

БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ  
ГОМОЛОГОВ ДЕФЕНЗИНОВ ПШЕНИЦЫ© 2023 г. М. П. Слезина<sup>1</sup>, Е. А. Истомина<sup>1</sup>, Т. И. Одинцова<sup>1</sup>, \*<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 11.07.2023 г.

Антимикробные пептиды (АМП) являются основными компонентами врожденного иммунитета растений и животных. Гены АМП обладают значительным внутри- и межвидовым полиморфизмом, роль которого практически не изучена. Ранее нами методом глубокого секвенирования транскриптомов растений пшеницы были выявлены гены дефензинов, экспрессия которых усиливалась при заражении патогенным грибом *Fusarium oxysporum* и/или обработке индукторами устойчивости. В настоящей работе был проведен биоинформатический поиск в базах данных NCBI пептидов-гомологов этих дефензинов пшеницы по последовательностям их  $\gamma$ -коров – участков молекул, ответственных за антимикробную активность. Гомологи дефензина DEFL1-16 были выявлены у 95 видов покрытосеменных растений, относящихся к 48 семействам и принадлежащих к 30 порядкам одно- и двудольных растений. Повсеместное распространение этого дефензина у покрытосеменных растений позволяет высказать предположение о его участии не только в защите, но и в других процессах в цветковых растениях. Гомологи других дефензинов, индуцированных заражением, обнаружены только у растений семейства Rosaceae, что предполагает наличие у мятликовых специфичного для этого семейства механизма защиты от патогенов, связанного с экспрессией этих дефензинов. Среди выявленных в ходе исследования вариантов  $\gamma$ -коров дефензинов дикорастущих растений могут быть пептиды с лучшей по сравнению с пшеницей антимикробной активностью, которые представляют несомненный интерес для разработки новых антибиотиков для медицины и сельского хозяйства.

**Ключевые слова:** иммунитет растений, антимикробные пептиды, дефензины, биоразнообразие генов.

**DOI:** 10.31857/S0016675823120111, **EDN:** QCCUZR

Каждый живой организм находится в постоянном контакте с различными патогенными микроорганизмами. Одним из эволюционно древних путей борьбы с ними является синтез антимикробных пептидов (АМП) – коротких полипептидных молекул, обладающих широким спектром антимикробного действия и разнообразным набором мишеней – от мембраны и клеточной стенки до трансляционного аппарата клетки. АМП обнаружены во всех царствах живого мира [1]. Считается, что в системе врожденного иммунитета они формируют “первую линию защиты” от патогенных микроорганизмов и вредителей. АМП обладают значительным внутри- и межвидовым полиморфизмом, роль которого практически не изучена. АМП растений подразделяют на несколько семейств: дефензины, тионины, снакины, липид-переносящие белки, циклотиды, гевеиноподобные и кноттиноподобные пептиды,  $\alpha$ -гарпинины [2–5]. Каждое семейство АМП включает, как правило, несколько пептидов, различающихся по аминокислотной последовательности и активности.

Большинство геномов растений и животных содержат 5–10 семейств генов АМП [6]. Таким образом, каждый вид содержит свой уникальный набор АМП, от которого зависит спектр патогенов для этого вида микроорганизмов, а также состав микробиома.

Наблюдаемое в настоящее время развитие устойчивости у патогенов к современным антибиотикам, связанное с их бесконтрольным использованием в медицине и сельском хозяйстве, представляет глобальную угрозу человечеству и требует поиска новых эффективных соединений для борьбы с инфекционными заболеваниями человека, сельскохозяйственных животных и растений. АМП в этом плане привлекают особое внимание исследователей, поскольку они сохранили свой антимикробный потенциал в непрекращающейся в ходе эволюции борьбе с различными видами патогенов [7]. Основным преимуществом АМП по сравнению с современными антибиотика-

ми является значительно более низкая скорость возникновения устойчивости к ним у патогенов и меньшее влияние на экологию, поскольку они менее стабильны в окружающей среде и распадаются до аминокислот.

Для того чтобы понять роль разнообразия АМП в защите растения-хозяина от различных патогенов, а также оценить их терапевтический потенциал для практического использования необходимо определить молекулярные детерминанты активности и понять их механизм действия в природном и эволюционном контекстах. Исследование детерминант антимикробной активности АМП показало, что антимикробная активность преимущественно связана с так называемым  $\gamma$ -кором — участком молекулы, обладающим мотивом  $GXCX_nC$  и характерной пространственной структурой, состоящей из двух  $\beta$ -тяжей, образующих шпильку [8].

Для выяснения роли АМП в иммунной системе растений ранее нами методом высокопроизводительного секвенирования транскриптомов был исследован молекулярный ответ растений пшеницы высокоустойчивого вида *Triticum kiharae* Dogof. et Migush. на заражение фитопатогенным грибом *Fusarium oxysporum*, а также на обработку индуктором устойчивости — метаболитами непатогенного штамма гриба *F. sambucinum* [9]. Нами было установлено, что как инфицирование патогеном, так и обработка индуктором устойчивости (элиситором) приводят к активации экспрессии не отдельных генов, а групп генов дефензинов различных подсемейств. Определив антимикробную активность  $\gamma$ -коров этих дефензинов, мы показали, что подавляющее большинство из них *in vitro* подавляет рост патогенного гриба *F. oxysporum* и целого ряда других патогенов растений и человека [10].

В связи с тем что дефензины относятся к эволюционно консервативным АМП, являясь неизменной составной частью врожденного иммунитета как растений, так и животных, представляло интерес выяснить насколько широко распространены в царстве растений гомологи дефензинов пшеницы, экспрессия генов которых индуцировалась заражением и/или индукторами устойчивости. В связи с этим целью настоящей работы был биоинформатический поиск гомологов этих дефензинов пшеницы у растений. Полученные в ходе подобного исследования сведения важны для понимания функционирования и эволюции иммунной системы растений, а также для практического использования пептидов на основе  $\gamma$ -коров дефензинов в качестве антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск гомологов дефензинов пшеницы осуществляли по базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) с помощью программы BLAST [11]. Определение сигнальной последовательности предшественников пептидов проводили с помощью программы SignalP 5.0 [12]. Выравнивание аминокислотных последовательностей и построение филогенетического дерева проводили с помощью программы MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [13].

