

УДК 58.036:577:582.683.2

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ НА КІЛЬКІСНІ ТА ЯКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІЛКІВ РІПАКУ *BRASSICA NAPUS* VAR. *OLEIFERA*

І.В. КОСАКІВСЬКА¹, Д.А. БЛЮМА¹, А.Ю. УСТІНОВА¹, К. ДЕМІРЕВСЬКА²

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
01601 Київ, вул. Терещенківська, 2, ДСП-1
e-mail: science@botany.kiev.ua

²Інститут фізіології рослин ім. М. Попова Болгарської академії наук
1113 Софія, вул. Академіка Г. Бончева, блок 21, Болгарія

Досліджено кількісні та якісні зміни, які відбувалися з розчинними білками проростків двох контрастних за стійкістю сортів ріпаку *Brassica napus* var. *oleifera* після дії короткотривалих температурних стресів. Виявлено неспецифічні та специфічні ознаки в адаптаційних перебудовах. Тепловий стрес супроводжувався виразнішими порівняно з холододовим змінами в білкових спектрах обох сортів ріпаку. У сорту Триангел після холододового стресу зменшувався вміст розчинного білка, після теплового — утворювався поліпептид із мол. м. 78 кД, змінювались кількості поліпептидів із 62, 58, 56, 40, 34 кД та низькомолекулярних. У сорту Мілена після дії холододового стресу вміст розчинного білка збільшувався, після теплового — змінювався вміст поліпептидів із мол. м. 78, 69 і 63 кД. Білки, утворення яких значно посилюється після дії температурних стресів, можна розглядати як біомаркери стійкості.

Ключові слова: *Brassica napus* var. *oleifera*, температурні стреси, білки, біомаркер, стійкість.

Абіотичні стреси вважають однією з головних причин втрати понад 50 % урожаю більшості сільськогосподарських культур в світі [17]. Високі й низькі температури навколишнього середовища є абіотичними стресовими чинниками, що впливають на ріст, розвиток, фізіологічні та біохімічні характеристики рослин, їх продуктивність. Клітини рослин відповідають на температурний стрес змінами процесу біосинтезу білків. Збереження структури білкових молекул і запобігання їх агрегації важливі для існування в стресових умовах. Протеомною пластичністю рослини забезпечують власну реконструкцію в період розвитку, адаптуються до змін навколишнього середовища. Перевищення нормальної для рослин температури на 5—10 град супроводжується синтезом специфічних білків, так званих білків теплового шоку (БТШ) [19, 21]. Розкриття механізму формування відповіді рослини на стрес і з'ясування ролі білків у забезпеченні їх стійкості мають велике практичне й теоретичне значення [20]. Вживанню в трансформованих умовах доквілля сприяють тимчасові зміни в експресії генів. Установлено, що температурний режим впливає на вміст нуклеїнових кислот. Так, за підвищення температури збільшується вміст мРНК у рослинах гарбуза [13], змінюється транскрипція генів пластоми ячменю [1]. До 4 % геному (від кількості

функціонуючих генів) може змінюватись під час низькотемпературного стресу [7].

Метою нашої роботи було дослідження якісних і кількісних змін білків у проростках двох сортів ріпаку, що різнились за стійкістю до дії несприятливих абіотичних чинників, в умовах температурних стресів і пошук можливих молекулярних біомаркерів стійкості.

Методика

Досліджували надземну частину 7-добових проростків ріпаку *Brassica napus* var. *oleifera* сортів Триангел і Мілена. Сорт Триангел характеризується жаро- і посухостійкістю, сорт Мілена — холодостійкістю. Насіння ріпаку ми отримали з Інституту фізіології рослин ім. М. Попова Болгарської академії наук.

Насіння відібраних сортів калібрували, розклали на фільтрувальний папір, зволожений дистильованою водою, і вміщували у чашки Петрі для пророщування. Перші дві доби насіння пророщували в термостаті за температури 25 °С в умовах постійної темряви. Після цього перенесли на світло (фотоперіод 15 год, 9 год темряви, освітлення 2500 лк). Щодоби в чашки додавали по 1 мл дистильованої води. Для експерименту відбирали 7-добові проростки. Температурні стреси моделювали витриманням проростків упродовж 2 год за температури +40 і +4 °С. Після цього надземну частину проростків зрізали і зважували на електронних вагах Ohaus Adventurer (Китай). По 100 мг зразків кожного сорту ріпаку в трьох повторностях заморожували в дипфрізері Jouan VX100 (Чехія) за температури –82 °С для подальшого дослідження.

