

UDC 576.36 : 577.218 + 577.29

Еспресія низькомолекулярних білків теплового шоку у проростках *Pisum sativum* L. за умов зміненої гравітації

О. С. Талалаєв

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
Вул. Терещенківська, 2, Київ, Україна, 01601

atalalaev@yahoo.com

Рослини реагують на зміни гравітаційних умов порушеннями у профілях експресії генів, що є індикатором загального стресового стану. Одним із механізмів адаптації клітини до стресових умов є синтез низькомолекулярних білків теплового шоку (small heat shock proteins, sHsp), які виконують функції молекулярних шаперонів. Мета. З'ясування впливу модельованих мікрогравітації (кліностакування) та гіпергравітації (центрифугування) на генну експресію sHsp в етіологованих проростках гороху. Методи. Рівень експресії генів визначали із залученням методів зворотної транскрипції і ПЛР, а також кількісної ПЛР. Результати. Показано відсутність дії модельованих умов зміненої гравітації на експресію генів sHsp різної клітинної локалізації – цитозольно-ядерних Pshsp17.1-CII і Pshsp18.1-CI, пластидного – Pshsp26.2-P, ендоплазматичного ретикулуму – Pshsp22.7-ER та мітохондріального – Pshsp22.9-M. Висновки. Відносний рівень транскриптів генів sHsp за впливу кліностакування, центрифугування і підвищеної температури свідчить про різний характер дії цих чинників на клітини. Змінена гравітація на відміну від теплового стресу не спричиняє ушкодження/денатурації білків та, відповідно, не модулює експресії генів sHsp.

Ключові слова: низькомолекулярні білки теплового шоку, кліностакування, гіпергравітація, етіологовані проростки, Pisum sativum.

Вступ. Фундаментальною проблемою космічної біології є питання щодо можливості і механізмів адаптації живих систем до умов космічного польоту. Постійно діючим чинником космічного польоту є невагомість (мікрогравітація), тобто сила тяжіння Землі, що діє на космонавтів, компенсована відцентровою силою. Вона виникає внаслідок руху космічного апарату по круговій орбіті з першою космічною швидкістю. Підйом і спуск космічного апарату супроводжуються гіпергравітацією, величина якої за підйому пілотованих космічних апаратів не повинна перевищувати 8 g. Результати багаторічних космічних експериментів з рослинами свідчать про те, що в оптимальних умовах культивування при орбітальному космічному польоті генетична

інформація зберігається і реалізується в онтогенезі рослин.

Встановлено, що 1) вищі рослини за умов космічного польоту ростуть і розвиваються; 2) процеси морфогенезу, цитокінезу і диференціювання клітин проходять без суттєвих відхилень від норми; 3) значні зміни відбуваються у клітинному метаболізмі порівняно з наземним контролем, що відображається у перебудові ультраструктурної організації клітин і свідчить про чутливість окремої клітини до гравітації; 4) порушується внутрішньоклітинний баланс кальцію; 5) можлива адаптація базових клітинних процесів до мікрогравітації [1, 2].

Розвиток молекулярно-генетичних методів та накопичені результати вивчення молекулярних основ відповіді рослин на різні стимули за умов Землі обумовили новий напрямок досліджень. Іденти-

фікація генів, експресія яких модулюється за космічного польоту та часткового відтворення його ефектів у наземних лабораторіях, а також оцінка специфічності відповідей є новими перспективними об'єктами дослідження космічної біології. Так, останніми роками показано, що за реальної і змодельованої мікрогравітації змінюється експресія багатьох генів, які беруть участь у процесах адаптації рослин до стресових умов [3–10]. Центрифугування з різними прискореннями, у свою чергу, також активує експресію низки генів, пов'язаних зі стресовою відповіддю [7, 9–11].

