

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.04.012>

УДК 581.143:577.175.1.05; 581.19; 581.2

Я.К. Бухонська, <https://orcid.org/0000-0003-1988-3811>

Я.С. Колесников, <https://orcid.org/0000-0002-5060-9362>

С.В. Кретинін, <https://orcid.org/0000-0002-0139-9936>

М.В. Дерев'янчук, <https://orcid.org/0009-0006-9250-3677>

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України, Київ, Україна

E-mail: yaroslavabukhonska@gmail.com

Вплив екзогенних брасиностероїдів на стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до інфікування бактеріями *Pseudomonas syringae*

Представлена членом-кореспондентом НАН України А.І. Вовком

Досліджено вплив екзогенних брасиностероїдів — 24-епібрасиноліду і 24-епікастастерону та інгібітора їхнього синтезу брасиназолу на стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до інфікування гемібіотрофним фітопатогеном *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Проаналізовано розвиток внутрішньотканинної бактеріальної інфекції у рослин дикого типу та мутантної лінії *bri1-6* за умов штучного зараження методом затоплення. Встановлено, що інгібування біосинтезу брасиностероїдів під дією брасиназолу спричиняє карликовий фенотип та зниження резистентності рослин дикого типу. Застосування екзогенного 24-епібрасиноліду повністю нівелює морфологічні прояви дії брасиназолу та зменшує ступінь ураження рослин дикого типу. Ефективність дії 24-епікастастерону залежить від способу введення: додавання сполуки в живильне середовище забезпечує резистентність лише в концентраціях від 100 нМ, тоді як додаткове фоліарне оброблення посилює резистентність рослин вже за концентрації 10 нМ. Усі захисні ефекти екзогенних брасиностероїдів спостерігалися лише за наявності функціонального рецептора BRI1, що підтверджено нечутливістю рослин лінії *bri1-6* до обробок та їхнім низьким конститутивним імунітетом.

Ключові слова: брасиностероїди, 24-епібрасинолід, рецептор BRI1, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, фітогормони, імунітет рослин.

Вступ. Брасиностероїди (БС) — це клас фітогормонів стероїдної природи, які беруть участь у регуляції ключових процесів росту і розвитку рослин. У *Arabidopsis thaliana* сигналізація БС реалізується через мембранні рецепторні кінази BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) та гомологи BRI1-Like 1 і 3, розташовані на плазматичній мембрані [1, 2]. Втрата

Ц и т у в а н н я: Бухонська Я.К., Колесников Я.С., Кретинін С.В., Дерев'янчук М.В. Вплив екзогенних брасиностероїдів на стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до інфікування бактеріями *Pseudomonas syringae*. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2026. № 4. С. 12—21. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.04.012>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2026. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

функції рецептора BRI1 або ферментів біосинтезу БС спричиняє різке гальмування росту й розвиток карликовості рослин [2]. Накопичено значний обсяг знань про роль БС у процесах росту рослин, а також про те, що зміни рівня ендогенних БС є важливою ланкою адаптації метаболізму за стресових умов [3, 4]. Показано, що екзогенні обробки БС здатні стимулювати ріст рослин, інтенсивність дихання, стійкість до посухи і високих / низьких температур, покращувати фотосинтез та стабільність клітинних мембран за впливу стресових факторів [5—7]. БС тісно взаємодіють із сигналізацією інших фітогормонів — абсцизової кислоти (АБК), цитокінінів, ауксинів та інших, формуючи розгалужену мережу крос-гормональної взаємодії [8—10].

Крім абіотичних факторів, протягом останніх років все більше уваги привертає роль БС у біотичному стресі, зокрема в розвитку стійкості до ураження інфекційними хворобами рослин. Відомо, що обробка БС знижувала ураженість деяких рослин грибними патогенами та індукувала експресію PR-генів [10]. Показано, що надлишок БС у генетично модифікованих рослин може одночасно підвищувати врожайність та стійкість до патогенів. Так, рослини ріпаку з гіперекспресією гена біосинтезу брасиностероїдів *AtDWF4* мали підвищену врожайність насіння, стійкість до теплового стресу та до некротрофних грибних патогенів *Leptosphaeria maculans* і *Sclerotinia sclerotiorum* [11]. Водночас застосування специфічного інгібітора біосинтезу БС — брасиназолу (БРЗ) спричиняє в *Arabidopsis* карликовий фенотип [12] і, як було продемонстровано в окремих дослідках, посилює сприйнятливість до фітопатогенів [10]. Це свідчить про можливий зв'язок між рівнем ендогенних БС та імунитетом рослин. Відомо також, що шляхи сигналізації БС можуть антагоністично взаємодіяти із сигнальними шляхами саліцилової (СК) та жасмонової (ЖК) кислот — ключових гормонів, залучених до імунної відповіді рослин [13]. Наприклад, було показано, що БС через транскрипційний фактор BES1 інгібують частину захисних реакцій, активованих ЖК [14]. З іншого боку, є дані, що БС та СК можуть діяти синергічно, взаємно підвищуючи вміст один одного і сприяючи зростанню стійкості до патогенів [15]. Отже, питання про роль БС у балансуванні захисних (СК-, ЖК-залежних) і ростових реакцій залишається актуальним.

