

УДК 58.036:504.73:577.112:581.5

## **ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ У РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СТРАТЕГИЙ**

© 2013 г. **И. В. Косаковская, Д. А. Блюма, А. Ю. Устинова**

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного  
Национальной Академии наук Украины  
(Киев, Украина)*

Показано, что после кратковременной (2 часа) гипо- (+ 2°C) и гипертермии (+40°C) происходят изменения в электрофоретических спектрах низкомолекулярных белков у 7-дневных проростков растений разных экологических стратегий. Наблюдались изменения в содержании десяти низкомолекулярных белков у пациента щавната (*Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los.), экологическая стратегия которого направлена на быстрое формирование адаптивных реакций. После гипертермии наблюдалось уменьшение содержания четырех низкомолекулярных белков у холодоустойчивого эксплоранта сурепицы озимой (*Brassica campestris* var. *olifera*). У теплолюбивого эксплоранта амаранта хвостатого (*Amaranthus caudatus* L.) после гипотермии изменялось количество 13 кД белка. Гипо- и гипертермия вызывали уменьшение количества 13 кД белка у виолента овсяницы луговой (*Festuca pratensis* L.).

**Ключевые слова:** *Festuca pratensis* Huds., *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los., *Brassica campestris* var. *olifera*, *Amaranthus caudatus* L., низкомолекулярные белки, гипотермия, гипертермия, экологическая стратегия

Температура окружающей среды оказывает определяющее влияние на рост и развитие растений. В результате эволюции на молекулярном уровне сформировались механизмы, обеспечивающие оптимизацию этих процессов в неблагоприятных условиях. Белки, синтезируемые *de novo*, а также те, содержание которых изменяется при стрессах, участвуют в формировании защитных реакций. Особое место в адаптационных процессах принадлежит белкам теплового шока (БТШ), которые разделены на пять основных семейств: БТШ 70, БТШ 60, БТШ 90, БТШ 100 и низкомолекулярные нмБТШ (Kotak et al., 2007). Среди белков, принадлежащих к семейству нмБТШ, имеются стресс-индуцированные и конституционные. Они локализованы в цитоплазме, хлоропластах, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме (Timperio et al., 2008). Образование нмБТШ коррелирует с развитием устойчивости

к засухе, засолению, действию низких температур и других абиотических факторов (Nakamoto, Vihg, 2007). Основными функциями нмБТШ являются сохранение структуры и предотвращение агрегации белков, восстановление структуры и функциональной активности денатурированных белков, удаление нефункциональных потенциально опасных полипептидов, участие в транслокации белков через мембраны митохондрий, хлоропластов и эндоплазматического ретикулума (Косаківська, 2012). Образование нмБТШ в ответ на действие различных абиотических факторов позволяет рассматривать их в качестве молекулярных маркеров стрессового состояния (Cheng et al., 2008).

Согласно двумерной концепции экологических стратегий (Раменский, 1971; Grime, 1974) растения разделяют на три группы: виоленты, пациенты и эксплоренты. Виоленты – растения стабильных мест обитания, неустойчивые к стрессам, реализованная и фундаментальная экологические ниши которых практически совпадают. Пациенты – растения экстремальных мест обитания, устойчивые к стрес-

сам. Их реализованная и фундаментальная экологические ниши достаточно близки, что обеспечивается тонкой специализацией и особыми приспособлениями. Эксплеренты произрастают в условиях низкой конкуренции, для их роста необходимы нарушения в развитии виолентов либо кратковременное понижение уровня конкуренции, чувствительны к стрессам (Работнов, 1985).

Влияние температурного режима на качественные и количественные характеристики низкомолекулярных белков у растений разных экологических стратегий не исследовано. Методом двумерного электрофореза и масс-спектрометрии проанализировано более 800 профилей растворимых белков у *Festuca pratensis*, образующихся в период холодной акклимации, и выявлены качественные и количественные отличия в спектрах растений с разной степенью морозоустойчивости (Kosmala et al., 2009). В связи с особой ролью низкомолекулярных белков в формировании адаптивных реакций, цель нашей работы состояла в изучении действия кратковременной гипо- и гипертермии на электрофоретические спектры низкомолекулярных белков у видов разных экологических стратегий.