Важливим елементом адаптації рослин до несприятливих впливів навколишнього середовища є система контролю якості клітинних білків. Компонентом цієї системи є і велика родина низькомолекулярних білків теплового шоку (small heat shock proteins, sHsp), що виконують у клітині функції молекулярних шаперонів, тобто здатні зв'язувати і стабілізувати частково пошкоджені клітинні білки, запобігаючи, таким чином, їхній незворотній агрегації [12, 13]. sHsp у рослинах представлені унікальним різноманіттям субродин, що функціонують у різних компартментах клітини. На сьогодні у покритонасінних рослин ідентифіковано 11 субродин: цитозольно-ядерні субродини CI, CII, CIII, CIV, CV і CVII, субродина пластидних sHsp (P), субродина sHsp ендоплазматичного ретикулуму (ER), субродина пероксисомних sHsp (Po) і дві субродини мітохондріальних sHsp (MI і MII) [14, 15]. Різноманітність рослинних sHsp відображає унікальність відповіді рослин на стрес і, напевно, є наслідком нерухомого способу життя рослин. Представники зазначених родин беруть участь у відповідях рослини на зовнішні стресові впливи (підвищена температура, холод, радіація, ультрафіолетове випромінювання, важкі метали тощо), конститутивно накопичуються на різних стадіях онтогенезу у різних органах і тканинах та мають складні схеми регулювання експресії. Тому дослідження експресії генів sHsp різної клітинної локалізації за умов симульованої мікро- і гіпергравітації дозволить деталізувати механізм клітинної адаптації до цих умов.

Мета даної роботи полягала у вивченні експресії генів sHsp різної клітинної локалізації – цитозольно-ядерних *Pshsp17.1-CII* і *Pshsp18.1-CI*, плас-

тидного – *Pshsp26.2-P*, ER – *Pshsp22.7-ER* і мітохондріального – *Pshsp22.9-M* на послідовних етапах росту етіюльованих проростків гороху у стаціонарному контролі за умов поступового підвищення температури та змодельованої зміненої гравітації. Горох як важливу сільськогосподарську культуру використовували в багатьох космічних експериментах, де він продемонстрував здатність проходити повний життєвий цикл за умов тривалих орбітальних польотів. Досліди саме на етіюльованих проростках дозволили виключити вплив світла як можливого індуктора експресії генів.

Матеріали і методи. Насіння гороху стерилізували протягом 15 хв у 5 %-му розчині гіпохлориту натрію та тричі промивали стерильною дистильованою водою, залишали у воді за кімнатної температури на 3 год для набухання. Насінини загортали в трубочки із зволоженого фільтрувального паперу і витримували протягом двох діб за температури 4 °C для рівномірної схожості. Ріст проростків за умов повільного кліностагування (2 об/хв) та в стаціонарному контролі проходив у темряві упродовж 5 діб (температура 24–26 °C, відносна вологість повітря 45–64 %). Кожні 24 год фільтрувальний папір зволожували, додаючи 0,5 мл води в кожену трубочку.

Всі експерименти виконували щонайменше у трьох біологічних ($n \geq 3$) та двох технічних ($n \geq 2$) повторностях. Для дослідження впливу теплового шоку і гіпергравітації використовували п'ятидобові проростки, які центрифугували з прискореннями 3, 7, 10 та 14 g протягом 1 год. Умови поступового підвищення температури моделювали за методикою, описаною в роботі [16]. РНК виділяли за допомогою Spectrum™ Plant Total RNA Kit («Sigma», Німеччина, номер за каталогом STRN50-1KT), згідно з протоколом виробника. Для виділення фракції сумарної РНК експериментальний матеріал фіксували і гомогенізували в рідкому азоті. Маса проби становила 100 мг сумарної тканини, отриманої розтиранням не менш ніж семи проростків. Чистоту і цілісність препарату РНК оцінювали при вимірюванні на спектрофотометрі (за розрахунками співвідношення показників оптичної абсорбції $A_{260/280}$ і $A_{260/230}$) та даними денатурувального гель-електрофорезу відповідно. кДНК одержували з 1 мкг обробленої DNase I («Fermentas», Литва, EN0525) то-

