



І.В. КОСАКІВСЬКА<sup>1</sup>, В.А. НЕГРЕЦЬКИЙ<sup>1</sup>, В.М. ПУШКАРЬОВ<sup>2</sup>,  
О.А. КОНТУРСЬКА<sup>1</sup>, Д.Б. РАХМЕТОВ<sup>3</sup>, А.Ю. УСТИНОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України

вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 201601, Україна

<sup>2</sup> Інститут ендокринології та обміну речовин імені В.П. Комісаренка НАМН України

вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

<sup>3</sup> Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України

вул. Тимірязєвська, 1, м. Київ, 01014, Україна

## **ВПЛИВ КОРОТКОЧАСНИХ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ НА СИНТЕЗ БІЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКУ 70 КДА Й УТВОРЕННЯ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ В ПРОРОСТКАХ *AMARANTHUS CAUDATUS* L.**

*Ключові слова:* *Amaranthus caudatus*, білок теплового шоку, пероксид водню, температурний стрес, термостійкість

Однією з найважливіших умов функціонування рослинної клітини є адаптація до негативних зовнішніх впливів. Оптимальний ріст і розвиток рослин відбувається в певному температурному діапазоні, відхилення від якого спричинює негативні зміни у перебігу метаболічних процесів, зниження продуктивності. Особливе значення в захисті від стресу має протеом, зокрема білки теплового шоку (БТШ). За величиною молекулярної маси вирізняють п'ять родин БТШ: БТШ60, БТШ70, БТШ90, БТШ100 і нмБТШ (Kotak et al., 2007). Серед білків, що належать до родини БТШ70, є стрес-індуковані й конститутивні. Білки родини БТШ70 ідентифікуються як цитоплазматично-ядерні, мітохондріальні, хлоропластні і такі, що локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі (Timperio et al., 2008). Визначеними дотепер функціями білків родини БТШ70 є збереження структури нативних і запобігання агрегації ненативних білків, відновлення структури та функціональної активності денатуро-

ваних білків, видалення нефункціональних, потенційно небезпечних поліпептидів, участь у транслокації білків через мембрани мітохондрій, хлоропластів й ендоплазматичного ретикулуму (Косаківська, 2012). Оскільки білки родини БТШ70 синтезуються у відповідь на дію різноманітних абіотичних стресів, серед яких високі та низькі температури, посуха, хімічні й інші впливи (Cho, Hong, 2006), їх доволі часто розглядають як молекулярні маркери стресового стану (Ireland et al., 2004).

Під дією абіотичних та біотичних стресових факторів у рослинній клітині утворюються та накопичуються активні форми кисню (АФК), до яких належить і пероксид водню (Cui et al., 2005; Swindell, Weber, 2007). АФК відіграють важливу роль у забезпеченні сигналіngu у відповідь на дію стресів (Torres et al., 2007). Вони беруть участь у керуванні процесами росту, розвитку, формуванні захисних реакцій (Плотникова, 2009). Припускають, що в ході еволюції сформувався механізм контролю токсичності рослинних клітин, компонентом якого виступають АФК (Orvar et al., 2000). Встановлено, що навіть незначна зміна вмісту пероксиду водню призводить до експресії генів та посттрансляційної модифіка-

© І.В. КОСАКІВСЬКА, В.А. НЕГРЕЦЬКИЙ,  
В.М. ПУШКАРЬОВ, О.А. КОНТУРСЬКА,  
Д.Б. РАХМЕТОВ, А.Ю. УСТИНОВА, 2013

ції окремих білкових молекул (Neill, 2002). Критична ж концентрація  $H_2O_2$  активізує реакції окиснення ліпідів, білків та нуклеїнових кислот, негативно впливає на перебіг циклу Кальвіна (Noeep, 2009). В окремих роботах пропонується використовувати відомості про вміст пероксиду водню як маркер стресового стану рослин, для чого потрібно визначати кореляцію між динамікою і розмірами пероксидного пулу та показниками стресового стану, враховуючи вікові та фенологічні особливості рослин (Cheeseman, 2006).

