

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 577.112:58.036+581.5

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР БЕЛКОВ И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ТИПОВ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СТРАТЕГИЙ

© 2010 г. И. В. Косаковская¹, Д. А. Климчук¹,
К. Демиревская², Д. А. Блюма¹, А. Ю. Устинова¹

¹Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной Академии наук Украины
(Киев, Украина)

²Институт физиологии растений им. М. Попова
Болгарской Академии наук
(София, Болгария)

Показано, что после действия низких и высоких стрессовых температур происходят изменения количественных и качественных характеристик растворимых белков, Рубиско, Рубиско активазы (RA) и Рубиско связывающего белка (RBP), а также ультраструктуры клеток листа у растений разных экологических стратегий. В контрольных условиях эксплоренты сурепица озимая (*Brassica campestris* var. *olifera*) и амарант хвостатый (*Amarantus caudatus* L.), а также виолент овсяница луговая (*Festuca pratensis* L.) содержат в 2-2,5 раза больше белка по сравнению с пациентом щавнатом (*Rumex patienta* L. × *R. tianshanicus* A. Los). Для всех исследованных растений характерно наличие 50 кД полипептида в стрессовых и контрольных условиях. После температурных воздействий у эксплорентов возрастало количество 72 и 94 кД полипептидов, а у пациента наблюдалось появление 71 кД и увеличение количества 44, 78 и 109 кД белков. У виолента выявлен 60 кД полипептид, отсутствующий в контроле. У эксплорентов и виолента в ответ на действие гипертермии увеличивалось количество Рубиско и RBP. Рубиско пациента по сравнению с RBP оказался менее устойчивым к действию теплового стресса. Выявлены изменения в ультраструктурной организации клеток листа эксплорентов. Белки и ультраструктурные характеристики рассматриваются как возможные биомаркеры растений с разными типами экологических стратегий.

Ключевые слова: *Brassica campestris*, *Amarantus caudatus*, *Rumex patienta* × *R. Tianshanicus*, *Festuca pratensis*, белки, ультраструктура, фотосинтез, стрессовые температуры, экологическая стратегия

Изучение влияния экологических стрессоров на растения – одна из наиболее актуальных проблем современной биологии. Возрастающие техногенная и антропогенная нагрузки придают ей особое значение, поскольку могут

привести к масштабным экологическим изменениям, негативно сказаться на биоразнообразии.

Адаптация растений к стрессорам контролируется сложной молекулярно-генетической системой, которая запускает опрделенный стресс-реагирующий механизм, обеспечивающий гомеостаз и защищающий от разрушений молекулярные и структурные кле-

Адрес для корреспонденции: Косаковская Ирина Васильевна, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев-1, 01601, Украина; e-mail: science@botany.kiev.ua, lgkos@ukrpost.ua

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР

точные компоненты (Пятыгин, 2008). В отличие от устойчивости к биотическим стрессорам, которая преимущественно контролируется единичными генами, абиотические стрессоры экспрессируют мультигенную систему, поэтому достаточно сложным является контроль и инженерия резистентности к тому или иному отрицательному воздействию (Kotak et al., 2007). Создание устойчивых к абиотическим стрессорам растений базируется на экспрессии генов, участвующих в сигнальных или регуляторных системах, в запуске синтеза стрессовых белков, функциональных и структурных метаболитов (Rampitsch, Sranivasan, 2006; Юрина, Одинцова, 2007).

Белки, в том числе стрессовые, являются ключевым компонентом, обеспечивающим поддержание клеточного гомеостаза в стрессовых условиях (Wang et al., 2004). Биосинтез стрессовых белков, который происходит на фоне депрессивных изменений в образовании полипептидов, характерных для нормальных условий существования, является одной из главных составляющих адаптационного синдрома (Косаковская, 2008).

Фотосинтез – один из наиболее чувствительных к температуре процессов. Тепловые и холодные воздействия влияют на количественные и качественные параметры не только ключевого фермента процессов фотосинтеза и фотодыхания Рубиско, но и на белки, задействованные в активации и сборке Рубиско - Рубиско активазу (RA) и Рубиско связывающий белок (RBP). На долю D-рибулозо-1,5-дифосфат-карбоксилазы/оскигеназы (КФ 4.1.1.39) (Рубиско) приходится 60% от общего количества растворимых белков растительной клетки (Ellis, 1979). Этот модельный белок применяют при изучении фотосинтеза, фотодыхания, генетического детерминирования и наследования, а также влияния абиотических стрессоров на метаболизм (Ainsworth, Roger, 2007; Parry et al, 2008). Активность Рубиско *in vivo* регулируется, преимущественно АТФ-зависимым ферментом RA, чувствительной к содержанию АТФ и величине соотношения АТФ/АДФ (Portis, 2003; Sage et al., 2008). RBP - Gro-El-образный белок, участвующий в укладке молекулы Рубиско, характеризуется низким уровнем АТФ-азной активности и классифицирован как шаперонин. Увеличение уровня RBP связано с его шаперонной функцией, обеспечивающей поддержание стабильного уровня Рубиско, а также с повышением устойчивости растений к стрессовым воздействиям (Demirevska et al., 2008). Ха-

рактер ответа Рубиско, RA и RBP на действие температуры зависит от интенсивности и продолжительности воздействия, типа клеток и тканей, а также стадии развития растения (Demirevska, Feller, 2004).