Праймери для ПЛР-РЧ

Назва та субродина sHsp	Інвентарний номер NCBI	Послідовності праймерів
<i>Pshsp 18.1-CI</i>	M33899.1	5'-ttcactccgcttcattccct-3'; 5'-ttctcaacgcttctctccgctt-3'
<i>Pshsp17.1-CII</i>	M33901.1	5'-ataatggacctaccgacgacaca-3'; 5'-ttctctctctctctctcgcacct-3'
<i>Pshsp 22.7-ER</i>	M33898.1	5'-gattctcccaacactcttattcgg-3'; 5'-ttctctcaccactcactcttagcac-3'
<i>Pshsp26.2-P</i>	X07187.1	5'-gtagaagaagaagcctcgagaag-3'; 5'-cacgaatctcactctccaatgt-3'
<i>Pshsp22.9-M</i>	X86222	5'-atgtttatctcactcttcc-3'; 5'-attgctcgtcagtaaatcca-3'
<i>Psactin3</i>	U81046.1	5'-tggtacacttccactctctgc-3'; 5'-ttcaggcatcggaaatcttcagc-3'

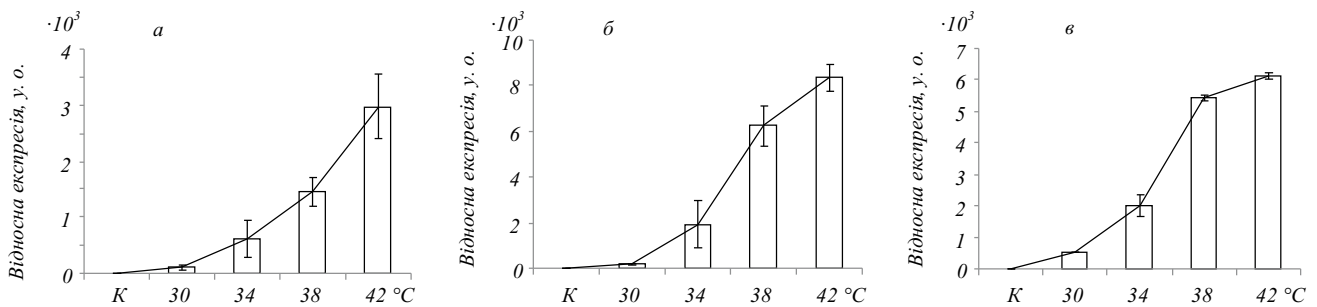


Рис. 1. Відносна експресія генів *sHsp* субродин клітинних органел за умов поступового підвищення температури, визначена методом ПЛР у реальному часі (умови експерименту див. у розділі Матеріали і методи): а – *Pshsp26.2-P*; б – *Pshsp22.7-ER*; в – *Pshsp22.9-M*

тальної фракції РНК у реакції зворотної транскрипції з використанням RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase («Fermentas», EP0451) та оліго-d(T)₁₈ праймера в концентрації 1 мМ.

ПЛР у реальному часі проводили на ПЛР-ампліфікаторах («BioRad», США) – IQ-Cycler і Chromo4 із застосуванням готової суміші для ПЛР у реальному часі Maxima™ Sybr Green Real Time PCR 2 × Master Mix («Fermentas», K0242) зі специфічними парами праймерів довжиною 20–24 нуклеотидів, сконструйованих на основі бази даних NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та спеціалізованого програмного забезпечення PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>). Для нормалізації використано експресію гена актину (*Psactin3*), відносний рівень якої залишався незмінним в усіх експериментах. Послідовності значених пар праймерів наведено в таблиці.

