

ORIGINAL ARTICLE

**Seasonal Dynamics of Stress Proteins in Leaves of
Medicinal Plants in a Natural Environment of Irkutsk and
on the Shores of the Lake Baikal**

M.A. Zhivetiev, A.V. Kolesnichenko, I.A. Graskova,
V.K. Voinikov

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of
Sciences, PO 317, Irkutsk, 664033, Russia*

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Received August 7, 2014

We study leaves of five plant species, growing in Irkutsk city and on the southeastern shore of Lake Baikal. These species are *Achillea asiatica* Serg., *Taraxacum officinale* Wigg., *Plantago major* L., *Veronica chamaedrys* L. and *Alchemilla subcrenata* Buser. In its leaves we identify some types of stress-induced proteins. In autumn, the accumulation of stress proteins in leaves of plants both from shores of Lake Baikal and from Irkutsk have been registered.

Key words: medicinal herbs, leaves, stress proteins, stress-induced proteins

ORIGINAL ARTICLE

Сезонная динамика стрессовых белков в листьях лекарственных растений в естественных условиях обитания города Иркутск и на побережье озера Байкал

М.А. Живетьев, А.В. Колесниченко, И.А. Граскова,

В.К. Войников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия

*E-Mail: nik.19@mail.ru

Поступила в редакцию 7 Августа 2014 г.

Изучались листья пяти видов лекарственных растений, произрастающих на юго-восточном побережье озера Байкал и в городе Иркутск: *Achillea asiatica* Serg., *Taraxacum officinale* Wigg., *Plantago major* L., *Veronica chamaedrys* L., *Alchemilla subcrenata* Buser. В их листьях определяли стрессовые белки. Осенью накопление стрессовых белков в листьях растений наблюдали как в растениях с побережья Байкал, так и из Иркутска.

Key words: лекарственные растения, листья, стрессовые белки

Известно, что растения для защиты своих тканей от перепадов температуры и других стрессовых условий активно синтезируют ряд защитных белков, таких как белки теплового (БТШ) (Guy, 1990) и холодового (БХШ) шока (Trunova, 2007). Впервые синтез БТШ в ответ на гипертермию был обнаружен в 1974 году (Tissieres *et al.*, 1974), а первым шагом в изучении собственно молекулярных механизмов экспрессии

генов БХШ при воздействии низкой температуры считают открытие Guy с соавторами (1985) соргенов (cold regulated genes) – целого семейства генов, кодирующего COR-белки, обладающих свойствами высокой гидрофильности и термоустойчивости и экспрессирующихся при гипотермии (Trunova, 2007; Koshkin, 2010). При этом показано, что эти белки не обладают ферментативными свойствами и они большей

частью низкомолекулярны (Trunova, 2007). Наиболее изучена экспрессия генов *cor15a* и *cor6.6*, которые кодируют COR15a и COR6.6 белки (Thomashow, 1999). Изучение функций COR15a белков позволило предположить, что они важны для формирования устойчивости к низкотемпературному стрессу, особенно морозостойкости, так как предотвращают переход мембран из ламеллярной фазы в гексагональную у зимующих растений при межклеточном образовании льда (Artus et al., 1996; Steponkus et al., 1982). Показано, что транскрипты *cor*-генов обнаруживаются через 2 ч конститутивно уже при отсутствии низкой температуры (Stockinger et al., 1997), а трансформированные *cor15a* геном растения арабидопсиса повышали свою морозостойкость на 1 °С. Арабидопсис, трансформированный введением сразу нескольких генов (*cor14*, *cor15* и *cor6.6*) в целом значительно повышал морозостойкость, но опять же не более, чем на 2-3 °С. Наибольшее повышение морозостойкости достигалось при длительном действии гипотермии, которая экспрессировала весь комплекс генов стрессовых белков, а не только *cor*-гены, что, в свою очередь, доказало существование многих других генов, экспрессирующихся пониженной температурой и регулирующихся не только ее краткосрочным, но и длительным воздействием (Trunova, 2007; Stockinger et al., 1997).

Действительно, наряду с синтезом низкомолекулярных шаперонов (15-35 кДа) выявлен синтез БТШ и БХШ более высокой

молекулярной массы, из которых наибольшим вниманием ученых пользуются БТШ с молекулярными массами 60, 70, 90 кДа (Koshkin, 2010). Не менее значимы такие стрессовые белки как БТШ101 (Queitsch et al., 2000), БХШ310 (Kolesnichenko et al., 1996) и другие (Voinikov, 2011; Voinikov, 2013).

