

УДК 577.112 Мол. наук співроб. В.А. Ковальова; проф. Г.Т. Криницький,
д-р. біол. наук; доц. Р.Т. Гут, канд. біол. наук – НЛТУ України, м. Львів

АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ДЕФЕНЗИНУ У ПРОЦЕСІ ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Вестерн-блот аналізом за допомогою поліклональних анти-GST-PsDef1 антитіл виявлено істотні зміни у рівні експресії дефензину, захисного білка рослин під час проростання насіння сосни (*Pinus sylvestris* L.).

Ключові слова: дефензин сосни звичайної; експресія; поліклональні анти-GST-PsDef1 антитіла.

*Junior research officer V.A. Kovalyova; prof. H.T. Krynytskyu;
assoc. prof. R.T. Gout – NUFWT of Ukraine, L'viv*

Analysis of Scots pine defensin expression under a seed germination

The substantial changes in the expression of Scots pine defensin under a seed germination were found by Western-blot analysis with polyclonal anti-GST-PsDef1 antibodies.

Keywords: scots pine defensin; expression, polyclonal anti-GST-PsDef1 antibodies.

Упродовж останнього десятиліття досягнуто значного прогресу у розумінні механізмів реагування рослинних організмів на зміни умов їх існування, зокрема на дію патогенних організмів. Нагромаджено великий обсяг фактичного матеріалу, який свідчить, що дефензини багатьох видів покрито-насінних є важливим компонентом природного захисту рослинних клітин [1].

Нагромаджені знання щодо біологічних властивостей рослинних дефензинів та їх ролі у захисті рослин від інфекцій вже починають використовуватися для вирішення практичних завдань сільського господарства. Так, є приклади отримання трансгенних рослин з геном дефензину, які виявили підвищену стійкість до патогенів [1]. Поряд з тим, випробовуються препарати, що містять еліситери, інтермедіати сигнальних систем клітин, стресові фітогормони для стимулювання експресії генів захисних білків та формування системної набутої або індукованої стійкості [2]. Однак, треба зазначити, що дуже мало робіт присвячено вивченню ролі патогеніндукованих білків у захисті лісотвірних деревних порід від ураження фітопатогенами, хоча інфікування деяких деревостанів хвойних порід небезпечними збудниками коренових гнилей в Україні сягає 100 %. Значного поширення набули грибні ураження сіянців та саджанців у розсадниках.

Нещодавно відкритий нами дефензин сосни звичайної виявив високу активність проти фітопатогенних грибів, які викликають захворювання хвойних деревних порід [3-5]. Відомо, що проростання насіння – це один з найбільш уразливих періодів в онтогенетичному розвитку рослини, тому дослідження експресії дефензину саме на цьому етапі є важливим для з'ясування механізмів формування стійкості хвойних порід до біотичного стресу.

Матеріали і методи

У досліджах використовували відсортоване життєздатне насіння *Pinus sylvestris* L., отримане з ДП "Буське ЛГ" Львівської області. Насіння сосни пророщували в термостаті за температури 26 °C у чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою. Проростки видаляли, за-

морожували у рідкому азоті та зберігали за температури -70°C до їхнього використання.

Гомогенати тканин отримували механічним розтиранням у гомогенізаторі Поттера за 4°C з додаванням лізуючого буферу, що містив 50 мМ трис- HCl , рН 7,5, 150 мМ NaCl , 1 % Тритон X-100 ("Sigma") 5 мМ EDTA та набір інгібіторів протеїназ ("Roche"). Отримані лізати центрифугували протягом 25 хв за 13000 g, 4°C . Концентрацію сумарного білка в отриманих супернатантах визначали за методом Бредфорда.

Вестерн-блот аналіз проводили після електрофорезу у 15 % ДСН-ПА-АГ у трис-трициновій буферній системі [6]. Електроперенос білків з гелю на мембрану проводили на апараті Trans-Blot™, за рекомендаціями виробника ("Bio-Rad") при 250 мА протягом 2 год.