Результати кількісних ПЛР аналізували, оцінюючи відносну експресію за допомогою математичної моделі з корекцією ефективності ампліфікації, описаної в [17]. Рівень експресії розраховували відносно показників C_t п'ятидобових проростків. Статистичне порівняння результатів кількісних ПЛР здійснювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з рівнем статистичної значущості

5 % (p ≤ 0,05). Статистичну обробку та побудову графіків виконано у програмі Microsoft Excel 2007.

Результати і обговорення. Експресію низькомолекулярних білків теплового шоку у п'ятидобових етіолованих проростках гороху вивчали за декількох температурних режимів: 26, 30, 34, 38 і 42 °C. Результати дослідження рівня відносної експресії *sHsp* за допомогою ПЛР-РЧ представлено на рис. 1 і 2.

Аналіз впливу поступового підвищення температури підтверджує чутливість генів низькомолекулярних білків теплового шоку до коливань температури повітря навколишнього середовища. За одержаними результатами, експресія всіх генів різко зростає з підвищенням температури середовища до 30 °C та сягає максимуму за температури 42 °C.

Найвищі значення відносної експресії за t = 42 °C спостерігали для *Pshsp22.7* субродини ER, *Pshsp22.9* субродини мітохондрій і *Pshsp26.2* субродини пластидних *sHsp*, експресія яких підвищується в тисячі разів відносно контрольного рівня (рис. 1).

Транскрипція генів цитозольно-ядерних sHsp за максимальних температур характеризується нижчими показниками відносної експресії (рис. 2). Така різниця у показниках для представників субродин

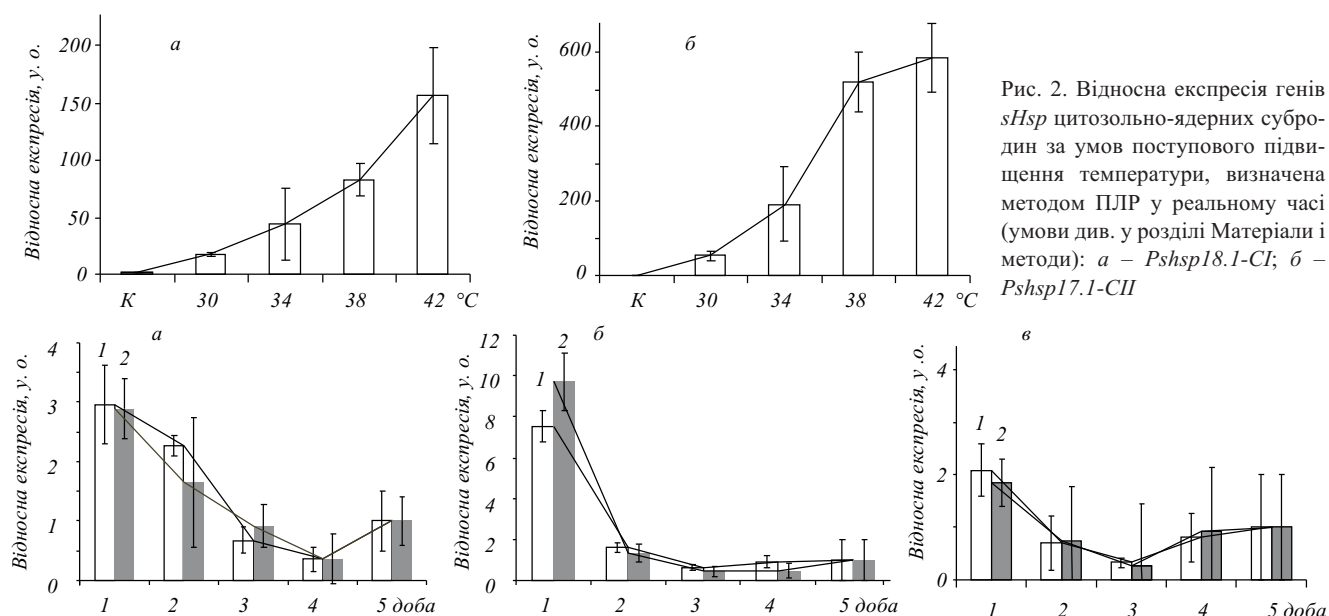


Рис. 2. Відносна експресія генів *sHsp* цитозольно-ядерних субродин за умов поступового підвищення температури, визначена методом ПЛР у реальному часі (умови див. у розділі Матеріали і методи): а – *Pshsp18.1-CI*; б – *Pshsp17.1-CII*