В условиях Сибири важно изучение действия известных фундаментальных механизмов адаптации растительных организмов к специфическим температурным условиям региона не только в модельных экспериментах, но и в естественных условиях среды произрастания растений.

В связи с этим целью работы было изучить наличие ряда белков, синтезирующихся в ответ на тепловой и холодный стресс (БТШ101, БТШ70, БТШ60, БТШ17.6, а также COR14b) в относительно жаркий (начало августа) и холодный (конец октября) периоды вегетации травянистых растений.

MATERIALS AND METHODS

Объектами исследования служили листья пяти видов лекарственных растений: тысячелистник азиатский (*Achillea asiatica* Serg.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.), подорожник большой (*Plantago major* L.), вероника дубравная (*Veronica chamaedrys* L.), манжетка городковатая (*Alchemilla subcrenata* Buser). Все эти виды являются многолетними и с приходом зимы их надземная часть полностью отмирает. Отбор растений производили соответственно на левом берегу реки Выдриная в 700 м от уреза озера

Байкал на территории стационара СИФИБРа и в Иркутске на территории дендрариума СИФИБРа. Эти территории характеризовались существенными отличиями не только температурного режима, но и в уровнях выпадения осадков и глубины залегания грунтовых вод. В летний период на Байкале выпадает больше атмосферных осадков, чем в Иркутске, однако быстрое просыхание хорошо дренируемых почв приводит к иссушению верхнего слоя почвы. Наоборот, в Иркутске, несмотря на меньшее количество осадков, почва, питаемая грунтовыми водами, оставалась хорошо увлажненной. Нами было подсчитано суммарное количество осадков непосредственно за 10 дней перед отбором проб. Выяснилось, что в августе, непосредственно перед сбором проб, растения находились в условиях недостаточной влагообеспеченности. Особенно мало осадков выпало на р. Выдриная. Наоборот, в октябре, меньшее количество осадков перед сбором проб наблюдалось в Иркутске. В августе, как и в середине лета, температура была стабильно выше в Иркутске, чем на побережье Байкала, причем ход температур был на р. Выдриная заметно сглажен по сравнению с городом, где наблюдались частые сильные перепады температур день/ночь. В середине октября в г. Иркутск было на несколько градусов теплее, чем на побережье оз. Байкал, но в дни отбора проб, с середины месяца, наступило сильное похолодание (с 5-6 до -1 – -2 °C), причем минимальная температура ночью в эти дни достигала на р. Выдриная -5 °C, в то время как в

Иркутске ночью она падала до -7,5 °C. Таким образом, растения в Иркутске и на р. Выдриная находятся в неравнозначных климатических условиях, что предполагает у них присутствие отличий в реализуемых адаптационных механизмах в зависимости от места произрастания.

Для анализа листьев тысячелистника азиатского, одуванчика лекарственного и подорожника большого отбирались на обеих экспериментальных площадках, а листья вероники дубравной и манжетки городковатой, массово представленные на стационаре «р. Выдриная», но не встречающиеся в Иркутске, исследовались только на первом участке. Пробы отбирались в два часа дня 10 августа и 19 октября 2009 г.

Выделение белка осуществляли по стандартной методике (Pobezhimova *et al.*, 2004). Количество белка определяли по методу Lowry с соавторами (1951). Электрофорез в ПААГ проводили в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970) на приборе Mini-PROTEAN III Cell (BIO-RAD, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану («AMERSHAM», США) и последующую обработку антителами проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Все образцы исследовались в трех повторностях.

Анализ сканированных мембран проводился при помощи программы «GEL Analysis 1,0».

RESULTS AND DISCUSSION

Было исследовано наличие БТШ с молекулярными массами 70 (рис. 1, А) и 60 kD (рис. 1, Б) в растениях, собранных в начале августа и

второй половине октября.

С наступлением осенних заморозков наблюдали накопление Hsp 70. На р. Выдриная сильнее всего увеличение синтеза Hsp 70 происходило у вероники и одуванчика, в Иркутске – у подорожника. Экспрессия Hsp 60 так же в большинстве случаев увеличивалась с осенним понижением температур (рис. 1 Б).

