



УДК 577*632.4

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ЛІПІДТРАНСФЕРНОГО ПРОТЕЇНУ В ОРГАНАХ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

Н. І. Груник, В. А. Ковальова, Р. Т. Гут

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

Визначено профіль експресії гена ліпідтрансферного протеїну *PsLTP1* (*Pinus sylvestris lipid transfer protein 1*) у вегетативних та генеративних органах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) методом полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Встановлено, що експресія гена *PsLTP1* є тканинспецифічною та змінюється протягом онтогенетичного розвитку. Досліджено вплив фітогормонів на рівень експресії *PsLTP1* у проростках сосни звичайної.

Ключові слова: сосна звичайна, ліпідтрансферний протеїн *PsLTP1*, експресія.

ВСТУП

У ході еволюції рослинні організми розвинули багаторівневу систему захисту від потенційних патогенів. Одним із компонентів цієї системи є велика група сполук із антимікробними властивостями: фітоалексини, фітоантисипіни, протеїни, пов'язані з патогенезом (PR-протеїни) і антимікробні пептиди (АМП). За просторовою структурою та характерним розташуванням залишків цистеїну в молекулі АМП рослин поділяються на декілька родин: дефензини, тіоніни, ліпідтрансферні протеїни (LTP), циклотиди, снейкіни, геветіни та кнотини [5, 10].

Однією із груп АМП рослин, для якої властивий широкий спектр біологічної активності, є ліпідтрансферні протеїни. Молекула LTP рослин характеризується невеликим розміром (7–9 кДа), позитивним зарядом і специфічним мотивом із восьми залишків цистеїну. Третинну структуру LTP формують чотири α -спіральні ланцюги, які стабілізовані дисульфідними зв'язками, та довгий С-кінцевий сегмент. Спіральні ділянки з'єднані між собою рухливими петлями і утворюють гідрофобну кишеню, яка забезпечує взаємодію LTP з жирними кислотами та фосфоліпідами. Ліпідтрансферні протеїни рослин, на відміну від гомологічних їм протеїнів тварин, володіють низькою специфічністю до ліпідів, за що отримали назву „неспецифічні ліпідтрансферні протеїни – nLTP” [2, 13, 17].

Встановлено, що LTP регулюють внутрішньоклітинний міжмембранний транспорт ліпідів, а також залучені до процесів ембріогенезу, росту і розвитку рослин,

адаптації рослинних організмів до стресових чинників довкілля. Деякі LTP рослин проявили активність щодо грибів, бактерій і вірусів *in vitro* [7, 13, 19, 21, 27]. На участь цих пептидів у захисних реакціях вказує посилення експресії генів LTP при інфікуванні, а також підвищення стійкості трансгенних рослин тютюну й арабідопсису, які експресували ген LTP2 ячменю, до ураження бактеріями роду *Pseudomonas* [9].

Гени LTP у геномах рослин утворюють дивергентні мультигенні родини і локалізовані у різних хромосомах. Для кожного гена характерний складний профіль експресії, з чітко вираженою тканинною та органоспецифічністю, який залежить від стадії онтогенетичного розвитку рослинного організму і може змінюватися під впливом абіотичних та біотичних стресових чинників [4, 12, 13, 26, 30]. Експресія LTP виявлена в насінні, стручках, листках, стовбурах, пагонах, фруктах, квітках і коренях різних видів рослин. Високі рівні експресії виявлено у периферійних шарах клітин надземних органів, де вони створюють захисний бар'єр на шляху потенційних патогенів безпосередньо, завдяки своїм антимікробним властивостям, а також опосередковано – через участь у синтезі кутину [9, 14, 30].

