

Л.А. Лутова,
Г.М. Шумилина

Кафедра генетики и селекции
Санкт-Петербургского государственного университета

МЕТАБОЛИТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ РОЛЬ В УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ

✿ В обзоре рассмотрена роль различных фитометаболитов в обеспечении устойчивости растений. Особое внимание уделено двум стратегиям получения устойчивых к патогенам растений: благодаря уменьшению питательной ценности растений для патогена и за счет синтеза различных антимикробных соединений. Возможность применения первого подхода описана на примере зависимости некоторых патогенов от стерина растений. Обобщены полученные на сегодняшний день данные о метаболизме, функциях стерина и мутантах по биосинтезу этих соединений. В использовании второй стратегии основную роль играют определенные классы вторичных метаболитов. На конкретных примерах показана роль отдельных фитоалексинов и стероидных гликоалкалоидов в повышении устойчивости растений к патогенам.

✿ **Ключевые слова:** вторичные метаболиты, фитостерины, мутанты, устойчивость к вредителям.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема устойчивости растений к болезням в последнее десятилетие стала одним из главных направлений в области генетики и физиологии растений. Основное внимание при этом уделяется олиогенной устойчивости, которая обеспечивает устойчивость растений к определенным генотипам патогена и контролируется работой всего лишь нескольких R-генов. В то же время другой тип устойчивости — полигенная или полевая устойчивость обладает рядом преимуществ. В частности, именно этот тип устойчивости обеспечивает невосприимчивость растений к широкому спектру патогенов, независимо от расовой принадлежности последних, ограничивает численность популяции патогена и расообразовательные процессы, протекающие в них. К сожалению, факторы, лежащие в основе полигенной устойчивости, мало изучены. В связи с этим особый интерес представляет выявление растительных метаболитов, отсутствие или недостаток которых в растении тормозит развитие патогена и предупреждает его размножение. Подобный эффект характерен для ряда вторичных метаболитов растений и стерина. Впервые эти факты были сведены в рабочую гипотезу, предложенную сотрудниками кафедры генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета и проверенную на практике [5, 6, 11–13].

В обзоре рассмотрена роль стерина и других биогенных соединений, которые вовлечены в природные взаимодействия растение-патоген и в той или иной степени определяют устойчивость к патогенам. Центральное место в обзоре уделено стеринам растений. Описаны стеринные мутанты и способы их получения.

РОЛЬ СТЕРИНА В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВРЕДИТЕЛЯМ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Многие организмы — насекомые, нематоды и некоторые грибы — утратили в процессе эволюции способность синтезировать стерин *de novo* из нециклических соединений, поэтому они получают их в готовом виде из растений. В большей степени зависимость насекомых от фитостерина обусловлена необходимостью использовать последние в качестве предшественников для синтеза гормона линьки насекомых — экдизона и экдистероидов, которые необходимы для превращения личинки в имаго [10]. При этом размножение и развитие различных видов насекомых жестко зависит от определенного качественного и количественного содержания фитостерина в растениях-продуцентах [51]. Исключение из пищевого рациона или замена одних стерина на другие сильно влияет на жизнеспособность насекомых и их личинок, как это было продемонстрировано на *Locusta migratoria* [24] и *Drosophila melanogaster* [7].

На основе зависимости насекомых от определенных стероидов растений (фитостерина) могут возникать интересные межвидовые ассоциации.

Так, показана специфичность ассоциаций между четырьмя видами дрозофил и четырьмя видами кактусов в североамериканской пустыне Сонора [41]:

Lophocerus schotti — *Drosophila pachea*;
Carnegiea gigantea — *D. nigrospiracula*;
Lemaurocerus thurberi — *D. mojavensis*;
Rathbunia alamosensis — *D. arizonensis*.

У каждого из этих видов кактусов есть «своя» дрозофила, живущая за счет мертвых тканей кактуса и служащая как бы санитаром для данного вида растений. Со своей стороны дрозофилы тоже проявляют высокую избирательность. Один из этих видов (*D. arizonensis*) живет только на одном виде растения-хозяина. Остальные три вида живут либо только на указанном виде кактуса, либо еще на 1–2 видах растений.

Биохимия специфичности этой ассоциации такова. Во-первых, кактусы всех четырех видов привлекают дрозофил наличием стероидных аттрактантов, необходимых для синтеза гормонов линьки. Во-вторых, кактусы каждого из этих видов вырабатывают свой алкалоид-репеллент, отпугивающий все виды дрозофил, кроме одного — «своего».

Интересно, что зависимость дрозофил от этих кактусов, по-видимому, совершенно облигатна, так как их фитостерины содержат ненасыщенную связь в положении Δ^7 в отличие от ряда других фитостеринов с двойной связью в положении Δ^5 . Гормон линьки α -экдизон должен содержать двойную связь в положении Δ^7 , а дрозофилы сами не способны провести реакцию реорганизации двойной связи $\Delta^5 \rightarrow \Delta^7$ (рис. 1).

Таким образом, экологическое значение фитостеринов и близких им по структуре фитоэстрогенов двояко. С одной стороны, они могут оказывать воздействие на популяции фитофагов, ограничивая их численность. С другой, — стеринны могут служить важнейшим химическим ресурсом для метаболизма клеток некоторых фитофагов.

Экзогенные стеринны имеют также большое химико-экологическое значение в жизнедеятельности некоторых грибов. Например, представители рода *Phytophthora* могут синтезировать только сквален, но не могут конвертировать его в 2,3-эпоксид [4]. Поэтому при отсутствии в пище стериннов гриб может слабо расти только вегетативно. Добавление стериннов в культуральную среду стимулирует вегетативный рост и половое размножение. Изменяя состав и соотношение стериннов в растении можно получить устойчивые к этому грибу растения.

Исследования, проведенные на различных объектах, показали, что отбор мутантов по биосинтезу стериннов можно проводить по их устойчивости к полиеновым антибиотикам или ингибиторам биосинтеза стериннов [6,11]. Как правило, устойчивость к такого рода соединениям обусловлена изменениями в работе единичных генов, кодирующих отдельные этапы биосинтеза стериннов [6, 15].

На основе этого феномена на кафедре генетики и селекции СПбГУ была создана модельная система «табак–*Drosophila*», позволяющая получать и выявлять расте-

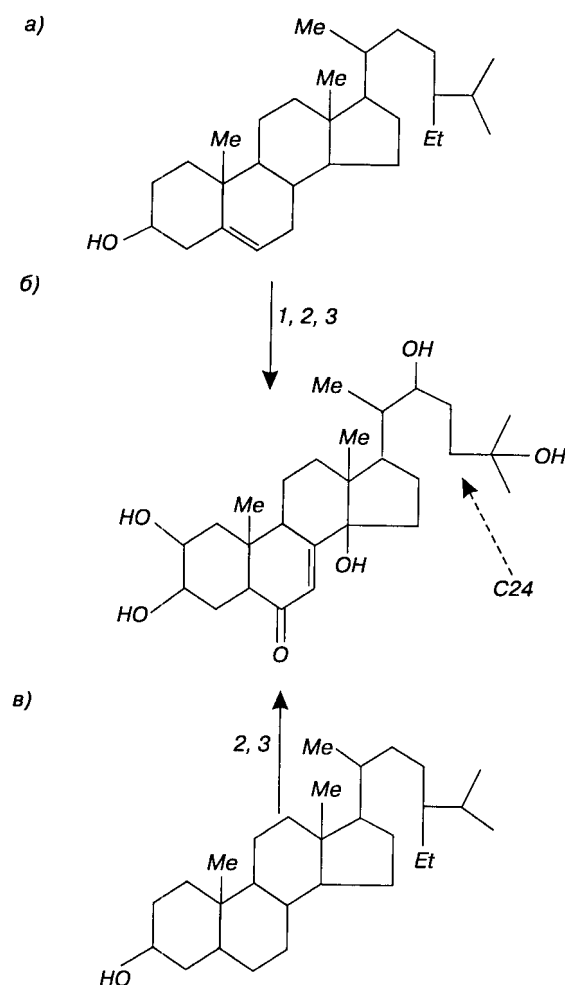


Рис. 1. Пути синтеза гормона линьки дрозофил из шоттенола кактусов или из ситостерола (Jacobson, 1982): а — ситостерол; б — гормон линьки α -экдизон; в — шоттенол.

