



УДК 577*632.4

ВПЛИВ ФІТОГОРМОНІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ ДЕФЕНЗИНІВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Ю. І. Шаловило, Ю. М. Юсипович, В. А. Ковальова, Р. Т. Гут

Національний лісотехнічний університет України
вул. Ген.Чупринки, 103, Львів 79057, Україна
e-mail: rgoutmollab@ukr.net

Рослинні дефензини – це багаті на цистеїн низькомолекулярні протеїни із широким спектром біологічної активності, які є ключовими молекулами природного імунітету рослин. Раніше нами було клоновано п'ять генів дефензинів сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), а саме: *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3*, *PsDef4* і *PsDef5.1*. У цьому дослідженні ми з'ясували, що експресія генів дефензинів сосни регулюється саліциловою (СК) і ясиновою (ЯК) кислотами, базовими сигнальними молекулами у захисній системі рослин. Так, екзогенна СК спричиняла підвищення рівня експресії усіх досліджуваних генів дефензинів від 20 до 80 %, а ЯК – від 69 до 120 %. Рістстимулювальні фітогормони ауксин (АК) та фурффуриламінопурин (ФФАП) пригнічували експресію генів *PsDef1* і *PsDef4* і не впливали на активність гомологічних генів *PsDef2* і *PsDef3*. Абсцизова кислота (АБК) збільшувала кількість транскриптів *PsDef1* і *PsDef4* на 100 і 20 %, відповідно. Гіберелінова кислота (ГК) підвищувала рівень експресії гена *PsDef4* на 65 % і не впливала на активність інших генів дефензинів сосни. Експресія гена дефензину *PsDef5.1* у восьмидобових проростках сосни звичайної повністю пригнічувалася під впливом екзогенних ЯК, ФФАП і АБК.

Ключові слова: сосна звичайна, експресія, дефензин, фітогормони.

ВСТУП

Рослинні організми впродовж усього онтогенезу постійно зазнають впливу несприятливих чинників навколишнього середовища. Різні абіотичні й біотичні стресори (такі як високі та низькі температури, посуха, засолення, дефіцит мінерального живлення або атаки патогенних мікроорганізмів) можуть серйозно вплинути на ріст і розвиток рослин. Виживання та збереження життєвого потенціалу рослинного організму за екстремальних умов визначається його здатністю швидко реагувати на різні стресові виклики, активувати ефективні захисні реакції та пристосовуватися до нових умов. Ключовими регуляторними компонентами захисних і адаптаційних механізмів рослин є гормони, які здатні індукувати стійкість організмів до широкого спектра стресових чинників.

Відомо, що у відповідь на патогенне ураження рослини синтезують широкий спектр сполук із антимікробними властивостями, серед яких різні групи PR-протеїнів (Pathogenesis Related proteins), таких як: ліпід-трансферні протеїни, геветіни, тіоніни, циклотиди, снейкіни, дефензини [5]. З'ясовано, що експресія різних PR-генів диференційовано регулюється саліцилат-залежним та/або ясминат/етилен-залежними сигнальними шляхами. Наприклад, у арабідопсису індукція генів PR-1, PR-2 і PR-5 проходить по саліцилат-залежному шляху, тоді як активація рослинного дефензину PDF1.2, основної хітинази PR-3 і геветіноподібного протеїну PR-4 відбувається по ясминатному шляху [19].

Вважають, що ці шляхи модулюють захисну відповідь рослин проти різних класів патогенів. Так, було з'ясовано, що екзогенна дія ясминової кислоти (ЯК) на рослини *Arabidopsis* сприяла їхній стійкості проти таких некротрофних патогенів, як *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* та *Plectosphaerella cucumerina*. Натомість, саліцилат-залежний шлях відповідає за формування стійкості до біотрофних патогенів. Зокрема, було продемонстровано, що за попередньої обробки рослин арабідопсису ізонікотиною кислотою функціональним аналогом саліцилової кислоти підвищується стійкість до біотрофу *Phytophthora parasitica*, а не до некротрофу *A. brassicicola* [16]. І хоча ці сигнальні шляхи є здебільшого антагоністичними, складно організована перехресна взаємодія між ними дає рослинам змогу досить чітко реагувати на чинники та визначати спектр і силу захисної відповіді. Водночас роль фітогормонів регуляторів росту і розвитку (ауксину, цитокініну, гіберелінової й абсцизової кислот) у функціонуванні сигнальних мереж, які задіяні у формуванні стійкості рослин до фітопатогенного ураження, є маловивченою.