Серед голонасінних гени LTP виявлені у *Pinus taeda*, *P. monticola*, *P. elliotii*, *Pinus abies* та *Ginkgo biloba*, але їхні профілі експресії не вивчено [15, 21, 24, 29]. Нещодавно нами було очищено ліпідтрансферний протеїн із проростків сосни звичайної та показано його антифунгальні властивості [16]. Нуклеотидну послідовність *PsLTP1* (*Pinus sylvestris* lipid transfer protein 1), яка кодує ліпідтрансферний протеїн сосни звичайної, ми клонували і зареєстрували у GenBank (Acc. No. [JN980402.1](#)). Метою даної роботи було проаналізувати особливості експресії *PsLTP1* у вегетативних і генеративних органах сосни звичайної та з'ясувати характер впливу екзогенних фітогормонів саліцилової (СК), ясинової (ЯК), абсцизової кислот (АК), гетероауксину та кінетину на рівень експресії цього гена у проростках сосни.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. У дослідах використано насіння *Pinus sylvestris* L., люб'язно надане Львівською зональною лісонасінневою станцією. На чашках Петрі пророщували по 50 насінин на фільтрувальному папері, попередньо змоченому дистильованою водою, за температури 26°C. Проростки відбирали на третю і восьму добу після гідратації, розділяли на частини (корінці, гіпокотилі, сім'ядолі), швидко заморожували їх у рідкому азоті та зберігали за температури -80°C до їхнього використання. Хвою, корінь, вегетативні бруньки, кору, а також макростробіли (жіночі шишки), мікростробіли (чоловічі шишки) та пилок поточного року відбирали з 15-річної сосни Дендроботанічного саду НЛТУ України. Насіння збирали з дворічних макростробілів сосни у липні (незріле насіння) та листопаді (зріле насіння). Після відбору всі зразки швидко заморожували при -80°C до подальшого використання.

Вплив стресових фітогормонів на рівень експресії гена *PsLTP1* визначали шляхом обприскування 6-добових проростків сосни 2 мкМ розчином саліцилату (в 0,1% етанолі), 1 мМ розчином ясинонату (у 0,1% етанолі) або 0,1% розчином етанолу як контролю. Проростки збирали через 48 год після оброблення та зберігали при -80°C. Вплив АК, гетероауксину (індоліл-3-оцтової кислоти – ІОК) та кінетину (6-фурфуріл-амінопурину) на рівень експресії гена *PsLTP1* у проростках досліджували при пророщуванні насіння на фільтрувальному папері, змоченому 10 мкМ розчинами АК, гетероауксину або кінетину (в 0,1% етанолі). Контрольні

зразки пророщували на папері, змоченому 0,1% етанолом. Проростки збирали на восьму добу після гідратації та зберігали при -80°C .