Реакции: 1 — миграция двойной связи $\Delta^5 \rightarrow \Delta^7$; 2 — алкилирование в положении C_{24} ; 3 — окисление

ния с измененным составом стериннов [6]. Авторами были получены нистатинустойчивые клеточные линии и растения-регенеранты табака. В качестве мутагена использовали УФ излучение (продолжительностью 4 минуты). На гомогенатах, приготовленных из некоторых нистатин-устойчивых клеточных линий и растений табака, у самок снижалась плодовитость и задерживалось развитие личинок. На гомогенатах, приготовленных из контрольных растений, личинки *D. melanogaster* успешно использовали растительные стеринны и завершали свое развитие от личинки до взрослой особи. У мутантных растений было обнаружено увеличение тотального содержания стериннов и накопление двух групп Δ^7 -стериннов и интермедиатов Δ^5 -стериннов. При этом единственным фенотипическим отличием мутантных растений от контрольных была неспособность к цветению. Итак, предложенный растительный субстрат, являясь

единственным источником пищи, полностью удовлетворяя потребность насекомых в стеринах, а изменение содержания последних оказывало негативное воздействие на размножение и развитие *Drosophila melanogaster* [5].

На основе опосредованной клеточной селекции были также получены растения картофеля, устойчивые к полиеновому антибиотику (ПА) филлипину и ингибитору биосинтеза стерина байтану. Среди мутантных растений в биотесте с фитотфторой выявлены устойчивые растения. При этом у устойчивых к фитотфторозу растений линии Rf-18 было показано изменение соотношения основных стерина (увеличение содержания ситостерина). Мутантные растения фенотипически не отличались от исходных форм. При анализе инбредного потомства линии Rf-18 треть проростков оказались устойчивыми к патогену, тогда как в контроле устойчивых не выявлено [12].

Кроме того, были получены мутанты растений культурного томата, устойчивые к полиеновому антибиотику нистатину [77]. При анализе их в тестах с *Phytophthora infestans* были выявлены формы, устойчивые к фитотфторозу. Высокий уровень устойчивости сохранялся как при вегетативном размножении мутантов томата, так и при размножении семенами.

Таким образом, было показано, что изменение содержания стерина растений (табака, картофеля, томатов) подавляет развитие стеринзависимых патогенов. Следовательно, изменение содержания стерина у растений снижает пищевую ценность последних для вредителей.

Отбирая растения на устойчивость к нарушающим стеринный метаболизм веществам, можно одновременно выделить формы, потенциально устойчивые к фитостеринзависимым патогенам и вредителям. Так как эта устойчивость основана на эволюционно сложившейся и непреодолимой зависимости патогена от метаболизма хозяина, то этот тип устойчивости имеет наибольшую ценность для сельскохозяйственных растений.

Разработанная стратегия, связанная с получением растений, устойчивых к фитостеринзависимым патогенам и основанная на изменении профиля стерина растения, уже сейчас позволяет обеспечить достаточно высокую степень устойчивости к вредителям. Однако следует отметить, что при таком способе селекции не всегда однозначно можно связать выявленную устойчивость растений к вредителям с измененным профилем стерина у мутанта. Биосинтез и метаболизм стерина у растений — сложный процесс, который определяется многими факторами: генотипом растения, температурой, освещенностью, изменениями условий окружающей среды и др. Поэтому получение и характеристика соответствующих мутаций у растений расширяет современные представления об экологических цепях и молекулярно-генетических аспектах взаимодействия высших растений и патогенов. Далее мы подробно рассмотрим пути биосинтеза стерина

и охарактеризуем мутанты по метаболизму стерина у растений. Это особенно важно, так как подобные мутации уже хорошо изучены у низших эукариот и практически не исследованы у высших растений.

СТЕРИНЫ РАСТЕНИЙ: БИОСИНТЕЗ, ФУНКЦИИ, МУТАЦИИ

Биосинтез стерина

Стерины — важный компонент клеток всех эукариотических организмов. Они относятся к изопреноидному семейству соединений, построенных из изопреновых строительных блоков $-\text{CH}_2 - \text{C}(\text{CH}_3) = \text{CH} - \text{CH}_2$. Фитостерины являются производными тетрациклического углеводорода пергидро-1,2-циклопентенофенантрена. В молекуле стерина к тетрациклическому ядру присоединена алифатическая боковая цепь из 8–10 атомов углерода. Тетрациклическая структура стерина представляет собой четыре конденсированных ядра — кольца А, В, С, D. В кольцо А всех стерина у C_3 атома присоединена вторичная гидроксильная группа [9]. Характерными отличиями растительных стерина от животных является присутствие алкильного заместителя у C_{24} атома боковой цепи, поэтому молекулы стерина чаще содержат 28 или 29 атомов углерода. Алкильный заместитель — это метильная, метиленовая, этильная группа с α - или β -хиральностью C_{24} атома. Фитостерины могут отличаться друг от друга и по числу двойных связей в молекуле, причем чаще двойные связи располагаются в $\Delta^{5(6)}$, Δ^7 , Δ^8 , Δ^{22} , $\Delta^{24(28)}$, $\Delta^{25(26)}$ [9]. Самыми распространенными стеринами в растениях являются ситостерин, стигмастерин и кампестерин, также в некоторых случаях и в больших количествах обнаружен холестерин. Надо отметить, что для всех клеток животных, грибов и растений биосинтез стерина на этапах от АсСоА до сквалена одинаков по образующимся промежуточным соединениям и осуществляется через мевалонатный путь метаболизма изопреноидов. Однако имеются существенные различия в ферментативных комплексах, обслуживающих данные шаги биосинтеза у организмов различных царств. Так, фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А (ГМГ-КоА) редуктаза катализирует биосинтез мевалоновой кислоты (МВК) и является первым этапом, на котором регулируется биосинтез изопентеноидов [16]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей клонированных генов ГМГ-КоА редуктазы млекопитающих *Saccharomyces cerevisiae* и *Arabidopsis thaliana* показал, что консервативные концевые районы, соответствующие каталитическому центру белка, имеют высокую степень гомологии [21]. Биосинтез стерина в растениях (рис. 2, 3) начинается с конденсации АсСоА, который клетка добывает тремя путями:

