

**Національна академія наук України  
Інститут фізіології рослин і генетики**

**КОЛУПАЄВ Юрій Євгенович**

УДК 581.13: 581.1.036.2: 581.1.632.122.1

**ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ  
АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН: РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ  
КИСНЮ ТА ІОНІВ КАЛЬЦІЮ**

03.00.12 – фізіологія рослин

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ - 2007

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Харківському національному аграрному університеті ім. В.В.Докучаєва

**Науковий консультант** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Косаківська Ірина Василівна** Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, заступник директора з наукової роботи, головний науковий співробітник

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук **Яворська Вікторія Казимирівна** Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, завідувач відділу фізіології росту і розвитку рослин

член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор **Кордюм Єлизавета Львівна** Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, завідувач відділу клітинної біології

доктор біологічних наук, професор **Паршикова Тетяна Вікторівна** Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, завідувач кафедри фізіології і екології рослин

Захист відбудеться 26 березня 2008 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.212.01 Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17)

Автореферат розіслано 22 лютого 2008 р.

Учений секретар спеціалізованої  
вченої ради д.б.н.

Є.Ю. Мордерер

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Пізнання механізмів стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища в останні десятиліття увійшло до числа найактуальніших проблем фітофізіології і загальної біології. Це зумовлено передусім глобальними кліматичними змінами і посиленням впливу на рослини чинників антропогенного походження (ксенобіотики, різні види випромінювання тощо) [Мокроносов, 2000]. Крім сільськогосподарського аспекту, проблема стійкості має велике природно-екологічне значення, адже здатність рослин адаптуватися до умов існування – один із факторів, що визначає ареали поширення видів на планеті і можливість їх інтродукції [Косаківська, 2003, Кордюм и др., 2003, Трунова, 2007].

Упродовж більшої частини 20 століття досліджувалася феноменологія загального адаптаційного синдрому і фізіологічних змін, що супроводжують пристосування рослин до конкретних несприятливих чинників. Було встановлено, що адаптаційний синдром є необхідним етапом формування пристосувальних реакцій, фактором збереження гомеостазу [Веселовский, 1993, Lichtenthaler, 1998, Таран, 2001]. На якісно новому рівні дослідження механізмів адаптації рослин почалися після з'ясування загальних принципів трансдукції стресових сигналів в їх клітинах, ідентифікації генів і кодованих ними специфічних білків, причетних до розвитку стійкості [Яворская, Драговоз, 1999, Тарчевский, 2002, Дмитриев, 2003, Kasperska, 2004, Bhattacharjee, 2005]. Разом з тим, гіпотези щодо сигнальної ролі окремих сполук (іонів), вміст і внутрішньоклітинна компартментація яких змінюється за умов стресу, потребували експериментального обґрунтування.

До ранніх реакцій організму на дію стресорів відносять посилення утворення активних форм кисню (АФК) і активацію пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). В останні десятиліття досить активно досліджується роль АФК в стійкості рослин до дії патогенів. Проте майже не з'ясованим залишається фізіологічне значення зрушення тканинного балансу антиоксидантів та прооксидантів у бік останніх (окиснювальний стрес) за дії абіотичних стресорів. Так, одними авторами розглядається зв'язок між нагромадженням АФК, продуктів ПОЛ та ступенем пошкодження тканин рослин за дії екстремальних факторів [Scandalios, 2002]. Водночас іншими дослідниками висловлюється припущення про роль АФК і продуктів ПОЛ як медіаторів, необхідних для запуску захисних реакцій рослинного організму [Dat et al., 2000, Suzuki, Mittler, 2006], хоча дотепер практично відсутні прямі докази участі АФК в індукуванні стійкості рослин до абіотичних стресорів. Мало відомо про те, які саме захисні реакції, корисні для розвитку стійкості до несприятливих абіотичних чинників, індукуються за зміни окиснювально-відновного балансу.

Разом з цим останнім часом активно досліджується роль кальцію як вторинного месенджера, що бере участь у передачі сигналів в рослинних клітинах. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  прямо чи опосередковано задіяні у роботі більшості сигнальних систем рослинних клітин [Медведев, 2005, Kaur, Gupta, 2005]. Проте

відомості щодо впливу екзогенного кальцію і внутрішньоклітинного його пулу на стійкість рослин залишаються вельми суперечливими. Так, є дані щодо підвищення іонами  $\text{Ca}^{2+}$  чутливості рослинних клітин до абіотичних стресорів [Бияшева и др., 1993, Лукаткин и др., 1997], з другого боку, нагромаджено і досить чисельні відомості про зростання стійкості рослин до несприятливих чинників під впливом екзогенного кальцію [Gong et al., 1998, Nayyar, Kaushal, 2002]. Встановлене важливе значення кальцію для розвитку окиснювального стресу як складової реакції надчутливості за ураження рослин патогенами [Grant et al., 2000]. Водночас недостатньо доказів причетності іонів кальцію до регуляції процесу генерації АФК і окиснювально-відновного балансу (зокрема, активності про-/антиоксидантних ферментів) у рослинних тканинах за дії абіотичних стресорів, з іншого боку, неоднозначними залишаються і відомості стосовно впливу потенційних агентів окиснювального стресу на кальцієвий статус рослинних клітин [Sagi, Fluchr, 2006]. В цілому значення зв'язків  $\text{Ca}^{2+}$  та АФК, як компонентів сигнальної мережі рослинних клітин, в адаптації рослин є маловивченим, особливо за дії абіотичних стресорів [Rentel, Knight, 2004].

У зв'язку з викладеним з використанням чинників різної природи досліджувалися характер і механізми змін окиснювально-відновного балансу при індукуванні стійкості рослин до абіотичних стресорів, а також значення генерації АФК рослинними тканинами і роль кальцієвого статусу у запуску конкретних адаптивних реакцій.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконувалася згідно з планом науково-дослідних робіт Харківського національного аграрного університету ім. В.В.Докучаєва в рамках міжкафедральної (кафедра ботаніки і фізіології рослин та кафедра загальної хімії) держбюджетної теми № 38.02 “Дослідження неспецифічних стресових реакцій рослин: біохімічні аспекти” (р/№ 0107U005809), керівником і виконавцем якої був дисертант.

**Мета і завдання дослідження.** Основною метою роботи було з'ясування ролі АФК та іонів кальцію як взаємопов'язаних інтермедіатів єдиної системи передачі стресових сигналів у рослинних клітинах у формуванні стійкості рослин до дії абіотичних стресорів. Відповідно було поставлено такі завдання:

- з'ясувати особливості впливу екзогенних пероксиду водню, саліцилової кислоти (СК), абсцизової кислоти (АБК) та іонів  $\text{Ca}^{2+}$  як можливих агентів окиснювального стресу на стійкість рослинних тканин до гіпертермії і дії  $\text{NaCl}$ ;
- дослідити часову динаміку вмісту АФК і продуктів ПОЛ за індукування стійкості рослин природними агентами окиснювального стресу та гіпертермії та після дії засолення середовища;
- встановити можливість супресії антиоксидантами фізіологічних ефектів агентів окиснювального стресу;
- оцінити значення змін активності гваяколпероксидази, супероксиддисмутази (СОД) і каталази в регуляції окиснювально-відновного балансу в рослинних тканинах за дії

екзогенних індукторів окиснювального стресу та пошкоджуючих чинників;

- виявити можливу роль кальцію як сигнального інтермедіата в реалізації фізіологічних ефектів саліцилату та  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- дослідити особливості сумісної дії іонів кальцію та пероксиду водню на показники окиснювального метаболізму рослинних об'єктів за умов гіпертермії та їх теплостійкість;
- визначити можливість індукування нагромадження низькомолекулярних поліфункціональних протекторів (пролін, розчинні вуглеводи) агентами окиснювального стресу і довести наявність зв'язку цих ефектів зі змінами вмісту АФК в рослинних тканинах;
- вивчити вплив штучних антиоксидантів на теплостійкість, показники окиснювально-відновного балансу та порівняти їх ефекти з дією агентів окиснювального стресу, здатних підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресорів.

**Об'єкт дослідження:** процес формування адаптивних реакцій рослин за участю  $\text{H}_2\text{O}_2$ , СК, АБК та іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Предмет дослідження:** маркери окиснювального метаболізму (динаміка генерації АФК, активності прооксидантних ферментів) та захисних реакцій (зміни вмісту низькомолекулярних поліфункціональних протекторів, активності компонентів антиоксидантної системи) рослин.

**Методи дослідження.** У роботі застосовувалися прийоми модифікації прооксидантно-антиоксидантного, кальцієвого і гормонального статусу рослинних об'єктів, а також методи інгібіторного (фармакологічного) аналізу. При проведенні біохімічних аналізів (визначення вмісту АФК і продуктів ПОЛ, активності про-/антиоксидантних ферментів, вмісту проліну та розчинних вуглеводів, вмісту білка) використовувалися переважно спектрофотометричні методи. Фізіологічний стан рослин та ізольованих органів після дії стрес-факторів оцінювався за кількісними показниками (виживання, інгібування росту, вихід електролітів з тканин). Для оцінки достовірності досліджуваних ефектів застосовувалися класичні методи статистичної обробки результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Сформульовано положення, відповідно до якого керований окиснювальний стрес розглядається як індуктор адаптивних реакцій рослинного організму, що призводять до підвищення стійкості до абіотичних стресорів (гіпертермія, дія солей тощо), а не як чинник пошкоджень. Запропоновано й експериментально обґрунтовано гіпотетичний механізм зв'язків між АФК та іонами кальцію як інтермедіатами запуску адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори. Згідно з ним індукування стійкості рослин відбувається за умови взаємопов'язаного зростання вмісту АФК і посилення надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль.

Вперше показано, що ефект індукування екзогенними СК, АБК та іонами кальцію стійкості рослин до нагрівання і дії  $\text{NaCl}$  реалізується з участю АФК.

Доведено, що у виникненні окиснювального стресу, індукованого дією на рослинні тканини екзогенною СК, задіяні кальцієві канали і кальмодулін. Отримано свідчення щодо ролі  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів в розвитку в рослинах ПОЛ, спричиненого екзогенним пероксидом водню.

Вперше встановлено, що сумісна обробка рослинних тканин екзогенними сіллю кальцію та пероксидом водню в нетоксичних концентраціях може призводити до розвитку некерованого окиснювального стресу за умов нагрівання рослинних об'єктів. Комбінована обробка рослинних тканин екзогенними іонами кальцію та пероксидом водню з наступним ушкоджуючим нагріванням розглядається як модель синергічних порушень кальцієвого та окиснювального гомеостазу.

