



Ю.Є. КОЛУПАЄВ, Ю.В. КАРПЕЦЬ

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
п/в Докучаєве, Харків, 62483, Україна
plant_biology@mail.ru

КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНИЙ ВПЛИВ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ НА ТЕПЛОСТІЙКІСТЬ КОЛЕОПТИЛІВ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, пероксид водню, кальцій, пероксидне окиснення ліпідів, теплостійкість

Останніми роками з'являються відомості, що засвідчують участь активних форм кисню (АФК) і продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в індукції стійкості рослин до стресових чинників різної природи. Досить детально з'ясована роль активного кисню в індукції захисних реакцій рослин у відповідь на дію біотичних стресів [2, 8]. Досліджується і значення АФК у розвитку стійкості до абіотичних стресових чинників [16]. Так, на прикладі проростків гірчиці показаний зв'язок між накопиченням H_2O_2 , індукованим обробкою саліциловою кислотою, і розвитком теплостійкості [9]. Встановлено, що H_2O_2 є посередником в індукції експресії генів у відповідь на дію ультрафіолетової радіації [16]. Підвищення абсцизовою кислотою стійкості проростків кукурудзи до окиснювального ушкодження також супроводжувалося зростанням рівнів супероксиду та H_2O_2 , яке передувало збільшенню активності ферментів антиоксидантного захисту [13].

Є відомості і про безпосередній вплив екзогенних АФК, зокрема, H_2O_2 , на резистентність рослин до високих [10] та низьких [17] температур.

Одним з ефектів дії пероксиду водню на рослинні тканини може бути активація ПОЛ, насамперед ненасичених жирних кислот плазматичної мембрани [1]. Зрос-

тання інтенсивності ПОЛ може спричинювати розвиток пошкоджень клітин. Водночас останніми роками з'являються відомості про сигнальні функції як АФК, так і продуктів ПОЛ, тобто у певних межах посилення утворення АФК і активація ПОЛ можуть бути фізіологічно доцільними процесами [4, 6].

Виявлена здатність пероксиду водню призводить до транзиторного збільшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} у рослин [18], що опосередковано свідчить про можливість активації пероксидом водню Ca^{2+} -залежних сигнальних систем.

Раніше ми показали можливість індукування стійкості відрізків колеоптилів пшениці (*Triticum aestivum* L.) до теплового і сольового стресів пероксидом водню [5]. У зв'язку з цим було цікаво з'ясувати, чи відбувалася за таких умов активація ПОЛ у тканинах колеоптилів і чи задіяні у цьому процесі Ca^{2+} -залежні сигнальні системи. Для з'ясування цього питання оцінювали вплив екзогенного пероксиду водню у поєднанні з модифікаторами кальцієвого статусу (LaCl_3 , хлорпромазин) на стійкість колеоптилів пшениці до ушкоджуючого нагрівання та інтенсивність ПОЛ.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом дослідження були відрізки колеоптилів озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48 у фазі росту розтягненням. Цю модель досить широко використовують для вивчення стійкості, котра визначається насамперед клітинними механізмами. Методику підготовки рослинного матеріалу ми описували раніше [4, 5]. Відрізки колеоптилів, одержані від 4-добових проростків, витримували протягом 14—16 год у 2%-му розчині сахарози; за 2,5 год до ушкоджуючого нагрівання в середовище інкубації колеоптилів відповідних варіантів вводили антагоністи кальцію — 1 мМ LaCl_3 або 20 мкМ хлорпромазин. Оптимальну концентрацію блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану [4] і антагоніста кальмодуліну хлорпромазину [3] та режим обробки колеоптилів визначили у попередніх дослідках. За 2 год до нагрівання у середовище відповідних варіантів додавали H_2O_2 до кінцевої концентрації 10 мМ [5].