Метою дослідження було вивчити вплив екзогенних брасиностероїдів 24-епібрасиноліду (24-ЕБЛ), 24-епікастастерону (24-ЕКС) та специфічного інгібітора біосинтезу брасиностероїдів БРЗ на стійкість *Arabidopsis thaliana* до інфікування *Pseudomonas syringae*. Особливу увагу приділено порівнянню стійкості до інфікування рослин дикого типу (WT) та мутантної лінії *bril-6* під впливом екзогенних 24-ЕБЛ, 24-ЕКС та БРЗ для з'ясування ролі рецептора BRI1 у реалізації їхньої захисної дії.

Матеріали та методи дослідження. *Рослини та умови вирощування.* Дослідження проводили на рослинах *Arabidopsis thaliana* (екотип Columbia-0) та на мутантній лінії *bril-6* (з мутацією гена, який кодує рецептор BRI1, що зумовлює нечутливість до БС). Насіння перед посівом стерилізували у 5%-му розчині гіпохлориту натрію з додаванням 0,025%-го Твін-20 та 70%-го етанолу протягом 15 хв, після чого п'ятикратно промивали стерильною водою. Стерильне насіння висівали на тверде живильне середовище 1/2 Мурашіге—Скуга (1/2 MS) з додаванням 24-ЕБЛ та / або БРЗ, а також 24-ЕКС до заданої кінцевої концентрації. Концентрації 24-ЕБЛ становили 1 нМ, 10 нМ або 100 нМ; 24-ЕКС — 10 нМ, 100 нМ або 1 мкМ; концентрація БРЗ — 1 мкМ. Рослини вирощували в кліматичній камері за постійної температури +22 °С, фотоперіоду 14 год світла / 10 год темряви, освітленості 150 мкмоль/(м² · с) (LED-світильники Philips повного спектра).

Підготовка розчинів 24-ЕБЛ, 24-ЕКС та БРЗ. Маточний розчин 24-ЕБЛ та 24-ЕКС готували в 96%-му етанолі (0,1 мМ); аналогічно БРЗ розчиняли в 96%-му етанолі до концентрації 10 мМ. Робочих концентрацій у живильному середовищі досягали шляхом додавання маточних розчинів. Кінцева концентрація етанолу в живильному середовищі не перевищувала 0,01 % і була однаковою в усіх варіантах. Для фоліарної обробки рослин концентровані розчини розбавляли водою до зазначених концентрацій, після чого проводили обприскування.

Інфікування рослин бактерією *Pseudomonas syringae*. Для оцінки стійкості рослин до біотичного стресору було застосовано інфікування методом затоплення (*flood-inoculation*) для рослин, вирощених *in vitro*. Використовували високовірулентний штам *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000), резистентний до рифампіцину. Культуру бактерій вирощували на твердому живильному агаризованому середовищі LB з додаванням 50 мг/л рифампіцину протягом ≈ 36 год. Перед зараженням бактеріальні клітини зішкрібали із поверхні агарової пластини та ресуспендували у стерильній дистильованій воді; оптичну густину суспензії коригували до $OD_{600} = 1,0$ ($\approx 2 \cdot 10^8$ КУО/мл), після чого робочу суспензію для інфікування розбавляли до $OD_{600} \approx 0,012$ ($\approx 2 \cdot 10^6$ КУО/мл). Для методу інфікування затопленням суспензію додатково розводили до $OD_{600} = 0,003$ і додавали змочувач Silwet L-77 (0,025 %). Рослини, вирощені *in vitro*, заливали суспензією так, щоб вона повністю покрила поверхню середовища і рослини, витримували 3 хв, після чого рідину видаляли. Чашки Петрі інкубували за тих самих температури й освітлення. Поява симптомів інфекції спостерігалася через дві—три доби [17].