Напівкількісна ЗТ-ПЛР. Сумарну РНК із рослинного матеріалу виділяли модифікованим методом літєво-хлоридної преципітації [6]. Для синтезу кДНК використали рівні кількості сумарної РНК (5 мкг) з оліго (dT)₁₈ праймером (5 мкМ) та зворотною транскриптазою RevertAid™ Premium (Fermentas, Литва). Реакцію проводили згідно з протоколом виробника зворотної транскриптази. ПЛР зі специфічними праймерами проводили в 25 мкл реакційної суміші, яка містила кДНК, синтезовану на 50 нг сумарної РНК, 2 U Taq полімерази (Fermentas, Литва), ПЛР-буфер від виробника, 0,2 мМ дНТФ та 0,5 мкМ специфічних праймерів. Для виявлення транскриптів гена *PsLTP1* використовували праймери: прямий – 5'-ATGGCTGTGAA-GAAGATG-3' і зворотний – 5'-TCAGTGAACCTTGGAAACAG-3'. Як контроль за перебігом ПЛР та визначення відносного рівня експресії гена *PsLTP1* використали ген „домашнього господарства” – 60S рибосомальний протеїн *L44* (*RPL44*; GenBank Acc. No. EL342388). Для ампліфікації цього гена використали такі олігонуклеотиди: прямий – 5'-CAAAGCTTGCAAAAAGCACA-3' та зворотний – 5'-TTCCCTTCCSCTT-CCTTGTC-3'. У кожній реакції ампліфікації одночасно використовували дві пари праймерів: до гена „домашнього господарства” і *PsLTP1*. Очікувана довжина продуктів ампліфікації для *PsLTP1* – 372 п.н., для *RPL44* – 263 п.н. Умови ПЛР: денатурація при 95°C протягом 5 хв, з подальшими 35 циклами ампліфікації (95°C – 1 хв; 54°C – 1 хв; 72°C – 1 хв) і елонгація при 72°C протягом 5 хв. Розділення продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозному гелі в трис-боратній буферній системі (50 мМ трис- H_3BO_3 , рН 8,3; 2 мМ ЕДТА), 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 („MediaCybernetics”, США). Значення рівня експресії гена *PsLTP1* нормалізували щодо рівня експресії гена *RPL44*. Експерименти проводили в триразовій повторності. Для статистичного оброблення результатів використовували двосторонній критерій Стьюдента. Статистично достовірною вважали різницю при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження експресії гена *PsLTP1* у тканинах вегетативних і генеративних органів сосни у різні періоди її онтогенетичного розвитку проводили методом ЗТ-ПЛР. Транскрипти *PsLTP1* виявлено як у тканинах восьмиденних проростків сосни, так і у тканинах вегетативних органів 15-річної сосни (рис. 1, А). Варто зауважити, що відносні значення рівня експресії *PsLTP1* в усіх частинах проростка були суттєво вищими за такі в органах молодого дерева (рис. 1, Б). У проростках найвищий рівень експресії *PsLTP1* спостерігався в сім'ядолях (рис. 1, доріжка 3), його відносне значення зменшувалося від сім'ядолей до корінців. Цікаво, що подібний профіль експресії LTP відзначено і у тютюну: рівень експресії гена *Ntltf1* в апікальній частині рослини був вищим за рівень у базальній частині [9]. В органах 15-річної сосни найвищий рівень експресії *PsLTP1* виявлено у вегетативних бруньках (рис. 1, доріжка 6), а найнижчий – у хвої. Підвищена кількість транскриптів *PsLTP1* у бруньках, можливо, пов'язана з утворенням у них кутикули. Вважається, що ліпідтрансферні протеїни є переносниками оксимонокарбонових кислот, попередників кутикули, на зовнішній бік гідрофільної клітинної стінки, де формується кутикула.

Відомо, що у покритонасінних гени *LTP* експресуються на ранніх етапах формування квітки, високі рівні експресії знайдено у молодих суцвіттях, у чашолистках нерозпущених квіток тютюну, в генеративних бруньках броколі, у мікроспорах рапсу, у віночку та плодолистках гербери [8, 13]. Нами виявлено, що у генеративних органах сосни звичайної (макро- та мікростробілах) також експресується ген ліпід-трансферного протеїну (рис. 2, А). Можливо, що подібно до покритонасінних, *LTP* сосни залучені до процесу дозрівння пилку та запліднення [20]. Транскрипти *PsLTP1* визначено і в пилку сосни (рис. 2, А), хоча рівень експресії цього гена у пилку був значно нижчим ніж у шишках (рис. 2, Б). Відомо, що ліпідтрансферні протеїни насіння, фруктів і пилку різних рослин здатні викликати алергічні реакції [23]. Gastañiza показав, що пилок сосни також володіє алергенними властивостями, і одним із основних алергенів пилку є протеїн із молекулярною масою (Мм) близько 8 кДа [11], що добре корелює із Мм *PsLTP1*.