Після напівсухого переносу мембрану інкубували в буфері для блокування 5 % знежиреного сухого молока в забуферному фізіологічному розчині (ЗФР) за присутності 0,1 %-го Твін-20 упродовж 1 год. за кімнатної температури для блокування сайтів неспецифічного зв'язування на мембрані. Мембрану інкубували з анти-дефензин 1 у блокувальному буфері (1:1000) 2 год. за кімнатної температури. Надлишок антитіл відмивали буфером для блокування. Мембрану відмивали три рази по 10 хв. вказаним буфером. Анти-IgG кроля антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, додавали у розведенні 1:2500 та інкубували протягом 1 год. за кімнатної температури. Після інкубації мембрану знову відмивали від надлишку антитіл буфером ЗФРТ три рази по 5 хв. Імунореактивні білки виявляли за реакцією посиленої хемілюмінесценції (ECL). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1-15 хв.

Денситометричний аналіз мікрофотографій здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4.0 ("Media Cybernetics", США).

Результати та їх обговорення

Проростання насіння – один з найбільш критичних періодів в онтогенетичному розвитку рослини для ураження патогенними мікроорганізмами. У цей момент механічні конститутивні бар'єри ще не сформовані, а цілісність насінневих покривів, які забезпечували захист, порушується при наклёвуванні насіння. І як свідчать літературні джерела, ключову роль у запобіганні інфікуванню в цей період виконують антимікробні компоненти, що синтезуються проростком, зокрема дефензини [7]. Так відомі роботи І. Первеукс [8] та К. Фоссдала [9] показали, що експресія дефензинів ялини голубої (PgD1) та ялини європейської (SPI 1) починається після появи проростку і значно посилюється при елонгації гіпокотилу. Оскільки PgD1 та SPI 1 та дефензин сосни звичайної (PsDef1) належать до одної групи, то для порівняння ми дослідили профіль експресії PsDef1 у процесі проростання сосни звичайної за допомогою отриманих нами поліклональних антитіл (рис. 1).

В експерименті використано зародки зі сухого насіння, а також 1...7-ми денні проростки. На електрофоретичну доріжку наносили близько 10 мкг білка кислоторозчинного екстракту кожного зразка (рис. 1, а). Як видно з рис. 1, б, імунореактивна смуга з молекулярною масою близько 6 кДа

спостерігається у всіх зразках, але сила сигналу змінюється (рис. 1, в), посилюючись на шостий, а особливо на сьомий день проростання.