В работе использовали классификацию растений по системе APG IV (всего в системе APG IV признано 416 семейств, отнесенных к 64 порядкам) [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска гомологов по последовательностям  $\gamma$ -коров были выбраны следующие дефензины пшеницы *T. kiharae*: DEFL1-16, DEFL1-32, DEFL1-11 и DEFL1-12. Экспрессия генов DEFL1-32, DEFL1-11 и DEFL1-12 индуцировалась заражением *F. oxysporum* [9]. Экспрессия гена дефензина DEFL1-16 активировалась при обработке растений пшеницы биогенными индукторами устойчивости, полученными из непатогенного штамма *F. sambucinum* [9]. Последовательности  $\gamma$ -коров выбранных пептидов были синтезированы методом твердофазного синтеза [10]. Они различались по физико-химическим свойствам, влияющим на антимикробную активность: длине, заряду, гидрофильности и амфифильности [10]. По данным молекулярного моделирования все пептиды содержали  $\alpha$ -спиральный участок.

Определение антимикробной активности против девяти патогенов (фитопатогенных бактерий и грибов, а также дрожжеподобных патогенов человека и животных) показало, что самой высокой ингибирующей активностью и самым широким спектром антимикробного действия обладал  $\gamma$ -кор DEFL1-16 [10]. Процент ингибирования всех тестированных патогенов варьировал от 50 до 100%. Ингибирование *F. oxysporum* достигало 70%.  $\gamma$ -Коры DEFL1-32 и DEFL1-12 подавляли рост гриба *F. oxysporum* несколько слабее — примерно на 60%.  $\gamma$ -Кор DEFL1-32 не действовал на *F. solani* и *F. verticillioides*, а DEFL1-12 был неактивным в отношении *F. verticillioides*. Самой слабой ингибирующей активностью обладал  $\gamma$ -кор DEFL1-11 [10]. Из девяти патогенов только три ингибировались этим пептидом, причем степень ингибирования не превышала 18%. Интересно, что  $\gamma$ -кор DEFL1-11 не подавлял рост четырех видов фузариевых грибов, включая *F. oxysporum* в тестах *in vitro*, хотя заражение этим патогеном сопровождалось усилением экспрессии его гена [9].

Поскольку, как отмечалось выше,  $\gamma$ -кор считается функционально важным элементом, определяющим антимикробную активность дефензинов и других цистеин-богатых пептидов, мы провели поиск гомологов дефензинов DEFL1-16, DEFL1-32 и DEFL1-11 в базах данных NCBI, используя в качестве запроса последовательности их  $\gamma$ -коров.

### DEFL1-16

Длина  $\gamma$ -кора DEFL1-16 составляет 18 аминокислотных остатков, он обладает максимальным положительным зарядом (+8) среди выбранных  $\gamma$ -коров (рис. 1) [10]. В результате проведенного поиска гомологи DEFL1-16 были обнаружены нами у 95 видов покрытосеменных растений, относящихся к 48 семействам и принадлежащих к 30 порядкам одно- и двудольных растений (рис. 1). В некоторых семействах было исследовано несколько видов, относящихся к одному или нескольким родам. В ряде случаев у одного вида растений было выявлено несколько гомологов DEFL1-16. У голосеменных растений и низших растений гомологи DEFL1-16 обнаружены не были. Из класса однодольных гомологи DEFL1-16 были найдены у растений восьми семейств: наиболее многочисленного семейства Poaceae (порядок Poales), Bromeliaceae (порядок Poales), Cyperaceae (порядок Poales), а также таких семейств как Arecaceae (порядок Arecales), Dioscoreaceae (порядок Dioscoreales), Asparagaceae (порядок Asparagales), Zosteraceae (порядок Alismatales) и Araceae (порядок Alismatales). У двудольных растений гомологи DEFL1-16 были обнаружены у растений 40 семейств. Жизненные формы растений-носителей гомологов DEFL1-16 самые разнообразные и включают деревья, кустарники и травы. Интересно, что гомологи DEFL1-16 выявлены как у наземных, так и у водных растений. К последним относятся так называемая «морская трава» *Zostera marina* (взморник морской, семейство Zosteraceae) — многолетнее травянистое растение, приспособленное к жизни в соленой воде морей и океанов [15]; *Spirodela intermedia* (многокоренник обыкновенный, или ряска многокоренниковая, семейство Araceae) — одно из наиболее быстро растущих цветковых растений, распространенное в умеренном поясе обоих полушарий в водоемах со стоячей или медленно текущей водой, а также *Nelumbo nucifera* (лотос орехоносный, семейство Nelumbonaceae) — тропический реликтовый вид, который растет в заболоченных местах, озерах и медленно текущих речках [16]. Гомологи DEFL1-16 обнаружены у видов как с широким ареалом распространения, так и приспособленных к жизни в экстремальных условиях высокогорья и повышенной засоленности почвы. Так, виды семейства Poaceae, одного из самых многочисленных и широко распространенных семейств однодольных растений, вклю-

чающего около 11 000 видов, произрастают во всех климатических зонах и на всех континентах. Представители семейства Rosaceae также заселяют самые разнообразные природные зоны — тундру, высокогорье, тропические леса, болота и полупустыни [16]. Лапчатка гусиная *Potentilla anserina* встречается в умеренной зоне по всему земному шару [17]. В то же время представитель этого же семейства — груша уссурийская *Pyrus ussuriensis*, в которой также был обнаружен гомолог DEFL1-16, распространена в Приморье и Приамурье и является самой морозостойкой грушей в мире, поскольку способна выдерживать температуру до  $-50^{\circ}\text{C}$  [18]. Представители семейства Malvaceae хотя тоже широко распространены, но преобладают в тропиках и практически отсутствуют в арктической зоне. В качестве примера можно привести представителей рода *Gossypium*, которые растут в тропической и субтропической зонах [16]. В то же время ряд растений-носителей гена DEFL1-16 имеют очень ограниченный ареал распространения. Так, *Cinnamomum micranthum* f. *kanehirae* (камфорное дерево, семейство Lauraceae) является эндемиком Тайваня, произрастающим на высоте до 2000 м [19]. Реликтовым деревом с ограниченным ареалом, растущим в Китае, Вьетнаме и восточных Гималаях на высоте 1100–3500 м над уровнем моря, является и тетрацентрон китайский *Tetracentron sinense* (семейство Trochodendraceae) [20]. Хлебная зерновая культура *Chenopodium quinoa* (киноа, семейство Amaranthaceae) также адаптирована к жизни на высоте 3000–4000 м над уровнем моря в условиях бедных почв и сурового климата и хорошо переносит резкие перепады температур, засуху и заморозки [16]. Приспособлена к жизни в условиях высокогорья и *Kingdonia uniflora* — многолетнее травянистое растение, растущее в горных районах Западного и Северного Китая [21]. К растениям-носителям гена DEFL1-16 относятся и *Arabis nemorensis* (резуха Жерара, семейство Brassicaceae) — растение с уникальной экологией, семена которого способны выдерживать длительные периоды затопления и засухи [16], и *Eutrema salsugineum* (эвтрема солонцовая, семейство Brassicaceae) — галофильный вид, адаптированный к жизни на засоленной почве [22]. В экстремальных условиях произрастает и *Parasponia andersonii*, заселяющая вулканические склоны Малайского архипелага [23]. Чрезвычайно широкое распространение растений-носителей гена DEFL1-16 подтверждается и тем, что он был обнаружен в экологической группе полупаразитических растений семейства Orobanchaceae — у вшивосемянника японского *Phtheirospermum japonicum*, распространенного в Восточной и Северо-Восточной Азии [24]. Обнаружен он и у насекомоядного растения — цефалота мешочкового (*Cephalotus follicularis*, семейство Cephalotaceae), произрастающего в Западной Австралии [25].