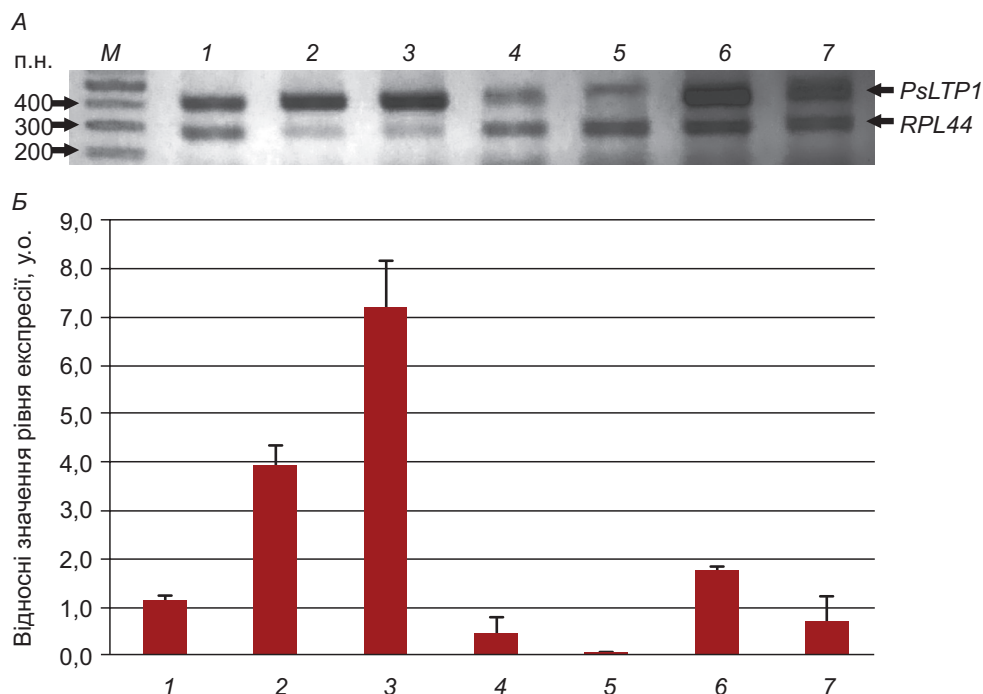


Рис. 1. Експресія *PsLTP1* у вегетативних органах сосни звичайної. А – електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР, отриманих із РНК корінців (1), гіпокотилів (2), сім'ядоль (3) 8-добових проростків сосни звичайної, кори (4), хвої (5), вегетативних бруньок (6) та кореня 15-річної сосни (7) зі специфічними праймерами. М – маркери GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва). Стрілками справа вказано продукти ПЛР: *PsLTP1* і ген „домашнього господарства” *RPL44*. Б – значення рівня експресії *PsLTP1* у вегетативних органах перелічено щодо *RPL44*

Fig. 1. Expression of *PsLTP1* in the vegetative organs of Scots pine. А – RT-PCR products electrophoresis obtained from RNA of roots (1), hypocotyls (2), cotyledons (3) of the 8-day old Scots pine seedlings, bark (4), needles (5), buds (6), roots (7) of the 15-year old Scots pine with specific primers. М – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Right arrows indicate the PCR-products: *PsLTP1* and „house-keeping” gene *RPL44*. Б – values of the expression level of *PsLTP1* calculated relative to *60S RPL44*

Раніше ми виявили, що у зрілому насінні, на відміну від незрілого, наявні транскрипти *PsLTP1* [1], які локалізовані у зародках (рис. 2, А, доріжка 5). Тобто у пізньому ембріогенезі відбувається накопичення мРНК, що сприяє біосинтезу LTP вже у ранньому постембріогенезі і свідчить про важливу функцію цих протеїнів на ранніх етапах онтогенетичного розвитку сосни. Кількість транскриптів *PsLTP1* збільшується у процесі проростання: так рівень експресії цього гена у восьмидобових проростках є у 2,6 разу вищим, ніж у тридобових (рис. 2). Проростання насіння – це найбільш уразливий період у життєвому циклі рослин, оскільки захисні механічні перепони ще не сформовані, і генетично детермінована стратегія захисту проростка проти фітопатогенів – це синтез сполук із антимікробними властивостями, до яких належать і LTP [12, 13, 21]. Захисна функція ліпідтрансферного протеїну зумовлена не тільки його активністю щодо фітопатогенів, але й участю у формуванні міцних механічних конститутивних бар'єрів на шляху патогенів, що і відображається у високому рівні експресії гена *PsLTP1* у проростках.