Метою нашої роботи було дослідити вплив короткочасних температурних стресів на синтез БТШ70 і вміст пероксиду водню в 7-добових проростках *Amaranthus caudatus* L. і виявити можливий зв'язок між характером змін у накопиченні пероксиду водню як сигнальної стресової молекули, утворенням БТШ70 і термостійкістю виду.

### Матеріали та методи дослідження

Для вивчення впливу температурних стресів на синтез БТШ70 і накопичення пероксиду водню ми відібрали *Amaranthus caudatus* L. Відкаліброване насіння розміщували в чашках Петрі на фільтрувальному папері, зволоженому дистильованою водою. Перші дві доби насіння пророщували в термостаті за температури  $+22\text{ }^\circ\text{C}$  і постійної темряви. Відтак переносили на світло (фотоперіод: 15 год — світло, 9 год — темрява; освітлення 3500 люкс, відносна вологість — 65 %). Щодоби в чашки із проростками додавали по 1 мл дистильованої води. Для вивчення впливу короткочасних температурних стресів на синтез БТШ70 й утворення пероксиду водню 7-добові проростки впродовж двох годин піддавали впливу температури  $+40\text{ }^\circ\text{C}$  і  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Проростки зважували на електронних вагах OHAUS Adventurer (Китай) по 30 мг у трьох повторях і фіксували в камері для глибокого заморожування JOUAN VX100 (Чехія) за температури  $-82\text{ }^\circ\text{C}$ . Експресію БТШ70 визначали за допомогою специфічних моноклональних антитіл до БТШ70 (Sigma, США). Білки екстрагували за методом (Негрецький, Ковзун, 2004). Виділені білки переносили на нітроцелюлозну мембрану, яку промивали у буфері PBS-T, що містив 1,7 мМ фосфату калію однозаміщеного, 5,2 мМ фосфату натрію двозаміщеного, 150 мМ хлориду натрію, 0,1 % Tween-20, pH 7,4. Для уникнення неспецифічного зв'язування антитіл вільні від білків ділянки мембрани блокували у TBS-T буфері (50 ммоль/л Tris-HCl, 0,2 М NaCl, pH 7,5), який містив 5 %

знежиреного сухого молока, впродовж 24 год за температури  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Відтак тричі промиту в TBS-T буфері мембрану інкубували за кімнатної температури в розчині первинних антитіл до БТШ70 впродовж 24 год за температури  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Після відмивання від залишків первинних антитіл у PBS-T буфері мембрану інкубували зі вторинними антитілами ECL (Amersham Life Science, США), міченими пероксидазою хрому (Cell signaling technology, США), впродовж 1 год за кімнатної температури. Нітроцелюлозну мембрану відмивали п'ять разів у PBS-T буфері, інкубували із сумішшю ECL (0,06 мг/мл кумарової кислоти, 0,44 мг/мл люміналу, 0,03 % пероксиду водню, 0,1 моль/л Tris-HCl, pH 8,7) протягом двох хвилин, відтак 5 хв експонували на рентгенівську плівку. Плівку проявляли, використовуючи стандартні реактиви (AGFA, Бельгія). Цифрову денситометрію отриманих фотографічних знімків здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Scion Image.

