

Изменения спектра растворимых белков и содержания стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностатирование

Л. Е. Козеко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины
Ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина

kozeko@voliacable.com

Изучено влияние клиностатирования — способа частичного воспроизведения биологических эффектов микрогравитации в земных условиях — на белковый спектр проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Прорастание семян и рост проростков при горизонтальном клиностатировании (2 об/мин) в течение 3 сут приводили к дезориентации и некоторому замедлению роста проростков по сравнению с контрольными, растущими в стационарных условиях. Показано, что содержание белков, в том числе белков теплового шока БТШ90 и БТШ70, для которых характерен высокий уровень представленности в зрелых семенах и его снижение в ходе прорастания, оставалось повышенным в клиностатированных проростках. Высказано предположение о замедлении их гидролиза в условиях клиностатирования. При сравнении с влиянием вертикального клиностатирования на содержание БТШ90 и БТШ70 показан комплексный характер эффекта горизонтального клиностатирования, включающего ответы растения как на вращение *sensu stricto*, так и на варьирование его положения относительно вектора гравитации. Полученные данные подтверждают сделанное предположение об участии БТШ90 и БТШ70 в адаптации растений к клиностатированию.

Ключевые слова: клиностатирование, *Pisum sativum* L., прорастание семян, белковый спектр, белки теплового шока, стресс.

Введение. Результаты космических экспериментов с растениями выявили изменения в скорости ростовых процессов, структуре и метаболизме [1]. Установлено, что одним из основных факторов космического полета, действующих на биологические системы, является микрогравитация [2, 3]. В земных условиях изучение отдельных биологических эффектов микрогравитации проводят с использованием горизонтальных клиностатов, на которых объект вращается в плоскости, перпендикулярной направлению гравитационного вектора [3–5].

После фундаментального открытия гравичувствительности растительных клеток возник вопрос о механизмах адаптации клеток к микрогравитации [1]. Важнейшим звеном стрессовой реакции расте-

ния на внешние стимулы является перестройка генной экспрессии и всего белкового обмена [6]. Данные по влиянию клиностатирования на белковый обмен растений неоднозначны. Так, изучение состава растворимых белков в листьях и стеблях растений *Arabidopsis thaliana*, росших в условиях клиностатирования, не выявило сколько-нибудь значительных качественных или количественных изменений [7]. Отсутствовали также различия в суммарном белковом спектре и составе изоформ актина в корнях проростков *Beta vulgaris*, растущих в стационарных условиях или при клиностатировании [8]. В то же время в работах других исследователей отмечались существенные изменения под влиянием клиностатирования в белковом спектре листьев орхидей [9], листьев и корней

© Л. Е. КОЗЕКО, 2006

Vicia faba [10, 11], в составе молекулярных форм актина мезофильных протопластов *V. faba* [12], в активности и компонентном составе дегидрогеназ протонемы *Funaria hygrometrica* [13].

Быстрое исчезновение отдельных изоформ актина в мезофильных протопластах *V. faba* в результате как клиностатирования в течение 3 и 6 мин, так и 6-мин действия микрогравитации в условиях параболического полета сопровождалось образованием убиквитиновых конъюгатов [12]. Изменение уровня убиквитинирования отдельных белков при клиностатировании [10—12] указывает на интенсификацию их протеолиза, что в свою очередь может свидетельствовать об изменении функциональной нагрузки этих белков в условиях измененной гравитации. Поскольку убиквитин относится к стрессовым белкам, а именно — к белкам теплового шока (БТШ) [14], можно предположить участие и других стрессовых белков в ответе клетки на действие измененной гравитации. Как известно, БТШ, в частности, БТШ70 и БТШ90, являясь молекулярными шаперонами, участвуют в первоначальном фолдинге вновь синтезированных белков и рефолдинге белков, деформированных при стрессе [15]. Экспрессия генов БТШ происходит в ответ на действие различных внешних факторов и рассматривается как один из компонентов неспецифической стрессовой реакции клетки [14, 16]. Исходя из этого мы предположили участие БТШ в адаптации растения к измененной гравитации.

Целью данной работы было оценить влияние клиностатирования на белковый спектр и содержание БТШ90 и БТШ70 в зародышевой оси семени гороха в динамике от начала прорастания до формирования 3-сут проростков.