Кількісна оцінка бактеріальної інфекції. На другу—третю добу після інфікування підраховували кількість бактерій *Pto* DC3000 усередині тканин листків для кожного варіанта досліджу. Для цього 50 мг уражених листків збирали й поверхнево стерилізували 5%-м розчином H_2O_2 протягом 5 хв. Потім зразки ретельно промивали стерильною водою п'ять разів і гомогенізували у 200 мкл стерильної води. Отримані гомогенати послідовно розбавляли (у 10, 100, 1000 разів) і по 100 мкл кожного розведення висівали на чашки з агаризованим LB, що містив 50 мг/л рифампіцину. Чашки інкубували дві доби за температури 28 °C, після чого підраховували число колонієутворювальних одиниць (КУО). Кількість бактерій у тканинах виражали у вигляді КУО на грам сирової маси листка: що більше КУО, то сприйнятливошою вважалася рослина [18].

Результати дослідження та обговорення. Для візуальної оцінки впливу екзогенного 24-ЕБЛ та інгібітора їх біосинтезу БРЗ на загальний габітус рослин було проведено фотофіксацію рослин *A. thaliana* WT, вирощених *in vitro* на агаризованому середовищі з додаванням відповідних сполук (рис. 1). Контрольні рослини (див. рис. 1, а), вирощені на середовищі з додаванням розчинника (0,01%-го EtOH), демонстрували типовий для цієї лінії морфотип. Проростки характеризувалися нормальним розвитком надземної частини: сім'ядольні та перші справжні листки були добре розвинені, інтенсивного зеленого забарвлення, а черешки листків мали помірну довжину. Екзогенне застосування 24-ЕБЛ у концентрації 10 нМ спричинило помітний стимулювальний ефект на розвиток розеток (див. рис. 1, б). Рослини цього варіанта візуально характеризувалися більшими розмірами листових пластинок порівняно з контролем. Крім того, спостерігалася класичне для брасиностероїдної відповіді видовження черешків листків, що надавало розетці більш розлогого габітусу. Протилежна морфологічна картина спостерігалася у варіанті з додаванням

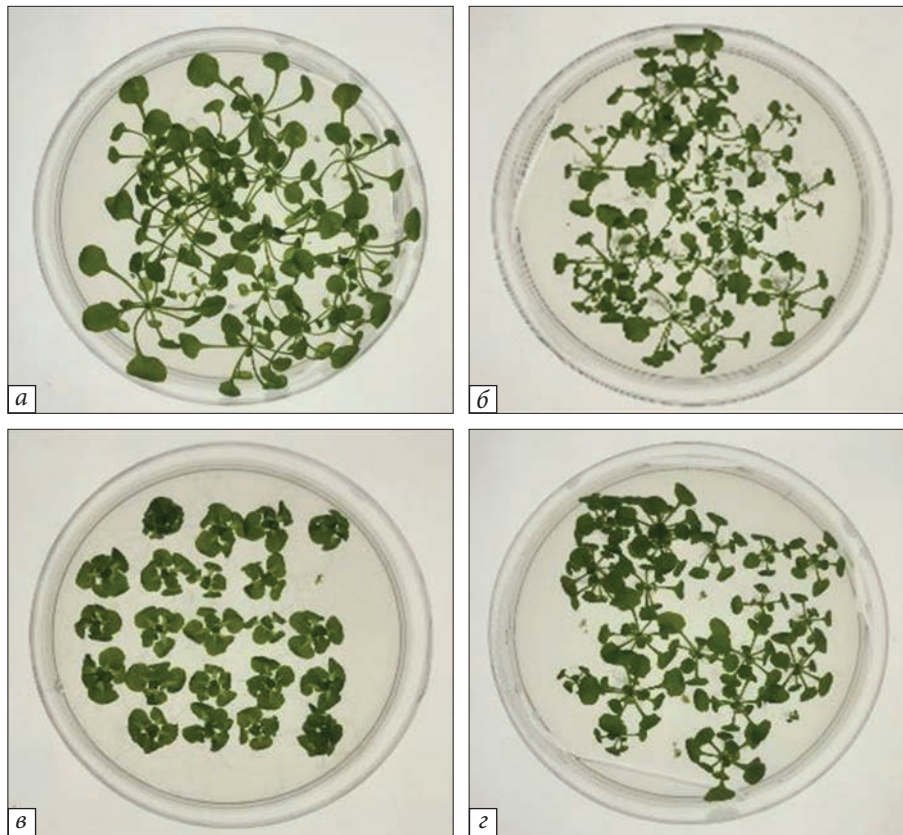


Рис. 1. Фенотипи рослин дикого типу, вирощених за стерильних умов на агаризованому живильному середовищі з додаванням EtOH, 0,01 % (а), 24-ЕБЛ, 10 нМ (б), БРЗ, 1 мкМ (в) та 24-ЕБЛ, 10 нМ + БРЗ, 1 мкМ (г)

