

N.V. Rubanovska

Ivan Ogienko Kamyanets-Podilsky state University, Ukraine

CENOTIC PECULIARITIES OF *ALLIUM PODOLICUM* (ASCH. ET GRAEBN.) BŁOCKI EX RACIB. ON THE WESTERN PODILLIA.

This paper deals with syntaxonomical peculiarities of *Allium podolicum*, a Middle-Dnister – Pokuttia subendemic species. It is shown, that *A. podolicum* in Western Podillia grow in communities belong to 12 associations of 4 alliances, 3 orders, and 3 classes. New association *Allio podolici-Koelerietum cristati* (alliance *Alysso-Sedion*) described previously.

Key words: *Allium podolicum*, Western Podillya, cenology, syntaxonomical

Рекомендує до друку

Надійшла 15.09.2010

М.М. Барна

УДК: 577:122:58.036.2

О. С. ТАЛАЛАЄВ

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ В ЕТІОЛЬОВАНИХ ПРОРОСТКАХ ГОРОХУ

Досліджували експресію генів п'яти представників різних класів низькомолекулярних білків теплового шоку в етіюльованих проростках гороху з використанням кількісної ПЛР. Результати дослідження показали, що експресія цих генів є частиною внутрішньої програми розвитку за нормальних умов.

Ключові слова: *Pisum sativum*, генна експресія, тепловий шок, низькомолекулярні білки теплового шоку, ПЛР в реальному часі

Низькомолекулярні білки теплового шоку (small heat shock proteins, sHSP) широко розповсюджені в природі. Ці білки здатні виконувати шаперонову функцію - асоціювати з частково денатурованими білками та формувати стабільний комплекс для запобігання незворотній агрегації білків-субстратів [17]. Вони індуюються у відповідь на тривалий температурний та інші типи стресів у різних органах та тканинах. Мономери sHSP характеризуються молекулярною вагою в межах від 12 до 42 кДа (рослинні в межах від 14 до 27 кДа) та наявністю послідовності довжиною у 100 амінокислотних залишків, названою α -кристаліновим доменом. Проте задля виконання їх шаперонової функції необхідна асоціація мономерів у олігомерні структури. Ці структури демонструють здатність зв'язувати велику кількість субстратів, та, на відміну від інших білків теплового шоку, не потребують наявності АТФ [12, 22].

Рослинні sHSP - надзвичайно широкий клас білків. Відомо, що геном *Arabidopsis thaliana* містить 37 генів які кодують низькомолекулярні білки теплового шоку, геноми *Oryza sativa* та *Vitis vinifera* 47 та 65 генів відповідно [23]. Спираючись на субклітинну локалізацію, амінокислотну гомологію та сучасні біоінформатичні дослідження, рослинні α -кристалінові білки на сьогодні виділяють у сім субродин: цитозольно-нуклеарні класи СІ, СІІ та СІІІ, клас пластидних (Р), клас низькомолекулярних білків теплового шоку ендоплазматичного ретикулума (ER), мітохондріальних (М) та клас пероксисомних sHSP (Po) [16, 19]. Білки цих класів були ідентифіковані у багатьох видів.

Що найменше декілька різних типів α -кристалінових білків рослин експресуються під дією осмотичного стресу [4, 20]. Експресія підкласів цитозольно-ядерних СІ та СІІ [18],

мітохондріальних [2] та хлоропластних sHSP [9, 14] також індукується окисним стресом. Деякі гени низькомолекулярних білків теплового шоку ініціюються холодним стресом, впливом важких металів [7], озону [6], ультрафіолетовим [18] та γ -випромінюванням [14]. Дані цих спостережень дозволяють стверджувати, що низькомолекулярні білки теплового шоку пов'язані із загальною відповіддю на стрес та мають суттєве значення в адаптації до різних факторів несприятливих впливів. Точний механізм, за яким температура чи інший стрес активує синтез sHSP не визначений, але деякі дані вказують на те, що експресія цих білків має запускатися з появою (чи бути направленою на попередження вірогідної появи) частково денатурованих або невірно складених білкових субстратів.