Материалы и методы. Семена *Pisum sativum* L. (сорт Дамир) стерилизовали с поверхности 0,5 %-м раствором NaOCl в течение 10 мин, после чего на протяжении 1 ч промывали холодной проточной водой. Затем семена заворачивали в трубочки из влажной фильтровальной бумаги, ориентируя микропиле вниз, помещали в пластиковый стакан и проращивали в темноте при температуре 20 ± 1 °С в стационарных условиях (контроль) или на горизонтальном клиностате (2 об/мин). В работе анализировали сухие семена, 1-, 2- и 3-сут проростки. Сухие семена выдерживали в течение 30 мин при температуре 4 °С для облегчения отделения зародышевых осей. Зародышевые оси или проростки отделяли от семядолей на холоду, измеряли их

длину, часть из них использовали для приготовления навесок по 100 мг, которые замораживали и хранили при температуре -70 °С до анализа, другую часть — для контрольного определения содержания в них влаги, высушивая при $t = 90$ °С.

Для электрофоретического разделения белки экстрагировали, растирая замороженный материал в охлажденной фарфоровой ступке до порошка и добавляя экстракционный буфер, содержащий 60 мМ трис-HCl, 60 мМ дитиотреитол, 2 %-й додецилсульфат натрия (ДС-Na), 15 %-ю сахарозу и протеопротектор 2 мМ фенилметилсульфонилфторид, pH 8,0. Гомогенат выдерживали в течение 3 мин на кипящей водяной бане и центрифугировали (10 мин, 12000 g, 4 °С). Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Бредфорда [17], при этом показания спектрофотометра для образцов белка в 2—3 раза превышали контрольные, полученные для экстракционного буфера. Все экстракты использовали свежими или хранили при $t = -70$ °С. Их аликвоты, содержащие 50 мкг белка, наносили на градиентный (10—15 %) полиакриламидный гель (ПААГ), содержащий ДС-Na. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу [18] с использованием прибора Hoeffer SE 400 («Amersham», Великобритания). Гели окрашивали кумасси G-250. Для определения молекулярной массы (м. м.) белков использовали набор белков-стандартов с м. м. 6,5—116 кДа («Sigma», США).

Изменения в уровне БТШ70 и БТШ90 изучали методами иммуноблоттинга и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Белки, разделенные электрофорезом в ПААГ (как указано выше), переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham») в электроблоттере в течение 60 мин при 400 мА в условиях охлаждения. Блокирующим раствором служил 3 %-й бычий сывороточный альбумин (БСА) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4). Для выявления БТШ70 и БТШ90 на мембране использовали моноклональные антитела («Sigma») в разведении 1:1000 и 1:400 соответственно в ФСБ, содержащем 1 % БСА и 0,01 % твин-20. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С, после чего мембрану отмывали в 1 % БСА и 0,1 % твине-20 в ФСБ 4 раза по 5 мин. Вторичными антителами служили анти-мышинные IgG, конъюгированные с биотином («Sigma»), в разведении 1:200000 в ФСБ,

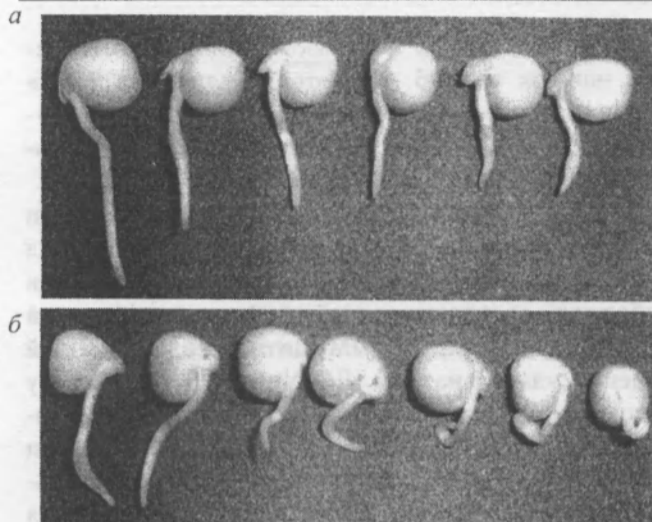


Рис. 1. Проростки гороха, росшие в течение 3-х сут от начала набухания семян в стационарных условиях (а) или при клиностатации (б)

содержащем 1 % БСА и 0,01 % твин-20. Биотин визуализировали с помощью экстравидин-пероксидазной системы («Sigma»), выявляя активность пероксидазы с помощью SIGMA FAST™ DAB.

