

УДК 577.122.5:58.036:581.57

**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ НА ВМІСТ
ТА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ СПЕКТР БІЛКІВ РІЗНИХ ОРГАНІВ
PHASEOLUS VULGARIS L. І *ZEA MAYS* L. НА РАННІХ ЕТАПАХ
ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗВИТКУ**

© 2007 р. **І. В. Косаківська, І. В. Голов'янюк**

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Досліджували особливості змін вмісту та електрофоретичного спектра білків різних органів *Phaseolus vulgaris* і *Zea mays* за температурних стресів на ранніх етапах вегетації. Після дії низькотемпературного (+2...+4 °С, 2 год) і високотемпературного (+40...+42 °С, 2 год) стресів вміст білків у різних органах 72-годинних проростків обох видів знижувався, але з неоднаковою інтенсивністю. Виявлено відмінності електрофоретичного спектра білків як на рівні окремих органів проростків квасолі, так і за реакцією на дію нелетальної високої та низької температур. Ідентифіковано посилення синтезу білків родини БТШ 70, окремих високомолекулярних та родини низькомолекулярних (39-10 кД) поліпептидів за умов температурних стресів.

Ключові слова: *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, БТШ, стресові білки, температурний стрес, адаптація

Температура навколишнього середовища є детермінуючим фактором розповсюдження рослин у природі. Встановлено, що реакція білкової системи рослин на поступову зміну температурного режиму та нетривалі температурні стреси різняться між собою [19]. За різкої зміни температур та дії інших стресорів у клітинах еукаріот відбувається пригнічення синтезу більшості конститутивних білків та активний синтез стресових білків [1, 3, 4, 6, 15, 17, 24].

Синтез білків теплового шоку (БТШ) ні активні досліджується в культурі клітин, ізольованих протопластах, різних органах рослин. Водночас мало досліджень стосується характеру змін, що мають місце у біосинтезі білка у різних органах одно- та дводольних рослин на ранніх етапах вегетативного розвитку за умов температурних стресів. Далеко не повністю з'ясована їх можлива роль у формуванні загального адаптаційного синдрому. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення вмісту

та електрофоретичних спектрів білків різних органів *Phaseolus vulgaris* L. та *Zea mays* L. на ранніх етапах вегетативного розвитку за умов теплового та холодного температурних стресів.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були проростки низькорослої спаржевої квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.) сорту Білозерна та кукурудзи (*Zea mays* L.) сорту Дніпровська 247. Відкаліброване за розміром і масою насіння після стерилізації етанолом замочували на 3 год у воді і промочували на вологому фільтрувальному папері при температурі 26°C у термостаті 72 год, після чого частину проростків витримували за температури +40...42°C 2 год (тепловий шок) або переносили в низькотемпературний термостат +2...4°C 2 год (холодовий шок). Оскільки відомо, що клітини сім'ядолей квасолі під час проростання не діляться і не розтягуються, а лише внаслідок відтоку запасних речовин старіють і відмирають [4], основна увага була зосереджена на вивченні органів зародкової осі. У зрілому насінні зародкова вісь добре диференційо-

Адреса для кореспонденції: Косаківська Ірина Василівна,
Інститут ботаніки НАН України, вул. Терещенківська, 2,
Київ, 01601, Україна;
e-mail: physioplants@mail.ru

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ

вана морфологічно і має довжину близько 5 мм. Її легко розділити на зародковий корінь з кореневим чохликом, гіпокотиль і епікотиль з первинними листками. Зріле насіння злаків поділяють на корінь з кореневим чохликом, мезокотиль і колеоптіль з первинним листком, на яких проводились дослідження. Саме стадії розвитку, пов'язані з певними фізіологічними подіями, зумовили термін фіксації матеріалу. Для дослідів був обраний етап найбільшої мітотичної активності клітин проростків – 72 год.