Рослинні дефензини (PR-12) є одними із ключових молекул у природній імунності рослин. Ці багаті на цистеїн основні пептиди (з молекулярною масою близько 5 кДа) мають антифунгальну й антибактеріальну активність, інгібують амілази, протеази та іонні канали [4, 21]. Експресія генів дефензинів індукується грибами, бактеріями, комахами, рослинами-паразитами, абіотичними чинниками довкілля, (посуха, холод, засолення), а також стресовими гормонами (метилясминатом, етиленом і саліциловою кислотою) [22].

Нещодавно нами було клоновано декілька генів дефензинів сосни *PsDef1* (*Pinus sylvestris* defensin 1, GenBank Acc. No. EF455616.1), *PsDef2* (Acc. No. EF455617.1), *PsDef3* (Acc. No. JN 980401.1), *PsDef4* (Acc. No. KJ 601732) і *PsDef5.1* (Acc. No. KJ 601733) і з'ясовано особливості їхньої експресії за дії фітопатогенних мікроорганізмів [10, 12, 14, 23]. У цьому дослідженні ми поставили за мету з'ясувати характер впливу низки фітогормонів (ясминової та саліцилової кислот, ауксину, фурфуріламінопурину, абсцизової і гіберелінової кислот) на експресію дефензинів *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3*, *PsDef4* та *PsDef5.1*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. У дослідях використано насіння *Pinus sylvestris* L., люб'язно надане Львівським лісовим селекційно-насіннєвим центром. У чашках Петрі пророщували по 50 насінин на фільтрувальному папері, попередньо змоченому дистильованою водою, при температурі 26 °С. На 6-ту добу проростки сосни обприскували фітогормонами: 2 мкМ розчином СК (в 0,01% етанолі), 0,1 мМ розчином

ЯК (у 0,01% етанолі) та 0,01% розчином етанолу, як контроль. Через 48 год після оброблення проростки збирали, заморожували у рідкому азоті та зберігали за температури -80°C .

Для з'ясування впливу рістрегулювальних гормонів на рівень експресії дефензинів насіння сосни пророщували на фільтрувальному папері, змоченому 10 мкМ розчином одного із регуляторів росту: ауксину (АК), фурфуріламінопурину (ФФАП), абсцизової (АБК) або гіберелінової кислоти (ГК). Контрольні зразки пророщували на папері, змоченому 0,01% етанолом. Проростки збирали на восьму добу після гідратації та зберігали при -80°C .

Напівкількісна ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Сумарну РНК із рослинного матеріалу виділяли модифікованим методом літєво-хлоридної преципітації [6]. кДНК отримували за допомогою зворотної транскриптази RevertAid™ Premium (Fermentas, Литва) за протоколом виробника ензиму. Визначення рівня експресії дефензинів проводили методом мультиплексної напівкількісної ПЛР зі специфічними праймерами (див. таблицю).

Праймери, які використані в роботі

Primers used in this study

Ген	Послідовність олігонуклеотидів	Довжина продукту (п.н)
<i>PsDef1</i> EF455616.1	5'-GGGATGATGCAGGTTCAAGT-3'	159
	5'-ACATTTTCTGCCAGCCACAT-3'	
<i>PsDef2</i> EF455617.1	5'-TCCACTCAGTGCCCTTTTTC-3'	210
	5'-ACCAGCCGAAAGTGCTACTG-3'	
<i>PsDef3</i> JN980401.1	5'-AACCATTGGGATGATGGC-3'	190
	5'-GCACTTTCGGCTGGTGAC-3'	
<i>PsDef4</i> KJ601732.1	5'-TGTGCTGCTCGTGTTAG-3'	145
	5'-CGTTGGAAACCCTTCAGTA-3'	
<i>PsDef5.1</i> KJ601733.1	5'-TCTTGCTACTTGCAATACGT-3'	203
	5'-GATACATGGTTTCTCGCAGA-3'	
<i>RPL 44</i> EL342388.1	5'-CAAAGCTTGCAAAAAGCACA-3'	263
	5'-TTCCCTTCCCCTTCTGTCT-3'	