Наряду с изменениями на молекулярном уровне, температурные воздействия вызывают перестройки в ультраструктуре клеток. В частности, отмечены количественные изменения характеристик мембран и состава липидов в хлоропластах пшеницы после действия теплового шока (Кислюк и др., 2008), а также изменения в ультраструктуре фотосинтетического аппарата подроста широколиственных деревьев в связи с адаптацией к определенным экологическим условиям (Вяль и др., 2007).

Изменение физиологических параметров растений в неблагоприятных условиях происходит в пределах формирования конкретных экологических стратегий. Ныне широко используется двумерная классификация растений (Grime, 1974), которая базируется на особенностях реализации целостного адаптивного комплекса. Согласно этой классификации выделяют три группы растений: виоленты, пациенты и эксплеренты. Разделение на группы основано на соотношении величины потенциального роста к размерам реально реализованного растения (Миркин и др., 1999). Исследования белков, а также ультраструктурный анализ клеток растений разных экологических стратегий, подвергшихся действию стрессовых температур, практически не проводились, что и определило цель работы. Мы полагаем, что в основе механизма формирования и функционирования экологических стратегий ключевая роль принадлежит молекулярным и структурным приспособительным (адаптационным) перестройкам, а белки и ультраструктурные характеристики можно рассматривать как биомаркеры растений различных экологических стратегий.

МЕТОДИКА

Для изучения влияния стрессовых температур на белки и ультраструктуру клеток нами был проведен скрининг растений различных экологических стратегий. Акцент был сделан на отборе новых перспективных кормовых и энергоемких культур местной флоры и интродуцентах. В качестве эксплерентов были отобраны растения сурепицы озимой (*Brassica campestris* var. *olifera*) и амаранта хвостатого (*Amaranthus caudatus* L.). Сурепица озимая – светолюбивая однолетняя зимостойкая культу-

ра с C₃ типом фотосинтеза. Амарант хвостатый – однолетняя экологически пластичная культура с C₄ типом фотосинтеза. Эксплеренты растут в условиях низкой конкуренции, одинаково чувствительны к действию абиотических и биотических стрессоров, характеризуются быстрым ростом при благоприятных и переходом к генеративному развитию при неблагоприятных условиях.

В качестве пациента была отобрана новая кормовая культура шавнат – гибрид *Rumex patienta* L. × *R. tianshanicus* A. Los. Это многолетнее (до 10 лет) растение характеризуется высокой экологической пластичностью, морозо- и зимостойкостью, устойчивостью к засолению и повышенной влажности. Пациенты – достаточно гетерогенная в морфологическом и ценотическом плане группа растений, устойчивых к действию стрессоров.

В качестве виолента были использованы растения овсяницы луговой (*Festuca pratensis* L.), характеризующиеся мощной системой поглощения, что обеспечивает более полное использование ресурсов. Виоленты – конкурентоспособные растения, одинаково неустойчивые к действию стрессоров и отклонений от нормальных условий существования.

Семена отобранных видов были откалиброваны. По 50 семян каждого вида перенесены в чашки Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную дистиллированной водой. В каждой чашке семена размещали в 5 рядов по 10 штук. Первые двое суток семена проращивали в термостате при температуре 23°C в условиях постоянной темноты. Затем переносили на свет (фотопериод: 15 ч – свет; 9 ч – темнота; освещенность 3500 люкс). Каждые сутки в чашки с проростками добавляли по 1 мл дистиллированной воды.

Для характеристики белков и ультраструктуры в стрессовых условиях 7-суточные проростки подвергали кратковременным температурным воздействиям: 2 ч при 40°C и 2 ч при 4°C. Затем отбирали навески (100 мг), состоящие из надземной части проростков, и замораживали при температуре -82°C. Из отобранных навесок проводили экстракцию суммарного белка. Растительный материал растирали в охлажденной керамической ступке, белок экстрагировали в 50 mM Tris-HCl буфере (pH 6,8), содержащем 0,3 M сахарозы, 8 mM EDTA, 4 mM дитиотреитола (DTT), 2 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Полученный гомогенат центрифугуovali при 6000

об/мин в течение 10 мин при +4°C на центрифуге JOUAN GR20.22.

Супернатант использовали для электрофореза в ПААГ. Содержание белка определяли по методу Bradford (1976). Белки разделяли в 13% ПААГ согласно методу Laemmli (1979). Количество нанесенного белка составляло 50 мкг/мл. В качестве маркеров использовали набор стандартных белков с мол. массами 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 кД. Для общей характеристики полипептидов использовали программу TotalLab 2.1.

Анализ электрофоретической подвижности и субъединичной структуры Рубиско, RA и RBP проводили согласно описанным методам (Demirevska-Kepova, Simova, 1989; Demirevska-Kepova, Juperlieva, 1990; Demirevska-Kepova et al., 1995). Для иммуоблоттинга растворимые белки растительных экстрактов разделяли в 12 % SDS-ПААГ, а затем переносили на нитроцеллюлозную бумагу (Bio-Rad) согласно методу Mitsuhashi, Feller (1992) с использованием Трансблот системы (Bio-Rad). На одну полосу наносили 10 мкг белка. В качестве маркеров были использованы стандартные смеси 31,2-174,6 kDa (Sigma). После электрофореза нитроцеллюлозную мембрану блокировали с 1% раствором бисульфата аммония в буфере (0,1 M Tris, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 0,1% Твин 20) в течение 60 мин. Идентификацию Рубиско, RA и RBP проводили, используя поликлональные антитела, полученные против исследованных белков. Дополнительно были включены goat-anti-rabbit-IgG в качестве второго антитела, которые связывали с комплексом пероксидаза-антипероксидаза. Пероксидазную реакцию выявляли при помощи 4-хлоро-альфа-нафтола (Sigma), полученные полосы сканировали на мультискане HP.