Денситометрическим анализом по результатам не менее трех разных экспериментов с использованием компьютерной программы ImageMaster™ TotalLab, 2.00 («Amersham») определено количество белковых зон в каждом образце, молекулярные массы (кДа) и количество белка (усл. ед.), соответствующие каждой зоне. Последний из показателей находили при нулевом фоне, используя функцию «rolling ball».

Методом ИФА исследовали количество БТШ90 и БТШ70 в 3-сут проростках, росших в стационарных условиях, на горизонтальном или вертикальном клиностате (2 об/мин). Остальные условия были аналогичными указанным выше. Белок экстрагировали с ФСБ, pH 7,4. Предварительно белковый экстракт проростков гороха анализировали методом последовательных разведений и определили, что наиболее эффективной концентрацией суммарного белка для ИФА БТШ70 и БТШ90 является 15,6 мкг/мл. Поэтому в данной работе на планшет наносили аликвоты экстракта по 15,6 мкг белка в четырех аналитических повторностях. Для выявления БТШ70 и БТШ90 использовали моноклональные антитела («Sigma») в разведении 1:5000 и 1:400 в ФСБ соответственно. Вторичными антителами для ИФА служили анти-мышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma»).

Пероксидазную активность выявляли с помощью хромогенного субстрата 2,2-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) («Sigma»). Оптическую плотность регистрировали с использованием иммуноферментного анализатора («Bio-Rad», США) при длине волны 405 нм. Проведены три независимых эксперимента. Результаты экспериментов подвергали статистическому анализу с использованием компьютерной программы «STATISTICA 6.0».

Результаты и обсуждение. Проклевывание семян гороха наблюдалось через 1 сут после начала набухания как в контроле, так и при клиностатации. К концу 3-х сут проростки достигали длины $13,2 \pm 1,5$ мм в контроле и $12,1 \pm 1,8$ мм в опыте. При этом корни проростков в контроле росли, как правило, вниз по направлению вектора гравитации (рис. 1, а), а рост клиностазированных проростков не был ориентирован в одном направлении (рис. 1, б). Тенденция к снижению скорости роста проростков гороха и его дезориентация при клиностатации свидетельствуют об отклонении ростовых процессов от нормы уже на ранних сроках развития проростков, что, по-видимому, должно отражаться на метаболизме клеток и, в частности, на белковом обмене.

Содержание белка в 3-сут проростках существенно не различалось и составляло $35,0 \pm 0,8$ и $34,4 \pm 0,9$ мкг/мг сухой массы в контроле и при клиностатации соответственно. Анализ электрофореграмм растворимых белков из зародышевых осей сухих семян, а также 1-, 2- и 3-сут проростков, росших в стационарных условиях и при клиностатации, суммарно по всем образцам выявил 43 белковые зоны с м. м. в диапазоне от 26 до 140 кДа (рис. 2). В ходе прорастания снижалось содержание белков с м. м., соответствующей 26,8; 28,3; 30,9; 31,4; 36,2; 37,0; 44,1; 46,5; 65,5; 69,4; 86,3; 93,3; 132,2 кДа, и увеличивалось содержание белков с м. м. 27,3; 32,7 и 33,6 кДа. При этом следует отметить, что 1) белки 86,3 и 132,2 кДа присущи только периоду прорастания *sensu stricto* поскольку на 2-е и 3-и сут детектировались в следовых количествах; 2) белки с м. м., соответствующей 30,9; 36,2; 37,0; 44,1; 46,5; 69,4; 93,3 и 132,2 кДа, представлены в сухом семени в большом количестве и резкое снижение их содержания в процессе прорастания свидетельствует об их мобилизации. Следует подчеркнуть, что все эти изменения наблюдались как в контроле, так и при клино-

