

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПЛАСТИДНИХ ТА МІТОХОНДРІАЛЬНИХ sHSP У *NICOTIANA SYLVESTRIS* ЗА ДІЇ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Л.В. КОЗУБ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, Україна, 58012
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

В умовах кліматичних змін дослідження механізмів захисту рослин від підвищених температур набуває особливої актуальності. Низькомолекулярні білки теплового шоку (small HSP - sHSP) відіграють ключову роль у підтримці білкового гомеостазу та регуляції відповіді рослин на стресові фактори, а саме - на тепловий стрес. У роботі здійснено біоінформатичний та експериментальний аналіз родини генів sHsp у *Nicotiana sylvestris*. Використання оновленої анотованої збірки геному дозволило ідентифікувати 48 генів sHsp, що є суттєвим розширенням порівняно з попередніми даними. Встановлено, що ці гени належать до 16 структурних класів, серед яких представлені білки з різною передбачуваною субклітинною локалізацією.

Для подальшого аналізу були обрані шість генів, які кодують sHSP з пластидною та мітохондріальною локалізацією: NslHsp18.1-MPI, NslHsp21.3-MPI, NslHsp24.4-MPI, NslHsp24.9-PI, NslHsp26.4-PI, NslHsp25.7-MPII. Методом кількісної ЗТ-ПЛР оцінено профіль експресії цих генів у листках *N. sylvestris* за контрольних умов (25°C) та після короткочасного теплового шоку (37°C і 42°C). За фізіологічно оптимальної температури експресія досліджених sHsp була низькою або відсутньою. Інкубація за температури 37°C викликала суттєву активацію транскрипції генів NslHsp24.4-MPI, NslHsp24.9-PI, NslHsp26.4-PI, NslHsp25.7-MPII, а за 42°C цей ефект посилювався. Водночас два гени – NslHsp-18.1-MPI та NslHsp-21.3-MPI – залишались помірно експресованими навіть за умов більш інтенсивного теплового шоку, що може відображати їхню допоміжну роль у стресовій відповіді.

Отримані дані демонструють класо- та компартмент-специфічний характер індукції sHSP у *N. sylvestris* та розширюють уявлення про молекулярні основи термотолерантності представників роду *Nicotiana*.

Ключові слова: абіотичний стрес, біоінформатичний аналіз, генетичний поліморфізм, експресія генів, мультигенна родина, тепловий стрес, sHSP, *Nicotiana sylvestris*.

Вступ. Здатність рослин виживати за несприятливих умов навколишнього середовища значною мірою визначається ефективністю функціонування їхніх захисних систем на молекулярному рівні. Серед різноманітних абіотичних стресів тепловий вплив є особливо руйнівним, оскільки призводить до денатурації та агрегації клітинних білків, що порушує гомеостаз і знижує життєздатність організму (Haq et al., 2019; Bavisotto et al., 2020; Kang et al., 2022). У відповідь на підвищення температури клітини активують синтез білків теплового шоку (heat shock proteins - HSP). Серед них важливу роль відіграють HSP з малою молекулярною масою 12–42 кДа (small HSP – sHSP, або HSP20), характерною структурною рисою яких є наявність консервативного α -кристалінового домену (ACD) в центральній частині білкової молекули (Yu et al., 2005; Waters & Vierling, 2020). За стресових умов sHSP здатні зв'язуватися з денатурованими білками, утримуючи їх у розчинному стані для подальшої реактивації за участю шаперонів HSP70/HSP100 (Sanmiya et al., 2004; Waters, 2012). Активація

експресії HSP, які забезпечують захист клітинних білків і мембран, спостерігається не лише у відповідь на підвищення температури, але й на інші стреси, такі як посуха, засолення, високі концентрації іонів важких металів, інші токсичні сполуки, ультрафіолетове опромінювання та окиснювальний стрес, які можуть спричиняти порушення нативної конформації білків, їх часткову денатурацію та агрегацію (Liu et al., 2021; Mondal et al., 2023; Cai et al., Peters et al., 2024).

На відміну від інших еукаріотів, рослини мають широкий набір sHSP, які належать до кількох структурних класів (підродин) і локалізуються у різних клітинних компартментах – цитоплазмі, пластидах, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі та пероксисомах (Ji et al., 2019; Huang et al., 2022; Kozub & Panchuk, 2024a). Відповідно, sHSP рослин кодуються мультигенними родинами, причому різні види мають різну кількість таких генів. Зокрема, у *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано 19 генів sHsp, у *Oryza sativa* (рис) – 35, у *Glycine max* (соя) – 51, у *Capsicum annuum* (перець) – 35,

у *Nicotiana attenuata* (койотовий тютюн) – 52. (Siddique et al., 2008; Guo et al., 2015; Waters & Vierling, 2020; Guo et al., 2020; Kozub et al., 2024b; Kozub et al., 2026). Наявність великої кількості sHSP пояснюється прикріпленням способом життя рослин та їхньою постійною залежністю від умов навколишнього середовища. Велика кількість генів sHsp дає можливість гнучко реагувати на різні види стресу.