Спеціальними аналізами встановлено, що використані модифікатори кальцієвого статусу не змінювали концентрацію H_2O_2 у середовищі інкубації колеоптилів, що свідчить про відсутність хімічної взаємодії між пероксидом водню та LaCl_3 чи хлорпромазином за умов наших експериментів.

По закінченні часу обробки колеоптилів ефекторами, а також через 1, 3, 24 год після нагрівання та (або) їх перенесення на 2%-й розчин сахарози у зразках визначали інтенсивність ПОЛ за вмістом тіобарбітурової кислоти активних продуктів (ТБКАП) [7]. У спеціальних експериментах також оцінювали вплив екзогенного H_2O_2 на ендогенний вміст пероксидів у колеоптилях пшениці, використовуючи феротіоціанатний метод [21]. Екстрагентом була 5%-на трихлороцтова кислота, за допомогою якої з тканин вилучаються H_2O_2 та, ймовірно, низькомолекулярні гідропероксиди [21].

Вживання колеоптилів оцінювали візуально через 48 год після нагрівання. Мертві колеоптилі втрачали тургор і набували специфічного відтінку. Водночас

визначали і виживання колеоптилів, які не прогрівали, але піддавали впливу всіх процедур експерименту. У цьому разі виживання відрізків в усіх варіантах становило не менше 95 %.

Повторність дослідів чотириразова. У таблиці і на рисунку наведені середні величини та їх стандартні відхилення.

Результати досліджень та їх обговорення

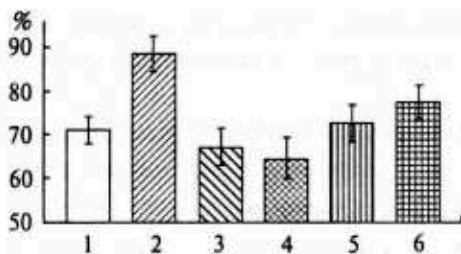
Двогодинна обробка відрізків колеоптилів *T. aestivum* 10 мМ H_2O_2 підвищувала в них вміст пероксидів (у перерахунку на H_2O_2) з 195 ± 11 до 635 ± 27 нмоль/г сухої речовини. Однак таке збільшення концентрації пероксидів було оборотним і через 24 год після перенесення відрізків на середовище без H_2O_2 вміст пероксидів знижувався до рівня контролю і становив 196 ± 14 нмоль/г сухої речовини. Таким чином, попри те, що обробка колеоптилів екзогенним пероксидом водню підвищувала ендогенний вміст пероксидів, він був майже на 5 порядків нижчим від концентрації H_2O_2 в інкубаційному середовищі, тобто перебував у межах фізіологічних концентрацій. Близькі результати одержали Рао зі співавт. [19], обробляючи екзогенним пероксидом водню листки *Arabidopsis thaliana* Heun. Вміст H_2O_2 у тканинах був на 4–5 порядків меншим, ніж його концентрація в інкубаційному розчині. Можна припускати, що проникнення екзогенного пероксиду водню досить жорстко регулюється рослинними клітинами. Крім того, ймовірно, певна частина екзогенної H_2O_2 може руйнуватися антиоксидантними ферментами [22].

Упродовж експерименту в контрольних колеоптилях, які не прогрівали і не обробляли H_2O_2 , інтенсивність ПОЛ, визначена за вмістом ТБКАП, достовірно не змінювалася (таблиця).

Обробка колеоптилів 10 мМ пероксидом водню підвищувала інтенсивність ПОЛ, а наступне перенесення відрізків на розчин сахарози без додавання H_2O_2 спричинювало поступове зниження інтенсивності ПОЛ. Через 24 год після припинення дії H_2O_2 (26-та година експерименту) вміст ТБКАП у колеоптилях, оброблених пероксидом водню, був нижчим порівняно з контрольними (таблиця). Можна припустити, що це явище пов'язане з індукцією пероксидом антиоксидантних ферментів. Зокрема, є відомості про підвищення активності каталази і глутатіонредуктази у проростках пшениці за обробки їх екзогенним H_2O_2 [22].