Вміст пероксиду водню в листках визначали за методом (Cheeseman, 2006) з модифікаціями. Заморожену надземну частину проростків розтирали в охолодженій порцеляновій ступці з додаванням 0,1 % розчину трихлороцтової кислоти у співвідношенні 1 : 3. Гомогенат центрифугували впродовж 30 хв за 10000 g на центрифугу JOUAN GR20.22 (Чехія). До аліквоти супернатанту додавали 0,25 мМ солі Мора, 0,1 мМ сорбітолу та 0,1 мМ розчину ксиленового помаранчевого в 25 мМ сульфатної кислоти. Мінімальний час розвитку забарвлення становив 15 хв. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 550 нм щодо відповідного контролю на реактиви за допомогою спектрофотометра СФ-2000 (Росія). Значення неспецифічної абсорбції за довжини хвилі 800 нм віднімали від значення хвилі 550 нм. Концентрацію пероксиду водню розраховували за калібрувальним графіком. Досліди проводилися в трьох біологічних і п'яти аналітичних повторях. Цифровий матеріал обробляли статистично за програмою «Excel 2002» та «Origin 6.0». Достовірність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента, використовуючи 5 % рівень значущості  $p \leq 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

*Amaranthus caudatus* — однорічна високоврожайна, екологічно пластична культура з широким діапазоном використання, посухо- та солестійка, а також резистентна щодо хвороб. Має C-4 тип фотосинтезу. Оптимальна температура для росту й розвитку —

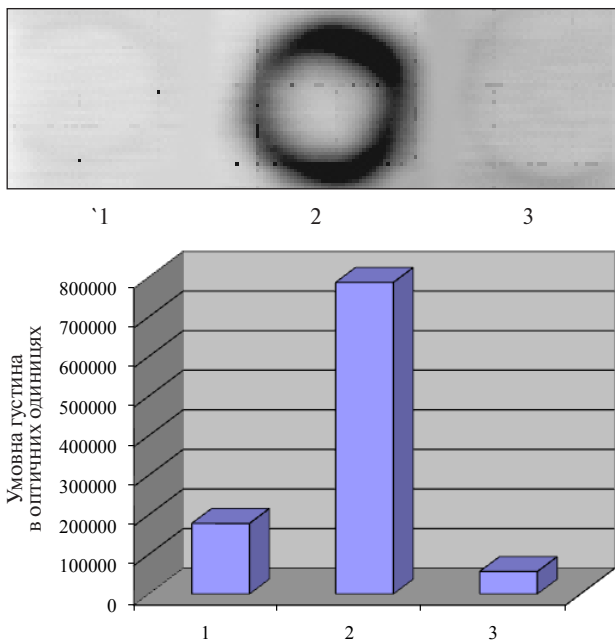
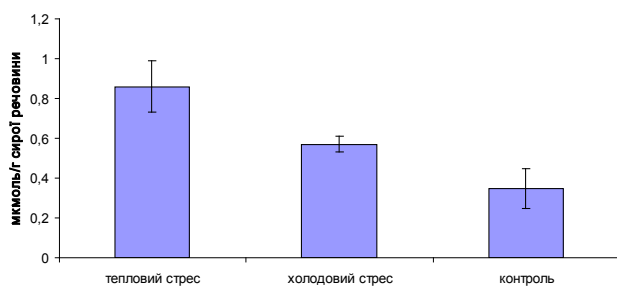


Рис. 1. Дот-блот і цифрова денситограма БТШ70 надземної частини 7-добових проростків *Amaranthus caudatus*. 1 — контроль, 2 — тепловий стрес, 3 — холодний стрес

Fig. 1. Dot-blot and figures densitogram of HSP 70 from 7-days seedlings leaves of *A. caudatus*. 1 — control, 2 — heat stress, 3 — cold stress



Рослина	Контроль	Тепловий стрес	% (від контролю)	Холодовий стрес	% (від контролю)
<i>Amaranthus caudatus</i>	0,35 ± 0,10	0,86 ± 0,13	245	0,57 ± 0,04	163

Рис. 2. Вплив температурних стресів на вміст пероксиду водню (мкмоль/г сирої речовини) в надземній частині 7-добових проростків *Amaranthus caudatus* ( $M \pm m$ ,  $n = 4$ ,  $p \leq 0,05$ )

Fig. 2. Influence of temperature stresses on concentration of hydrogen peroxide in 7-days seedlings leaves (mkM/g of fresh tissue) of *A. caudatus* ( $M \pm m$ ,  $n = 4$ ,  $p \leq 0,05$ )

35 °C, нормально переносить перепади нічної та денної температури. Швидкий ріст відбувається за температури 20—25 °C. Ми встановили, що 7-добові проростки *Amaranthus caudatus* у контрольних умовах містили БТШ70 у невеликій кількості. Активний

синтез БТШ70 спостерігався після короткочасного теплового стресу. Натомість після холодного стресу незначно зменшувався вміст БТШ70 (рис. 1).

