

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ СИНТЕЗУ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ HSP70 У *MALVA SILVESTRIS* І *M. PULCHELLA* (*MALVACEAE*) І СТІЙКІСТЬ ДО ВИСОКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ, ЗАТОПЛЕННЯ ТА ПОСУХИ

Kozeko L.Ye.¹, Rakhmetov D.B.² Variation in dynamics of the heat shock proteins HSP70 synthesis in *Malva sylvestris* and *M. pulchella* (*Malvaceae*) in connection with tolerance to high temperature, flooding and drought. Ukr. Bot. J., 2016, 73(2): 194–203.

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, 01004, Ukraine

² M.M. Gryshko National Botanic Garden, National Academy of Sciences of Ukraine
1, Tymiryzevska Str., Kyiv, 01014, Ukraine

Abstract. Tolerance ranges and heat shock protein HSP70 synthesis pattern in *Malva sylvestris* L. 'Krasavka' and *M. pulchella* Bernh. 'Sylva' were analyzed under high temperature, soil flooding and drought. Juvenile plants of the species showed close tolerance ranges; at that, *M. sylvestris* was some more thermotolerant and more sensitive to flooding, comparatively to *M. pulchella*. Western-blot analysis revealed the identical spectrum and equal basic level of the cytosolic HSP70s in the related species, as well as similar stressor-specific pattern of their synthesis. High thermo- and drought tolerance of the species corresponded to their ability to long and intensive synthesis of the constitutive and inducible proteins, which increased at near lethal doses. The stress reaction to flooding included a rapid, but short activation of the inducible HSP70 synthesis and a decrease in the content of the constitutive protein for the first hours that could be protective under short waterlogging and associated with the inability of the species to long-term survival in such conditions. Species-specific differences related to the time course and magnitude of the HSP70 synthesis. The obtained results suggest that molecular mechanisms underlying the high tolerance in plants include the ability to extended and intensive synthesis of both inducible and constitutive HSP70s under long-term influence of an unfavorable factor.

Key words: *Malva sylvestris*, *M. pulchella*, tolerance range, stress reaction, heat shock proteins 70

Вступ

Ареал зростання виду взаємопов'язаний із межами його толерантності до змін навколишнього середовища (Odum, 1986). Більшість видів роду *Malva* L. (*Malvaceae*) характеризуються широкими, але специфічними для кожного виду природними ареалами. Так, *M. sylvestris* L. поширена в Малій і Середній Азії та Європі (окрім північної) (Oglyanitskaya, Tsvelev, 1996), включаючи всю територію України (переважно в лісових і лісостепових районах) (Dobrochaeva et al., 1999). *Malva pulchella* Bernh. розповсюджена у Центральній та Східній Азії, Середземній і Атлантичній Європі (Oglyanitskaya, Tsvelev, 1996), в Україні є інтродукованим видом (Rakhmetov, 2000). Такі природні ареали свідчать про широкі діапазони толерантності цих видів і, разом з тим, передбачають відмінності між ними.

© Л.Є. КОЗЕКО, Д.Б. РАХМЕТОВ, 2016

Міжвидова різниця за рівнем стійкості визначається активністю захисних механізмів клітини в період стрес-реакції та здатністю до подальшої специфічної метаболічної і морфологічної адаптації (Lichtenthaler, 1998; Kordyum et al., 2003). Важливу роль у захисті клітин від впливу несприятливих чинників різної природи відіграють білки теплового шоку (heat shock protein, HSP)/шаперони (Margulis, Guzhova, 2000; Schumann, 2001; Kosakivska, 2003; Sørensen et al., 2003; Kolupaev, Kapets, 2010). На тваринних об'єктах (амфіподах) показано, що у вивченні молекулярних основ стійкості близькоспоріднених видів інформативним показником є динаміка синтезу HSP70 (Shatilina et al., 2011; Bedulina et al., 2013). Цитозольні білки родини HSP70 містять конститутивні та індукбельні ізоформи, які відповідають за підтримання та відновлення білкового гомеостазу за нормальних і стресових умов. Їхній синтез активується за різних несприятливих факторів, зокрема, високої

температури (Klueva, Samohvalov, 1990; Sung et al., 2001; Gamburg et al., 2014; Kozeko, 2014), анаеробіозу (Banti et al., 2008), затоплення (Kozeko, Ovcharenko, 2015) і зневоднення (Wang et al., 2009). За загальними уявленнями, стресова індукція експресії генів HSP70 відбувається впродовж перших хвилин дії чинника, значно посилюється протягом кількох годин, відтак спадає (Margulis, Guzova, 2000; Schumann, 2001; Kosakivska, 2003). Подібна динаміка синтезу HSP70 визначалась і в модельного виду *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh., який найширше використовується для вивчення молекулярних механізмів стійкості в рослин, однак характеризується коротким онтогенезом і помірними адаптаційними властивостями, зокрема за високої температури (Klueva, Samohvalov, 1990; Sung et al., 2001; Gamburg et al., 2014) й нестачі кисню (Banti et al., 2008). Але, попри високий ступінь консервативності HSP70, рівень їхнього синтезу може суттєво різнитися в рослин із різним діапазоном толерантності. Так, значна відмінність щодо рівня стресової індукції HSP, зокрема HSP70, виявлена в *A. thaliana* та іншого виду родини *Brassicaceae*, високорезистентного до низки несприятливих екологічних чинників — *Thellungiella salsuginea* (Pall.) O.E. Schulz (Gamburg et al., 2014), і навіть між еко-типами *T. salsuginea* різної резистентності (Wong et al., 2005). При цьому перебіг захисних процесів у часі в зв'язку з адаптаційними властивостями рослин залишається нез'ясованим.

Наше дослідження спрямоване на вивчення питання, яким чином діапазон толерантності виду в рослин пов'язаний із характером динаміки синтезу білків родини HSP70 за несприятливих змін екологічних факторів. Для цього здійснено порівняльне вивчення *M. sylvestris* і *M. pulchella* за впливу високої температури, затоплення ґрунту та посухи. Вибираючи екологічні чинники, ми враховували те, що температура та вода є ключовими компонентами довкілля, які визначають розповсюдження рослин. Для експериментів брали ювенільні рослини, що характеризуються найбільшою чутливістю до несприятливих змін довкілля та найбільшим рівнем стресової індукції генної експресії HSP у вегетативних органах (Yung et al., 2001; Sørensen et al., 2003).