Показано, що тимчасове підвищення вмісту АФК в рослинних тканинах під впливом СК пов'язане не стільки з інгібуванням каталази, як вважалося раніше, скільки з одночасними різноспрямованими змінами активності кількох ферментів окиснювального метаболізму (гваяколпероксидази, СОД, каталази). На підставі одержаних експериментальних даних запропонований гіпотетичний механізм виникнення окиснювального стресу в рослинних клітинах під впливом СК.

Доведено, що екзогенні індуктори окиснювального стресу (пероксид водню, СК, іони кальцію) здатні спричиняти нагромадження в рослинах поліфункціональних низькомолекулярних протекторів. Вперше показано, що антиоксиданти пригнічують захисні реакції нагромадження в рослинах проліну та розчинних вуглеводів, індуковані дією СК та іонів кальцію.

**Теоретичне і практичне значення.** Представлена робота є фундаментальним дослідженням, яке істотно доповнює сучасні уявлення про функціонування сигнальних систем рослинних клітин за стресових умов та створює теоретичні основи для керування адаптивними реакціями рослин.

Отримані результати є передумовою для обґрунтування нової парадигми захисту рослин від окиснювальних пошкоджень шляхом індукування їх власної антиоксидантної системи за допомогою передобробки агентами окиснювального стресу у помірних дозах. Ці підходи відрізняються від традиційних, що зводяться до застосування штучних антиоксидантів.

Результати дослідження можуть бути використані при розробці методів оцінки дії синтетичних препаратів як потенційних індукторів стійкості рослин, виборі критеріїв визначення стресового стану рослин.

Експериментальні дані й теоретичні узагальнення використовуються при читанні спецкурсу “Фізіологія стійкості рослин”, загального курсу “Фізіологія рослин” в Харківському національному аграрному університеті ім. В.В.Докучаєва. Вони можуть бути використані у навчальному процесі на біологічних факультетах класичних університетів та в інших аграрних і педагогічних вищих навчальних закладах, а також у наукових установах, які здійснюють дослідження в галузі фізіології стресу і адаптації рослин.

**Особистий внесок здобувача.** Робота виконана автором особисто. Дисертантом самостійно здійснені інформаційний пошук та аналіз літературних джерел, визначено мету і завдання дослідження, розроблені робочі гіпотези та методологія постановки експериментів, інтерпретовано та узагальнено результати, підготовлено друковані праці. Експериментальні дослідження проводилися автором особисто та за участю здобувача кафедри ботаніки і фізіології рослин ХНАУ Карпця Ю.В. і магістрантки Акініної Г.Є. Частка особистої участі в основних колективних публікаціях становить 80-90 %.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційного дослідження були представлені на Міжнародному симпозіумі “Фізико-хімічні основи фізіології рослин” (Росія, 1996), XI і XII з’їздах Українського ботанічного товариства (Харків, 2001; Одеса, 2005), Третьюму з’їзді Українського товариства фізіологів рослин (Тернопіль, 2002), Міжнародній конференції “Проблеми сучасної екології” (Запоріжжя, 2002), Другій і Третій Міжнародних конференціях “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти” (Львів, 2004, 2007), Міжнародній науковій конференції “Актуальні питання ботаніки і фізіології рослин” (Росія, 2004), Міжнародній науковій конференції “Ріст і розвиток рослин: теоретичні і практичні проблеми” (Литва, 2004), 8-й Міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми збереження стійкості живих систем” (Росія, 2004), Першій і Другій Всеукраїнських наукових конференціях “Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин” (Дніпропетровськ, 2005; 2007), XV Конгресі Федерації європейських товариств біологів рослин (Франція, 2006), IX Українському біохімічному з’їзді (Харків, 2006), Міжнародній конференції “Сучасні проблеми біології, екології та хімії” (Запоріжжя, 2007), VI з’їзді Товариства фізіологів рослин Росії: Міжнародна конференція “Сучасна фізіологія рослин: від молекул до екосистем” (Росія, 2007), II з’їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007) та інших конференціях.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 52 наукові праці, у тому числі 27 статей у провідних фахових виданнях та одна монографія.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація складається зі вступу, 6 розділів (огляд літератури, опис об’єктів і методів досліджень, чотири експериментальні розділи), узагальнення результатів досліджень, висновків. Список цитованої літератури містить 508 джерел. Дисертація викладена на 340 сторінках, ілюстрована 74 рисунками, містить 15 таблиць і 7 схем.

## ОБ'ЄКТИ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Об'єкти досліджень.** Основними об'єктами досліджень були відрізки колеоптилів та етіюльовані проростки озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Окремі експерименти проводили на сортах пшениці Донецька 46, Харківська 81, Харківська 96. Вибір етіюльованих проростків або їх частин як об'єктів досліджень зумовлений складністю регуляції про-/антиоксидантної рівноваги в зелених частинах рослин. Водночас незелені органи рослин - корені та колеоптилі, а також інтактні етіюльовані проростки - можуть бути чутливими моделями для створення експериментального окиснювального стресу [Минибаева и др., 1997]. Для попередження можливого розвитку явищ апоптозу в колеоптилях під час досліджень насіння пшениці пророщували 4 доби за температури 18-20°C, а експерименти з ізольованими колеоптилями закінчували на 6-7добу. При цьому в контрольних колеоптилях, що не зазнавали стресу, не спостерігалось змін, які б могли свідчити про початок апоптозних явищ (вміст білка і показники окиснювального метаболізму залишалися стабільними). Частина досліджень проводили також на етіюльованих проростках ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L. – сорт Козак) та ізольованих сім'ядолях огірка (*Cucumis sativum* L. – сорт Джерело).

**Обробка рослинного матеріалу ефекторами.** Як агенти окиснювального стресу використовували пероксид водню або сполуки, здатні посилювати генерацію АФК тканинами (СК, іони кальцію, АБК).

У дослідах з вивчення ефектів *блокаторів кальцієвих каналів* використовували блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів верапаміл, а також хлориди лантану та кобальту ( $\text{LaCl}_3$  і  $\text{CoCl}_2$ ), що блокують різні типи кальцієвих каналів [Дячок и др., 1997]. Крім того, досліджували ефекти *антагоніста кальмодуліну* хлорпромазину.

Для оцінки внеску білоксинтезуючої системи в реалізацію дії досліджуваних ефекторів використовували *інгібітор синтезу білка* на 80S рибосомах циклогексимід (ЦГ).

З метою з'ясування ролі АФК в реалізації ефектів екзогенних СК, кальцію і АБК на рослинні об'єкти використовували антиоксиданти *іонол* та *глутатіон*. Дослідження включали також оцінку впливу *диметилсульфоксиду* (ДМСО) на теплостійкість проростків і відокремлених колеоптилів пшениці та показники окиснювально-відновного балансу. В окремій серії експериментів вивчалася дія екзогенного *цитокиніну* (кінетин) на теплостійкість сім'ядолей огірка та вміст в них пероксидів [Колупаєв та ін., 2006].

В експериментах з колеоптилями пшениці досліджувані речовини додавали в основне середовище їх інкубації (2%-ний розчин сахарози). Сім'ядолі огірка інкубували на дистильованій воді (контроль), у дослідні варіанти додавали відповідні ефектори. В інтактні проростки пшениці та ячменю досліджувані сполуки вводили шляхом інкубації кореневої системи у відповідних розчинах.

**Дія стрес-факторів на досліджувані об'єкти.** У роботі вивчали вплив жорстких (потенційно летальних) “доз” стрес-факторів [Мелехов, 1985] і оцінювали їх ефекти за рівнем виживання об'єктів досліджень.



Як основний абіотичний стресор використовували *ушкоджуюче нагрівання*. Нагрівання здійснювали, занурюючи досліджувані об'єкти (етіоловані проростки пшениці або ячменю, відрізки колеоптилів пшениці, сім'ядолі огірка) у ванну водного ультратермостату на 10 хв. Температуру прогріву вибирали на підставі результатів попередніх дослідів. Для колеоптилів пшениці в різних серіях дослідів вона становила 43-45 °С, для інтактних проростків пшениці та ячменю - 44,5-45,0 °С, для сім'ядолей огірка – 46-47 °С.

Досліджували також дію осмотичного і сольового стрес-факторів на рослинні об'єкти. Вплив *зневоднення* вивчали на прикладі колеоптилів пшениці, які занурювали на 3 год у 25%-ний ПЕГ-4000. Ефекти *засолення* середовища досліджували на колеоптилях та інтактних проростках пшениці. Відрізки колеоптилів експонували 48 год у вологій камері на фільтрувальному папері, зволоженому 2%-ним розчином сахарози з додаванням 0,4 М NaCl. У випадку з проростками пшениці їх кореневу систему занурювали в 4% (0,68 М) NaCl на 5 год, далі відмивали від солі і переносили зразки на воду.

**Біохімічні аналізи.** Для характеристики окиснювально-відновного балансу оцінювали генерацію рослинними об'єктами *супероксидного радикала* (за відновленням нітротетразолію синього) [Шоринг и др., 2000], *вміст пероксидів* в тканинах [Sagisaka, 1976] та *кінцевих продуктів ПОЛ* – тіобарбітурат-активних (ТБК-активних) сполук [Мерзляк и др., 1978].

*Активність розчинної пероксидази та іоннозв'язаної пероксидази клітинних стінок* (КФ 1.11.1.7) визначали за методом Ріджа і Осборна [Ridge, Osborne, 1970] з деякими модифікаціями [Колупаев и др., 2005], як відновник використовували гваякол. *Активність СОД* (КФ 1.15.1.1) визначали за методом, описаним Чеварі та співавт. [Чевари и др., 1985]. *Активність каталази* (КФ 1.11.1.6) визначали за кількістю розкладеного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Королюк и др., 1988].

*Вміст білка* в рослинному матеріалі визначали за [Bradford, 1976], *проліну* - за методом Бейтса [Bates, 1973], *вміст відновних цукрів та суму розчинних вуглеводів* - ферроціанідним методом [Арасимович, 1987].

*Вживання* рослинних об'єктів оцінювали візуально. Стан колеоптилів пшениці визначали через 48 год після дії стресора. Ушкоджені колеоптилі набували специфічного відтінку і втрачали тургор [Мелехов и др., 1983]. Вживання проростків пшениці та ячменю оцінювали за їх здатністю до росту після дії несприятливого фактора. Оцінку проводили через 3-4 доби після дії стресора, при цьому 2-3 останні доби проростки інкубувалися на світлі (2 клк, фотоперіод 14 год). Вживання сім'ядолей огірка визначали через 4 доби після ушкоджуючого нагрівання [Анев и др., 1987].