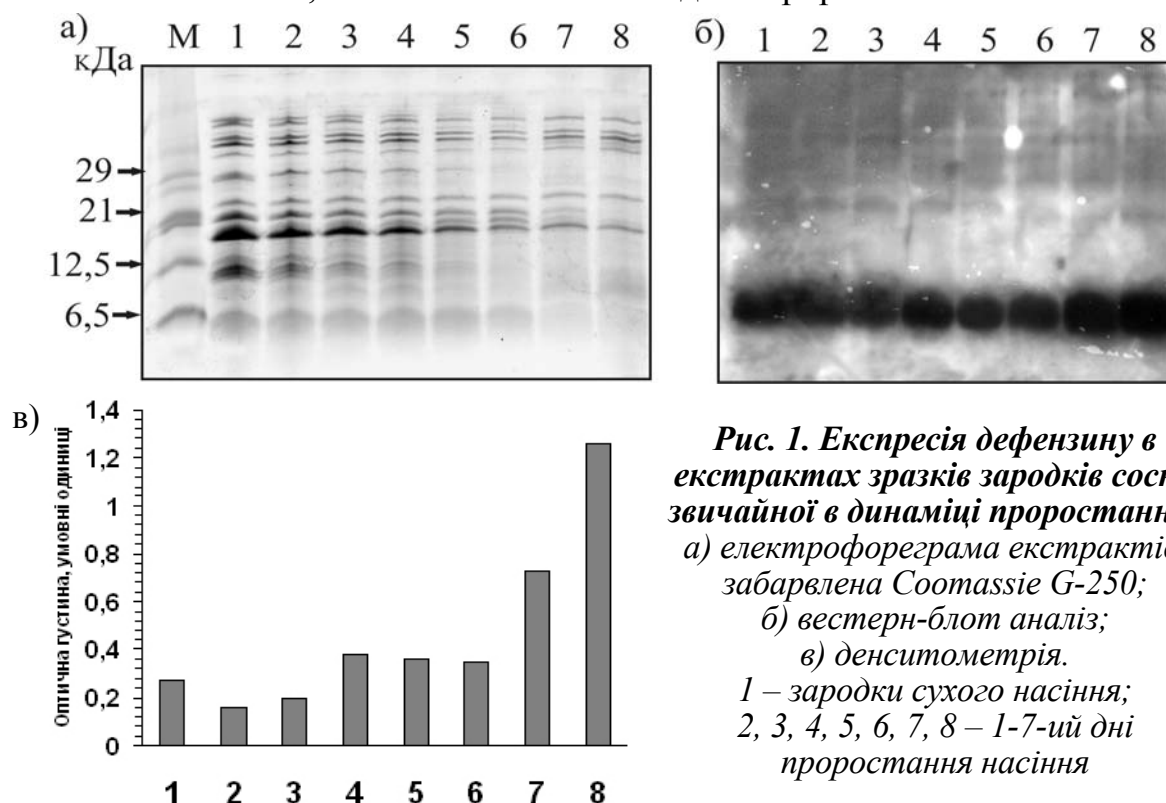


Рис. 1. Експресія дефензину в екстрактах зразків зародків сосни звичайної в динаміці проростання:
 а) електрофореграма екстрактів, забарвлена Coomassie G-250;
 б) вестерн-блот аналіз;
 в) денситометрія.
 1 – зародки сухого насіння;
 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – 1-7-ий дні проростання насіння

Цікавим є факт наявності специфічного сигналу в насінні, яке знаходиться в стані спокою, оскільки на цей час існує думка, що дефензини хвойних порід не беруть участі у захисті насіння від патогеної інвазії, на відміну від покритонасінних, в яких більшість дефензинів мають насіннєве походження. Ця гіпотеза виникла внаслідок того, що імуноблотингом з використанням анти-SPI 1 антитіл не виявлено дефензинів у насінні ялини європейської, яке перебуває у стані спокою [9], а також не знайдено транскриптів PgD1 і в насінні *Picea glauca* [8]. Варто зауважити, що анти-SPI 1 антитіла були специфічні до невеликого фрагменту (12 амінокислотних залишків) дефензину ялини, а ця ділянка дуже варіабельна в дефензинів хвойних, і тому, на нашу думку, ці антитіла не розпізнають епітопів дефензинів насіннєвого походження, рівень гомології яких з SPI 1 становить 50 %. Ми отримали антитіла проти повної амінокислотної послідовності дефензину сосни звичайної, що розширює їх можливості у виявленні експресії дефензинів у хвойних.

Для виявлення впливу фітопатогенного гриба на рівень експресії дефензину, п'ятиденні проростки інокулювали грибом *Heterobasidion annosum* і на третю добу аналізували імуноблотингом (рис. 2). Як контроль використовували восьмиденні неінфіковані проростки.

За результатами анти-PsDef1 імуноблотингу в умовах біотичного стресу, викликаного дією некротрофного фітопатогена *H. annosum*, рівень експресії дефензину сосни зростає, що свідчить про активацію механізмів захисту еліситерними молекулами гриба. Як відомо з попередніх наших досліджень, ендогенний дефензин сосни володіє високою активністю *in vitro* щодо *H. annosum* [10], і підвищення рівня експресії за умов дії патогена сприяє розвитку стійкості проростків до грибної інвазії.