Среди растений-носителей генов гомологов DEFL1-16 много хозяйственно ценных и медицинских растений. К первым относятся, прежде всего, хлебные злаки (семейство Poaceae), такие как пшеница, ячмень, кукуруза, овес, просо, сорго и рис, и масличные культуры, такие как подсолнечник, маслина, арахис, кунжут, масличная пальма [16, 26]. Многие виды, в которых были обнаружены гомологи DEFL1-16, относятся к медицинским растениям, среди них такое уникальное растение как женьшень настоящий *Panax ginseng* семейства Agaliaceae, встречающийся на Дальнем Востоке [16]. Экстракты многих растений-носителей генов гомологов DEFL1-16 обладают терапевтическим действием. Так, показано, что этанольный экстракт листьев *Cinnamom micranthum* f. *kanehirae* обладает антимикробными свойствами и цитотоксическим действием на раковые клетки [19]. Экстракт *Momordica charantia* обладает цитотоксическим действием на клетки рака поджелудочной железы, а также используется при лечении малярии и ВИЧ [27]. *Handroanthus impetiginosus* используют для лечения целого ряда заболеваний, в том числе воспалительных процессов, грибных инфекций и опухолей [28]. Лапчатка гусиная *P. anserina* эффективна при лечении воспалительных заболеваний кожи, горла и полости рта [17]. Роль гомологов DEFL1-16 в лечебных свойствах растений-носителей этого пептида не изучена.

Подводя итог краткой характеристике видов – носителей гена DEFL1-16 можно утверждать, что среди покрытосеменных растений ген дефензина DEFL1-16 распространен очень широко, если не повсеместно.

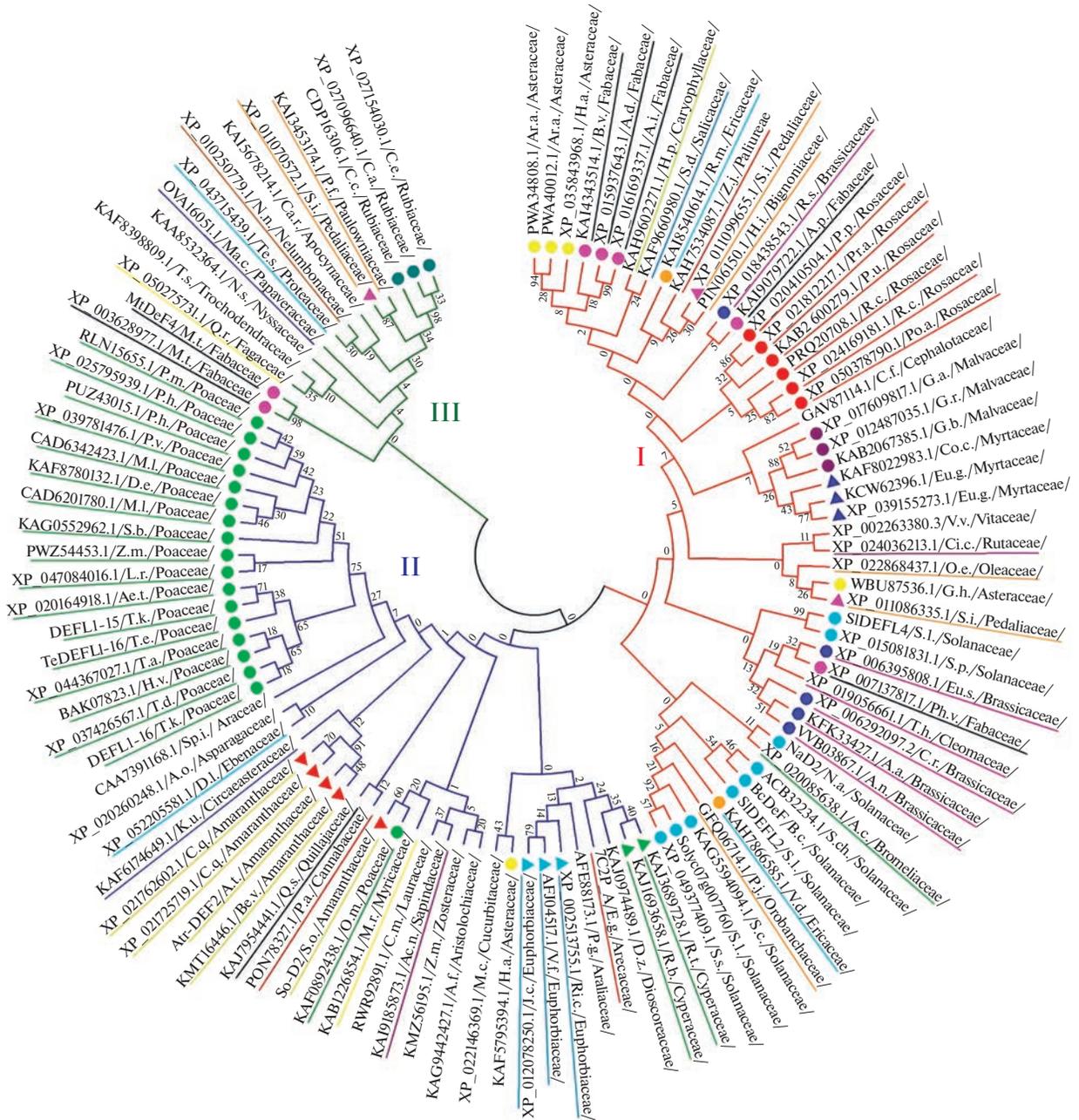
Аминокислотные последовательности гомологов предшественника DEFL1-16 приведены на рис. 1. Известно, что в зависимости от структуры предшественника дефензины растений подразделяются на два класса: дефензины класса 1 синте-

зируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида и зрелого пептида. Дефензины класса 2 содержат еще и С-концевой продомен. Обнаруженные нами дефензины-гомологи DEFL1-16 относятся к дефензинам класса 1. Сравнение аминокислотных последовательностей всех предшественников показывает, что сигнальный пептид, который ответствен за транспорт дефензина в апопласт, является наименее консервативной областью предшественников (рис. 1). Последовательности зрелого пептида достаточно консервативны. Причем в пределах одного семейства (у представителей разных родов) сходство последовательностей гомологов DEFL1-16 выше, чем между гомологами, принадлежащими разным семействам. Однако если сравнить последовательности гомологов всех изученных семейств растений, то помимо консервативных остатков цистеина в N-концевой области молекулы (остатки 1–36) лишь четыре остатка являются неизменными у всех гомологов: это R6, S12, N24 и E32 (рис. 2). Напротив, находящийся в С-концевой области пептида  $\gamma$ -кор оказывается наиболее консервативным участком всей молекулы дефензина. В 10-членном мотиве  $\gamma$ -кора GXCX<sub>n</sub>C помимо G в положении 37, G в положении 41 и RRR в положениях 43–45 встречаются у всех гомологов DEFL1-16 (рис. 2). Более того, R в положении 40 встречается почти во всех последовательностях. Лишь в двух в этом положении находится K и в одном – H. Таким образом, в положении 40 всегда расположена основная аминокислота. В положении 42 в подавляющем большинстве случаев находится F, в шести последовательностях – L и в одной – I. Таким образом, в положении 42 всегда расположена гидрофобная аминокислота. Чрезвычайно высокий консерватизм последовательности  $\gamma$ -кора у гомологов DEFL1-16 у огромного числа филогенетически удаленных видов свиде-

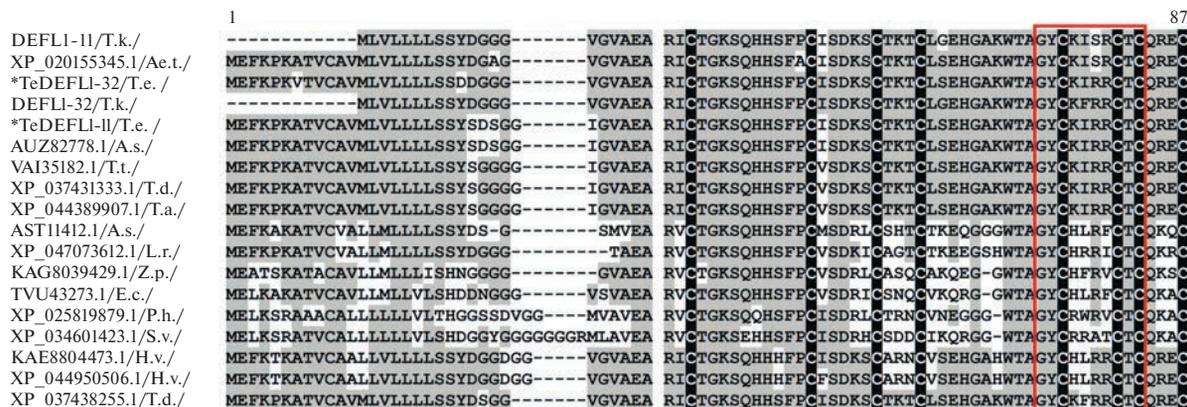
**Рис. 1.** Множественное выравнивание последовательностей гомологов предшественника DEFL1-16 пшеницы, представленных в базе данных NCBI. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Сигнальная последовательность и область зрелого пептида разделены пробелом. Последовательность  $\gamma$ -кора обведена рамкой. Использованы следующие сокращения: C.e., *Coffea eugenoides*; C.a., *Coffea arabica*; C.c., *Coffea canephora*; P.f., *Paulownia fortunei*; S.i., *Sesamum indicum*; Ca.r., *Catharanthus roseus*; N.n., *Nelumbo nucifera*; Te.s., *Telopea speciosissima*; Ma.c., *Macleaya cordata*; N.s., *Nyssa sinensis*; T.s., *Tetracentron sinense*; Q.r., *Quercus robur*; M.t., *Medicago truncatula*; P.m., *Panicum miliaceum*; P.h., *Panicum hallii*; P.v., *Panicum virgatum*; M.l., *Miscanthus lutarioriparius*; D.e., *Digitaria exilis*; S.b., *Sorghum bicolor*; Z.m., *Zea mays*; L.r., *Lolium rigidum*; Ae.t., *Aegilops tauschii* subsp. *strangulata*; T.k., *Triticum kiharae*; T.e., *Thinopyrum elongatum*; T.a., *Triticum aestivum*; H.v., *Hordeum vulgare*; T.d., *Triticum dicoccoides*; Sp.i., *Spirodela intermedia*; A.o., *Asparagus officinalis*; D.l., *Diospyros lotus*; K.u., *Kingdonia uniflora*; C.q., *Chenopodium quinoa*; A.t., *Amaranthus tricolor*; Be.v., *Beta vulgaris*; Q.s., *Quillaja saponaria*; P.a., *Parasponia andersonii*; S.o., *Spinacia oleraceae*; O.m., *Oryza meyeriana*; M.r., *Morella rubra*; C.m., *Cinnamomum micranthum* f. *kanehirae*; Ac.n., *Acer negundo*; Zo.m., *Zostera marina*; A.f., *Aristolochia fimbriata*; M.c., *Momordica charantia*; H.a., *Helianthus annuus*; J.c., *Jatropha curcas*; V.f., *Vernicia fordii*; Ri.c., *Ricinus communis*; P.g., *Panax ginseng*; E.g., *Elaeis guineensis*; D.z., *Dioscorea zingiberensis*; R.b., *Rhynchospora breviuscula*; R.t., *Rhynchospora tenuis*; S.s., *Solanum stenotomum*; S.l., *Solanum lycopersicum*; S.c., *Solanum commersonii*; P.j., *Phtheirospermum japonicum*; V.d., *Vaccinium darrowii*; B.c., *Brugmansia × candida*; S.ch., *Solanum chacoense*; A.c., *Ananas comosus*; N.a., *Nicotiana glauca*; A.n., *Acer negundo*; A.a., *Artemisia annua*; C.r., *Capsella rubella*; T.h., *Tarenaya hassleriana*; Ph.v., *Phaseolus vulgaris*; Eu.s., *Eutrema salsugineum*; S.p., *Solanum pennellii*; G.h., *Gerbera hybrida*; O.e., *Olea europaea* var. *sylvestris*; Ci.c., *Citrus clementina*; V.v., *Vitis vinifera*; Eu.g., *Eucalyptus grandis*; Co.c., *Corymbia citriodora*; G.b., *Gossypium barbadense*; G.r., *Gossypium raimondii*; G.a., *Gossypium arboreum*; C.f., *Cephalotus follicularis*; Po.a., *Potentilla anserina*; R.c., *Rosa chinensis*; P.u., *Pyrus ussuriensis*; Pr.a., *Prunus avium*; P.p., *Prunus persica*; A.p., *Acacia pycnantha*; R.s., *Raphanus sativus*; H.i., *Handroanthus impetiginosus*; Z.j., *Ziziphora jujuba* var. *spinosa*; R.m., *Rhododendron molle*; S.d., *Salix dunnii*; H.p., *Heliosperma pusillum*; A.i., *Arachis ipaensis*; A.d., *Arachis duranensis*; B.v., *Bauhinia variegata*; Ar.a., *Artemisia annua*. \* Последовательность выведена на основе геномных данных [10].