Показано, що sHSP у рослин практично не експресуються у вегетативних тканинах за фізіологічно оптимальних температур, але індукуються за дії теплового стресу, причому окремі члени мультигенних родин демонструють компартмент- і тканинно-специфічні патерни експресії. Наприклад, у гарбуза мускатного *Cucurbita moschata* деякі гени родин Hsp20 різко індукуються високою температурою, тоді як інші реагують слабо, що відображає функціональну диверсифікацію членів мультигенних родин (Hu et al., 2021). Вважається, що індукція експресії sHsp за дії теплового та інших видів абіотичного стресу є високо видо-, тканино- та компартмент-специфічною (Guo et al., 2020; Bourguine & Guihur, 2021; Friedrich et al., 2021; Hu et al., 2021).

Структурний поліморфізм, молекулярна еволюція та регуляція експресії генів sHsp все ще залишаються недостатньо дослідженими для багатьох таксонів покритонасінних рослин, зокрема, для представників роду *Nicotiana* (родина Solanaceae). Раніше для аллотетраплоїдного виду *N. tabacum* нами було ідентифіковано 11 генів, які кодують цитозольні sHsp та оцінено їх експресією під час розвитку пилку та за дії теплового та холодного стресів (Volkov et al., 2005). Нещодавно ми здійснили біоінформатичний аналіз мультигенної родини sHsp у диплоїдного виду *N. attenuata*. Було виявлено 52 гени sHsp, які належать до 15 структурних класів (Kozub et al., 2026). Метою даної роботи було ідентифікувати гени sHsp у геномі іншого диплоїду, *N. sylvestris* (який є донором материнського субгеному *N. tabacum* – Goodspeed & Thompson, 1959; Miroshnichenko et al., 1988) та визначити характер експресії за умов теплового стресу генів, які кодують мітохондріальні та пластидні sHSP.

Матеріали та методи. Виявлення генів sHsp у геномі *N. sylvestris* здійснювали з використанням анотованої референтної версії ASM39365v2 (GCF_000393655.2). Початковий пошук амінокислотних послідовностей sHsp проводили в базі даних GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) із застосуванням алгоритму BLASTp (Boratyn et al.,

2013; Samal et al., 2021). Як запити для пошуку використовували описані раніше амінокислотні послідовності sHSP *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum* та *N. attenuata* (Scharf et al., 2001; Siddique et al., 2008; Yu et al., 2016; Zhao et al., 2018; Kozub et al., 2026). Для подальшого аналізу відбирали послідовності, які містили ACD та мали молекулярну масу не більше 42 кДа, що вважається характерною ознакою sHSP (Haslbeck & Vierling, 2015; Hassan et al., 2020; Hagymasi et al., 2022).

Передбачення субклітинної локалізації sHSP здійснювали за допомогою інструментів WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp>), та TargetP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>).

Рослинний матеріал та умови вирощування. Насіння *N. sylvestris*, яке було отримано від Botanic Gardens Conservation International (Великобританія), стерилізували та висаджували по одній насінині у прозорий контейнер з агаризованим живильним середовищем MS (Murashige & Skoog, 1962) без додавання вітамінів та сахарози. Рослини вирощували в культурі *in vitro* у кліматичній камері протягом 4 тижнів до стадії 6 листків за температури 25°C з фотоперіодом 16/8.

Умови теплового стресу. Для здійснення теплового стресу контейнери інкубували у темряві на термостатованій водяній бані за 37°C або 42°C протягом 2 год. Контрольні рослини утримували за 25°C. Після закінчення стресової обробки листки заморожували у рідкому азоті та зберігали за -70°C.

Виділення РНК та синтез кДНК. Загальну РНК виділяли із 100–200 мг рослинного матеріалу з використанням гуанідину для лізису (Kingston et al., 1996). Концентрацію та чистоту препаратів контролювали спектрофотометрично. Фракцію полі(А)-РНК виділяли з використанням набору NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs). Перший ланцюг кДНК синтезували за допомогою набору ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) відповідно до інструкцій виробника.

Кількісна ПЛР. Ампліфікацію кДНК проводили у реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила 5 мкл 5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix, 0,5 мкМ ген-специфічні праймери та 1 мкл кДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі CFX96 (Bio-Rad) за програмою: (1) початкова активація полімерази - 95°C, 12 хв; (2) денатурація ДНК - 95°C, 15 с; (3) гібридизація праймерів - 60°C, 30 с; (4) синтез ДНК - 72°C, 40 с. Загальна кількість циклів ампліфікації – 42.

Рівень транскрипції нормалізували відносно референтного гену рибосомного білка L25, рівень експресії якого приймали за 100 у.о. (умовних одиниць) (Volkov et al., 2003).

Статистичний аналіз. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок. Зміни рівня експресії у 2 або більше разів були статистично достовірними.