Об'єкти та методи досліджень

В експериментах використовували насіння сортів *M. sylvestris* 'Красавка' і *M. pulchella* 'Сильва' ISSN 0372-4123. Укр. ботан. журн., 2016, 73(2)

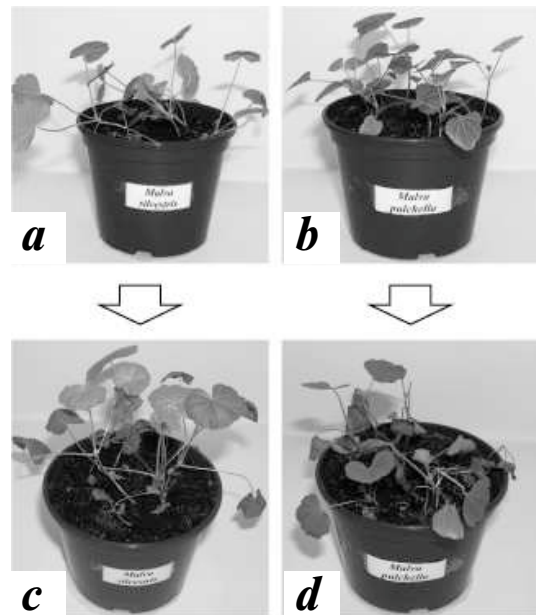


Рис. 1. Експеримент щодо впливу високої температури: *Malva silvestris* (a, c) і *M. pulchella* (b, d) до теплової експозиції (a, b) та після неї (48 год за +37 °C) і реадaptaції (48 год за +22 °C) (c, d)

Fig. 1. Experiment on the influence of high temperature: *Malva silvestris* (a, c) і *M. pulchella* (b, d) before heat exposure (a, b), and after heat exposure (48 h at +37 °C) and readaptation (48 h at +22 °C) (c, d)

(останній створений Д.Б. Рахметовим методом багаторічного добору) з колекції відділу нових культур Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Насіння стерилізували та пророщували за методикою, описаною раніше (Kozeko, Ovcharenko, 2015). Проростки висаджували в ґрунт і вирощували за його вологості 70–90 % (від сухої маси), температури повітря +22 ± 2 °C, фотоперіоду 16/8 год (світло/темрява) й інтенсивності світла 100 мкмоль/м²с. Для експериментів з теплової експозиції та затоплення рослини вирощували в пластикових ємностях діаметром 9 см (по 8–10 особин у кожній). В експериментах щодо впливу посухи 10–12 рослин кожного виду вирощували в різних половинах однієї ємності (9 × 28 см), щоби забезпечити однаковий рівень вологості ґрунту. Для експериментів використовували ювенільні рослини з двома–чотирма розвиненими листками (рис. 1, a, b). Для теплової експозиції ємності з рослинами інкубували в термостаті за температури +37 °C й умов збереження режиму освітлення. В експериментах щодо затоплення ємності з рослинами вмщували у велику посудину з відстояною водопровідною водою таким чином, щоби ґрунт

перебував у воді. Посуху створювали шляхом природного поступового підсихання ґрунту після припинення поливу. Протягом періоду експерименту визначали ваговий відносний уміст води в ґрунті (% від його сухої маси).

З метою оцінки адаптаційного потенціалу рослин у лабораторних експериментах використовували відсоток живих зелених листків. Теплостійкість оцінювали через дві доби реадаптації після теплової експозиції різної тривалості, стійкість до затоплення — протягом 35 діб затоплення, посухостійкість — за поступового підсихання ґрунту впродовж 18 діб. У кожному варіанті підраховували відсоток живих зелених листків від загальної кількості листків у п'яти рослин за триразової повторюваності.

Для аналізу білків зразки листків відбирали за нормальних умов (контроль) і через різні проміжки часу від початку експерименту: за теплової експозиції — через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 і 48 год, затоплення — через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 і 72 год, посухи — через кожні три доби до стійкого в'янення листків. Відібрані зразки листків (по 250 мг) заморожували та зберігали за температури -70°C .

Вестерн-блот-аналіз HSP70 у листках проводили за методикою, описаною нами раніше (Kozeko, 2014). Проби сумарного розчинного білка (по 20 мкг) розділяли у вертикальному 10 %-му поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату Na (SDS-PAGE) за (Laemmli, 1970). Після електрофорезу гелі використовували для імуноблотингу або забарвлювали Кумасі. Молекулярну масу (мол. м.) білків визначали маркером PageRuller Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). Первинними антитілами слугували моноклональні мишачі антитіла (H5147, Sigma, США), вторинними — кролячі антитіла, кон'юговані з біотином (Sigma, США). Останні візуалізували за допомогою екстравидин-пероксидазної системи. Контроль за однаковою кількістю сумарного білка у пробах, нанесених на гель, здійснювали за білковими треками в гелі після забарвлення Кумасі або на мембранах, забарвлених Понсо С. Визначення молекулярної маси та кількісну оцінку білків на блотах проводили з використанням комп'ютерної програми GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>). Значення для кожного варіанта виражали як відносну кількість HSP70 у відсотках від контролю після денситометричного аналізу трьох блотів у кожному варіанті. При цьому за 100 % брали кількість

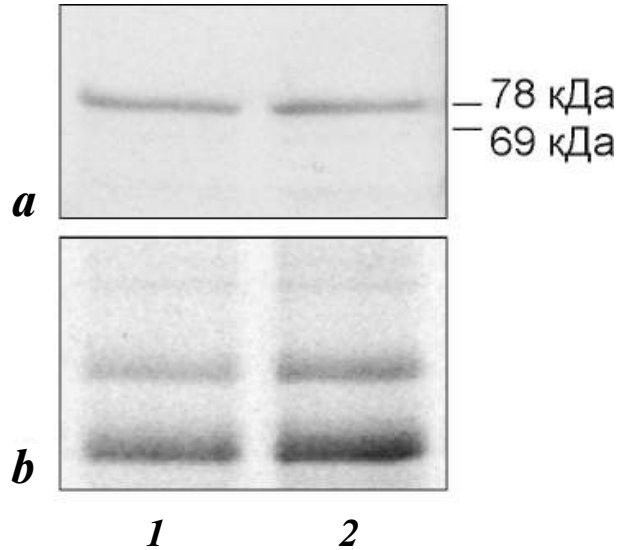


Рис. 2. Базовий рівень HSP70 у листках *Malva silvestris* (1) і *M. pulchella* (2) за контрольних умов: а — Вестерн-блот-аналіз HSP70; б — контроль завантаження білка у вигляді фрагмента електрофореграм сумарних білкових екстрактів

Fig. 2. The basal level of HSP70 in *Malva silvestris* (1) and *M. pulchella* (2) leaves under the control conditions: a — Western-blot-analysis of HSP70; b — a fragment of the electrophoregrams of total protein extracts as a loading control білка з мол. м. 78 кДа за температури 22°C (контроль). Усі експерименти повторювали щонайменше тричі.

