

**Є.Л. Кордюм¹, Я.П. Дідух¹, Л.Є. Козеко¹,
О.А. Артеменко¹, В.А. Заславський¹, А.Я. Дідух²**

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ

² Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ «Інститут біології» КНУ ім. Тараса Шевченка, Київ

РОЗРОБКА ТА ПІДГОТОВКА ДО ВПРОВАДЖЕННЯ МЕТОДУ ОЦІНКИ СТАНУ РОСЛИН У НЕСПРИЯТЛИВИХ ПРИРОДНИХ УМОВАХ



Відпрацьовано метод оцінки стану рослин, які ростуть в несприятливих природних умовах. Доведено, що рівень білка теплового шоку Hsp70 в органах рослин (зокрема, в листках) може бути інтегральним показником стану та діапазону стійкості рослин під дією несприятливих екологічних факторів. Підготовлено методичні рекомендації щодо використання білків теплового шоку Hsp70 для моніторингу рослин природних угруповань, інтродукованих рослин та сільськогосподарських культур.

Ключові слова: білок теплового шоку 70 кДа, біомаркер, стрес, рослина, моніторинг.

Нині з огляду на глобальні зміни клімату та антропогенний пресинг першочерговою є проблема збереження довкілля. Із завданнями збереження та відновлення біорізноманіття безпосередньо пов'язані питання адаптаційного потенціалу рослин природних угруповань та пізнання механізмів їх пристосування до несприятливих змін зовнішнього середовища, яких вони не можуть уникнути внаслідок нерухомого способу життя. Результати фундаментальних досліджень пластичності рослин є основою для проведення оцінки та прогнозування стану рослинних угруповань. Одним з пріоритетних способів такої оцінки є використання біомаркерів стресового стану рослин, які в природних умовах можуть відчувати вплив комплексу несприятливих факторів.

Результати аналізу ряду стресових білків, проведеного в рамках наших досліджень ста-

більності та пластичності розвитку рослин при змінах водного режиму в природних умовах [1, 2], дали підставу розглядати білок теплового шоку 70 кДа (Heat Shock Protein 70 kDa, Hsp70) як біомаркер стресового стану рослин. Раніше подібні положення висловлювалися для тваринних об'єктів в рамках робіт з токсикології та моніторингу забруднення середовища важкими металами, пестицидами та іншими шкідливими сполуками [3–6]. Білок Hsp70 розглядався також як біомаркер стресу водних рослин *Fucus serratus* і *Lemna minor* [7].

Синтез білків теплового шоку, які функціонують як молекулярні шаперони, є одним з найбільш універсальних механізмів захисту клітини від ушкоджень при дії стресорів різної природи практично в усіх організмах [8, 9]. Сигналом для індукції синтезу цих білків є поява в клітині під впливом несприятливих факторів значної кількості поліпептидів в ненативній конформації, а функціонування шаперонів при цьому спрямоване на запобігання

агрегації та рефолдинг цих поліпептидів [10]. Родина білків Hsp70 займає центральне місце у роботі шаперонної системи клітини. Індукція синтезу цих білків у рослин показана при дії несприятливих факторів: температурного, водного, осмотичного, сольового стресів, поранення, високої інтенсивності світла, дії важких металів і патогенів [7, 9, 11–13]. У зелених водоростей білок Hsp70В, локалізований у хлоропластах, вважається раннім маркером окислювального стресу [14]. Таким чином, використання білків Hsp70 як біомаркерів стресового стану стає можливим завдяки їх участі в стресовій реакції на дію багатьох зовнішніх факторів різної природи в організмах різного рівня організації.

Важливим методичним аспектом щодо використання білків Hsp70 як біомаркерів є високий ступінь подібності їх амінокислотних послідовностей у різних організмів [9], що дає можливість використовувати антитіла, специфічні до висококонсервативної ділянки білка, для тестування представників різних таксонів.