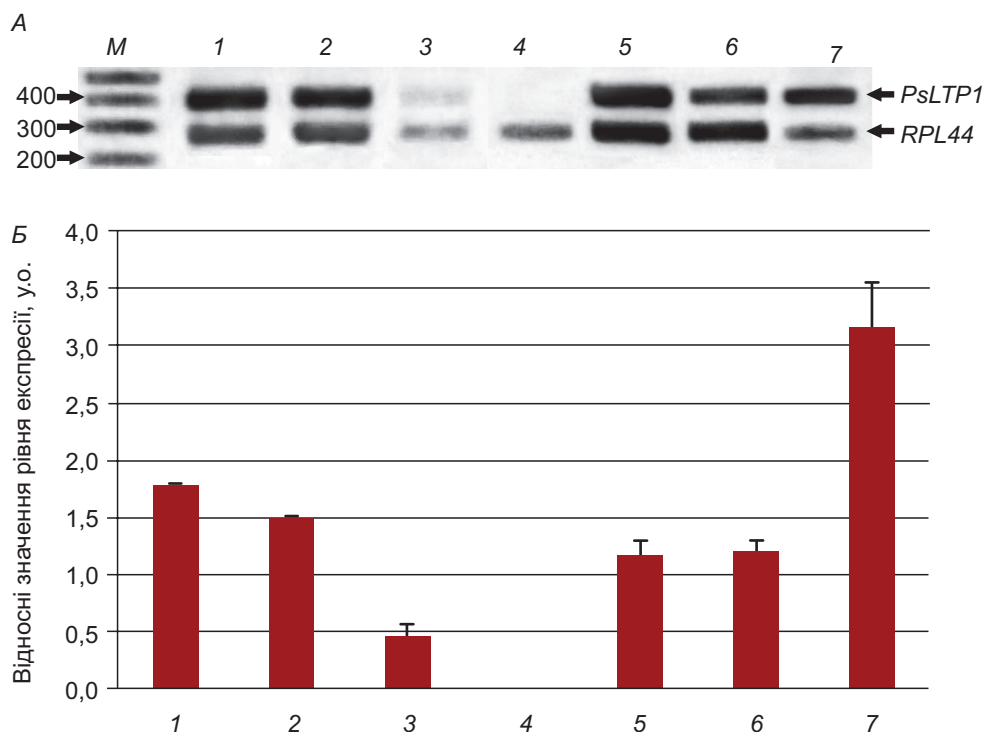


Рис. 2. Аналіз експресії *PsLTP1* у генеративних органах і проростках сосни звичайної. А – електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації кДНК із макростробіл (1), мікростробіл (2), пилку (3), ендосперму (4), зародків (5), 3-добових проростків (6), 8-добових проростків (7) зі специфічними праймерами. М – маркери GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва). Стрілками справа вказано продукти ПЛР: *PsLTP1* та ген „домашнього господарства” *RPL44*. Б – значення рівня експресії *PsLTP1* у генеративних органах перелічено щодо *60S RP L44*

Fig. 2. Analysis of *PsLTP1* expression in the generative organs of Scots pine. А – electrophoretic analysis of cDNA amplification products from megastrobiles (1), microstrobiles (2), pollen (3), endosperm (4), embryos (5), 3-day old seedlings (6), 8-day old seedlings (7) with specific primers. М – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Right arrows indicate the PCR-products: *PsLTP1* and „house-keeping” gene *RPL44*. Б – values of the expression level of *PsLTP1* calculated relative to *60S RP L44*

Ключовими сигнальними молекулами у захисній системі рослин є стресові гормони – саліцилова та ясинова кислоти, етилен (ЕТ), які регулюють відповідні сигнальні шляхи, складно організована перехресна взаємодія між якими дає рослинам змогу досить чітко реагувати на чинники експресію генів низки АМП. Зокрема, нами було показано, що під дією СК і ЯК підвищується рівень експресії гена дефензину сосни (*PsDef1*) [3]. З літератури відомо, що ЯК індукує експресію LTP у арабідопсису, рису, перцю, пшениці, капусти, льону, а СК, у свою чергу, мала здатність індукувати експресію LTP у рису, арабідопсису, тютюну та льону [4, 12, 13, 25, 26, 28]. Протилежний ефект дії цих гормонів на рівень експресії ліпідтрансферного протеїну ми спостерігали після обприскування ними проростків сосни. Через 48 год вміст транскриптів *PsLTP1* у проростках зменшувався утричі порівняно з контрольною групою як для СК, так і для ЯК (рис. 3, А). Такий вплив екзогенних СК і ЯК на експресію гена антимікробного протеїну, подібного до 1,3-глюканази (GenBank Асс. No. BM 318308), описано у *Sorghum bicolor* [22], але негативна регуляція цими стресовими гормонами експресії гена *LTP* у рослин нами виявлена вперше. Вважається, що регуляція експресії мультигенної родини генів *LTP* у голонасінних відрізняється від такої у покритонасінних [15].