## МЕТОДИКА

Для анализа влияния гипо- и гипертермии на электрофоретический спектр низкомолекулярных белков были отобраны виолент овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.), пациент щавнат (гибрид между *Rumex patientia* L. и *R. tianshanicus* A. Los.) и эксплеренты сурепица озимая (*Brassica campestris* var. *olifera*) и амарант хвостатый (*Amaranthus caudatus* L.). Овсяница луговая – многолетний злак, имеет мощную корневую систему, холодоустойчивый. Щавнат – многолетнее растение, характеризуется высокой экологической пластичностью, морозо- и зимостойкостью, устойчивостью к засолению и повышенной влажности. Сурепица озимая – светолюбивая однолетняя зимостойкая культура с C<sub>3</sub>-типом фотосинтеза. Амарант хвостатый – однолетняя экологически пластичная, теплолюбивая культура с C<sub>4</sub>-типом фотосинтеза.

Откалиброванные семена в течение первых двух суток проращивали в темноте в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в термостате при температуре +20°C. Затем чашки Петри переносили на свет (фото-период 16 ч свет/8 ч темнота). Каждые сутки в

чашки с проростками добавляли по 1 мл дистиллированной воды. Для изучения влияния кратковременных температурных стрессов на электрофоретический спектр низкомолекулярных белков 7-дневные проростки в течение двух часов подвергали действию температуры +40°C и +4°C.

Навески проростков фиксировали в камере для глубинного замораживания (Jouan VX100, Чехия) при температуре -82°C. Для выделения растворимого белка надземную часть проростков растирали в охлажденной керамической ступке. Белок экстрагировали в 50 mM Трис-НСl буфере (рН 6,8), содержащем 0,3 M сахарозы, 8 mM ЭДТА, 4 mM дитиотреитола, 2 mM фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат центрифугировали при 6000 g при +4°C в течение 10 минут на центрифуге JOUAN GR20.22 (Франция). Супернатант использовали для электрофореза в 13% ПААГ, который проводили по методу Laemmli (1970).

Содержание белка определяли согласно методу Bradford (1976). В качестве маркеров использовали набор стандартных белков с мол. массами 40, 30, 25, 20, 15, 10 кД. Для количественной характеристики низкомолекулярных белков использовали программу TotalLab 2.1.