На базі вищесказаного нами запропонований метод з використанням білків Hsp70 для оцінки стану рослин в несприятливих природних умовах. Для підтвердження ефективності такого методу необхідно показати, що:

1) рівень Hsp70 в листках рослин може бути індикатором стресового стану рослин при дії несприятливих чинників різної природи;

2) для тестування рослин різних видів і родин можливе використання вищезазначених антитіл.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єкти тестування

Для відпрацювання методу були обрані види покритонасінних рослин, різні за своєю екологією, зокрема за вимогами до умов водозабезпечення: наземні — *Salix purpurea* L. (*Salicaceae*), *Malva pulchella* Bernh., сорт Сильва і *Malva sylvestris* L., сорт Красавка (*Malvaceae*) та *Epipremnum aureum* Linden & André (*Araaceae*); повітряно-водні — *Sium latifolium* L. (*Api-*

aceae) та *Hydrocotyle verticillata* Thunb. (*Apiaceae*), які здатні рости як у прибережній водній зоні, так і на суші; справжні водні — плаваюча у воді *Pistia stratiotes* L. (*Araaceae*), яка може адаптуватися до росту на суходолі; прикріплені до ґрунту — *Trapa natans* L. (*Trapaceae*) з плаваючою на поверхні води листовою розеткою і *Vallisneria spiralis* L. (*Hydrocharitaceae*) із зануреними у воду листками. Для двох останніх видів існування поза водою неможливе.

Для аналізу використовували листки з рослин, які зазнавали впливу водного дефіциту, затоплення і теплового стресу в природних умовах або в штучно створених. Так, рослини *S. purpurea* зростали за умов помірної та високої вологості ґрунту при температурі повітря 17 °С. Рослини *M. pulchella* і *M. sylvestris* знаходились в умовах тривалої посухи при середній денній температурі повітря 41 °С і в умовах помірної вологості при температурі повітря 17 °С. Рослини *E. aureum* спеціально піддавались впливу водного дефіциту, підвищеної вологості ґрунту, затоплення кореневої системи, а також дії теплового стресу.

Для тестування *S. latifolium* використовували рослини прибережної водної смуги і суходолу; відбір зразків проводили при температурі повітря 24 °С після дощів, а також при температурі 41 °С і відсутності атмосферних осадків протягом тривалого часу.

Для тестування *H. verticillata* використовували рослини, які росли у воді при температурі води 21 °С під час відбору зразків, на суші при температурі повітря 20 °С, та водні рослини за умов теплового стресу.

Листки *P. stratiotes* відбирали з водних рослин при температурі води 21 °С та суходільних рослин при температурі повітря 20 °С. Листки *T. natans* збирали з рослин природної водойми при температурі води 23 °С, а також з рослин, витриманих у шарі води 2 см при температурі води 30 ± 2 °С протягом двох тижнів або за умов впливу водного стресу і підвищеної температури (35 ± 3 °С) протягом двох діб. Листки *V. spiralis* збирали з рослин, які росли у

водоймі при температурі води 21 °С, та після підсушування рослин протягом однієї та трьох годин або теплового стресу. Для створення теплового стресу витримували рослини при 40 °С протягом двох годин.

Методи досліджень

Аналіз Hsp70 проводили з використанням методу вестерн-блотингу.

Методика екстракції сумарних розчинних білків, їх електрофоретичного розподілу, переносу на нітроцелюлозну мембрану викладена в [15]. Імунодетекцію Hsp70 проводили за протоколом (<http://zbio.net/protocol/#a17-08.html>), використовуючи як первинні антитіла моноклональні мишачі антитіла (N H5147, Sigma), специфічні до різних ізоформ Hsp70 широкого кола організмів, включаючи рослини. Як вторинні антитіла використовували кролячі антитіла, специфічні до мишачих IgG, кон'юговані з біотинном, які візуалізували за допомогою екстравидин-пероксидазної системи.