Рис. 3. Відносна експресія генів *sHsp* субродин клітинних органел за умов стаціонарного контролю (1) та при кліностауванні (2), визначена методом ПЛР у реальному часі (умови див. у розділі Матеріали і методи): а – *Pshsp26.2-P*; б – *Pshsp22.7-ER*; в – *Pshsp22.9-M*

цитозольно-ядерних і органельних *sHsp* передбачає більшу вихідну кількість мРНК *Pshsp18.1* і *Pshsp17.1* як генів з конститутивною експресією та свідчить про важливу роль цих білків у захисті компонентів клітинних органел саме за умов теплового шоку.

Конститутивне накопичення *sHsp* продемонстровано для багатьох видів рослин [14–16, 18]. Суттєвою загальною ознакою, яку відмічають в літературі, є те, що конститутивна експресія *sHsp* неоднорідна у представників різних субродин і навіть в межах однієї субродини різних видів рослин [13, 15].

Для гороху раніше показано конститутивне накопичення мРНК і синтезованих *sHsp* у сухому насінні та на ранніх стадіях росту проростків [13, 18]. Проте ці дослідження здебільшого стосувалися цитозольно-ядерних субродин *sHsp P. sativum* і не мали на меті кількісно оцінити динаміку експресії генів *sHsp* та вплив на неї зовнішніх факторів.

На рис. 3 і 4 представлено результати ПЛР-аналізу експресії генів низькомолекулярних білків теплового шоку в етіологованих проростках гороху за умов кліностаування. Наявність транскриптів досліджуваних генів *sHsp* фіксували впродовж усього експерименту, тобто в проростках віком від 1-ї до 5-ї доби. Найбільшу кількість мРНК і відповідно найвищий рівень відносної експресії для всіх генів спостерігали на першу добу росту проростків. На-

дали кількість мРНК зменшувалася, сягаючи найменших значень на 4–5-ту добу. Варто також зазначити, що найвищі показники відносної експресії мали *Pshsp17.1* (рис. 4, а) і *Pshsp18.1* (рис. 4, б), які презентують цитозольно-ядерні субродини, а також *Pshsp22.7* (рис. 3, б), що належить до спорідненої субродини ER. Інші органельні форми мали значно менші показники – ≈ 3 ум. од. (рис. 3).

Результати стаціонарного контролю підтвердили літературні дані щодо наявності транскриптів генів *sHsp* у перші дні росту проростків. Існує думка, що невелика кількість білків і транскриптів генів *sHsp* у проростках в перші дні після проростання насіння є залишком цих білків і транскриптів, накопичених у насінні на пізніх стадіях дозрівання [13, 16]. Проте отримані результати дозволяють припустити, що в певних органах чи тканинах проростків на ранніх етапах онтогенезу має місце модуляція експресії досліджуваних генів *de novo* за генетичною програмою розвитку.