Для проведения ультраструктурных исследований растительные образцы фиксировали в 2,5% (об/об) растворе глутаральдегида в 0,05 M натрий какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 3 ч с последующей одночасовой инкубацией в 1% (об/об) растворе тетраоксида осмия в том же буфере, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и помещали в смесь эпоксидных смол согласно общепринятым процедурам (Klymchuk et al., 2003). Срезы толщиной 60±10 нм получали на ультрамикротоме LKB 8800, помещали на покрытые формваром медные сетки, контрастировали цитратом свинца (Klymchuk et al., 2001), исследовали в

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР

трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1230 EX (JEOL, Япония) при 60 кВ.

Морфометрический анализ проводили на электронно-микроскопических негативах $\times 5000$. Площадь разреза митохондрий определяли под светооптическим бинокулярным микроскопом МБС-10. Тестовая решеточная система, содержащая 25 точек на см^2 , накладывалась на негатив и количество точек, проецируемых на каждую органеллу, подсчитывалось. Проанализировано не менее 500 органелл в каждом варианте. Достоверность разницы между средними показателями размеров хлоропластов и митохондрий в исследованных условиях определяли, используя критерий Стьюдента с вероятностью не меньше 95% ($P \geq 0,95$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что в контрольных условиях экспланты и виолент содержат в 2-2,5 раза больше белка по сравнению с пациентом (рис. 1). У *B. campestris* – экспланта с C_3 типом фотосинтеза и *A. caudatus* – экспланта с C_4 типом фотосинтеза в условиях кратковременных температурных стрессов имели место незначительные изменения в содержании растворимых белков.

У виолента *F. pratensis* после холодового воздействия содержание белка не изменялось, а в ответ на гипертермию наблюдалось уменьшение его количества. После кратковременных температурных воздействий происходило су-

щественное увеличение содержания белка в проростках пациента щавната (рис. 1). Вероятно, в неблагоприятных температурных условиях у щавната происходит стресс-индуцируемая активация белкового синтеза.

Методом диск-электрофореза в 13% ПААГ был изучен спектральный состав белков надземной части проростков *B. campestris*, *A. caudatus*, *R. patienta* \times *R. tianshanicus* и *F. pratensis* в контроле и после температурных воздействий. Гипо- и гипертермия приводили к неспецифическим и специфическим изменениям в белковых спектрах. В контрольных условиях все исследованные виды характеризовались наличием ярко выраженного 50 кД полипептида, содержание которого после воздействия стрессовых температур изменялось в зависимости от вида растения и стрессора. Так, в проростках пациента щавната биосинтез 50 кД полипептида значительно усиливался после действия гипертермии. В проростках *B. campestris* после действия стрессовых температур выявлены изменения в содержании 72 кД, а в проростках *A. caudatus* – 94 кД полипептидов. Установлено появление 71 кД и увеличение количества 44, 50 и 78 кД белков у пациента щавната. В проростках *B. campestris* наблюдалось уменьшение количества 47 кД полипептида (рис. 2).

Установлено, что температурные воздействия приводили к качественными и количественными изменениями в белковых спектрах проростков виолента *F. pratensis*. В частности,

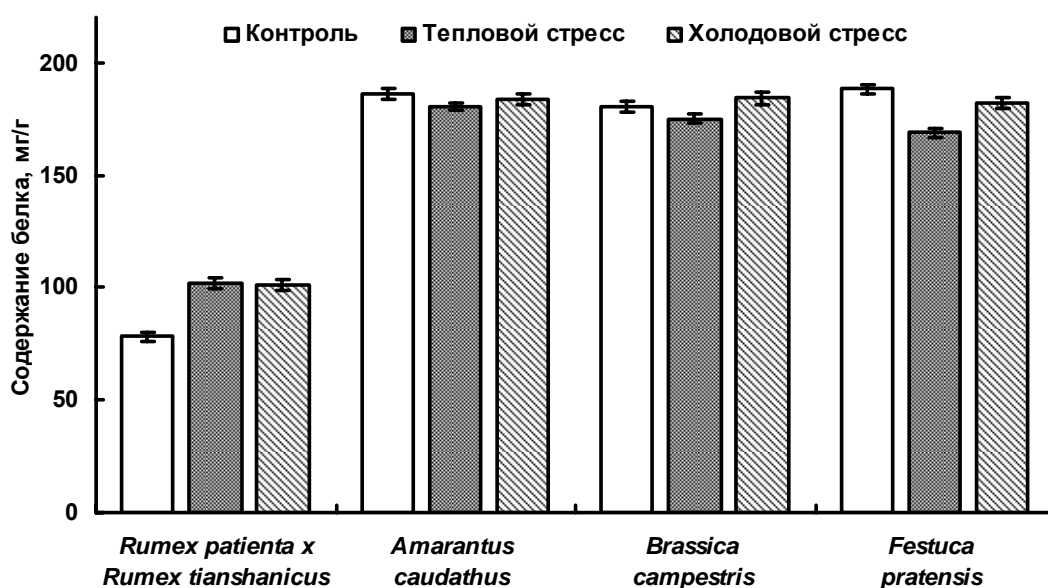


Рис. 1. Содержание растворимого белка в надземной части 7-дневных проростков растений различных экологических стратегий в контроле и после температурных воздействий.