ПЛР реакцію проводили в 25 мкл реакційної суміші, яка містила кДНК, синтезовану на 50 нг сумарної РНК, 2 у.о. Тақ полімерази (Fermentas, Литва), ПЛР-буфер від виробника, 0,2 мМ дНТФ і 0,5 мкМ специфічних праймерів. Як контроль за перебігом ПЛР і визначення відносних рівнів експресії дефензинів використали ген "домашнього господарства" – *60S рибосомальний протеїн L44 (RPL44; GenBank Асс. No. EL342388)*. Умови ПЛР: денатурація при 95°C протягом 5 хв, з подальшими 25 циклами ампліфікації (95°C – 1 хв; 53 – 54°C – 1 хв; 72°C – 1 хв) і елонгація при 72°C протягом 5 хв. Розділення продуктів ПЛР проводили у 2% агарозному гелі в *трис*-боратній буферній системі (50 мМ *трис*- H_3BO_3 , рН 8,3; 2 мМ ЕДТА), гель зафарбовували бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували в УФ-світлі та фотографували.

Статистичне оброблення результатів. Денситометричний аналіз електрофореграм проводили за допомогою програми GelProAnalyzer 4.0 ("Media Cybernetics", США). Значення рівнів експресії генів дефензинів нормалізували щодо рівня експресії гена *RPL44*. Експерименти проводили у трикратній повторності. Для статистичного оброблення результатів використовували двобічний критерій Стьюдента. Статистично достовірною вважали різницю при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Стійкість сосни звичайної до патогенних організмів змінюється протягом усього онтогенезу. Найбільш уразливими до хвороб є проростки та сіянці, у яких ще не сформовані міцні механічні покриви. Тому великою проблемою під час вирощування садивного матеріалу в теплицях, в умовах підвищеної вологості й температури, є інфекційне вилягання сіянців, яке викликають гриби родів *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Pythium*. Однією із необхідних умов отримання високоякісних сіянців є захист їх від фітозахворювань. У сільському господарстві з цією метою дедалі частіше використовуються екологічно безпечні комплексні препарати, до складу яких входять сполуки із гормональною активністю, які здатні підвищувати природний імунітет рослин і стимулювати ріст.

Ми дослідили вплив екзогенних стресових фітогормонів СК та ЯК на рівень експресії генів дефензинів. Для цього 6-добові проростки сосни звичайної обробляли розчинами гормонів і через 48 год визначали рівень транскриптів генів дефензинів методом мультиплексною напівкількісної ПЛР (рис. 1). Діючу концентрацію фітогормонів визначили відповідно до робіт I. Pervieux [17].

Як видно із рис. 1, обидва гормони підвищували рівень експресії генів *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3* і *PsDef4*, причому вплив ясинової кислоти був більш виражений. Так, вміст транскриптів *PsDef1* у проростках, оброблених саліцилатом, був на 41 %, а ясиноматом – на 80 % вищим за такий у контрольних рослин. За дії СК і ЯК найбільше зростав рівень експресії гена *PsDef2* на 80 і 120 %, відповідно. Ймовірно, що подібна реакція чотирьох генів дефензинів на дію стресових гормонів пов'язана із їх високою гомологією, ідентичність амінокислотних послідовностей, які кодують ці гени, становить 91–98 %. Натомість Е. Jaber et al. встановили супресію гена *PsDef1* 100 мМ метилямсиноматом і 5 мМ СК [11]. Ми припускаємо, що причиною такого ефекту є використання цими авторами високих кількостей стресових гормонів, які перевищують діючі концентрації на 2–3 порядки. Як відомо, високі концентрації стресових гормонів можуть пригнічувати синтез протеїнів і навіть викликати апоптичну загибель клітин [8]. Непрямим доказом того, що дефензини *PsDef1-4* можуть регулюватись обома досліджуваними гормонами, є той факт, що промоторна ділянка гомологічного дефензину *PgD1* містить регуляторні мотиви, чутливі до СК і ЯК [9].