Вміст ТБКАП (нмоль/г сухої речовини) у колеоптилях пшениці

Варіант досліду	Час від початку експерименту, год			
	2	3	5	26
Контроль (без нагрівання)	$85,6 \pm 6,8$	$92,2 \pm 6,9$	$88,3 \pm 9,8$	$95,3 \pm 8,7$
Контроль (нагрівання)		$130 \pm 9,5$	149 ± 11	168 ± 10
H_2O_2 , 10 мМ	$129 \pm 9,5$	$106 \pm 7,0$	$100 \pm 8,4$	$56,1 \pm 7,2$
H_2O_2 , 10 мМ + нагрівання		$147 \pm 7,1$	$104 \pm 9,1$	$107 \pm 8,5$
$LaCl_3$, 1 мМ	$88,5 \pm 7,2$	$68,3 \pm 8,6$	$66,1 \pm 9,1$	$72,2 \pm 6,9$
$LaCl_3$, 1 мМ + нагрівання		$85,6 \pm 11$	109 ± 12	$182 \pm 9,3$
H_2O_2 , 10 мМ + $LaCl_3$, 1 мМ	$87,5 \pm 8,4$	$78,2 \pm 7,9$	$90,0 \pm 7,2$	$84,7 \pm 11$
H_2O_2 , 10 мМ + $LaCl_3$, 1 мМ + нагрівання		106 ± 11	$119 \pm 8,4$	174 ± 11



Вживання колеоптилів пшениці (%) після ушкоджуючого нагрівання: 1 — контроль; 2 — 10 мМ Н₂О₂; 3 — 1 мМ LaCl₃; 4 — 10 мМ Н₂О₂ + 1 мМ LaCl₃; 5 — 20 мкМ хлорпромазин; 6 — 10 мМ Н₂О₂ + 20 мкМ хлорпромазин

Survival of wheat coleoptiles (%) after the damaging heating: 1 — control; 2 — 10 mM H₂O₂; 3 — 1 mM LaCl₃; 4 — 10 mM H₂O₂ + 1 mM LaCl₃; 5 — 20 μM chlorpromazine; 6 — 10 mM H₂O₂ + 20 μM chlorpromazine

Блокатор кальцієвих каналів різних типів — хлорид лантану — сам по собі достовірно не впливав на інтенсивність ПОЛ, хоча через 1–24 год після припинення обробки колеоптилів LaCl₃ (3, 5 і 26-та година експерименту) вміст ТБКАП у них був дещо нижчим за контрольний. LaCl₃ цілком знімав підвищення інтенсивності ПОЛ, спричинену обробкою Н₂О₂ (таблиця).

Протягом усього часу спостережень нагрівання поступово підвищувало інтенсивність ПОЛ у колеоптилях контрольного (без обробки ефекторами) варіанта (таблиця). У відрізках, оброблених Н₂О₂, спостерігалось незначне підвищення інтенсивності ПОЛ через 1 год після нагрівання, а надалі вміст ТБКАП падав і ставав нижчим порівняно з відповідним контрольним варіантом. Обробка LaCl₃ гальмувала збільшення вмісту продуктів ПОЛ через 1–3 год після нагрівання (3-тя і 5-та год експерименту), але через 24 год (26-та година від початку досліду) вміст ТБКАП у колеоптилях, оброблених LaCl₃, значно зростає. Майже такою самою була після нагрівання і динаміка процесу ПОЛ у колеоптилях, оброблених комбінацією Н₂О₂ і LaCl₃. Можна припускати, що підвищення вмісту ТБКАП у колеоптилях, оброблених іонами лантану або комбінацією пероксиду водню з блокатором кальцієвих каналів, через 24 год після нагрівання пов'язане з розвитком ушкоджень, а не з первинною стресовою реакцією. Проте перший сплеск інтенсивності ПОЛ, який спостерігали після обробки колеоптилів Н₂О₂ та/або нагрівання, навпаки, гальмувався блокатором кальцієвих каналів. Слід зауважити, що в літературі останніми роками з'являються відомості про антиоксидантну дію іонів La³⁺ [12]. Однак блокатори кальцієвих каналів можуть пригнічувати і захисні реакції, збільшуючи стресові ушкодження рослинних тканин [15].