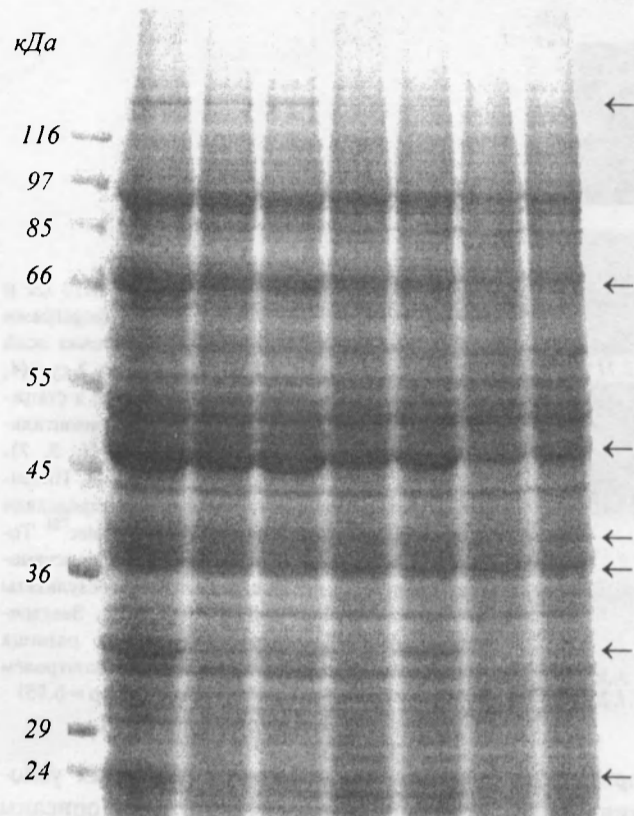


Рис. 2. Электрофореграммы растворимых белков гороха: 1 — зародышевой оси сухого семени; 2, 3 — 1-сут; 4, 5 — 2-сут; 6, 7 — 3-сут проростков, росших в стационарных условиях (контроль, 2, 4, 6) и на горизонтальном клинострате (3, 5, 7). Электрофорез проводили в градиентном 10—15 % ПААГ в присутствии ДС-На. Слева приведены м. м. белков-стандартов, справа стрелками указаны зоны, количество белка в которых было выше в клиностратном варианте по сравнению с контролем на протяжении исследованного периода

Относительное содержание белков проростков гороха, полученное в результате анализа электрофореграмм с использованием программы ImageMaster™ TotalLab

№ белковой зоны	Молекулярная масса, кДа	Сухие зародышевые оси	Относительное содержание белка от суммарного количества белка в электрофореграмме, %					
			Срок от начала прорастания, сут					
			1		2		3	
			Контроль	Клиностративание	Контроль	Клиностративание	Контроль	Клиностративание
2	132,2	1,46	1,36	1,43	0,76	0,75	0,19	0,58
15	69,4	6,74	6,14	6,34	3,16	3,25	2,93	2,96
24	44,1	8,69	8,38	8,58	7,52	7,99	5,68	5,74
27	37,0	7,98	7,66	8,15	4,67	6,25	4,40	5,77
28	36,2	3,56	2,54	2,79	1,16	1,82	0,61	0,82
34	30,9	5,33	3,23	3,30	2,24	3,98	0,71	1,08
41	26,8	5,47	2,53	3,51	3,28	3,52	2,16	2,38

Примечание. НСР_{0,95} = 0,05 %. Приведены белки, содержание которых изменялось под влиянием клиностративания на протяжении всего исследованного периода.

стативации. Известно, что в ходе прорастания семени происходят значительные изменения в его белковом составе [19—21]: белки, аккумулированные в зрелом семени в большом количестве, — запасные белки, белки, связанные с устойчивостью клеток к обезвоживанию, в том числе белки LEA (late embryoogenesis abundant), дегидрины, белки теплового шока — гидролизуются и активируется синтез белков, обеспечивающих реактивацию и в дальнейшем регуляцию ростовых процессов. Однако в условиях клиностративания (при сохранении основных закономерностей изменения белкового состава в ходе формирования и роста проростков) были выявлены некоторые количественные отличия в интенсивности окрашивания отдельных зон (таблица): содержание белков с м. м., соответствующей 26,8; 30,9; 36,2; 37,0; 44,1; 69,4 и 132,2 кДа, было выше в клиностративанных проростках по сравнению с контрольными на протяжении всего анализируемого периода.