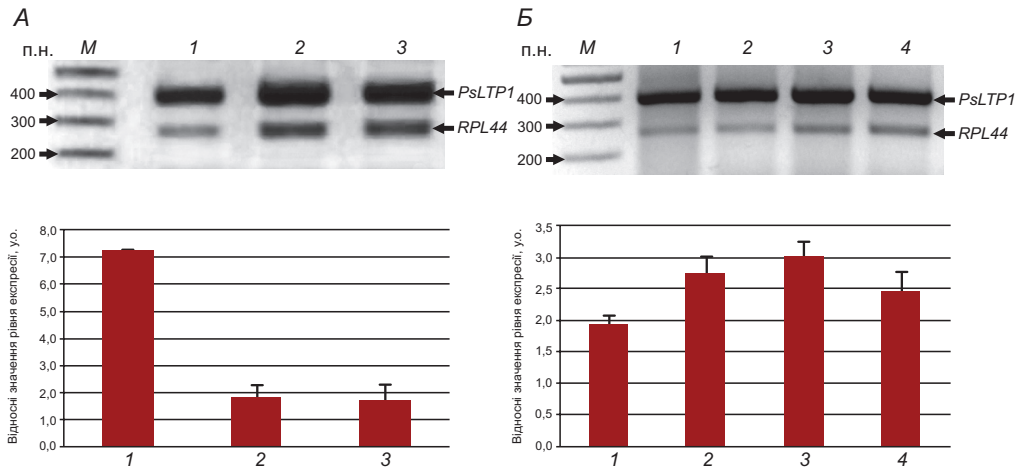


Рис. 3. Вплив фітогормонів на експресію *PsLTP1* у проростках сосни звичайної. А, верхня панель - електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР, отриманих із РНК проростків, які оброблені 0,1% етанолом (1), 2 мкМ СК (2), 1 мМ ЯК (3) зі специфічними праймерами. Нижня панель – значення рівня експресії *PsLTP1* перелічено щодо *RPL44*. Б, верхня панель – електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації кДНК у проростках, які оброблені 0,1 % етанолом (1), 10 мкМ АК (2), 10 мкМ гетероауксином (3), 10 мкМ кінетином (4). Нижня панель – значення рівня експресії *PsLTP1* перелічено щодо *RPL44*. М – маркери GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва). Стрілки справа вказано продукти ПЛР: *PsLTP1* та „домашнього господарства” *RPL44*

Fig. 3. Effects of phytohormones on the *PsLTP1* expression in Scots pine seedlings. А, top panel – electrophoresis of RT-PCR products obtained from RNA of seedlings after treatment with 0.1% ethanol (1), 2 μM SA (2), 1 mM JA (3) with specific primers. Bottom panel – the values of the expression level of *PsLTP1* calculated relative to *RPL44*. Б, top panel – electrophoretic analysis of cDNA amplification products from seedlings after treatment with 0.1% ethanol (1), 10 μM ABA (2), 10 μM heteroauxin (3), 10 μM kinetin (4) with specific primers. Bottom panel – the values of the expression level of *PsLTP1* calculated relative to *RPL44*. М – GeneRuler 100 b.p. Plus DNA Ladder (Fermentas). Right arrows indicate the PCR-products: *PsLTP1* and „house-keeping” gene *RPL44*

Крім стресових фітогормонів, ми дослідили вплив деяких регуляторів росту на рівень експресії *PsLTP1* у проростках сосни звичайної. Після оброблення насіння АК спостерігали незначне збільшення вмісту транскриптів *PsLTP1* у проростках порівняно з контролем (рис. 3, Б). Такі результати отримано при дослідженні впливу АК на рівень експресії *CALTP* у *Capsicum annuum* та *LpLTP* у *Lycopersicon pennellii* [12, 27]. Як відомо, АК індукуює синтез мРНК запасних протеїнів у зернах пшениці протягом їхнього дозрівання [18]. Оскільки LTP належить до родини запасних протеїнів/інгібіторів α -амілази/трипсину, то можна припустити, що екзогенна АК специфічно індукуює експресію *PsLTP1* при проростанні насіння сосни звичайної.