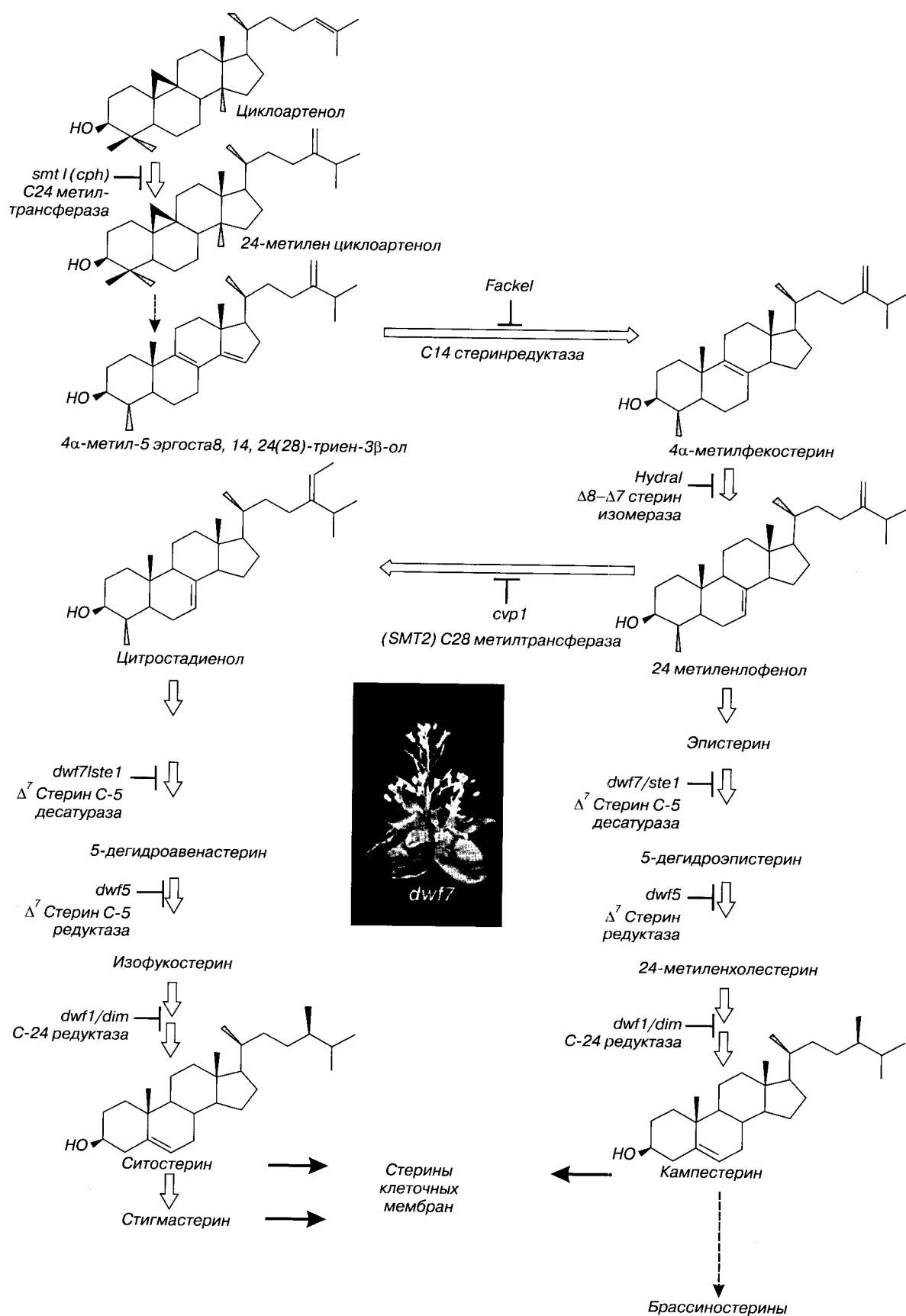


Рис. 3. Некоторые этапы биосинтеза стероидов (Clouse S.D. *Arabidopsis* Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development // The Plant Cell. — 2002. — 14. — P. 1995–2000)

1. Расщепление пирувата в ходе гликолиза (с выделением CO_2). 2. β -окисление жирных кислот. 3. Активация свободной CH_3COOH , катализируемая ферментом АсСоА-синтетазой. В результате двухэтапной конденсации трех молекул АсСоА образуется 3-окси-3-метил-глутарилСоА. При участии двух молекул NADPH он восстанавливается в мевалоновую кислоту (МВК). МВК — это первый специфический предшественник всех без исключения терпеноидов; реакция ее образования лимитирует скорость стероидного биосинтеза. Затем МВК в ходе трехступенчатой реакции в присутствии Mg^{2+} и АТР превращается в изопентилдифосфат (ИПРР). Последний изомеризуется, в ходе чего происходит перемещение двойной связи из положения Δ^3 в положение Δ^2 и образует Δ^2 -изопентилдифосфат. Благодаря конденсации молекулы ИПРР и молекулы Δ^2 -изопентилдифосфата, образуется геранилдифосфат, наращивание углеродной цепи которого дает фарнезилдифосфат. Дальнейшая полимеризация по этому же типу приводит к образованию геранилгеранилдифосфата (предшественник каротиноидов, хлорофиллов, гибберелловой кислоты), а взаимодействие двух молекул фарнезилдифосфата (NADPH-

зависимое) приводит к образованию сквалена [9]. Дальнейшее превращение сквалена (его циклизация) является первым этапом расхождения путей биосинтеза стероидов у фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих организмов [17]. Основными отличиями биосинтеза стероидов у растений от биосинтеза стероидов у грибов и животных являются следующие:

1. Первым циклическим соединением, образующимся у фотосинтезирующих эукариот, является циклоартенол, а у нефотосинтезирующих — ланостерин. 2. Фермент, раскрывающий циклопропановое кольцо (циклоэукаленол-обтузифолиол изомеразы) обнаружен только у высших растений. 3. Разная последовательность реакций деметилирования в положениях C_4 и C_{14} . 4. Противоположная стереохимическая ориентация боковых цепей у C_{24} , наличие которых строго специфично для растений и грибов [18].

Кроме этих отличий, необходимо упомянуть, что ферменты, осуществляющие однотипные реакции, могут обладать разными свойствами в отношении субстратной специфичности или восприимчивости к действию ингибитора [73].

Итак, первой специфической реакцией биосинтеза фитостероидов является циклизация 2(3) оксидосквалена с образованием циклоартенола. Затем образуются различные виды фитостероидов. Необходимо отметить, что у высших растений в нормальных физиологических и биохимических условиях биосинтез стероидов происходит по пути, определяемому видом растения. Действие ингибиторов биосинтеза стероидов приводит к накоплению промежуточных соединений и вызывает переключение биосинтеза с основного пути на вторичные [65].

ФУНКЦИИ СТЕРИНОВ

Наличие в клетке разнообразных путей биосинтеза стероидов наводит на мысль о важности и необходимости функций, выполняемых этими соединениями. Выделяют три основные функции стероидов: структурную, регуляторную, метаболическую.

Структурная функция связана с присутствием стероидов во всех клеточных мембранах: плазматической, митохондриальной, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, ядерной. Для нормального взаимодействия с фосфолипидными мембранами стероиды должны иметь свободную 3-ОН группу, плоскую неповрежденную систему колец и CH_3 -группу при C_{17} [18]. При этом гидроксильная группа ориентирована в гидрофильном направлении, кольцевые структуры и боковая цепь погружены в гидрофобные жирные кислоты фосфолипидов. Регуляторная функция связана со способностью стероидов определенного строения регулировать структурную организацию мембран. Для выполнения регуляторной функции требуется минимальное количество сте-



Рис. 2. Основные этапы биосинтеза стероидов у фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих организмов (Benveniste, 1986; Bach & Lichtenthaler, 1983)

ринов, тогда как структурная организация базируется на больших количествах этих соединений [43]. Регуляторные стерины — это 24- β -метилстерины, воздействующие на мембранные функции без предварительного транспорта внутрь или из клетки [43, 66].

Метаболическая функция состоит в том, что стерин-ы могут быть предшественниками веществ, выполняющих разные физиологические функции. Например, эхдистероиды насекомых [27], антеридиолы некоторых грибов [58] и брассинолиды растений [57].

Показано, что из наиболее известных растительных стерин-ов, структурные функции — у холестерина и, частично, ситостерина, а стигмастерин — типичный регуляторный элемент мембраны [71]. Предположительно стерин-ы участвуют в процессе адаптации растений к стрессовым условиям. Имеются данные, что растения, выращенные в условиях пониженной температуры, короткого дня или высокой засоленности почв, характеризуются измененным соотношением стерин-ов и фосфолипидов в мембранах. Кроме того, изменения в стерин-овом составе приводят к нарушениям активного и пассивного транспорта через мембраны [54], снижают активность мембранных ферментов [76]. Стерин-овое голодание приводит к преждевременному старению клеток [1].

В цитоплазме молекулы стерин-ов образуют конъюгаты с ацилированными сахарами или сложные эфиры с жирными кислотами [42]. Возможно, текучесть мембран регулируется благодаря обратимости этерификации стерин-ов [46]. Избыточное количество стерин-ов и их интермедиатов (после образования сложных эфиров) вместе с запасными липидами (триацилглицеролами) образуют в цитоплазме масляные капли — «липидные тельца» [26]. Способность стерин-ов к образованию конъюгатов и эфиров предотвращает токсичность некоторых соединений и интермедиатов биосинтеза стероидов [1, 56].