до середовища 1 мкМ БРЗ (див. рис. 1, в). Рослини демонстрували фенотип вираженої карликовості, що є типовим для БС-дефіцитних мутантів. Їхні розетки були значно зменшені, компактні, з сильно вкороченими черешками. Листки характеризувалися насиченим темно-зеленим забарвленням та зморшкуватою структурою. Сумісне застосування 10 нМ 24-ЕБЛ та 1 мкМ БРЗ дало змогу майже повністю нівелювати інгібувальний ефект останнього (див. рис. 1, г). Рослини цього варіанта за своїм габітусом, розмірами розеток та довжиною черешків були візуально зіставними з контрольними рослинами, хоча й дещо поступалися за розмірами рослинам, вирощеним суто на середовищі з додаванням 24-ЕБЛ. Цей ефект гормональної компенсації підтверджує, що спостережувана карликовість у рослин під дією БРЗ була зумовлена саме дефіцитом БС, а не неспецифічною токсичною дією інгібітора, і що введення екзогенного гормону відновлює нормальний морфогенез надземної частини за умов хімічного блокування його ендогенного синтезу.

Вплив ЕБЛ та БРЗ на стійкість *Arabidopsis thaliana* до *Pto* DC 3000. Контрольні рослини дикого типу продемонстрували значно вищу стійкість до ураження *Pto* DC3000, ніж рослини лінії *bril-6*: чисельність бактерій *Pto* DC3000 у тканинах мутантних рослин *bril-6* у 17,4 раза перевищувала аналогічний показник у рослин WT. Обробки 24-ЕБЛ та БРЗ не впливали на сприйнятливність рослин лінії *bril-6* (таблиця). Застосування БРЗ дало змогу

оцінити залежність рослинного імунітету від наявності БС. У рослин дикого типу блокування їхнього біосинтезу спричинило найбільш виражене зростання бактеріального навантаження, що у 27 разів перевищувало контрольні значення. Натомість у мутантних рослин лінії *bri1-6* реакція на БРЗ була слабо вираженою (зростання внутрішньотканинної популяції лише на 12,6 % порівняно з контрольними рослинами лінії *bri1-6*), що свідчить про специфічність дії БРЗ саме на БС-залежний метаболічний шлях. Це узгоджується з даними [19], згідно з якими наявність функціонального рецептора BRI1 є необхідною для роботи рослинного імунітету. В усіх експериментах екзогенні 24-ЕБЛ та БРЗ не спричиняли значних змін у концентрації *Pto* DC3000 у тканинах листків рослин лінії *bri1-6*.

Для підтвердження регуляторної функції БС було проведено експерименти з екзогенною компенсацією їхнього дефіциту. Додавання 10 нМ 24-ЕБЛ на фоні дії БРЗ у рослин дикого типу забезпечило зниження рівня КУО *Pto* DC3000 у 4 рази порівняно з контролем. Це свідчить про можливість часткового відновлення імунного потенціалу за умови належного функціонування системи рецепції. У мутантних рослин лінії *bri1-6* комбінована обробка (24-ЕБЛ + БРЗ) призвела до максимального накопичення *Pto* DC3000 у тканинах. Відсутність позитивного ефекту від екзогенного гормону в рослин цієї лінії підтверджує, що захисна дія БС реалізується лише через рецептор-опосередковану сигналізацію.

Отримані результати свідчать про складну систему регуляції імунітету за участі БС. З одного боку, рецептор BRI1 є необхідним компонентом для підтримання конститутивної стійкості, з іншого — динамічна зміна концентрації ендогенних БС (гомеостаз) дає можливість рослині оперативно модулювати відповідь на біотичний стрес. Зростання сприйнятливості рослин WT під дією БРЗ до рівня, що перевищує показники мутантних рослин *bri1-6*, може свідчити про наявність додаткових механізмів крос-взаємодії між шляхами біосинтезу БС та іншими захисними сигнальними системами (наприклад, саліцилатним або жасмонатним шляхами).

Оскільки екзогенний 24-ЕБЛ у концентраціях 1 нМ та 10 нМ не спричиняв підвищення стійкості рослин WT до *Pto* DC3000, було досліджено також вплив концентрації 100 нМ (рис. 2). Встановлено, що з усіх досліджених концентрацій лише найвища з них забезпечувала достовірне зниження вмісту внутрішньотканних КУО *Pto* DC3000.