Іншу картину спостерігали під час досліджень експресії гена *PsDef5.1* під впливом екзогенних стресових фітогормонів. Якщо СК підвищувала її на 20 %, то за дії ЯК транскриптів цього гена у проростках не виявлено. Варто зазначити, що *PsDef5.1* експресується виключно у генеративних органах і насінні, у проростках його транскрипти визначаються лише до початку інтенсивного видовження гіпокотилля. Ми припускаємо, що експресія цього гена регулюється сигналами, які активують процеси інтенсивної проліферації та диференціації клітин проростка.

Прогресивні технології лісовідновлення й лісорозведення передбачають застосування інтенсивних методів вирощування високоякісного садивного матеріалу із використанням регуляторів росту рослин. Тому актуальним є завдання з'ясувати вплив рістрегулювальних гормонів на потенційну стійкість сіянців до фітозахворювань. Ми дослідили вплив ауксину, фурфуриламінопурину, абсцизової кислоти й гіберелінової кислоти на рівень експресії генів дефензинів, пептидів, які завдяки своїм антимікробним властивостям забезпечують стійкість сіянців до ґрунтових патогенів [12, 22].

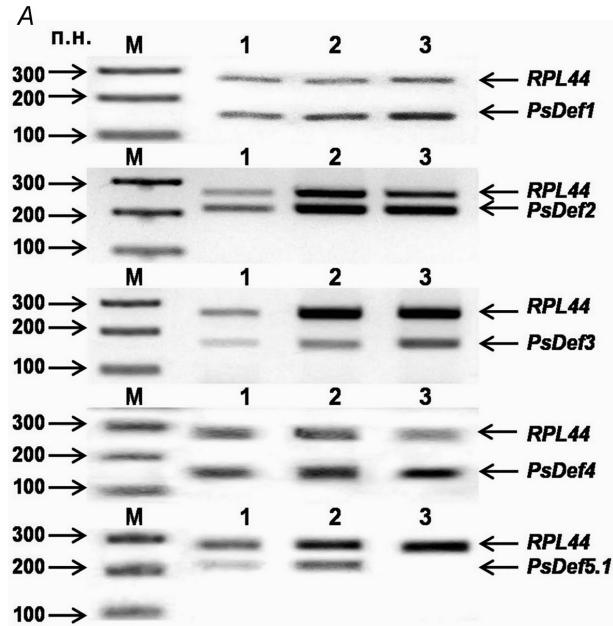
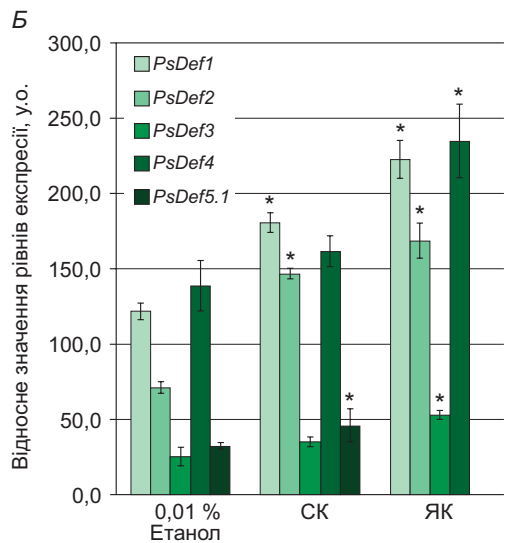


Рис. 1. Вплив екзогенних стресових фітогормонів на експресію дефензинів сосни звичайної: **А** – електрофорез ампліфікованих продуктів експресії генів дефензинів у 8-добових проростках: М – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва); 1 – 0,01 % етанол; 2 – СК; 3 – ЯК. Стрілками справа вказано продукти ПЛР. **Б** – гістограма рівня експресії дефензинів, перерахованого щодо *RPL44*; * – достовірно при $p \leq 0,05$

