

## ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

### СИНТЕЗ БІЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКУ HSP70 І АЛКОГОЛЬДЕГІДРОГЕНАЗИ У ЛИСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* І *SIUM SISAROIDEUM* У ВІДПОВІДЬ НА ЗАТОПЛЕННЯ ҐРУНТУ

© 2017 р. Л. Є. Козеко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
Національної академії наук України  
(Київ, Україна)

Досліджували реакцію на затоплення ґрунту нестійкого до гіпоксії *Arabidopsis thaliana* і здатного адаптуватися *Sium sisaroidium*. Виявлено особливості динаміки синтезу білка теплового шоку HSP70 (компонент неспецифічної стресової реакції) і алкогольдегідрогенази (АДГ, фермент анаеробного метаболізму) у листках. У обох видів затоплення ґрунту призводило до швидкої послідовної активації синтезу HSP70 і АДГ. У *A. thaliana* вміст цих білків досягав максимуму на 6-ту год, після чого знижувався. У подальшому затоплення призводило до пригнічення розвитку, погіршення стану і загибелі рослин. У *S. sisaroidium* активний синтез обох білків підтримувався протягом 10-ти діб структурної адаптації, що сприяло нормальному росту. Активація неспецифічної стресової реакції та анаеробного метаболізму в листках при затопленні коренів показує системність відповіді рослин на кореневу гіпоксію.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, *Sium sisaroidium*, коренева гіпоксія, HSP70, алкогольдегідрогеназа, стійкість до затоплення

Затоплення ґрунту є несприятливим екологічним чинником для більшості наземних рослин, здатним суттєво впливати на їх виживаність, ріст і розвиток. Головною причиною негативного впливу є те, що затоплення призводить до різкого зменшення кількості кисню, доступного кореневій системі (Jackson, Ricard, 2003). Разом з тим, повітряно-водні рослини адаптовані до довготривалого росту за таких умов завдяки генетично детермінованим структурним і метаболічним пристосуванням, в першу чергу, формуванню аеренхіми для транспортування O<sub>2</sub> з повітря до клітин коренів (Кордюм и др., 2003; Jackson, Ricard, 2003; Kordyum et al., 2017). Метаболічна реакція клітин на гіпоксію включає активацію синтезу «анаеробних» поліпептидів, зокрема ферментів гліколізу та етанольної ферментації, що забезпечує альтернативний шлях енергетичного метаболізму

за нестачі кисню (Crawford, 1967; Sachs et al., 1996). Основним ферментом етанольної ферментації є алкогольдегідрогеназа (алкоголь:НАД-оксидоредуктаза, АДГ, К.Ф. 1.1.1.1), яка каталізує реакцію перетворення ацетальдегіду на етанол. Важливість АДГ для забезпечення стійкості рослин до дефіциту кисню підтверджена, зокрема, в експериментах з нуль-мутантами *adh Arabidopsis thaliana* (Ellis et al., 1999). Реакція рослин на нестачу кисню включає також активацію синтезу білків теплового шоку (heat shock protein, HSP) (Loreti et al., 2005; Banti et al., 2008), що є важливим компонентом неспецифічної стресової реакції і спрямоване на захист і відновлення білкового гомеостазу (Schumann, 2001).

На прикладі *A. thaliana* показана істотна різниця між кореневою і стебловою системами щодо механізмів стійкості до низької концентрації кисню у повітрі (Ellis et al., 1999). Разом з тим, розглядаючи вплив затоплення ґрунту на рослину, треба уявляти, що цей чинник створює гіпоксичні умови безпосередньо лише для

кореневої системи, тоді як надводна частина дефіциту кисню не зазнає. Проте відомо, що стеблова система за умов ґрунтового затоплення також може зазнавати суттєвих метаболічних, структурних і фізіологічних змін (Кордюм і др., 2003; Jackson, 2006; Mühlenbock et al., 2007; Недуха, 2011). Зокрема, показаний синтез АДГ і HSP70 у листках ряду видів рослин (Козеко, Овчаренко, 2014; Козеко, Рахметов, 2016; Kordyum et al., 2017). Однак, особливості цих реакцій у зв'язку зі стійкістю до затоплення залишаються нез'ясованими.