Статистична обробка даних. Центральна тенденція та розкид значень ознак представлені у вигляді середнього значення і стандартного відхилення ($\alpha = 0,95$). Для оцінки значущості різниці між видами та впливу тривалості дії стресового чинника на частку зелених листків у рослин застосовували двофакторний дисперсійний аналіз (Two-way ANOVA, Statistica.6), коли $\alpha = 0,95$.

Результати досліджень та їх обговорення

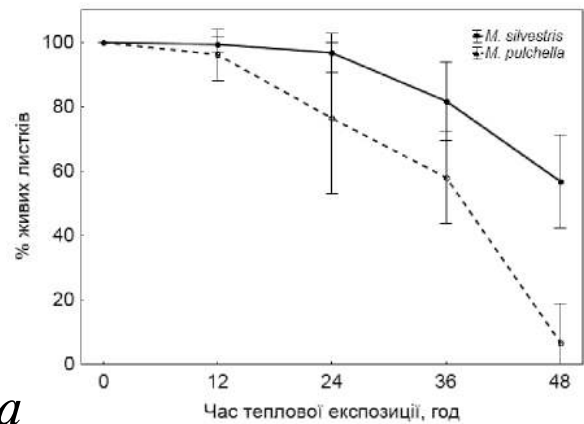
Вестерн-блот-аналіз HSP70 *M. sylvestris* і *M. pulchella* проводився з використанням моноклональних антитіл, специфічних до цитозольних HSP70 широкого кола організмів, включаючи рослини (Kozeko et al., 2011). За результатами аналізу в обох видів виявлено дві імунореактивні зони з мол. м. 69 і 78 кДа. За характером синтезу першу можна вважати індукцйбельною ізоформою, другу — конститутивною (рисунки 2–5). Показано, що базовий рівень конститутивної ізоформи (за температури $+22^{\circ}\text{C}$ і вологості ґрунту $\sim 70\%$) у видів був близьким (рис. 2).

Рис. 3. Реакція *Malva sylvestris* і *M. pulchella* на експозицію за +37 °С: *a* — відсоток живих листків після теплової експозиції різної тривалості та подальшої 48-годинної реадaptaції за +22 °С; *b, c* — Вестерн-блот-аналіз HSP70 у листках *M. sylvestris* (*b*) і *M. pulchella* (*c*) після теплової експозиції тривалістю: 1 — 0 год (контроль), 2 — 0,5 год, 3 — 1 год, 4 — 2 год, 5 — 4 год, 6 — 6 год, 7 — 8 год, 8 — 24 год, 9 — 48 год. Фотографії типових імуноблотів розташовані під результатами денситометричного аналізу. Рівень білка виражений у відсотках до базового вмісту білка з мол. м. 78 кДа у контролі (100 %). Дані представлені у вигляді середніх значень і стандартних відхилень у трьох незалежних експериментах, $\alpha = 0,95$

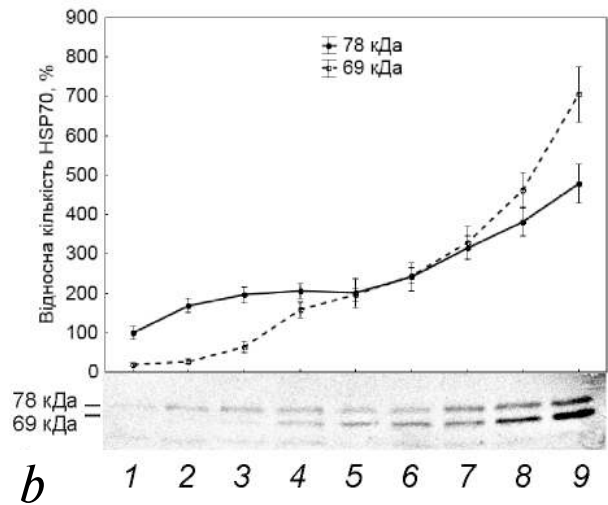
Fig. 3. Reaction of *Malva sylvestris* і *M. pulchella* to the exposition at +37 °С: *a* — Per cent of live leaves after heat exposure followed by 48 h recovery at +22 °С; *b, c* — Western-blot-analysis of HSP70 in *M. sylvestris* (*b*) and *M. pulchella* (*c*) leaves after heat exposure for: 1 — 0 h (control), 2 — 0,5 h, 3 — 1 h, 4 — 2 h, 5 — 4 h, 6 — 6 h, 7 — 8 h, 8 — 24 h, 9 — 48 h. The actual blots are shown below the results of the densitometric analysis. The level is expressed as the per cent difference from the basal level of the 78 kDa protein in the control (100 %). The data are the means and standard deviations from three independent experiments, $\alpha = 0,95$

Динаміку синтезу HSP70 аналізували шляхом його зіставлення зі стійкістю рослин до впливу несприятливих чинників. Для порівняння стійкості ювенільних рослин видів роду *Malva* використовували відсоток живих листків. Як приклад, на рис. 1 представлені рослини до і після теплової експозиції. Для аналізу HSP70 брали зелені розвинуті листки. Результати засвідчили, що в обох видів висока температура, затоплення і водний дефіцит зумовлювали активацію синтезу HSP70. Проте синтез як конститутивної ізоформи, так і індукційної мав свою динаміку за впливу кожного чинника та певні видоспецифічні особливості.

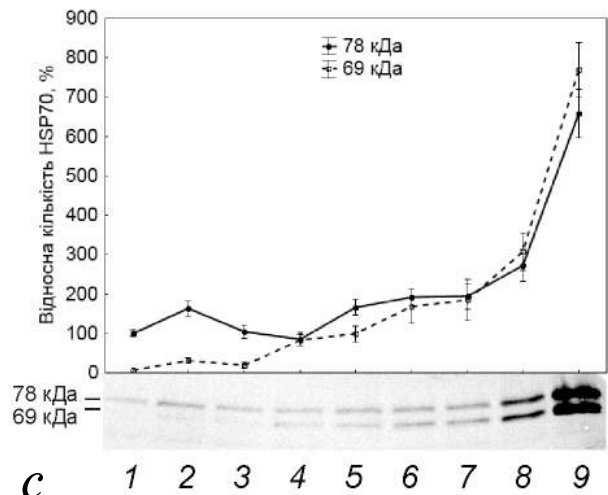
Аналіз стійкості рослин до високої температури після експозиції за +37 °С різної тривалості (до 48 год) і подальшої 48-годинної реадaptaції показав більшу теплостійкість *M. sylvestris* ($p < 0,05$) (рис. 3, *a*). Характер динаміки синтезу HSP70 протягом теплової експозиції в обох видів був схожим (рис. 3, *b, c*): упродовж перших 30 хв у ~1,5 раза зростає вміст конститутивного білка, далі відбувалася індукція синтезу білка з мол. м. 69 кДа, рівень якого наближався до рівня конститутивного білка через 2 год. Подальша дія цього чинника призводила до прогресивного збільшення в кілька разів вмісту обох HSP70. При цьому концентрація індукційної ізоформи у *M. sylvestris* протягом першої доби в 1,3–1,5 раза перевищувала таку в *M. pulchella*. Слід також зазначити, що наприкінці 48-годинної ек-