На сьогодні залишається не до кінця з'ясованим питання щодо експресії генів α -кристалінових шаперонів рослин під час проростання насіння. Або наявність різних sHSP в насінні на ранніх стадіях проростання [24, 5, 1] пов'язана лише із залишковими кількостями відповідних мРНК в сухому насінні, або має місце експресія sHSP генів проростків. Відповідь на ці питання має суттєве значення для розуміння механізмів забезпечення толерантності рослин у варіабельному середовищі.

Для відповіді на ці запитання ми провели дослідження експресії генів sHSP гороху при проростанні та протягом перших діб росту проростків. Як позитивний контроль використовували температурний стрес. Досліджували експресію наступних генів: *PsHSP 18.1* – клас цитозольно-ядерних CI, *PsHSP 17.7* - клас цитозольно-ядерних CII, *PsHSP 22.7* – клас ER, *PsHSP26.2* – клас P та *PsHSP22.9* - клас M.

Матеріал і методи досліджень

Перед посівом насіння *Pisum sativum* L. (сорт Інтенсивний) стерилізували протягом 15 хвилин у 5%-му розчині гіпохлориту натрію та тричі промивали стерильною дистильованою водою, після чого насіння залишали у воді при кімнатній температурі на 3 години для набухання. Відбірні насінини поміщали у трубочки із зволоженого фільтрувального паперу та витримували протягом 2-х діб при 4° С для більш рівномірної схожості. Подальший ріст проростків відбувався при 24° С та відносній вологості повітря 60 - 64% у темряві. Проростки вирощували до 5-ти діб, зволожуючи фільтрувальний папір та фіксуючи експериментальний матеріал кожні 24 години. Для імітації умов температурного стресу п'ятидобові проростки поміщали в термостат. Температуру підвищували протягом чотирьох годин на 4°С щогодини до досягнення необхідної стресової – 40° С, потім знижували на 4°С щогодини до рівня 24° С за методикою описаною раніше [11].

Виділення РНК проводили за допомогою Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma, Німеччина) згідно протоколу виробника. Для дослідів рослинний матеріал фіксували у рідкому азоті безпосередньо перед виділенням кожні 24 години. Розмір проби складав 100 мг сумарної тканини не менше ніж 3-х проростків, отриманої шляхом розтирання в рідкому азоті. Суміш виділеної тотальної РНК обробляли ДНКазою (Fermentas) відповідно до протоколу від виробника. Для контролю якості та цілісності виділеної РНК безпосередньо після виділення проводили формальдегідний денатуруючий гель-електрофорез. кДНК отримували з 1 мкг тотальної РНК за допомогою реакції зворотної транскрипції з використанням М-MLV зворотної транскриптази (Fermentas). Отриману кДНК перед використанням в ПЛР розбавляли водою у співвідношенні 1:10.

Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили на Real-Time PCR IQ-Cycler (BioRad). Використовували готову суміш для ПЛР реального часу Maxima SYBR Green Real Time PCR 2x Master Mix (Fermentas). Отримані значення порогових циклів для кожного з варіантів (C_t) використовували для аналізу за методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [15].

ПЛР проводили з використанням специфічних праймерів (таблиця) довжиною 20-24 нуклеотидів, сконструйованих з використанням бази даних NCBI. Для нормалізації використовували експресію гену актину (*PsActin3*), відносний рівень експресії якого залишався незмінним в усіх експериментах. Всі експерименти виконувалися щонайменше у трьох біологічних та трьох технічних повтореннях. Для дослідження експресії низькомолекулярних білків теплового шоку в насінні та етіологованих проростках гороху обрали 5 генів *P. sativum*.

Кожен ген кодує білок-представник окремої субродини низькомолекулярних білків теплового шоку.

Гени *PsHSP 18.1* та *PsHSP17.7* гороху кодують однойменні протеїни, що відносяться до цитозольно-ядерних класів CI та CII відповідно. *PsHSP 22.7* кодує відповідний білок, представник sHSP з класу ендоплазматичного ретикулума (ER). Ген *PsHSP26.2* відноситься до пластидних sHSP (P). *PsHSP22.9* – відноситься до кодує sHSP, що функціонує в мітохондріях (M).