У даній роботі представлені результати порівняльного дослідження синтезу HSP70 і АДГ у листках модельного виду *A. thaliana*, високочутливого до дефіциту кисню (Ellis et al., 1999; Banti et al., 2008), і *Sium sisaroidium*, суходільні рослини якого успішно адаптуються до умов затоплення (Kordyum et al., 2017).

## МЕТОДИКА

В експериментах використовували рослини різунки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Brassicaceae) лабораторної лінії екотипу Columbia (Col) і веху сизаровидного (*Sium sisaroidium* DC., Apiaceae). Насіння *S. sisaroidium* збирали з рослин природної популяції на березі річки Псьол біля смт Велика Багачка (Полтавська обл.) і стратифікували за температури 4°C протягом 2 міс. Перед висіванням насіння обох видів стерилізували 70% етанолом і розчином гіпохлориту (3% Cl) із наступним промиванням проточною водопровідною водою. Стерилізоване насіння пророщували в чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері при 22°C. Проростки висаджували в ґрунт у пластикові ємності й вирощували при вологості ґрунту 70-90% (від сухої маси), 22 ± 2°C, фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) та інтенсивності освітлення 100 мкмоль/м<sup>2</sup>с. Для експерименту використовували 3-тижневі рослини *A. thaliana* на стадії розетки та 4-тижневі рослини *S. sisaroidium* з 2-4-ма перисторозсіченими листками. Ємності з рослинами поміщали у велику посудину з відстояною водопровідною водою таким чином, щоб вода покривала ґрунт (рис. 1, 2). Контролем служили рослини, що росли за нормальної вологості ґрунту. Візуальні спостереження за станом рослин проводили щонайменше протягом 10 діб. Для аналізу білків відбирали по 300 мг листків: в *A. thaliana* – у контролі та через 2, 4, 6, 8, 24 і 48 год від початку затоплення, у *S. sisaroidium* – у контролі та через 2, 4, 6, 8, 24 год і 10 діб. Зразки заморожували і зберігали при температурі -70°C.

Аналіз білка HSP70 здійснювали за допомогою Вестерн-блотингу, як описано нами раніше (Козеко, 2014). Концентрацію білка в екстрактах визначали за Bradford (1976). Проби сумарного білка (20 мкг) розподіляли за допомогою SDS-PAGE. Первинними антитілами служили моноклональні мишачі антитіла до цитозольних HSP70 (H5147, Sigma), вторинними – кролячі антитіла, кон'юговані з біотином (Sigma). Візуалізацію останніх проводили за допомогою екстрав'їдин-пероксидазної системи шляхом інкубації мембрани в розчині 0,02% тетрагідрохлориду 3,3-діамінобензидину (Sigma) і 0,02 % пероксиду водню в цитрат-фосфатному буфері (pH 5,0). Контроль за кількістю сумарного білка у пробах, нанесених на гель, здійснювали за білковими треками на мембрані, забарвленими Понсо С.