a



b



c

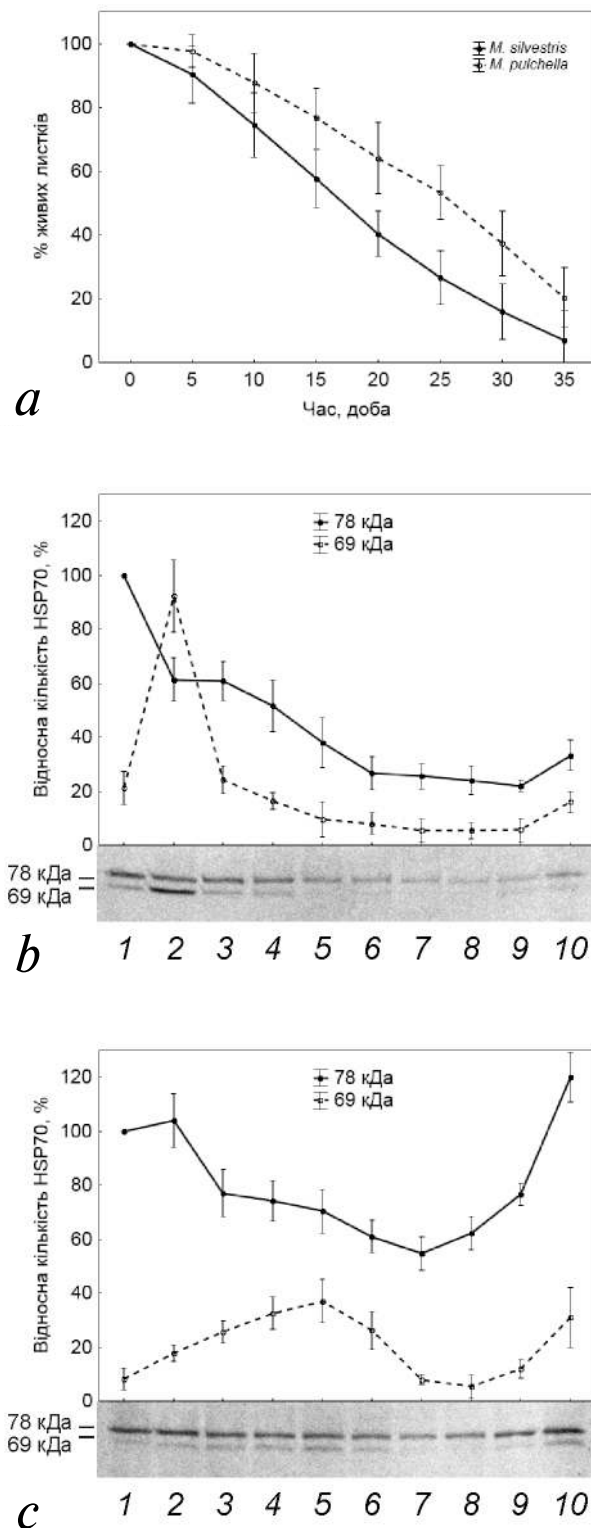


Рис. 4. Реакція *Malva silvestris* і *M. pulchella* на затоплення ґрунту: *a* — відсоток живих листків; *b, c* — Вестерн-блот-аналіз HSP70 у листках *M. silvestris* (*b*) і *M. pulchella* (*c*) після затоплення тривалістю: 1 — 0 год (контроль), 2 — 0,5 год, 3 — 1 год, 4 — 2 год, 5 — 4 год, 6 — 6 год, 7 — 8 год, 8 — 24 год, 9 — 48 год, 10 — 72 год. Фотографії типових імуноблотів розташовані під результатами денситометричного аналізу. Рівень білка виражений у відсотках до базового вмісту білка з мол. м. 78 кДа у контролі (100 %). Дані представлені у вигляді середніх значень і стандартних відхилень у трьох незалежних експериментах, $\alpha = 0,95$

Fig. 4. Reaction of *Malva silvestris* і *M. pulchella* to soil flooding: *a* — Per cent of live leaves; *b, c* — Western-blot-analysis of HSP70 in *M. silvestris* (*b*) and *M. pulchella* (*c*) leaves after flooding for: 1 — 0 h (control), 2 — 0,5 h, 3 — 1 h, 4 — 2 h, 5 — 4 h, 6 — 6 h, 7 — 8 h, 8 — 24 h, 9 — 48 h, 10 — 72 h. The actual blots are shown below the results of the densitometric analysis. The level is expressed as the per cent difference from the basal level of the 78 kDa protein in the control (100 %). The data are the means and standard deviations from three independent experiments, $\alpha = 0,95$

спозиції рівень обох ізоформ був, навпаки, вищим у менш стійкої *M. pulchella*.

Затоплення ґрунту спричинювало поступове погіршення стану рослин і їхню загибель упродовж 30–35 діб. За відсотком живих листків стійкішою виявилася *M. pulchella* ($p < 0,05$) (рис. 4, *a*). Аналіз HSP70 в обох видів показав зниження рівня конститутивного HSP70 і тимчасову активацію синтезу індукцйбельного білка за першу добу та посилення синтезу обох ізоформ у подальшому (рис. 4, *b, c*). Відмінності між видами стосувалися кількісних і часових параметрів. У *M. silvestris* значна активація синтезу індукцйбельного білка за перші півгодини затоплення супроводжувалася падінням вмісту конститутивного білка, відтак рівень обох HSP70 знижувався протягом двох діб (для конститутивного білка — до ~30 % від контрольного) (рис. 4, *b*). У *M. pulchella* концентрація конститутивного білка починала знижуватися лише після 30 хв, досягаючи ~60 % від контрольного на восьму годину. Активація синтезу індукцйбельного HSP70 впродовж першої доби була менш значною, ніж у попереднього виду, але тривалішою (рис. 4, *c*).