Также были проведены исследования на наличие таких стрессовых белковых молекул как Hsp 101, Hsp 17,6 и Cor 14 b в пробах растений, собранных в начале августа и конце октября (рис. 2).

На рисунках 3 и 4 представлены графические результаты обработки мембран в программе GEL Analysis.

Из всех изученных растений вероника дубравная показала наиболее высокое накопление в октябре БТШ 60 и 70 в своих листьях. При этом, именно у этого растения, отличающейся, по-видимому, высокой терморезистентностью, других стрессовых белков не накапливалось.

На фоне повсеместного увеличения в октябре БТШ 70, обращает на себя внимание слабое уменьшение содержания БТШ 60 у тысячелистника и одуванчика в г. Иркутск, что может быть связано с процессами деадаптации в листьях растений. Об этом же, по-видимому, свидетельствует ранее показанное нами уменьшение активности пероксидазы в листьях лекарственных растений в Иркутске в этот же период (Zhivet'ev et al., 2010).

Высокое содержание БТШ 101 манжетки в

августе можно связать с засухой и высокими дневными температурами в этом месяце. Отсутствие детектирования его у других видов может свидетельствовать либо о видоспецифичности данного защитного механизма, либо об отсутствии необходимости синтеза данного типа БТШ в связи с наличием и достаточно высокой степенью активности других защитных механизмов.

Низкомолекулярные БТШ детектировались только на Байкале и только у манжетки и подорожника в октябре, что может быть связано с их большей уязвимостью к гипотермии и отличиями в микроклиматических условиях мест произрастания.

В этой связи интересным может быть высокое содержание COR 14 b в листьях одуванчика в октябре на побережье Байкала при видимом его отсутствии в это же время на территории города Иркутск. Иначе вели себя COR 14 b в листьях тысячелистника, а особенно – подорожника, которые в Иркутске уже активно отмирали и завершали сезон вегетации, а на Байкале продолжали активно вегетировать.

Таким образом, исследуемые растения в той или иной мере накапливали разнообразный спектр стрессовых белков в ответ на неблагоприятные высокие температуры летом и низкие осенью. Выявлена видовая специфика по составу стрессовых белков в зависимости от вегетационного периода и условий произрастания. Наиболее часто их накопление происходит осенью.

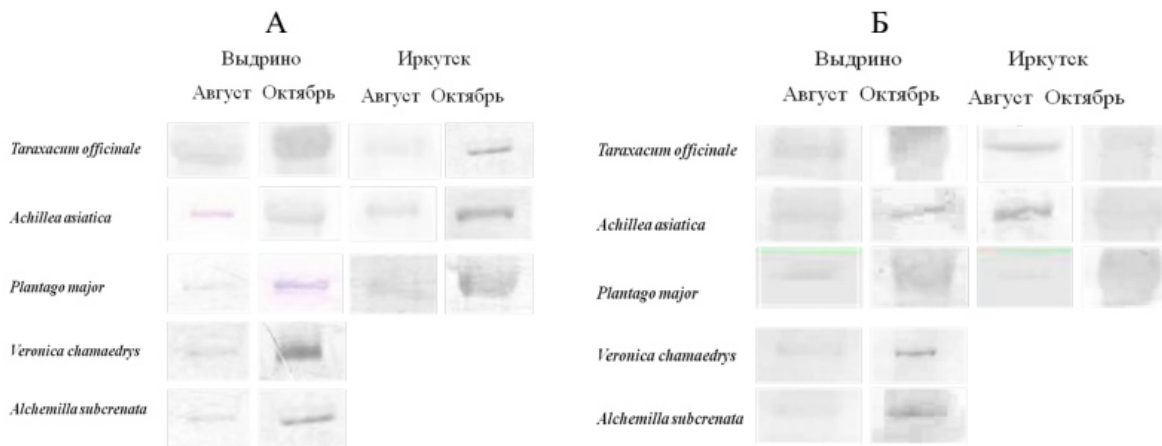


Рисунок 1. Стрессовые белки в листьях одуванчика *Taraxacum officinale*, подорожника *Plantago major*, тысячелистника *Achillea asiatica*, вероники *Veronica chamaedrys*, манжетки *Alchemilla subcrenata* в августе и октябре 2009 в г. Иркутск и на побережье Байкала: А – Hsp 70; Б – Hsp 60