Щоб виділити розчинний білок, рослинний матеріал розтирали в охолодженій ступці, білок екстрагували в 50 мМ *трис*-HCl буфері (pH 6,8), що містив 0,3 М сахарози, 8 мМ EDTA, 4 мМ дитіотреїтолу (DTT), 2 мМ фенілметилсульфонілфториду (PMSF). Отриманий гомогенат центрифугували за 6000 об/хв упродовж 10 хв при +4 °С на центрифугі Jouan GR20.22 (Чехія).

Надосадову рідину використовували для ПААГ-електрофорезу, попередньо визначивши концентрацію білка за методом Бредфорда [3]. Білки розділяли в 13 %-му розчині ПААГ за методикою [14]. Наносили по 50 мкг/мл білка. Маркером слугував набір стандартних білків із мол. м. 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 15, 10 кД. Для загальної характеристики поліпептидів використано програму TotalLab 2.1.

Робота виконана в рамках наукового проекту міжнародного двостороннього співробітництва між Інститутом ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України та Інститутом фізіології рослин ім. М. Попова Болгарської академії наук.

Результати та обговорення

За результатами дослідження білків (протеому) та порівняння їхнього складу до і після абіотичного впливу можна отримати інформацію щодо формування рослиною відповідних захисних механізмів. Протеом забезпечує зв'язок між транскриптомом (мРНК) та метаболомом [6, 8]. Інформація про структурно-функціональні зміни на рівні геному, транскриптому, протеому та метаболому дає змогу проаналізувати фізіолого-біохімічну стратегію адаптації рослин до стресів.

Провівши експерименти, ми встановили, що вміст розчинних білків у надземній частині 7-добових проростків ріпаку сорту Триангел після дії короткотривалого теплового стресу практично не змінювався, а після холодового — зменшувався. У сорту Мілена вміст розчинного білка після дії теплового стресу зменшувався, а після холодового, навпаки, зростав (таблиця). Експонування за низьких температур супроводжувалось зміною вмісту ліпідів у мембранах, збільшенням кількості розчинних білків і кріопротекторних молекул, таких як цукри, пролін, що загалом сприяє холодовій аклімації рослин [9].

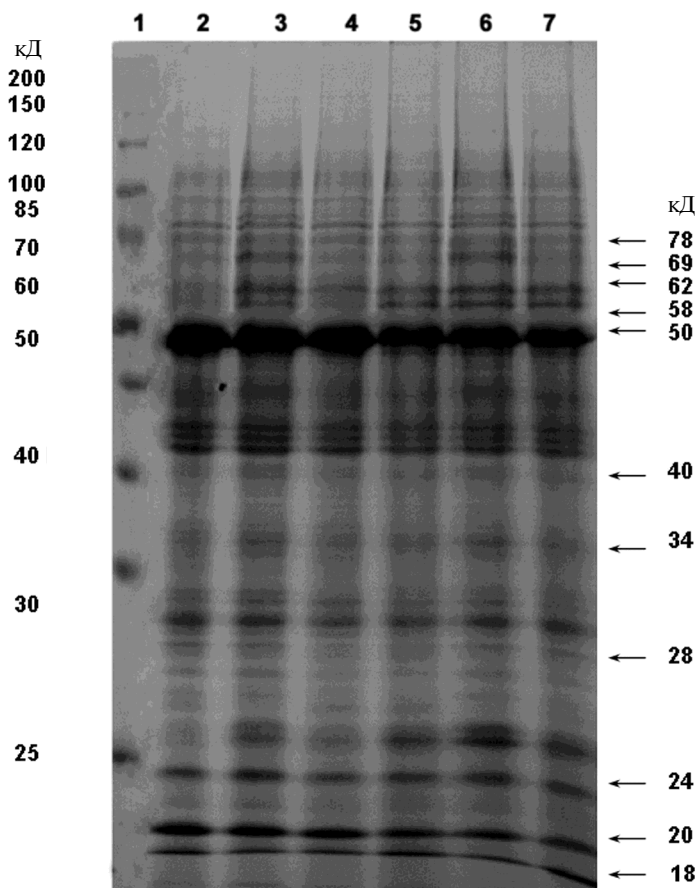
Методом диск-електрофорезу в ПААГ досліджено поліпептидний склад білків ріпаку в контролі та після дії температурних стресів. За контрольних умов у досліджуваних сортах чітко виявлявся поліпептид з мол. м. 50 кД, вміст якого у сорту Триангел був вищим як у контролі, так і після дії стресів. У ріпаку сорту Триангел після дії теплового стресу з'являвся поліпептид з мол. м. 78 кД, збільшувався вміст поліпептидів із мол. м. 62, 58, 56, 40, 34, 28, 24, 21, 20, 18 кД порівняно з контролем і після дії холодового стресу. У ріпаку сорту Мілена після дії теплового стресу зростав вміст поліпептидів із мол. м. 78, 69, 63 кД порівняно з контролем та після дії холодового стресу. Температурні стреси помітно змінювали склад низькомолекулярних поліпептидів, причому реакція на холодний стрес у ріпаку сорту Мілена була виразнішою (рисунок).