Оброблення насіння сосни звичайної кінетином призводило до зростання експресії гена *PsLTP1* (рис. 3, Б, доріжка 4), проте більш виражений стимулювальний ефект на експресію цього гена у проростках виявив гетероауксин, який підвищував рівень транскриптів цього гена на 50% (рис. 3, Б). Із літературних джерел відомо, що гетероауксин стимулює розтяг клітин і основними мішенями дії цього гормону є клітини, які диференціюються поблизу різних меристем. Можливо, такий фізіологічний ефект гетероауксину зумовлений, зокрема, і активацією цим фітогормоном генів ліпідтрансферних протеїнів, які відіграють важливу роль у розтягненні клітин і рості рослин, завдяки своїй здатності зменшувати міцність клітинної стінки [7, 13]. Цитокініни й ауксини викликають поділ клітин, який супроводжується інтенсивним синтезом нових мембран, основним структурним елементом яких є ліпіди [18]. Відомо, що LTP мають здатність переносити ліпіди від ендоплазматичного ретикулулу до мембран інших органел, тому можна припустити, що посилення експресії *PsLTP1* під дією цих фітогормонів пов'язане із залученням ліпідтрансферного протеїну до утворення біомембран.

ВИСНОВКИ

За допомогою аналізу ЗТ-ПЛР встановлено, що ген *PsLTP1* конститутивно експресується у тканинах вегетативних і генеративних органів сосни звичайної. Виявлено диференційований характер експресії цього гена протягом дозрівання та проростання насіння. Під впливом СК та ЯК спостерігали зниження рівнів експресії *PsLTP1* у проростках сосни, що є першим свідченням негативної регуляції цими стресовими гормонами експресії гена *LTP*. Під впливом АК, гетероауксину та кінетину вміст транскриптів *PsLTP1* у проростках сосни зростав.

Робота підтримана грантом ДФД України (проект № Ф41.4/049).

1. Груник Н.І., Ковальова В.А., Гут Р.Т. Органоспецифічна експресія ліпідтрансферного протеїну на різних етапах онтогенетичного розвитку сосни звичайної. В кн.: **Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти: матер. II Міжнар. конф.** (м. Харків, 11–13 жовтня 2011 р.). Харків, 2011. с. 21–22.
2. Груник Н.І., Шаловило Ю.І., Ковальова В.А., Гут Р.Т. Ліпідтрансферні протеїни рослин: структура, функції і біотехнологічні перспективи. **Наук. вісник НЛТУ України: збірник наук.-техн. праць**, 2011; 21(8): 32–35.
3. Гут Р.Т., Юсипович Ю.М., Ковальова В.А. Особливості експресії генів дефензинів у різних органах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.). **Наук. праці Лісівничої академії наук України: збірник наук. праць**, 2011; 9: 86–89.