Ми також встановили, що короткочасні температурні стреси спричинювали зростання вмісту пероксиду водню в 7-добових проростках *Amaranthus caudatus*, причому реакція на тепловий стрес була значно виразнішою порівняно з відповіддю на холодний стрес (рис. 2).

Дослідження впливу гіпо- та гіпертермії на білки листків рису виявили утворення стрес-індукованих БТШ70 (Hashimoto, Komatsu, 2007; Lee et al., 2007). БТШ70 дедалі частіше розглядають як молекулярний маркер стійкості, а відсутність індукції БТШ70 за стресових умов може свідчити про вузьку спеціалізацію виду до певної екологічної ніші (Козеко та ін., 2011; Ireland et al., 2004).

Утворення й накопичення в рослинних клітинах пероксиду водню спостерігається після теплового та холодного стресів, дії озону й ультрафіолетового опромінення, посухи, засолення, механічного ушкодження, впливу патогенів (Колупаев, Карпец, 2010). Молекули пероксиду водню незаряджені, характеризуються тривалим періодом життя, здатні проникати через мембрани і долати великі відстані (Креславский и др., 2012; Bienert et al., 2007). Пероксид водню розглядають як внутрішні та між-органні сигнальні молекули, що спричинюють адаптивні зміни (Jaspers, Kangasjarvi, 2010; Mubarakshina et al., 2010). Виявлені нами зміни щодо вмісту пероксиду водню у 7-добових проростках *Amaranthus caudatus* після короткочасних температурних стресів спонукають до припущення, що ці АФК є компонентом системи неспецифічного реагування рослинних клітин на температурні стреси. Зростання концентрації пероксиду водню в 2,5 раза після теплового стресу в проростках *Amaranthus caudatus* корелює з активним синтезом БТШ70. Натомість після короткочасного холодного стресу спостерігалось незначне, порівняно з тепловим стресом, збільшення вмісту  $H_2O_2$ , тоді як синтез БТШ70 навіть дещо пригнічувався.

Таким чином, для теплолюбного виду *Amaranthus caudatus*, температурний оптимум якого перебуває в межах 35 °C, виявлено активне утворення БТШ70 і накопичення пероксиду водню у відповідь на тепловий стрес. Це може бути одним із факторів, який сприяє теплостійкості дослідженого виду. Припускають, що рослинні клітини реагують на АФК, серед яких — пероксид водню, з участю редоксчут-