Білки, серед яких є і стресові, відіграють важливу роль у забезпеченні клітинного гомеостазу в несприятливих умовах, захисті та відновленні рівноваги після стресу [2]. Дія теплового стресу супроводжується синтезом високо- (з мол. м. 60—100 кД) та низькомолекулярних (з мол. м. 15—45 кД) БТШ [18]. Білки-шаперони БТШ70 синтезуються у відповідь на дію екологічних стресів, таких як тепло, холод, посуха, хімічні та інші впливи [15]. Виявлено, що рослини тютюну з підвищеним вмістом БТШ70 відзначалися стійкістю до посухи [5]. Експресія генів, що кодують БТШ70, позитивно корелює з розвитком теплостійкості, а також супроводжується підвищенням стійкості до водного, сольового і високотемпературного стресів. З огляду на це було запропоновано розглядати БТШ70 як потенційний біомаркер стійкості [11]. БТШ70 характеризується чутливістю до низьких температур. Вміст цього білка в рослинах рису, які зазнали впливу холодового стресу, зменшувався, що, вірогідно, пов'язано з деградацією хлоропластів [10]. Ми встановили, що реакція білків, які можна віднести до родини БТШ70, на тепловий стрес була виразнішою порівняно з їх реакцією на дію холодового стресу.

Білки родини БТШ60 знайдено в мітохондріях і хлоропластах у стресіндукованому й конститутивному станах [20]. Головна їх функція полягає в забезпеченні конформаційних перебудов мітохондріальних і

Вміст розчинного білка у надземній частині 7-добових проростків ріпаку Brassica napus var. oleifera сортів Триангел і Мілена в контролі та після дії температурних стресів

Варіант	Вміст білка, мг/г	
	Триангел	Мілена
Контроль	131,0±0,3	129,0±0,3
Тепловий стрес	133,0±0,3	117,0±0,2
Холодовий стрес	120,0±0,3	136,0±0,3



Спектры поліпептидів надземної частини 7-добових проростків ріпаку сортів Триангел (2–4) та Мілена (5–7) після дії температурних стресів:

1 – маркер; 2, 5 – контроль; 3, 6 – тепловий стрес (2 год, 40 °С); 4, 7 – холодний стрес (2 год, 4 °С)

хлоропластних поліпептидів. Білки, які належать до цієї родини, ми виявили в контрольних і стресових умовах, причому після дії теплового стресу їх вміст істотно зростає. Низькомолекулярні білки теплового шоку синтезуються в хлоропластах під контролем хлоропластного пластоми [4, 21]. Вони не можуть самостійно відновити зруйновані білки, але утворюють зв'язки із частково зруйнованими або денатурованими білками і тим самим запобігають їх незворотним конформаційним змінам й агрегації [16]. Загалом у проростках ріпаку сорту Триангел зміни білків, зокрема тих, які можна віднести до родин БТШ70, БТШ60 та низькомолекулярних, були виразнішими.

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено неспецифічні та специфічні якісні й кількісні зміни білків у проростках двох сортів ріпаку після дії температурних стресів. У надземній частині 7-добових проростків жаро- й посухостійкого сорту Триангел збільшувався вміст розчинного білка, з'являвся поліпептид з мол. м. 78 кД, змінювався склад білків, які можна віднести до родини БТШ60, та низькомолекулярних поліпептидів. У надземній частині 7-добових проростків холодостійкого сорту Мілена після холодного стресу підвищувався вміст розчинного білка, змінювався склад низькомолекулярних поліпептидів. Поліпепти-

ди, синтез яких значно інтенсифікується після дії температурних стресів, слугують біомаркерами стійкості.

