

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА НА НАКОПЛЕНИЕ sHSP У ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Н. Е. Коротаева, Г. Б. Боровский

ФГБОУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.

Аннотация. Низкомолекулярные белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) в условиях стресса отвечают за предотвращение повреждений и восстановление поврежденных в результате действия стрессора белков. Влияние водного дефицита (ВД) на накопление sHsp кукурузы на сегодняшний день исследовано недостаточно, хотя эта культура в полевых условиях часто испытывает недостаток влаги. Целью работы было охарактеризовать sHsp проростков кукурузы, накапливающиеся при действии ВД разной интенсивности. Для создания ВД 3-суточные проростки кукурузы оставляли без полива на 24, 48 или 72 ч., либо погружали на 2 ч. в растворы 20%, 40% или 50 % полиэтиленгликоля (ПЭГ). Судя по содержанию общей воды в проростках, воздействие ПЭГ вызывало более мягкий ВД по сравнению с отсутствием полива на протяжении от 2 до 3 сут и соответствовало зоне закалывания. Дыхательные параметры митохондрий, изолированных из оставленных без полива проростков зависели от продолжительности засухи, особенно снижались дыхательный контроль, скорость фосфорилирующего (V3) и нефосфорилирующего дыхания (V4). 3-суточное отсутствие полива, судя по выживаемости и параметрам дыхания, соответствовало зоне повреждения. Степень накопления в проростках sHsp Mr 28, 22 и 19 кД в ответ на ВД зависела от силы воздействия. Интенсивное накопление sHsp 19 кД происходило в ответ на наиболее продолжительный ВД (72 ч. отсутствия полива). Характер накопления sHsp говорит в пользу большего значения sHsp 28 и 22 кД для защиты от последствий мягкого обезвоживания, тогда как sHsp 19 кД может оказывать защитное действие в условиях более жесткого ВД.

Ключевые слова: кукуруза, белки теплового шока, водный дефицит, дыхание, устойчивость

Водный дефицит (ВД) является одним из распространенных стрессоров. ВД приводит к изменению осмотического давления внутри клеток [1], подавлению продукционных процессов и развитию окислительного стресса [2, 3]. К сожалению, в литературе не удалось найти сведений о том, какая величина оводненности тканей может соответствовать слабому или умеренному стрессовому воздействию у проростков злаков. Сопоставление величины ВД с функциональными параметрами проростков позволило бы оценить пределы ВД, при которых воздействие становится закалывающим, повреждающим или приводит к гибели.

Одним из важных компонентов ответа на ВД и механизмом клеточной защиты является синтез стрессовых белков, или белков теплового шока (Heat Shock Proteins, Hsp), назначение которых –

предохранение других полипептидов от повреждений и их восстановление [4, 5]. Низкомолекулярные Hsp (small Hsp, sHsp) являются группой стрессовых белков с молекулярной массой ниже 40 кД, которые накапливаются во всех клеточных органеллах растений при разнообразных неблагоприятных воздействиях, в том числе, под действием осмотического стресса [4, 6]. Трансгенные растения, экспрессирующие повышенное количество sHsp, проявляют повышенную устойчивость к засухе и солевому стрессу [6].

К настоящему дню накопленная информация о действии засухи на содержание sHsp кукурузы касается в первую очередь системы сигналинга. При совместном действии высокой температуры и ВД в регуляции экспрессии генов sHsp участвует абсцизовая кислота (АК) [7, 8]. Однако, в регуляции содержания ряда sHsp АК не участвует [9]. Фосфорилирование sHsp, которое маркирует белки и определяет направление их функциони-