За умов поступового підсихання ґрунту різниця між видами за часткою зелених листків виявилася статистично недостовірною ($p > 0,05$), тобто стан рослин обох видів погіршувався майже однаковою мірою (рис. 5, *a*). Подібною була і динаміка синтезу HSP70 (рис. 5, *b, c*). Пожовтіння та в'янення нижніх листків починалося за вологості ґрунту нижче 40 % від сухої маси, що супроводжувалося поси-

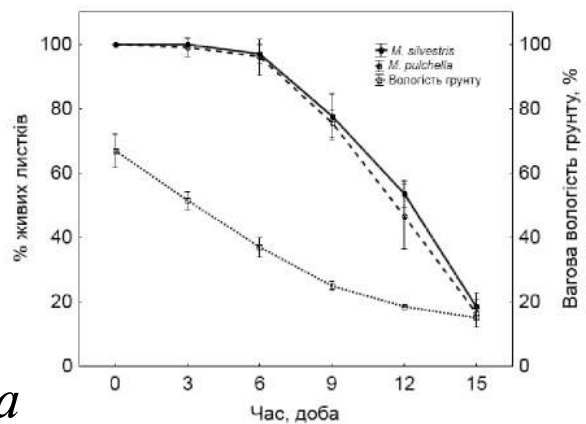
Рис. 5. Реакція *Malva silvestris* і *M. pulchella* на поступове підсихання ґрунту: *a* — відсоток живих листків і відносний вміст води у ґрунті (% від сухої маси); *b, c* — Вестерн-блот-аналіз HSP70 у листках *M. sylvestris* (*b*) і *M. pulchella* (*c*) у контролі (1) та через певний час після припинення поливу: 2 — 3 доби, 3 — 6, 4 — 9, 5 — 12, 6 — 15 діб. Фотографії типових імуноблотів розташовані під результатами денситометричного аналізу. Рівень білка виражений у відсотках до базового вмісту білка з мол. м. 78 кДа у контролі (100 %). Дані представлені у вигляді середніх значень і стандартних відхилень у трьох незалежних експериментах, $\alpha = 0,95$

Fig. 5. Reaction of *Malva silvestris* і *M. pulchella* to soil drought: *a* — Per cent of live leaves and relative soil water content (% from dry soil mass); *b, c* — Western-blot-analysis of HSP70 in *M. sylvestris* (*b*) and *M. pulchella* (*c*) leaves in control (1) and under drought for: 2 — 3 d, 3 — 6 d, 4 — 9 d, 5 — 12 d, 6 — 15 d. The actual blots are shown below the results of the densitometric analysis. The level is expressed as the per cent difference from the basal level of the 78 kDa protein in the control (100 %). The data are the means and standard deviations from three independent experiments, $\alpha = 0,95$

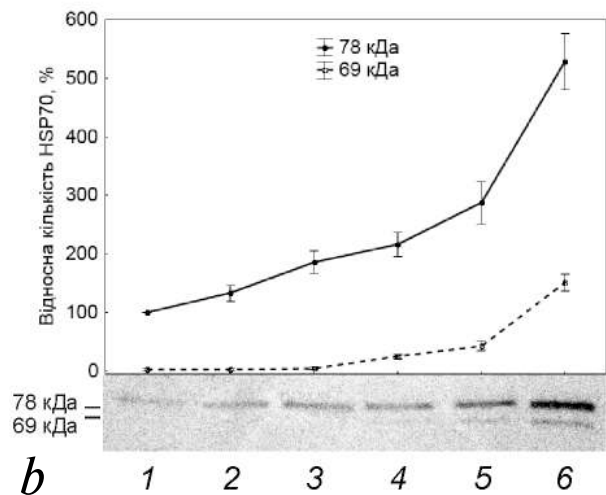
ленням синтезу конститутивного HSP70 у верхніх листках. Подальше підсихання ґрунту нижче ~25 % призводило до відмирання нижніх листків, збільшення накопичення конститутивного HSP70 та ініціації синтезу індукцйного білка у верхніх листках.

Наводимо результати порівняльного аналізу діапазону толерантності та динаміки синтезу шаперонів HSP70 у *M. sylvestris* і *M. pulchella*, різних за ареалами зростання, морфологічними, онтогенетичними й адаптивними особливостями (Rakhmetov, 2000). Ювенільні рослини представників роду *Malva* за впливу високої температури, нестачі або надлишку води виживають шляхом збереження верхівкової точки росту стебла і верхніх листків за рахунок індукції старіння та відмирання нижніх листків. Визначення змін частки живих листків у *M. sylvestris* і *M. pulchella* протягом теплової експозиції, затоплення та посухи показало близькість видів за рівнем стійкості. Однак певну перевагу щодо теплостійкості відзначали в *M. sylvestris*, стійкості до затоплення — в *M. pulchella*.

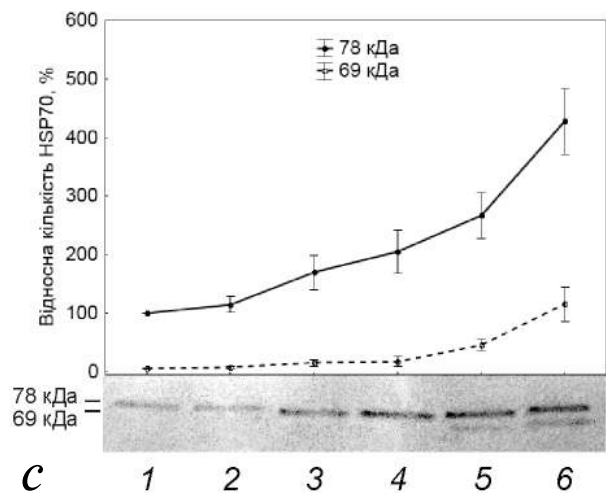
Зміни фізіологічного стану рослин доволі чітко пов'язані з особливостями конститутивного й індукцйного синтезу білків родини HSP70. Вважається, що рівень резистентності залежить як від числа копій генів HSP у геномі (Evgen'ev et al., 2007; Garbuz et al., 2011), так і від таких особливостей їхньої експресії, як базовий рівень, поріг індукції та динаміка синтезу (Shatilina et al., 2011; Vedulina et al., 2013). За нашими результатами, у



a



b



c

M. sylvestris і *M. pulchella* виявлено дві молекулярні форми HSP70, які реагували з антитілами до консервативної ділянки цитозольних HSP70 і мали однакову молекулярну масу. Однаковий профіль цитозольних HSP70 свідчить про високу гомологічність і консервативність цих шаперонів у двох досліджуваних видів роду *Malva*. Близьким виявився і вміст конститутивної ізоформи в листках цих видів за нормальних умов. За даними літератури, в різних таксонів базовий рівень HSP70 корелює з теплостійкістю організмів (Dutton, Hofmann, 2009; Shatilina et al., 2011; Gamburg et al., 2014). Враховуючи подібний характер фізіологічних змін у двох досліджених видів мальви, можна розглядати конститутивний синтез HSP70 як індикатор базової резистентності організму до різних стресових чинників. Це може означати, що конститутивні HSP70 не тільки відповідають за фолдинг білків за оптимальних умов (Margulis, Guzova, 2000), а й забезпечують захист білкового компонента клітин за помірних флуктуацій факторів довкілля.