**Статистичну обробку** результатів проводили за загальноприйнятими методами [Лакин, 1990]. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються результати, достовірні при  $P \leq 0,05$ .

## **ОКИСНЮВАЛЬНИЙ СТРЕС І СТІЙКІСТЬ РОСЛИН ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ**

Одним із досить простих і водночас інформативних методичних підходів з'ясування ролі АФК в індукуванні стійкості рослин є штучна зміна



<i>Cucumis sativus</i> L. (сім'ядолі)	46±0,2	46,1±2,7	48,7±2,1	67,0±3,0	59,9±2,6	40,2±2,9	-
<i>Triticum aestivum</i> L. (проростки)	44±0,1	51,7±3,2	74,8±4,5	81,1±3,7	56,7±3,3	43,6±3,3	-
<i>Triticum aestivum</i> L. (колеоптилі)	43±0,1	47,8±3,4	-	50,1±4,1	68,9±4,2	55,2±4,7	21,3±6
<i>Hordeum vulgare</i> L. (проростки)	44±0,1	67,0±2,9	-	78,3±3,6	85,8±2,9	68,7±3,4	-

Підвищення стійкості рослинних об'єктів викликав й екзогенний кальцій. 16-20-годинна інкубація колеоптилів пшениці на розчинах  $\text{CaCl}_2$  призводила до підвищення їх виживання після дії теплового і осмотичного стресів (рис. 2). Ефективними виявилися досить високі концентрації іонів кальцію – 5-50 мМ. Однак такі ефекти не пов'язані з осмотичною дією кальцію, адже обробка колеоптилів індіферентним (метаболічно неактивним) вуглеводом маннітом не призводила до підвищення їх стійкості [Колупаєв и др., 2002]. Ідентичні результати отримані на інтактних проростках пшениці [Колупаєв, Карпець, 2006].

З метою оцінки ролі АФК у формуванні адаптивних реакцій з'ясували, чи супроводжувалося описане вище підвищення стійкості рослин до дії абіотичних стресорів під впливом екзогенних пероксиду водню, СК та хлориду кальцію, змінами показників про-/антиоксидантної рівноваги.

**Рис. 2.** Вплив  $\text{CaCl}_2$  на виживання (%) колеоптилів пшениці після теплового (а) (44°C, 10 хв) і осмотичного (б) (25% ПЕГ-4000, 3 год) стресів.

Обробка колеоптилів екзогенним пероксидом водню (1-10 мМ) призводила до збільшення вмісту пероксидів приблизно в 3 рази, але він був на 5 порядків нижчим від концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  в інкубаційному середовищі і знаходився в межах фізіологічних концентрацій [Колупаєв, Карпець, 2007]. Під впливом 1 та 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  вміст ТБК-активних продуктів зростав відповідно в 1,4-1,5 рази. Проте після ушкоджуючого нагрівання у зразках, оброблених перед стресом пероксидом водню, вміст пероксидів і ТБК-активних продуктів був значно меншим від контролю, в якому відзначалося зростання цих показників [Колупаєв, Карпець, 2007, Колупаєв, 2007].

СК в концентраціях, що підвищували теплостійкість рослинних об'єктів, як і екзогенний пероксид водню, викликала тимчасове зростання вмісту пероксидів в тканинах [Колупаєв, Карпець, 2005, Колупаєв та ін., 2006]. Посилення генерації рослинами АФК, як правило, призводить до підвищення інтенсивності ПОЛ [Меньшикова, Зенков, 1993]. Такий ефект спостерігався нами і у разі обробки колеоптилів СК [Колупаєв, Акініна, 2005]. Ми порівняли вплив на інтенсивність ПОЛ СК в концентрації, що чинила захисний ефект (10

мкМ) і посилювала пошкодження (250 мкМ, див. табл. 1). Після двогодинної обробки 10 мкМ СК вміст ТБК-активних продуктів в тканинах зростав приблизно на 25%, дія 250 мкМ СК призводила до дворазового збільшення вмісту ТБК-активних продуктів. Тепловий стрес спричиняв додаткове підвищення вмісту продуктів ПОЛ у колеоптилях, оброблених СК, що спостерігалось через 1 год після нагрівання (рис. 3). У разі обробки 10 мкМ СК це явище не пов'язане з пошкодженням колеоптилів, оскільки вже через 3 год після теплового стресу (5 год від початку експерименту) вміст ТБК-активних продуктів у зразках, оброблених СК, був набагато нижчим порівняно з контролем і меншим за передстресовий. Через 24 год після нагрівання вміст продуктів ПОЛ дещо збільшувався як у контролі, так і у варіанті з 10 мкМ СК, водночас вміст ТБК-активних продуктів у дослідному варіанті був значно меншим від контролю (рис. 3). Зовсім іншою була динаміка ПОЛ в колеоптилях, оброблених 250 мкМ СК. Відбувалося незворотне підвищення інтенсивності ПОЛ після нагрівання, тобто мав місце розвиток некерованого окиснювального стресу. Вміст ТБК-активних продуктів досягав високих значень і не зменшувався в ході післястресової інкубації колеоптилів (рис. 3). Отже, захисний ефект (підвищення виживання колеоптилів після нагрівання) СК викликала лише в концентрації, яка спричинювала керований (оборотний) окиснювальний стрес. Висока концентрація СК, яка призводила до незворотного посилення ПОЛ, знижувала показники виживання колеоптилів.

**Рис. 3.** Вплив СК на вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/г сух. речовини) в колеоптилях пшениці до і після нагрівання (43 °С, 10 хв). 1 - контроль (2% сахароза), 2 - 2% сахароза + 10 мкМ СК, 3 - 2% сахароза + 250 мкМ СК. Фігурною дужкою позначено час обробки колеоптилів СК, після чого їх відразу прогрівали.

Іони кальцію, які ми розглядаємо як потенційний агент окиснювального стресу, також призводили до підвищення вмісту АФК в рослинних тканинах. Так, інкубація колеоптилів на середовищі з  $\text{CaCl}_2$  спричинювала достовірне підвищення (на 35%) вмісту пероксидів (рис. 4). Іншою була картина після теплового стресу. Через 1 год після ушкоджуючого нагрівання вміст пероксидів в колеоптилях контрольного варіанта достовірно не змінювався. Водночас у відрізках, оброблених іонами кальцію, цей показник зменшувався. Через 24 год після стресового впливу в контролі виявлялася тенденція до збільшення вмісту пероксидів, у варіанті з  $\text{CaCl}_2$  відбувалося подальше зниження вмісту пероксидів (рис. 4). Схожа картина відзначалася і при визначенні генерації зразками супероксидного радикала [Колупаев, Карпец, 2005] та оцінці вмісту в них ТБК-активних продуктів [Колупаев и др., 2005]: “попередній” окиснювальний стрес, спричинений обробкою рослинних тканин екзогенним кальцієм, зменшував його прояви після наступного ушкоджуючого нагрівання колеоптилів або інтактних проростків пшениці.

**Рис. 4.** Вміст пероксидів (нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /г сухої речовини) в колеоптилях пшениці за дії іонів кальцію (5 мМ) і ушкоджуючого нагрівання ( $43^\circ\text{C}$ , 10 хв). 1 – контроль (2% сахароза), 2 - 2% сахароза + 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Значення окиснювального сплеску, спричинюваного екзогенними пероксидом водню, СК та іонами кальцію в реалізації захисних ефектів було доведено в експериментах з усуванням нагромадження АФК антиоксидантами. Є відомості, що обробка рослин антиоксидантами може пригнічувати індукований СК синтез PR-білків, необхідний для формування стійкості рослин до патогенів [Wendehene et al., 1998]. Водночас такий методичний підхід за умов дії абіотичних стресорів не використовувався. У зв'язку з цим дію СК на теплостійкість колеоптилів та інтактних етіольованих проростків пшениці, а також сім'ядолей огірка досліджували у поєднанні з антиоксидантами – глутатіоном та іонолом. На прикладі колеоптилів та інтактних проростків пшениці вивчали також сумісну дію іонів кальцію та іонолу на теплостійкість та показники окиснювально-відновного балансу.

**Рис. 5.** Генерація супероксидного радикала інтактними проростками пшениці (% до контролю без нагрівання та обробки модифікаторами окиснювального метаболізму). *a* – через 4 год від початку обробки СК або через 6 год від початку обробки іонолом; *б* – через 24 год від початку обробки СК або через 26 год від початку обробки іонолом; *в, г* – відповідно через 1 і 24 год після нагрівання проростків при  $44^\circ\text{C}$ ; *д* – через 24 год після перенесення проростків, що не зазнавали нагрівання, з розчинів модифікаторів окиснювального метаболізму на дистильовану воду. 1 – контроль (дистильована вода), 2 – СК (1 мкМ), 3 – іонол (90 мкМ), 4 – СК (1 мкМ) + іонол (90 мкМ).

Інкубація проростків пшениці у розчині СК спричинювала посилення генерації ними супероксидного радикала (рис. 5, *a*). Необхідно зауважити, що через 4 год від початку експерименту підвищувалася і генерація „зовнішнього” супероксиду контрольними проростками. Такий ефект може бути пов'язаний з перенесенням проростків на початку експерименту у свіжу дистильовану воду, що спричинювало механічний стресовий вплив на корені [Часов и др., 2005]. Надалі (через 24 год інкубації) генерація супероксиду проростками як в контролі, так і у варіанті з СК зменшувалася. Проте і в цьому випадку виділення  $\text{O}_2^-$  проростками, обробленими СК, приблизно на 30% перевищувало величину контролю (рис. 5, *б*). Іонол знижував генерацію супероксиду проростками і повністю знімав ефект СК (див. рис. 5, *a, б*).

Через 1 год після нагрівання посилювалася генерація  $\text{O}_2^-$  проростками усіх варіантів, при цьому відмінності між варіантами досліду нівелювалися. Через 24

год після нагрівання утворення супероксиду зменшувалося, а вірогідної різниці між варіантами не було (рис. 5, в, з). Необхідно зауважити, що у проростках, які не нагрівали, генерація  $O_2^-$  через добу після перенесення на дистильовану воду дещо зменшувалася у варіанті з СК і зростала у варіантах з іонолом та іонолом + СК (рис. 5, д).

Зміни сумарного вмісту пероксидів в коренях і пагонах корелювали зі змінами генерації супероксиду в період обробки проростків досліджуваними речовинами [Колупаєв, Карпець, 2007]. Отже, обробка проростків СК перед нагріванням спричиняла ефект окиснювального стресу, що усувався антиоксидантом іонолом.