рования, отмечается только при совместном действии засухи и повышенной температуры [10], то же самое отмечается для экспрессии генов sHSP17.2 кД, sHSP17.4 кД и sHSP26 кД кукурузы [7, 8]. Однако, при двухдневном инкубировании 20-суточных проростков кукурузы с 20%-й ПЭГ без нагревания содержание 17.4 кД и 16.9 кДа возросло в 5 раз [1]. Таким образом, информация о действии ВД на содержание sHsp кукурузы достаточно противоречива. Целью данной работы было определить влияние ВД различной интенсивности на содержание sHsp в проростках кукурузы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали 3-суточные этиолированные проростки кукурузы (*Zea mays* L., сорт Российская 1), выращенные в темноте при 27°C. Для создания ВД проростки оставляли в темноте без полива на 24, 48 или 72 ч. В качестве контроля использовали проростки, росшие 6 суток в условиях нормального увлажнения. Различий в измеряемых показателях между контрольными проростками возраста 4-6 суток в предварительных экспериментах обнаружено не было. Для определения выживаемости по 50 проростков, подвергнутых ВД, переносили на трое суток на свет в условия нормального увлажнения; остальные срезали и использовали для определения оводненности тканей, выделения митохондрий или суммарного клеточного белка. Выживаемость оценивали, как число проростков, возобновивших рост после окончания действия стресса, в процентах от первоначального количества проростков. Для создания ВД с использованием осмотика срезанные проростки на 3 часа погружали в растворы 20, 40 или 50%-го полиэтиленгликоля ПЭГ 6000 (Ferak, Германия) при 27°C в условиях вакуума, после чего по 5-6 проростков использовали для определения оводненности или выделения суммарного белка. Для определения содержания общей воды (СОВ) после каждого вида обработки 50-60 проростков высушивали до постоянного веса при 80°C. СОВ вычисляли в процентах, как вес воды, испарившейся после высушивания относительно сырого веса побегов. Суммарный клеточный белок выделяли стандартным способом (без использования поливинилипирролидона) [11]. Содержание белка определяли по методу Лоури. Накопление sHsp детектировали после электрофоретического фракционирования и Western Blot в системе Mini-Protean III ("BioRad", США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. На

гель наносили по 10 мкг белка. Количество наносимого белка нормализовали по окрашиванию геля Кумасси. Для детекции sHsp использовали поликлональные антитела, выработанные против консервативного α -кристаллинового домена sHsp растений и любезно предоставленные д-ром Craig A. Downs (США, Университет Чарльстона) [12, 13]. Аминокислотная последовательность этого участка sHsp содержит домен II и часть сегмента между доменами I и II с карбоксильного конца sHsp (т.е. α -кристаллиновый участок) [14, 15]. Для выяснения действия ВД на окислительное фосфорилирование митохондрии выделяли из проростков, оставленных без полива на 24, 48 или 72 часа, и из контрольных проростков методом дифференциального центрифугирования [16]. Энергетическую активность митохондрий определяли сразу после их выделения по поглощению кислорода полярографически [16]. На основе полярограмм рассчитывали скорость фосфорилирующего дыхания (V3), скорость нефосфорилирующего дыхания (V4), дыхательный контроль по Чансу-Вильямсу (ДК) и отношение АДФ:О [17]. Все эксперименты проводили не менее чем в 3-х биологических повторностях. С использованием программы Excel были рассчитаны средние арифметические, среднее квадратическое отклонение и доверительный интервал.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные по выживаемости проростков позволяют сделать вывод о глубине воздействия. После суточного и 2-х суточного подсушивания практически все проростки были способны к восстановлению роста, а на 3-и сутки после начала засухи стрессовое воздействие оказалось гораздо сильнее (табл. 1), поскольку после него возобновление роста у проростков так и не наступило даже через пять суток от начала полива, что говорит о полученных ими глубоких повреждениях. Ведущие к гибели необратимые повреждения, разрушение клеточных структур, серьезные нарушения метаболизма начинаются в зоне повреждения, более слабые воздействия вызывают изменения, приводящие к адаптации [18]. Проинкубированные в растворах ПЭГ побеги испытывали более слабый ВД (рис. 1). Это может объясняться как меньшей продолжительностью, так и меньшей силой воздействия. Судя по СОВ, воздействие с помощью ПЭГ не оказывало повреждающего действия. Возможно, причиной является более короткое время воздействия ПЭГ. Таким образом, ВД, который ис-