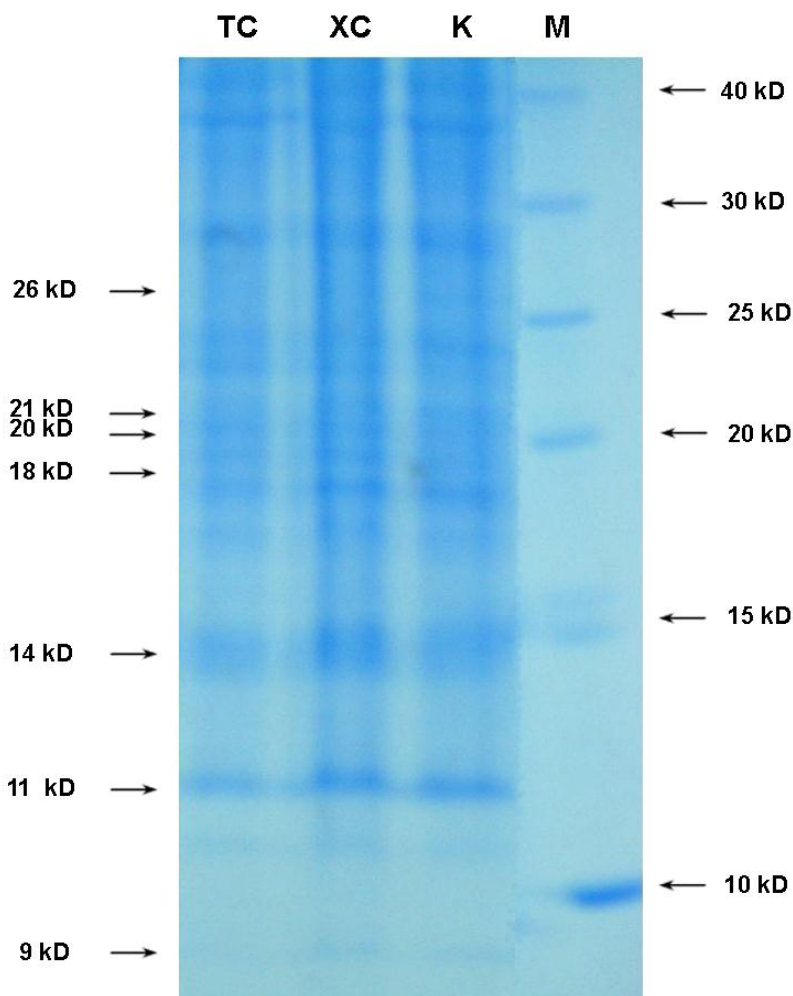
Опыты проводили в четырех биологических и трех аналитических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее выраженной была реакция на кратковременные температурные стрессы (2 ч при +40°C и 2 ч при +2°C) у 7-дневных проростков пациента щавната (рис. 1). Для десяти низкомолекулярных белков зафиксированы четкие количественные изменения. После холодового стресса наблюдалось увеличение содержания четырех, а после теплового двух низкомолекулярных белков. Отмечено значительное увеличение количества 26 кД полипептида после гипотермии (на 56%) и 20 кД полипептида после гипертермии (на 51%). Известно, что 26 кД и 20 кД нмБТШ синтезируются после стрессов и задействованы в реакциях защиты, а 16 кД полипептид участвует в транспорте других