Кліностаування, у свою чергу, не має статистично достовірного впливу на експресію генів *sHsp*. Відомо, що за кліностаування відбуваються ультраструктурні і фізіолого-біохімічні зміни. Однак можна припустити, що вони не торкаються регуляторних шляхів контролю експресії генів *sHsp* та не призводять до порушень у синтезі білків і появи денатуру-

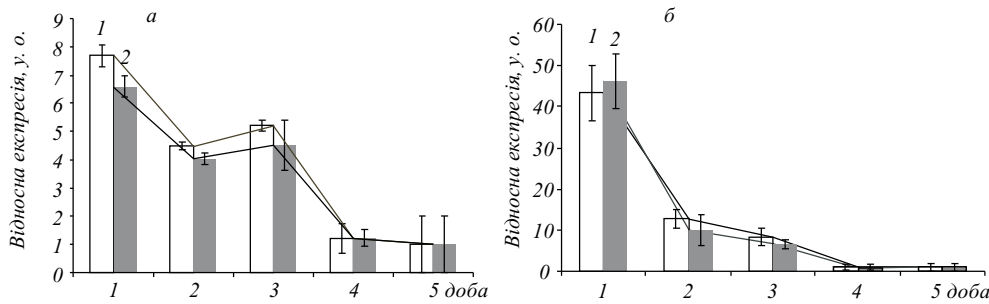


Рис. 4. Відносна експресія генів *sHsp* цитозольно-ядерних субродин за умов стаціонарного контролю (1) та при кліностауванні (2), визначена методом ПЛР у реальному часі (умови див. у розділі Матеріали і методи): а – *Pshsp18.1-CI*; б – *Pshsp17.1-CI*

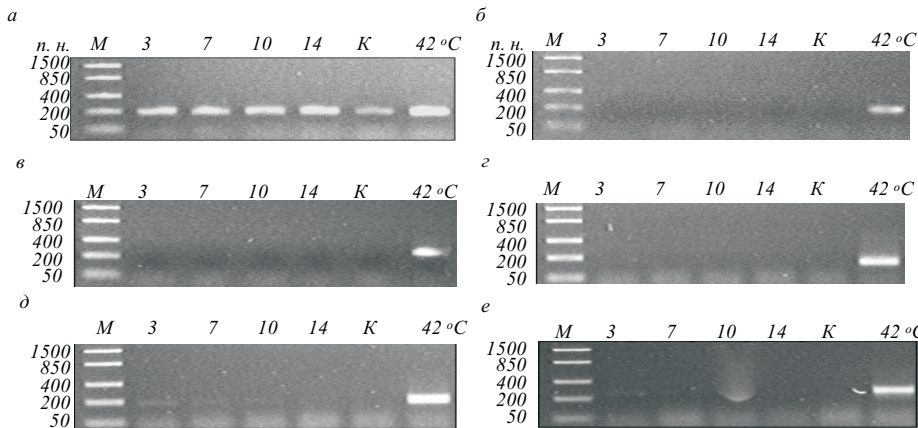


Рис. 5. Експресія генів низькомолекулярних білків теплового шоку за умов центрифугування: а – *Psactin3*; б – *Pshsp18.1-CI*; в – *Pshsp17.1-CI*; г – *Pshsp26.2-P*; д – *Pshsp22.7-ER*; е – *Pshsp22.9-M*. Продукти зворотної транскрипції і ПЛР після розділення у 2 %-му агарозному гелі. К – контрольні етіюльовані проростки; М – маркер молекулярної маси (FastRuler™ DNA ladder, «Fermentas», Литва)

ваних білків-субстратів, які також можуть виконувати регульовальну функцію відносно *sHsp*.

Враховуючи результати попередніх досліджень, які свідчать, що найнижчий рівень накопичення мРНК усіх досліджуваних генів *sHsp* спостерігається у п'ятидобових проростках, а також те, що акумулювання пептидів цитозольно-ядерних білків теплового шоку не відбувається, експерименти з вивчення впливу гіпергравітації виконували лише на п'ятидобових етіюльованих проростках. ПЛР з отриманою кДНК проводили у режимі 33 циклів, що, на нашу думку, дає підставу припустити наявність або відсутність регуляції відповідних мРНК після центрифугування, не використовуючи кількісної ПЛР.