Fig. 1. Effect of exogenous stress phytohormones on defensin expression in Scots pine: **A** – electrophoresis of the amplified products of defensin gene expression in 8-days-old seedlings: М – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва); 1 – 0.01 % ethanol; 2 – SA; 3 – JA. Right arrows indicate the PCR-products. **B** – histogram of expression level of defensin genes calculated relative to *60S RPL44*; * – significant at $p \leq 0.05$



У результаті аналізу рівня експресії генів дефензинів сосни за нормалізацією утворених ампліконів щодо гена *RPL44* визначено, що досліджувані гормони не впливали на рівень експресії генів *PsDef2* і *PsDef3* (рис. 2).

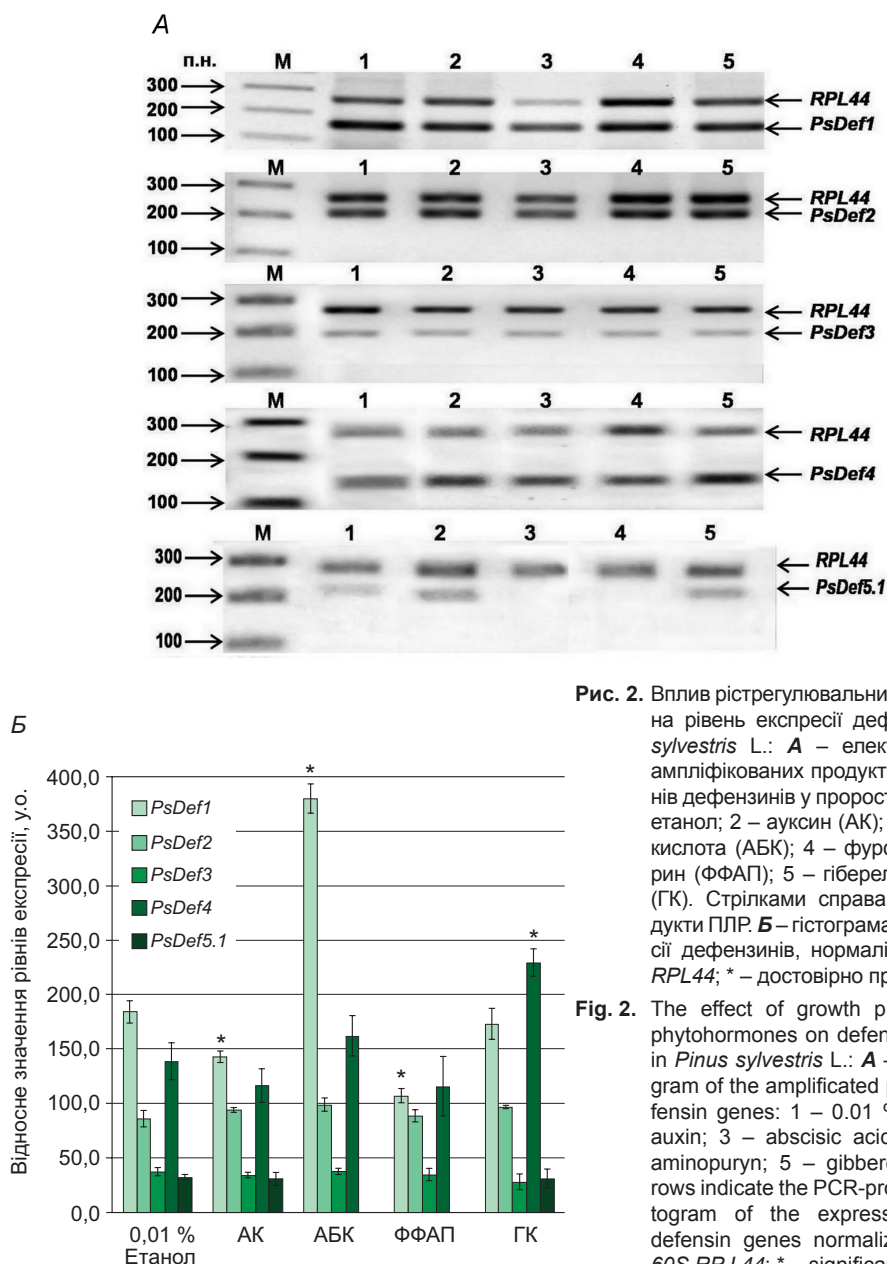


Рис. 2. Вплив рістрегулювальних фітогормонів на рівень експресії дефензинів *Pinus sylvestris* L.: **А** – електрофореграма амплікованих продуктів експресії генів дефензинів у проростках: 1 – 0,01% етанол; 2 – ауксин (АК); 3 – абсцизова кислота (АБК); 4 – фурфуриламінопурин (ФФАП); 5 – гіберелінова кислота (ГК). Стрілками справа вказано продукти ПЛР. **Б** – гістограма рівнів експресії дефензинів, нормалізованих щодо *RPL44*; * – достовірно при $p \leq 0,05$

Fig. 2. The effect of growth promoting plant phytohormones on defensin expression in *Pinus sylvestris* L.: **A** – electropherogram of the amplified products of defensin genes: 1 – 0.01 % ethanol; 2 – auxin; 3 – abscisic acid; 4 – furfurylamino-purine; 5 – gibberellin. Right arrows indicate the PCR-products. **B** – histogram of the expression levels of defensin genes normalized relative to *60S RPL44*; * – significant at $p \leq 0.05$

Найбільш чутливим виявився ген *PsDef1*: ауксин і фурфуриламінопурин, який належить до класу цитокинінів, знижували експресію цього гена на 24 і 40 %, відповідно. Як відомо, ауксин, впливаючи на ріст і розвиток рослин, індукуює експресію