XP_027154030.1/C.e./Rubiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_027096640.1/C.a./Rubiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
CDP16306.1/C.c./Rubiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KA13453174.1/P.t./Paulowniaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_011070572.1/S.i./Pedaliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KA15678214.1/C.a./Apocynaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_012507729.1/N.n./Nelumbonaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_043715439.1/T.s./Protaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
OWA16051.1/M.a./Papaveraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAAS532364.1/N.s./Nyssaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAFF839889.1/T.s./Trochodendraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_050275731.1/Q.r./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
MtDeF4.M.t./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_003628977.1/M.t./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
RLN15655.1/P.m./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_025795939.1/P.h./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PUZ43015.1/P.h./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_039781476.1/P.v./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
CAD6342423.1/M.l./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAFF870132.1/D.e./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
CAD6201780.1/M.l./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAG0552962.1/S.b./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PWZ54453.1/Z.m./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_047084016.1/L.r./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_020164918.1/A.e.t./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
DEFL1-15/T.k./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
*TeDEFL1-16/T.a./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_044367027.1/T.a./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
BAK07823.1/H.v./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_037426567.1/T.d./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
DEFL1-16/T.k./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
CAA7391168.1/Sp.i./Araceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_020620248.1/A.o./Asparagaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_052205581.1/D.l./Ebenaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAf6174649.1/K.u./Circaceasteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_021762602.1/C.q./Amaranthaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_021725719.1/C.q./Amaranthaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
Attr-DEF2/A.t./Amaranthaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KMT16446.1/Be.v./Amaranthaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAJ7954441.1/Q.s./Quillajaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PON78327.1/P.a./Cannabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
So-D2/S.o./Amaranthaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAf0892438.1/O.m./Poaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAB1226854.1/M.r./Myricaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
RWR92891.1/C.m./Lauraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KA19185873.1/A.n./Sapindaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KMZ56195.1/Z.m./Zosteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KA9442427.1/A.f./Aristolochiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_022146369.1/M.c./Cucurbitaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAf595394.1/H.a./Asteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_012078250.1/J.e./Euphorbiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
AFJ04517.1/V.t./Euphorbiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_002513755.1/R.ic./Euphorbiaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
AFES8173.1/P.g./Araliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
7C2P A/E.g./Araliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAJ0974489.1/D.z./Dioscoreaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAJ1693658.1/R.b./Cyperaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAJ3689728.1/R.t./Cyperaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_049377409.1/S.s./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
Solyc07g007760/S.i./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAG5594094.1/S.c./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
FQ06714.1/P.j./Orobanchaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAH7866585.1/J.d./Ericaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
S1DEFLL2/S.i./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
BcDeF/B.c./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
ACB32234.1/S.ch./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_020085638.1/G.b./Bromeliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
NaD2/N.a./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
WB03867.1/A.n./Brassicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KFK33427.1/A.a./Brassicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_006292097.2/C.r./Brassicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_010956661.1/T.h./Cleomaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_007137817.1/P.h./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_006395808.1/E.us./Brassicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_015081831.1/S.s./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
SIDEFL4/S.i./Solanaeae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_011086335.1/S.i./Pedaliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
WBU87536.1/G.h./Asteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_022684837.1/O.e./Oleaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_024036213.1/C.i./Rutaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_020263380.3/V.v./Vitaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_039155273.1/E.u.g./Myrtaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KCw62396.1/E.u.g./Myrtaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAf8022983.1/Co.c./Myrtaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAB2067385.1/G.b./Malvaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_012487035.1/G.r./Malvaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_017609817.1/G.a./Malvaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
GAV87114.1/C.f./Cephalotaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_050378790.1/P.o./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_024169181.1/R.c./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PRQ20708.1/R.c./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAB2600279.1/C.u./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_021812217.1/Pr.a./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_020410504.1/P.d./Rosaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAJ9079722.1/A.p./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_018438543.1/R.s./Brassicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PIN06150.1/H.i./Bignoniaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_011099655.1/S.i./Pedaliaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAH7534087.1/Z.j./Paluriaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAH8540614.1/R.m./Ericaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAf9660980.1/S.d./Salicaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KAH9602271.1/H.p./Caryophyllaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_016169337.1/A.i./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_015937643.1/A.d./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
KA14343514.1/B.v./Fabaceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
XP_035843968.1/H.a./Asteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PWA40012.1/Ar.a./Asteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH
PWA34808.1/Ar.a./Asteraceae/	---MRSFMRLSATVLLLLAL-FMASDMG---PIGVAEA	RICEQSQRHFVKGPVRRKSNCAVCGTEGFGHGGRGFRFRRCGTRKH