Контроль за рівністю кількості сумарного білка, використовуюваного в аналізі зразків кожного виду рослин, здійснювали за інтенсивністю забарвлення білкових треків Кумасі у гелі та Понсо С на мембрані. Аналіз кількості Hsp70 проводили шляхом комп'ютерної обробки дигітальних зображень імуноблотів за допомогою програми ImageMaster Total.Lab version 2.00 (Amersham). Аналіз зразків кожного варіанта проводили щонайменше у трьохкратній повторюваності. Паралельно з відбором зразків листків проводили визначення вмісту води в листках і ґрунті, на якому росли рослини, за стандартними методиками.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати аналізу підтвердили можливість використання антитіл, реактивних до консервативної послідовності білків Hsp70, для тестування представників різних родин рослин. Оскільки використані нами первинні антитіла можуть зв'язуватися з різними ізоформами Hsp70, то білкова зона, виявлена на мембрані

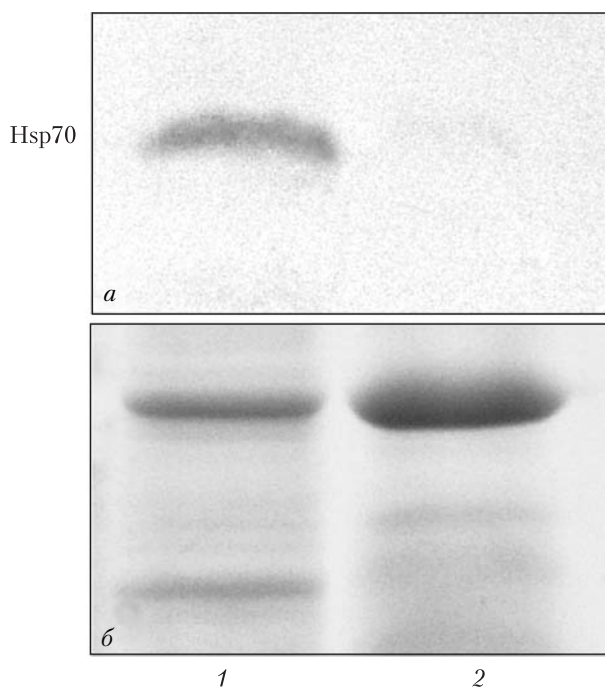


Рис. 1. Вестерн-блоти Hsp70 (а) і фрагмент електрофореграм сумарного білка як контроль завантаження білка на гелі (б) листків *Salix purpurea*: 1 – на перезволоженому ґрунті (за умов поливу); 2 – без поливу за умов природного зволоження ґрунту при температурі повітря 17 °С

в результаті імунодетекції, очевидно, може містити як одну, так і декілька ізоформ, подібних за молекулярною масою. Але оскільки в цьому дослідженні важливим є факт індукції білків Hsp70 за несприятливих умов і завдання визначення особливостей синтезу окремих ізоформ не стояло, далі для зручності білкові зони на імуноблотах ми будемо узагальнено називати «білком Hsp70». Метод вестерн-блотингу є напівкількісним, але достатнім для визначення саме суттєвих змін в рівні білка, залишаючи за межами аналізу тонкі його варіації, що відповідає поставленому завданню індикації стану рослин за умов значних змін факторів довкілля.

Дев'ять видів з шести родин покритонасінних рослин було нами протестовано при різних змінах екологічних факторів за допомогою білка Hsp70. У семи видів виявлено наявність Hsp70 у значній кількості за умов дії