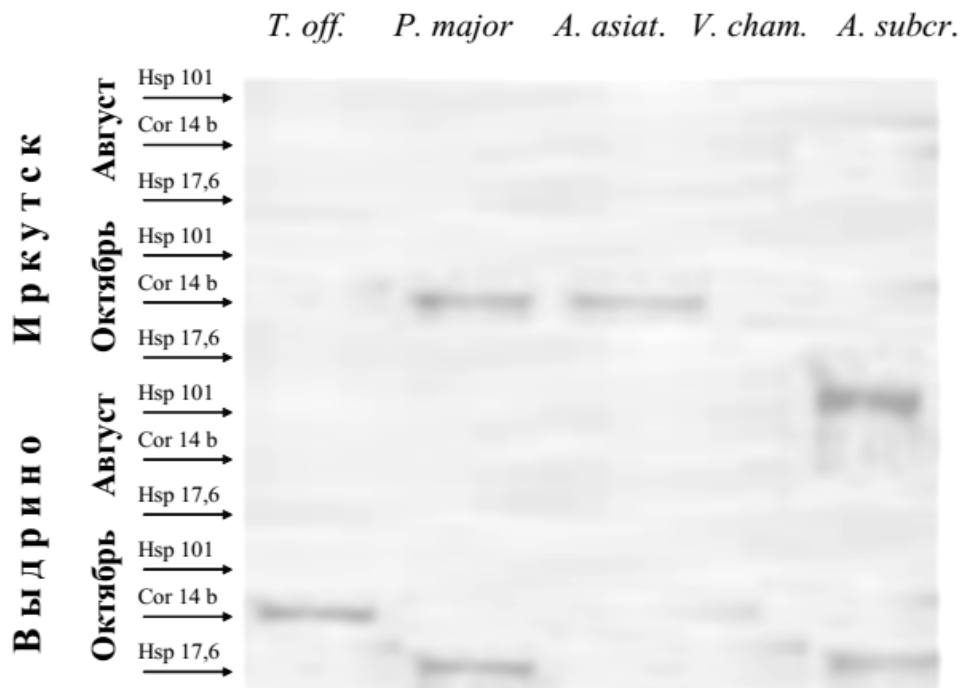


Рисунок 2. Стрессовые белки Hsp 101, Cor 14 b и Hsp 17,6 в листьях одуванчика *Taraxacum officinale*, подорожника *Plantago major*, тысячелистника *Achillea asiatica*, вероники *Veronica chamaedrys*, манжетки *Alchemilla subcrenata* в августе и октябре 2009 в г. Иркутск и на побережье Байкала