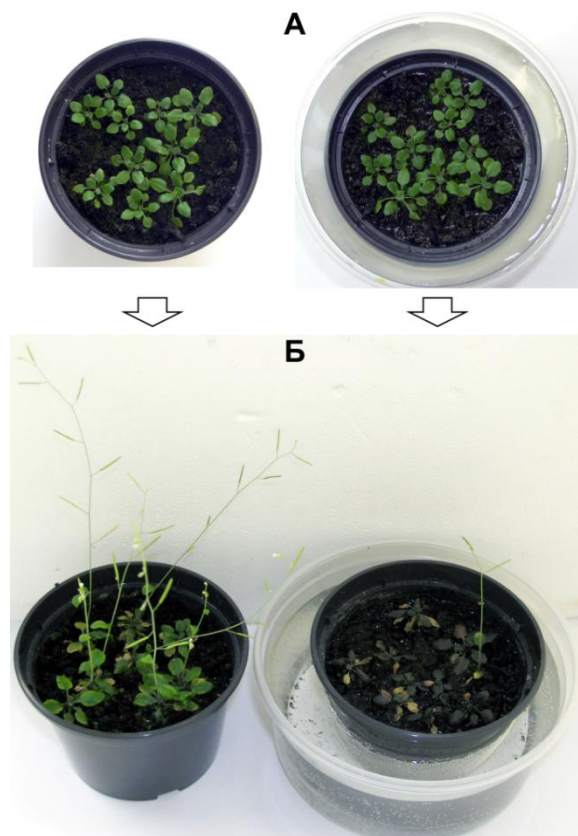
Виділення білка, нативний PAGE та забарвлення активності АДГ у гелі проводили, як описано нами раніше (Козеко, Овчаренко, 2015). Кожна аліквота, нанесена на гель, містила 10 мкг сумарного білка.

Денситометричний аналіз кількості білка на блятах і в гелях проводили з використанням комп'ютерної програми GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>). При аналізі АДГ у *S. sisaroidium* в кожній зимограмі визначали сумарну кількість ферменту. Результати виражали як відносну кількість HSP70 і АДГ у відсотках від контролю після аналізу трьох повторів у кожному варіанті. На графіках наведені середні значення та стандартні відхилення при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

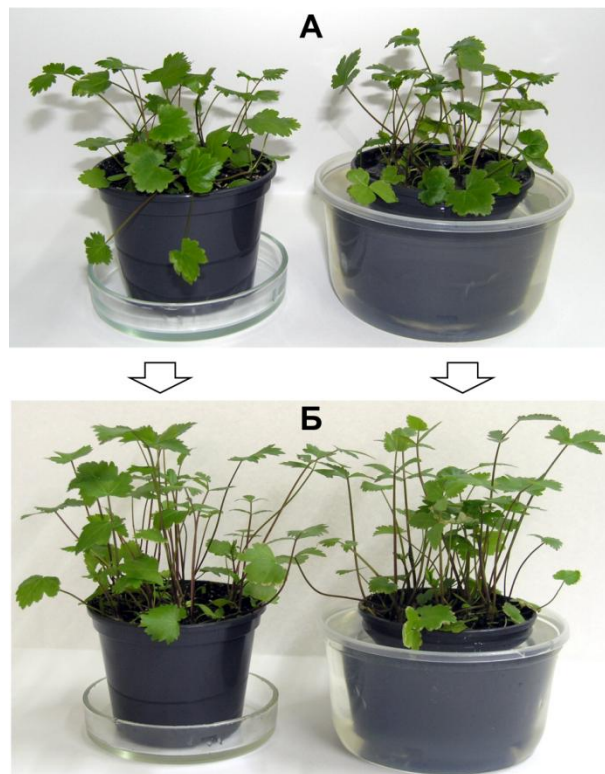
В експерименті ювенільні рослини *A. thaliana* і *S. sisaroidium*, що росли за нормального зволоження ґрунту (70-90% від сухої маси), піддавалися затопленню кореневої системи. У *A. thaliana* це призвело до гальмування переходу рослин до генеративної фази розвитку, потемніння листків, втрати тургору, відмирання нижніх листків протягом 10-ти діб і в подальшому до загибелі рослин (рис. 1). Напротива цьому, рослини *S. sisaroidium* успішно пристосувалися до нових умов (рис. 2).

Розвиток неспецифічної стресової реакції у листках відстежували за рівнем HSP70. Вестерн-блот-аналіз з антитілами до цитозольних HSP70 широкого спектра видів виявив у *A. thaliana* і *S. sisaroidium* імунореактивну зону з молекулярною масою 71 і 72 кДа відповідно. Показано, що у обох видів рослин синтез HSP70 у листках активується протягом 2-х год



**Рис. 1.** Вплив затоплення ґрунту на рослини *A. thaliana*.

А – постановка експерименту: зліва – контрольні рослини без затоплення, справа – рослини відразу після затоплення; Б – через 10 діб після затоплення.