Для виділення білка використовували різні органи проростків *Ph. vulgaris* та *Z. mays*. Рослинний матеріал розтирали в охолодженій ступці і білок екстрагували у 50 mM Tris-HCl буфері (pH 6,8), що містив 0,3 M сахарозу, 8 mM EDTA, 4 mM DTT, 2 mM PMSF. Отриманий гомогенат рослинної тканини центрифугували при 10000 g 15 хв і надалі використовували для SDS-електрофорезу у поліакриламідному гелі, попередньо визначивши у ньому концентрацію білка за методом Бредфорд [11].

Білки розділяли за допомогою денатуруючого електрофорезу в градієнтному (10-15 %) ПААГ за методом Leammli [18] з деякими модифікаціями. Кількість нанесеного білка складала 35-40 мкг/мл. Як маркери використовували білки стандартного набору фірми «Fermentas», що мали мол. маси: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 та 10 кД. Для ідентифікації білків використовували програму

TotalLab 2.1. Кожний дослід проводили не менше 2-3 разів у 2-кратній повторності.

Обробка отриманих даних проводилася за правилами множинної статистики [7] з використанням пакета програм Microsoft EXCEL.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Порівняльне вивчення вмісту загального білка у різних органах одно- та дводольних рослин на ранніх етапах вегетативного розвитку в контролі та за умов температурних стресів виявило відмінності у реакції на стресові впливи білкової системи *Ph. vulgaris* та *Z. mays*. Так, у листках проростків *Ph. vulgaris* відзначений найбільший вміст білка, тоді як у коренях рослин він був найменшим (рис. 1). Листки проростків *Z. mays* також характеризувалися найбільшим вмістом білка. Найменший вміст білка виявлено у коренях рослин (рис. 2). Встановлено, що за умов як теплового (2 год, +40...42°C), так і холодого (2 год, +2...4°C) стресу вміст білка в усіх органах аналізованих рослин зменшувався (рис. 1, 2). Зменшення загального вмісту білка у різних органах одно- та дводольних рослин за стресових умов, ймовірно, зумовлений посиленням розщеплення їх протеазами та пригніченням синтезу конституційних білків. Найбільш чутливим органом проростків *Ph. vulgaris* до впливу температурних стресів виявився гіпокотиль. За умов теплового шоку вміст білка у ньому зменшувався майже вдвічі.

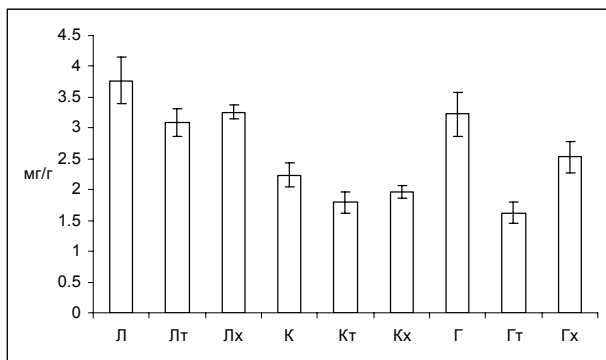


Рис. 1. Вміст загального білка в зародкових органах *Phaseolus vulgaris* на ранніх етапах розвитку (72 год). Л – листки, Лт – листки за умов теплового шоку (+40...42°C, 2 год.), Лх – листки за умов холодого шоку (+2...4°C, 2 год.); Г – гіпокотиль, Гт – гіпокотиль за умов теплового шоку, Гх – гіпокотиль за умов холодого шоку; К – корінь, Кт – корінь за умов теплового шоку, Кх – корінь за умов холодого шоку.

Тут і на рис. 2: бари – довірчі інтервали середніх арифметичних значень за $p \leq 0,05$.