В концентрації, яка посилювала генерацію АФК перед нагріванням, СК підвищувала теплостійкість проростків, про що свідчить збільшення відсотка їх виживання через 4 доби після теплового стресу (рис. 6). Захисний вплив на проростки за умов нагрівання чинила і обробка їх іонолом, хоча ефекти антиоксиданту були меншими порівняно з СК. Проте комбінована обробка проростків СК та іонолом призводила до повного нівелювання ефекту СК (рис. 6). Таким чином, антиоксидант, пригнічуючи генерацію АФК, індуковану обробкою СК, знімав водночас і позитивний вплив СК на теплостійкість проростків. Ідентичні результати ми отримали і на прикладі відокремлених колеоптилів пшениці та сім'ядолей огірка [Колупаєв и др., 2004, 2006].

**Рис. 6.** Виживання проростків пшениці, оброблених СК, іонолом та їх комбінацією (%) після ушкоджуючого нагрівання ( $45^{\circ}C$ , 10 хв). 1 – контроль (дистильована вода), 2 – СК (1 мкМ), 3 – іонол (90 мкМ), 4 – СК (1 мкМ) + іонол (90 мкМ).

Подібну картину спостерігали при дослідженні дії екзогенного кальцію у поєднанні з іонолом на проростки пшениці: антиоксидант усував прояви окиснювального стресу, спричинюваного екзогенним кальцієм і водночас значно зменшував позитивний вплив обробки сіллю кальцію на виживання проростків після ушкоджуючого нагрівання [Колупаєв, Карпець, 2006].

Отже, одержані результати свідчать про участь АФК в індукуванні стійкості рослин до абіотичних стресорів. Підвищення тепло- і солестійкості інтактних рослин та їх ізольованих органів вдавалося досягти, змінюючи про-/антиоксидантний статус різними способами – прямою обробкою АФК (екзогенним пероксидом водню) або дією екзогенних індукторів утворення АФК – СК, іонами кальцію, а також АБК [Колупаєв та ін., 2006]. Всі види таких обробок призводили до тимчасового підвищення вмісту пероксидів в рослинних тканинах та короткочасної активації процесів ПОЛ.

Зміна про-/антиоксидантної рівноваги, ймовірно, пов'язана з модуляцією активності ферментів, що беруть участь в генерації і руйнуванні АФК. Так, індукування окиснювального стресу СК включало в себе тимчасове зниження активності каталази, підвищення активності гваяколпероксидази (потенційний продуцент АФК, зокрема, супероксиду) і зростання активності СОД, яке може бути причиною нагромадження пероксиду водню [Колупаєв, Акініна, 2005, Колупаєв, 2007]. В посилення генерації АФК рослинними тканинами під впливом екзогенного кальцію певний внесок робить підвищення активності гваяколпероксидази, передусім її іоннозв'язаної форми [Колупаєв и др., 2005].

Після тимчасового (оборотного) зрушення про-/антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік відбувалося підвищення стійкості рослинних тканин. При цьому рослинні об'єкти, попередньо „загартовані” (переадаптовані) обробкою названими індукторами окиснювального стресу, після потенційно летальних впливів високої температури або засолення краще зберігали про-/антиоксидантну рівновагу і мали менші пошкодження. Про пряму причетність АФК до індукування стійкості свідчить супресія антиоксидантами позитивних ефектів СК, АБК та іонів кальцію на стійкість рослинних тканин.

## **РОЛЬ КАЛЬЦІЄВОГО СТАТУСУ У РОЗВИТКУ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ ТА АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИННИХ КЛІТИН**

**Залежність впливу пероксиду водню та СК на теплостійкість рослинних клітин від їх кальцієвого статусу.** Між вмістом іонів кальцію, їх розподілом в рослинних клітинах і тканинах, з одного боку, та утворенням і елімінацією АФК з іншого, існують досить складні і далеко не повністю з'ясовані зв'язки. Є відомості як про індукування генерації АФК за збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, так і про здатність АФК спричиняти вихід  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль [Bolwer, Fluhr, 2000, Kaur, Gupta, 2005].

Виникає запитання, наскільки залежать ефекти індукторів окиснювального стресу, які використовувалися в наших експериментах – екзогенних пероксиду водню та СК – від кальцієвого статусу клітин? Для з'ясування цього питання проводили обробку рослинних тканин названими сполуками разом з модифікаторами кальцієвого статусу клітин – блокаторами кальцієвих каналів та антагоністом кальмодуліну.

В одній із серій експериментів оцінювали вплив екзогенного пероксиду водню в поєднанні з модифікаторами кальцієвого статусу - блокатором кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  та антагоністом кальмодуліну хлорпромазином - на стійкість колеоптилів пшениці до ушкоджуючого нагрівання. Як показали результати наших досліджень, блокатор кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  повністю, антагоніст кальмодуліну хлорпромазин значною мірою знімали позитивний вплив пероксиду водню на теплостійкість колеоптилів пшениці [Kolupaev, 2007].

Ми досліджували також вплив блокаторів кальцієвих каналів (верапаміл, хлориди лантану і кобальту) та антагоніста кальмодуліну (хлорпромазин) на генерацію АФК, інтенсивність ПОЛ і активність ферментів, причетних до утворення АФК, в колеоптилях пшениці, які обробляли екзогенною СК. Всі антагоністи кальцію пригнічували прояви окиснювального стресу,

спричинюваного дією СК. Так, у колеоптилях пшениці, оброблених СК у поєднанні з верапамілом або хлорпромазином, на відміну від зразків, оброблених лише СК, не відбувалося активації утворення  $O_2^-$  (рис. 7). Водночас нагрівання колеоптилів викликало тенденцію до посилення генерації супероксидного радикала в усіх варіантах досліду за винятком варіанта з СК.

**Рис. 7.** Генерація супероксиду (% до контролю без нагрівання) колеоптилями пшениці за обробки СК, верапамілом, хлорпромазином та їх комбінацією. 1 – контроль (2%-на сахароза), 2 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК, 3 - 2%-на сахароза + 250 мкМ верапаміл, 4 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК + 250 мкМ верапаміл, 5 - 2%-на сахароза + 20 мкМ хлорпромазин, 6 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК + 20 мкМ хлорпромазин.

Верапаміл пригнічував спричинюване СК підвищення активності гваяколпероксидази в рослинних тканинах [Колупаєв и др., 2004]. Гваяколпероксидаза розглядається як фермент, причетний до генерації АФК, зокрема, супероксидного радикала [Shannon, 1986]. Знімаючи прояви окиснювального стресу, індукованого обробкою колеоптилів пшениці екзогенною СК, модифікатори кальцієвого статусу водночас нівелювали і позитивний вплив СК на теплостійкість рослинних клітин. Обробка колеоптилів верапамілом у досліджуваних концентраціях сама по собі дещо зменшувала їх виживання після ушкоджуючого нагрівання. Хлорид лантану і хлорпромазин істотно не впливали на теплостійкість відрізків колеоптилів. Водночас обидва блокатори кальцієвих каналів (верапаміл і  $LaCl_3$ ), а також антагоніст кальмодуліну хлорпромазин повністю нівелювали підвищення теплостійкості колеоптилів, індуковане СК (рис. 8).

**Рис. 8.** Вплив СК, верапамілу, хлориду лантану і хлорпромазину та їх комбінації на виживання колеоптилів пшениці після ушкоджуючого нагрівання (43,5°C, 10 хв). 1 – контроль (2%-на сахароза), 2 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК, 3 - 2%-на сахароза + 250 мкМ верапаміл, 4 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК + 250 мкМ верапаміл, 5 - 2%-на сахароза + 1 мМ  $LaCl_3$ , 6 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК + 1 мМ  $LaCl_3$ , 7 - 2%-на сахароза + 20 мкМ хлорпромазин, 8 - 2%-на сахароза + 10 мкМ СК + 20 мкМ хлорпромазин.

Отже, одержані результати свідчать про участь іонів кальцію і кальмодуліну у розвитку окиснювального спалаху, індукованого СК. Гіпотетичний механізм індукування саліцилатом окиснювального стресу представлений на рис. 9. Одним із шляхів впливу СК на про-/антиоксидантний статус клітин може бути безпосереднє інгібування каталази [Chen et al., 1993, 1997]. На прикладі колеоптилів пшениці нами показано, що концентрація СК 10 мкМ цілком достатня для інгібування каталази *in vitro* [Колупаєв та ін., 2006]. Інгібування каталази призводить до підвищення концентрації пероксиду водню. Транзиторне збільшення вмісту внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  під впливом нагромадженого пероксиду водню може бути важливою складовою окиснювального стресу. Інший шлях індукування саліцилатом окиснювального



стресу і захисних реакцій, ймовірно, полягає в активації (посиленні синтезу) супероксид-генеруючих ферментів, таких як фенолпероксидази [Shannon, 1986] і НАДФН-оксидаза [Тарчевский, 2002]. Прикметно, що як пероксидаза [Кутузова, Угарова, 1981], так і НАДФН-оксидаза [Keller et al., 1998] мають  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі ділянки. Підвищення активності НАДФН-оксидази і фенолпероксидаз може посилювати генерацію супероксиду. Останній, як відомо, під впливом СОД перетворюється на стабільну АФК – пероксид водню. Важливо, що екзогенна СК здатна підвищувати активність цього ферменту. Нами встановлено, що за обробки колеоптилів СК в них не лише тимчасово знижувалася активність каталази і підвищувалася активність пероксидази, а й мало місце істотне зростання активності СОД [Колупаєв, 2007]. На цьому тлі зростав вміст пероксидів в тканинах. Напевно, пероксиди, накопичувані в тканинах колеоптилів під дією СК, беруть безпосередню участь в процесі ПОЛ, адже СК викликала також тимчасове нагромадження продуктів ПОЛ (див. рис. 3).

**Рис. 9.** Можливі механізми індукування окиснювального стресу саліциловою кислотою. ГПО – гваяколпероксидаза, КМ – кальмодулін, СК – саліцилова кислота, СОД – супероксиддисмутаза, “+” – посилення, “-” – пригнічення.

Продукти ПОЛ і самі по собі АФК, зокрема, пероксид водню, після досягнення певних концентрацій здатні впливати на експресію різних генів, у т.ч. викликати активацію генів антиоксидантного захисту [Neill et al., 2002] та індукувати розвиток інших захисних реакцій.