Також було досліджено вплив 24-епікастерону (24-ЕКС) — біосинтетичного попередника 24-ЕБЛ — на стійкість рослин арабідопсису дикого типу до *Pto* DC3000. Оскільки 24-ЕКС має нижчу біологічну активність, істотну ефективність було відмічено лише в разі застосування більш високих концентрацій — 100 нМ та 1 мкМ (рис. 3). Крім додавання в

Таблиця 1. *In vivo* вплив обробки ЕБЛ та БРЗ на внутрішньотканинну популяцію *Pto* DC3000 у рослинах дикого типу та лінії *bri1-6* на третю добу після інфікування методом затоплення (*flood-inoculation*)

Варіант	WT (КУО $\pm$ SD)	<i>bri1-6</i> (КУО $\pm$ SD)
Контроль	1500 $\pm$ 520	26100 $\pm$ 2381
24-ЕБЛ, 10 нМ	2100 $\pm$ 520	31800 $\pm$ 3637
БРЗ, 1 мкМ	40800 $\pm$ 1375	29400 $\pm$ 1375
24-ЕБЛ, 10 нМ + БРЗ, 1 мкМ	7800 $\pm$ 1039	37200 $\pm$ 2265

Примітка. Дані наведено як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD), $n = 3$ (біологічні повторності).

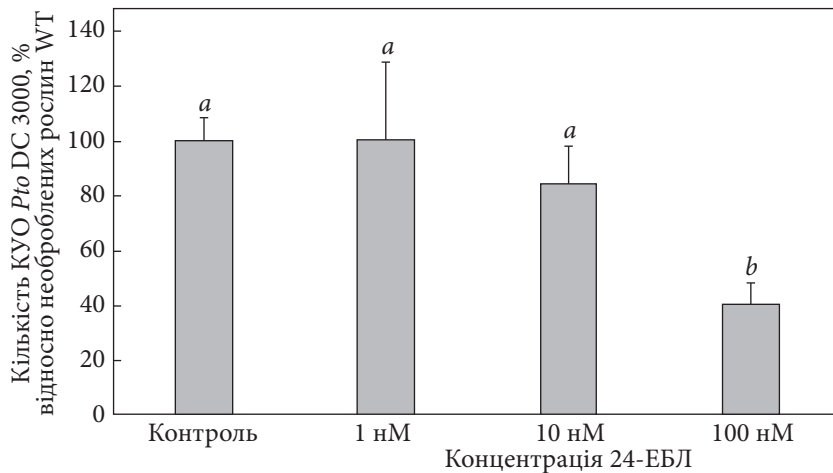


Рис. 2. Вплив *in vivo* різних концентрацій 24-ЕБЛ на внутрішньотканинну популяцію *Pto* DC3000 у рослинах дикого типу на третю добу після інфікування методом затоплення. Різні літери позначають статистично достовірні відмінності за $P \leq 0,05$ згідно з LSD-тестом

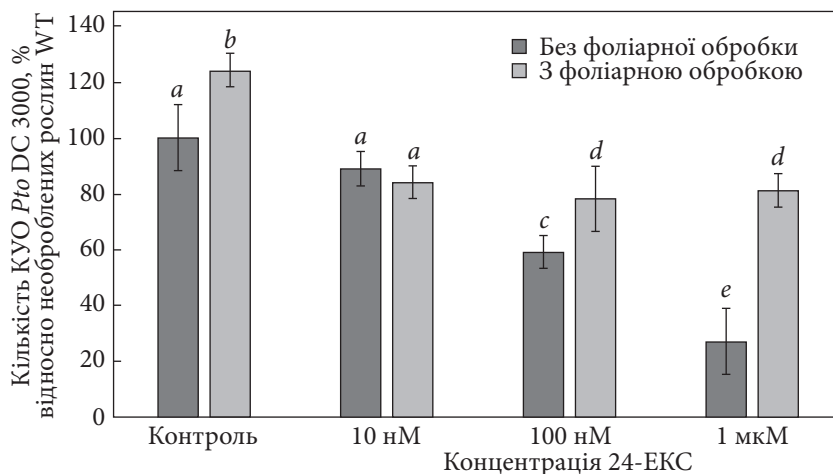


Рис. 3. Вплив *in vivo* різних концентрацій 24-ЕКС на чисельність внутрішньої популяції *P. syringae* у рослинах дикого типу на третю добу після інфікування методом затоплення за умов додаткової фоліарної обробки 24-ЕКС у зазначених концентраціях за дві доби до інфікування та без неї. Значення, марковані різними літерами, мають статистично значущу різницю за $P < 0,05$ згідно з LSD-тестом

живильне середовище, досліджено ефект додаткової фоліарної обробки рослин. Таке додаткове внесення 24-ЕКС забезпечило значне зниження кількості КУО *Pto* DC3000 у тканинах листків вже за концентрації 24-ЕКС 10 нМ.