**Рис. 2.** Вплив затоплення ґрунту на рослини *S. sisaroides*.

А – постановка експерименту: зліва – контрольні рослини без затоплення, справа – рослини відразу після затоплення; Б – через 10 діб після затоплення.

від початку затоплення коренів (рис. 3, А, Б). У *A. thaliana* вміст HSP70 досягав максимуму через 4-6 год дії фактора, після чого знижувався. На противагу цьому, у *S. sisaroides* активний синтез HSP70 підтримувався протягом 10-ти діб, що зумовило значне накопичення білка.

Перебіг метаболічної акліматії рослин до затоплення оцінювали за кількістю АДГ з використанням методу нативного PAGE з наступним гістохімічним забарвленням в гелі. У *A. thaliana* виявлена одна зона ферменту, у *S. sisaroides* – три зони, кількість білка в яких оцінювали сумарно (рис. 3, В, Г). В обох видів показано індукцію синтезу АДГ у листках через 4 год затоплення коренів. Подальша динаміка його синтезу була подібна до динаміки синтезу HSP70 у цих видів. Так, у *A. thaliana* вміст АДГ досягав різко вираженого максимуму на 6-ту год дії чинника, після чого знижувався до 24-тої год. У *S. sisaroides* рівень АДГ зростав протягом всього дослідженого періоду, досягаючи максимального значення на 10-ту добу.

## ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння стану рослин двох видів підтвердило їх суттєву різницю за стійкістю до затоплення: *S. sisaroides* успішно адаптувався до кореневої гіпоксії, тоді як у *A. thaliana* такі умови призвели до поступового погіршення стану і загибелі. За даними літератури та нашими попередніми результатами, різниця в адаптивних властивостях цих видів в першу чергу зумовлена їх здатністю до утворення аеренхіми. Повітряно-водні за своєю екологією рослини вежу при рості на затопленому ґрунті формують адвентивні корені з системою міжклітинних порожнин схізогенного походження (Козеко, Овчаренко, 2014; Kordyum et al., 2017). Так, ювенільні рослини *S. sisaroides*, що вирощувались як суходільні, відповідали на затоплення ініціацією адвентивних аеренхімоносних коренів у перші дні дії фактору (Kordyum et al., 2017). На відміну від цього у *A. thaliana* здатність формувати невелику за об'ємом лізоген-