**Рис. 3.** Филогенетическое дерево дефензинов-гомологов DEFL1-16, построенное методом присоединения соседей (Neighbor-joining) с помощью программы MEGA7 [13]. Статистический анализ дерева был проведен методом бутстрэп (Bootstrap) с 10000 повторами. Дефензины представителей семейства Poaceae отмечены салатовыми кружками, семейства Fabaceae – розовыми кружками, семейства Rosaceae – красными кружками, семейства Solanaceae – бирюзовыми кружками, семейства Brassicaceae – синими кружками, семейства Asteraceae – желтыми кружками, семейства Malvaceae – фиолетовыми кружками, семейства Rubiaceae – темнобирюзовыми кружками, семейства Ericaceae – оранжевыми кружками. Дефензины представителей семейства Suraceae отмечены салатовыми треугольниками, семейства Pedaliaceae – розовыми треугольниками, семейства Amaranthaceae – красными треугольниками, семейства Euphorbitaceae – бирюзовыми треугольниками, семейства Myrtaceae – синими треугольниками. Нижним подчеркиванием одинакового цвета отмечены семейства одного порядка: зеленым – Poales, фиолетовым – Sapindales, синим – Ranunculales, оранжевым – Lamiales, черным – Fabales, розовым – Brassicales, красным – Rosales, бирюзовым – Ericales, голубым – Malpighiales, коричневым – Proteales, желтым – Fagales, салатовым – Caryophyllales. Группы гомологов обозначены разным цветом ветвей: группа I – красным, группа II – синим, группа III – зеленым. Сокращения см. подпись к рис. 1.



**Рис. 4.** Множественное выравнивание последовательностей гомологов предшественников DEFL1-11 и 1-32 пшеницы, представленных в базе данных NCBI. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Сигнальная последовательность и область зрелого пептида разделены пробелом. Последовательность  $\gamma$ -кора обведена рамкой. Использованы следующие сокращения: T.k., *T. kiharae*; Ae.t., *Ae. tauschii* subsp. *strangulata*; T.e., *Th. elongatum*; A.s., *Avena sativa*; T.t., *Triticum turgidum* subsp. *durum*; T.d., *T. dicoccoides*; T.a., *T. aestivum*; L.r., *L. rigidum*; Z.p., *Zizania palustris*; E.c., *Eragrostis curvula*; P.h., *P. hallii*; S.v., *Setaria viridis*; H.v., *H. vulgare*. \* Последовательность выведена на основе геномных данных [10].

участвует в иммунном ответе растений пшеницы на заражение *F. oxysporum*. Для этого используются другие дефензины или АМП, или иные защитные соединения. Нами установлено, что заражение пшеницы приводило к усилению экспрессии четырех генов дефензинов DEFL1-11, DEFL1-12, DEFL1-32 и DEFL1-43 [9]. Однако в устойчивости, индуцированной непатогенными штаммами микроорганизмов или другими элиситорами, дефензин DEFL1-16, несомненно, участвует. Роль паралога дефензина DEFL1-15 остается неясной. Возможно, он участвует в защите от других патогенов или выполняет какие-то иные (не защитные) функции. Таким образом, уже в пределах одного вида происходит разделение функций у паралогов DEFL-16. Сходная ситуация наблюдается у томатов. В транскриптомах томатов нами выявлено три гена гомологов DEFL1-16 пшеницы: SIDEFL1, -2 и -4 [31]. Экспрессия генов дефензинов SIDEFL1 и SIDEFL2, как и DEFL1-16 пшеницы, усиливалась лишь при обработке индукторами устойчивости, и только экспрессия гена SIDEFL4 многократно усиливалась при заражении грибом *F. oxysporum*. Эти данные свидетельствуют о том, что лишь SIDEFL4 участвует в защите от гриба *F. oxysporum*. Как и в случае DEFL1-15, возможно, что другие паралоги связаны с защитой от других патогенов (или стрессовых факторов).

Чрезвычайно широкое распространение гомологов DEFL1-16 среди покрытосеменных растений наводит на мысль о том, что этот дефензин может выполнять и другие, не связанные с защитой, жизненно важные функции. Наличие у дефензинов более одной функции (полифункциональность) была показана для некоторых из них [32–34]. Полученные нами данные по дифференциальной экспрессии генов дефензинов у пшеницы и томата также свидетельствуют в пользу этого

предположения. Поскольку гомологи DEFL1-16 были обнаружены нами только у покрытосеменных растений, возможно, что этот пептид участвует в процессах развития цветка или двойного оплодотворения.

#### DEFL1-11 и DEFL1-32

Длина  $\gamma$ -коров DEFL1-11 и DEFL1-32 составляет 14 остатков, они различаются лишь двумя аминокислотными остатками: IS у  $\gamma$ -кора DEFL1-11 заменен на FR у DEFL1-32 (рис. 4). Петля между первым и вторым цистеинами у  $\gamma$ -коров DEFL1-11 и DEFL1-32 короче, чем у DEFL1-16, на два остатка. Заряд  $\gamma$ -коров DEFL1-32 и DEFL1-11 также отличался +3 и +2 соответственно [10]. Поиск гомологов близкородственных дефензинов DEFL1-11 и DEFL1-32 показал, что в отличие от DEFL1-16 они выявляются только у растений семейства Poaceae (рис. 4). Более того, гомологи с точно таким же  $\gamma$ -коровом, как у DEFL1-11 и DEFL1-32, обнаружены только у представителей рода *Triticum* и у *Ae. tauschii*, который считается донором генома D полиплоидным пшеницам. Как отмечалось выше, неактивный DEFL1-11 отличается от высокоактивного DEFL1-32 двумя аминокислотными остатками в  $\gamma$ -коре: IS у DEFL1-11 заменен на FR у DEFL1-32. Таким образом, эта замена приводит к потере активности. У представителей рода *Triticum* (*T. turgidum*, *T. dicoccoides*, *T. aestivum*), а также у пырея и овса S заменен на R. Такая замена увеличивает заряд  $\gamma$ -кора, поэтому можно предположить, что она приводит к усилению антимикробных свойств, т.е. пептиды с IR, вероятно, обладают антимикробными свойствами, в отличие от пептидов с IS, таких как DEFL1-11. Однако это предположение нуждается в экспериментальной проверке. Вместо K4 встречаются другие основ-



**Рис. 5.** Множественное выравнивание последовательностей гомологов предшественников DEFL1-12 и 1-43 пшеницы, представленных в базе данных NCBI. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Сигнальная последовательность и область зрелого пептида разделены пробелом. Последовательность  $\gamma$ -кора обведена рамкой. Использованы следующие сокращения: T.k., *T. kiharae*; T.d., *T. dicoccoides*; Ae.t., *Ae. tauschii* subsp. *strangulata*; A.s., *A. sativa*; T.e., *Th. elongatum*; H.v., *H. vulgare*; S.i., *S. italica*; M.l., *Miscanthus lutarioriparius*; S.b., *S. bicolor*; Z.m., *Z. mays*; D.e., *Digitaria exilis*; S.v., *S. viridis*; P.h., *P. hallii*; P.v., *P. virgatum*; E.c., *Eleusine coracana* subsp. *coracana*; L.r., *L. rigidum*. \* Последовательность выведена на основе геномных данных [10].