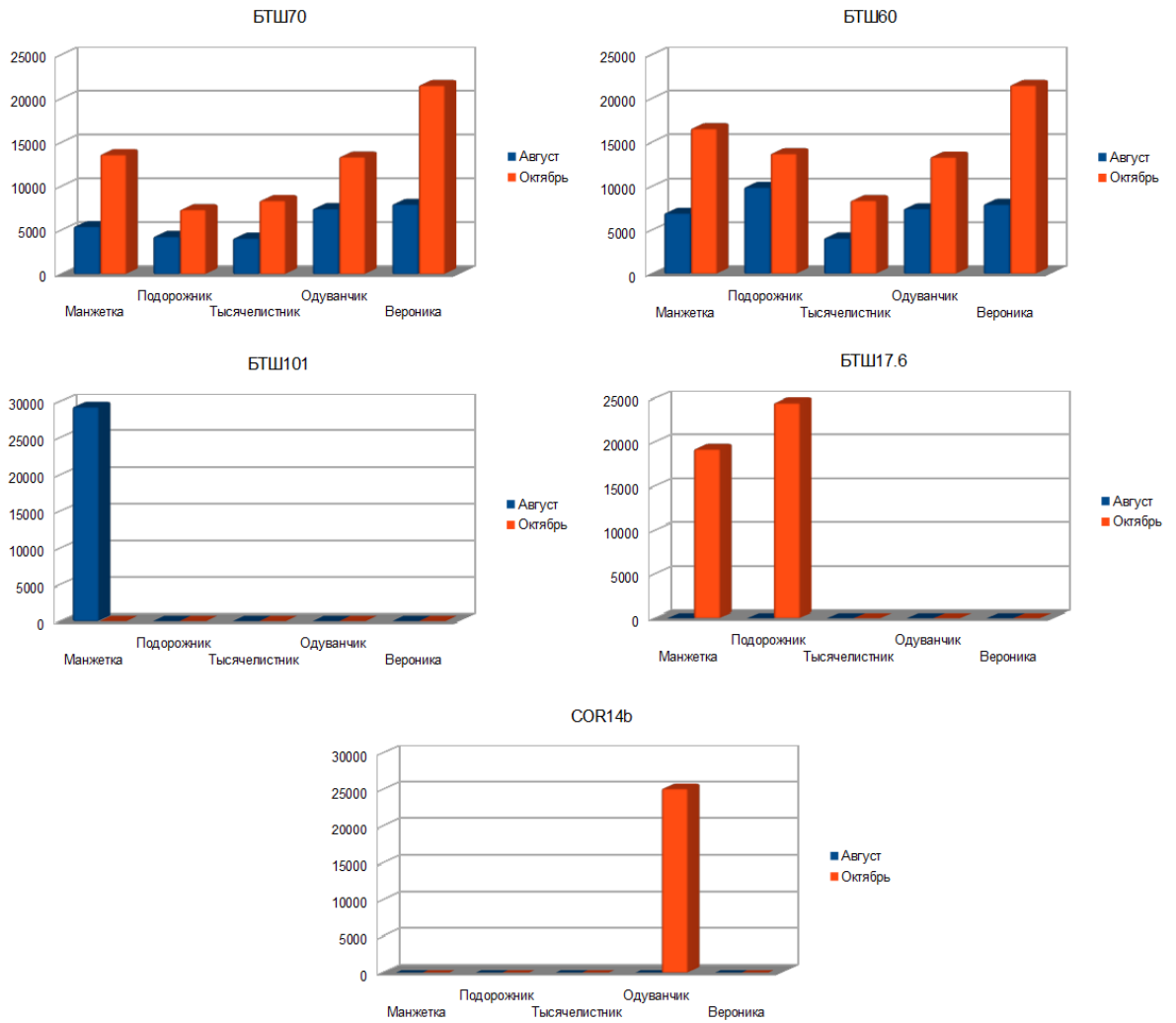


Рисунок 3. Динамика содержания стрессовых белков в листьях одуванчика *Taraxacum officinale*, подорожника *Plantago major*, тысячелистника *Achillea asiatica*, вероники *Veronica chamaedrys*, манжетки *Alchemilla subcrenata* в августе и октябре 2009, р. Выдриная.