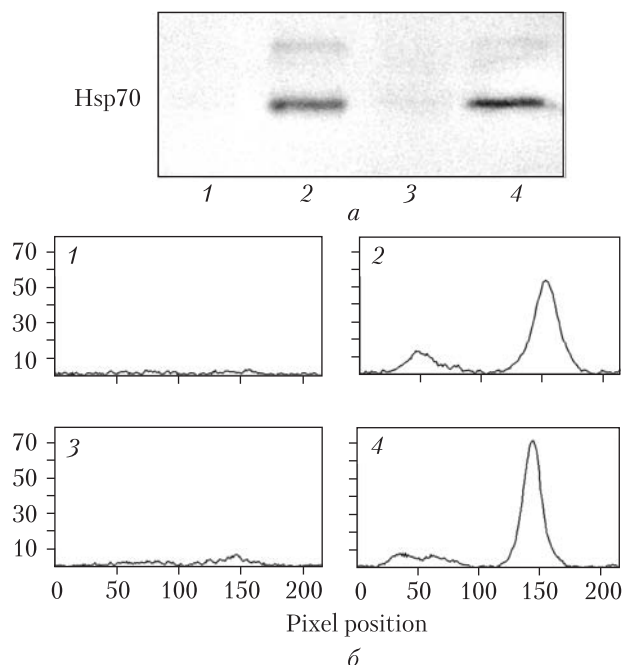


Рис. 2. Вестерн-блот-аналіз Hsp70 листків *Malva pulchella*, сорт Сильва (1, 2) і *Malva sylvestris*, сорт Красавка (3, 4): а – вестерн-блоти Hsp70, б – їхні денситометричні сканограми; 1, 3 – за умов помірного зволоження ґрунту при температурі повітря 17 °С; 2, 4 – в посушливий період при температурі повітря 41 °С

несприятливих факторів і відсутність або присутність у малій кількості за умов, близьких до оптимальних, специфічних для кожного виду. Так, в листках *S. purpurea* цей білок виявлявся у великій кількості при вмісті води в ґрунті близько 64 % відносно сухої маси і в малій кількості – при вмісті води близько 28 % (рис. 1). За екологічною характеристикою для цього виду сприятливими є рихлі аеровані ґрунти, тоді як надмірне зволоження пригнічує ріст. У обох видів мальви білок Hsp70 активно синтезувався при високій температурі повітря за посушливих умов і не визначався при помірних вологості та температурі (вміст води в ґрунті близько 5 і 30 % від сухої маси, відповідно) (рис. 2).

Результати аналізу *E. aureum* дали можливість розташувати варіанти дослідів за кількістю Hsp70 в листках від мінімальної до максимальної у такому порядку: вміст води в ґрунті

близько 18 % по відношенню до сухої маси < надмірна зволоженість ґрунту – близько 88 % < витримування кореневої системи рослини у воді протягом місяця (коренева гіпоксія, нестача поживних речовин) < тепловий стрес. Надмірна зволоженість ґрунту так само, як і витримування коренів у воді, створює для кореневої системи надземних видів гіпоксичні умови, адаптація до яких, як відомо, потребує функціонування шаперонів [16]. Навпаки, аналіз білка Hsp70 в листках повітряно-водної рослини *H. verticillata* (рис. 3) та водної плаваючої рослини *P. stratiotes* показав, що у рослин, які зростали у воді, Hsp70 не виявлявся, тоді як адаптація суходольної рослини потребувала синтезу цього стресового білка. В іншій повітряно-водній рослині *S. latifolium* Hsp70 синтезувався як у водних, так і у суходольних формах, що вказує на участь цього білка в забезпеченні широкої пластичності виду. Підвищена температура призводила до посиленої індукції синтезу Hsp70 як в експериментальних (показано для *E. aureum* і *H. verticillata* (рис. 3) при тепловому стресі), так і в природних умовах під час подовжених спекотних умов влітку 2010 р. (показано для *M. pulchella*, *M. sylvestris* (рис. 2) і *S. latifolium*).

У природному середовищі рослини одночасно відчувають вплив комплексу факторів, в тому числі й негативних, причому для кожного організму цей комплекс є особливим. Одночасний вплив двох або більше стресових факторів, очевидно, може призводити до більш значних порушень у клітині, порівняно з дією одного з них, що повинно призводити до більш високого рівня індукції Hsp70. Так, аналіз цього білка у рослин *S. latifolium* за посушливих погодних умов показав більш високий рівень Hsp70 у всіх досліджених суходольних рослин, на які висока температура діяла в комплексі з тривалою посухою, порівняно з рослинами прибережної водної зони, які дефіциту води не відчували. Аналіз рослин *S. latifolium* з різних місць зростання на одній території показав значну варіабельність рівня Hsp70, що з одного боку, може бути результатом впливу