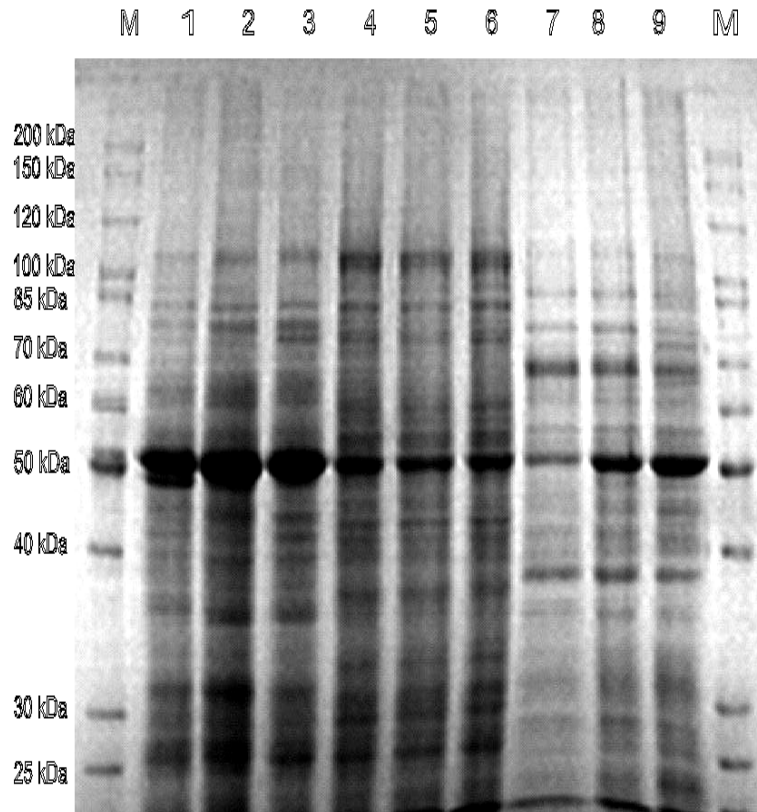


Рис. 2. Белковые спектры надземной части 7-дневных проростков *Brassica campestris* (1-3), *Amarantus caudatus* (4-6) и *Rumex patientia* × *R. tianshanicus* (7-9) в контроле и после температурных воздействий 1, 4, 7 – контроль; 2, 5, 8 – гипотермия, 2 ч, 4°C; 3, 6, 9 – гипертермия, 2 ч, 40°C.

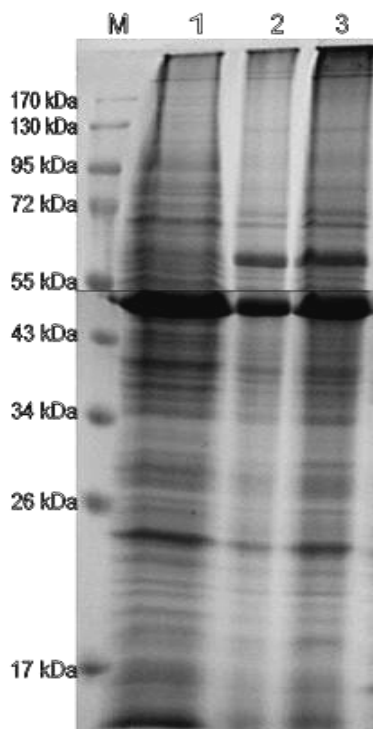


Рис. 3. Белковые спектры надземной части 7-дневных проростков *Festuca pratensis* в контроле и после температурных воздействий 1 – контроль; 2 – гипотермия, 2 ч, 4°C; 3 – гипертермия, 2 ч, 40°C.

обнаружено появление 60 кД полипептида, отсутствующего в контрольных образцах. Полипептид с мол. массой 95 кД выявлен только в контроле, а 80 кД полипептид – в контроле и после холодового воздействия. Полипептиды с мол. массами 43 и 20 кД присутствовали в контроле и отсутствовали после температурных воздействий. Для контрольных условий характерен более насыщенный спектр низкомолекулярных белков с молекулярными массами от 20 до 40 кД. Отмечена высокая концентрация 15 кД полипептида в контроле (рис. 3).

Следовательно, выявленные отличия в белковых спектрах указывают на то, что при формировании и функционировании различных экологических стратегий адаптационным перестройкам белковых макромолекул принадлежит определенная роль.

Активация экспрессии генов и включение механизма биосинтеза стрессовых белков имеет свои особенности в зависимости от типа стратегии. Геном, как правило, остается стабильным после действия большинства стрессоров, в то время как транскриптом и протеом подвергаются изменениям в процессе развития, а так-