1. Зубо Я.О., Лысенко Е.А., Алейникова А.Ю. и др. Изменение транскрипционной активности генов пластома ячменя в условиях теплового шока // Физиология растений. — 2008. — 55, № 3. — С. 323—331.
2. Baniwal S.K., Bharti K., Chanky F. et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors // J. Biosci. — 2004. — 29. — P. 471—487.
3. 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 (2). — P. 248—254.
4. Cheng G., Basha E., Wysocki V.N., Vierling E. Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry // J. Biol. Chem. — 2008. — 283, N 39. — P. 26634—26642.
5. Cho E.K., Hong C.B. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants // Plant Cell Rep. — 2006. — 25. — P. 349—358.
6. Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2004. — 101. — P. 15243—15248.
7. Fowler S., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // Plant Cell. — 2002. — 14. — P. 1675—1690.
8. Gray G.R., Heath D. A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolome fingerprinting // Physiol. plant. — 2005. — 124. — P. 236—248.
9. Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1990. — 41. — P. 187—223.
10. Hashimoto M., Komatsu S. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress // Proteomics. — 2007. — 7. — P. 1293—1302.
11. Ireland H.E., Harding S.J., Bonwick G.A. et al. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor* // Biomarkers. — 2004. — 9. — P. 139—155.
12. Kotak S., Larkindale J., Lee U. et al. Complexity of the heat stress response in plants // Curr. Opin. Plant Biol. — 2007. — 10. — P. 310—316.
13. Kusnetsov V.V., Mikulovich T.P., Kukina I.M. et al. Changes in the level of chloroplast transcripts in pumpkin cotyledons during heatshock // FEBS Lett. — 1993. — 321. — P. 189—193.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227 (5259). — P. 680—685.
15. Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family // Plant Physiol. — 2001. — 126. — P. 789—800.
16. Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants // Biochim. Biophys. Acta. — 2002. — 1577. — P. 1—9.
17. Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways // BMC Genomics. — 2007. — 8. — P. 125—131.
18. Timperio A.M., Egidì M.G., Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP) // J. Proteom. — 2008. — 71. — P. 391—411.
19. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — 432. — P. 579—620.
20. 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. — 9, N 5. — P. 244—252.
21. Waters E.R., Lee G.J., Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants // J. Exp. Bot. — 1996. — 47, N 296. — P. 325—338.

Отримано 08.04.2010

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССОВ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ
И КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ РАПСА *BRASSICA NAPUS* VAR.
OLEIFERA

И.В. Косаковская,¹ Д.А. Блюма,¹ А.Ю. Устинова,¹ К. Демиревская²

¹Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев

²Институт физиологии растений им. М. Попова Болгарской академии наук, София

Исследованы количественные и качественные изменения, происходящие с растворимыми белками проростков двух контрастных по устойчивости сортов рапса *Brassica napus* var. *oleifera* после действия кратковременных температурных стрессов. Выявлены неспецифические и специфические признаки в адаптационных перестройках. Тепловой стресс вызывал более выраженные по сравнению с холодным изменения в белковых спектрах обоих сортов рапса. У сорта Триангел после действия холодного стресса уменьшалось содержание растворимого белка, после теплового — образовывался полипептид с мол. м. 78 кД, изменялись количества полипептидов с 62, 58, 56, 40, 34 кД и низкомолекулярных. У сорта Милена после действия холодного стресса содержание растворимого белка увеличивалось, после теплового — наблюдались изменения в содержании полипептидов с мол. м. 78, 69 и 63 кД. Белки, синтез которых значительно интенсифицируется после действия температурных стрессов, можно рассматривать как биомаркеры устойчивости.

INFLUENCE OF STRESS TEMPERATURES ON PROTEINS OF *BRASSICA NAPUS* VAR.
OLEIFERA VARIETIES

I.V. Kosakivska,¹ D.A. Bluma,¹ A.Yu. Ustinova,¹ K. Demirevska²

¹M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

2 Tereschenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine

²M. Popov Institute of Plant Physiology, Bulgarian Academy of Sciences

21 Akad. G. Bonchev St., Sofia, 1113, Bulgaria

The character of qualitative and quantitative changes in soluble proteins of two *Brassica napus* var. *oleifera* varieties seedlings under moderate heat (2 h. +40 °C) and cold (2 h. +2 °C) stresses was analyzed. Specific and non-specific features in adaptation to stress conditions were revealed. Both varieties were characterized by presence of 50 kD polypeptide in control and stress conditions. Changes in polypeptide composition were more intensive after short-term heat stress. Decrease of protein content in cv. Triangel seedlings after cold stress, appearance of a 78 kD polypeptide, an elevated expression of 62, 58, 56, 40, 34 kD and small molecular weight proteins after heat stress were observed. The protein content in cv. Milena seedlings was increased after cold stress and expression of 78, 69 and 63 kD polypeptides raised after heat stress. Perspectives of proteins usage as biomarkers during adaptation to temperature stresses are discussed.

Key words: *Brassica napus* var. *oleifera*, temperature stresses, proteins, biomarker, stress-tolerance.