ливого транскрипційного фактора (ФТШ), котрий активує синтез БТШ (Mittler et al., 2004). Тобто процеси утворення БТШ і накопичення АФК є взаємопов'язаними (Suzuki, Mittler, 2006). Рівень АФК і передача сигналів контролюються генами, які кодують синтез індукованих і пригнічуваних АФК білків. У *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано 152 гени, що взаємодіють з іншими генами, відповідальними за стійкість рослин до дії стресових чинників (Mittler et al., 2004; Torres, Dangl, 2005). У дослідженнях нами проростків *Amaranthus caudatus* пероксид водню можна розглядати як сигнальну сполуку, що, вірогідно, активує синтез молекул БТШ70, задіяних у формуванні відповіді на тепловий стрес. Оскільки батьківщиною більшості видів *Amaranthus* є «тропічна» Америка (Мексика, Аргентина, Венесуела, Перу), звідкіля, як стародавня зернова культура, вона поширилася на простори Центральної Америки, Азії, Африки, Австралії та Європи, відсутність індукції БТШ70 за дії низької температури видається достатньо закономірною і може обумовлюватися особливостями температурного режиму первинного ареалу *A. caudatus*. Утворення БТШ70, спричинене високою температурою, можна розглядати як маркер теплостійкості дослідженого нами виду *A. caudatus*.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух А.Я., Рахметов Д.Б., Мартинюк Г.М., Дідух Я.П., Кордюм Є.Л. Оцінка стану рослин за дії несприятливих змін екологічних факторів із використанням білка теплового шоку 70 кДа (Hsp70) // Укр. ботан. журн. — 2011. — 68, № 6. — С. 890—900.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. — Киев: Основа, 2010. — 352 с.
- Косаківська І.В. Протеом рослин: реакція на абиотичні стресові впливи // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2012. — 44, № 5. — С. 1—10.
- Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллавердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиол. раст. — 2012. — 59, № 2. — С. 163—178.
- Негрецкий В.А., Ковзун Е.И. Экспрессия протеникиназы С в процессе фотопериодической индукции цветения растений короткодневной мари красной *Chenopodium rubrum* L. // Доп. НАН України. — 2004. — № 10. — С. 174—177.
- Плотникова Л.Я. Участие активных форм кислорода в защите линий пшеницы с генами устойчивости видов рода *Agropyron* от бурой ржавчины // Физиол. раст. — 2009. — 56, № 3. — С. 200—209.
- Biener G.P., Moller A.L., Kristiansen K.A., Schulz A. et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // J. Biol. Chem. — 2007. — 139. — P. 1183—1192.
- Cheeseman J.M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions // J. Exp. Bot. — 2006. — 57(10). — P. 2435—2444.
- Cho E.K., Hong C.B. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants // Plant Cell Rep. — 2006. — 25. — P. 349—358.
- Cui S., Huang F., Wang J. et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings // Proteomics. — 2005. — 5. — P. 3162—3172.
- Hashimoto M., Komatsu S. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress // Proteomics. — 2007. — 7. — P. 1293—1302.
- Ireland H.E., Harding S.J., Bonwick G.A., Jones M., Smith C.J., Williams J.H.H. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor* // Biomarkers. — 2004. — 9. — P. 139—155.
- Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signalling // Physiol. Plant. — 2010. — 138. — P. 405—413.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Doring P., Vierling E., Scharf K.D. // Complexity of the heat stress response in plants // Curr. Opin. Plant Biol. — 2007. — 10. — P. 310—316.
- Lee D.G., Ahsan N., Lee S.H., Kang K.Y., Bahk J.D., Lee I.J. et al. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves // Proteomics. — 2007. — 7. — P. 3369—3383.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. — 2004. — 9. — P. 490—498.
- Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Naidov I.A., Hiller W. et al. Production and diffusion of chloroplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its implication to signalling // J. Exp. Bot. — 2010. — 61. — P. 3577—3587.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants // J. Exp. Bot. — 2002. — 53(372). — P. 1237—1274.
- Noreen Z., Ashraf M. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers // J. Plant Physiol. — 2009. — 166. — P. 1764—1774.
- Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // Plant J. — 2000. — 23. — P. 785—794.
- Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. — 2006. — 126. — P. 45—51.
- Swindell W.R., Weber A.P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcriptional factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways // BMC Genomics. — 2007. — 8. — P. 125—131.
- Timperio A.M., Egidi M.G., Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP) // J. Proteom. — 2008. — 71. — P. 391—411.
- Torres M.A., Dangl J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development // Curr. Opin. Plant Biol. — 2005. — 8. — P. 397—403.
- Torres N.L., Cho K., Shibato J et al. Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama // Electrophoresis. — 2007. — 28. — P. 4369—4381.

Рекомендує до друку  
О.К. Золотарьова

Надійшла 29.01.2011 р.