Динаміка синтезу HSP70 в обох видів мала подібний за впливу кожного чинника характер. За високої температури поріг індукції для індукцйбельного HSP70 як у *M. sylvestris*, так і в *M. pulchella* становив 1 год за +37 °C, і вже через 2 год вміст цього білка наближався до рівня конститутивного, подальше накопичення обох білків досягало максимального значення в разі доз, близьких до летальних. Проте такий характер синтезу HSP70 у представників *Malvaceae* кардинально відрізняється від загальних уявлень про обмеженість індукції HSP першими годинами дії чинника (Margulis, Guzova, 2000; Schumann, 2001; Kosakivska, 2003), що, зокрема, показано для модельного виду *Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh. (*Brassicaceae*) з невисокою теплостійкістю (Klueva, Samohvalov, 1990; Sung et al., 2001).

Наші результати можуть свідчити, що теплостійкість представників *Malva* забезпечується потужним захистом білкового компонента від теплової денатурації у верхніх листках і водночас різким прискоренням старіння нижніх листків. Обговорюючи різницю між видами, слід підкреслити, що теплостійкіша *M. sylvestris* відрізнялася потужнішою індукцією синтезу HSP70 протягом першої доби теплової експозиції, що має сильніше проти-діяти порушенню структури білків. Проте вищий рівень HSP70 у менш стійкої *M. pulchella* на 48-му год, на нашу думку, може пояснюватися гіршим

станом рослин цього виду наприкінці дослідженого періоду, порівняно з *M. sylvestris*, імовірно, внаслідок меншої ефективності інших захисних механізмів.

Затоплення ґрунту, як відомо, призводить до різкого падіння вмісту кисню в оточенні коренів (Jackson, 2006). Прискорене старіння та загибель ювенільних рослин *Malva* в разі затоплення, очевидно, обумовлене відсутністю генетично детермінованих механізмів специфічної адаптації до тривалої кореневої гіпоксії. Проте індукція синтезу HSP70 у листках є індикатором короткочасної системної стрес-реакції. Її визначення протягом перших 30 хв свідчить про високу чутливість рослин до надмірної вологості ґрунту. Нетривалий синтез індукцйбельної ізоформи в перші години та повторна активація синтезу індукцйбельної та конститутивної ізоформ упродовж другої–третьої діб можуть зумовлюватися збільшенням вмісту нефункціональних поліпептидів унаслідок зниження рН цитоплазми, генерації активних форм кисню, катаболічних процесів, які відбуваються за анаеробних умов (Roberts et al., 1982; Jackson, Ricard, 2003; Jackson, 2006; Ye et al., 2015). Вплив кореневої гіпоксії на метаболізм стеблової частини рослини описаний у низці робіт (Jackson, Ricard, 2003; Jackson, 2006). Порівнюючи результати аналізу видів родини *Malvaceae* під час затоплення з видами інших родин, відзначимо таке. У нестійкого до перезволоження *A. thaliana* (*Brassicaceae*) подібна нетривала індукція синтезу HSP70 упродовж перших годин визначалася на рівні транскрипції (Banti et al., 2008) і трансляції (за нашими неопублікованими даними), триваліший вплив цього чинника призводив до деградації HSP70 і загибелі рослин. Навпаки, у високопластичного повітряно-водного виду *Sium latifolium* L. (*Apiaceae*) пристосування наземних рослин до затоплення виражалася у посиленні синтезу HSP70 в листках протягом усього періоду фізіолого-морфологічної адаптації (Kozeko, Ovcharenko, 2015).

За нашими результатами, види роду *Malva* посідають проміжне місце між *A. thaliana* і *S. latifolium* як за тривалістю виживання внаслідок затоплення, так і за рівнем індукції HSP70. Різниця між *M. sylvestris* і *M. pulchella* стосувалася лаг-періоду, інтенсивності та тривалості синтезу індукцйбельного HSP70 та рівня конститутивного білка. Так, швидка, потужна, але нетривала індукція спостерігалася в *M. sylvestris*. Разом із нижчим вмістом

конститутивного білка це відповідало меншій стійкості виду до затоплення. Слід зазначити, що кореляція між високою чутливістю до несприятливого фактора та коротким лаг-періодом і нетривалою індукцією HSP70 раніше визначалась у тваринних об'єктів — амфіпод (Shatilina et al., 2011).

В експерименті з поступовим підсиханням ґрунту доза стресового чинника зростала не тільки з часом (як у попередніх двох експериментах), а й за рахунок посилення водного дефіциту, який може призводити до втрати білками нативної структури й агрегації (Bray, 2002). За результатами експерименту близькі щодо рівня посухостійкості види роду *Malva* показали схожу динаміку синтезу HSP70. Старіння та відмирання нижніх листків з посиленням водного дефіциту супроводжувалося поступовою активацією синтезу конститутивного й індукційного HSP70 у верхніх листках. Прикметно, що протягом усього періоду конститутивна ізоформа за вмістом переважала. Подібне значне накопичення як конститутивного, так і індукційного HSP70 під час тривалої посухи фіксували і в інших високопластичних видів (Ye et al., 2015).

Таким чином, *M. sylvestris* 'Красавка' і *M. pulchella* 'Сильва' характеризуються однаковим складом і близьким базовим рівнем цитозольних HSP70, а також подібною, специфічною для кожного типу стресора динамікою їхнього синтезу. Перебіг кількісних змін цих білків взаємопов'язаний зі змінами фізіологічного стану рослин. Отримані дані підтверджують, що захист білкового компонента клітини на початку дії стресового чинника відбувається за рахунок функціонування конститутивного HSP70, тоді як збільшення дози стресора через певний лаг-період запускає синтез індукційної ізоформи. Значній тепло- і посухостійкості видів роду *Malva* відповідає здатність до активного синтезу обох молекулярних форм білка у відповідь на вплив високої температури та посухи з посиленням, якщо доза стресора наближається до летального рівня. На противагу цьому реакцією на затоплення кореневої системи протягом першої доби була нетривала активація синтезу індукційного HSP70 у листках разом зі зменшенням вмісту конститутивного білка, що асоціюється з нездатністю представників роду *Malva* до постійного існування за таких умов. Видові особливості динаміки синтезу HSP70 стосувалися кількісних і часових показників. Як правило, стійкіші до певного чинника рослини характеризувалися трива-