**Сумісний вплив іонів кальцію і пероксиду водню на окиснювальний метаболізм і теплостійкість рослинних клітин.** Нами показана здатність іонів кальцію спричиняти ефект окиснювального стресу і ймовірна роль цього явища у запуску адаптивних реакцій рослин. Водночас в літературі є дані і про посилення теплового ушкодження клітин в суспензійній культурі *Beta vulgaris* при підвищенні концентрації іонів кальцію в середовищі, яке в таких експериментальних умовах спричиняло збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі [Бияшева и др., 1993]. Ймовірно, характер ефектів екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  за дії стресорів на рослинні об'єкти може визначатися здатністю клітин контролювати кальцієвий гомеостаз, що, в свою чергу, певною мірою залежить від про-/антиоксидантного статусу. Так, є відомості про підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі рослинних клітин під впливом екзогенного  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Logan, Knight, 2003]. Показано, що  $\text{O}_2^{\cdot-}$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$  можуть бути фізіологічними модуляторами транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних компартментів [Rentel, Knigh, 2000]. Цілком можливо, що за певних обставин саме через порушення кальцієвого гомеостазу і надмірне надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль відбувається розвиток некерованого окиснювального стресу.

Водночас вплив екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  у поєднанні з прооксидантами на стійкість рослинних об'єктів до абіотичних стресорів спеціально не досліджувався. Тому ми вивчали комбінований вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і АФК

(пероксиду водню) на теплостійкість колеоптилів пшениці та показники, що характеризують виникнення окиснювального стресу.

**Рис. 10.** Вміст ТБК-активних продуктів (нмоль/г сухої речовини) в колеоптилях пшениці за обробки хлоридом кальцію, пероксидом водню і блокатором кальцієвих каналів. *а* – одразу після обробки ефекторами; *б, в* – відповідно через 1 і 24 год після припинення обробки ефекторами (перенесення на 2 %-ний розчин сахарози); *г, д* – відповідно через 1 і 24 год після нагрівання при 43,5 °С. 1 – контроль (2%-на сахароза), 2 – 2%-на сахароза + CaCl<sub>2</sub> (5 мМ), 3 – 2%-на сахароза + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), 4 – 2%-на сахароза + CaCl<sub>2</sub> (5 мМ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), 5 – 2%-на сахароза + CaCl<sub>2</sub> (5 мМ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ) + LaCl<sub>3</sub> (1 мМ).

Передобробка колеоптилів як Ca<sup>2+</sup>, так і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а також їх комбінацією викликала підвищення вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 10, *а*). Додавання блокатора кальцієвих каналів хлориду лантану в середовище інкубації колеоптилів спричиняло значне зниження нагромадження продуктів ПОЛ. Перенесення колеоптилів на середовище без добавок поступово нівелювало прояв ефектів в усіх варіантах, крім випадку з комбінованою обробкою Ca<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 10, *б, в*). У варіанті з одночасною обробкою колеоптилів Ca<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і La<sup>3+</sup> мала місце тенденція до збільшення вмісту продукту ПОЛ, хоча він все одно залишався нижчим від контролю.

Нагрівання викликало підвищення вмісту ТБК-активних продуктів (в основному малоновий діальдегід – МДА) в контролі. У варіантах з обробкою колеоптилів окремо іонами Ca<sup>2+</sup> та пероксидом водню через 1 год після нагрівання також відбувалося підвищення вмісту МДА, але через 24 год після нагрівання в цих варіантах вміст продукту ПОЛ знижувався (рис. 10, *г, д*). Іншою була картина у разі комбінованої обробки колеоптилів Ca<sup>2+</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. У даному випадку найбільших значень вміст МДА досягав через 24 год після нагрівання. Цей показник значно перевищував відповідні величини з окремою обробкою зразків тільки Ca<sup>2+</sup> або лише H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Додавання La<sup>3+</sup> в суміш Ca<sup>2+</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пригнічувало нагромадження МДА, яке мало місце через 1 год після нагрівання, але через 24 год подібний ефект був менш помітним.

Як уже зазначалося, обробка рослинних тканин окремо іонами кальцію та пероксидом водню підвищувала їх теплостійкість. Водночас обробка сумішшю H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та CaCl<sub>2</sub>, викликаючи незворотний окиснювальний стрес, знижувала показники виживання колеоптилів після їх нагрівання [Колупаєв, Карпець, 2007]. Розвиток окиснювального стресу, спричинений комбінованою обробкою Ca<sup>2+</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, гальмувався блокатором кальцієвих каналів La<sup>3+</sup>. Це може свідчити про причетність кальцію до розвитку пошкоджень клітин колеоптилів. Розвиток некерованого окиснювального стресу за обробки колеоптилів іонами кальцію та пероксидом водню, ймовірно, пов'язаний із синергічним посиленням їх ефектів. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і продукти ПОЛ у присутності кальцію могли спричинити надмірне його надходження в клітини шляхом відкриття кальцієвих каналів та посилення неспецифічного проникнення через мембрани (ефект пероксидів ліпідів як іонофорів). Надлишок кальцію в цитозолі міг бути причиною подальшої активації ферментів, що генерують утворення АФК. Таким чином, довготривале

підвищення концентрації кальцію в цитозолі через надмірне посилення утворення АФК або іншим шляхом, очевидно, здатне посилювати пошкодження клітин.

### АКТИВАЦІЯ СИСТЕМИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ІНДУКТОРАМИ ОКИСНЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ

Для оцінки стану ферментативної антиоксидантної системи ми аналізували активність СОД і каталази. Вони є ключовими в системі антиоксидантного захисту, присутні в різних компартментах рослинних клітин [Scandalios, 2005]. Важливою особливістю даних ферментів є відсутність потреби в кофакторах, що зумовлює певну автономність їх роботи, незалежність від функціонування інших клітинних структур [Зенков и др., 2003], а отже, дозволяє однозначно інтерпретувати отримувані результати. Крім того, відомо, що СОД і каталаза працюють зазвичай як єдина система [Байляк и др., 2006].

У зв'язку з викладеним ми вважали за доцільне встановити можливість модифікації активності СОД і каталази прямою дією АФК (пероксид водню), а також іонами кальцію як ефекторами, що спричиняють окиснювальний стрес; дослідити, як позначиться передобробка рослинних об'єктів агентами окиснювального стресу на функціонуванні антиоксидантних ферментів за наступної дії потенційно летального теплового стресу; та, використовуючи антиоксиданти, встановити залежність індукції антиоксидантних ферментів від наявності АФК в тканинах.

Передобробка колеоптилів пшениці пероксидом водню підвищувала активність СОД, більш помітним це підвищення було після нагрівання [Колупаєв, Карпець, 2007].

Передобробка відрізків пероксидом водню підвищувала й активність каталази в них (рис. 11). Наступне їх перенесення на розчин сахарози без додавання  $H_2O_2$  призводило до поступового зниження активності ферменту практично до рівня контролю (рис. 11, порівняти криві 1, 3 і 5). Через 1 год після нагрівання активність каталази істотно не змінювалася в усіх варіантах. А через 3 год після дії температури  $43^{\circ}C$  відбувалося незначне підвищення активності ферменту в контролі. У варіанті з обробкою  $H_2O_2$  (особливо 10 мМ) активність ферменту зростала і значно перевищувала відповідний контроль (рис. 11). До кінця спостережень (через 24 год після нагрівання) активність ферменту в усіх варіантах трохи знижувалася, однак у колеоптилях, оброблених  $H_2O_2$ , була вищою від контролю.

**Рис. 11.** Активність каталази ( $E$ , ммоль  $H_2O_2$  / (хв·г сух. речовини)) в колеоптилях пшениці за обробки екзогенним пероксидом водню і дії ушкоджуючого нагрівання. 1 – 2% сахароза (контроль), без нагрівання; 2 – 2% сахароза, після нагрівання при  $43^{\circ}C$ , 10 хв; 3 – 2% сахароза + 1 мМ  $H_2O_2$ , без нагрівання; 4 – 2% сахароза + 1 мМ  $H_2O_2$ , після нагрівання при  $43^{\circ}C$ , 10 хв; 5 – 2% сахароза + 10 мМ  $H_2O_2$ , без нагрівання; 6 – 2%

сахароза + 10 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, після нагрівання при 43<sup>0</sup>С. Стрілкою вказано момент початку 10 хвилинного нагрівання.

Можна припустити, що окиснювальний стрес, спричинюваний дією Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, слугував сигналом для активації експресії генів антиоксидантних ферментів. Ефект індукування синтезу СОД і каталази екзогенним Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> доведений прямими методами на прикладі дріжджів [Байляк и др., 2006]. Проте необхідно наголосити, що підвищення активності СОД в рослинах у відповідь на дію пероксиду водню не є типовим явищем. Так, відомо, що Cu/Zn-СОД – одна з поширених форм ферменту в евкаріот - інактивується Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> *in vitro* [Alscher et al., 2002]. Але злакові можуть містити певний пул Mn-СОД [Dat et al., 2000], яка є стійкою до пероксиду водню [Alscher et al., 2002]. Крім того, ймовірно, пероксид водню, інгібуючи певні форми СОД *in vitro*, здатний активувати синтез ферменту *in vivo*.

**Рис. 12.** Активність каталази (Е, ммоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/(хв·г маси сух. речовини)) в коренях проростків пшениці за обробки хлоридом кальцію, антиоксидантом та дії ушкоджуючого нагрівання.

*a* – через 4 год від початку обробки СаСl<sub>2</sub> або через 6 год від початку обробки іонолом; *b* – через 24 год від початку обробки СаСl<sub>2</sub> або через 26 год від початку обробки іонолом; *в, г* – відповідно через 1 і 24 год після нагрівання проростків за 44,5<sup>0</sup>С, *д* – через 24 год після перенесення проростків, які не нагрівали, на дистильовану воду. *1* – контроль, *2* - СаСl<sub>2</sub> (50 мМ), *3* – іонол (90 мкМ), *4* - СаСl<sub>2</sub> (50 мМ) + іонол (90 мкМ).

Підвищення активності СОД і каталази відбувалося в колеоптилях та інтактних проростках пшениці і під впливом екзогенного кальцію, який також спричинював прояви ефектів окиснювального стресу [Колупаев и др., 2005, Колупаев, Карпец, 2006]. Прикметно, що викликане кальцієм підвищення активності каталази в коренях проростків пшениці майже повністю знімалося антиоксидантом іонолом, що можна вважати свідченням причетності АФК до індукування каталази (рис. 12). Важливо також, що у рослинних об'єктах, оброблених іонами кальцію перед нагріванням, зберігалася більш висока порівняно з контролем активність каталази. Характер змін активності антиоксидантних ферментів в рослинах, оброблених індукторами окиснювального стресу, узгоджується з даними щодо підвищення їх виживання після дії стресорів. Тобто агенти окиснювального стресу спричиняють ефект передаптації, "готуючи" антиоксидантну систему до функціонування за умов дії ушкоджуючого стресора (в наших експериментах нагрівання, яке викликає загибель частини рослинних об'єктів).