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР

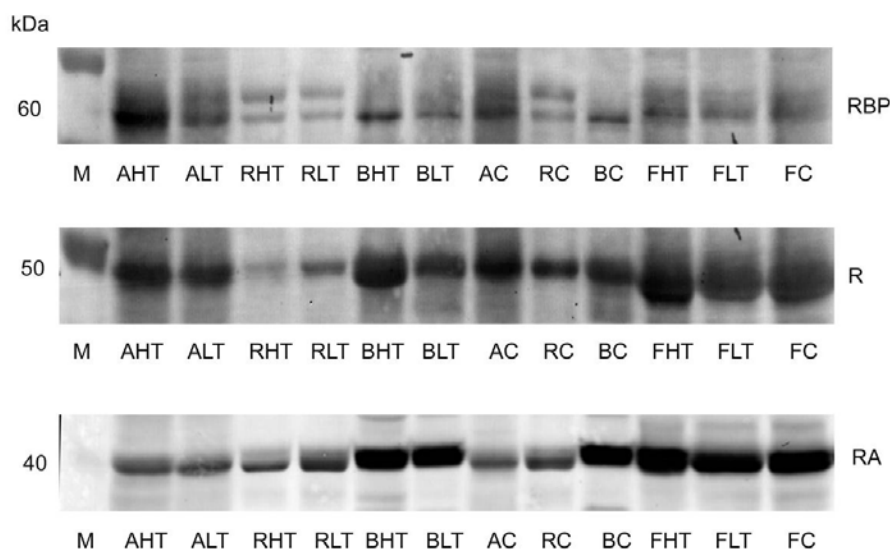


Рис. 4. Изменения в содержании Рубиско (R), Рубиско активазы (RA) и Рубиско связывающего белка (RBP) в растениях разных экологических стратегий в контроле и после температурных воздействий.

Amarantus caudatus – контроль (AC), гипертермия (AHT), гипотермия (ALT), *Rumex patienta* × *R. tianshanicus* – контроль (RC), гипертермия (RHT), гипотермия (RLT), *Brassica campestris* – контроль (BC), гипертермия (BHT), гипотермия (BLT), *Festuca pratensis* – контроль (FC), гипертермия (FHT), гипотермия (FLT).

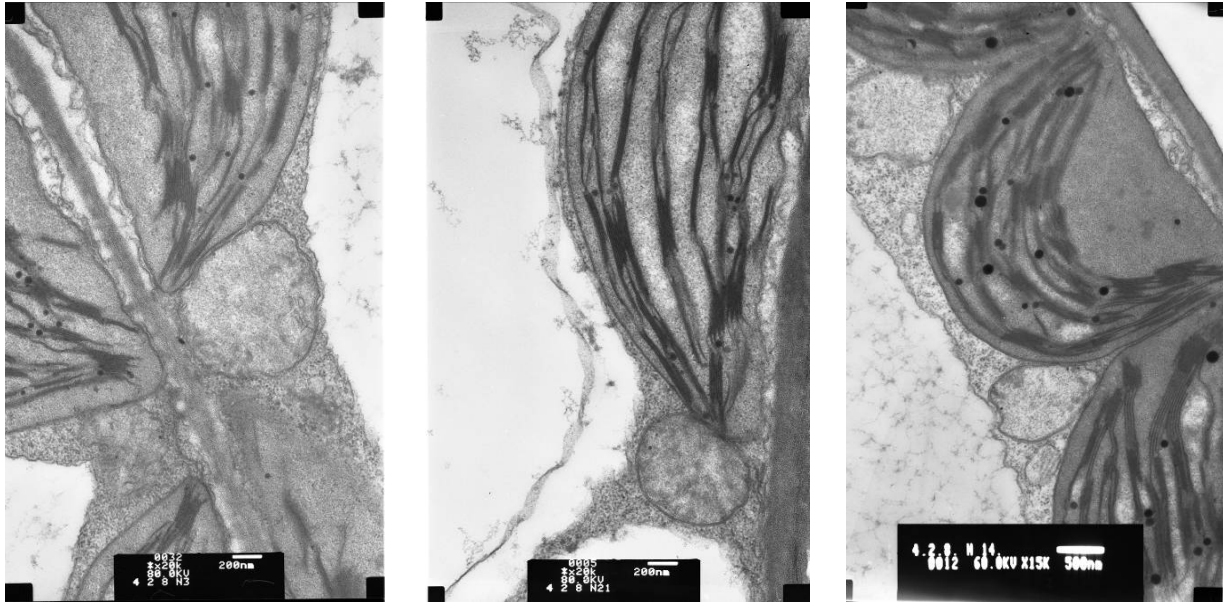
же под влиянием биотических и абиотических стрессоров (Rampitsch, Sranivasan, 2006). В наших исследованиях было показано, что изменения в белковых спектрах пациента щавната происходят активнее. Формирование быстрых адаптивных реакций пациентов способствует выживанию и реализации жизненного цикла этими растениями в неблагоприятных условиях. Выявленные в наших исследованиях различия в белковых спектрах в контроле и после действия температурных стрессоров позволяют рассматривать белки как возможные биомаркеры растений с разными экологическими стратегиями.

Рубиско, RA и RBP растений разных экологических стратегий характеризовались различной электрофоретической подвижностью и субъединичной структурой. Рубиско располагалась в области 50 кД, RBP – в области 60 кД и RA – в области 40 кД. RBP пациента щавната характеризовалась наличием ярко выраженных α и β субъединиц. У виолента овсяницы луговой эти субъединицы достаточно диффузны. RA выявлена преимущественно как одна белковая полоса, однако у пациента щавната отмечено наличие второй изоформы.

Температурные воздействия вызывали качественные и количественные изменения Рубиско, RA и RBP. Уровень Рубиско у эксплерентов *A. caudatus*, *B. campestris* и виолента

F. pratensis существенно повышался после действия гипертермии. Четкие изменения Рубиско в условиях холодового стресса у эксплерента *A. caudatus* и виолента *F. pratensis* не выявлены. Интенсивность белковых полос Рубиско уменьшалась при холодовом воздействии у *B. campestris* эксплерента с C_3 типом фотосинтеза, что указывает на большую чувствительность к гипотермии. Количество RBP сохранялось на уровне контроля. Тепловое воздействие приводило к увеличению количества RBP у эксплерента *A. caudatus* и RA у эксплерента *B. campestris* и виолента *F. pratensis*. Количество всех трех исследованных белков у пациента щавната в условиях теплового стресса снижалось по сравнению с изменениями этих белков у эксплерентов *A. caudatus* и *B. campestris*, а также виолента *F. pratensis* (рис. 4).