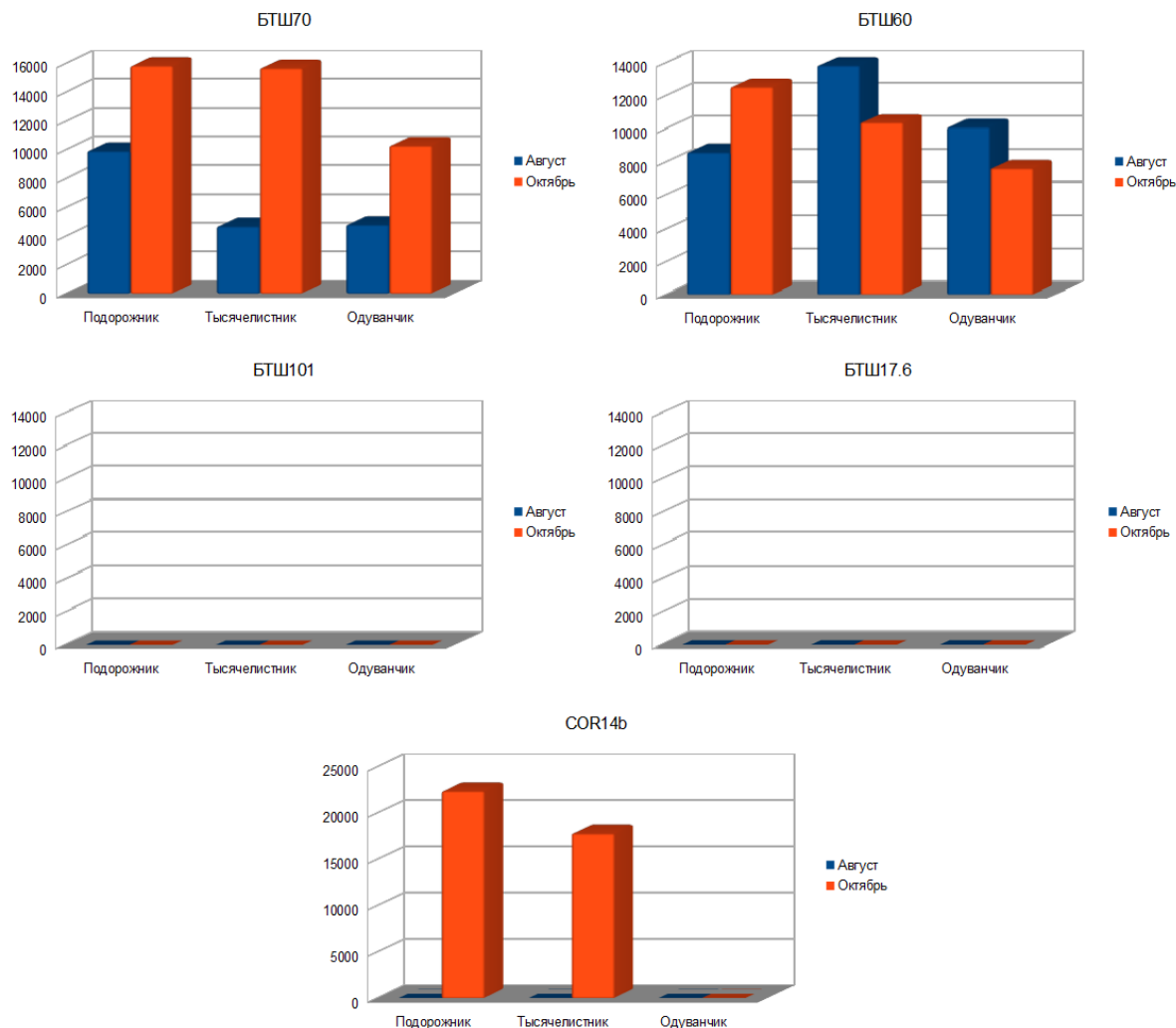


Рисунок 4. Динамика содержания стрессовых белков в листьях одуванчика *Taraxacum officinale*, подорожника *Plantago major*, тысячелистника *Achillea asiatica* в августе и октябре 2009, г. Иркутск

REFERENCES

- Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.I., Gilmour SJ, Lin CT, Tomashow MF. (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Acad. Sci. USA*. **93**, 13404-13409.
- Guy C.I., Niemi K.J., Brambl R. (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **81**, 3673-3677.
- Guy C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant. Physiol. and Plant. Mol. Biol.* **41**, 187-223.
- Kolesnichenko A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K., Misharin S.I., Antipina A.I. (1996) Antigen from winter rye accumulated under low temperature. *Russ J Plant Physiol*, **43**, 771-776.
- Koshkin E.I. (2010) Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник. М.: Дрофа, 638 с.

- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.
- Lowry O. H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.L. (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol.Chem*, **193**, 265–275.
- Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabelnyh O.I. (2004) Metody izucheniya mitokhondriy rasteniy. Polyarografiya i elektroforez. M.: OOO "NPK "PROMEKOBEZOPASNOST", 98 s.
- Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*. **12(4)**, 479-92
- Steponkus P., Dowgert M., Evans R., Gordon-Kammt W. (1982) Cryobiology of isolated protoplast. In: *Plant cold hardiness and freezing stress*: Li P., Sakai A. (eds.) N.Y.: Acad. Press. N.Y., V. 2., pp. 459-475.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF 1 encodes an AP 2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/ DRE, a cis-acting transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Nat. Acad. USA*, **94**, 1035-1040.
- Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *D. Melanogaster*. Relation to chromosome puffs *J. Mol. Biol.*, **84**, 389–398.
- Voinikov V.K. (2011) Mitokhondrii rasteniy pri temperaturnom stresse, Salyaev R.K. (red.) Novosibirsk: Akademicheskoye izdaniye "Geo", 163 s.
- Voinikov V.K. (2013) Energeticheskaya i informatsionnaya sistemy rastitelnykh kletok pri giporepmii, Calyaev R.K. (red.) Novosibirsk: Nauka, 212 s.
- Zhivet'ev M.A., Rachenco E.I., Putilina T.E., Krasnobaev V.A., Graskova I.A., Voinikov V.K. (2010) Activity and isoenzyme spectrum of peroxidases and dehydrins of some plant species, growing on the shores of lake Baikal, under abiotic stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **6(4)**, 42-50.