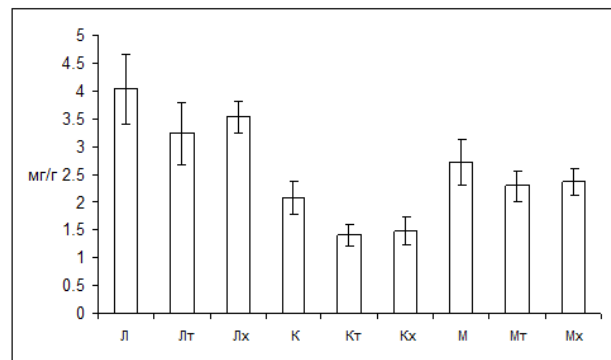


Рис. 2. Вміст загального білка в зародкових органах *Zea mays L.* на ранніх етапах розвитку (72 год). Л – листки, Лт – листки за умов теплового шоку (+40...42°C, 2 год.), Лх – листки за умов холодого шоку (+2...4°C, 2 год.); К – корінь, Кт – корінь за умов теплового шоку, Кх – корінь за умов холодого шоку; М – мезокотиль, Мт – мезокотиль за умов теплового шоку, Мх – мезокотиль за умов холодого шоку.

У той же час холодний стрес викликав незначне зменшення вмісту білка у гіпокотилі (рис. 1). У проростків *Z. mays* найбільш чутливим до стресових впливів виявився корінь, у якому за умов теплового стресу також встановлене значне зменшення вмісту білка. Холодний стрес викликав незначне зменшення вмісту білка (рис. 2). Таким чином, виявлені особливості у характері накопичення загального білка у різних органах проростків одно- та дводольних рослин на ранніх етапах вегетативного розвитку за умов нетривалих температурних стресів.

В літературі є багато відомостей про те, що підвищення тепло- та холодостійкості клітин рослин після теплового та холодного шоку відповідно, позитивно корелює із синтезом і накопиченням стресових білків [1, 6, 15, 24]. Для перевірки цього висновку стосовно проростків квасолі досліджувався спектр білків, що синтезуються за стресових умов. Для досліджень змін спектра білків цей об'єкт було обрано на підставі відомостей про природні ареали двох досліджуваних видів. *Ph. vulgaris* має очевидно вужчу екологічну амплітуду за фактором температури, ніж *Z. mays*, який зростає в аридних умовах Центральної Америки [5]. Таким чином, реакція, принаймні на тепловий стрес, у квасолі повинна бути більш вираженою, ніж у кукурудзи.

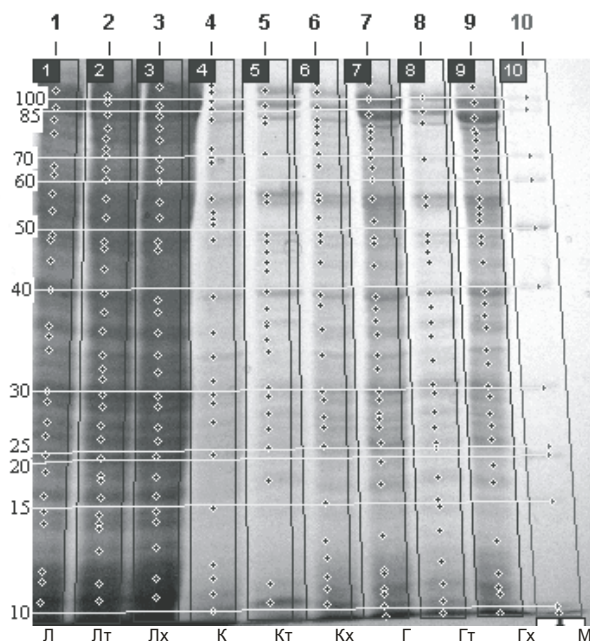


Рис. 3. Електрофореграма білків проростків *Ph. vulgaris*. Л – листки, Лт – листки за умов теплового шоку (+40...42°C, 2 год), Лх – листки за умов холодного шоку (+2...+4°C, 2 год); Г – гіпокотиль, Гт – гіпокотиль за умов теплового шоку, Гх – гіпокотиль за умов холодного шоку; К – корінь, Кт – корінь за умов теплового шоку, Кх – корінь за умов холодного шоку, М – маркер.