Таким образом, иммунохимическими исследованиями было установлено, что эксплеренты *A. caudatus* и *B. campestris*, а также виолент *F. pratensis* реагируют на гипертермию повышением количества Рубиско и RBP. Рубиско и RA пациента щавната оказался недостаточно устойчивым к тепловому стрессу, однако RBP остался на уровне контроля. Эксплеренты и виолент проявили сходную тактику в реагировании на действие температурных стрессов. В целом, белки, задействованные в процессе фиксации CO_2 , оказались достаточно устойчивыми.

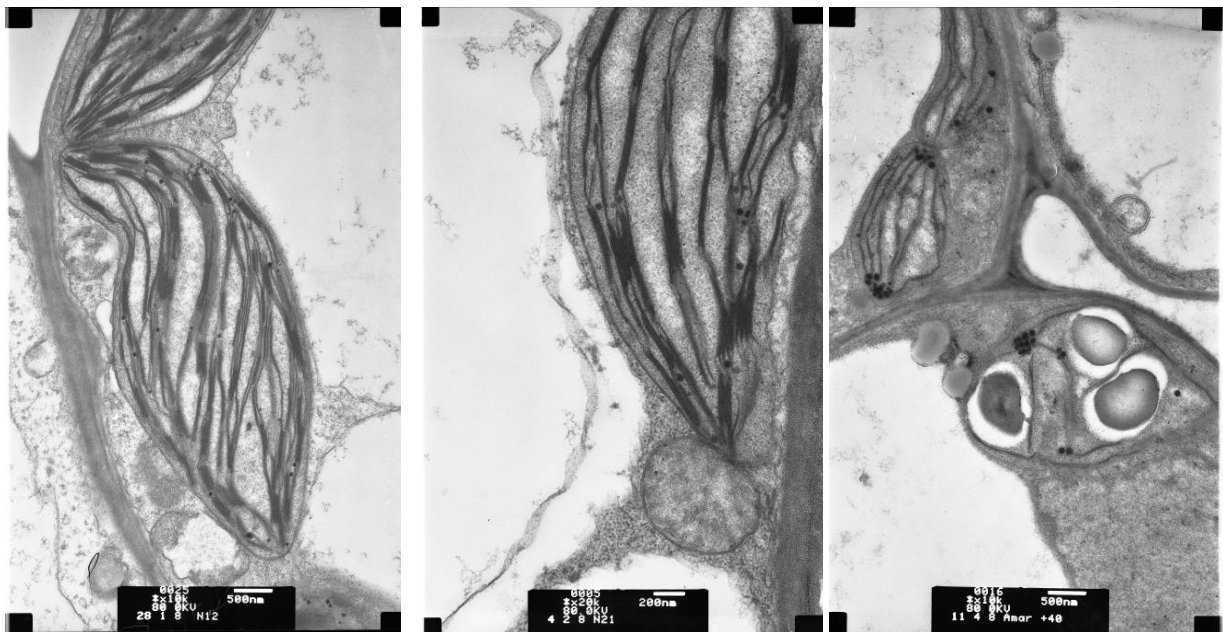


a

б

в

Рис. 5. Электронные микрофотографии фрагментов клеток листа *Brassica campestris*, иллюстрирующие ультраструктурную организацию хлоропластов и митохондрий. *a* – контроль, *б* – 4°C 2 ч, *в* – 40°C, 2 ч. Линейка: 1 мкм.



a

б

в

Рис. 6. Электронные микрофотографии фрагментов клеток листа *Amarantus caudatus*, иллюстрирующие ультраструктурную организацию хлоропластов и митохондрий. *a* – контроль, *б* – 4°C 2 ч, *в* – 40°C, 2 ч. Линейка: 1 мкм.

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР

Количество RBP можно рассматривать как биомаркер устойчивости к гипертермии.

Наряду с изучением белков и ферментов, были проведены электронно-микроскопические исследования 7-дневных проростков эксплантов *A. caudatus* и *B. campestris* в контрольных и стрессовых условиях. Это растения одинаковой экологической стратегии, отличающиеся типом фотосинтеза. *A. Caudatus* относится к растениям с C₄ типом фотосинтеза, тогда как *B. campestris* имеет C₃ тип фотосинтеза.

Хлоропласты в клетках мезофилла *B. campestris* в контрольных условиях имели преимущественно форму выгнуто-выпуклой линзы с эллипсоидным, реже округлым контуром и развитой мембранной системой, состоящей из тилакоидов стромы и гран с незначительным количеством (5-10) тилакоидов в них. В строме большей части органелл отмечены одиночные крахмальные зерна относительно небольших размеров. Митохондрии преимущественно округлой формы, с гомогенным матриксом и слабо развитыми кристами (рис. 5а).

Экспонирование проростков сурепицы озимой в течение 2 ч при 4°C не вызывало существенных изменений в ультраструктурной организации клеток. В строме хлоропластов не обнаруживались зерна крахмала (рис. 5б). В то же время содержание крахмала в хлоропластах клеток мезофилла, которые экспонировались при 40°C, было выше по сравнению с контролем. В строме хлоропластов увеличивалось также содержание пластоглобул, снижалось количество тилакоидов в гранах. Матрикс митохондрий более электронноплотный по сравнению с контрольными органеллами (рис. 5в).