Заметим, что содержание упомянутых выше белков в ходе прорастания снижается. Исходя из этого можно предположить, что более высокая их представленность в клиностративанных проростках обусловлена снижением скорости гидролиза таких белков, что в свою очередь может быть одной из причин снижения скорости роста проростка. Эти данные согласуются с другими, достаточно многочисленными и разносторонними сведениями об изменении скорости биологических процессов в условиях клиностративания [1].

Зафиксированные морфофизиологические от-

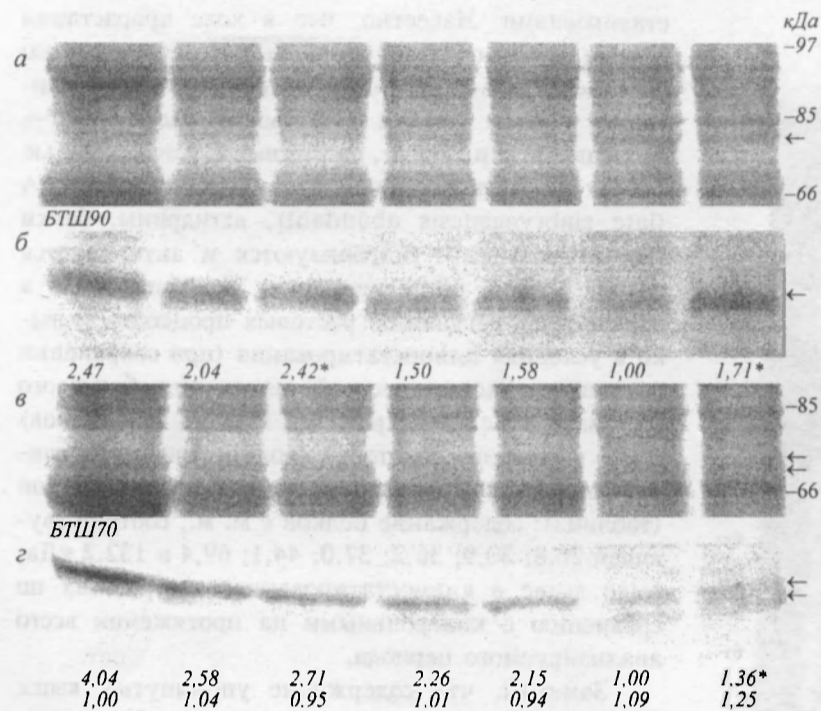


Рис. 3. Иммуноблоты БТШ90 (б), БТШ70 (с) и соответствующие им участки электрофоретграмм (а, в) суммарных белков из зародышевых осей сухих семян гороха (1) и 1-сут (2, 3); 2-сут (4, 5) и 3-сут (6, 7) проростков, растущих в стационарных условиях (2, 4, 6) и при горизонтальном клиностатировании (2 об/мин) (3, 5, 7). Расположение БТШ указано стрелками. Интенсивность окрашивания белковых зон определяли в усл. ед. с использованием ImageMaster™ TotalLab и выражали как отношение к интенсивности наименее окрашенной зоны (результаты приведены под фотографиями блотов). Звездочкой отмечены данные, для которых разница между клиностатным вариантом и контролем была статистически достоверной (для $p = 0,95$)

клонения в росте проростков и в белковом обмене дают основание предположить наличие в растении процессов, как чувствительных к изменению его положения относительно вектора гравитации, так и позволяющих ему стабилизировать метаболизм в этих условиях. Функцией стабилизации в стрессовых условиях белковых структур и отдельных процессов, в частности, как известно, обладают белки теплового шока [14, 22].