Методом диск електрофорезу в ПААГ було досліджено спектральний склад білків різних органів 72-годинних проростків *Ph. vulgaris*, які зазнали впливу короточасного теплового та холодного температурних стресів. На рис. 3 представлена електрофореграма білків листків (Л), гіпокотилі (Г) та кореня (К) проростків квасолі контрольного варіанта (1,4,7), рослин, що зазнали дії теплового (2,5,8) та холодного шоку (3,6,9). Виявлено відмінності як на рівні окремих органів, так і в реакції на дію нелетальної високої та низької температури. В усіх органах аналізованих рослин зміна температури призводила до послаблення синтезу білків, характерних для нормальних умов, та появи стресових білків, що належать до родин БТШ 60 (Мм 53-62 кД), БТШ 70 (Мм 63-78 кД), БТШ 90 (Мм 80-95 кД), БТШ 100 (Мм 104-110 кД) і низькомолекулярних БТШ (Мм 10-39 кД) (таблиця).

Встановлено, що температурні стреси супроводжувалися посиленням утворення білків родини БТШ 70, які, зокрема, були знайдені і в спектрах білків контрольних рослин (таблиця). Поліпептиди родини БТШ 70 знайдено в усіх клітинних компартментах. Відомо, що БТШ 70 здатні попереджати помилки в процесі білкового синтезу, можуть виступати медіаторами білкової транслокації через мембрани мітохондрій, хлоропластів та ендоплазматичного ретикулулу [22, 23]. Вони вступають у короточасну взаємодію з новосинтезованими цитоплазматичними білками, сприяють укладанню останніх у нативну конформацію, попереджають накопичення денатурованих поліпептидів, які утворюються внаслідок теплового або інших видів стресу [9, 26].

За умов теплового стресу спостерігалася поява високомолекулярного 105 кД поліпептиду в листках, 126 кД білка у гіпокотилі та 132 кД поліпептиду в коренях проростків квасолі (таблиця). Холодний стрес призводив до появи 117 кД поліпептиду в листках, 121 кД поліпептиду в коренях аналізованих рослин та 139 кД поліпептиду в гіпокотилі (таблиця). Встановлено, що високомолекулярні стресові білки відіграють ключову роль у захисті клітин від дії високих температур [21]. Вони характеризуються шапероною активністю, вибірково зв'язують та відновлюють структуру денатурованих білків [20], руйнують нерозчинні агрегати, що утворюються за умов стресу, та вивільняють білки, які входять до їх складу [13]. Низькомолекулярні поліпептиди були виявлені в електрофореграмах всіх проаналізованих орга-

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ

Молекулярні маси (кД) білків різних органів проростків *Phaseolus vulgaris* L. за умов теплового та холодного стресів

Л	Лт	Лх	К	Кт	Кх	Г	Гт	Гх
112	105	117	138	132	121	128	126	139
88	97	92	120	111	109	121	100	114
77	81	80	110	91	88	99	83	93
73	74	74	97	79	77	80	75	78
67	72	72	87	76	74	74	69	73
63	71	70	77	71	73	73	55	72
56	70	66	71	55	72	72	53	71
53	66	60	70	54	71	71	49	69
50	61	54	68	49	66	70	48	65
49	55	52	55	48	55	66	46	59
45	52	48	52	47	54	60	44	54
40	49	47	51	45	51	55	39	53
34	47	38	49	43	49	51	36	52
32	44	36	38	39	48	49	34	51
31	39	33	33	36	45	48	32	49
29	36	30	30	34	38	44	30	48
23	33	29	29	33	37	38	29	44
16	30	22	23	32	33	36	27	39
14	29	15	14	30	30	34	25	37
13	21	14	13	29	26	32	14	35
11	15	13	12	25	14	30	12	33
	14	11	10	14	13	29	11	30
	13			13	12	28	10	29
	11			11	10	18		28
						14		16
						13		14
						12		13
						11		12
						10		11
								10

Л – листки (контроль); Лт – листки за умов теплового стресу (2 год, +40...42°C); Лх – листки за умов холодного стресу (2 год, +2...4°C); К – корінь (контроль); Кт – корінь за умов теплового стресу (2 год, +40...42°C); Кх – корінь за умов холодного стресу (2 год, +2...4°C); Г – гіпокотиль (контроль); Гт – гіпокотиль за умов теплового стресу (2 год, +40...42°C); Гх – гіпокотиль за умов холодного стресу (2 год, +2...4°C)

нів проростків квасолі як в контролі, так і за умов температурних стресів. Кількість їх коливалась від 5 до 7 (мол. маса 39-10 кД). Найбільш виразною була реакція на тепловий стрес гіпокотилів 72-годинних проростків, для яких встановлено появу 9 низькомолекулярних поліпептидів (таблиця).