Части одного и того же растения характеризуются различным количественным содержанием фитостерин-ов [29], к тому же наблюдается доминирование различных стерин-ов на разных этапах развития растения [22, 28]. При прорастании семян содержание стерин-ов в растении резко падает, что связано с необходимостью быстрого синтеза большого количества мембран [28, 29]. Когда растение вступает в фазу цветения, содержание стерин-ов падает или выходит на плато. Последний вариант характерен, в частности, для сои. При этом было показано, что сухой вес растения увеличился в 5 раз, что приводило к снижению удельного содержания стерин-ов в единице сухого материала. На последующих стадиях развития растения содержание стерин-ов остается неизменным вплоть до начала старения, когда можно наблюдать уменьшение уровня синтеза стерин-ов [28, 29]. Уменьшение уровня синтеза стерин-ов при старении растения сопряжено с уменьшением уровня активности ГМГ-КоА редуктазы [61], что,

вероятно, связано со снижением синтеза мевалоновой кислоты. Итак, содержание стерин-ов в пределах одного растения колеблется от высокого в меристематических, активно растущих вегетативных и репродуктивных тканях до относительно низкого в зрелых вегетативных тканях [29].

Показано, что виды растений различаются по качественному содержанию стерин-ов, что позволяет использовать этот показатель в хемосистематике растений [69]. Методами газово-жидкостной хроматографии и масс-спектрального анализа показано, что растения семейства *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Peaceae* синтезируют в основном Δ^5 -стерины, однако для некоторых видов наблюдали присутствие Δ^7 -стерин-ов как промежуточных веществ биосинтеза [46]. Для *Asteraceae* и *Fabaceae* набор стерин-ов схож с этими тремя семействами, но по крайней мере для одного из видов каждого семейства показан биосинтез исключительно Δ^7 -стерин-ов [72, 49]. Растения семейств *Theaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, напротив, продуцируют в основном Δ^7 -стерины и лишь небольшое количество — Δ^5 -стерин-ов [36, 15, 49]. Выявлено разнообразие стерин-ов листьев при анализе их состава у 13 видов из семейства *Chenopodiaceae* [69].

Таким образом, стерин-ы растений выполняют важные функции в клетке — структурные, являясь компонентом клеточных мембран и биогенетические, являясь предшественниками в синтезе стероидных гормонов и алкалоидов. Качественное и количественное соотношение стерин-ов зависит от вида растения, ткани и фазы развития.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИН-ОВ В КЛЕТКЕ

Большая часть растительных стерин-ов в клетке — это несвязанные стерин-ы (β -ОН у атома C_3), входящие в состав мембраны. Минорная фракция стерин-ов (а именно кампестерин и его эпимер 22(23) дегидробрассикостерин) формируют пул предшественников брассиностерин-ов. Небольшое количество стерин-ов в клетке находится в виде эфиров жирных кислот, стерин-гликозидов или стерин-ацилгликозидов.

При значительном повышении уровня стерин-ов в клетке, который наблюдается у мутантных растений табака *sterol*, стерин-ы находятся в виде эфиров жирных кислот, формируя в цитоплазме липидные капли. Эти формирования, называемые также стериносомы, могут быть вовлечены в регуляцию содержания свободных стерин-ов в мембране [55]. Однако показано, что сверхпродукция фермента ГМГ-КоА редуктазы у трансгенных растений табака, приводящая к значительному повышению уровня стерин-ов в клетке, не отражается на морфологии и особенностях развития этих растений по сравнению с диким типом [19]. Вероятно, стериносомы используются в клетке исключительно как депо для

накопления стерина и не выполняют какой-либо другой функции.

Так, стериносомы были обнаружены в клетках тапета у растений *Brassica napus*. Предполагается, что они участвуют в обеспечении функциональных особенностей пыльцы. Например, являются одним из адгезивных компонентов пыльцевой оболочки при опылении насекомыми [60].

В связанном состоянии стерин (в основном это характерно для Δ^5 -стерина) могут находиться в клетке в виде стерингликозидов или ацилстерингликозидов. Такие конъюгаты находятся в плазматической мембране [42]. Итак, стерин присутствует во всех типах растительных клеток как в свободной, так и в связанной формах.

МУТАНТЫ БИОСИНТЕЗА СТЕРИНОВ

Изучению этапов биосинтеза, специфических функций стерина и глубоких структурно-функциональных взаимоотношений, опосредованных этими соединениями, препятствует ассоциация последних с эндоплазматическим ретикуломом. Это затрудняет их очистку и применение антител при скрининге экспрессирующих библиотек для клонирования кДНК [33,34]. Поэтому селекция мутантов представляет собой важную стратегию для выделения новых генов, контролирующих метаболизм стерина [33].

Мутанты на раннем этапе биосинтеза стерина

Методом клеточной селекции при культивировании микрокаллусов на среде, содержащей триазол LAB170250F [55], было получено 40 мутантных растений табака (*Nicotiana tabacum*). Два из них, названные *sterov*, имели измененный профиль стерина по сравнению с контролем. От одного из двух генотипов было получено фертильное растение LAB 1-4, которое характеризовалось увеличением общего количества стерина в каллусе и листьях, а также были отмечены качественные изменения — накопление некоторых промежуточных соединений биосинтеза стерина, присутствующих в контроле в следовых количествах (24-метилхолестерол, Δ^7 -авенастерол, 24-этилиденфенол и 24-метилциклоартенол) [55]. Авторы предлагают два объяснения накопления промежуточных продуктов: 1) дефект связан с двумя реакциями деметилирования и с метилированием С-24-циклоартенола; 2) увеличение потока биосинтеза вызывает рост общего количества стерина, снимающий ограничение с субстратлимитированных реакций (например, С-4-деметилирования и С-24-метилтрансферазная реакция). Показано сохранение высокого уровня содержания стерина в течение двух половых поколений. По мнению авторов, количественное содержание стерина зависело

от статуса клеток: в листьях общее количество стерина было увеличено в 3 раза по сравнению с диким типом, а в каллусах — в 10 раз. При этом по количественному составу свободных стерина LAB 1-4 не отличался от контроля, все избыточные стеринны у мутанта накапливались в виде эфиров [38]. Генетический анализ показал, что мутация наследуется как ядерная полудоминантная и приводит к изменению или нарушению координации биосинтеза стерина [56]. У мутанта в каллусе и листьях показано увеличение в три раза активности гидроксиметил-глутарил КоА-редуктазы (ГМГР), катализирующей синтез мевалоновой кислоты — первого предшественника в изопреноидном биосинтезе [39].

Мутантные растения по гену FACKEL, кодирующему С-14 стеринредуктазу, были получены независимо, с использованием двух разных подходов, в двух лабораториях. У арабидопсиса при анализе 14 000 растений M_2 , полученных из семян, обработанных ЭМС, выявили одно мутантное растение fk-179. В ходе генетического анализа показано, что fk-179 — это рецессивная ядерная мутация с плейотропным эффектом. На ранних стадиях проростки, выращенные из семян этого растения, характеризовались значительными фенотипическими изменениями, а именно: отсутствие удлинения гипокотыля у этилированных проростков на свету; на месте, где в норме формировался гипокотиль, развивались короткие, но тонкие структуры; увеличение числа семядолей. Взрослые растения имели фенотип, схожий с фенотипом мутантов по синтезу брассинолидов: карликовость, темно-зеленая розетка листьев, снижение апикального доминирования. Кроме того, растения fk-179 характеризовались, по сравнению с диким типом, продолжительной меристематической активностью, почти полной стерильностью и нарушениями развития сосудистой системы [50].

Шесть других аллелей локуса FACKEL были выявлены при скрининге Т-ДНК инсерционных мутантов. Анализ проводили на ранних стадиях эмбриогенеза. У 6 мутантов выявлены различные отклонения в клеточном делении на стадии глобулы [72]. Все полученные мутации оказались аллельными.