4. *Boutrot F., Guirao A., Alary R. et al.* Wheat nonspecific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. **Biochim. Biophys. Acta**, 2005; 1730: 114–125.
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. *Doulliez J.P., Michon T., Elmorijani K. et al.* Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. **J. Cereal Sci**, 2000; 32: 1–20.
8. *Eklund D.M., Edqvist J.* Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. **Plant Physiology**, 2003; 132: 1249–1259.
9. *Fleming A.J., Mandel T., Hofmann S. et al.* Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. **Plant J**, 1992; 2: 855–862.
10. *Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A. et al.* The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends Microbiol**, 1995; 3: 72–74.
11. *Gastaminza G., Lombardero M., Bernaola G. et al.* Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen. **Clin. Exp. Allergy**, 2009; 39(9): 1438–46.
12. *Jung H.W., Kim W., Hwang B.K.* Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant, Cell and Environment**, 2003; 26: 915–928.
13. *Kader J.C.* Lipid-transfer proteins in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, 1996; 47: 627–654.
14. *Kader J.C.* Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. **Trends Plant Sci**, 1997; 2: 66–70.
15. *Kinlaw C.S., Gerttula S.M., Carter M.C.* Lipid transfer protein genes of loblolly pine are members of a complex gene family. **Plant Mol. Biol**, 1994; 26: 1213–1216.
16. *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.
17. *Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F.* Lipid transfer proteins (LTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Letter**, 1993; 316: 627–654.
18. *Moor R., Clark W.D., Stern K.R.* Botany. **Wm. C. Brown Publishers**, 1995. 824 p.
19. *Ostergaard J., Hojrup P., Knudsen J.* Amino acid sequences of three acyl-binding/lipid-transfer proteins from rape seedlings. **Biochim. Biophys. Acta**, 1995; 1254: 169–179.
20. *Park S.Y., Lauh G.Y., Mollet J.C. et al.* A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. **Plant Cell**, 2000; 12: 151–164.
21. *Sabala I., Elfstrand M., Farbos I. et al.* Tissue-specific expression of Pa18, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Mol. Biol**, 2000; 42: 461–478.
22. *Salzman R.A., Brady J.A., Finlayson S.A. et al.* Transcriptional Profiling of Sorghum Induced by Methyl Jasmonate, Salicylic Acid, and Aminocyclopropane Carboxylic Acid Reveals Cooperative Regulation and Novel Gene Responses. **Plant Physiology**, 2005; 138: 352–368.
23. *Sanchez-Monge R., Lombardero M., Garcia-Selles F.J. et al.* Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. **J. Allergy Clin. Immunol**, 1999; 103: 514–519.
24. *Sawano Y., Hatano K., Miyakawa T. et al.* Proteinase inhibitor from ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. **Plant Physiology**, 2008; 146: 1909–1919.

25. *Sohal A.K., Pallas J.A., Jenkins G.I.* The promoter of a Brassica napus lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic Arabidopsis. **Plant Mol. Biol**, 1999; 41: 75–87.
26. *Sossountzov L., Ruiz-Avila L., Vignols F. et al.* Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. **The Plant Cell**, 1991; 3: 923–933.
27. *Trevino M.B., O'Connell M.A.* Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. **Plant Physiology**, 1998; 116: 1461–1468.
28. *Vignols F., Wigger M., Garcia-Garrido J.M. et al.* Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated, **Gene**, 1997; 195: 177–186.
29. *Warren J.M., Covert S.F.* Differential expression of pine and *Cronartium quercuum* f. sp. fusiforme genes in fusiform rust galls. **Appl. Environ. Microbiol**, 2004; 70: 441–451.
30. *Yubero-Serrano E., Moyano E., Medina-Escobar N.* Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. **J. of Exp. Botany**, 2003; 54(389): 1865–1877.

PATTERNS OF EXPRESSION OF LIPID-TRANSFER PROTEIN GENE IN ORGANS OF SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

N. I. Hrunyk, V. A. Kovaleva, R. T. Gout

*Ukrainian National Forest University, 103, Gen. Chuprynyk St., Lviv 79057, Ukraine
e-mail: rgoutmollab@ukr.net*

The patterns of lipid-transfer protein *PsLTP1* (*Pinus sylvestris* lipid transfer protein 1) gene expression in the vegetative and generative organs of Scots pine have been studied by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). It was found that *PsLTP1* gene expression is tissue-specific and it changes during ontogenetic development. Effect of phytohormones on *PsLTP1* expression level in Scots pine seedlings has been investigated.

Keywords: Scots pine, lipid-transfer protein *PsLTP1*, expression.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛИПИДПЕРЕНОСЯЩЕГО ПРОТЕИНА В ОРГАНАХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

Н. И. Груник, В. А. Ковалева, Р. Т. Гут

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

Определен профиль экспрессии гена липидпереносящего протеина *PsLTP1* (*Pinus sylvestris* lipid transfer protein 1) в вегетативных и генеративных органах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) методом полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Установлено, что экспрессия гена *PsLTP1*

является тканеспецифической и изменяется в ходе онтогенетического развития. Исследовано влияние фитогормонов на уровень экспрессии *PsLTP1* в проростках сосны обыкновенной.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, липидпереносящий протеин *PsLTP*, экспрессия.

Одержано: 15.05.2012