лішим й інтенсивнішим синтезом індукційного та вищим вмістом конститутивного білка. Видові особливості генної експресії HSP70 можуть обумовлюватися варіаціями в регуляторних і кодуючих ділянках генів (Sørensen et al., 2003), а також відмінностями в інших адаптивних механізмах. Загалом отримані дані, з одного боку, ілюструють загальні уявлення про індукцію HSP як частину неспецифічної стресової реакції (Lichtenthaler, 1998; Kosakivska, 2003; Sørensen et al., 2003; Kolupaev, Karpets, 2010), а з другого — показують специфічні як для стресових чинників, так і для видів з різною резистентністю особливості динаміки синтезу HSP70.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 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, **31**: 1029–1037. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01816.x
- Bedulina D.S., Evgen'ev M.B., Timofeyev M.A., Protopopova M.V., Garbuz D.G., Pavlichenko V.V., Luckenbach T., Shatilina Z.M., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Sokolova I.M., Zatsepina O.G. Expression patterns and organization of the *hsp70* genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal, *Mol. Ecol.*, 2013, **22**: 1416–1430. doi:10.1111/mec.12136
- Bray E.A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data, *Ann. Bot.*, 2002, **89**: 803–811. doi:10.1093/aob/mcf104
- Olyanitskaya L.G. *Malva*. In: *Opredelitel vysshikh rasteniy Ukrainy*, Kyiv: Phytosotsiocentre, 1999, pp. 141–142. [Оляницькая Л.Г. *Malva* // *Опеделитель высших растений Украины*. 2 изд. — Киев: Фитосоцицентр, 1999. — С. 141–142].
- Dutton J.M., Hofmann G.E. Biogeographic variation in *Mytilus galloprovincialis* heat shock gene expression across the eastern Pacific range, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2009, **376**: 37–42. doi:10.1016/j.jembe.2009.06.001
- Evgen'ev M.B., Garbuz D.G., Shilova V.Y., Zatsepina O.G. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals, *J. Biosci.*, 2007, **32**: 489–499.
- Gamburg K.Z., Korotaeva N.E., Baduev B.K., Borovsky G.B., Voinikov V.K. *Russian J. Plant Physiol.*, 2014, **61**(3): 318–323. [Гамбург К.З., Коротаева Н.Е., Бадюев Б.К., Боровский Г.Б., Войников В.К. Взаимосвязь различий в устойчивости к заморозкам арабидопсиса и теллунгеллы с содержанием белков теплового шока и дегидринов // *Физиол. раст.* — 2014. — **61**(3). — С. 318–323].
- Garbuz D.G., Yushenova I.A., Zatsepina O.G., Przhiboro A.A., Bettencourt B.R., Evgen'ev M.B. Organization and evolution of *hsp70* clusters strikingly

- differ in two species of stratiomyidae (*Diptera*) inhabiting thermally contrasting environments, *BMC Evol. Biol.*, 2011, **11**(74): 17 pp. doi: 10.1186/1471-2148-11-74, available at: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-11-74> (accessed 23 December 2015).
- Jackson M.B. Plant survival in wet environments: resilience and escape mediated by shoot systems. In: *Wetlands: functioning, biodiversity conservation, and restoration*. Eds R. Bobbink et al., Berlin; Heidelberg: Springer, 2006, pp. 15–36.
- Jackson M.B., Ricard B. Physiology, biochemistry and molecular biology of plant root systems subjected to flooding of the soil. In: *Root ecology*. Eds de Kroon H., Visser E.J.W., Berlin; Heidelberg: Springer, 2003, pp. 193–213.
- Klueva N.Yu., Samohvalov I.M. *Russian J. Plant Physiol.*, 1990, **37**(4): 739–747. [Клюева Н.Ю., Самохвалов И.М. Синтез белков теплового шока в листьях *Arabidopsis thaliana* // *Физиол. раст.* — 1990. — **37**(4). — С. 739–747].
- Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V. *Formation of adaptive reactions of plants on the action of abiotic stress factors*. Kyiv: Osnova, 2010, 350 pp. [Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. *Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров*. — Киев: Основа, 2010. — 350 с.].
- Kordyum E.L., Sytnik K.M., Baranenko V.V., Belivskaia N.A., Klimchuk D.A., Nedukha E.M. *Cell mechanisms of plant adaptation to unfavorable influence of ecological factors in field conditions*, Kyiv: Naukova Dumka, 2003, 277 pp. [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* / Под ред. Е.Л. Кордюм. — Киев: Наук. думка, 2003. — 277 с.].
- Kosakivska I.V. *Physiological and biochemical mechanisms of plant adaptation to stresses*, Kyiv: Stall, 2003, 191 pp. [Косаківська І.В. *Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів*. — К.: Сталь, 2003. — 191 с.].
- Kozeiko L.Ye. *Cell Tissue Biol.*, 2014, **8**(5): 416–422. doi: 10.1134/S1990519X14050046 [Козеико Л.Е. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином // *Цитология*. — 2014. — **56**(6). — С. 419–426].
- Kozeiko L.Ye., Artemenko O.A., Zaslavsky V.A., Didukh A.Ya., Rakhmetov D.B., Martynyuk G.M., Didukh Ya.P., Kordyum Ye.L. *Ukr. Bot. J.*, 2011, **68**(6): 890–900. [Козеико Л.Е., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух Г.Я., Рахметов Д.Б., Мартинюк Г.М., Дідух Я.П., Кордюм Є.Л. Оцінка стану рослин при несприятливих змінах екологічних факторів з використанням білка теплового шоку 70 кДа (Hsp70) // *Укр. ботан. журн.* — 2011. — **68**(6). — С. 890–900].
- Kozeiko L.Ye., Ovcharenko Yu.V. *Ukr. Bot. J.*, 2015, **72**(2): 172–179. <http://dx.doi.org/10.15407/ukrbotj72.02.172> [Козеико Л.Е., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (*Apiaceae*) до затоплення кореневої системи // *Укр. ботан. журн.* — 2015. — **72**(2). — С. 172–179].
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**(5259): 680–685.
- Lichtenthaler H.K. The stress concept in plants: an introduction. In: *Stress of life from molecules to man*, Ed. P. Csermely, Ann. NY Acad. Sci., 1998, 851, pp. 187–198.
- Margulis V.A., Guzhova I.V. *Tsitologia*, 2000, **42**(4): 323–342. [Маргуліс В.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке // *Цитология*. — 2000. — **42**(4). — С. 323–342].
- Odum E. *Ecology*, Moscow: Mir, 1986, vol. 1, 328 pp. [Одум Ю. *Экология*. — М.: Мир, 1986. — Т. 1. — 328 с.].
- Olyanitskaya L.G., Tsvelev N.N. *Malva*. In: *Flora Vostochnoi Evropy (Flora Europae Orientalis)*. Ed. N.N. Tsvelev, St. Petersburg: Mir i Semiya, 1996, vol. 9, pp. 239–246. [Оляницкая Л.Г., Цвелев Н.Н. *Malva* // *Флора Восточной Европы* / Ред. Н.Н. Цвелев. — СПб.: Мир и семья, 1996. — Т. 9. — С. 239–246].
- Rakhmetov D.B. *Kormovye mal'vy v agrofитocenozah lesostepi Ukrainy: introdukcija, biologija, sorta, vzdelyvanie*, Kyiv: Phytosociocentre, 2000, 288 pp. [Рахметов Д.Б. *Кормовые мальвы в агрофитоценозах Лесостепи Украины: интродукция, биология, сорта, возделывание*. — Киев: Фитосоцицентр, 2000. — 288 с.].
- Roberts J.K.M., Wemmer D., Ray P.M., Jardetsky O. Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH in maize root tips under different experimental conditions, *Plant Physiol.*, 1982, **69**: 1344–1347. doi:10.1104/pp.69.6.1344
- Schumann W. Heat shock response, *eLS*, 2001: 7 pp. doi: 10.1038/npg.els.0000395, available at: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0000395> (accessed 23 December 2015).
- Shatilina Z.M., Riss H.W., Protopopova M.V., Trippe M., Meyer E.I., Pavlichenko V.V., Bedulina D.S., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) for the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats, *J. Therm. Biol.*, 2011, **36**: 142–149. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.008
- Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins, *Ecol. Lett.*, 2003, **6**: 1025–1037. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x
- Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family, *Plant Physiol.*, 2001, **126**: 789–800. doi:10.1104/pp.126.2.789
- Wang X.Q., Yang P.F., Liu Z., Liu W.Z., Hu Y., Chen H., Kuang T.Y., Pei Z.M., Shen H.S., He Y.K. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy, *Plant Physiol.*, 2009, **149**: 1739–1750. doi:10.1104/pp.108.131714
- Wong C.E., Li Y., Whitty B.R., Diaz-Camino C., Akhter S.R., Brandle J.E., Golding G.B., Weretilnyk E.A., Moffatt B.A., Griffith M. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella*

reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap, *Plant Mol. Biol.*, 2005, **58**: 561–574. doi: 10.1007/s11103-005-6163-6

Ye T., Shi H., Wang Y., Chan Z. Contrasting changes caused by drought and submergence stresses in bermudagrass (*Cynodon dactylon*), *Front. Plant Sci.*, 2015, **6**(951): 14 pp. doi: 10.3389/fpls.2015.00951, available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00951> (accessed 23 December 2015).

Yung T.E., Ling J., Geisler-Lee C.J., Tanguay R.L., Caldwell C., Gallie D.R. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101, *Plant Physiol.*, 2001, **127**: 777–791. doi:10.1104/pp.010160

Рекомендує до друку Надійшла 07.12.2015 р.
О.К. Золотарьова

Козеко Л.Є.¹, Рахметов Д.Б.² **Особливості динаміки синтезу білків теплового шоку HSP70 у *Malva sylvestris* і *M. pulchella* (Malvaceae) і стійкість до високої температури, затоплення та посухи.** — Укр. ботан. журн. — 2016. — 73(2): 194–203.

¹ Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01004, Україна

² Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України вул. Тимирязевська, 1, м. Київ, 01014, Україна

Проведено порівняльний аналіз діапазону толерантності та характеру змін щодо рівня білків теплового шоку HSP70 у *Malva sylvestris* L. 'Красавка' і *M. pulchella* Bernh. 'Сильва' за впливу високої температури, ґрунтового затоплення та посухи. Показано, що ювенільні рослини цих видів виявилися близькими за діапазоном толерантності, причому *M. sylvestris* була стійкішою до високої температури та чутливішою до затоплення порівняно з *M. pulchella*. За результатами Вестерт-блот-аналізу вони характеризувались однаковим складом і близьким базовим рівнем цитозольних HSP70, подібною специфічною для кожного стресора динамікою їхнього синтезу. Високій тепло- і посухостійкості цих видів відповідала їхня здатність до тривалого інтенсивного синтезу конститутивного й індукційного білків із посиленням у разі наближення дози стресора до летального рівня. Стрес-реакція на затоплення мстила швидко, проте нетривалу активацію синтезу індукційного HSP70 і зниження вмісту конститутивного білка за перші години. Це може слугувати захистом від короткочасного перезволоження ґрунту й асоціюється з нездатністю видів до тривалого існування за таких умов. Виявлені видові особливості стосувалися кількісних і часових показників синтезу HSP70. Отримані дані свідчать, що до молекулярних основ високої стійкості рослин можна віднести здатність до тривалого й інтенсивного синтезу як індукційних, так і конститутивних HSP70 за довгочасного впливу несприятливого чинника.

Ключові слова: *Malva sylvestris*, *M. pulchella*, діапазон стійкості, стрес-реакція, білки теплового шоку 70.

Козеко Л.Е.¹, Рахметов Д.Б.² **Особенности динамики синтеза белков теплового шока HSP70 у *Malva sylvestris* и *M. pulchella* (Malvaceae) и устойчивость к высокой температуре, затоплению и засухе.** — Укр. ботан. журн. — 2016. — 73(2): 194–203.

¹ Інститут ботаніки імені Н.Г. Холодного НАН України ул. Терещенковская, 2, г. Киев, 01004, Украина

² Национальный ботанический сад имени Н.Н. Гришко НАН Украины ул. Тимирязевская, 1, г. Киев, 01014, Украина

Проведен сравнительный анализ диапазона толерантности и характера изменений в уровне белков теплового шока HSP70 у *Malva sylvestris* L. 'Красавка' и *M. pulchella* Bernh. 'Сильва' при воздействии высокой температуры, почвенного затопления и засухи. Показано, что ювенильные растения исследуемых видов близки по диапазону толерантности, при этом *M. sylvestris* более устойчива к высокой температуре и более чувствительна к затоплению по сравнению с *M. pulchella*. По результатам Вестерт-блот-анализа они характеризовались одинаковым составом и близким базовым уровнем цитозольных HSP70, схожей специфичной для каждого стрессора динамикой их синтеза. Высокой тепло- и засухоустойчивости данных видов соответствовала их способность к продолжительному и интенсивному синтезу конститутивного и индукционного белков с усилением в случае приближения дозы стрессора к летальным значениям. Стресс-реакция на затопление включала быструю, однако непродолжительную активацию синтеза индукционного HSP70 и снижение содержания конститутивного белка в первые часы. Это может служить для защиты от непродолжительного переувлажнения почвы и ассоциируется с неспособностью видов к длительному существованию в таких условиях. Выявленные видовые особенности касались количественных и временных характеристик синтеза HSP70. Полученные данные свидетельствуют, что к молекулярным основам высокой устойчивости растений можно отнести способность к продолжительному и интенсивному синтезу как индукционных, так и конститутивных HSP70 при длительном действии неблагоприятного фактора.

Ключевые слова: *Malva sylvestris*, *M. pulchella*, диапазон стойкости, стресс-реакция, белки теплового шока 70.