Ген был клонирован, и показано, что он гомологичен гену ERG24, кодирующему С-14 стеринредуктазу дрожжей, и двум генам стеринредуктаз человека.

Биохимическими характеристиками мутантов являлось накопление субстрата фермента С14 стеринредуктазы — 4 α -метил-5 α -эргоста-8,14,24(28)-триен-3 β -ола, изменение соотношения стерина, уменьшение содержания брассиностероидов. Состав стерина изменялся как качественно (появление значительного количества Δ^8 14-диенстерина), так и количественно (уменьшение уровня кампестерина, кампестанола, ситостерина, ситостанола). С использованием 15-азостерина, ингибитора стеринметилтрансферазы (СМТ) были также получены мутанты

по биосинтезу стерина, у которых наблюдалось накопление $\Delta^{8,14}$ -диенстерина в клетках. Растения, выращиваемые на среде с добавлением 15-азостерина, характеризовались замедленным развитием, коррелирующим с повышением уровня $\Delta^{8,14}$ -диенстерина в клетках [70]. Таким образом, эмбриональное (генетическое) и постэмбриональное (химическое) ингибирование СМТ влияет по-разному на рост и развитие растений.

Стериновые мутанты растений по последним этапам биосинтеза

Стериновые мутанты последующих шагов биосинтеза были выявлены среди проростков с измененной морфологией (карликовостью). Так, для арабидопсиса и гороха были описаны мутации по генам, кодирующим Δ^7 -стерин-С5-десатуразу (STE1/DWARF/BUL1), $\Delta^{5,7}$ -стерин- Δ^7 -редуктазу (DWARF 5) [23] и Δ^{24} — стерин-изомеразу/редуктазу (DIM/DWARF1/LKB) [52, 62, 23], которые характеризовались значительными изменениями роста и развития. Фенотипически эти мутанты выглядели как карлики и по многим признакам напоминали мутантов по синтезу brassinosteroidов *cpd* [70] и *dwarf4* [23]. Они также характеризовались сниженной фертильностью, удлиненным жизненным циклом и круглыми закрученными листьями [47].

Для мутантов по гену, кодирующему C5(6)-десатуразу, характерно накопление Δ^7 -стерина (в основном ситостанола). При этом у таких мутантов (*ste1*, *dwarf7* и *bul1*) почти полностью отсутствует Δ^5 кампестерин, что приводит к снижению уровня синтеза brassinosteroidов, что соответственно отражалось на размере растения [23, 69]. Трансформация корней растений *ste1* геном *ERG3 Saccharomyces cerevisiae*, кодирующим Δ^7 -стерол-С5-десатуразу, привела к частичному восстановлению нормального фенотипа [33]. Для подтверждения того, что ген STE1 *Arabidopsis thaliana* кодирует Δ^7 -стерол-С5-десатуразу, мутант дрожжей, дефектный по гену ERG3, был трансформирован фрагментами библиотеки кДНК, выделенными у растений арабидопсиса дикого типа. В ходе анализа трансформантов был выявлен фрагмент, восстанавливающий утраченную функцию у мутанта дрожжей. Фрагмент соответствовал ORF размером 843bp и кодировал полипептид из 281 аминокислоты. Для белка характерны три гистидин-богатых мотива, которые также были выявлены у белка Erg3 [34].

Мутанты *dwarf5* накапливают $\Delta^{5,7}$ -ситостерин. Очевидно, что мутантные растения имеют блок на этапе, контролируемым $\Delta^{5,7}$ -стерин- Δ^7 -редуктазой. Экзогенное добавление brassinosteroidов приводит к восстановлению нормального фенотипа [69].

Описаны мутанты арабидопсиса (*diminuto/dwarf1*) и гороха (*lkb*) по гену, кодирующему Δ^{24} — стерин-изомеразу/

редуктазу. Все они имеют карликовый фенотип, характерный для мутантов по синтезу brassinosteroidов, который обусловлен нарушением клеточной элонгации. Экзогенное добавление brassinosteroidов восстанавливало у мутантов *diminuto* способность к нормальной клеточной элонгации. Качественный и количественный анализ содержания стерина показал, что у таких мутантов очень сильно снижено содержание кампестерина и ситостерина, в то время как содержание 24-метилхлестерина и изофукостерина (для синтеза которых не требуется Δ^{24} — стерин-редуктазная активность), напротив, увеличено [52].

Таким образом, в литературе описаны стериновые мутанты, которые характеризуются различными морфологическими изменениями и, как правило, имеют карликовый фенотип.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Фитоалексины. Показано, что кроме стерина некоторые вторичные соединения, например фитоалексины, могут также значительно изменять уровень устойчивости растений к вредителям.

Так, большая часть синтезируемых веществ, а именно более 100 000 низкомолекулярных соединений, не являются необходимыми для жизнедеятельности. Роль многих из этих соединений еще не ясна. Спектр этих веществ, называемых вторичными метаболитами, различен у представителей различных таксономических групп растительного царства. Такое большое разнообразие данных соединений возникло в процессе эволюции высших растений и, как считают некоторые авторы, связано с их ролью в обеспечении устойчивости к вредителям [25].

Известно, что многие вторичные метаболиты обладают антимикробной активностью *in vitro*, и, как полагают, играют большую роль в защите растения от различных патогенов. Это достигается как благодаря конститутивному, так и индуцибельному (т. е. начинающегося после заражения патогеном) синтезу данных соединений. По современным представлениям, эти вещества разделяют на 2 группы: фитоалексины и фитоантиципины. Гетерогенную группу низкомолекулярных веществ, синтезируемых растением *de novo* после вторжения патогена и обладающих антимикробной активностью, называют фитоалексинами (рис. 4). В отличие от фитоалексинов, фитоантиципины синтезируются растением (после вторжения патогена) не *de novo*, а из сложных предшественников или конститутивно присутствуют в растении. Важно отметить, что различие между фитоалексинами и фитоантиципинами основано не на их химической структуре, а на том, как и когда они синтезируются в растении. Таким образом, одно и то же вещество может являться как фитоантиципином, так и фитоалексином. Так, например, сакуранин — антимикробный агент из группы флаво-