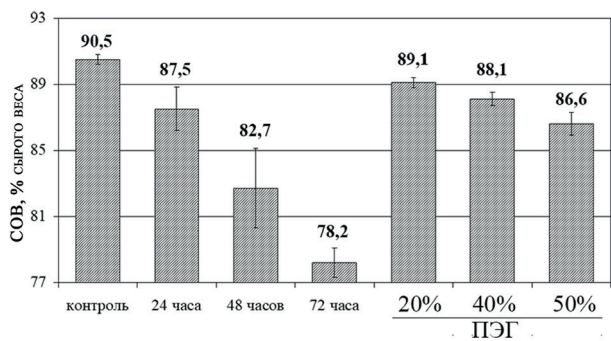


Рис. 1. Изменение содержания общей воды (COB) в проростках после подсушивания и действия различных концентраций ПЭГ. Цифрами над барами обозначены значения COB проростков. $M \pm m$, $n=50-60$

Таблица 1
Выживаемость проростков после подсушивания различной продолжительности ($M \pm m$, $n=50$)

Варианты опыта	Выживаемость, % от общего количества побегов
Контроль	100
1-е сутки	98.7 ± 1.3
2-е сутки	96 ± 2.3
3-и сутки	61.3 ± 20.9

пытывали проростки в случае отсутствия полива на протяжении 24 и 48 часов, а также во всех вариантах инкубирования с растворами ПЭГ, можно считать слабым или умеренным, не выходящим за пределы зоны адаптации; ВД, наступивший через трое суток отсутствия полива, можно считать сильным, соответствующим зоне повреждения.

ВД вызывает повреждения митохондрий и изменения окислительного фосфорилирования [19, 20]. Действительно, одновременно со снижением COB проростков происходило постепенное уменьшение скорости потребления кислорода изолированными митохондриями, как V3, так и V4 (табл. 2). Даже незначительное обезвоживание сказывалось на интенсивности дыхания. Такое снижение можно объяснить тем, что недостаток

воды в клетке затрудняет работу дыхательных ферментов, приводит к снижению скорости их функционирования. Эти затруднения, в свою очередь, объясняются повышением вязкости жидкой среды в цитоплазме и в матриксе митохондрий, что влияет на белок-белковые взаимодействия и активность ферментов дыхания [21], понижает проницаемость внутренней мембраны для протонов [22], а также вызывает окислительные повреждения ферментов дыхания [19]. Наблюдаемое через трое суток воздействия подавление дыхания может говорить о значительных повреждениях, полученных митохондриями. В пользу этого свидетельствует низкая выживаемость проростков через 72 часа стресса.

Снижение дыхательной активности изолированных митохондрий наблюдалось при добавлении субстратов как I, так и II комплексов дыхательной цепи, однако, динамика этих изменений отличалась (табл. 2). Так поглощение кислорода митохондриями при фосфорилирующем дыхании с использованием малата (I комплекс, V3) резко уменьшалось уже через сутки и сильно сокращалось на 2-е и 3-и сутки стресса. Фосфорилирующее дыхание с использованием сукцината (II комплекс, V3) проявило большую устойчивость к ВД. Сходным образом изменялся уровень поглощения кислорода и при нефосфорилирующем дыхании (V4). То, что сукцинат-зависимое дыхание (II комплекс) проявляет большую устойчивость к неблагоприятному воздействию по сравнению с дыханием с использованием малата (I комплекс), согласуется с данными других авторов о большей устойчивости к стрессовым воздействиям сукцинат-зависимого дыхания, чем малат-зависимого [13, 23, 24].