Результати та їх обговорення. За результатами біоінформатичного скринінгу встановлено, що у *N. sylvestris* мультигенна родина *sHsp* нараховує 48 членів. Попередньо нами в геномі цього виду було виявлено 24 гени (Козуб та Панчук, 2024). Отже, використання для аналізу оновленої референтної збірки геному *N. sylvestris* ASM39365v2 (GCF_000393655.2) дозволило додатково ідентифікувати 24 гени *sHsp* (табл. 1). За структурними особливостями та передбаченою клітинною локалізацією *sHSP* *N. sylvestris* розподіляються між 16 структурними класами, які були виявлені нами раніше у *N. attenuata* та у інших представників родини Solanaceae, *S. lycopersicum* та *S. tuberosum* (Kozub et al., 2026). В цілому, більшість *sHsp* генів *N. sylvestris* можна вважати гомологами відповідних генів *N. attenuata*, у якого мультигенна родина *sHsp* нараховує 52 члени. Проте, у *N. sylvestris* також ідентифіковано ген *NslHSP-15.7-CV* класу CV, який відсутній у *N. attenuata*, але наявний у *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. Імовірно, цей ген було втрачено з геному *N. attenuata* після його дивергенції від *N. sylvestris*.

У попередніх дослідженнях у *N. tabacum* було охарактеризовано експресію генів, які кодують цитоплазматичні *sHSP* (Volkov et al., 2005). Відповідно, у подальших експериментах ми вирішили дослідити характер індукції за дії теплового стресу генів, які кодують пластидні та мітохондріальні *sHSP*, а саме – *NslHsp18.1-MPI*, *NslHsp21.3-MPI*, *NslHsp24.4-MPI*, *NslHsp24.9-PI*, *NslHsp26.4-PI*, *NslHsp25.7-MPII*. Для визначення рівня мРНК цих генів у листках *N. sylvestris* було здійснено кількісний ЗТ-ПЛР-аналіз із використанням ген-специфічних праймерів.

Отримані дані свідчать, що за фізіологічно оптимальної температури 25°C рівень експресії шести досліджуваних генів був низьким або практично відсутнім (рис. 1). Інкубація рослин за 37°C протягом 2 год призводила до суттєвого підняття рівня мРНК чотирьох генів. Зокрема, рівень експресії *NslHsp-24.9-PI* та *NslHsp-25.7-MPII* зростав до 193 та 178 у.о., тобто у 175 та 39 разів, відповідно. Ще більш високим ставав

рівень мРНК *NslHsp-24.4-MPI* та *NslHsp-26.4-PI* – 1705 та 994 у.о., що відповідає зростанню експресії у 208 та 1169 разів порівняно із температурою 25°C. Натомість експресія двох генів, *NslHsp-18.1-MPI* та *NslHsp-21.3-MPI*, практично не зростала під час інкубації за 37°C.

Обробка рослин *N. sylvestris* за температури 42°C спричинила більш суттєве посилення транскрипційної відповіді. Найвищий рівень мРНК спостерігався для гена *NslHsp-26.4-PI* – 3345 у.о., що відповідає індукції у 3935 разів. Така висока експресія цього гена вказує на його важливу роль у відповіді на тепловий стрес. Крім того, за температури 42°C значне зростання рівня мРНК – до 2582, 1141 та 943 у.о. (тобто, в 315, 1037 та 205 разів) – продемонстрували гени *NslHsp-24.4-MPI*, *NslHsp-24.9-PI* та *NslHsp-25.7-MPII*. Також відбулось зростання експресії генів *NslHsp-18.1-MPI* та *NslHsp-21.3-MPI*, в 5,9 та 350 разів, хоча вміст відповідних мРНК досягав лише помірного рівня, 10 та 21 у.о.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що у *N. tabacum* за температури 42°C відбувається значне підвищення експресії генів, які кодують цитозольні *sHSP* класів СІ та СІІ: залежно від гена, максимальний рівень мРНК у листках сягав рівня від 320 до 11600 у.о. (Volkov et al., 2005). Згідно із нашими новими даними, у *N. sylvestris* для генів пластидних та мітохондріальних *sHSP* цей показник знаходиться у межах від 10 у.о. для *NslHsp-18.1-MPI* до 3345 у.о. для *NslHSP-26.4-PI*, тобто є помітно нижчим. Таке менш виражене накопичення мРНК пластидних та мітохондріальних *sHSP* вказує на компартмент-специфічний характер індукції захисних білків за умов теплового стресу.

Отримані результати свідчать, що у *N. sylvestris* тепловий стрес за температури 42°C викликає сильнішу експресію генів мітохондріальних та пластидних *sHSP*, ніж за 37°C. При цьому, досліджувані *sHsp* гени демонструють різні температурні пороги активації: експресія чотирьох генів значно зростає вже за 37°C, тоді як два гени, *NslHsp-18.1-MPI* та *NslHsp-21.3-MPI*, індукуються тільки за 42°C. Такий профіль активації наводить на думку про функціональну спеціалізацію *sHSP*: частина білків залучена у захист органел вже за 37°C, тоді як інші експресуються при подальшому зростанні температури, додатково захищаючи мітохондрії та пластиди.

Таблиця 1.

Характеристика генів та білків sHSP *Nicotiana sylvestris*

Table 1.