На рис. 5 представлено типові електрофореграми розділення продуктів ЗТ-ПЛР актину і *sHsp* після центрифугування 5-добових етіюльованих проростків протягом 1 год. Показано, що центрифугування з прискореннями 3, 7, 10 і 14 g не впливає на експресію генів низькомолекулярних білків теплового шоку як цитозольно-ядерних *Pshsp18.1* і *Pshsp17.1* (рис. 5, б, в), так і цитоплазматичних органел гороху *Pshsp26.2*, *Pshsp22.7* і *Pshsp22.9* (рис. 5, г-е).

Висновки. Експресія генів низькомолекулярних білків теплового шоку активується у п'ятидо-

бових проростках гороху з підвищенням температури навколишнього середовища до 30 °C і досягає максимального рівня за температури 42 °C, що підтверджує чутливість зазначенх генів до температури та їхню особливу роль у клітині за цих умов.

Динаміка експресії генів *sHsp* у 1–5-добових етіюльованих проростках гороху за умов кліностаування подібна до такої в стаціонарному контролі.

Відсутність підвищення експресії генів *sHsp* у проростках гороху за дії кліностаування та центрифугування дозволяє зробити висновок стосовно того, що модельовані умови зміненої гравітації на відміну від теплового стресу не є модулюючим фактором відносно експресії генів низькомолекулярних білків теплового шоку.

A. S. Talalaiev

Expression of small heat shock proteins in *Pisum sativum* L. under gravity altered conditions

M. G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

Altered gravity induces significant changes in the gene expression profiles of the plant cell, which are indicative of stress conditions. One of the molecular mechanisms of cell adaptation is synthesis of small

heat shock proteins (sHsp). The sHsps are chaperones, and as such, they assist in the protein folding and prevent the irreversible protein aggregation. **Aim.** Determination the effect of simulated microgravity (clinorotation) and hypergravity (centrifugation) on the sHsp genes expression in the etiolated pea seedlings. **Methods.** The gene expression was examined with the reverse transcription and real-time PCR. **Results.** The qPCR results demonstrated that the altered gravity conditions do not change the expression of sHsp genes which belong to the subfamilies of different subcellular localization – cytosolic-nuclear Pshsp 17.1-CII and Pshsp18.1-CI, plastid – Pshsp26.2-P, endoplasmic reticulum – Pshsp22.7-ER and mitochondrial – Pshsp22.9-M. **Conclusions.** The relative qPCR results demonstrate that altered gravity and temperature elevation have different effects on the sHsp genes: unlike high temperature, altered gravity does not lead to the denaturation of cell proteins and, therefore, does not modulate the sHsp genes expression.

Keywords: small heat shock proteins, microgravity, hypergravity, etiolated seedlings, *Pisum sativum*.

A. С. Талалаев

Влияние условий измененной гравитации на экспрессию низкомолекулярных белков теплового шока *Pisum sativum* L.

Резюме

Растения реагируют на изменения гравитационных условий нарушениями в профилях экспрессии генов, что является индикатором состояния общего стресса. Одним из механизмов адаптации клетки к условиям стресса является синтез низкомолекулярных белков теплового шока (small heat shock proteins, sHsp), выполняющих функцию молекулярных шаперонов. **Цель.** Определение влияния моделированных микрогравитации (клиностагирования) и гипергравитации (центрифугирования) на экспрессию генов sHsp в этиолированных проростках гороха. **Методы.** Уровень экспрессии генов определяли, используя методы обратной транскрипции и ПЦР, количественную ПЦР. **Результаты.** Показано отсутствие влияния моделированных условий измененной гравитации на экспрессию генов sHsp разной клеточной локализации – цитозольно-ядерных Pshsp 17.1-CII и Pshsp18.1-CI, пластного – Pshsp26.2-P, эндоплазматического ретикулума – Pshsp22.7-ER и митохондриального – Pshsp22.9-M. **Выводы.** Относительный уровень транскриптов sHsp генов при действии клиностагирования, центрифугирования и повышенной температуры свидетельствует о разном характере влияния этих факторов на клетки, то есть условия измененной гравитации в отличие от теплового шока не приводят к повреждению/денатурации белков и, соответственно, не модулируют экспрессию генов sHsp.