GH3 генів, які кодують ІОК-амідо синтетази, що регулюють рівень ауксину в клітинах. X. Ding et. al. довели, що надекспресія гена GH3-8 у рослин призводила до супресії генів, чутливих до саліцилової та ясинової кислоти, зокрема і дефензинів [7]. У *Arabidopsis* серед генів, експресія яких пригнічується у відповідь на екзогенний цитокінін, виявлено ген дефензину *PDF1.2b* [15]. Подібний характер впливу цих фітогормонів було виявлено нами і для гена *PsDef4*. Натомість в іншому дослідженні, виконаному також на *Arabidopsis* із застосуванням ДНК-чипів, було встановлено, що обробка проростків 5 мкМ цитокініном підвищувала у 3–4 рази експресію трьох дефензиноподібних генів (AT4G22214, AT3G13403, AT4G22230) [3]. Нещодавні дослідження підтвердили, що дефензини у геномах рослин представлені мультигенними родинами і, окрім захисту рослин проти фітопатогенних організмів, вони залучені до регуляції росту, процесів запліднення й адаптації до абіотичного стресу [13, 18]. Відповідно, і регуляція різних генів дефензинів буде диференційованою залежно від виконуваних ними функцій.

Абсцизова кислота бере участь у регуляції багатьох аспектів росту і розвитку рослини. Вона належить до гормонів стресу, оскільки швидко накопичується у тканинах у разі водного дефіциту, під дією холоду, іонів солей, ультрафіолетового випромінювання. Нами виявлено, що за дії екзогенної АБК експресія гена *PsDef1* зростала удвічі, а *PsDef4* – на 20 %. В. F. Adie et al. довели, що АБК залучена до біосинтезу ЯК і активує ЯК-чутливі гени, зокрема і дефензини [1].

Із п'яти досліджуваних генів дефензинів сосни тільки *PsDef4* відреагував на екзогенну ГК, збільшивши на 65 % кількість транскриптів. Подібну дію цього гормону на експресію гена дефензину *tgas118* виявлено у *Lycopersicon esculentum* [20].

Кількість транскриптів гена *PsDef5.1* у проростках не змінювалася за дії ауксину та гібереліну, АБК і ФФАП пришвидшували “виключення” цього гена у ранньому постембріогенезі.