Особливістю рослинних клітин є синтез низькомолекулярних (нм) БТШ [25]. Більшість нмБТШ не знайдено у вегетативних тканинах за нормальних умов, але відхилення температури на 10-15°C від норми викликає синтез цих поліпептидів, які зберігаються у клітинах ще впродовж 30-50 год після стресу і, як вважають, є важливим компонентом процесу репарації [12, 15]. нмБТШ також виявляють шаперонну

активність, а їх синтез асоціюється з розвитком стійкості до дії стресу [8, 9]. Проте, можна припустити, що функції нмБТШ пов'язані не лише з участю в стресових реакціях. Адже у досліджуваних нами об'єктах низькомолекулярні БТШ були присутні в усіх органах проростків квасолі не лише за стресів, а й в контролі.

Таким чином, дія як теплового, так і холодного шоку призводила до зменшення вмісту білка в усіх органах аналізованих рослин. Найбільшим вмістом білка відрізнялися листки *Ph. vulgaris* та *Z. mays*, найменший – зафіксований у коренях рослин. Електрофоретичний аналіз виявив відмінності в білкових спектрах окремих органів 72-годинних проростків квасолі як в контролі, так і в умовах модельованих

теплового та холодого температурних стресів. Встановлено, що родина БТШ 70 присутня в спектрах білків всіх органів проростків в контролі та експерименті, що свідчить про неспецифічність даної компоненти адаптаційного синдрому. Гіпокотилі активно утворювали низькомолекулярні БТШ під час теплового стресу, що напевно можна розглядати як специфічну реакцію на стрес.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Войников В.К., Иванова Г.Г., Рудиковский А.В.* Белки теплового шока растений // Физиология растений – 1984. – Т. 31, №1. – С. 970-979.
2. *Косаківська І.В.* Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. – К.: Сталь, 2003. – 191 с.
3. *Майор Н.С., Половинкін І.Г., Кравець В.С.* Вплив низьких температур та затоплення на стан білків етіюльованих проростків озимої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений – 1999. – Т. 31, №2 – С. 123-128.
4. *Мусатенко Л.І., Мартин Г.І., Ситник К.М.* Деякі структурно-функціональні особливості росту органів зародка квасолі // Укр. бот. журн. – 1982. – Т. 39, №4. – С. 631-643.
5. *Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др.* – Киев: Наук. думка, 1978. – 548 с.
6. *Таусон Е.Л., Клименко Е. С., Колесниченко А.В. и др.* Характеристика лиганда, связанного с белком холодого шока БХШ 310 // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2002. – №9 (1). – С. 8-15.
7. *Шмидт В.М.* Математические методы в ботанике. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. – 288 с.
8. *Basha E., Lee G.J., Demeler B., Vierling E.* Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins // Eur. J. Biochem. – 2004. – V. 271. – P. 1426-1436.
9. *Basha E., Lee G.J., Breci L.A. et al.* The identify of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protein a wide range of cellular functions // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, № 9. – P. 7566-7575.
10. *Becelman R.P., Mizzen L.A., Welch W.* Interaction of HSP 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly // Science – 1990. – V. 248. – P. 850-854.
11. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding // Anal. Biochem. – 1976. –V. 72, № 2. – P. 248-254.
12. *Chen Q., Lauzon L.M., DeRocher A.E., Vierling E.* Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein // J. Cell Biol. – 1990. – V. 11. – P. 1873-1883.
13. *Coca M.A., Almoguera C., Jordano J.* Expression of sunflower lowmolecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localisation and possible function implications // Plant Mol. Biol. – 1994. – V. 25. – P. 479-492.
14. *Glover J.R., Lindquists* Hsp 104, Hsp 70 and Hsp 40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins // Cell. – 1998. – V. 94. – P. 73-83.
15. *Howarth C.J.* Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock // Plant Cell Environ. – 1991. – V. 14. – P. 831-841.
16. *Kimpel J.A., Key J.L.* Heat shock in plants // Trends Biochemical Sci. – 1985. – V. 10, № 9. – P. 353-357.
17. *Ladomery M.* Multifunctional proteins suggest connections between transcriptional and posttranscriptional processes // Bioessays. – 1997. – V. 19.- P. 903-909.
18. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680-685.
19. *Mascarenhas J.P.* Molecular mechanisms of heat stress tolerance // Application of Genetic Engineering to Crop Improvement. – USA, 1984. – P. 391-425.
20. *Oh H.J., Chem X., Subject J.R.* Hsp 110 protects heat-denaturated and confers cellular thermoresistance // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 636-640.
21. *Queitsch C., Hong S.-W., Vierling E., Lindquist S.* Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermoresistance in Arabidopsis // Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 479-492.
22. *Rapoport T.A., Jungnickel B., Kutay U.* Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes // Ann. Rev. Biochem. – 1996. – V. 65. – P. 271-303.
23. *Rassow J., Ahsen Ol., Bomer Ul., Pfanner N.* Molecular chaperones: a characterization of the heat-