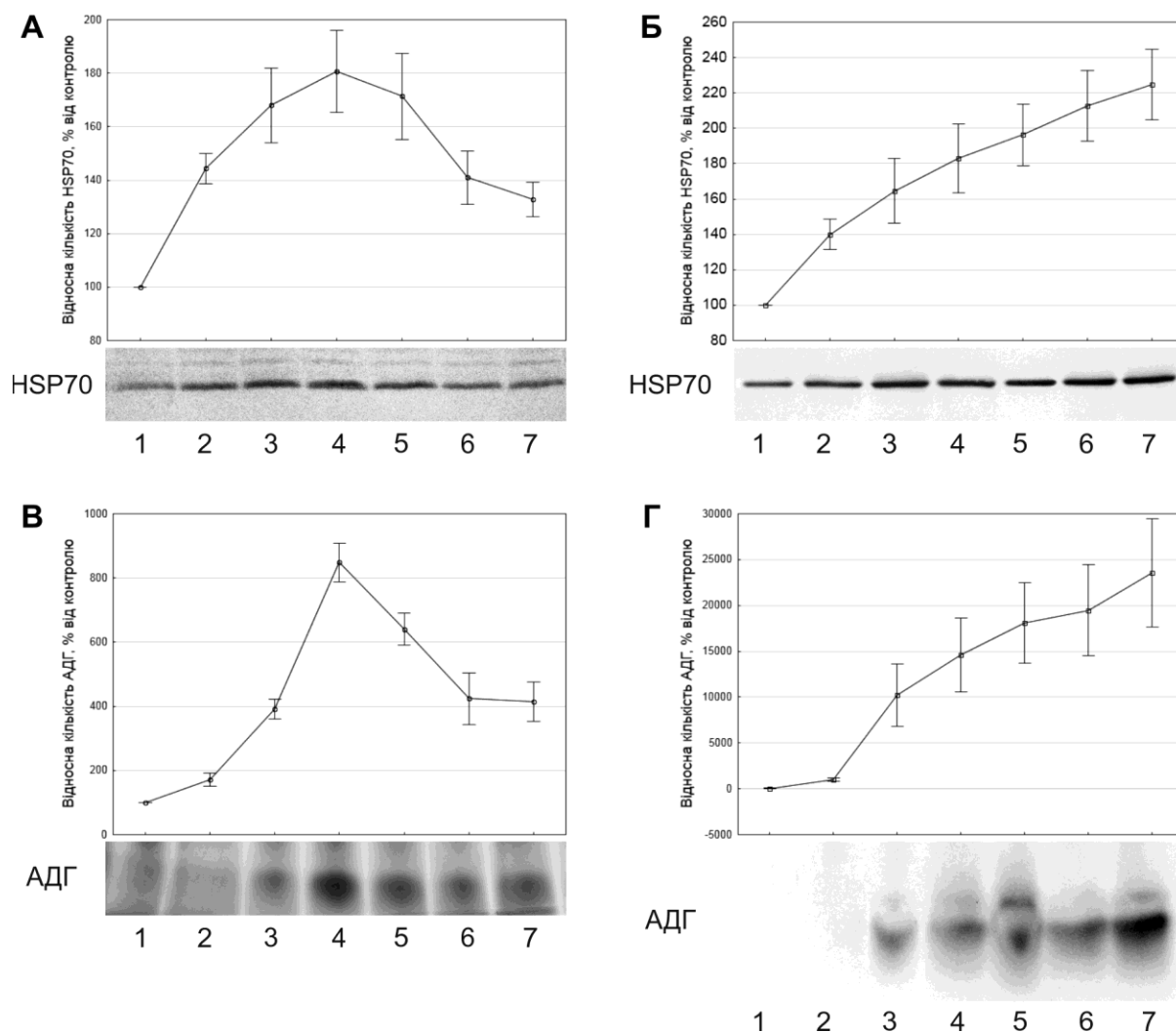


Рис. 3. Синтез HSP70 і АДГ у листках *A. thaliana* (А, В) і *S. sisaroides* (Б, Г) у відповідь на затоплення ґрунту.

А, Б – вестерн-блот-аналіз HSP70; В, Г – аналіз АДГ методом нативного електрофорезу; 1 – до затоплення та через певний період часу від початку затоплення: 2 – 2 год, 3 – 4 год, 4 – 6 год, 5 – 8 год, 6 – 24 год, 7 – 48 год (А, В), 10 діб (Б, Г).

ну аеренхіму в гіпокотилі-корені з'являється з віком (виявлено у 12-тижневих рослин), проте у 4-тижневих рослин аеренхіма не утворюється (Mühlenbock et al., 2007). Це, очевидно, і є головною причиною загибелі проростків цього наземного виду за впливу кореневої гіпоксії понад 10 діб.

Однак, навіть якщо рослина здатна до структурної адаптації, ріст адвентивних коренів і формування аеренхіми потребують щонайменше кількох діб. Виживання на початку впливу дефіциту кисню забезпечується активацією анаеробного енергетичного метаболізму, що доведено в багатьох роботах на коренях і проростках (Crawford, 1967; Jackson, Ricard, 2003; Jackson, 2006; Banti et al., 2008). Індукція експресії генів кількох HSP під впливом аноксії також виявлялась у проростків (Loreti et al.,

2005; Banti et al., 2008). Результати даного дослідження продемонстрували активацію синтезу стресових білків у листках у відповідь на затоплення коренів, що свідчить про системний характер реакції. Відомо, що ризосферна гіпоксія призводить до поступового збільшення протягом кількох діб продукції  $H_2O_2$  та етилену і закриття продохів у листках *A. thaliana* (Mühlenbock et al., 2007). Швидка реакція суходільних рослин *S. sisaroides* на затоплення раніше не вивчалася, проте численні ознаки структурної та метаболічної адаптації листків, виявлені у рослин веху природних популяцій, що зростаючи на мілководді та на суші (Недуча, 2011), свідчать про наявність системних змін у метаболізмі надводної частини рослин.