По результатам иммуноблота с антителами против БТШ90 выявлена одна иммунореактивная зона с м. м. около 81 кДа, а с антителами против БТШ70 — две зоны с м. м. около 70 кДа (рис. 3). В зародышевых осях сухих зрелых семян определен высокий уровень БТШ90 и одного из БТШ70 (с меньшей электрофоретической подвижностью), а также снижение их уровня в ходе прорастания. При этом в клиностатированных проростках количество этих белков было выше по сравнению с проростками, растущими в стационарных условиях (за исключением БТШ70 в 2-сут проростках). Содержание другого БТШ70 (с более высокой электрофоретической подвижностью) мало изменялось во всех вариантах опыта. Известно, что БТШ образуют семейства, включающие белки с различной внутриклеточной компарментализацией и функциями, среди них есть как конститутивные,

присутствующие в клетках при нормальных условиях, так и индуцибельные [14]. У гороха описаны два белка — члены семейства БТШ70 — БТШ70 с м. м. 71,166 кДа и гомолог БТШ70 с м. м. 71,003 кДа [14]. Стабильная транскрипция гена — гомолога БТШ70 выявлена в различных органах растения гороха в нормальных условиях, в том числе в развивающихся семенах, тогда как для мРНК БТШ70 установлено накопление в ходе созревания семян [23, 24]. В зрелых семенах обнаружено также высокое содержание БТШ [25]. Для *A. thaliana* показано, что уровень БТШ70 значительно снижался в процессе прорастания семян, в то время как уровень гомолога БТШ70 оставался постоянным на протяжении всего этого периода [21]. Принимая во внимание данные, полученные другими исследователями, можно предположить, что выявленные нами с помощью антител к БТШ70 белки являются БТШ70 и гомологом БТШ70 (с меньшей и большей электрофоретической подвижностью соответственно).

Полагают, что БТШ могут участвовать в защите клеточных структур при пониженной оводненности клеток, в частности, при обезвоживании семян в период созревания, а также при прорастании до тех пор, пока ткани еще не регидратировались полностью [22, 24]. С другой стороны, эти

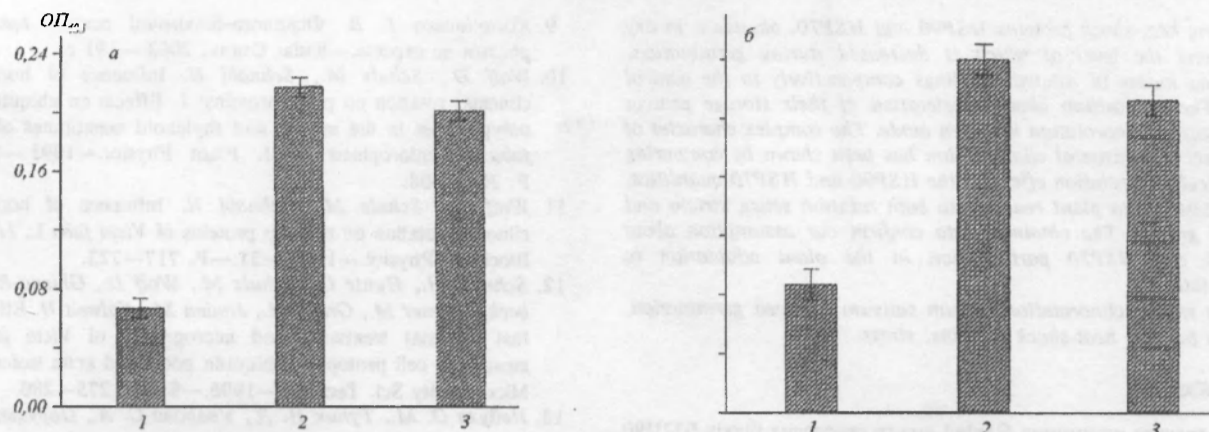


Рис. 4. Данные ИФА по влиянию горизонтального и вертикального клинотатирования на количество БТШ90 (а) и БТШ70 (б) в 3-сут проростках гороха, растущих в стационарных условиях (1), при горизонтальном (2) и вертикальном (3) клинотатировании

белки накапливаются в клетках в больших количествах в ответ на неблагоприятные внешние воздействия [9, 14]. Анализируя полученные нами данные иммуноблотов, можно предположить следующие причины повышенного под влиянием клинотатирования уровня БТШ90 и БТШ70 в проростках: задержка их естественного протеолиза при прорастании, активация их синтеза за счет трансляции мРНК, запасенных в сухом семени, и/или индукция геной экспрессии как реакция растения на клинотатирование.