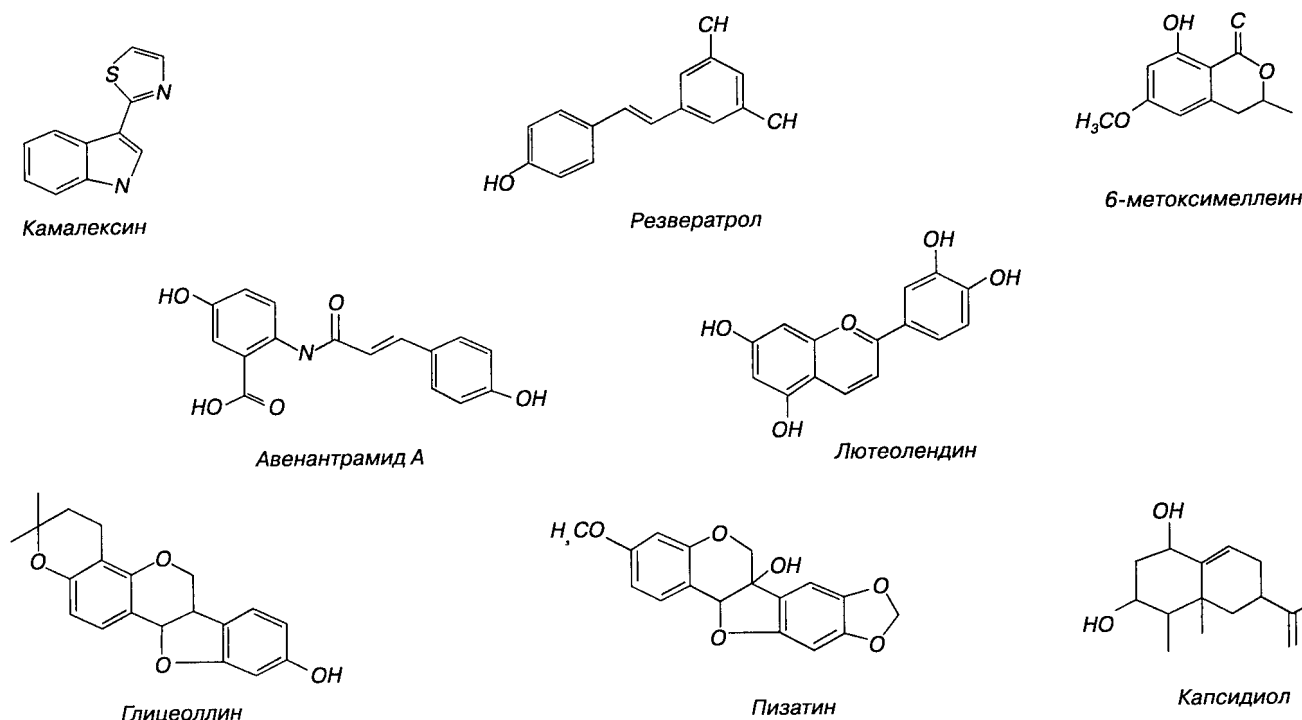


Рис. 4. Структура некоторых фитоалексинов

нов, конститутивно синтезируется в листьях черной смородины, являясь таким образом фитоантиципином. В то же время сакурнетин — это главный фитоалексин, синтезируемый в листьях риса в ответ на вторжение патогена [53]. Как полагают, фитоалексины играют большую роль в защите растений, чем фитоантиципины. Во-первых, наличие фитоантиципинов показано для очень небольшого числа представителей высших растений, во-вторых, известно, что защитные реакции растения, которые останавливают рост патогена, развиваются после инфицирования [76].

В последние годы появляется все больше данных, подтверждающих роль вторичных соединений в защите растения от патогена.

Так, мутантные растения, у которых снижен уровень биосинтеза фитоалексинов или фитоантиципинов, характеризуются сниженной устойчивостью к патогенам по сравнению с диким типом. Например, мутация по гену кукурузы *BX1* приводит к блоку биосинтеза DIMBOA (2,4 гидроксигруппы, 7-метокси, 1,4 — бензоки, 3-бензоксазин). Гомозиготы по данной мутации характеризовались неустойчивостью к *Helminthosporium turcicum* и *Diplodia maydis* [30].

Известно, что сапонины — это производные тритерпенов — также обладают антимикробной активностью. На основе двухвидовой системы хозяин-патоген: овес *Avena sativa* и корневой паразит *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, было показано, что мутантные растения со сниженным содержанием авенацина (один из са-

понинов) характеризуются пониженной устойчивостью к патогену [64]. Известно, что *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* синтезирует фермент авенациназу, который расщепляет авенацин. С помощью метода «генного нокаута» были получены мутанты этого гриба по гену, кодирующему этот фермент. Потеря способности детоксифицировать авенацин приводила к неспособности гриба поражать овес [20]. Следовательно, авенацин обеспечивает один из первых защитных барьеров при инфицировании, и является одним из ключевых агентов, определяющих устойчивость в системе патоген-хозяин.

Интересные факты, касающиеся патогенспецифического ответа хозяина, получены при изучении нескольких *pad* — мутантов (*phytoalexin deficient*) арабидопсиса со сниженным уровнем биосинтеза камалексина (производное индола; единственный известный фитоалексин для арабидопсиса). Так, растения *pad-3*, в отличие от растений дикого типа, были неустойчивы к двум грибам-патогенам, *Cochliobolus carbonum* и *Alternaria brassicola*, но сохранили устойчивость к *Botrytis cinerea*, *Peronospora parasitica*. В то же время растения *pad-4* оказались неустойчивы к двум последним из перечисленных патогенов. Кроме того, *pad-3* сохранял устойчивость к бактериальному патогену *Pseudomonas syringae*. Эти результаты согласуются с тем, что различные патогены приводят к активации разных генов хозяйского ответа [37].

Другим примером, показывающим роль фитоалексинов в обеспечении устойчивости растений к патогенам, являются трансгенные растения томатов, характеризу-

ющиеся сверхпродукцией гена стилбенсинтазы и как результат — измененным содержанием фитоалексинов. Этот фермент участвует в биосинтезе фитоалексина резвератрола. Показано, что полученные трансгенные растения, в которых успешно экспрессировались 2 гена стилбенсинтазы, были устойчивы к *Phytophthora infestans* [74]. Аналогичная работа была проведена на люцерне. Трансгенные растения, несущие ген стилбенсинтазы, выделенный из растений винограда, характеризовались более высокой устойчивостью к *Phoma medicaginis* по сравнению с диким типом [48]. Примерно в то же время были получены растения люцерны со сверхэкспрессией гена, кодирующего фермент изофлавоон-О-метилтрансферазу. У них был повышен уровень содержания фитоалексина медикарпина, и эти растения характеризовались большей устойчивостью к *Phoma medicaginis* по сравнению с диким типом [45].

Итак, фитоалексины и фитоантиципины влияют на устойчивость растений к патогенам, что открывает заманчивые перспективы для получения устойчивых растений методами генной инженерии.

Таким образом, изучение путей вторичного метаболизма растений позволит не только уточнить их биологические функции, но в будущем использовать эти соединения для получения устойчивых к патогенам культурных растений.

Стероидные гликоалкалоиды также относятся к веществам вторичного метаболизма. При рассмотрении функций стероидных гликоалкалоидов мы ограничимся гликоалкалоидами рода *Lycopersicon*. При поиске фунгитоксических веществ алкалоид томатин был выделен из листьев томата *Lycopersicon pimpinellifolium*. Как оказалось, он представляет собой смесь двух гликоалкалоидов — α -томатина и дегидротоматина. Оба эти компонента представлены во всех частях растения [31]. α -томатин и дегидротоматин имеют сходную структуру — это гликозиды, образованные из циклического углеводорода и тетрасахарида ликотетраозы. В образовании последнего участвуют ксилоза, галактоза и глюкоза в соотношении 1:1:2. Различие между двумя гликоалкалоидами состоит лишь в том, что у дегидротоматина имеется двойная связь между C_5 и C_6 атомами кольца В, а у α -томатина она отсутствует.

В целях выяснения роли α -томатина в устойчивости к *Phytophthora infestans* проведено изучение его содержания в листьях диких видов и культурных форм томата. Показана корреляция между содержанием томатина и степенью устойчивости к фитофторозу в пределах рода *Lycopersicon* (рис. 5, 6) [2]. Параллельно исследовано влияние α -томатина на способность ингибировать рост 23 видов грибов [32].

Фунгитоксические свойства α -томатина и других стероидных гликозидов объясняются их способностью об-



Рис. 5. Растения томатов, устойчивые к фитофторозу



Рис. 6. Растения томата, пораженные фитофторозом

разовывать комплексы со стеринами мембран клеток гриба. Дельтонин, например, в опытах *in vitro* образует такой комплекс с холестерином.

Сравнительно недавно при изучении фунгитоксичности α -томатина показано, что многие патогенные для томатов грибы, и даже некоторые непатогенные, содержат фермент томатиназу. Этот фермент переводит α -томатин в менее токсичные для патогена формы — β_1 -или β_2 -томатин. Стероидные гликоалкалоиды и α -томатин и дегидротоматин, в частности, являются важным фактором иммунитета и подавляют развитие активности патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, устойчивость (полная или частичная) растений к патогену обеспечивается либо выработкой антимикробных соединений, либо отсутствием веществ, необходимых для роста и развития патогена. Направленное изменение биосинтеза метаболитов растений позволяет получать растения, устойчивые к вредителям. Для обеспечения своей защиты растения синтезируют большое количество различных соединений. Научные представления об особенностях метаболизма этих веществ и их роли в обеспечении защиты растений постоянно расширяются. Возможно, это позволит в будущем успешно использовать стратегию, например, сверхпродукции фитоалексинов для получения устойчивых к патогенам растений.