Слід зазначити, що як у *A. thaliana*, так і у *S. sisaroides* реакція листків на кореневу гіпо-

ксію включала негайну індукцію синтезу HSP70 і з 2-годинним інтервалом – синтезу АДГ та його посилення протягом перших 6-ти год. Це свідчить про швидкий поступовий розвиток неспецифічної стресової реакції і активації етанольної ферментації в обох видів, незалежно від їх здатності до структурної адаптації. Проте подальші зміни вмісту білків корелюють з адаптаційними властивостями видів. У *A. thaliana* після початкового підйому вмісту HSP70 і АДГ відбувалось зниження, тоді як у *S. sisaroides* синтез обох білків продовжував підтримуватися на високому рівні, що призвело до їх суттєвого накопичення протягом 10-ти діб. Нетривала активація синтезу цих білків у листках проростків *A. thaliana* корелює з нездатністю формувати аеренхіму (Mühlenbock et al., 2007) і низькою стійкістю до гіпоксії. Враховуючи дані про те, що з віком рослини цього виду набувають здатності формувати невелику за об'ємом аеренхіму (Mühlenbock et al., 2007), можна прогнозувати певну пролонгацію їх виживаності за кореневої гіпоксії протягом онтогенезу. Подібна нетривала активація синтезу індукцибельного HSP70 в листках була продемонстрована нами в попередній роботі у наземних рослин *Malva sylvestris* і *M. pulchella*, які також характеризуються обмеженим рівнем стійкості до затоплення (Козеко, Рахметов, 2016). Що стосується *S. sisaroides*, виявлене збільшення вмісту обох білків протягом 10-ти діб збігається з періодом утворення системи адвентивних аеренхімоночних коренів (Козеко, Овчаренко, 2014; Kordyum et al., 2017). Це свідчить про необхідність підвищення активності протеопротекторної системи і анаеробного метаболізму в надводній частині рослини щонайменше в період структурної адаптації. Однак, призначення активації процесів анаеробного метаболізму в листках у відповідь на кореневу гіпоксію залишається нез'ясованим. Можна припускати, що це сприяє попередній аклімації стеблової частини рослин до можливого підйому рівню води.

В цілому, отримані результати, по-перше, свідчать про системність реакції рослин на кореневу гіпоксію, по-друге, показують схожість розвитку стресової реакції і анаеробної аклімації в листках рослин, контрастних за стійкістю, у перші години ґрунтового затоплення та видоспецифічність у подальшому перебігу цих процесів, що корелює зі здатністю видів до структурної адаптації.

## ЛІТЕРАТУРА

- Козеко Л.Е. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 6. – С. 419-426.
- Козеко Л.С., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (Apiaceae) до затоплення кореневої системи // Укр. ботан. журн. – 2015. – Т. 72, № 2. – С. 172-179.
- Козеко Л.С., Рахметов Д.Б. Особенности динамики синтеза белков теплового шока HSP70 у *Malva sylvestris* і *M. pulchella* (Malvaceae) у зв'язку зі стійкістю до високої температури, затоплення та посухи // Укр. ботан. журн. – 2016. – Т. 73, № 2. – С. 194-203.
- Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В., Белявская Н.А., Климчук Д.А., Недуха Е.М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. – Киев: Наук. думка, 2003. – 277 с.
- Недуха О.М. Гетерофілія у рослин. – К., 2011. – 192 с.
- Banti V., Loreti E., Novi G., Santaniello A., Alpi A., Perata P. Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis* // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 1029-1037.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
- Crawford R.M.M. Alcohol dehydrogenase activity in relation to flooding tolerance in roots // J. Exp. Bot. – 1967. – V. 18. – P. 458-464.
- Ellis M.H., Dennis E.S., Peacock W.J. *Arabidopsis* roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance // Plant Physiol. – 1999. – V. 199. – P. 57-64.
- Jackson M.B. Plant survival in wet environments: resilience and escape mediated by shoot systems // Wetlands: Functioning, Biodiversity Conservation, and Restoration. – Berlin, 2006. – P. 15-36.
- Jackson M.B., Ricard B. Physiology, biochemistry and molecular biology of plant root systems subjected to flooding of the soil // Root Ecology. – Berlin, 2003. – P. 193-213.
- Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (Apiaceae) to water-logging // Aquat. Bot. – 2017. – V. 142. – P. 71-77.
- Loreti E., Poggi A., Novi G., Alpi A., Perata P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia // Plant Physiol. – 2005. – V. 137. – P. 1130-1138.