Characteristics of sHSP genes and proteins in *Nicotiana sylvestris*

Назва гена			Локус	Номер реєстрації в GenBank	Розмір білка, АК	МВ, кДа	Субклітинна локалізація	Анотація у GenBank
Ця стаття	Козуб та ін., 2024							
Клас CI								
1	<i>NslHsp16.1-CI</i>		104231718	XM_009784769.2	141	16,1	Ц	<i>Class I HSP-like</i>
2	<i>NslHsp17.5A-CI</i>	<i>NsHsp17.5A-CI</i>	104214877	XM_009764599.2	153	17,5	Ц	<i>17.6 kDa class I HSP-like</i>
3	<i>NslHsp17.5B-CI</i>	<i>NsHsp17.5B-CI</i>	104213642	XM_009763174.2	153	17,5	Ц	<i>17.6 kDa class I HSP</i>
4	<i>NslHsp17.5C-CI</i>	<i>NsHsp17.5C-CI</i>	104221085	XM_009772066.2	154	17,5	Ц	<i>17.8 kDa class I HSP –like</i>
5	<i>NslHsp17.5D-CI</i>		104214616	XM_070150089.1	153	17,5	Ц	<i>17.6 kDa class I HSP-like</i>
6	<i>NslHsp17.5E-CI</i>		104241504	XM_009796442.2	153	17,5	Ц	<i>17.6 kDa class I HSP -like</i>
7	<i>NslHsp17.9A-CI</i>	<i>NsHsp17.9-CI</i>	104222203	XM_009773397.2	159	17,9	Ц	<i>17.6 kDa class I HSP 3-like</i>
8	<i>NslHsp17.9B-CI</i>	<i>NsHsp12.0-CI</i>	104223090	XM_009774444.2	159	17,9	Ц	<i>18.2 kDa class I HSP -like</i>
9	<i>NslHsp17.9C-CI</i>		104241491	XM_009796430.2	159	17,9	Ц	<i>18.2 kDa class I HSP -like</i>
10	<i>NslHsp18.1A-CI</i>	<i>NsHsp18.1-CI</i>	104229251	XM_009781855.2	159	18,1	Ц	<i>17.8 kDa class I HSP -like</i>
11	<i>NslHsp18.1B-CI</i>		104211845	XM_009760979.2	159	18,1	Ц	<i>14.7 kDa class I HSP-like</i>
12	<i>NslHsp19.9-CI</i>	<i>NsHsp19.9-CI</i>	104240477	XM_009795322.2	177	19,9	Ц	<i>17.8 kDa class I HSP -like</i>
13	<i>NslHsp20.6-CI</i>		104229575	XM_009782230.2	176	20,6	Ц, Я	<i>18.1 kDa class I HSP -like</i>
Клас CII								
14	<i>NslHsp17.1-CII</i>		138875183	XM_070154007.1	156	17,1	Ц	<i>17.3 kDa class II HSP -like</i>
15	<i>NslHsp17.4A-CII</i>	<i>NsHsp17.4-CII</i>	104211476	XM_009760536.2	157	17,4	Ц	<i>17.3 kDa class II HSP-like</i>
16	<i>NslHsp17.4B-CII</i>		104234814	XM_009788451.2	157	17,4	Ц	<i>17.3 kDa class II HSP -like</i>
17	<i>NslHsp17.4C-CII</i>		138875182	XM_070154006.1	157	17,4	Ц	<i>17.3 kDa class II HSP -like</i>
18	<i>NslHsp17.5-CII</i>	<i>NsHsp17.5-CII</i>	104241461	XM_009796403.2	157	17,5	Ц	<i>17.3 kDa class II HSP -like</i>
19	<i>NslHsp18.3-CII</i>	<i>NsHsp18.3-CII</i>	104217017	XM_009767173.2	161	18,3	Ц	<i>18.8 kDa class II HSP-like</i>
20	<i>NslHsp21.5-CII</i>	<i>NsHsp21.5-CII</i>	104217016	XM_009767172.2	195	21,5	Ц	<i>17.1 kDa class II HSP-like</i>
21	<i>NslHsp41.2-CII</i>		104222638	XM_009773883.2	365	41,2	Я	<i>uncharacterized protein</i>
Клас CIII								
22	<i>NslHsp16.7-CIII</i>	<i>NsHsp16.7-CIII</i>	104246432	XM_009802241.2	150	16,7	ЕІПР	<i>17.4 kDa class III HSP</i>
Клас CV								
23	<i>NslHsp15.7-CV</i>	<i>NsHsp15.7-CV</i>	104214411	XM_009764074.2	137	15,7	Ц	<i>15.4 kDa class V HSP</i>
Клас CVI								
24	<i>NslHsp20.7-CVI</i>		104249035	XM_009805404.2	181	20,7	Хл	<i>21.7 kDa class VI HSP , isof X2</i>
Клас CVII								
25	<i>NslHsp18.4-CVII</i>	<i>NsHsp18.4-CVII</i>	104221035	XM_009772008.2	164	18,4	Ц	<i>16.9 kDa class I HSP 1-like</i>
26	<i>NslHsp18.5-CVII</i>	<i>NsHsp18.5-CVII</i>	104242081	XM_009797062.2	164	18,5	Ц	<i>16.9 kDa class I HSP 1-like</i>
Клас CVIII								
27	<i>NslHsp24.6-CVIII</i>		104245882	XM_009801582.2	217	24,6	Ц, Г	<i>17.5 kDa class I HSP -like</i>