Поскольку в действии клинотатирования выделяют два эффекта — эффект вращения объекта и эффект положения, обусловленный его пространственной ориентацией [26] — в данной работе предпринята попытка выяснить, какая из этих двух составляющих действует на растение при горизонтальном клинотатировании, вызывая повышенный уровень БТШ в клетках. Чтобы вычлени эффект вращения, сравнивали содержание БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха, растущих в условиях горизонтального и вертикального клинотатирования, а также в норме. Для этого использовали ИФА, дающий более точную количественную оценку. Анализ показал значительное повышение содержания как БТШ90, так и БТШ70 при обоих способах клинотатирования, в то же время влияние горизонтального клинотатирования было более выраженным (рис. 4). Исходя из этого можно предположить, что основную долю в эффекте горизонтального клинотатирования составляет эффект вращения. Тем не менее, изменение положения растения относительно вектора гравитации также вносит свой вклад в изменение уровня БТШ90 и БТШ70. Сравнение эффектов горизонтального и

вертикального клинотатирования подтверждает точку зрения о комплексном характере влияния горизонтального клинотатирования на растение [3, 26], а именно — вращение само по себе является для растения стрессовым фактором, поэтому следует вычлени из суммарного биологического эффекта влияние измененной гравитации.

Выводы. Таким образом, в проростках гороха, развивающихся в условиях клинотатирования, выявлен повышенный уровень ряда белков, в том числе БТШ90 и БТШ70, для которых характерно высокое содержание в сухих семенах и активный гидролиз их в ходе прорастания. Показан комплексный характер влияния горизонтального клинотатирования на уровень БТШ в растении. В целом полученные данные могут служить подтверждением предположения о стрессовой природе действия клинотатирования и об участии БТШ90 и БТШ70 в адаптации растения к этому фактору.

Автор искренне признателен д-ру Н. Ю. Евдокимовой (Ин-т биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины) за методические консультации и помощь в проведении ИФА.

L. Ye. Kozeko

Alterations in a soluble protein pattern and a quantity of stress proteins HSP90 and HSP70 in pea seedlings in response to clinorotation

Summary

The influence of clinorotation (a method of partial simulation of the biological effects of microgravity under the earth conditions) on protein spectrum of pea seedlings (*Pisum sativum* L.) has been investigated. The germination of seeds under horizontal clinorotation (2 rpm) for 3 days resulted in disorientation and some slowing down of seedling growth in comparison to the stationary vertical control. It has been shown that the protein content,

including heat-shock proteins HSP90 and HSP70, abundant in dry seeds and the level of which is decreased during germination, remained higher in rotated seedlings comparatively to the control ones. The supposition about deceleration of their storage protein hydrolysis at clinorotation has been made. The complex character of the effect of horizontal clinorotation has been shown by comparing to vertical clinorotation effect on the HSP90 and HSP70 quantities, which testifies to plant reaction to both rotation *sensu stricto* and altered gravity. The obtained data confirm our assumption about HSP90 and HSP70 participation in the plant adaptation to clinorotation.

Key words: clinorotation, *Pisum sativum* L., seed germination, protein pattern, heat-shock proteins, stress.

Л. Е. Козеко

Зміни спектра розчинних білків і вмісту стресових білків БТШ90 і БТШ70 у проростках гороху у відповідь на клинотатування

Резюме

Вивчено вплив клинотатування у земних умовах на білковий спектр проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Проростання насіння при горизонтальному клинотатуванні (2 об/хв) протягом 3 діб призводило до дезорієнтації проростків. Показано, що вміст білків, у тому числі білків теплового шоку БТШ90 і БТШ70, для яких характерним є високий рівень представленості у сухому насінні та його зниження упродовж проростання, залишався вищим у клинотатованих проростках порівняно з контрольними. Висловлено думку про можливість уповільнення їхнього гідролізу за умов клинотатування. При порівнянні із впливом вертикального клинотатування на вміст БТШ90 і БТШ70 показано комплексний характер ефекту горизонтального клинотатування, що включає відповідь рослини як на обертання *sensu stricto*, так і на варіювання його положення відносно вектора гравітації. Отримані дані підтверджують припущення щодо участі БТШ90 і БТШ70 в адаптації рослин до клинотатування.