белков через мембраны митохондрий и хлоропластов (Cho et al., 2010). Установлено, что после теплового стресса у пациента щавната имело место значительное уменьшение количества 9 кД полипептида (на 38%).

Температурные стрессы вызывали уменьшение в содержании четырех низкомоле-

### ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ



Молекулярная масса (кД)	ТС (% от контроля)	ХС (% от контроля)
26,117	<b>115</b>	<b>156</b>
22,772	95	103
21,254	84	<b>117</b>
20,475	<b>151</b>	103
19,025	97	93
18,191	80	81
16,956	95	89
14,550	86	106
11,863	83	<b>117</b>
9,014	<b>62</b>	<b>129</b>

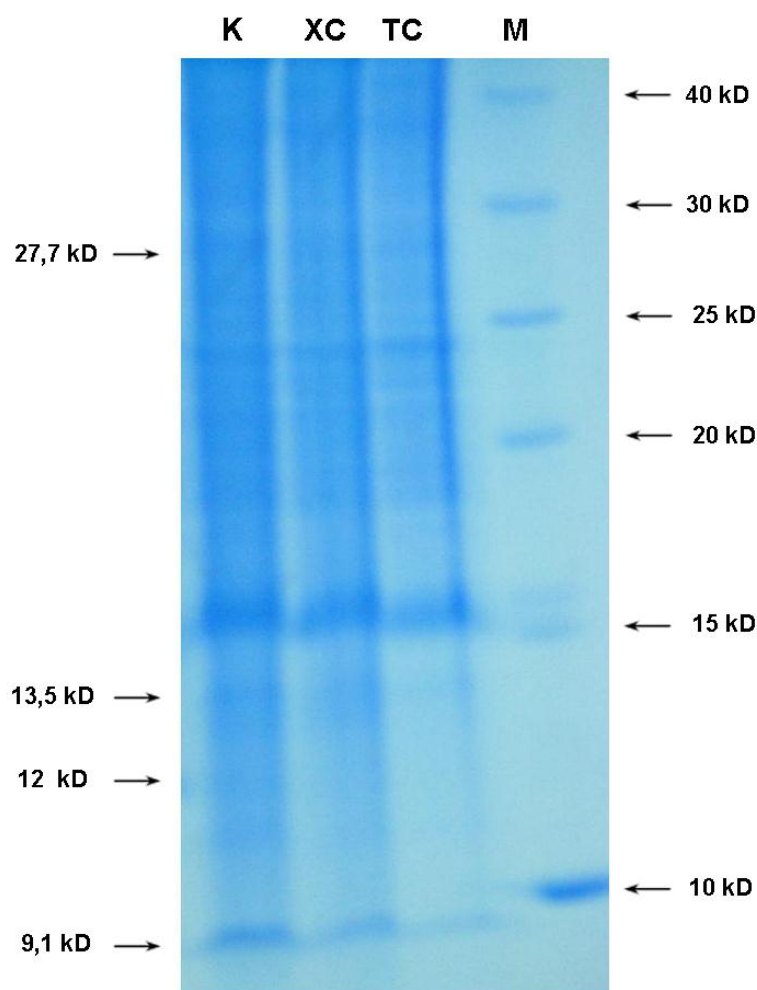
**Рис. 1. Электрофореграмма низкомолекулярных белков надземной части 7-дневных проростков пациента щавната (*Rumex patientia* × *R. tianchanicus*).**