## КОЗЕКО

- Mühlenbock P., Plaszczyca M., Plaszczyca M., Mel-lerowicz E., Karpinski S. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by *LESION SIMULATING DISEASE1* // Plant Cell. – 2007. – V. 19. – P. 3819-3830.
- Sachs M.M., Subbaiah C.C., Saab I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize // J. Exp. Bot. – 1996. – V. 47. – P. 1-15.
- Schumann W. Heat shock response // eLS, 2001: www.els.net

Надійшла до редакції  
07.09.2017 р.

### HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 AND ALCOHOL DEHYDROGENASE SYNTHESIS IN LEAVES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* AND *SIUM SISAROIDEUM* IN RESPONSE TO SOIL FLOODING

L. Ye. Kozeko

*M.G. Kholodny Institute of Botany  
of National Academy of Science of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)  
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

The response to soil flooding in highly sensitive to low oxygen *Arabidopsis thaliana* and tolerant *Sium sisaroidium* was investigated. Dynamics of heat shock protein HSP70 (a component of the nonspecific stress reaction) and alcohol dehydrogenase (ADH, an enzyme of anaerobic metabolism) in leaves were characterized. Soil flooding was shown to cause rapid consecutive activation of HSP70 and АДГ synthesis in both species. In *A. thaliana*, the level of the proteins reached a maximum on 6 h and then decreased. Further, flooding resulted in oppressing the plant development, damage and death. In *S. sisaroidium*, active synthesis of both proteins was maintained for 10 days of structural adaptation that supported normal growth. Activation of the nonspecific stress reaction and anaerobic metabolism in leaves after root flooding shows the systemic response of the plants to root hypoxia.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, *Sium sisaroidium*, root hypoxia, HSP70, alcohol dehydrogenase, tolerance to flooding

### СИНТЕЗ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКУ HSP70 И АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA* И *SIUM SISAROIDEUM* В ОТВЕТ НА ЗАТОПЛЕНИЕ ПОЧВЫ

Л. Е. Козеко

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного  
Национальной академии наук Украины  
(Киев, Украина)  
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

Исследовали реакцию на затопление почвы неустойчивого к гипоксии *Arabidopsis thaliana* и способного адаптироваться *Sium sisaroidium*. Охарактеризована динамика синтеза белка теплового шока HSP70 (компонент неспецифической стрессовой реакции) и алкогольдегидрогеназы (АДГ, фермент анаэробного метаболизма) в листьях. У обоих видов затопление почвы приводило к последовательной активации синтеза HSP70 и АДГ. У *A. thaliana* содержание белков достигало максимума на 6-й ч, после чего снижался. В дальнейшем затопление приводило к угнетению развития, ухудшению состояния и гибели растений. У *S. sisaroidium* активный синтез обоих белков поддерживался на протяжении 10-ти дней структурной адаптации, что способствовало нормальному росту. Активация неспецифической стрессовой реакции и анаэробного метаболизма в листьях при затоплении корней показывает системность ответа растений на корневую гипоксию.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, *Sium sisaroidium*, корневая гипоксия, HSP70, алкогольдегидрогеназа, устойчивость к затоплению