Ключові слова: клинотатування, *Pisum sativum* L., проростання насіння, білковий спектр, білки теплового шоку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Белявская Н. А., Жадько С. И., Климчук Д. А., Полулях Ю. А. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии.—М.: Наука, 1994.—293 с.
2. Газенко О. Г., Ильин Е. А., Парфенов Г. П. Космическая биология: Некоторые итоги и перспективы // Изв. АН СССР. Сер. биол.—1974.—№ 4.—С. 461—475.
3. Сытник К. М., Кордюм Е. Л., Недуха Е. М., Сидоренко П. Г., Фомичева В. М. Растительная клетка при изменении геофизических факторов.—Киев: Наукова думка, 1984.—136 с.
4. Меркис А. И. Геотропическая реакция растений.—Вильнюс: Минтис, 1973.—264 с.
5. Sievers A., Hensel W. Towards a more critical use of clinostats // Naturwissenschaften.—1981.—68.—С. 429.
6. Sachs M. M., Ho T.-H. D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants // Annu. Rev. Plant Physiol.—1986.—37.—Р. 363—376.
7. Piastuch W. C., Brown C. S. Protein expression in *Arabidopsis thaliana* after chronic clinorotation // J. Plant Physiol.—1995.—146.—Р. 329—332.
8. Козеко Л. Е. Актин проростков *Beta vulgaris* при клинотатуванні // Космічна наука і технологія.—2004.—10, № 5/6.—С. 218—220.
9. Косаківська І. В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів.—Київ: Сталь, 2003.—191 с.
10. Wolf D., Schulz M., Schnabl H. Influence of horizontal clinostat rotation on plant proteins: 1. Effects on ubiquitinated polypeptides in the stroma and thylakoid membranes of *Vicia faba* L. chloroplasts // J. Plant Physiol.—1993.—141.—Р. 304—308.
11. Wolf D., Schulz M., Schnabl H. Influence of horizontal clinostat rotation on root tip proteins of *Vicia faba* L. // Plant Biochem. Physiol.—1993.—31.—Р. 717—723.
12. Schnabl H., Hunte C., Schulz M., Wolf D., Ghiena-Rahlenbeck, Bramer M., Graab M., Janien M., Kalweit H. Effects of fast clinostat treatment and microgravity of *Vicia faba* L. mesophyll cell protoplast ubiquitin pools and actin isoforms // Microgravity Sci. Technol.—1996.—9.—Р. 275—280.
13. Недуха О. М., Тупик Н. Д., Уварова С. А., Овруцька І. І. Дія гіпогравітації на активність та множинні молекулярні форми дегідрогеназ протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. бот. журн.—1985.—42, № 1.—С. 52—55.
14. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol.—1991.—42.—Р. 579—620.
15. Hendrick J. P., Hartl F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // Annu. Rev. Biochem.—1993.—62.—Р. 349—384.
16. Leshem Y. Y., Kuiper P. J. C., Erdei L., Lurie S., Perl-Treves R. Do Selye's mammalian «GAS» concept and «co-stress» response exist in plants // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1998.—851.—Р. 199—208.
17. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—Р. 248—254.
18. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—Р. 680—685.
19. Козеко Л. Е. Белоксителирующая система осевых органов семени фасоли: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1991.—20 с.
20. Job C., Kersulec A., Ravasio L., Chareyre S., Pepin R., Job D. The solubilization of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming and early germination // Seed Sci. Res.—1997.—7.—Р. 225—243.
21. Gallardo K., Job C., Groot S. P. C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming // Plant Physiol.—2001.—126.—Р. 835—848.
22. Hong S.-W., Vierling E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2000.—97.—Р. 4392.
23. De Rocher A., Lauzon L., Vierling E. HSP70 expression during seed development // J. Cell Biochem.—1990.—14E:298 (Abstr.).
24. DeRocher A., Vierling E. Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs // Plant Mol. Biol.—1995.—27.—Р. 441—456.
25. Wehmeyer N., Hernandez L. D., Finkelstein R. R., Vierling E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the development program of late seed maturation // Plant Physiol.—1996.—112.—Р. 747—757.
26. Brown A. H., Dahl A. O., Chapman D. K. Morphology of *Arabidopsis* grown under chronic centrifugation and on the clinostat // Plant Physiol.—1976.—57.—Р. 358—364.

УДК 581.134:581.142 + 581.84
Надійшла до редакції 29.07.05