Хлоропласты в клетках мезофилла *A. caudatus* в контрольных условиях преимущественно имели форму двойной выпуклой линзы с эллипсоидным контуром, характеризовались отсутствием крахмальных зерен в строме и менее развитой мембранной системой по сравнению с хлоропластами сурепицы озимой. Хлоропласты в клетках обкладки локализованы на стороне, прилегающей к сосудистому пучку. Митохондрии в клетках мезофилла имели преимущественно округлую форму с более развитыми по сравнению с клетками мезофилла сурепицы озимой кристами, локальными участками низкой электронной плотности в части органелл (рис. 6а).

После действия гипотермии выявлены более выраженные по сравнению с клетками сурепицы озимой изменения в ультраструктурной организации клеток. В части хлоропластов клеток

разных типов отмечалось появление периферийного пластидного ретикулума, полостей в строме, что вызывало образование чашеподобных форм. В вакуолях отмечалось накопление мультивезикулярных тел, в части митохондрий наблюдалось просветление матрикса (рис. 6б).

Было установлено, что после теплового шока в клетках амаранта хвостатого происходит существенное накопление крахмала, появление периферийного пластидного ретикулума, осмиофильных глобул. В гиалоплазме клеток увеличивается содержание липидных глобул, интенсифицируются автолитические процессы (рис. 6в). Следовательно, у растений одной экологической стратегии, но с разным типом фотосинтеза, выявлены отличия в ультраструктурных преобразованиях при формировании ответной реакции на температурные стрессы.

Таким образом, проведенными исследованиями было подтверждено исходное предположение о том, что у растений разных экологических стратегий существуют различия в молекулярных и структурных перестройках при адаптации к температурным воздействиям. Некоторые белки и ультраструктурные характеристики могут рассматриваться как возможные биомаркеры растений с разными типами экологических стратегий.

ЛИТЕРАТУРА

- Вяль Ю.А., Дюкова Г.Р., Леонова Н.А., Хрянин В.Н. Адаптация фотосинтетического аппарата подраста широколиственных деревьев к условиям поймы // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 1. – С. 68-72.
- Кислюк И.М., Буболо Л.С., Быков О.Д. и др. Защитное и повреждающее действие видимого света на фотосинтетический аппарат пшеницы при гипертермии // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 681-689.
- Косаковская И.В. Стрессовые белки растений. – Киев: Укр. фитосоциол. центр, 2008. – 151 с.
- Миркин Б.М., Усманов И.Ю., Наумова Л.Г. Типы стратегий растений: место в системах видовых классификаций и тенденции развития // Журн. общей биологии. – 1999. – Т. 60, №5. – С. 581-595.
- Пятыгин С.С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общей биологии. – 2008. – Т. 69, № 4. – С. 294-298.
- Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 4. – С. 485-498.

- Ainsworth E.A., Roger A.* The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising (CO₂): mechanisms and environmental interactions // *Plant Cell and Environment*. – 2007. – V. 30. – P. 258-270.
- 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, № 2. – P. 248-254.
- Demirevska K., Simova-Stoilova V., Vassileva V., Feller U.* Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties // *Plant Growth Regulation*. – 2008. – V. 56. – P. 97-106.
- Demirevska-Kepova K., Feller U.* Heat sensitivity of Rubisco, Rubisco activase and Rubisco binding protein in higher plants // *Acta Physiol. Plant.* – 2004. – V. 26, № 1. – P. 103-114.
- Demirevska-Kepova K., Juperlieva-Matveeva B.* Purification of Rubisco large subunit binding protein from barley leaves and preparation of polyclonal antisera against it // *Докл. Българ. АН*. – 1990. – V. 43, № 12. – P. 101-104.
- Demirevska-Kepova K., Simova L.* Isolation and purification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from barley leaves // *Plant Physiol. (Bulg.)*. – 1989. – V. 15, № 3. – P. 3-10.
- Demirevska-Kepova K., Simova L., Juperlieva-Matveeva B.* Rubisco activase from Barley leaves and polyclonal antibodies against it // *Докл. Българ. АН* – 1995. – V. 48, № 1. – P. 97-100.
- Ellis R.J.* The most abundant protein in the world // *Trends Biochem. Sci.* – 1979. – V. 4. – P. 241-244.
- Grime J.P.* Vegetation classification by reference to strategies // *Nature*. – 1974. – V. 250. – P. 26-31.
- Klymchuk D.O., Brown C.S., Chapman D.K. et al.* Cytochemical localization of calcium in soybean root cap cells in microgravity // *Adv. Space Res.* – 2001. – V. 27, № 5. – P. 967-972.
- Klymchuk D.O., Kordyum E.L., Vorobyova T.V. et al.* Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity // *Adv. Space Res.* – 2003. – V. 31, № 10. – P. 2283-2288.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U. et al.* Complexity of heat stress response in plants // *Cur. Opin. Plant Biol.* – 2007. – V. 10. – P. 310-316.
- Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680-685.
- Mitsuhashi W., Feller U.* Effects of light and external solutes on the catabolism of nuclear-encoded stromal proteins in intact chloroplasts isolated from pea leaves // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 100. – P. 2100-2105.
- Parry M.A., Keys A.J., Madgwick P.J. et al.* Rubisco regulation: a role for inhibitors // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59, № 7. – P. 1569-1580.
- Portis A.R.Jr.* Rubisco activase – Rubisco catalytic chaperone // *Photosynth. Res.* – 2003. – V. 75, № 1. – P. 11-27.
- Rampitsch Ch., Srinivasan H.* The application of proteomics to plant biology: a review // *Can. J. Bot.* – 2006. – V. 84. – P. 883-892.
- Sage R.F., Way D.A., Kubien D.S.* Rubisco, Rubisco activase and global climate change // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59, № 7. – P. 1581-1595.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.* Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response // *Trends Plant Sci.* – 2004. – V. 9, № 5. – P. 244-252.