Підвищення активності антиоксидантних ферментів спричиняли не лише агенти окиснювального стресу, а й речовини, які традиційно вважаються антиоксидантами, наприклад, ДМСО. Нами встановлено підвищення активності каталази в проростках пшениці під впливом ДМСО. Такий ефект мав місце лише в системі *in vivo* і не відтворювався *in vitro* при додаванні ДМСО до екстракту

ферменту [Колупаєв, Карпець, 2007]. Питання активації антиоксидантних ферментів ДМСО потребує спеціального вивчення. Не виключено, що ця сполука на певних етапах виявляє малопомітний прооксидантний ефект або ж здатність індукувати антиоксидантні ферменти є його специфічною особливістю.

### **ОКИСНЮВАЛЬНИЙ СТРЕС І НАГРОМАДЖЕННЯ РОСЛИНАМИ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК**

Адаптація рослин до стресорів включає в себе нагромадження різноманітних низькомолекулярних сполук, для яких властива поліфункціональність дії. До таких сполук належать, зокрема, пролін та розчинні вуглеводи. Ми порівнювали вплив СК, пероксиду водню й кальцію на нагромадження проліну в рослинних тканинах. Всі три агенти окиснювального стресу викликали підвищення вмісту проліну в рослинних тканинах [Колупаєв, Акініна, 2005, Колупаєв и др., 2005].

СК спричинювала підвищення вмісту проліну в коренях проростків пшениці за участю АФК, адже антиоксидант іонол знімав ефект нагромадження проліну, спричинюваний СК (рис. 13). У пагонах виявлялася лише тенденція до незначного підвищення вмісту проліну під впливом СК. В інших дослідних варіантах вміст проліну не відрізнявся від контролю. Сольовий стрес викликав нагромадження проліну в коренях проростків усіх варіантів досліду. Проте найбільші абсолютні значення спостерігалися у варіанті з СК. У випадку з іонолом та комбінацією іонолу й СК вміст проліну в коренях не відрізнявся від відповідного (стресового) контролю (див. рис. 13). У пагонах після дії стресора вміст проліну незначною мірою знижувався в усіх варіантах досліду. Найбільші абсолютні значення при цьому залишалися у варіанті з СК, хоча різниця порівняно з контролем була недостовірною.

**Рис. 13.** Вміст проліну в коренях (А) і пагонах (Б) проростків пшениці.  
1 – контроль, 2 - СК (1 мкМ), 3 – іонол (90 мкМ), 4 - СК (1 мкМ) + іонол (90 мкМ).  
Світлі і заштриховані стовпчики – відповідно до і після дії 4%-ного NaCl.

СК підвищувала вміст суми розчинних вуглеводів і відновних цукрів у коренях проростків (табл. 2). Іонол не впливав на загальний вміст цукрів у коренях, хоча й дещо підвищував вміст відновних цукрів як сам по собі, так і в комбінації з СК. Але цей ефект поступався дії однієї СК. Крім того, іонол знімав підвищення сумарного вмісту розчинних вуглеводів у коренях, спричинюване СК. У пагонах підвищення сумарного вмісту цукрів, а також вмісту відновних цукрів під впливом СК було менш істотним, ніж у коренях, хоча й достовірним (табл. 2). Іонол, а також комбінація СК та іонолу не впливали на вміст розчинних вуглеводів у пагонах за відсутності дії стресового чинника.

Після сольового стресу загальний вміст розчинних вуглеводів у коренях зростав в усіх варіантах, вміст відновних цукрів підвищувався лише в контролі. При цьому найбільші абсолютні значення сумарного вмісту розчинних

вуглеводів і вмісту відновних цукрів спостерігалися у варіанті з СК. У пагонах після сольового стресу загальний вміст цукрів в контролі знижувався, а у варіантах з СК, іонолом та їх комбінацією істотно не змінювався. Вміст відновних цукрів у пагонах після дії сольового стресу у контролі істотно не змінювався, але зростав в усіх дослідних варіантах (див. табл. 2). Особливо помітним було це зростання у варіанті з СК.

Таблиця 2

## Розчинні вуглеводи (мг/г сухої речовини) в коренях і пагонах проростків пшениці

Варіант досліджу	До стресу		Після дії 4%-ного розчину NaCl	
	Сумарний вміст розчинних вуглеводів	Вміст відновних цукрів	Сумарний вміст розчинних вуглеводів	Вміст відновних цукрів
Корені				
Контроль	158±5	51,5±1,7	186±5	66,4±2,1
СК (1 мкМ)	226±8	83,0±2,7	279±9	84,5±3,2
Іонол (90 мкМ)	159±9	62,4±1,9	225±8	59,0±4,9
СК (1 мкМ) + Іонол (90 мкМ)	163±7	69,5±3,4	219±8	63,2±4,0
Пагони				
Контроль	416±12	208±7	341±13	223±11
СК (1 мкМ)	525±22	236±6	499±18	363±8
Іонол (90 мкМ)	428±17	215±7	432±16	332±9
СК (1 мкМ) + Іонол (90 мкМ)	400±19	204±9	452±14	320±10

Отже, обробка проростків пшениці СК призводила до нагромадження проліну та розчинних вуглеводів у коренях і (меншою мірою) у пагонах. Такі ефекти СК пригнічувалися антиоксидантом іонолом. При цьому антиоксидант практично повністю знімав захисний ефект СК за сольового стресу. З отриманих результатів випливає, що індуковане СК нагромадження проліну і цукрів в коренях і пагонах належить до реакцій, причетних до підвищення солестійкості проростків пшениці. Індуковане саліцилатом нагромадження протекторних речовин, ймовірно, відбувається за участю АФК. Важливо, що антиоксидант також знімав ефект нагромадження проліну в колеоптилях пшениці, спричинюваний екзогенним кальцієм [Колупаев и др., 2007].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Отримані результати узагальнені в схемі, представленій на рис. 14. Обробка рослинних об'єктів АФК або індукторами їх утворення спричинювала оборотні (тимчасові) прояви окиснювального стресу, що призводило до активації захисних реакцій - нагромадження низькомолекулярних протекторів та підвищення активності антиоксидантних ферментів. Рослини, передадаптовані дією АФК або агентів їх утворення, мали істотно вищу стійкість до абіотичних

стресорів. Обробка рослинних об'єктів антиоксидантами сама по собі і при застосуванні в комбінації з агентами окиснювального стресу призводила до зменшення вмісту в тканинах АФК та продуктів ПОЛ. Водночас антиоксиданти нівелювали спричинюване агентами окиснювального стресу зростання вмісту низькомолекулярних протекторів; менш помітними були зміни активності антиоксидантних ферментів. Необхідно наголосити, що самі по собі антиоксиданти (принаймні у дозах, які нами використовувалися) призводили до деякого підвищення стійкості рослин. Такий ефект напевно пов'язаний з прямою антиоксидантною дією, яка реалізується за наявності пулу антиоксиданту в тканинах. Комбінована дія антиоксидантів (іонол, глутатіон) з індукторами окиснювального стресу призводила до нівелювання позитивного впливу останніх на стійкість рослин [Колупаєв и др., 2004, Колупаєв, Карпець, 2006, 2007], що можна розглядати як свідчення участі АФК в індукуванні захисних реакцій.

**Рис. 14.** Метаболічна і фізіологічна відповідь рослинних об'єктів на дію індукторів окиснювального стресу, антиоксидантів і блокаторів кальцієвих каналів

Вплив блокаторів кальцієвих каналів та їх комбінації з агентами окиснювального стресу був значною мірою подібним до дії антиоксидантів, що свідчить про участь цитозольного кальцію в активації утворення АФК і процесів ПОЛ. Як показали наші дослідження, підвищення теплостійкості рослин, спричинюване пероксидом водню, СК та іонами кальцію, усувалося блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [Колупаєв и др., 2002, 2004, Колупаєв, Акініна, 2005]. Більше того, блокатори кальцієвих каналів і антагоніст кальмодуліну хлорпромазин нівелювали ефект окиснювального стресу, який викликала обробка рослинного матеріалу СК. Таким чином, для істотного посилення утворення АФК необхідні підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію та наявність кальмодуліну в активній формі [Колупаєв, Карпець, 2006]. Блокатор різних типів кальцієвих каналів хлорид лантану пригнічував процес ПОЛ в колеоптилях пшениці, активований екзогенними пероксидом водню, СК і кальцієм, і при цьому зменшував їх захисний вплив на рослинні об'єкти, що зазнавали нагрівання [Колупаєв та ін., 2005, Колупаєв, 2007].

На підставі отриманих експериментальних даних та літературних відомостей нами складено гіпотетичну схему індукування адаптивних реакцій рослин (рис. 15).

**Рис. 15.** Можливий механізм індукування адаптивних реакцій рослин екзогенними іонами  $\text{Ca}^{2+}$  та пероксидом водню. ФЛА<sub>2</sub> – фосфоліпаза А<sub>2</sub>, ЛОГ – ліпоксигеназа.

Як уже зазначалося, процеси, що забезпечують підвищення стійкості рослинних об'єктів до дії стресорів, можуть бути активовані як екзогенним кальцієм, так і АФК ( $\text{H}_2\text{O}_2$  або сполуками, що спричиняють його нагромадження

в тканинах, наприклад, в наших експериментах СК або АБК). При цьому ефекти зміни кальцієвого статусу і про-/антиоксидантної рівноваги є взаємозалежними. Так, екзогенний  $\text{Ca}^{2+}$  активує гваяколпероксидазу (її іоннозв'язана форма причетна до утворення АФК) [Колупаев и др., 2005] і, ймовірно, НАДФН-оксидазу [Keller et al., 1998], що призводить до збільшення вмісту АФК в тканинах (див. рис. 4). Це, в свою чергу, напевно викликає підвищення вмісту цитозольного кальцію, адже відомо, що АФК сприяють відкриттю потенціалзалежних кальцієвих каналів [Mori, Schroeder, 2004]. Зміна кальцієвого статусу клітин здатна спричинити додаткову активацію АФК-генеруючих ферментів, а, отже, посилювати первинний вплив кальцію на нагромадження АФК.