Отримані результати свідчать про те, що фоліарне застосування БС у поєднанні з вирощуванням рослин на середовищах з БС забезпечує захист від інфікування *Pto* DC3000 в експериментах з інокуляцією рослин методом затоплення.

Висновки. Встановлено, що пригнічення біосинтезу ендogenous брасиностероїдів за допомогою БРЗ спричиняє різке підвищення сприйнятливості рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу до бактерії *Pseudomonas syringae* DC3000, що супроводжується значним збільшенням кількості КУО фітопатогену в тканинах рослин. Під дією екзогенного 24-ЕКС у *Arabidopsis thaliana* дикого типу підвищується стійкість до інфікування *Pseudomonas syringae*. Обробка рослин екзогенним 24-ЕБЛ частково нейтралізує негативний ефект БРЗ: в умовах інгібування біосинтезу БС додавання екзогенного ЕБЛ знижує ступінь бактеріального ураження, проте воно не досягає рівня контрольних рослин. У рослин мутантної лінії *bril-6*, нечутливих до БС (дефект рецептора BRI1), відзначено різке зниження базальної стійкості до *P. syringae* порівняно з диким типом. Обробки 24-ЕБЛ або БРЗ значно не впливали на резистентність рослин лінії *bril-6*, що підтверджує ключову роль рецептора BRI1 у реалізації дії брасиностероїдів.

Дослідження підтримано грантом EURIZON H2020 (EURIZON FELLOWSHIP PROGRAMME Remote Research Grants, grant #EU-3042-137) та грантом Національної академії наук України (No 2.1.10.32-25-29).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Blanco-Touriñán N., Rana S., Nolan T.M., Li K., Vukašinović N., Hsu C.-W., Russinova E., Hardtke C.S. The brassinosteroid receptor gene *BRI1* safeguards cell-autonomous brassinosteroid signaling across tissues. *Sci. Adv.* 2024. **10**, № 39. eadq3352. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq3352>
2. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K.H., Li J., Chory J. *BRL1* and *BRL3* are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*. 2004. **131**, № 21. P. 5341—5351. <https://doi.org/10.1242/dev.01403>
3. Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature*. 2011. **474**, № 7352. P. 467—471. <https://doi.org/10.1038/nature10153>
4. Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K.A., Tax F.E. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol.* 1999. **121**, № 3. P. 743—752. <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.743>
5. Nolan T.M., Vukašinović N., Liu D., Russinova E., Yin Y. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *Plant Cell*. 2020. **32**, № 2. P. 295—318. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
6. Gruszka D., Bajguz A., Li Q.-F., Hayat S., Hansson M., Wang X., Li J. Editorial: An update on brassinosteroids: Homeostasis, crosstalk, and adaptation to environmental stress. *Front. Plant Sci.* 2021. **12**. 677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.673587>
7. Sadura I., Janeczko A. Brassinosteroids and the tolerance of cereals to low and high temperature stress: Photosynthesis and the physicochemical properties of cell membranes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. **23**, № 1. 342. <https://doi.org/10.3390/ijms23010342>
8. Chen Z., Wang Z., Yang Y., Li M., Xu B. Absciscic acid and brassinolide combined application synergistically enhances drought tolerance and photosynthesis of tall fescue under water stress. *Sci. Hortic.* 2018. **228**. P. 1—9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.004>
9. Li Q., Xu F., Chen Z., Teng Z., Sun K., Li X., Yu J., Zhang G., Liang Y., Huang X., Du L., Qian Y., Wang Y., Chu C., Tang J. Synergistic interplay of ABA and BR signal in regulating plant growth and adaptation. *Nat. Plants*. 2021. **7**, № 8. P. 1108—1118. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00959-1>
10. Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I., Yoshida S. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 2003. **33**. P. 887—898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01675.x>