Другая стратегия связана с природной зависимостью патогена от определенных веществ растения. В частности, показано, что растения с изменениями метаболизма стероидов устойчивы к фитостеринзависимым патогенам. Используя такую зависимость патогена от метаболизма хозяина, можно получать устойчивые к соответствующим заболеваниям растения. Разработка этой стратегии имеет очень большое значение, так как

в данном случае используется зависимость патогена от метаболизма хозяина.

Таким образом, достижения современной науки по изучению роли как стероидов, так и вторичных метаболитов, открывают широкие перспективы для решения практических задач получения устойчивых к патогенам растений на основе высокоурожайных сельскохозяйственных сортов.

Работа поддержана грантом BRNE STO-12-O (CRDF-МинОбр РФ).

Литература

1. Гальцова Р.Д. Стеринообразование у дрожжевых организмов. — М.: Наука, 1980. — 224 с.
2. Жученко А.А. Устойчивость растений к патогенам в системе их общей и специфической активности: Кн. Генетика иммунитета и селекция сельскохозяйственных растений на устойчивость в Молдавии. — Кишинев: Штиинца, 1984. — 254 с.
3. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашиха Н.Н., Балашиха И.Т. и др. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фураностана. — Кишинев: Штиинца, 1987. — 141 с.
4. Ковганко Н.В., Ахрем А.А. Стероиды (экологические функции). — Минск: Навука і техника, 1990. — 224 с.
5. Левашина Е.А. Клеточная селекция *in vitro* как способ получения растений, ограничивающих развитие стерин-зависимых насекомых // Дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 1994. — 120 с.
6. Лутова Л.А., Левашина Е.А., Бондаренко Л.В., Андреева Е.В. и др. Мутации высших растений по биосинтезу стероидов // Генетика. — 1992. Вып. 28. — С. 129–136.
7. Лучникова Е.А., Инге-Вечтомов С.Г., Ибрагимов А.И., Левченко Л.В. Влияние генетических изменений в биосинтезе стероидов у *Saccharomyces cerevisiae* на морфогенез и плодовитость *Drosophila melanogaster* в двойной системе «дрозофила-дрожжи» // Иссл. генет. — 1981. — Вып. 9. — С. 54–65.
8. Озерцевская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. Биохимические механизмы олигогенной фитофтороустойчивости картофеля // Успехи биол. химии. — 1993. — Вып. 66. — С. 51–85.
9. Пасешиченко В.А. Итоги науки и техники. Биосинтез и биологическая активность растительных терпеноидов и стероидов. — М., 1987. — С. 88–127.
10. Тарлаковский С.А. Стероиды: их метаболизм, функции и роль во взаимоотношениях растений с вредными организмами // Биохимические аспекты проблем защиты растений от болезней, вредителей и сорняков // Труды ВИЗР. — 1977. — Вып. 52. — С. 53–65.
11. Ходжайова Л.Т., Усольцева М.Ю., Асеева Е.А., Лутова Л.А. Клеточная селекция растений картофеля, устойчивых к фитофторозу, с использованием веществ, нарушающих метаболизм стероидов // Физиология растений. — 1998. — Т. 45. — С. 283–288.
12. Ходжайова Л.Т., Левашина Е.А., Усольцева М.Ю., Бондаренко Л.В. и др. Изменение содержания стероидов как способ биологической борьбы с фитостерин-зависимыми организмами // Генная инженерия и экология. — 2000. — Т. 1. — С. 56–63.
13. Чжан Си Чунь. Получение мутантов томатов, устойчивых к фитофторозу с использованием методов клеточной селекции // Дис. канд. биол. наук. — СПб., 1999. — 119 с.
14. Щербатова Л.А., Васюкова Н.И., Иванюк В.Г., Давыдова М.А. и др. Фитостероиды и развитие фитофтороза в период вегетации картофеля // Прикл. биохим. микробиол. — 1981. — Вып. 16. — С. 106–112.
15. Akihisha T., Shimizu N., Ghosh P., Thakur S. et al. Sterols of Cucurbitaceae // Phytochem. — 1987. — 26. — P. 1693–1700.
16. Bach T.J., Lichtenthaler H.K. Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation // Physiol. Plant. — 1983. — 59. — P. 50–60.
17. Benveniste P. Sterol Biosynthesis // Annu. Rev. Plant. Physiol. — 1986. — 37. — P. 275–308.
18. Benveniste P., Rahier A. Target sites of sterol biosynthesis inhibitors in plants // In: Target sites of fungicidal action / Ed. Koller W.D. — London: CRC Press. — 1992. — P. 207–226.
19. Benveniste P., Schaller H., Grausem B. et al. // Expression of the Hevea brasiliensis (H.B.K.) Mull. Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase 1 in Tobacco Results in Sterol Overproduction // Plant Physiol. — 1995. — 109. — P. 761–770.
20. Bowyer P., Clarke B.R., Lunniss P., Daniels, M.J. et al. // Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme // Science. — 1995. — 267. — P. 371–374.
21. Caelles C., Ferrer A., Balcells L., Hegardt F.G. et al. Isolation and structural characterization of a cDNA encoding Arabidopsis thaliana 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // Plant Mol. Biol. — 1989. — 13. — P. 627–634.
22. Cattel L., Balliano G., Caputo D., Delprino L. Biosynthesis of stigmasta-7, E-24(28)-dien-3b-ol and 24a-alkyl sterols in Bryonia discalis // Phytochem. — 1980. — 19. — P. 465–466.
23. Choe S., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S. et al. The Arabidopsis dwf7/stel mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis // Plant Cell. — 1999. — 11. — P. 207–221.
24. Clouse S.D. Arabidopsis Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development // The Plant Cell. — 2002. — 14. — P. 1995–2000.
25. Costet M.F., Achouri M., Charlet M., Janot R. et al. Ecdysteroid biosynthesis and embryonic development are disturbed in insects (*Locusta migratoria*) reared on plant diet (*Triticum sativum*) with a selectively modified sterol profile // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 84. — P. 643–647.
26. Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance // Nature. — 2001. — 411. — P. 843–847.
27. Dutta P.C. Lipid bodies in plants // Plant Science. — 1991. — 78. — P. 259–267.
28. Feldlaufer M.F. Diversity of molting hormones in insects // In Ecdysone, ed. Koolman J. // Verlag. Stuttgart. — 1989. — P. 308–311.
29. Fenner G.P., Patterson G.W., Koiness P.M. Sterol composition during the life cycle of the soybean and squash // Lipids. — 1986. — 21. — P. 53–56.
30. Fenner G.P., Patterson G.W., Lusby W.R. Development regulation of sterol biosynthesis in Cucurbita maxima L. // Lipids. — 1989. — 24. — P. 271–278.
31. Frey M. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses // Science. — 1997. — 277. — P. 696–699.
32. Friedman M., Levin C., McDonald G. Tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection // J. Agric. Food Chem. — 1994. — 42. — P. 1959–1964.
33. Friedman M. Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet // J. Agric. Food Chem. — 2002. — 50. — P. 5751–5780.
34. Gachotte D., Meens R., Benveniste P. An Arabidopsis mutant deficient in sterol biosynthesis: heterologous complementation by ERG3 encoding a Δ^7 -sterol-C5-desaturase from yeast // The Plant Journal. — 1995. — 8. — P. 407–416.
35. Gachotte D., Husselstein T., Bard M. et al. Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a Δ^7 -sterol-C5-desaturase by functional complementation of defective yeast mutant // The Plant Journal. — 1996. — 9. — P. 391–398.
36. Garg V.K., Nes W.R. Codisterol and others Δ^5 — sterols of Cucurbita maxima // Phytochem. — 1984. — 23. — P. 2925–2929.
37. Garg V.K., Nes W.R. Studies on the C-24 configurations of Δ^7 — sterols in the seeds of Cucurbita maxima // Phytochem. — 1984. — 23. — P. 2919–2923.
38. Glazebrook J. Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses // Annual Rev. Genet. — 1997. — 31. — P. 547–569.