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ

- shock puotci 70 family // Trends Cell Biol. – 1997. – V. 7. – P. 129-133.
24. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. – 1991. – V. 42. – P. 579-620.
25. Waters E. R., Lee G. J., Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants // J. Exp. Bot. – 1996. – V. 47. – P. 325-338.
26. Wu D.H., Zaidman D.I. Selective binding of plant proteins to heat shock protein 70 // Phytochemistry – 1997. – V. 6, № 46. – P. 987-990.

Надійшла до редакції
25.12.2006 р.

INFLUENCING OF TEMPERATURE STRESSES ON PROTEIN CONTENTS AND ELECTROPHORETIC SPECTRUM OF DIFFERENT ORGANS OF *PHASEOLUS VULGARIS* AND *ZEA MAYS* ON EARLY PHASES OF VEGETATIVE DEVELOPMENT

I. V. Kosakyvska, I. V. Golovyanko

*M.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The experimental data about reaction of the protein biosystem in different organs of *Ph. vulgaris* and *Z. mays* plants under temperature stresses on the early phases of vegetation are present in article. Characteristics in protein contents in different organs of 72-hours seedling of *Ph. vulgaris* and *Z. mays* in control and stress condition was revealed. The differences between electrophoretograms of proteins from organs were shown. Active synthesis of proteins from HSP 70 family, some high molecular and SW HSP family (39-10 kD) polypeptides under temperature stresses was revealed.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, HSP, stress protein, temperature stress, adaptation

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССОВ НА СОДЕРЖАНИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР БЕЛКОВ РАЗНЫХ ОРГАНОВ *PHASEOLUS VULGARIS* L. И *ZEA MAYS* L. НА РАННИХ ЭТАПАХ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗВИТИЯ

И. В. Косаковская, И. В. Головянко

*Институт ботаники им. М.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовали особенности изменений содержания и электрофоретического спектра белков разных органов *Phaseolus vulgaris* и *Zea mays* при температурных стрессах на ранних этапах вегетации. После действия низкотемпературного (+2...+4 °С, 2 ч) и высокотемпературного (+40...+42 °С, 2 ч) стрессов содержание белков в разных органах 72-часовых проростков обоих видов снижалось, но с неодинаковой интенсивностью. Выявлены отличия электрофоретического спектра как на уровне отдельных органов проростков фасоли, так и по реакции на действие нелетальной высокой и низкой температур. Идентифицировано усиление синтеза белков семейства БТШ 70, отдельных высокомолекулярных и семейства низкомолекулярных (39-10 кД) полипептидов в условиях температурных стрессов.

Ключевые слова: *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, БТШ, стрессовые белки, температурный стресс, адаптация