11. Sahni S., Prasad B.D., Liu Q., Grbic V., Sharpe A., Singh S.P., Krishna P. Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *DWF4* in *Brassica napus* simultaneously increases seed yield and stress tolerance. *Sci. Rep.* 2016. **6**. 28298. <https://doi.org/10.1038/srep28298>
12. Asami T., Min Y.K., Nagata N., Yamagishi K., Takatsuto S., Fujioka S., Murofushi N., Yamaguchi I., Yoshida S. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* 2000. **123**, № 1. P. 93—100. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.93>
13. Xiao S., Hu Q., Zhang X., Si H., Liu S., Chen L., Chen K., Berne S., Yuan D., Lindsey K., Zhang X., Zhu L. Orchestration of plant development and defense by indirect crosstalk of salicylic acid and brassinosteroid signaling via transcription factor GhTINY2. *J. Exp. Bot.* 2021. **72**, № 13. P. 4721—4743. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab186>
14. Liao K., Peng Y.-J., Yuan L.-B., Dai Y.-S., Chen Q.-F., Yu L.-J., Bai M.-Y., Zhang W.-Q., Xie L.-J., Xiao S. Brassinosteroids antagonize jasmonate-activated plant defense responses through BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1). *Plant Physiol.* 2020. **182**, № 2. P. 1066—1082. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01220>
15. Park C.-H., Park Y.J., Youn J.-H., Roh J., Kim S.-K. Brassinosteroids and salicylic acid mutually enhance endogenous content and signaling to show a synergistic effect on pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Biol.* 2023. **66**, № 2. P. 181—192. <https://doi.org/10.1007/s12374-023-09390-9>
16. Dobrev P.I., Vankova R. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Plant salt tolerance: Methods and protocols*. Methods in molecular biology, vol. 913. Totowa, N. J.: Humana Press, 2012. P. 251—261. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_17
17. Ishiga Y., Ishiga T., Uppalapati S.R., Mysore K.S. *Arabidopsis* seedling flood-inoculation technique: A rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods*. 2011. **7**. 32. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-32>
18. Ishiga Y., Ishiga T., Ichinose Y., Mysore K.S. *Pseudomonas syringae* flood-inoculation method in *Arabidopsis*. *Bio-Protoc.* 2017. **7**, № 2. e2106. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2106>
19. Xiong J., Wan X., Ran M., Xu X., Chen L., Yang F. Brassinosteroids positively regulate plant immunity via BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1-mediated *GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8* transcription. *Front. Plant Sci.* 2022. **13**. 854899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854899>

Надійшла до редакції 17.06.2026

REFERENCES

1. Blanco-Touriñán, N., Rana, S., Nolan, T. M., Li, K., Vukašinović, N., Hsu, C.-W., Russinova, E. & Hardtke, C. S. (2024). The brassinosteroid receptor gene *BRI1* safeguards cell-autonomous brassinosteroid signaling across tissues. *Sci. Adv.*, 10, No. 39, eadq3352. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq3352>
2. Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-García, S., Cheng, J.-C., Nam, K. H., Li, J. & Chory, J. (2004). *BRL1* and *BRL3* are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*, 131, No. 21, pp. 5341–5351. <https://doi.org/10.1242/dev.01403>
3. Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dreux, M., Dabi, T., Noel, J. P., Wilson, I. A. & Chory, J. (2011). Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature*, 474, No. 7352, pp. 467–471. <https://doi.org/10.1038/nature10153>
4. Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., Feldmann, K. A. & Tax, F. E. (1999). Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol.*, 121, No. 3, pp. 743–752. <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.743>
5. Nolan, T. M., Vukašinović, N., Liu, D., Russinova, E. & Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *Plant Cell*, 32, No. 2, pp. 295–318. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
6. Gruszka, D., Bajguz, A., Li, Q.-F., Hayat, S., Hansson, M., Wang, X. & Li, J. (2021). Editorial: An update on brassinosteroids: Homeostasis, crosstalk, and adaptation to environmental stress. *Front. Plant Sci.*, 12, 677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.673587>
7. Sadura, I. & Janeczko, A. (2022). Brassinosteroids and the tolerance of cereals to low and high temperature stress: Photosynthesis and the physicochemical properties of cell membranes. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, No. 1, 342. <https://doi.org/10.3390/ijms23010342>