Значения ДК и АДФ:О изменялись не столь существенно (табл. 2), что говорит о сохранении высокого уровня сопряженности процессов окисления и фосфорилирования даже при значительной потере влаги после 72 ч ВД. Похожие результаты

Таблица 2.

Влияние подсушивания различной продолжительности на дыхательные параметры изолированных митохондрий ($M \pm m$, $n=3$)

	Поглощение кислорода, $\text{нмоль} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		ДК	АДФ:О
	Состояние 3	Состояние 4		
субстрат дыхания – малат в присутствии глутамата				
Увлажнение	37.7 ± 5.5	13.1 ± 2.1	2.9 ± 0.3	3 ± 0.08
Водный дефицит, 24 ч	23.9 ± 3.2	9.3 ± 1.8	2.7 ± 0.2	3 ± 0.1
Водный дефицит, 48 ч	16.8 ± 2.5	8.04 ± 1.8	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.2
Водный дефицит, 72 ч	11.2 ± 2.5	5.3 ± 0.6	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.4
субстрат дыхания - сукцинат в присутствии глутамата и ротенона				
Увлажнение	47.04 ± 3.9	29.2 ± 6.8	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.3
Водный дефицит, 24 ч	42.3 ± 3.2	27.6 ± 0.5	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1
Водный дефицит, 72 ч	14.5 ± 6.2	11.5 ± 2.6	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.3

были получены на проростках кукурузы [25] и гороха [26]. Хотя сопряженность процессов окисления и фосфорилирования оставалась достаточно высокой, она все-таки снижалась на 3-и сутки ВД. В качестве одной из причин такого снижения, как правило, указывается развитие окислительного стресса [27], хотя есть и противоречащие этому данные [26]. Снижение сопряженности процессов дыхания в наших экспериментах косвенно указывает на рост развития окислительного стресса по мере развития обезвоживания, поскольку одно из назначений разобщения – устранение перевосстановленности ферментов дыхательной цепи, которая приводит к образованию АФК [28].

Как известно, пониженное количество воды в клетках сказывается на состоянии липидов [19], составе и состоянии мембран [29] и белковых молекул [21], сопровождается интенсивным энергозависимым накоплением осмолитов, защитных и стрессовых белков [30, 31]. Данные иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что по мере усиления ВД, в проростках кукурузы накапливаются sHsp Mr 28, 22 и 19 кД (рис. 2). Молекулярные массы обнаруженных нами белков близки к Mr sHsp, выявленных другими авторами [1, 7, 8]. Небольшие различия, скорее всего, объясняются неточностью способа определения Mr белка по пробегу. Инкубирование проростков с растворами ПЭГ приводило к меньшему накоплению sHsp по сравнению с подсушиванием. Такие различия в накоплении могут быть связаны с различной интенсивностью стрессового сигнала и соответствуют данным о СОВ (рис. 1).

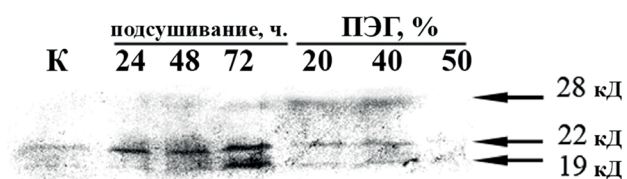


Рис. 2. Влияние ВД на содержание sHsp в проростках кукурузы. Представлено изображение типичной мембраны. Справа обозначены Mr sHsp

Различия в накоплении могут говорить о важности присутствия sHsp в клетке для защиты от ВД или адаптации к нему и согласуются с данными о том, что накопление sHsp является одним из необходимых ответов растительных клеток в период обезвоживания. Следует отметить большую интенсивность полосы белка 22 кД, по сравнению с двумя другими белками, в период первых и вторых суток засухи. Накопление sHsp с Mr 22 кД является более ранним явлением, чем накопление других sHsp (с Mr 19 и 28 кД). Судя по сходству молеку-