ные аминокислоты — H или R. Непонятно, влияет ли это на активность пептида. Вместо F5 встречается I, L или W. Поскольку все эти аминокислоты относятся к гидрофобным, возможно, что пептиды с I, L или W обладают такой же активностью, как DEFL1-32. Следует, однако, отметить, что триптофан является мембраноактивной аминокислотой, поэтому не исключена вероятность того, что  $\gamma$ -кор с триптофаном, как у *P. hallii*, обладает более высокой активностью, чем DEFL1-32. Интересно, что в отличие от DEFL1-16, у которого  $\gamma$ -кор является более консервативной частью молекулы, чем другие участки, у гомологов DEFL1-11 и DEFL1-32 одновременно с заменами в  $\gamma$ -коре наблюдаются и замены в других частях молекул дефензинов.

Экспрессия обоих генов DEFL1-11 и DEFL1-32 усиливалась при инфицировании *F. oxysporum* и в зараженных растениях после обработки элиситорами. Поскольку DEFL1-32 подавлял рост *F. oxysporum* в тестах *in vitro*, усиление экспрессии его гена свидетельствует в пользу его участия в подавлении роста этого патогена в растениях пшеницы (*in planta*). Роль DEFL1-11 остается неясной, поскольку он не подавлял рост *F. oxysporum in vitro*, хотя экспрессия его гена и усиливалась при заражении грибом. Можно предположить, что DEFL1-11 действует в синергизме с другими дефензинами (АМП или другими защитными белками), усиливая их антифунгальное действие. Нельзя исключить существование и еще каких-то (не антимикробных) функций у DEFL1-11. И наконец, экспрессия “коктейлей” АМП в ответ на заражение патогеном, в которых есть пептиды, неактивные в отношении именно этого патогена, может иметь смысл в природном контексте. Инфицирование растений в природных условиях часто про-

исходит не одним, а сразу несколькими патогенами, в связи с чем синтез сразу целого набора АМП с различными спектрами действия приобретает смысл. Более того возможно и другое объяснение. Растение может не совсем точно идентифицировать “врага”, а синтез антимикробных “коктейлей” позволит все же защититься.

### DEFL1-12/DEFL1-43

Мы провели также поиск гомологов других дефензинов, индуцированных заражением *F. oxysporum*. Это дефензины DEFL1-12 и DEFL1-43. Их  $\gamma$ -кору длиной 16 аминокислотных остатков и зарядом +3 одинаковы, а в зрелом пептиде есть различие лишь по одному аминокислотному остатку (рис. 5). Как и в случае с DEFL1-11 и DEFL1-32, гомологи этих дефензинов выявляются только у злаков (рис. 5). Последовательность  $\gamma$ -кору этих дефензинов менее консервативна, чем у DEFL1-16. В последовательности петли между двумя остатками цистеина 10-членного мотива  $\gamma$ -кору GXCX<sub>n</sub>C у всех выявленных гомологов одинаковы лишь две аминокислоты: G в положении 5 и R в положении 8. В положении 4 в большинстве последовательностей находится D. Наблюдаемые замены в последовательности  $\gamma$ -кору у гомологов приводят либо к увеличению положительного заряда пептида, либо к усилению гидрофобных свойств. Каким образом эти изменения влияют на антимикробную активность пептида, еще предстоит установить.

Подводя итог полученным результатам, можно сказать, что из изученных дефензинов пшеницы только гомологи DEFL1-16 были обнаружены у очень большого числа видов покрытосеменных

растений, что позволяет предположить наличие у этого дефензина уникальных, ключевых для растений функций, возможно связанных не только с защитой от патогенов. Высокий консерватизм последовательности  $\gamma$ -кора этого дефензина свидетельствует о том, что он подвержен строгим функциональным ограничениям, важным для функционирования содержащих эту последовательность дефензинов, и находится под действием сильного стабилизирующего отбора. Повсеместное распространение гомологов DEFL1-16 у покрытосеменных растений делает этот дефензин особо привлекательным для дальнейших исследований его биологических функций и роли выявленных мутаций в  $\gamma$ -коре в биологической активности, что послужит основой для разработки на его основе пептидных антибиотиков нового поколения. Гомологи других дефензинов пшеницы, индуцированных заражением патогенным грибом, обнаружены только у растений семейства Poaceae. Это дает основание предполагать наличие у них общего и характерного только для этого семейства механизма защиты от патогенов, связанного с экспрессией этих генов дефензинов. Однако это предположение нуждается в экспериментальной проверке и предполагает транскриптомный анализ различных представителей этого семейства в ответ на заражение. Последовательности  $\gamma$ -коров дефензинов, индуцированных заражением, менее консервативны в эволюции, чем  $\gamma$ -кор DEFL1-16. Можно предположить, что эти последовательности находятся под действием движущего отбора, который усиливает антимикробные свойства пептида или изменяет его функцию. В связи с этим особый интерес представляют исследования активности  $\gamma$ -коров дефензинов не культурных, а устойчивых к патогенам дикорастущих видов, таких как пырей. Работы в этом направлении нами уже ведутся. Как показали наши исследования, мутации в  $\gamma$ -коре могут приводить и к потере антимикробных свойств, как в случае DEFL1-11, что может свидетельствовать о происходящей неофункционализации, которая может быть оправдана в определенных условиях в природе при снижении инфекционной нагрузки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-16-00010.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zasloff M.* Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature*. 2002. № 415. P. 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
2. *Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L.* Antimicrobial peptides from plants // *Pharmaceuticals*. 2015. V. 8. № 4. P. 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
3. *Li J., Hu S., Jian W. et al.* Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications // *Bot. Stud.* 2021. V. 62. № 1. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
4. *Lima A.M., Azevedo M.I.G., Sousa L.M. et al.* Plant antimicrobial peptides: An overview about classification, toxicity and clinical applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 214. P. 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.043>
5. *Zou F., Tan C., Shinali T.S. et al.* Plant antimicrobial peptides: A comprehensive review of their classification, production, mode of action, functions, applications, and challenges // *Food Funct.* 2023. V. 14. № 12. P. 5492–5515. <https://doi.org/10.1039/d3fo01119d>
6. *Lazzaro B.P., Zasloff M., Rolff J.* Antimicrobial peptides: Application informed by evolution // *Science*. 2020. V. 368. № 6490. <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>
7. *Zhu Y., Hao W., Wang X. et al.* Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections // *Med. Res. Rev.* 2022. V. 42. № 4. P. 1377–1422. <https://doi.org/10.1002/med.21879>
8. *Yount N.Y., Yeaman M.R.* Multidimensional signatures in antimicrobial peptides // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 19. P. 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
9. *Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. et al.* Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: A focus on structural diversity and role in induced resistance // *PeerJ*. 2019. V. 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6125>
10. *Slezina M.P., Istomina E.A., Kulakovskaya E.V. et al.* The  $\gamma$ -core motif peptides of AMPs from grasses display inhibitory activity against human and plant pathogens // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158383>
11. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
12. *Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 340. № 4. P. 783–795. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>
13. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
14. *The Angiosperm Phylogeny Group, Chase M.W., Christenhusz M.J.M. et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. V. 181. № 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
15. *Вехов В.Н.* Зостера морская Белого моря. М.: МГУ, 1992. 144 с.
16. Жизнь растений. Т. 5. Ч. 2. Цветковые растения / Под ред. Тахтаджяна А.Л. М.: Просвещение, 1981. 511 с.
17. *Понов А.П.* Лекарственные растения в народной медицине. Киев: Здоров'я, 1967. 316 с.
18. *Усенко Н.В.* Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока. Хабаровск: Хабаровское кн. изд-во, 1984. С. 110–111.
19. *Li P.-H., Shih Y.-J., Lu W.-C. et al.* Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and anticancer properties