8. Chen, Z., Wang, Z., Yang, Y., Li, M. & Xu, B. (2018). Absciscic acid and brassinolide combined application synergistically enhances drought tolerance and photosynthesis of tall fescue under water stress. *Sci. Hortic.*, 228, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.004>
9. Li, Q., Xu, F., Chen, Z., Teng, Z., Sun, K., Li, X., Yu, J., Zhang, G., Liang, Y., Huang, X., Du, L., Qian, Y., Wang, Y., Chu, C. & Tang, J. (2021). Synergistic interplay of ABA and BR signal in regulating plant growth and adaptation. *Nat. Plants*, 7, No. 8, pp. 1108-1118. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00959-1>
10. Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I. & Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.*, 33, pp. 887-898. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01675.x>
11. Sahni, S., Prasad, B. D., Liu, Q., Grbic, V., Sharpe, A., Singh, S. P. & Krishna, P. (2016). Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *DWF4* in *Brassica napus* simultaneously increases seed yield and stress tolerance. *Sci. Rep.*, 6, 28298. <https://doi.org/10.1038/srep28298>
12. Asami, T., Min, Y. K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I. & Yoshida, S. (2000). Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.*, 123, No. 1, pp. 93-100. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.93>
13. Xiao, S., Hu, Q., Zhang, X., Si, H., Liu, S., Chen, L., Chen, K., Berne, S., Yuan, D., Lindsey, K., Zhang, X. & Zhu, L. (2021). Orchestration of plant development and defense by indirect crosstalk of salicylic acid and brassinosteroid signaling via transcription factor GhTINY2. *J. Exp. Bot.*, 72, No. 13, pp. 4721-4743. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab186>
14. Liao, K., Peng, Y.-J., Yuan, L.-B., Dai, Y.-S., Chen, Q.-F., Yu, L.-J., Bai, M.-Y., Zhang, W.-Q., Xie, L.-J. & Xiao, S. (2020). Brassinosteroids antagonize jasmonate-activated plant defense responses through BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1). *Plant Physiol.*, 182, No. 2, pp. 1066-1082. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01220>
15. Park, C.-H., Park, Y. J., Youn, J.-H., Roh, J. & Kim, S.-K. (2023). Brassinosteroids and salicylic acid mutually enhance endogenous content and signaling to show a synergistic effect on pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Biol.*, 66, No. 2, pp. 181-192. <https://doi.org/10.1007/s12374-023-09390-9>
16. Dobrev, P. I. & Vankova, R. (2012). Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. In: *Plant salt tolerance: Methods and protocols. Methods in molecular biology*, vol. 913 (pp. 251-261). Totowa, N. J.: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-986-0_17
17. Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S. R. & Mysore, K. S. (2011). *Arabidopsis* seedling flood-inoculation technique: A rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods*, 7, 32. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-32>
18. Ishiga, Y., Ishiga, T., Ichinose, Y. & Mysore, K. S. (2017). *Pseudomonas syringae* flood-inoculation method in *Arabidopsis*. *Bio-Protocol*, 7, No. 2, e2106. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2106>
19. Xiong, J., Wan, X., Ran, M., Xu, X., Chen, L. & Yang, F. (2022). Brassinosteroids positively regulate plant immunity via BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1-mediated *GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8* transcription. *Front. Plant Sci.*, 13, 854899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854899>

Received 17.06.2026

Ya.K. Bukhonska, <https://orcid.org/0000-0003-1988-3811>

Ya.S. Kolesnikov, <https://orcid.org/0000-0002-5060-9362>

S.V. Kretynin, <https://orcid.org/0000-0002-0139-9936>

M.V. Derevyanchuk, <https://orcid.org/0009-0006-9250-3677>

V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: yaroslavabukhonska@gmail.com

EFFECT OF EXOGENOUS BRASSINOSTEROIDS ON RESISTANCE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* TO BACTERIAL INFECTION BY *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

The effects of exogenous brassinosteroids—24-epibrassinolide and 24-epicastasterone—as well as a specific inhibitor of their biosynthesis, brassinazole, on the resistance of *Arabidopsis thaliana* plants to infection by the hemibiotrophic bacterial phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) was comprehensively investigated. The study analyzed the progression of an intracellular bacterial infection in wild-type plants (ecotype Columbia-0) and in the *bri1-6* mutant line, which is insensitive to brassinosteroids, using the flood inoculation method for in vitro infection of plants. The bacterial load within leaf tissues was quantified on the third day after inoculation by counting colony-forming units (CFU) per gram of fresh weight following surface sterilization. It was found that inhibition of endogenous brassinosteroids biosynthesis by brassinazole severely reduces the basal immunity of wild-type plants. The application of exogenous 24-epibrassinolide completely counteracts the effects of brassinazole that cause morphological dwarfism. When applied separately, exogenous 24-epibrassinolide resulted in a statistically significant reduction in pathogen accumulation only at the highest concentration tested — 100 nM. The protective effectiveness of 24-epicastasterone, a biosynthetic precursor with lower biological activity, strongly depended on the mode of application. Its addition to the growth medium alone conferred resistance only at higher concentrations of 100 nM and 1 μ M, whereas a supplemental foliar spraying treatment performed two days prior to inoculation significantly enhanced plant resistance already at a lower concentration of 10 nM. Crucially, all protective and regulatory effects of exogenous brassinosteroids were observed only in the presence of a functional BRI1 receptor. This was confirmed by the complete resistance of *bri1-6* plants to any chemical stress and their characteristically low level of constitutive immunity. These results highlight the important role of brassinosteroid homeostasis and BRI1-mediated signaling in balancing growth-defense trade-off.

Keywords: brassinosteroids, 24-epibrassinolide, BRI1 receptor, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, pathogens, phytohormones, plant immunity.