лярной массы, обнаруженный белок, скорее всего, может быть локализован в митохондриях, хлоропластах или в ЭПР [14, 15, 32]. sHsp 22 кД был обнаружен в митохондриях гороха в условиях ВД [33] и ТШ [34, 35], в митохондриях кукурузы [32], томата [36], маи [37], яблони [13], пшеницы [38; 39], арабидопсиса [40] и сои [41] в ответ на тепловое воздействие. Раннее накопление стрессового белка sHsp 22 кД говорит о его важной роли в условиях ВД. Было показано, что sHsp оказывают протекторное действие на связанное с I комплексом дыхание, при этом на интенсивность дыхания с использованием субстратов II комплекса они никак не влияют [13]. Можно предположить, что стрессовый белок с Mr 22 кД в условиях ВД присутствует в митохондриях для защиты митохондриальных белков от обезвоживания, также как это происходило в условиях теплового стресса, а также играет важную сигнальную роль для экспрессии стрессовых белков в условиях ВД [33]. Этим может быть обусловлена необходимость в его ранней экспрессии. Количество sHSP 19 кД увеличивается в проростках после 72 ч подсушивания, которое соответствует зоне повреждения. Т.о., этот белок способствует преодолению нарушений, происходящих при повреждающем действии ВД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Судя по нашим данным, накопление стрессовых белков в тканях кукурузных проростков начинается под действием слабого, закалывающего ВД и резко усиливается, когда он приобретает силу повреждающего воздействия. При этом состав накапливающихся sHsp изменяется в зависимости от интенсивности воздействия. Возможно, функции sHsp 19 кД в большей степени ассоциированы с повреждающим действием ВД по сравнению с sHsp 28 и 22 кД. Таким образом, степень воздействия, которая характеризуется мерой снижения оводненности клеток, интенсивности и сопряженности дыхания, и соответствует зоне повреждения, либо зоне закалывания, приводит к качественным различиям в накоплении sHsp в проростках кукурузы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shao R., Xin L., Mao J., Li L., Kang G., Yang Q. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. pp. 21606-21625.
2. Zhao Y., Wang Y., Yang H., Wang W., Wu J., Hu X. // *Front. in Plant Sci.* 2016. Vol. 7. pp. 1827.
3. Zhao F., Zhang D., Zhao Y., Wang W., Yang H., Tai F., Li C., Hu X. // *Front. in Plant Sci.* 2016.