Здесь и на рис. 2-4: ТС – тепловой стресс; ХС – холодогов стресс; К – контроль; М – молекулярные маркеры.

кулярных белков у 7-дневных проростков эксплорента сурепицы озимой, при этом реакция на тепловой стресс у данного холодоустойчивого растения была более выраженной (рис. 2). Так содержание 27 кД полипептида уменьшилось на 41%, а 9 кД – на 47%. Изменения в электрофоретическом спектре низкомолеку-

лярных белков после холодогов стресса носили менее выраженный характер, за исключением 9 кД полипептида.

Низкомолекулярные белки 7-дневных проростков эксплорента амаранта хвостатого были более устойчивы к воздействию темпера-



Молекулярная масса (кД)	ТС (% от контроля)	ХС (% от контроля)
27,757	<b>59</b>	90
13,496	62	88
11,992	75	91
9,146	<b>53</b>	<b>74</b>

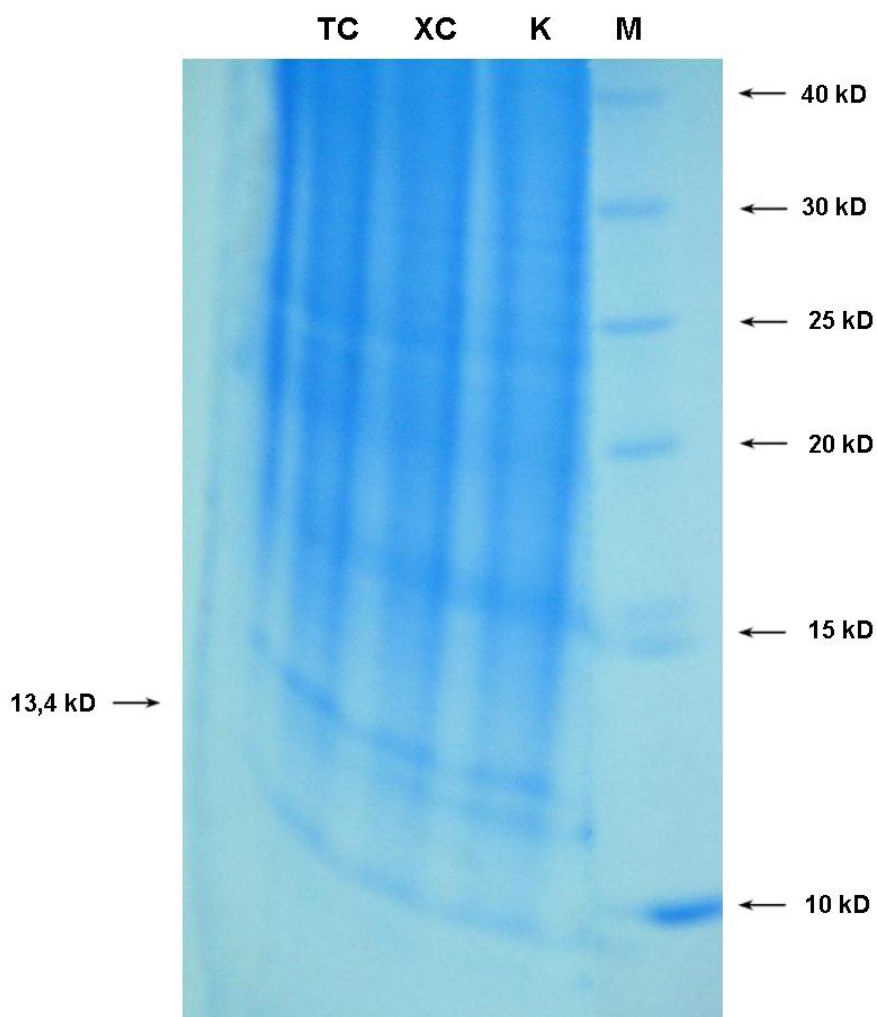
**Рис. 2.** Электрофореграмма низкомолекулярных белков надземной части 7-дневных проростков озимой сурепицы (*Brassica campestris* var. *olifera*).