Таким чином, є підстави припускати, що посилення ПОЛ, спричинене обробкою Н₂О₂, пов'язане не лише з безпосереднім впливом пероксиду водню на залишки ненасичених жирних кислот [1], а й з активацією Ca²⁺-залежних сигнальних систем. Таке припущення узгоджується з даними про здатність Н₂О₂ призводити до транзиторного збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію, у т. ч. у рослинних об'єктах [18]. Своєю чергою, підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺ може стимулювати активність ферментів, причетних до розвитку ПОЛ. Відомо, що іони кальцію здатні підвищувати активність мембранних фосфоліпаз та ліпоксигенази [8, 11]. Це може призводити до нагромадження вільних жирних кислот та їх подальшого пероксидного окиснення [14]. Можна припуска-

ти, що такі процеси необхідні для ініціації каскаду захисних реакцій, зокрема, пов'язаних із синтезом стресових білків [8], активацією антиоксидантних систем [6, 16, 22], нагромадженням низькомолекулярних протекторів, у т.ч. проліну [5]. Є відомості про роль продуктів ПОЛ в індукованні принаймні частини з перелічених захисних реакцій [8].

З такими уявленнями узгоджуються результати оцінки теплостійкості колеоптилів за їх виживанням після ушкоджуючого нагрівання. Передобробка H_2O_2 підвищувала рівень виживання колеоптилів (рисунок). Блокатор кальцієвих каналів La^{3+} сам по собі істотно не впливав на виживання зразків, але цілком блокував захисну дію H_2O_2 на колеоптилі.

Можна припускати, що вплив H_2O_2 на теплостійкість колеоптилів залежить не лише від надходження Ca^{2+} у цитозоль через кальцієві канали, а й від активності кальмодуліну. Антагоніст кальмодуліну — хлорпромазин у концентрації, використаній нами, сам по собі не змінював виживання колеоптилів після теплового стресу, але він повністю знімав захисні ефекти передобробки пероксидом водню (рисунок). Ці дані узгоджуються з відомостями щодо участі кальмодулінзалежних протеїнкіназ у трансдукції сигналу, індукованого обробкою пероксидом водню в рослинних клітинах [16, 20].

Таким чином, передобробка колеоптилів H_2O_2 спричинювала у них посилення ПОЛ, яке було оборотним та, ймовірно, причетним до індукції адаптивних реакцій. Пероксид водню підвищував виживання колеоптилів після нагрівання. Його ефекти були кальційзалежними, адже усувалися блокаторами кальцієвих каналів $LaCl_3$ і антагоністом кальмодуліну — хлорпромазином.

1. *Гамалей И.А., Клубин И.В.* Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология. — 1996. — 38, № 12. — С. 1233—1247.
2. *Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М.* Активні форми кисню та імунітет рослин // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 4. — С. 64—75.
3. *Жерелова О.М., Чайлахян Л.М.* Са-канали растительных клеток и их регуляция // Усп. соврем. биологии. — 1994. — 114, вып. 5. — С. 608—619.
4. *Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В.* Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиол. раст. — 2005. — 52, № 2. — С. 227—232.
5. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Акинина Г.Е.* Влияние салициловой кислоты и перекиси водорода на содержание пролина в колеоптилях пшеницы при тепловом и солевом стрессах // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — Вип. 1(6). — С. 51—56.
6. *Курганова Л.Н., Веселов А.П., Сеницина Ю.В., Еликова Е.А.* Продукты перекисного окисления липидов как возможные посредники между воздействием повышенной температуры и развитием стресс-реакции у растений // Физиол. раст. — 1999. — 46, № 2. — С. 218—222.
7. *Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Юферова С.Г., Шевырева В.А.* Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биол. науки. — 1978. — № 9. — С. 86—94.
8. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
9. *Dat J.F., Delgado H.L., Foger C.H., Scott J.M.* Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // Plant Physiol. — 1998. — 116. — P. 1351—1357.