- Vol. 7. pp. 1471.
4. Eisenhardt B.D. // *Biomol. Concepts*. 2013. Vol. 4. pp. 583-595.
 5. Basha E., Lee G.L., Breci L.A., Hausrath A.C., Buan N.R., Giese K.C., Vierling E. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. pp. 7566-7575.
 6. Hossain Z., Nouri M.Z., Komatsu S. // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11. pp. 37-48.
 7. Hu X.L., Li Y.H., Li C.H., Yang H.R., Wang W., Lu M.H. // *J. Plant Growth Regul.* 2010. Vol. 29. pp. 455-464.
 8. Liu T., Zhan L., Yuan Z., Hu X., Lu M., Wang W., Wang Y. // *Acta Physiol. Plant.* 2013. Vol. 35. pp. 501-513.
 9. Wu X., Gong F., Yang L., Hu X., Tai F., Wang W. // *Front. in Plant Sci.* 2015. Vol. 5. pp. 801.
 10. Hu X., Wu L., Zhao F., Zhang D., Li N., Zhu G., Li C., Wang W. // *Front. in Plant Sci.* 2015. Vol. 6. pp. 298.
 11. Korotaeva N.E., Belkov V.I., Tarasenko V.I., Voinikov V.K., Borovskii G.B. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. Vol. 65. pp. 688-696.
 12. Heckathorn S.A., Downs C.A., Sharkey T.D., Coleman J.S. // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 116. pp. 439-444.
 13. Downs C.A., Heckathorn S.A., Bryan J.K., Coleman J.S. // *Am. J. Bot.* 1998. Vol. 85. pp. 175-183.
 14. Waters E.R. // *Genetics*. 1995. Vol. 141. pp. 785-795.
 15. Waters E.R., Lee G.J., Vierling E. // *J. Exp. Bot.* 1996. Vol. 47. pp. 325-338.
 16. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. Москва, ООО "НПК "ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ", 2004, 98 с.
 17. Estabrook R.W. // *Meth. Enzymol.* 1967. Vol. 10. pp. 41-47.
 18. Коровин А.И. Растения и экстремальные температуры. Ленинград, Гидрометеиздат, 1984, 272 с.
 19. Taylor N.L., Day D.A., Millar A.H. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. pp. 42663-42668.
 20. Atkin O.K., Macherel D. // *Ann. Bot.* 2009. Vol. 103. pp. 581-597.
 21. Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. // *Trends Plant Sci.* 2001. Vol. 6. pp. 431-438.
 22. Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Шугаева Н.А., Выскребенцева Э.И. // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 3. С. 374-380.
 23. Generozova I.P., Butsanets P.A., Shugaev A.G. // *Biologia plantarum*. 2019. Vol. 63. p. 11-19.
 24. Hamilton E.W. 3rd, Heckathorn S.A. // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 126. pp. 1266-1274.
 25. Bell D.T., Koeppel D.E., Miller R.J. // *Plant Physiol.* 1971. Vol. 48. pp. 413-415.
 26. Генерозова И.П., Маевская С.Н., Шугаев А.Г. // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. № 1. С. 45-52.
 27. Shumilina J.S., Kuznetsova A.V., Frolov A.A., Grishina T.V. // *J. Plant Physiol. Biochem.* 2018. Vol. 14. pp. 5-15.
 28. Ribas-Carbo M., Taylor N.L., Giles L., Busquets S., Finnegan P.M., Day D.A., Lambers H., Medrano H., Berry J.A., Flexas J. // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. pp. 466 - 473.
 29. Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L., Gašparíková O. // *Plant Soil and Environ.* 2006. Vol. 52. pp. 186-191.
 30. Ramanjulu S., Bartels D. // *Plant, Cell Environ.* 2002. Vol. 25. pp. 141-151.
 31. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. // *Physiol. Plant.* 2006. Vol. 126. pp. 62-71.
 32. Lund A.A., Rhoads D.M., Lund A.L., Cerny R.L., Ehron T.E. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. pp. 29924-29929.
 33. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. // *Mol. Cellular Proteom.* 2005. Vol. 4. pp. 1122-1133.
 34. Lenne C., Douce R. // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 105. pp. 1255-1261.
 35. Lenne C., Block M.A., Garin J., Douce R. // *Biochem. J.* 1995. Vol. 311. pp. 805-813.
 36. Lui J., Shono M. // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40. pp. 1297-1304.
 37. Debel K., Knack G., Klopstech K. // *Plant J.* 1994. Vol. 6. pp. 79-85.
 38. Basha E.M., Waters E.R., Vierling E. // *Plant Sci.* 1999. Vol. 141. pp. 93-103.
 39. Joshi C.P., Klueva N.Y., Morrow K.J., Nguyen H.T. // *TAG.* 1997. Vol. 95. pp. 834-841.
 40. Visioli G., Maestri E., Marmiroli N. // *Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 34. pp. 517-527.
 41. LaFayette P.R., Nagao R.T., O'Grady K., Vierling E., Key J.L. // *Plant Mol. Biol.* 1996. Vol. 30. pp. 159-169.