Таблиця

Список аналізованих генів та послідовності використаних праймерів

Назва гену	GenBank	Сенс праймер	Анти-сенс праймер
<i>PsHSP18.1</i>	M33899.1	5'tcaccttcgcttcattccct3'	5'ttctcaacgcttctctccgctt3'
<i>PsHSP17.7</i>	M33901.1	5'ataatggacctcaccgacgacaca3'	5'tcttctcttctctctcgcacct3'
<i>PsHSP22.7</i>	M33898.1	5'gattctcccaactctcttatcgg3'	5'ttctctcaccactcactcttagcac3'
<i>PsHSP26.2</i>	X07187.1	5'gtagaagaagaagcctcgagaag3'	5'cacgaatcaccctcctccaatgt3'
<i>PsHSP22.9</i>	X86222	5'atgtttatgtcactcctcc3'	5'attgctcgtcagtaaatcca-3'
<i>PsActin3</i>	U81046.1	5'tggctacacttcaccactctgc3'	5'ttcaggctcgggaatcttccagc3'

Результати досліджень та їх обговорення

На рисунку представлені результати дослідження експресії генів sHSP різних класів за допомогою ПЛР в реальному часі в діапазоні від 1-ї до 5-ї доби з моменту проростання. Дані аналізу відносної експресії цитозольного *PsHSP17.7* вказують на те, що експресія гену має місце в проростках від першої до п'ятої доби. Максимальний рівень експресії - 6,75 одиниць – спостерігали після перших 24 годин. Надалі, від другої до п'ятої доби відбувається зниження експресії цього гену до рівня близько 1,02 одиниць, включно з підвищенням рівня до 2 одиниць на третю добу. Рівень експресії *PsHSP18.1* знижується на другу добу з 4,87 до 2,02 одиниць та різко підвищується до рівнів 10,82 та 7,8 на третю та четверту добу відповідно, що є найбільшим показником серед усіх досліджуваних генів.

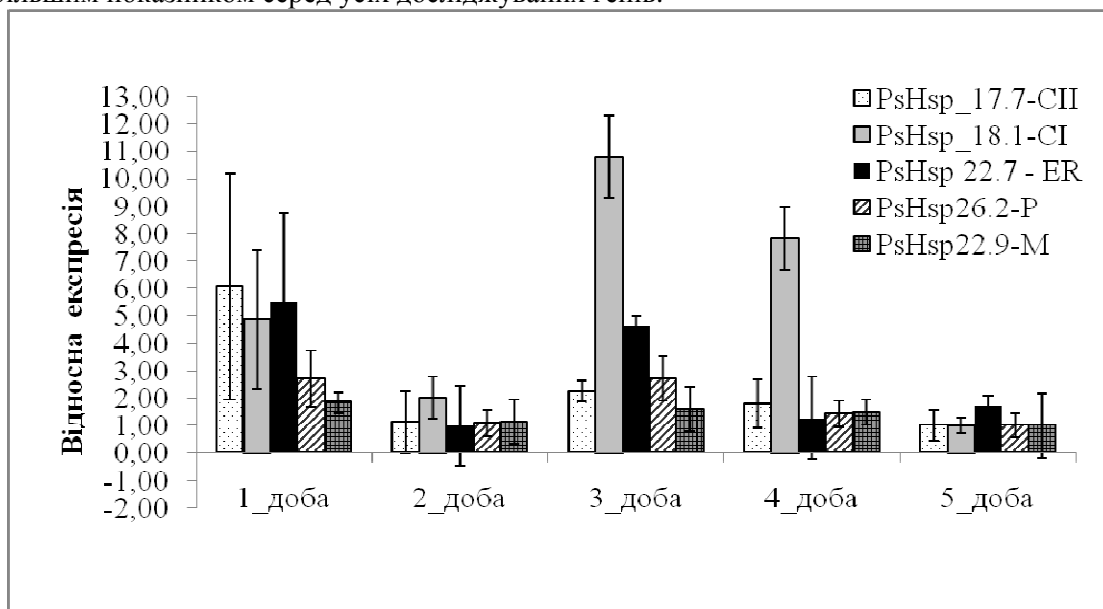


Рис. Відносна експресія генів низькомолекулярних білків теплового шоку в етіюльованих проростках гороху протягом перших 5 днів з початку проростання. Планки похибки відображають стандартне відхилення