Ключевые слова: низкомолекулярные белки теплового шока, микрогравитация, гипергравитация, этиолированные проростки, *Pisum sativum*.

REFERENCES

1. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.*–1997.–**171**.–P. 1–78.
2. Matia I., Gonzalez-Camacho F., Hernandez R., Kiss J. Z., Gasset G., van Loon J. J., Marco R., Medina F. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight // *J. Plant Physiol.*–2010.–**167**, N 3.–P. 184–193.

3. Paul A. L., Daugherty C. J., Bihn E. A., Chapman D. K., Norwood K. L., Ferl R. J. Transgene expression patterns indicate that spaceflight affects stress signal perception and transduction in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*–2001.–**126**, N 2.–P. 613–621.
4. Paul A. L., Popp M. P., Gurley W. B., Guy C., Norwood K. L., Ferl R. J. *Arabidopsis* gene expression patterns are altered during spaceflight // *Adv. Space Res.*–2005.–**36**, N 7.–P. 1175–1181.
5. Paul A.-L., Zupanska A. K., Ostrow D. T., Zhang Y., Sun Y., Li J.-L., Shanker S., Farmerie W. G., Amalfitano C. E., Ferl R. J. Spaceflight transcriptomes: unique responses to a novel environment // *Astrobiology.*–2012.–**12**, N 1.–P. 40–56.
6. Salmi M. L., Roux S. J. Gene expression changes induced by space flight in single-cells of the fern *Ceratopteris richardii* // *Planta.*–2008.–**229**, N 1.–P. 151–159.
7. Martzivanou M., Hampp R. Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome // *Physiol. Plant.*–2003.–**118**, N 2.–P. 221–231.
8. Babbick M., Dijkstra C. Larkin O. J., Anthony P., Davey M. R., Power J. B., Lowe K. C., Cogoli-Greuter M., Hampp R. Expression of transcription factors after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures to hypergravity and simulated (2-D/3-D clinorotation, magnetic levitation) // *Adv. Space Res.*–2007.–**39**, N 7.–P. 1182–1189.
9. Martzivanou M., Babbick M., Cogoli-Greuter M., Hampp R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures // *Protoplasma.*–2006.–**229**, N 2–4.–P. 155–162.
10. Kozeko L., Kordyum E. Effect of hypergravity on the level of Heat Shock Proteins 70 and 90 in Pea seedlings // *Microgravity Sci. Technol.*–2008.–**21**, N 1–2.–P. 175–178.
11. Barjaktarovic Z., Nordheim A., Lamkemeyer T., Fladerer C., Madlung J., Hampp R. Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of *Arabidopsis* cell cultures // *J. Exp. Bot.*–2007.–**58**, N 15–16.–P. 4357–4363.
12. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*–1991.–**42**.–P. 579–620.
13. 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 3.–P. 325–338.
14. Siddique M., Gernhard S., von Koskull-Doring P., Vierling E., Scharf K.-D. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties // *Cell Stress Chaperones.*–2008.–**13**, N 2.–P. 183–197.
15. Waters E. R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs // *J. Exp. Bot.*–2013.–**64**, N 2.–P. 391–403.
16. Wehmeyer N., Hernandez L. D., Finkelstein R. R., Vierling E. Synthesis of small heat-shock proteins is a part of the developmental program of a late seed maturation // *Plant Physiol.*–1996.–**112**, N 2.–P. 747–757.
17. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.*–2001.–**29**, N 9.–e45.
18. DeRocher A. E., Vierling E. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation // *Plant J.*–1994.–**5**, N 1.–P. 93–102.

Received 10.04.13