Зовнішній пероксид водню або агенти його утворення також, ймовірно, здатні сприяти надходженню кальцію в клітини, адже більшість ефектів індукторів окиснювального стресу в наших експериментах інгібувалася блокаторами кальцієвих каналів [Kolupaev, 2007]. Підвищення концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , яке може бути викликане як дією екзогенних АФК, так і самого кальцію, призводить до посилення пероксидації ліпідів [Колупаев и др., 2005, Колупаев та ін., 2005], що, ймовірно, пов'язано з його впливом на активність фосфоліпази  $\text{A}_2$  та ліпоксигенази [Leshem, 1987]. АФК, кальцій і продукти ПОЛ через низку посередників, очевидно, викликають зміни активності ряду протеїназ і протеїнофосфатаз [Kaur, Gupta, 2005], що, в свою чергу, спричиняє зміни стану факторів регуляції транскрипції і зміни в експресії генів. Фосфорилування протеїназ може бути індуковане і безпосередньою дією АФК [Scandalios, 2005]. Показано також, що транскрипт-фактори деяких стресових білків можуть модифікуватися прямою дією  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Miller, Mittler, 2006]. Нами доведена участь як АФК, так і кальцію в індукуванні антиоксидантних ферментів – СОД [Колупаев и др., 2005, Колупаев, Карпец, 2007] і каталази (рис. 11, 12), а також нагромадження проліну та розчинних вуглеводів [Колупаев и др., 2005, Колупаев та ін., 2007]. Необхідно наголосити, що підвищення стійкості рослинних об'єктів за дії екзогенної СК (агент окиснювального стресу) також відбувалося за обов'язковою участю як АФК, так і кальцію (див. рис. 5-8). Можна припустити, що спектр реакцій, індукованих АФК та іонами кальцію і важливих для розвитку стійкості значно ширший від запропонованого нами сценарію розвитку подій. Розширення спектра конкретних реакцій, індукованих зміною окиснювально-відновного балансу і кальцієвого статусу рослинних клітин, і важливих для стійкості до абіотичних стресорів може бути напрямом подальших досліджень.

Таким чином, є підстави стверджувати, що процес індукування стійкості до абіотичних стресорів відбувається лише за умови взаємопов'язаного зростання вмісту АФК в тканинах і проникнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль. Отже, АФК і кальцій можна вважати взаємозалежними месенджерами єдиної мережі передачі стресових сигналів в рослинних клітинах. На різних етапах її функціонування можливе взаємне підсилення дії цих месенджерів.

Результати проведених досліджень можуть стати основою для розробки нових підходів захисту рослин від окиснювальних ушкоджень. В контексті



експериментально доведеної нами можливості індукування антиоксидантної системи рослин за допомогою екзогенних агентів окиснювального стресу набуває актуальності пошук прийомів, які б дозволили підвищувати активність власної системи захисту рослин від надлишку АФК. За таких обставин з'являється можливість індукування не лише антиоксидантної системи як такої, а й цілої низки інших “корисних” реакцій, здатних зробити рослини “компетентними” для адекватного реагування на стресори різної природи. При цьому для скринінгу перспективних протекторних препаратів як інформативні критерії можуть використовуватися динамічні зміни комплексу показників про-/антиоксидантної рівноваги після обробки рослин досліджуваними сполуками і наступної дії стресорів.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення важливої наукової проблеми в галузі фізіології стійкості рослин. Сформульовано положення, відповідно до якого керований окиснювальний стрес може виступати індуктором адаптивних реакцій рослинного організму, що призводять до підвищення стійкості до абіотичних стресорів, а не чинником пошкодження. Досліджені механізми виникнення в рослинних об'єктах ефекту окиснювального стресу за дії екзогенних АФК, СК та іонів кальцію. Запропоновано й експериментально обґрунтовано гіпотетичний механізм зв'язків між АФК та іонами кальцію як інтермедіатами запуску стресових і адаптивних реакцій рослин. Згідно з ним індукування стійкості відбувається за умови взаємозалежного зростання вмісту АФК і проникнення іонів кальцію в цитозоль. Визначені конкретні реакції, фізіологічно важливі для стійкості рослин до абіотичних стресорів, що розвиваються внаслідок керованого окиснювального стресу. До таких реакцій належать, зокрема, активація ферментативної антиоксидантної системи та нагромадження низькомолекулярних сполук-протекторів поліфункціональної дії.

1. Переадаптація рослин екзогенними чинниками (сигнальні сполуки та АБК) призводить до АФК- і кальційзалежної стимуляції комплексу реакцій, в результаті яких формується здатність рослин до адекватної відповіді на дію ушкоджуючих чинників (біохімічної і фізіологічної адаптації).
2. Вплив на інтактні рослини або їх ізольовані органи екзогенних пероксиду водню, СК, АБК та іонів кальцію спричиняє ефект окиснювального стресу (збільшення вмісту ендогенних АФК в тканинах та посилення інтенсивності ПОЛ), який за дії певних доз ефекторів є керованим і оборотним.
3. Агенти окиснювального стресу (екзогенний пероксид водню або індуктори утворення АФК – СК, АБК,  $\text{Ca}^{2+}$ ) підвищують стійкість рослинних об'єктів до дії гіпертермії і високих концентрацій  $\text{NaCl}$ . Такі ефекти пригнічуються антиоксидантом іонолом, що є прямим свідченням участі АФК в переадаптації рослин до дії абіотичних стресорів.

4. Нагромадження АФК і розвиток окиснювального стресу у рослин під впливом СК і  $\text{Ca}^{2+}$  зумовлені модифікацією активності про-/антиоксидантних ферментів, зокрема, пероксидази, СОД і каталази. Виникнення окиснювального стресу під впливом іонів кальцію відбувається за зростання активності гваяколпероксидази, передусім її іоннозв'язаної форми. Індукування окиснювального стресу СК включає в себе інгібування каталази та підвищення активності гваяколпероксидази при одночасному зростанні активності СОД, що призводить до збільшення вмісту в тканинах пероксиду водню.
5. Дія екзогенних пероксиду водню, СК та іонів кальцію як індукторів окиснювального стресу гальмується блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, що свідчить про значення надходження іонів кальцію в цитозоль в процесах генерації АФК та пероксидації ліпідів.
6. Одночасна обробка рослинних тканин екзогенними кальцієм і пероксидом водню в нетоксичних концентраціях спричиняє розвиток некерованого окиснювального стресу, що має місце після дії ушкоджуючого чинника (нагрівання). АФК і продукти ПОЛ посилюють надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль, а іони кальцію сприяють розвитку окиснювального стресу. Підтримання кальцієвого гомеостазу - важливий чинник регулювання окиснювально-відновного балансу в рослинних клітинах.
7. Передстресова обробка рослинних тканин індукторами утворення АФК ( $\text{Ca}^{2+}$ , СК або безпосередньо пероксид водню в нетоксичних концентраціях) зменшує інтенсивність ПОЛ за дії ушкоджуючих чинників (нагрівання, дія  $\text{NaCl}$ ).
8. Обробка рослин агентами окиснювального стресу призводить до активації ферментативної системи антиоксидантного захисту за умов дії на рослини ушкоджуючих стресових чинників. Посилення активності цієї системи усувається антиоксидантами та інгібіторами білкового синтезу, що свідчить про участь АФК в індуванні синтезу антиоксидантних ферментів в рослинних тканинах.
9. Обробка екзогенними антиоксидантами (іонол, ДМСО) підвищує стійкість рослин до абіотичних стресорів. Позитивний ефект ДМСО, на відміну від іонолу, що діє як "пастка" вільних радикалів, зумовлений його впливом на активність антиоксидантних ферментів.
10. Агенти окиснювального стресу здатні індукувати нагромадження в рослинах поліфункціональних низькомолекулярних протекторів – проліну і розчинних вуглеводів. Ці ефекти пригнічуються екзогенними антиоксидантами, що свідчить про участь АФК у формуванні таких захисних реакцій.

## **СПИСОК ОСНОВНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Колупаєв Ю.Є. Вплив екзогенних низькомолекулярних сполук на колеоптилі пшениці за умов сольового стресу // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – Т. 26, № 1. – С. 56-61.
2. Колупаєв Ю.Є. Низькомолекулярні сполуки азоту в рослинах за умов стресів: особливості метаболізму та можливе фізіологічне значення // Физиология и биохимия культ. растений. – 1995. – Т. 27, № 5/6. – С. 324-335.
3. Колупаєв Ю.Є. Вплив диметилсульфоксиду на стійкість колеоптилів пшениці до теплового стресу // Физиология и биохимия культ. растений. – 1997. – Т. 29, № 4. – С. 265-270.
4. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Діденко С.Ю. Можливі механізми протекторної дії диметилсульфоксиду на рослинні тканини при жорсткому високотемпературному стресі // Биол. вестник. – 2000. – Т. 4, № 1-2. – С. 54-57.
5. Колупаєв Ю.Є. Реакція рослин на дію екстремальних факторів: неспецифічна складова та її фізіологічне значення // Физиология растений на межі тисячоліть / Голов. ред. В.В.Моргун. - К.: Фітосоціоцентр, 2001.- Т. 2. - С. 190-193.
6. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Акинина Г.Е. Действие  $\text{Ca}^{2+}$  на клетки колеоптилей озимой пшеницы в условиях высокотемпературного стресса // Вісн. Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. - 2002. - №9 (1). - С. 16-23.
7. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Влияние экзогенного кальция на интенсивность пероксидного окисления липидов в колеоптилях озимой пшеницы и их теплоустойчивость // Физиология и биохимия культ. растений. – 2003. – Т. 35, №1. – С. 68 – 74.
8. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В., Сирота Н.И. Индукция салициловой кислотой окислительного стресса и теплоустойчивости растительных клеток // Вісник Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. - 2004 – Вип. 1(4). - С. 40-47.
9. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Е., Карпець Ю.В., Паталах И.И. Зависимость влияния экзогенного салицилата на активность гваяколпероксидазы и теплоустойчивость колеоптилей пшеницы от состояния  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов // Вісник Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2004. – Вип.2(5). - С. 52-56.
10. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Е. Изменение теплоустойчивости растительных клеток, вызываемое модификаторами интенсивности окислительных процессов // Физиология и биохимия культ. растений. - 2005. - Т. 37, № 1.- С. 66-72.
11. Колупаєв Ю.Є., Акініна Г.Є. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на компоненти системи антиоксидантного захисту в колеоптилях пшениці за умов теплового стресу // Живлення рослин: теорія і практика / Голов. ред. В.В.Моргун. - К.: Логос, 2005. - С. 71-81.
12. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В. Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 227-232.