турных стрессов (рис. 3). Так, в проростках теплолюбивого амаранта хвостатого кратковременный холодовой стресс вызывал уменьшение количества 13 кД полипептида на 23%, тогда как тепловой стресс практически не влиял на содержание этого белка.

Достаточно выраженные изменения наблюдались в содержании 13 кД полипептида также у виолента овсяницы луговой (рис. 4). Образование этого низкомолекулярного белка угнеталось после гипотермии на 60%, а после гипертермии на 47%.

Гипертермия отрицательно влияет на метаболизм растений. При нагревании нарушается четвертичная структура сложных белковых комплексов (Timperio et al., 2008). Специфические изменения в биосинтезе белковых макромолекул рассматриваются как маркер интенсивности стрессового воздействия (Polenta et al., 2007). Низкая температура также негативно влияет на метаболизм, существенно снижает продуктивность (Жесткова и др., 2009). Механизм защиты от низкой температуры включает экспрессию отдельных генов и изменения в синтезе белков (Renaut et al., 2006).

### ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

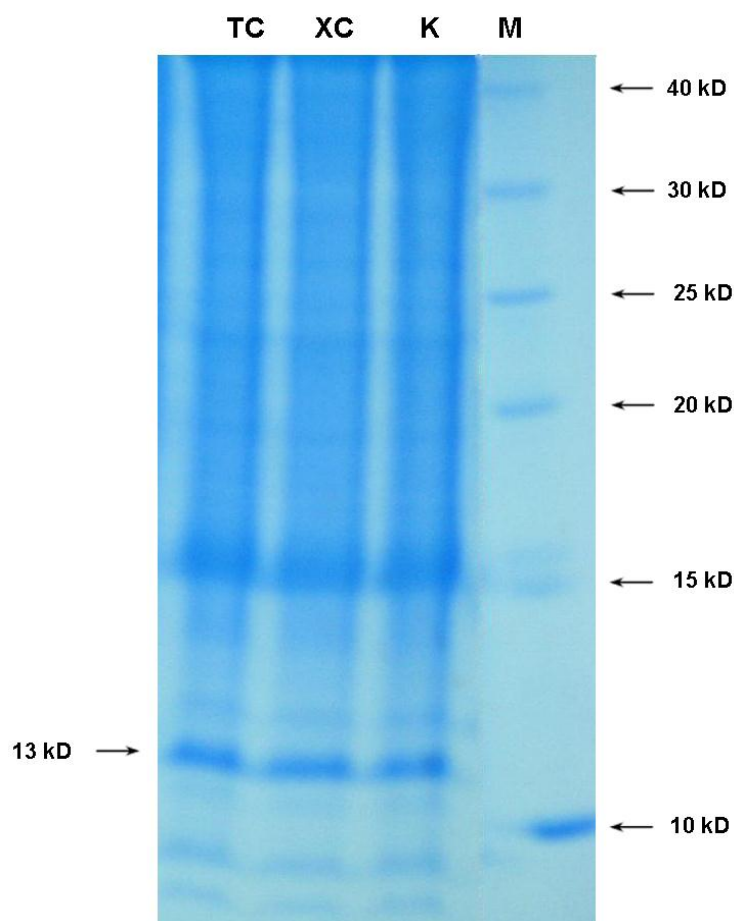


Молекулярная масса (кД)	ТС (% от контроля)	XC (% от контроля)
13,397	98	77

**Рис. 3.** Электрофореграмма низкомолекулярных белков надземной части 7-дневных проростков амаранта хвостатого (*Amaranthus caudatus*).

Нами показано, что наиболее выраженные изменения электрофоретических спектров низкомолекулярных белков после температурных стрессов были у проростков пациента щавната. Это коррелирует с экологической стратегией пациентов, направленной на быстрое формирование адаптивных реакций. У эксплорента амаранта хвостатого, характеризующегося теплоустойчивостью, после гипотермии заметно снижалось содержание белка 13 кД. В проростках эксплорента сурепицы озимой, характеризующейся холодоустойчивостью, наблюдалось уменьшение количества четырех низкомолекулярных белков после гипертермии. Для проростков виолента овсянницы луговой установлено, что гипо- и гипертермия вызывали существенное уменьшение количество 13 кД белка.

Таким образом, изменения электрофоретических спектров низкомолекулярных белков после температурных стрессов носили специфический характер. У пациента, в отличие от виолента и эксплорентов, наблюдалось увеличение количества отдельных низкомолекулярных полипептидов, что может указывать на активацию защитных реакций в стрессовых условиях. У эксплорентов и виолента, экологические стратегии которых близки и характеризуются неустойчивостью к неблагоприятным воздействиям, имело место уменьшение количества отдельных низкомолекулярных белков, причем у холодостойкого вида *Brassica campestris* более выраженной была реакция на тепловой стресс, тогда как у теплолюбивого *Amaranthus caudatus*, напротив, на холодовой стресс. Выяв-



Молекулярная масса (кД)	ТС (% от контроля)	XC (% от контроля)
13,110	53	40

Рис. 4. Электрофореграмма низкомолекулярных белков надземной части 7-дневных проростков овсяницы луговой (*Festuca pratensis*).

ленные специфические изменения в электрофоретических спектрах низкомолекулярных белков можно рассматривать как маркер стрессового температурного воздействия.

Авторы выражают благодарность чл.-корр. НАН Украины Я.П. Дидуку за научное обсуждение и консультации при определении экологических стратегий исследованных видов, а также д-ру с.-х. наук Д.Б. Рахметову за помощь при подборе объектов, предоставление семенного материала и сведений о биологических особенностях видов, отобранных для физиолого-биохимических исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

Жесткова И.М., Ампилогова Я.Н., Шевырева Т.А., Трофимова М.С. Влияние низких положительных температур на осмотическую водную проницаемость и активность аквапоринов плазма-

леммы корней гороха // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 5. – С. 704-719.

Косаківська І.В. Протеом рослин: реакція на абіотичні стресові впливи // Физиология и биохимия культ. растений. – 2012. – Т. 44, № 5. – С. 389-398.

Работнов Т.А. О типах стратегий растений // Экология. – 1985. – № 3. – С. 3-11.

Раменский Л.Г. Избранные работы. – Л.: Наука, 1971. – 334 с.

Breadford 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. – P. 248-254.