ВИСНОВКИ

Отже, нами було доведено, що експресія генів дефензинів сосни звичайної регулюється ясиновою і саліциловою кислотами, ключовими сигнальними молекулами природної імунності рослин. Екзогенні СК і ЯК підвищували рівень транскриптів *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3* і *PsDef4* у восьмидобових проростках.

Вплив екзогенних рістрегулювальних гормонів на експресію генів дефензинів сосни був диференційованим. Ауксин і фурфуриламінопурин пригнічували експресію генів *PsDef1* і *PsDef4*, а абсцизова кислота викликала протилежний ефект. Гіберелінова кислота підвищувала експресію тільки одного гена дефензину *PsDef4* із п'яти досліджуваних. ЯК, АБК і ФФАП супресували активність гена *PsDef5.1* у ранньому постембріогенезі сосни. Отримані результати свідчать, що рістрегулювальні фітогормони опосередковано через сигнальні мережі впливають на активність генів дефензинів сосни звичайної.

1. *Adie B.A., Pérez-Pérez J., Pérez-Pérez M.M.* et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 2007; 19(5): 1665–1681.
2. *Bari B., Jones J.D.G.* Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant. Mol. Biol.**, 2009; 69: 473–488.
3. *Bhargava A., Clabaugh I., To J.P.* et al. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 2013; 162: 272–294.
4. *Carvalho A.O., Gomes V.M.* Plant defensins – Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, 2009; 30: 1007–1020.
5. *Castro M.S., Fontes W.* Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and Peptide Letters**, 2005; 12(1): 11–16.
6. *Chang S., Puryear J., Cairney J.* A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Biol. Rep**, 1993; 11: 113–116.
7. *Ding X., Cao Y., Huang L.* et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. **Plant Cell**, 2008; 20:228–240.
8. *Garcia-Heredia J.M., Hervas M., De la Rosa M.A., Navarro J.A.* Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. **Planta**, 2008; 228(1): 89–98.
9. *Germain H., Lachance D., Pelletier G.* et al. The expression pattern of the *Picea glauca* Defensin 1 promoter is maintained in *Arabidopsis thaliana*, indicating the conservation of signaling pathways between angiosperms, and gymnosperms. **Journ. of Exp. Botany**, 2012; 63(2): 785–795.
10. *Gout R.T., Yusypovych Yu.M., Kovaleva V.A.* Patterns of defensin gene expression in different organs of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Nauk. Praci Forestry Academy of Sciences of Ukraine**, 2011; 9: 86–89. (In Ukrainian).
11. *Jaber E., Xiao C., Asiegbu F.O.* Comparative pathobiology of *Heterobasidion annosum* during challenge on *Pinus sylvestris* and *Arabidopsis* roots: an analysis of defensin gene expression in two pathosystem. **Planta**, 2014; 239: 717–733.
12. *Kovaleva V., Kiyamova R., Cramer R.* et al. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. **Peptides**, 2009; 30(12): 2136–2143.
13. *Kovaleva V.A.* Defensins in plant genomes of *Pinaceae* family. **Nauk. Visnyk of Ukrainian National Forestry University**, 2010; 20.2: 32–36. (In Ukrainian).
14. *Koval'ova V.A., Hut R.T.* Molecular cloning and characterization of Scotch pine Defensin-2. **Cyt. Genet**, 2008; 42: 55–60. (In Ukrainian).
15. *Lee D.J., Park J.-Y., Ku S.-J.* et al. Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7(ARR7) overexpression in cytokinin response. **Mol. Genet. Genomics**, 2007; 277: 115–137
16. *Penninckx I.A.M.A., Thomma B.P.H.J., Buchala A.* et al. Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, 1998; 10: 2103–2113.
17. *Pervieux I., Bourassa M., Laurans F.* et al. Spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2004; 64: 331–341.
18. *Silvestein K., Graham M., Paape T., van den Bosh K.* Genome organization of more 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, 2005; 138(4): 600–610.
19. *Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A.* et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1998; 95: 15107–15111.
20. *van den Heuvel K.J., Hulzink J.M., Barendse G.W., Wullems G.J.* The expression of tgas118, encoding a defensin in *Lycopersicon esculentum*, is regulated by gibberellin. **Journ. of Exp. Botany**, 2001; 52(360): 1427–1436.