10. *Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — 57. — P. 779—795.
11. *Grijalba M.T., Vercesi A.E., Schreier Sh.* Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain // *Biochemistry.* — 1999. — 38. — P. 13279—13287.
12. *Huo Yu-Yun, Jing Lan-hua, Zeng Fu-li.* Studying of La³⁺ action on winter wheat leaves damage at drought stress // *Acta Bot. Boreali-Occident. Sin.* — 2001. — 21. — P. 1134—1141.
13. *Jiang M., Jianhua Z.* Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings // *Plant and Cell Physiol.* — 2001. — 42. — P. 1265—1273.
14. *Kavanagh N.I., Ainscow E.K., Brand M.D.* Calcium regulation of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — 1457. — P. 57—70.
15. *Larkindale J., Knight M.R.* Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene and salicylic acid // *Plant Physiol.* — 2002. — 128. — P. 682—695.
16. *Neill S.T., Desikan R., Clarke A. et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. Exp. Bot.* — 2002. — 53. — P. 1237—1247.
17. *Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B., Stewart C.R.* Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide // *Plant Cell.* — 1994. — 6. — P. 65—74.
18. *Price A.H., Taylor A., Ripley S.J. et al.* Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium // *Plant Cell.* — 1994. — 6. — P. 1301—1310.
19. *Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. et al.* Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes // *Plant Physiol.* — 1997. — 115. — P. 137—149.
20. *Rentel M.C., Knight M.R.* Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis // *Plant Physiol.* — 2004. — 135. — P. 1471—1479.
21. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, populus gelrica // *Plant Physiol.* — 1976. — 57. — P. 308—309.
22. *Sairam R.K., Srivastava G.C.* Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes // *Biol. Plant.* — 2000. — 43. — P. 381—386.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 26.02.2007

Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ КОЛЕОПТИЛЕЙ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Изучали влияние экзогенного пероксида водорода (H₂O₂) на динамику пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и теплоустойчивость coleoptилей *Triticum aestivum* L. Двухчасовая обработка отрезков 10 мМ H₂O₂ вызывала обратимое усиление ПОЛ и повышала теплоустойчивость coleoptилей. Эффекты H₂O₂ снимались блокатором кальциевых каналов LaCl₃ и антагонистом кальмодулина хлорпромазином. Предполагается, что усиление ПОЛ под влиянием пероксида водорода вызывало индукцию защитных реакций растительных клеток с участием кальцийзависимых сигнальных систем.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, пероксид водорода, кальций, пероксидное окисление липидов, теплоустойчивость.

Yu.Ye. Kolupaev, Yu.V. Karpets

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University

**CALCIUM DEPENDENT INFLUENCE
OF THE HYDROGEN PEROXIDE ON HEAT RESISTANCE
OF *TRITICUM AESTIVUM* L. COLEOPTILES**

The influence of an exogenous hydrogen peroxide (H_2O_2) on dynamics of a lipide peroxidation (LPO) and heat resistance of *Triticum aestivum* L. coleoptiles have been studied. Two-hour treatment of pieces by 10 mM H_2O_2 caused reversible intensifying the LPO and raised heat resistance of coleoptiles. Effects of H_2O_2 were taken out by $LaCl_3$ (blocker of calcium channels) and chlorpromazinum (antagonist of calmodulin). It is supposed, that LPO intensifying under the influence hydrogen peroxide caused an induction of plant cells defense reactions with participation of calcium dependent signaling systems.

Key words: *Triticum aestivum*, *hydrogen peroxide*, *calcium*, *lipide peroxidation*, *heat resistance*.