ФГБУН СИФИБР СО РАН

Коротаева Н. Е., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
E-mail: knev73@yandex.ru*

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS

Korotaeva N. E., PhD., Senior Research Scientist
E-mail: knev73@yandex.ru

Боровский Г. Б., доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе

E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Borovskii G. B., PhD., DSci, Full Professor, Deputy Director for Research

E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

THE IMPACT OF THE WATER DEFICIENCY ON SHSP ACCUMULATION IN MAIZE SEEDLINGS

N. E. Korotaeva, G. B. Borovskii

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS

Abstract. Low-molecular weight heat shock proteins (small Hsp, sHsp) at stress conditions are responsible for preventing from damage and for restoring of the damaged proteins. The effect of water deficiency (WD) on the accumulation of maize sHsp has not been studied enough to date, although corn often suffers the moisture deficiency in the environment. The aim of the work was to characterize sHsp of corn, which accumulate in response of the varying degrees of WD. To create a WD, 3-day-old maize seedlings were left without watering for 24, 48 or 72 hours, or immersed for 2 hours in solutions of 20%, 40% or 50% polyethylene glycol (PEG). Judging by the water content in the seedlings, PEG exposure caused a milder moisture deficit in comparing of 2 and 3 days of drought and corresponded to the hardening zone. The parameters of respiration of mitochondria isolated from seedlings lefted without irrigation depended on the duration of the drought, herewith respiratory control, the rate of phosphorylating (V3) and non-phosphorylating respiration (V4) especially decreased. The 3-days without watering corresponded to the injury zone judging by the survival rate and respiration parameters. The degree of the accumulation of sHsp Mr 28, 22 and 19 kD depended on the severity of the influence. Intensive accumulation of sHsp 19 kD occurred in response to the most severe water deficit (72 hours of drought). The character of the accumulation of sHsp speaks in favor of a higher value of sHsp 28 and 22 kD to protect against the effects of mild dehydration, while sHsp 19 kD can have a protective effect in conditions of a more severe moisture deficit.

Keywords: maize, heat shock proteins, water deficiency, respiration, tolerance

REFERENCES

1. Shao R., Xin L., Mao J., Li L., Kang G., Yang Q., *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, pp. 21606-21625.
2. Zhao Y., Wang Y., Yang H., Wang W., Wu J., Hu X., *Front. in Plant Sci.*, 2016, Vol. 7, pp. 1827.
3. Zhao F., Zhang D., Zhao Y., Wang W., Yang H., Tai F., Li C., Hu X., *Front. in Plant Sci.*, 2016, Vol. 7, pp. 1471.
4. Eisenhardt B.D., *Biomol. Concepts.*, 2013, Vol. 4, No. 6, pp. 583-595.
5. Basha E., Lee G.L., Breci L.A., Hausrath A.C., Buan N.R., Giese K.C., Vierling E., *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 7566-7575.
6. Hossain Z., Nouri M.Z., Komatsu S., *J. Proteome Res.*, 2012, Vol. 11, No. 1, pp. 37-48.
7. Hu X.L., Li Y.H., Li C.H., Yang H.R., Wang W., Lu M.H., *J. Plant Growth Regul.*, 2010, Vol. 29, pp. 455-464.
8. Liu T., Zhan L., Yuan Z., Hu X., Lu M., Wang W., Wang Y., *Acta Physiol. Plant.*, 2013, Vol. 35, pp. 501-513.
9. Wu X., Gong F., Yang L., Hu X., Tai F., Wang W., *Front. in Plant Sci.*, 2015, Vol. 5, pp. 801.
10. Hu X., Wu L., Zhao F., Zhang D., Li N., Zhu G., Li C., Wang W., *Front. in Plant Sci.*, 2015, Vol. 6, pp. 298.
11. Korotaeva N.E., Belkov V.I., Tarasenko V.I., Voinikov V.K., Borovskii G.B., *Russ. J. Plant Physiol.*, 2018, Vol. 65, No. 5, pp. 688-696.
12. Heckathorn S.A., Downs C.A., Sharkey T.D., Coleman J.S., *Plant Physiol.*, 1998, Vol. 116, pp. 439-444.
13. Downs C.A., Heckathorn S.A., Bryan J.K., Coleman J.S., *Am. J. Bot.*, 1998, Vol. 85, pp. 175-183.