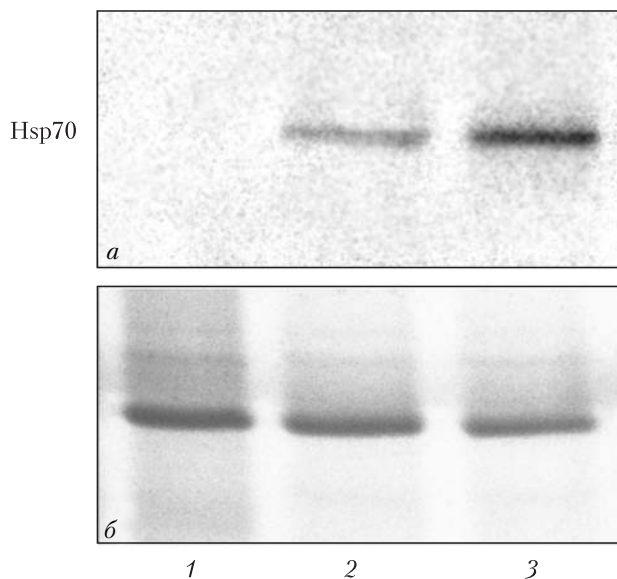


Рис. 3. Вестерн-блоти Hsp70 (а) і фрагмент електрофореграм сумарного білка як контроль завантаження білка на гель (б) листків *Hydrocotyle verticillata*: 1 – рослини, які росли у воді при температурі води 21 °С; 2 – рослини, які росли на суші при температурі повітря 20 °С; 3 – водні рослини, які зазнали теплового стресу (40 °С протягом 2 год)

локальних умов місця існування, а з іншого – відображати індивідуальну здатність особин до адаптації та синтезу цього білка. Як ілюстрація роботи запропонованого методу приводяться типові результати вестерн-блот-аналізу білка Hsp70 в листках *S. purpurea* (рис. 1), *H. verticillata* (рис. 3) та *M. pulchella* і *M. sylvestris* (рис. 2).

На відміну від цих видів з широким адаптаційним потенціалом при аналізі справжніх водних рослин *T. natans* і *V. spiralis* білка Hsp70 не було виявлено ні за нормальних умов, ні за умов водного і теплового стресів. Причини цього поки що не зрозумілі та потребують подальшого дослідження. Проте слід підкреслити, що обидва види не є стійкими до водного стресу, що може бути пов'язано, зокрема, з відсутністю чи дуже низьким рівнем (за межами чутливості методу) синтезу Hsp70. Хоча індукція синтезу цього стресового білка є одним з універсальних компонентів стрес-реакції та

основою стійкості до несприятливих змін довкілля, в окремих видах цей процес редукований або не детектується. Такий феномен відомий для ряду спеціалізованих і ендемічних видів тварин, які в процесі еволюції пристосувалися до певної екологічної ніші [6, 17, 18].

ВИСНОВКИ

Експериментально доведено, що рівень білка Hsp70 в органах рослин (зокрема, в листках) може бути інтегральним показником стану та діапазону стійкості рослин при дії комплексу несприятливих екологічних факторів. Відсутність індукції Hsp70 за стресових умов у певних видів може слугувати сигналом щодо обмеженої здатності цих видів пристосовуватись до змін довкілля і вузької спеціалізації до певної екологічної ніші, що може бути визначальним при обґрунтуванні необхідності їх охорони.

В результаті виконаного проекту був розроблений метод, призначений для оцінки стану рослин природних угруповань. Даний метод можна рекомендувати для лабораторного моніторингу стану навколишнього середовища суб'єктів довкілля. Метод також може бути застосований при тестуванні інтродукованих рослин і сільськогосподарських культур.

Автори статті щиро вдячні завідувачу відділу нових культур Національного ботанічного саду ім. М.Г. Гришка НАН України д-ру біолог. наук, Д.Б. Рахметову і куратору водної орнажерей Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка канд. біолог. наук Т.П. Мазур за надані для аналізу рослини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kozeko L. Hsp70 level in *Sium latifolium* leaves in different water environments // Abstr. book PISA conf. 2008 «Responses of plants to environmental stresses» (12–18 May 2008, Elena, Bulgaria). — P. 43.
2. Kozeko L., Ovcharenko Yu., Kordyum E. Alcohol dehydrogenase expression in aerial-aquatic plants in response to different water environment // Adv. Agricultural Sci. Problem, 2008. — 524. — P. 167–171.