Поступила в редакцию
10.02.2010 г.

INFLUENCE OF STRESS TEMPERATURES ON ELECTROPHORETIC SPECTRUMS OF PROTEINS AND ULTRASTRUCTURE OF LEAVES CELLS FROM PLANTS WITH DIFFERENT TYPES OF ECOLOGICAL STRATEGIES

I. V. Kosakivska¹, D. O. Klymchuk¹,
K. Demirevska², D. A. Bluma¹, A. Yu. Ustinova¹

¹*M. G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

²*M. Popov Institute of Plant Physiology Bulgarian Academy of Sciences
(Sofia, Bulgaria)*

To select potential biomarkers we screened plants with different types of ecological strategies. *Brassica campestris* var. *olifera* and *Amaranthus caudatus* L. were chosen from among ruderals, a new culture – hybrid *Rumex patienta* L. × *R. tianshanicus* A. Los was selected from among stress-tolerant and *Festuca pratensis* L. – from among concurrent. We determined that under the conditions

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ТЕМПЕРАТУР

of short-term heat stress observed a 2-fold increase of protein content in stress-tolerant seedlings. Using polyacrylamide gel electrophoresis we investigated the proteins spectrum. All species were characterized by presence of 50 kDa polypeptide in control and stress conditions. In *R. patienta* × *R. tianshanicus* seedlings the biosynthesis of 50 kDa polypeptide was considerably amplified during heat shock. Changes due to temperature influences took place across the entire spectrum of molecular weights. *B. campestris* seedlings under temperature influences synthesized 72 kDa polypeptides; *A. caudatus* seedlings synthesized 94 kDa polypeptides. Temperature influences caused the synthesis of 71 kDa polypeptide and an increase in 44, 78 and 109 kDa proteins in *R. patienta* × *R. tianshanicus* seedlings. In *B. campestris* seedlings the reduction in 47 kDa protein content was observed under temperature influences. Heat stress was associated with ramped-up synthesis of 60 kDa proteins in *F. pratensis* seedlings. Temperature influences caused the increase in Rubisco and RBP contents of concurrent and ruderals. Rubisco of stress-tolerant was more sensitive to heat stress than RBP. Ultra structural investigations revealed different features and directions in changes of cells organelles from plants with different types of ecological strategies under stress conditions. Perspectives of proteins usage as biomarkers of plants with different types of ecological strategies and probable role of ultra structural changes in cells organelles during adaptation to environmental stresses are discussed.

Key words: *Brassica campestris*, *Amarantus caudatus*, *Rumex patienta* × *R. tianshanicus*, *Festuca pratensis*, proteins, ultrastructure, photosynthesis, temperature stresses, ecological strategy

ВПЛИВ СТРЕСОВИХ ТЕМПЕРАТУР НА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ СПЕКТР БІЛКІВ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛІТИН ЛИСТКІВ РОСЛИН РІЗНИХ ТИПІВ ЕКОЛОГІЧНИХ СТРАТЕГІЙ

І. В. Косаківська¹, Д. О. Климчук¹,
К. Деміревська², Д. А. Блюма¹, А. Ю. Устінова¹

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної Академії наук України
(Київ, Україна)

²Інститут фізіології рослин ім. М. Попова
Болгарської Академії наук
(Софія, Болгарія)

Показано, що після дії низьких і високих стресових температур відбуваються зміни кількісних та якісних характеристик розчинних білків, Рубіско, Рубіско активази (RA) та Рубіско зв'язуючого білка (RBP), а також ультраструктури клітин листка у рослин різних екологічних стратегій. В контрольних умовах експерименту суріпиця озима (*Brassica campestris* L. var. *olifera*) та щиряця хвостата (*Amarantus caudatus* L.), а також віолента костриця лугова (*Festuca pratensis* L.) містять у 2-2,5 рази більше білка порівняно з пацієнтом щавнатом (*Rumex patienta* L. × *R. tianshanicus* A. Los). В усіх досліджених рослин присутній 50 кД поліпептид у стресових та контрольних умовах. Після температурних впливів у експерименті зростала кількість 72 та 94 кД поліпептидів, а у пацієнта спостерігалась поява 71 кД та збільшення вмісту 44, 78 і 109 кД білків. У віолента виявлено 60 кД поліпептид, відсутній в контролі. У експерименті та віолента у відповідь на дію гіпертермії збільшувалася кількість Рубіско та RBP. Рубіско пацієнта порівняно з RBP виявився менш стійким до дії високих температур. Виявлені зміни в ультраструктурній організації клітин листка експериментів. Білки та ультраструктурні характеристики розглядаються як можливі біомаркери рослин з різними типами екологічних стратегій.

Ключові слова: *Brassica campestris*, *Amarantus caudatus*, *Rumex patienta* × *R. Tianshanicus*, *Festuca pratensis*, білки, ультраструктура, фотосинтез, температурні стреси, екологічна стратегія