39. Gondet L., Weber T., Maillot-Vernier P., Benveniste P. et al. Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in tobacco mutant that overproduces sterols // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1992. — 186. — P. 888–893.
40. Gondet L., Bronner R., Benveniste P. Regulation of Sterol Contents in Membranes by Subcellular Compartmentation of Steryl-Esters Accumulating in a Sterol-Overproducing Tobacco Mutant // *Plant Physiol.* — 1994. — 105. — P. 509–518.
41. Hammerschmidt R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1999. — 37. — P. 285–306.
42. Harbone J.B. Introduction to ecological biochemistry // L.: Acad. Press. — 1982. — P. 278.
43. Hartmann P., Benveniste P. Plant Membran Sterols: Isolation, Identification and Biosynthesis // *Methods of Enzymology.* — 1987. — 148. — P. 632.
44. Hauple R.C. & Nes W.D. Evidence for differences in sterol biosynthesis derivatization in sorghum // *Journal of natural products.* — 1984. — 47. — P. 292–299.
44. Hayashi H., Czya I., Lubenow H., Schell J., Walden R. Activation of plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro // *Science.* — 1992. — 258. — P. 1350–1353.
46. He X., Dixon R. Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances the biosynthesis of 48-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa // *Plant Cell.* — 2000. — 12. — P. 1689–1702.
47. Heftman E. Biosynthesis of steroids in Solanaceae // *Phytochemistry.* — 1983. — 22. — P. 1843–1860.
48. Heuple R., Nes W.D. Evidence for differences in sterol biosynthesis derivatization in sorghum // *Journal of natural products.* — 1984. — 47. — P. 292–299.
49. Hipskind J., Paiva N.L. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 2000. — 13. — P. 551–562.
50. Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. Sterols, methylsterols and triterpene alcohols in three Theaceae and some other vegetable oils // *Lipids.* — 1974. — 9. — P. 173–184.
51. Jang J.C., Fujioka S., Tasaka M., Seto H. et al. A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by fackel mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Genes & Devel.* — 2001. — 14. — P. 1485–1497.
52. Kauschmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M. et al. // *Plant Journal.* — 1996. — 9. — P. 701–713.
53. Kircher H.W., Rosenstein F.V., Fogleman J.C. Selective uptake and lack of dealkylation of phytosterol by cactophilic species of *Drosophila* // *Lipids.* — 1984. — 19. — P. 235–238.
54. Klahre U., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S. et al. // *Plant Cell.* — 1998. — 10. — P. 1677–1690.
55. Kodama O., Suzuki T., Miyakawa J. & Akatsuka T. Ultraviolet-induced accumulation of phytoalexins in rice leaves // *Agric. Biol. Chem.* — 1988. — 52. — P. 2469–2473.
56. Koller W. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis // Target sites of fungicide action / Ed. Koller W. London: CRC Press. — 1991. — P. 119–207.
57. Maillot-Vernier P., Schaller H., Benveniste P., Belligard G. Biochemical characterization of sterol mutant plant regenerated from tobacco callus resistant to a triazole cytochrome P₄₅₀-obtusifolliol-14-demethylase inhibitor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — 165. — P. 125–130.
58. Maillot-Vernier P., Schaller H., Benveniste P., Belligard G. Genetic study and further biochemical characterization of tobacco mutant that overproduces sterols // *Mol. Gen. Genet.* — 1991. — 231. — P. 33–40.
59. Maugh T.M. New Chemicals promise larger crops // *Science.* — 1981. — 212. — P. 33–34.
60. McMorris T.C. Sex hormones in the aquatic fungus *Achlya* // *Lipids.* — 1978. — 13. — P. 716–722.
61. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — 15. — P. 473–479.
62. Murphy D. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms // *Prog Lipid Res.* — 2001. — 40. — P. 325–438.
63. Narita J.O., Grissem W. Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening // *The Plant Cell.* — 1989. — 1. — P. 181–190.
64. Nomura T., Kitasaka Y., Takatsuto S., Reid J. et al. // *Plant Physiol.* — 1999. — 119. — P. 1517–1526.
65. Pang S.-Z., de Boer D., Wan Y., Ye G. et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants // *Plant Physiol.* — 1996. — 258. — P. 1350–1353.
66. Papadopoulos K., Melton R.E., Leggett M., Daniels M.J. et al. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 1999. — 96. — P. 12923–12928.
67. Pascale S., Taton M., Rahier A. Plant sterol biosynthesis. Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C-4 demethylation // *J. Biol. Chem.* — 1993. — 268. — P. 11636–11654.
68. Pinto W.J., Nes W.R. Stereochemical specificity for sterols in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* — 1983. — 258. — P. 4472–4479.
69. Salimova E., Boschetti A., Eichenberger W., Lutova L. Sterol mutants of *Clamidomonas reinhardtii*: characterization of three strains deficient in C24(28) reductase // *Plant Physiol. Biochem.* — 1999. — 37. — P. 241–249.
70. Salt T., Adler J.H. Diversity of sterol composition in the family Chenopodiaceae // *Lipids.* — 1985. — 20. — P. 594–601.
71. Salt T., Tocker J.E., Adler J.H. Dominance of Δ^5 -sterols in eight species of the Cactaceae // *Phytochem.* — 1987. — 26. — P. 731–733.
72. Schaller H. The role of sterols in plant growth and development // *Progress in Lipid Research.* — 2003. — 42. — P. 63–175.
73. Schaller H., Maillot-Vernier P., Benveniste P., Belligard G. Sterol composition of tobacco calli selected for resistance to fenpropimorph // *Phytochem.* — 1991. — 30. — P. 2547–2554.
74. Schrick K., Mayer U., Horrichs A., Kuhnt C. et al. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis // *Genes Dev.* — 2000. — 14. — P. 1471–1484.
75. Tada M., Takahashi T., Koyama H. Triterpene and sterol from the roots of *Aster scaber* // *Phytochem.* — 1974. — 3. — P. 670–671.
76. Taton M., Benveniste P., Rahier A. Mechanism of inhibition of sterol biosynthesis enzymes by N-substituted morpholines // *Pestis. Sci.* — 1987. — 21. — P. 269–280.
77. Thomzik J., Stenzel K., Schreiber P. et al. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans* // — *Physiological and Molecular Plant Pathology.* — 1997. — 51. — P. 65–278.
78. VanEtten, Farmer B. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus Phytoanticipins? // *The Plant Cell.* — 1994. — 9. — P. 1191–1192.
79. Venken M., Asard H., Geuns J. et al. Senescence of oat leaves: changes in the sterol composition and enzyme activities of the membrane // *Plant Sci.* — 1991. — 79. — P. 3–11.
80. Zhang X.-C., Han Z.-H., Hodjaiova L.T., Lutova L.A. Sterols biosynthesis and their physiological role in plants // *Plant Physiology Communications.* — 2001. — 37. — P. 452–457.

Metabolites of plants and their role in resistance to phytopathogens

L.A. Lutova, G.M. Shumilina

Chair of genetics and selection of Saint Petersburg university.

✿ THE SUMMARY: Plant disease resistance is a complex reaction where biochemical peculiarities play a major role. The review is focused on two strategies of improvement of plant resistance to some groups of pathogens. The first strategy is based on a dependence of pathogens on certain plant compounds, i.e. sterols. The lack of these metabolites in a host plant repress pathogen development and reproduction. Here we present modern data on sterol metabolism and their functions in plants as well as description of known plant sterol mutants. The other way to improve plant resistance is to stimulate biosynthesis of secondary metabolites with antimicrobial activity. The roles of phytoalexins and steroid glycoalkaloids in the development of plant resistance is described here on certain examples.

✿ KEY WORDS: second metabolites, phyto sterina, mutants, resistance to pest.