Клас NPI								
28	<i>NslHsp24.6-NPI</i>		104220253	XM_009771084.2	232	24,6	Я	<i>alpha-crystallin domain-containing protein 22.3-like</i>
29	<i>NslHsp21.8-NPI</i>		104242838	XM_009797943.2	201	21,8	Я	<i>increased DNA methylation 3-like</i>
Клас NPII								
30	<i>NslHsp17.7-NPII</i>	<i>NsHsp17.7-CVI</i>	104228807	XM_009781349.2	224	17,7	Я, Ц	<i>uncharacterized protein</i>
31	<i>NslHsp28.5-NPII</i>		104245497	XM_009801112.2	259	28,5	Хл	<i>heat shock 22 kDa protein, chloroplastic-like</i>
Клас MCIII								
32	<i>NslHsp36.3-MCIII</i>		104222338	XM_009773566.2	324	36,3	Ц	<i>uncharacterized protein</i>
33	<i>NslHsp34.3-MCIII</i>		104211200	XM_009760214.2	299	34,3	Ц	<i>uncharacterized protein</i>
Клас MCIV								
34	<i>NslHsp18.9-MCIV</i>		104249310	XM_009805707.2	171	18,9	Ц, Г	<i>uncharacterized protein</i>
35	<i>NslHsp17.4-MCIV</i>		104249030	XM_009805399.2	154	17,4	Ц	<i>16.9 kDa class I HSP 1-like</i>
36	<i>NslHsp28.0-MCIV</i>		104210544	XM_009759469.2	253	28	Г	<i>inactive protein RESTRICTED TEV MOVEMENT 2-like</i>
37	<i>NslHsp29.3-MCIV</i>		104240330	XM_070156439.1	266	29,3	Г	<i>inactive protein RESTRICTED TEV MOVEMENT 2-like</i>
38	<i>NslHsp27.3-MCIV</i>		104236408	XM_009790325.2	244	27,3	Г	<i>inactive protein RESTRICTED TEV MOVEMENT 2-like</i>
Клас MPI								
39	<i>NslHsp24.4A-MPI</i>	<i>NsHsp24.4-M</i>	104215007	XM_009764740.2	216	24,4	Хл	<i>sHSP, chloroplastic-like</i>
40	<i>NslHsp18.1-MPI</i>		104211845	XM_009760979.2	168	18,1	М, Хл	<i>14.7 kDa HSP -like</i>
41	<i>NslHsp21.3-MPI</i>	<i>NsHsp21.3-M</i>	104215006	XM_009764739.2	192	21,3	Хл	<i>22 kDa HSP, mitochondrial-like</i>
Клас MPII								
42	<i>NslHsp25.7-MPII</i>	<i>NsHsp25.7-M</i>	104235038	XM_009788708.1	230	25,7	М	<i>26.5 kDa HSP, mitochondrial-like</i>
Клас PI								
43	<i>NslHsp24.9-PI</i>	<i>NsHsp24.9-P</i>	104228771	XM_009781309.2	217	24,9	Хл	<i>HSP, chloroplastic-like</i>
44	<i>NslHsp26.4-PI</i>	<i>NsHsp26.4-P</i>	104238959	XM_009793483.2	241	26,4	Хл	<i>sHSP, chloroplastic</i>
Клас Po								
45	<i>NslHsp15.8-Po</i>	<i>NsHsp15.8-Per</i>	104228857	XM_009781403.2	143	15,8	П	<i>15.7 kDa HSP, peroxisomal</i>
Клас ER								
46	<i>NslHsp16.7-ER</i>	<i>NsHsp16.7-CIV</i>	104215399	XM_009765184.2	192	16,7	В, ЕПП	<i>22.0 kDa class IV HSP-like</i>
47	<i>NslHsp21.6-ER</i>	<i>NsHsp21.6- CIV</i>	104211485	XM_009760546.2	190	21,6	Ц, ЕПП	<i>18.1 kDa class I HSP-like</i>
48	<i>NslHsp22.3-ER</i>		104230569	XM_009783409.2	198	22,3	В	<i>22.0 kDa class IV HSP</i>

Примітка: Класифікація Hsp генів наведена згідно із Kozub et al., 2026. В – вакуоля, Г – апарат Гольджі, ЕПП – ендоплазматичний ретикулум, М – мітохондрії, П – пероксисома, ХЛ – хлоропласти, Ц – цитозоль, Я – ядро

Note: Classification of Hsp genes is given according to Kozub et al., 2026. В – vacuole, Г – Golgi apparatus, ЕПП – endoplasmic reticulum, М – mitochondria, П – peroxisome, ХЛ – chloroplasts, Ц – cytosol, Я – nucleus