И.В. Косаковская<sup>1</sup>, В.А. Негрецкий<sup>1</sup>, В.М. Пушкарев<sup>2</sup>,  
О.А. Контурская<sup>1</sup>, Д.Б. Рахметов<sup>3</sup>, А.Ю. Устинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины,  
г. Киев

<sup>2</sup> Институт эндокринологии и обмена веществ  
имени В.П. Комиссаренко НАМН Украины, г. Киев

<sup>3</sup> Национальный ботанический сад имени Н.Н. Гришко  
НАН Украины, г. Киев

#### ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССОВ НА СИНТЕЗ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 КДА И ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ПРОРОСТКАХ *AMARANTHUS CAUDATUS* L.

Определено содержание белка теплового шока БТШ70 и перекиси водорода в контрольных условиях и после кратковременных температурных стрессов в 7-дневных проростках *Amaranthus caudatus* L. Выявлено наличие небольшого количества БТШ70 в контрольных условиях и активное образование БТШ70 после кратковременного теплового стресса (2 часа, +40 °С). Установлено, что после кратковременного холодного стресса (2 часа, +4 °С) содержание БТШ70 практически не изменялось. Кратковременные температурные стрессы вызывали увеличение количества перекиси водорода в 7-дневных проростках *Amaranthus caudatus*, причем реакция на тепловой стресс была значительно более выраженной. Выявленные изменения в содержании перекиси водорода после температурных стрессов позволяют предположить, что молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> могут быть компонентом системы неспецифического реагирования растительной клетки на температурные воздействия. Увеличение количества перекиси водорода в 2,5 раза после теплового стресса совпадает с активным синтезом БТШ70 в проростках теплолюбивого вида *Amaranthus caudatus*, температурный оптимум которого находится в пределах +35 °С. Активное образование БТШ70 и накопление перекиси водорода в ответ на действие кратковременного температурного стресса рассматривается как один из факторов, определяющих теплоустойчивость исследованного вида. Предполагается, что перекись водорода является сигнальным соединением, которое инициирует образование БТШ70,

обладающего, в свою очередь, защитной функцией при формировании ответной реакции на действие стресса.

*Ключевые слова:* *Amaranthus caudatus*, белок теплового шока, перекись водорода, температурный стресс, термостойкость.

I.V. Kosakivska<sup>1</sup>, V.A. Negretsky<sup>1</sup>, V.M. Pushkarev<sup>2</sup>,  
O.A. Konturska<sup>1</sup>, J.B. Rakhmetov<sup>3</sup>, A.Yu. Ustinova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup> V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,  
National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup> M.M. Gryshko National Botanical Garden,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

#### EFFECT OF SHORT-TERM TEMPERATURE STRESSES ON HSP70 SYNTHESIS AND LEVEL OF HYDROGEN PEROXIDE IN *AMARANTHUS CAUDATUS* L. SEEDLINGS

We analyzed the level of HSP70 and hydrogen peroxide in 7-day-old seedlings of *Amaranthus caudatus* L. in control and after short-term high and low temperature stresses. HSP70 was identified strongly activated in control and its active synthesis was shown after short-term temperature stress (2 hours, +40 °C). The level of HSP70 after short-term cold stress (2 hours, +4 °C) practically did not change. It was shown that concentration of hydrogen peroxide in 7-day-old seedlings of *Amaranthus caudatus* increased after short-term temperature stresses. The response to the heat stress was much stronger than to the cold one. The possible role of hydrogen peroxide as a component of nonspecific stress-reaction system of the plant is discussed. HSP70 synthesis and accumulation of hydrogen peroxide after short-term heat stress correlate with thermotolerance of *Amaranthus caudatus*. Our results support that hydrogen peroxide molecules act as signaling agents. They activate HSP70 synthesis which protects plant from the high temperature stress.

*Key words:* *Amaranthus caudatus*, heat shock protein, hydrogen peroxide, temperature stresses, thermotolerance.