Ці результати в повній мірі підтверджують літературні дані щодо накопичення цитозольно-ядерних sHSP у великій кількості в процесі ембріогенезу, дозрівання та проростання насіння *Helianthus annuus*, *Arabidopsis thaliana* та *P. sativum* [18, 5, 13].

sHSP ER-класу еволюційно, структурно та функціонально найбільш близькі до класів цитозольно-ядерних низькомолекулярних білків теплового шоку [10, 23]. За результатами наших досліджень *PsHSP 22.7* експресується в етіюльованих проростках за схемою, подібною до цитозольно-ядерних, - з максимальним рівнем 5,5 в перші 24 години, зниженням до показників в межах 1 на другу добу та підвищенням експресії на третю добу до рівня 4,65.

Експресія пластидного *PsHSP26.2* має схожий «хвильоподібний» характер, проте з меншою амплітудою підвищення рівня експресії на третю та четверту добу. Цей клас білків також має α -кристалінові консервативні ділянки, знайдені у всіх низькомолекулярних білків теплового шоку, та відрізняється наявністю унікального насиченого метіоніном домену на N-кінці, що є високо консервативним для всіх пластидних sHSP та відсутній у представників інших класів sHSP [3]. Дослідження хлоропластів *in vitro* показало, що пластидні sHSP захищають термолабільні компоненти фотосистеми II та важливі не лише у процесах адаптації до високих температур [8], а й також експресуються за умов оксидативного, холодного стресу, під впливом важких металів [9] а також за нормальних умов в тканинах етіюльованих проростків та тканинах плодів під час їх дозрівання [21].

Експресія *PsHSP22.9*, що належить до класу мітохондріальних, визначається протягом перших діб проростання етіюльованих проростків лише у незначній кількості та коливається від першої до п'ятої доби в межах похибки. Відповідно до літературних відомостей крім температурного стресу різке підвищення транскрипції мітохондріальних sHSP також відмічається за умов впливу оксидативного стресу та під дією гамма радіації [2]. Конститутивної експресії генів sHSP класу мітохондріальних білків в літературних джерелах не відмічається.

Отже, з 5-ти досліджуваних генів, що кодують представників різних класів низькомолекулярних білків теплового шоку гороху лише представники класу мітохондріальних HSP не характеризувалися змінами рівня експресії генів в етіюльованих проростках гороху протягом п'яти діб проростання. Експресія всіх досліджуваних генів різко підвищувалася за умов теплового шоку до показників у декілька тисяч разів.

Висновки

Показано, що експресія низькомолекулярних білків теплового шоку в етіюльованих проростках гороху за відсутності зовнішніх впливів є частиною внутрішньої програми розвитку. Особлива роль належить представникам цитозольно-ядерних класів та класу ER, які експресуються від першої до п'ятої доби більш інтенсивно порівняно представників класів пластидних та мітохондріальних sHSP.

Рівень експресії всіх досліджуваних генів за нормальних умов є значно нижчим за рівень, що відмічається за умов температурного стресу. Цей факт підтверджує роль низькомолекулярних білків теплового шоку одного з основних механізмів захисту від шкідливих впливів екстремальних стресових умов.

1. *Almoguera C.* Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular heat-shock protein and Lea mRNAs / C. Almoguera, J. Jordano // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – №19. - P. 781–792.
2. *Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells* / Banzet N., Richaud C., Deveaux Y. [et al.] // *Plant J.* – 1998. – №13. – P. 519– 527.
3. *Chen Q.* Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein / Q. Chen, E. Vierling // *Mol. Gen Genet.* – 1991. – №226, N.3. – P 425–431.
4. *Coca M.A.* Expression of sunflower low- molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible function implications / M.A. Coca, C. Almoguera, J. Jordano // *Plant Mol. Biol.* – 1994. – №25. – P. 479–492.