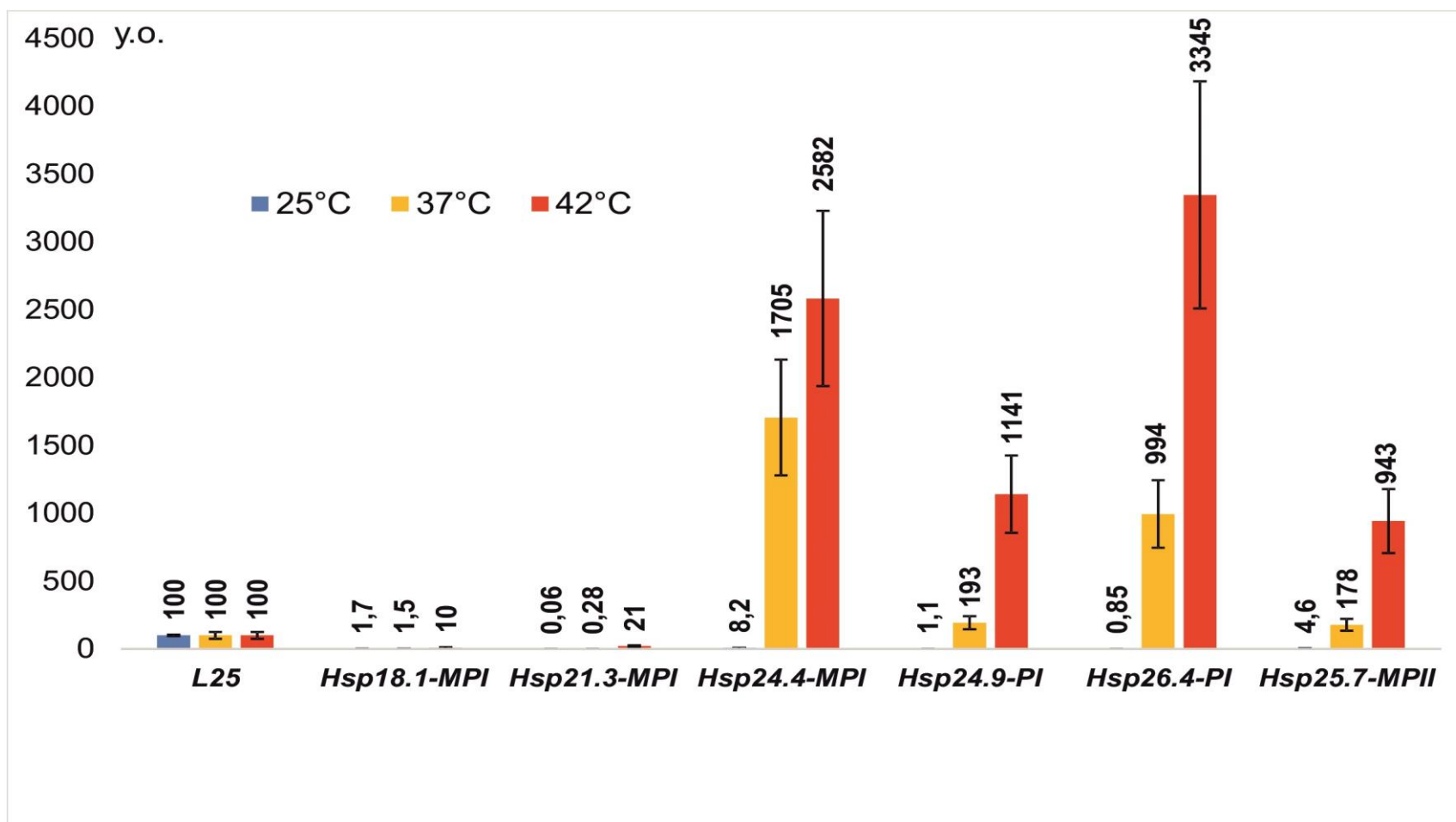


Рис. 1. Рівень експресії генів sHSP у рослин *Nicotiana sylvestris* за умов теплового стресу (25°C - контроль, 37°C та 42°C), у відносних одиницях (у.о.)

Fig. 1. Expression level of sHSP genes in *Nicotiana sylvestris* plants under heat stress conditions (25°C - control, 37°C and 42°C), in relative units (r.u.)

Аналогічна картина спостерігалась раніше і для інших видів рослин. Зокрема, сильна активація експресії окремих sHSP та їхній геноспецифічний характер продемонстровано в *Oryza sativa*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata* та *S. tuberosum*, у яких різні підродини HSP20 демонструють різні пороги і ступені індукції за дії тепла (Zhao et al., 2018; Guo et al., 2020; Hu et al., 2021; Huang et al., 2022).

Слід зазначити, що у *N. sylvestris* навіть за температури 42°C рівень мРНК деяких sHsp генів, *NslHsp-18.1-MPI*, *NslHsp-21.3-MPI*, сягає лише помірного рівня, 10 та 21 у.о. Імовірним поясненням такого характеру експресії може бути те, що відповідні sHSP грають додаткову (допоміжну) роль у захисній реакції на тепловий стрес, або ж помірна експресія на рівні мРНК може компенсуватись регуляцією на посттранскрипційному/посттрансляційному рівні (Muthusamy et al., 2017; Peters et al., 2024).

Висновки. У геномі *Nicotiana sylvestris* наявні 48 генів sHsp, які кодують білки, що належать до 16 структурних класів та мають різну передбачувану субклітинну локалізацію.