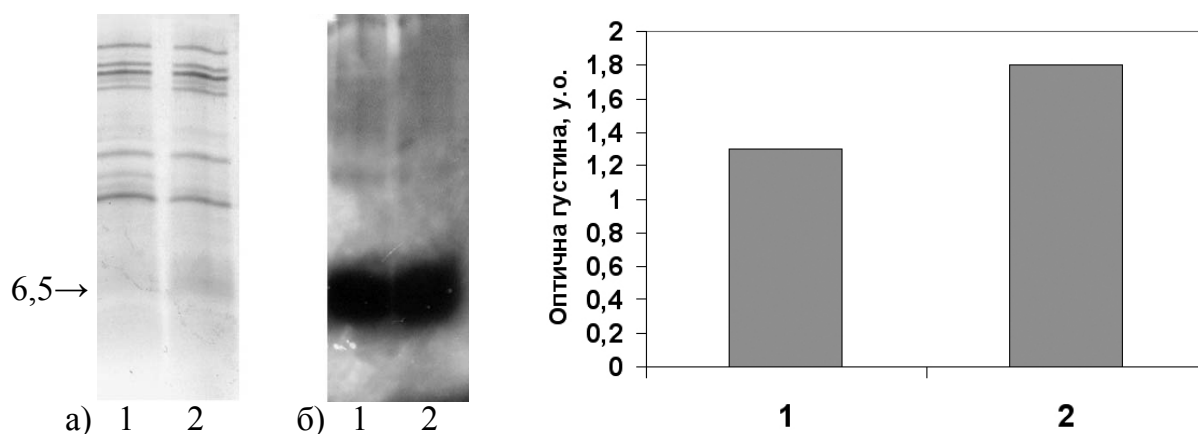


Рис. 2. Експресія дефензину 1 сосни за умов дії фітопатогенного чинника:

а) електрофореграма білків проростків; б) імуноблотинг; в) денситограма.

*1 – неінфіковані проростки; 2 – проростки, інюльовані *H. annosum**

Таким чином, отримані результати свідчать, що при проростанні насіння сосни звичайної реалізується генетична програма захисту уразливих для патогенних мікроорганізмів тканин шляхом експресії антимікробних білків, зокрема дефензинів, навіть за відсутності біотичних стресорів. Отримані нами специфічні анти-дефензин 1 антитіла можуть бути хорошим інструментом для вивчення впливу різних факторів біотичної та абіотичної природи на експресію дефензину сосни та формування стійкості хвойних деревних порід до фітозахворювань.

Література

1. Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. Plant defensins// *Planta*. – 2002, vol. 216. – P. 193-202.
2. Gao A.G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M. Fungal protection in potato by expression of a plant defensin peptide// *Nat. Biotechnol.* – 2000, vol. 18. – P. 1307-10.
3. Ковальова В.А., Гут Р.Т. Виділення білків із фунгіцидною активністю з проростків сосни звичайної// *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2006, vol. 39. – С. 114-120.
4. Kovaleva V.A., Gout R.T. Isolation and the antifungal activity of defensin-like protein from Scots pine roots// *Joint conference of UIFRO "Population genetics and genomics of forest trees: from gene function to evolutionary dynamics and conservation. October 1-6, 2006, Madrid*. – P. 188-189.
5. Ковальова В.А., Гут І.Т., Гут Р.Т. Характеристика двох дефензиноподібних білків з проростків сосни звичайної// *Біополімери і клітина*. – 2006, vol. 22. – С. 126-131.
6. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton// *Anal. Biochem.* – 1987, vol. 166. – P. 368-379.
7. Liu Y., Luo J., Xu C., Ren F., Peng C., Wu G., Zhao J. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed// *Plant Physiology*. – 2000, vol. 122. – P. 1015-1024.
8. Pervieux I., Bourassa M., Laurans F., Hamelin R., Seguin A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments// *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2004, vol. 64. – P. 331-341.
9. Fossdal C.G., Nagy N.E., Sharma P., Lönneborg A. The putative gymnosperm plant defensin polypeptide (SPI1) accumulates after seed germination, is not readily released, and the SPI1 levels are reduced in *Pythium dimorphum*-infected spruce roots// *Plant Mol. Biol.* – 2003, vol. 52. – P. 291-302.
10. Ковальова В.А., Гут І.Т., Гут Р.Т. Очистка та характеристика дефензину з коренів *Pinus sylvestris* L.// *Матеріали IX Українського біохімічного з'їзду 24-27 жовтня 2006 р., Харків*. – С. 45-46.