21. *van der Weerden N.L., Anderson M.A.* Plant defensins: Common fold, multiple functions. **Fungal Biology Reviews**, 2013; 26: 121–131.
22. *Vriens K., Cammue B.P.A., Thevissen K.* Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. **Molecules**, 2014; 19: 12280–12300.
23. *Yusypovych Y.M., Gout R.T., Kovaleva V.A.* The influence of phytopathogenic fungi *Heterobasidion annosum* and *Fusarium oxysporum* to the defensin expression level in seedlings. **Nauk. Visnyk of Ukrainian National Forestry University**, 2008; 18.7: 123–127. (In Ukrainian).

THE EFFECT OF PHYTOHORMONES ON EXPRESSION OF DEFENSIN GENE IN SCOTS PINE

Yu. I. Shalovylo, Yu. M. Yusypovych, V. A. Kovaleva, R. T. Gout

*Ukrainian National Forestry University, 103, Chuprynka St., Lviv 79057, Ukraine
e-mail: rgoutmollab@ukr.net*

Defensins are low molecular weight cysteine-rich proteins with a wide spectrum of biological activity, which are key molecules in innate plant immunity. Previously, we have cloned five defensin genes of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), namely: *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3*, *PsDef4* and *PsDef5.1*. In this study, we demonstrated that expression of pine defensin genes is regulated by salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids. Thus, exogenous SA causes an increase in defensin gene expression from 20 to 80 %, and JA – from 69 % to 120 %. Growth promoting plant hormones auxin (IAA) and furfurylaminopurine (FFAP) inhibited *PsDef1* and *PsDef4* gene expression and had no effect on the activity of homologous genes *PsDef2* and *PsDef3*. The abscisic acid (ABA) increased the number of *PsDef1* and *PsDef4* transcripts by 100 % and 20 %, respectively. The gibberellic acid (GA) increased the level of *PsDef4* gene expression by 65% and had no effect on the activity of other pine defensin genes. Expression of *PsDef5.1* is completely suppressed by the exogenous JA, FFAP and ABA in the eight-days-old seedlings of Scots pine.

Keywords: Scots pine, expression, defensin, phytohormones.

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ДЕФЕНЗИНОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Ю. И. Шаловило, Ю. М. Юсипович, В. А. Ковалева, Р. Т. Гут

*Национальный лесотехнический университет Украины
ул. Ген. Чупринки, 103, Львов 79057, Украина
e-mail: rgoutmollab@ukr.net*

Растительные дефензины – это обогащенные цистеином низкомолекулярные белки с широким спектром биологической активности, которые являются ключевыми молекулами естественного иммунитета растений. Ранее нами было клонировано пять генов дефензинов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), а именно: *PsDef1*, *PsDef2*, *PsDef3*, *PsDef4* и *PsDef5.1*. В этом исследовании мы показали, что экспрессия генов дефензинов сосны регулируется салициловой (СК) и жасмино-

вой (ЖК) кислотами, базовыми сигнальными молекулами в защитной системе растений. Так, экзогенная СК вызывала повышение уровня экспрессии всех исследуемых генов дефензинов от 20 до 80 %, а ЖК – от 69 до 120 %. Ростостимулирующие фитогормоны ауксин (АК) и фуруриламинопурин (ФФАП) подавляли экспрессию генов *PsDef1* и *PsDef4* и не влияли на активность гомологических генов *PsDef2* и *PsDef3*. Абсцизовая кислота (АБК) увеличивала количество транскриптов *PsDef1* и *PsDef4* на 100 и 20 %, соответственно. Гиббереллиновая кислота (ГК) повышала уровень экспрессии гена *PsDef4* на 65 % и не влияла на активность других генов дефензинов сосны. Экспрессия гена дефензина *PsDef5.1* в восьмидневных проростках сосны обыкновенной полностью подавлялась экзогенными ЖК, ФФАП и АБК.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, экспрессия, дефензины, фитогормоны.

Одержано: 12.01.2015