3. Sanders B.M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective // Critical Reviews in Toxicology. — 1993. — **23**, № 1. — P. 49–75.
4. Werner I., Hinton D.E. Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is down regulation an indicator of stress? // Biomarkers. — 1999. — **4**, № 6. — P. 473–484.
5. Mukhopadhyay I., Nazir A., Saxena D.K., Chowdhuri K.D. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring // J. Biochem. Mol. Toxicology. — 2003. — **17**, № 5. — P. 249–254.
6. Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С. и др. Особенности применения белков теплового шока в качестве стресс-маркеров у водных организмов на примере байкальских эндемичных амфипод // Прикл. биохим. микробиол. — 2008. — **44**, № 3. — С. 343–346.
7. Ireland H.E., Harding S.J., Bonwick G.A., et al. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor* // Biomarkers. — 2004. — **9**, № 2. — P. 139–155.
8. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — **42**. — P. 579–620.
9. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. — 2000. — **42**, № 4. — С. 323–342.
10. Pelham H.R.B. Speculations on the function of major heat shock and glucose-regulated proteins // 1986. — **46**. — P. 959–961.
11. Guy C.L., Li Q.B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family // Plant Cell. — 1998. — **10**, № 4. — P. 539–556.
12. Nam M.H., Heo E.J., Kim J.Y., et al. Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data // Proteomics. — 2003. — **3**, № 12. — P. 2351–2367.
13. Zou J., Liu A., Chen X., et al. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment // J. Plant Physiol. — 2009. — **166**, № 8. — P. 851–861.
14. Юрина Н.П. Устойчивость к окислительному стрессу у зеленых водорослей: корреляция с содержанием HSP70B / шаперона хлоропластов // Растение и стресс: Тез. докл. Всероссийского симп. (Москва, Россия, 9–12 ноября 2010). — М., 2010. — С. 404.
15. Козеко Л.Е. Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации // Доповіді НАН України. — 2009. — № 1. — С. 140–143.
16. Banti V., Loreti E., Novi G., et al. Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis* // Plant, Cell and Environment. — 2008. — **31**. — P. 1029–1037.
17. Brennecke T., Gellner K., Bosch T.C.G. The lack of a stress response in *Hydra oligactis* is due to reduced hsp70 mRNA stability // Eur. J. Biochem. — 1998. — **255**, № 3. — P. 703–709.
18. Hofmann G.E., Buckley B.A., Airaksinen S., et al. Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family *Nototherniidae*) // J. Exp. Biol. — 2000. — **203**, № 15. — P. 2331–2339.

Є.Л. Кордюм, Я.П. Дідух, Л.Є. Козеко,
О.А. Артеменко, В.А. Заславський, А.Я. Дідух

РАЗРАБОТКА И ПОДГОТОВКА
К ВНЕДРЕНИЮ МЕТОДА ОЦЕНКИ
СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ
В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ
ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ

Отработан метод оценки состояния растений, растущих в неблагоприятных природных условиях. Показано, что уровень белка теплового шока Hsp70 в органах растений (в частности, в листьях) может служить интегральным показателем состояния и диапазона стойкости растений под действием неблагоприятных экологических факторов. Подготовлены методические рекомендации по использованию белка теплового шока Hsp70 для мониторинга растений природных сообществ, интродуцированных растений и сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: белок теплового шока 70 кДа, биомаркер, стресс, растение, мониторинг.

Ye.L. Kordyum, Ya.P. Didukh, L.Ye. Kozeko,
O.A. Artemenko, V.A. Zaslavsky, A.Ya. Didukh

DEVELOPMENT AND INTRODUCTION
OF THE TECHNIQUE FOR ASSESSMENT
OF PLANT CONDITION
IN ADVERSE ENVIRONMENT

The technique for estimation of plant condition in unfavorable environment using Western-blot-analysis of the heat shock protein 70 kDa (Hsp70) has been developed. It was shown that Hsp70 level in plant organs (particularly, leaves) can be an integral indicator of plant state and tolerance range under the influence of unfavorable ecological factors. Practical recommendations on Hsp70 use in monitoring of plant natural associations as well as introduced plants and agricultural crops, has been prepared.

Key words: 70 kDa heat shock protein, biomarker, stress, plant, monitoring.

Стаття надійшла до редакції 01.04.11