- of *Cinnamomum kanehirae* Hayata leaves extracts // Arab. J. Chem. 2023. V. 16. № 7. 104873. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104873>
20. Endress P.K. Trochodendraceae // Flowering Plants Dicotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants. V. 2. Berlin; Heidelberg: Springer, 1993. P. 599–602. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5\\_74](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_74)
  21. Sun Y., Deng T., Zhang A. et al. Genome sequencing of the endangered *Kingdonia uniflora* (Circaceasteraceae, Ranunculales) reveals potential mechanisms of evolutionary specialization // iScience. 2020. V. 23. № 5. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101124>
  22. Li C., Duan C., Zhang H. et al. Adaptative mechanisms of halophytic *Eutrema salsugineum* encountering saline environment // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.909527>
  23. Dupin S.E., Geurts R., Kiers E.T. The non-legume *Parasponia andersonii* mediates the fitness of nitrogen-fixing rhizobial symbionts under high nitrogen conditions // Front. Plant Sci. 2020. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01779>
  24. Clarke C.R., Timko M.P., Yoder J.I. et al. Molecular dialog between parasitic plants and their hosts // Annu. Rev. Phytopathol. 2019. V. 57. P. 279–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100043>
  25. Conran J.G. Cephalotaceae // Flowering Plants Dicotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants. Berlin; Heidelberg: Springer, 2004. V. 6. P. 65–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-07257-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07257-8_7)
  26. Жизнь растений. Т. 6. Цветковые растения / Под ред. Тахтаджяна А.Л. М.: Просвещение, 1982. 543 с.
  27. Li C.J., Tsang S.F., Tsai C.H. et al. *Momordica charantia* extract induces apoptosis in human cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012. V. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/261971>
  28. Zhang J., Hunto S.T., Yang Y. et al. *Tabebuia impetiginosa*: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and immunopharmacological properties // Molecules. 2020. V. 25. № 18. <https://doi.org/10.3390/molecules25184294>
  29. Huang W., Zhang L., Columbus J.T. et al. A well-supported nuclear phylogeny of Poaceae and implications for the evolution of C4 photosynthesis // Mol. Plant. 2022. V. 15. № 4. P. 755–777. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.01.015>
  30. Slezina M.P., Istomina E.A., Kulakovskaya E.V. et al. Synthetic oligopeptides mimicking  $\gamma$ -core regions of cysteine-rich peptides of *Solanum lycopersicum* possess antimicrobial activity against human and plant pathogens // Curr. Issues Mol. Biol. 2021. V. 43. № 3. P. 1226–1242. <https://doi.org/10.3390/cimb43030087>
  31. Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V. et al. Molecular insights into the role of cysteine-rich peptides in induced resistance to *Fusarium oxysporum* infection in tomato based on transcriptome profiling // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115741>
  32. Stotz H.U., Spence B., Wang Y. A defensin from tomato with dual function in defense and development // Plant Mol. Biol. 2009. V. 71. № 1–2. P. 131–143. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9512-z>
  33. Allen A., Snyder A.K., Preuss M. et al. Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth // Planta. 2008. V. 227. № 2. P. 331–339. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0620-1>
  34. Mith O., Benhamdi A., Castillo T. et al. The antifungal plant defensin AhPDF1.1b is a beneficial factor involved in adaptive response to zinc overload when it is expressed in yeast cells // Microbiologyopen. 2015. V. 4. № 3. P. 409–422. <https://doi.org/10.1002/mbo3.248>

## Biological Diversity of Genes Encoding Wheat Defensin Homologues

M. P. Slezina<sup>a</sup>, E. A. Istomina<sup>a</sup>, and T. I. Odintsova<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Antimicrobial peptides (AMPs) are major components of innate immunity in plants and animals. AMP genes have significant intra- and interspecific polymorphism, the role of which is poorly understood. Previously, by high throughput transcriptome sequencing of wheat plants, we identified defensin genes up-regulated upon infection with the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* and/or treatment with resistance inducers. In the present work, a bioinformatic search in NCBI databases for peptide homologues of these defensins was carried out using the sequences of their  $\gamma$ -cores, the sites of the molecules responsible for antimicrobial activity. DEFL1-16 homologues were identified in 95 species of angiosperms belonging to 48 families and 30 orders of monocotyledonous and dicotyledonous plants. The ubiquitous distribution of this defensin in angiosperms suggests its involvement not only in defense, but also in other processes in flowering plants. Homologues of other defensins induced by infection were found only in plants of the Poaceae family, which suggests the existence of a Poaceae-specific defense mechanism associated with the expression of these defensins. Among the  $\gamma$ -core variants of wild plant defensins identified in the study, the peptides with better antimicrobial activity compared to wheat, might be present, which are of considerable interest for the development of new antibiotics for medicine and agriculture.

**Keywords:** plant immunity, antimicrobial peptides, defensins, gene biodiversity.