Список літератури / References:

1. Bavisotto, C. C., Alberti, G., Vitale, A. M., Paladino, L., Campanella, C., Rappa, F., Gorska, M., De Macario, E. C., Cappello, F., Macario, A. J. L., & Gammazza, A. M. (2020). HSP60 post-translational modifications: functional and pathological consequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 95. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00095>
2. Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E. W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W29–W33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
3. Bourguin, B., & Guihur, A. (2021). Heat shock signaling in land plants: From plasma membrane sensing to the transcription of small heat shock proteins. *Frontiers in Plant Science*, 12, 710801. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710801>
4. Cai, G., Niu, M., Sun, Z., Wang, H., Zhang, S., Liu, F., Wu, Y., & Wang, G. (2024). A small heat shock protein (SHSP17.3) in tomato plays a positive role in salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1443625>
5. Friedrich, T., Oberkofler, V., Trindade, I., Altmann, S., Brzezinka, K., Lämke, J., Gorka, M., Kappel, C., Sokolowska, E., Skirycz, A., Graf, A., & Bäurle, I. (2021). Heteromeric HsFA2/HsFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in Arabidopsis. *Nature Communications*, 12, 3426. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23786-6>
6. Goodspeed, T., & Thompson, M. (1959). Cytotaxonomy of *Nicotiana*. *Botanical Review*, 25(2), 385–415. <http://www.jstor.org/stable/4353598>
7. Guo, L.-M., Li, J., He, J., Liu, H., & Zhang, H.-M. (2020). A class I cytosolic HSP20 of rice enhances heat and salt tolerance in different organisms. *Scientific Reports*, 10, 1383. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58395-8>
8. Guo, M., Liu, J.-H., Lu, J.-P., Zhai, Y.-F., Wang, H., Gong, Z.-H., Wang, S.-B., & Lu, M.-H. (2015). Genome-wide analysis of the CaHsp20 gene family in pepper: Comprehensive sequence and expression profile analysis under heat stress. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00806>
9. Hagymasi, A. T., Dempsey, J. P., & Srivastava, P. K. (2022). Heat-shock proteins. *Current Protocols*, 2(11), e592. <https://doi.org/10.1002/cpz1.592>
10. Haq, S. U., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W., Zhang, H., Wei, A., & Gong, Z. (2019). Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5321. <https://doi.org/10.3390/ijms20215321>
11. Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1537–1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
12. Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Barbanti, L., Aamer, M., Iqbal, M. M., Nawaz, M., Mahmood, A., Ali, A., & Aslam, M. T. (2020). Heat stress in cultivated plants: nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies - a review.

13. Hu, Y., Zhang, T., Liu, Y., Li, Y., Wang, M., Zhu, B., Liao, D., Yun, T., Huang, W., Zhang, W., & Zhou, Y. (2021). Pumpkin (*Cucurbita moschata*) HSP20 gene family identification and expression under heat stress. *Frontiers in Genetics*, 12, 753953. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.753953>.
14. Huang, J., Hai, Z., Wang, R., Yu, Y., Chen, X., Liang, W., & Wang, H. (2022). Genome-wide analysis of HSP20 gene family and expression patterns under heat stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13, 968418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.968418>
15. Ji, X.-R., Yu, Y.-H., Ni, P.-Y., Zhang, G.-H., & Guo, D.-L. (2019). Genome-wide identification of small heat-shock protein (HSP20) gene family in grape and expression profile during berry development. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2031-4>
16. Kang, Y., Lee, K., Hoshikawa, K., Kang, M., & Jang, S. (2022). Molecular bases of heat stress responses in vegetable crops with focusing on heat shock factors and heat shock proteins. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837152>
17. Kingston, R.E., Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1996). Guanidine methods for total RNA preparation. *Current Protocols in Molecular Biology*, 36: 4.2.1-4.2.9. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0402s36>
18. Kozub, L. V., Tynkevich, Y. O., Volkov, R. A., & Panchuk, I. I. (2026). Identification and analysis of the organization of sHsp genes in *Nicotiana attenuata* and *Solanum lycopersicum* (Solanaceae). *Cytology and Genetics*, 60(1), 21–40. <https://doi.org/10.3103/s0095452726010044>
19. Kozub, L., & Panchuk, I. (2024a). Bioinformatic analysis of the coding sequences of *Nicotiana sylvestris* sHSP. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 16(1), 31–40. <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.01.031>
20. Kozub, L., & Panchuk, I. (2024b). Identification and bioinformatics analysis of sHSP genes in *Oryza sativa*. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 16(3). <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.03.280>
21. Liu, Y.-L., Liu, S., Xiao, J.-J., Cheng, G.-X., Ul, H. S., & Gong, Z.-H. (2021). CaHSP18.1a, a small heat shock protein from pepper (*Capsicum annuum* L.), positively responds to heat, drought, and salt tolerance. *Horticulturae*, 7(5), 117. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7050117>
22. Lopes-Caitar, V. S., De Carvalho, M. C., Darben, L. M., Kuwahara, M. K., Nepomuceno, A. L., Dias, W. P., Abdelnoor, R. V., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2013). Genome-wide analysis of the Hsp 20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, 14(1), 577. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-577>
23. Miroshnichenko, G., Volkov, R., & Kostyshin, S. (1988). Divergence of the polynucleotide sequences of DNA in interspecies Solanaceae hybrids. *Biochemistry-Moscow*, 53(4), 492–498.
24. Mondal, S., Karmakar, S., Panda, D., Pramanik, K., Bose, B., & Singhal, R. K. (2023). Crucial plant processes under heat stress and tolerance through heat shock proteins. *Plant Stress*, 10, 100227. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100227>.
25. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
26. Muthusamy, S. K., Dalal, M., Chinnusamy, V., & Bansal, K. C. (2017). Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat. *Journal of plant physiology*, 211, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.01.004>
27. Peters, C., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2024). Catchers of folding gone awry: A tale of small heat shock proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 49(12), 1063–1078. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2024.08.003>.
28. Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST program and a step-by-step guide for its use in life science research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*. <https://doi.org/10.18805/bkap283>
29. Sanmiya, K., Suzuki, K., Egawa, Y., & Shono, M. (2004). Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Letters*, 557(1–3), 265–268. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01494-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01494-7)
30. Scharf, K., Siddique, M., & Vierling, E. (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 225. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0225:tefoat>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0225:tefoat>2.0.co;2)
31. Siddique, M., Gernhard, S., Von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. (2008). The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress and Chaperones*, 13(2), 183–197. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0032-6>
32. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., & Schöffl, F. (2003). Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: The potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany*, 54(391), 2343–2349. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg244>
33. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., & Schöffl, F. (2005). Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 57(4), 487–502. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0339-y>
34. Waters, E. R. (2012). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 391–403. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers355>
35. Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins - evolutionary and functional diversity.