14. Waters E.R., Genetics, 1995, Vol. 141, pp. 785-795.
15. Waters E.R., Lee G.J., Vierling E., J. Exp. Bot., 1996, Vol. 47, pp. 325-338.
16. Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabel'nykh O.I. Metody izucheniya mitokhondrii rastenii. Polyarografiya i elektroforez. Moscow, OOO "NPK "PROMEKOBEZOPASNOST", 2004, 98 p.
17. Estabrook R.W., Meth. Enzymol., 1967, Vol. 10, pp. 41-47.
18. Korovin A.I. Rasteniya i ekstremal'nye temperatury. Leningrad, Gidrometeoizdat, 1984, 272 p.
19. Taylor N.L., Day D.A., Millar A.H., J. Biol. Chem., 2002, Vol. 277, No. 45, pp. 42663-42668.
20. Atkin O.K., Macherel D., Ann. Bot., 2009, Vol. 103, No. 4, pp. 581-597.
21. Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J., Trends Plant Sci., 2001, Vol. 6, pp. 431-438.
22. Shugaev A.G., Generozova I.P., Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Russ. J. of Plant Physiol., 2008, Vol. 55, No. 3, pp. 338-343.
23. Generozova I.P., Butsanets P.A., Shugaev A.G. Biologia plantarum. 2019. Vol. 63. p. 11-19.
24. Hamilton E.W. 3rd, Heckathorn S.A., Plant Physiol., 2001, Vol. 126, No. 3, pp. 1266-1274.
25. Bell D.T., Koeppe D.E., Miller R.J., Plant Physiol., 1971, Vol. 48, pp. 413-415.
26. Generozova I.P., Maevskaya S.N., Shugaev A.G., Russ. J. of Plant Physiol., 2009, Vol. 56, No. 1, pp. 38-44.
27. Shumilina J.S., Kuznetsova A.V., Frolov A.A., Grishina T.V., J. Plant Physiol. Biochem., 2018, Vol. 14, No. 4, pp. 5-15.
28. Ribas-Carbo M., Taylor N.L., Giles L., Busquets S., Finnegan P.M., Day D.A., Lambers H., Medrano H., Berry J.A., Flexas J., Plant Physiol., 2005, Vol. 139, pp. 466 - 473.
29. Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L., Gašparíková O., Plant Soil and Environ., 2006, Vol. 52, No. 4, pp. 186-191.
30. Ramanjulu S., Bartels D., Plant, Cell Environ., 2002, Vol. 25, pp. 141-151.
31. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Physiol. Plant., 2006, Vol. 126, pp. 62-71.
32. Lund A.A., Rhoads D.M., Lund A.L., Cerny R.L., Ehlon T.E., J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276, pp. 29924-29929.
33. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H., Mol. Cellular Proteom., 2005, Vol. 4, pp. 1122-1133.
34. Lenne C., Douce R., Plant Physiol., 1994, Vol. 105, pp. 1255-1261.
35. Lenne C., Block M.A., Garin J., Douce R., Biochem. J., 1995, Vol. 311, pp. 805-813.
36. Lui J., Shono M., Plant Cell Physiol., 1999, Vol. 40, pp. 1297-1304.
37. Debel K., Knack G., Kloppstech K., Plant J., 1994, Vol. 6, pp. 79-85.
38. Basha E.M., Waters E.R., Vierling E., Plant Sci., 1999, Vol. 141, pp. 93-103.
39. Joshi C.P., Klueva N.Y., Morrow K.J., Nguyen H.T., TAG, 1997, Vol. 95, pp. 834-841.
40. Visioli G., Maestri E., Marmioli N., Plant Mol. Biol., 1997, Vol. 34, pp. 517-527.
41. LaFayette P.R., Nagao R.T., O'Grady K., Vierling E., Key J.L., Plant Mol. Biol., 1996, Vol. 30, pp. 159-169.