Cheng G., Basha E., Wysocki V.H., Vierling E. Insights into small heat shock protein substrate structure during chaperone action derived from hydro-

## ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

- gen/deuterium exchange and mass spectrometry // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – P. 26634-26642.
- Cho W.K., Chen X.-Ya., Rim Ye., Chu H., Kim S., Kim S.-W., Park Z.-Yo., Kim J.-Ya. Proteom study of the phloem pumpkin using multidimensional protein identification technology // J. Plant Physiol. – 2010. – V. 167. – P. 771-778.
- Grime J.P. Vegetation classification by reference to strategies // Nature. – 1974. – V. 250. – P. 26-31.
- Kosmala Ar., Bocian Al., Rapicz M., Jurczyk B., Zwierzykowski Zb. Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct level of frost tolerance // J. Exp. Bot. – 2009. – V. 60. – P. 3595-3609.
- 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. – V. 10. – P. 310-316.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the read of bacteriophage // Nature. – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680-685.
- Nakamoto H., Vigh L. The small heat shock proteins and their clients // Cell Mol. Life Sci. – 2007. – V. 64. – P. 294-306.
- Polenta G.A., Calvete J.J., Gonzalez C.B. Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment // FEBS Journal. – 2007. – V. 274. – P. 6447-6455.
- Renaut J., Hausman J.F., Wisniewski M.E. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism // Physiol. Plant. – 2006. – V. 126. – P. 97-109.
- Timperio A.M., D'Amici G.M., Barta C., Loreto F., Zolla L. Proteomic, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58. – P. 3695-3710.

Поступила в редакцию  
04.01.2013 г.

## INFLUENCE of temperature STRESSES on ELECTROPHORESIS SPECTRUM OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEINS IN PLANTS WITH DIFFERENT TYPES OF ECOLOGICAL STRATEGIES

I. V. Kosakivska, D. A. Bluma, A. Yu. Ustinova

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

It was shown that after short term temperature stresses (2 h, + 2°C and + 40°C) specific changes in low molecular weight proteins electrophoresis spectrum took place in 7-day seedlings of plants with different type of ecological strategy. We watch that ten low molecular weight proteins of stress-tolerant *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los. changed after stresses. This correlates with ecological strategy of stress-tolerant, which bases on rapid adaptive reactions. Four low molecular weight proteins from cold resistant ruderal *Brassica campestris* var. *olifera* decreased after heat shock. It was shown that amount of 13 kDa polypeptide from heat resistant ruderal *Amaranthus caudatus* L. decreased after cold stress. Level of 13 kDa protein from violent *Festuca pratensis* L. also decreased after both stresses.

**Key words:** *Festuca pratensis* Huds., *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los., *Brassica campestris* var. *olifera*, *Amaranthus caudatus* L., low molecular weight proteins, temperature stress, ecological strategy



**ВПЛИВ ГІПО- І ГІПЕРТЕРМІЇ НА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ СПЕКТР  
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ БІЛКІВ У РОСЛИН  
РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ СТРАТЕГІЙ**

І. В. Косаківська, Д. А. Блюма, А. Ю. Устінова

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного  
Національної Академії наук України  
(Київ, Україна)*

Показано, що після короткочасної (2 год) гіпо- (+ 2°C) і гіпертермії (+ 40°C) відбуваються зміни в електрофоретичних спектрах низькомолекулярних білків у 7-добових проростках рослин різних екологічних стратегій. Для патієнта щавнату (*Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los), екологічна стратегія якого спрямована на швидке формування адаптивних реакцій, виявлені зміни у вмісті десяти низькомолекулярних білків. Після гіпертермії спостерігалось зменшення вмісту чотирьох низькомолекулярних білків у холодостійкого експлерента суріпиці озимої (*Brassica campestris* var. *olifera*). У теплолюбивого експлерента щиріці хвостатої (*Amaranthus caudatus* L.) після гіпотермії змінювалась кількість 13 кД білка. Гіпо- і гіпертермія викликали зменшення кількості 13 кД білку у віолента костриці лучної (*Festuca pratensis* L.).

**Ключові слова:** *Festuca pratensis* Huds., *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los., *Brassica campestris* var. *olifera*, *Amaranthus caudatus* L., низькомолекулярні білки, гіпотермія, гіпертермія, екологічна стратегія