- New *Phytologist*, 227(1), 24–37.
<https://doi.org/10.1111/nph.16536>
36. Yu, J. H., Kim, K. P., Park, S. M., & Hong, C. B. (2005). Biochemical analysis of a cytosolic small heat shock protein, NtHSP18.3, from *Nicotiana tabacum*. *Molecules and Cells*, 19(3), 328–333.
[https://doi.org/10.1016/s1016-8478\(23\)13176-1](https://doi.org/10.1016/s1016-8478(23)13176-1)
37. Yu, J., Cheng, Y., Feng, K., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., ... Wan, H. (2016). Genome-wide identification and expression profiling of tomato Hsp20 gene family in response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01215>
38. Zhao, P., Wang, D., Wang, R., Kong, N., Zhang, C., Yang, C., ... Chen, Q. (2018). Genome-wide analysis of the potato Hsp20 gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to heat stress. *BMC Genomics*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4443-1>

EXPRESSION OF PLASTIDIAL AND MITOCHONDRIAL sHSP GENES IN *NICOTIANA SYLVESTRIS* UNDER HEAT STRESS

L. V. Kozub, I. I. Panchuk

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
 2 Kotsiubynskoho st., 58002 Chernivtsi, Ukraine
 e-mai: i.panchuk@chnu.edu.ua

Understanding the mechanisms that protect plants against elevated temperatures has become particularly important under climate change. Small heat shock proteins (sHSPs) play a key role in maintaining protein homeostasis and regulating plant responses to stress factors, particularly heat stress. In this study, a bioinformatic and experimental analysis of the sHsp gene family in *Nicotiana sylvestris* was performed. The use of an updated annotated genome assembly enabled the identification of 48 sHsp genes, representing a substantial expansion compared with previous reports. These genes were assigned to 16 structural classes, including proteins with different predicted subcellular localizations.

For further analysis, six genes encoding sHSPs localized to plastids and mitochondria were selected: NslHsp18.1-MPI, NslHsp21.3-MPI, NslHsp24.4-MPI, NslHsp24.9-PI, NslHsp26.4-PI, and NslHsp25.7-MPII. The expression profiles of these genes were assessed by quantitative RT-PCR in leaves of *N. sylvestris* under control conditions (25°C) and after short-term heat shock treatments at 37°C and 42°C. At the physiologically optimal temperature, the expression levels of the investigated sHsp genes were low or undetectable. Incubation at 37°C resulted in a marked induction of expression of NslHsp24.4-MPI, NslHsp24.9-PI, NslHsp26.4-PI, and NslHsp25.7-MPII, and this effect became even more pronounced at 42°C. In contrast, two genes, NslHsp18.1-MPI and NslHsp21.3-MPI, remained only moderately expressed even under more severe heat stress conditions, which may reflect their auxiliary role in the stress response.

These findings demonstrate the class- and compartment-specific patterns of sHSP induction in *N. sylvestris* and expand our understanding of the molecular basis of thermotolerance in members of the genus *Nicotiana*.

Keywords: abiotic stress, bioinformatic analysis, genetic polymorphism, gene expression, multigene family, heat stress, sHSP, *Nicotiana sylvestris*.

Отримано редколегією 17.05.2026 р.
 Підписано до друку 15.06.2026 р.
 Дата публікації 30.06.2026 р.

ORCID ID

Людмила Козуб: <https://orcid.org/0000-0002-2675-5896>

Ірина Панчук: <https://orcid.org/0000-0002-2837-4480>