5. *DeRocher A.E.* Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation/ A.E. DeRocher, E. Vierling // *Plant J.* – 1994. - №5. – P. 93–102.
6. *Differential* transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock / H. Eckey-Kaltenbach, E. Kiefer, E. Grosskopf [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – №33. – P. 343–350.
7. *Alfalfa* heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis / J. Gyorgyey, A. Gartner, K. Nemeth [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – №16. – P. 999–1007.
8. *The small*, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress / S. A. Heckathorn, C. A. Downs, T. D. Sharkey, J. S. Coleman // *Plant Physiol.* – 1998. – №116, N.1. – P. 439 – 444.
9. *Chloroplast* small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress / S. A. Heckathorn, J. K. Mueller, S. La Guidice [et al.] // *Am J. Botany.* – 2004. – №91. – P. 1312–1318.
10. *Localization* of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system / K.W. Helm, P.R. LaFayette, R.T. Nagao [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 1993. – №13, N1. – P. 238–247.
11. *Hernandez L.D.* Expression of low molecular weight heat shock proteins under field conditions / L.D. Hernandez, E. Vierling // *Plant Physiol.* – 1993. – №101. – P. 1209–1216.
12. *On the mechanism* of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii* / R. Kim, L. Lai, H.-H. Lee [et al.] // *PNAS.* – 2003. - №100, N.14. – P. 8151–8155.
13. *Lee G. J.* Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea / G. J. Lee, N. Pokala, E. Vierling // *J. Biol. Chem.* – 1995. – №270, N.18. – P. 10432–10438.
14. *Lee G. J.* A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein / G. J. Lee, E. Vierling // *Plant Physiol.* – 2000. – №1. - P. 189–198.
15. *Livak K. J.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – №25. – P. 402–408.
16. *Identification* and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes / C. Ma, M. Haslbeck, L. Babujee [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – №141. – P. 47–60.
17. *Narberhaus F.* α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network / F. Narberhaus // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. - №66, N.1. - P. 64–93.
18. *Pla M.* Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems / M. Pla, G. Huguet, D. Verdager [et al.] // *Plant Sci.* – 1998. – №139. – P. 49–57.
19. *Scharf K. D.* The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins (sHSPs) and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins) / K. D. Scharf, M. Siddique, E. Vierling // *Cell Stress Chaperones.* – 2001. – №6. – P. 225-237.
20. *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression/ W. Sun, C. Bernard, B. Van de Cotte [et al.] // *Plant J.* – 2001. – №27. – P. 407-415.
21. *Specific* heat shock proteins are transported into chloroplasts / E. Vierling, M. L. Mishkind, G. W. Schmidt, J. Key // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* – 1986. – №83 – P. 361–365.
22. *Wang K.* ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein / K. Wang, A. Spector // *Eur. J. Biochem.* – 2001. №268. – P. 6335–6345.
23. *Waters E. R.* Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns / E. R. Waters, B. D. Aevermann, Z. Sanders-Reed // *Cell Stress and Chaperones.* – 2008. – №13. – P. 127–142
24. *Synthesis* of small heat-shock proteins is a part of the developmental program of a late seed maturation / N. Wehmeyer, L. D. Hernandez, R. R. Finkelstein, E. Vierling // *Plant Physiol.* – 1996. – №112. – P. 747–757.

O.S. Talalaiev

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

ЭКСПРЕССИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В
ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ ГОРОХА

Исследовали экспрессию генов представителей пяти разных классов низкомолекулярных белков теплового шока в этиолированных проростках гороха. Результаты исследований показали, что экспрессия этих генов является частью внутренней программы развития в нормальных условиях.

Ключевые слова: Pisum sativum, экспрессия генов, низкомолекулярные белки теплового шока, ПЦР в реальном времени

O.S. Talalaiev

M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

EXPRESSION OF THE SMALL HEAT SHOCK PROTEINS IN ETIOLATED PEA SEEDLINGS

Gene expression of small heat shock from five different classes was investigated. Results shown that expression of these genes is the part of the internal developmental program under normal conditions.

Key words: Pisum sativum, gene expression, heat shock, small heat shock proteins, sHSP, real-time PCR

Рекомендує до друку

Надійшла 8.09.2010

М.М. Барна