13. 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.
14. Колупаєв Ю.Є., Акініна Г.Є. Вплив саліцилової кислоти на теплостійкість колеоптилів пшениці у зв'язку зі змінами окислювального метаболізму // Физиология и биохимия культ. растений. - 2005. - Т. 37, № 6. - С. 524-529.
15. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Генерация активных форм кислорода колеоптилями пшеницы при индуцировании их теплоустойчивости ионами кальция и салициловой кислотой // Вісник Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. - 2005. – Вип.2 (7). - С. 22-28.
16. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Акинина Г.Є. Вплив саліцилової кислоти на активність каталази і гваяколпероксидази колеоптилів пшениці за умов теплового стресу // Физиология и биохимия культ. растений. - 2006. - Т. 38, № 4. - С. 317-323.
17. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Індукування саліциловою кислотою тепло- і солестійкості проростків *Triticum aestivum* L. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. – 2006. – Т. 63, № 4. – С. 558-565.
18. Колупаєв Ю.Є., Мусатенко Л.І., Косаківська І.В., Карпець Ю.В. Вплив саліцилової кислоти і фітогормонів на теплостійкість сім'ядолей *Cuscutis sativus* L. у зв'язку зі зрушеннями прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. – 2006. – Т. 63, № 6. – С. 837-843.
19. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Салицилатиндуцируемая генерация супероксида колеоптилями пшеницы зависит от кальциевого статуса их клеток // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 1 (8). – С. 51-57.
20. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Супрессия антиоксидантом ионолом повышения теплоустойчивости проростков пшеницы, индуцируемого ионами кальция // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.– 2006. – Вип. 2 (9). - С. 21-30.
21. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Сумісний вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та пероксиду водню на окислювальний метаболізм і теплостійкість колеоптилів пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 1. – С. 66-72.
22. Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.
23. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Активні форми кисню як посередники в індуванні теплостійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 242-248.
24. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Активність супероксиддисмутази і каталази у колеоптилях пшениці за дії пероксиду водню і нагрівання // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 319-325.
25. Колупаєв Ю.Є. Можлива роль супероксиддисмутази у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. – 2007. – Т. 64, № 2. – С. 270-278.

26. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Мусатенко Л.І. Участь активних форм кисню в індукованні солестійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // Доп. НАН України. – 2007. - № 6. – С. 154-158.
27. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Кальційзалежний вплив пероксиду водню на теплостійкість колеоптилів *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. – 2007. – Т. 64, № 5. – С. 713-719.
28. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В. Антиоксидантна дія диметилсульфоксиду на проростки пшениці за теплового стресу // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 2 (11). – С. 69-75.
29. Колупаєв Ю.Є. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень. – Х., 2001. – 171 с.
30. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Роль активних форм кисню в индуцируемому екзогенним кальцієм накопленні проліна в отрезках колеоптилей пшениці // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 122-125.
31. Kolupaev Yu.E. Effect of antimetabolites and dimethylsulphoxide on the vegetable cell resistance against potentially lethal stresses // Annual symposium Physical-chemical basis of plant physiology. 5-8 Feb., 1996, Penza: Abstracts. – Pushchino, 1996. – P. 99.
32. Колупаєв Ю.Є. Початкові стресові реакції рослинної клітини // Мат-ли XI з'їзду Укр. ботан. тов-ва, Харків, 25-27 вересня 2001 р.,- Х., 2001.- С. 170-171.
33. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Акинина Г.Є. Можливі механізми захисної дії  $\text{Ca}^{2+}$  на рослинні клітини за умов теплового стресу // Проблеми сучасної екології: Тези міжнар. конф. (Запоріжжя, 24-26 червня 2002 р.). – Запоріжжя, 2002.- С. 106.
34. Kolupaev Yu.Ye., Akinina G.Ye., Mokrousov A.V. The influence of exogenic of  $\text{Ca}^{2+}$  and salicylic acid on lipid peroxidation process in plant cells and their heat resistance // Actual problems of botany and plant physiology. – Saransk: The Mordovian N.P. Ogariov State University, 2004. – P. 120-121.
35. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Є., Мокроусов А.В. Модифікація показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і теплостійкості рослинних клітин екзогенним  $\text{Ca}^{2+}$  // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти. Тези Другої Міжнародної конференції. Львів, 18-21 серпня 2004 р.- Львів: Сполом, 2004.- С. 245.
36. Kolupaev Yu. Ye., Akinina G. Ye., Mokrousov A. V. Possible Mechanisms of Protective Effect of Salicylic Acid on Plant Cell under Heat Stress // Growth and Development of Plants. Theoretical and Practical Problems : Abstract of international scientific conference (Babtai, 7–9 June, 2004) . – Babtai : Lithuan. Inst. of Horticult., 2004. – P. 46-47.
37. Колупаєв Ю.Є., Акинина Г.Є., Карпець Ю.В. Кальций и клеточные механизмы устойчивости растений // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Мат-лы 8-й Международной научной экологической конференции, Белгород, 27-29 сентября 2004 г. - Белгород, 2004. - С. 90-91.

38. Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Сирота Н.И., Мокроусов А.В. Модификация теплоустойчивости растительных клеток салициловой кислотой и ее влияние на окислительный метаболизм // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Мат-лы 8-й Международной научной экологической конференции, Белгород, 27-29 сентября 2004 г. - Белгород, 2004.- С. 91-93.
39. Колупаев Ю.Є., Карпець Ю.В., Акініна Г.Є. Екзогенна саліцилова кислота як  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний індуктор окислювального стресу і теплостійкості рослинних клітин // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин // Мат-ли Всеукр. наук.-практ. конф., Дніпропетровськ, 5-6 квітня 2005 р. - Дніпропетровськ, 2005.- С. 27-28.
40. Акініна Г.Є., Карпець Ю.В., Сирота М.І., Колупаев Ю.Є. Саліцилова кислота індукує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний синтез пероксидази в колеоптилях пшениці // Укр. біохім. журн. – 2005. - Т. 77, № 5. - С. 133.
41. Колупаев Ю.Є., Карпець Ю.В. Роль іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у розвитку окиснювального стресу в рослинних клітинах // Мат-ли XII з'їзду Укр. ботан. тов-ва, Одеса, 15-18 травня 2006 р. – Одеса, 2006. – С. 452-453.
42. Kolupaev Yu.Ye, Karpets Yu.V. Influence of salicylic and ionol on heat and salt resistance of wheat plantlets in connection with formation of reactive oxygen species // XV FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology: Book in Abstracts, Lyon, 17-21 July 2006. – Lyon, 2006. – P. 167.
43. Колупаев Ю.Є. Супресія іонолом підвищення теплостійкості проростків пшениці, індукованого саліциловою кислоту // Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду, Харків, 24-27 жовтня 2006 р. – Х., 2006. – С. 79-80.
44. Карпець Ю.В., Колупаев Ю.Є. Можлива роль кальцієвого статусу рослинних клітин у виникненні саліцилатіндукованого „окиснювального спалаху” // Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду, Харків, 24-27 жовтня 2006 р. – Х., 2006. – С. 128-129.
45. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Генерация супероксидного радикала колеоптилями пшеницы при действии перекиси водорода и нагрева // Сучасні проблеми біології, екології та хімії: Міжнар. конф., 29 березня – 1 квітня 2007 р. – Запоріжжя, 2007. - Ч. 2. – С. 552-554.
46. Карпець Ю.В., Колупаев Ю.Є. Індукція теплостійкості різних видів рослин екзогенною саліциловою кислоту // Сучасні проблеми біології, екології та хімії: Міжнар. конф., 29 березня – 1 квітня 2007 р. – Запоріжжя, 2007. - Ч. 1. – С. 41-42.
47. Колупаев Ю.Є., Карпець Ю.В., Ястреб Т.О. Вплив диметилсульфоксиду на теплостійкість проростків пшениці у зв'язку з його антиоксидантними ефектами // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин. Мат-ли Всеукр. науково-практ. конф., Дніпропетровськ, 22-23 травня 2007 р. – Дніпропетровськ, 2007. – С. 68-69.
48. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Возможная роль активных форм кислорода в индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенным кальцием // Современная физиология растений: от молекул до экосистем.

- Мат-лы докл. Междунар. конф. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). – Сыктывкар, 2007. – Ч. 2. - С. 200-202.
49. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* Влияние салициловой кислоты на активность про/антиоксидантных ферментов в coleoptiles пшеницы и их теплоустойчивость // Современная физиология растений: от молекул до экосистем. Мат-лы докл. Междунар. конф. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). – Сыктывкар, 2007. – Ч. 2. - С. 198-200.
50. *Kolupaev Yu.* Probable mechanisms of the heat resistance induction of wheat coleoptiles by exogenous hydrogen peroxide // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти: Тези Третьої Міжнар. конф. – Львів, 2007. – С. 191.
51. *Kolupaev Yu., Karpets Yu., Kosakivska I., Musatenko L.* Salicylic acid increases the salt resistance of wheat plantlets with the participation of reactive oxygen species // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти: Тези Третьої Міжнар. конф. – Львів, 2007. – С. 192.
52. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Косаківська І.В.* Роль змін про-/антиоксидантної рівноваги і кальцієвого статусу рослинних клітин при індукуванні їх терморезистентності екзогенною салициловою кислотою // 2-ий з'їзд Українського товариства клітинної біології: Збірник тез. – К., 2007. - С. 227.

### АНОТАЦІЯ

**Колупаев Ю.Е. Фізіолого-біохімічні механізми формування адаптивних реакцій рослин: роль активних форм кисню та іонів кальцію. – Рукопис**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. – Київ, 2007

Сформульовано положення, згідно з яким керований окиснювальний стрес може виступати індуктором адаптивних реакцій рослинного організму, що призводять до підвищення стійкості до абіотичних стресорів. Запропоновано й експериментально обґрунтовано гіпотетичний механізм взаємодії АФК та іонів  $\text{Ca}^{2+}$  як інтермедіатів запуску стресових і адаптивних реакцій рослин. Згідно з ним індукування стійкості відбувається за умови взаємозалежного зростання вмісту АФК і проникнення іонів кальцію в цитозоль.

Показано, що ефект підвищення стійкості рослин до абіотичних стресорів екзогенними салициловою та абсцизовою кислотами й іонами кальцію реалізується з участю АФК. Доведено, що у виникненні окиснювального стресу, індукованого дією на рослинні тканини екзогенними салициловою кислотою та пероксидом водню, задіяні кальцієві канали і кальмодулін.

Екзогенні індуктори окиснювального стресу здатні спричиняти підвищення активності антиоксидантних ферментів, особливо виразно цей ефект виявляється після ушкоджуючої дії стресорів. Обробка рослинних об'єктів агентами окиснювального стресу активує нагромадження поліфункціональних

низькомолекулярних протекторів (проліну та розчинних вуглеводів). Показано, що антиоксиданти пригнічують їх накопичення, індуковане дією саліцилової кислоти та іонів кальцію.

**Ключові слова:** активні форми кисню, кальцій, саліцилова кислота, окиснювальний стрес, адаптивні реакції, стійкість, рослини.

### АННОТАЦИЯ

**Колупаев Ю.Е. Физиолого-биохимические механизмы формирования адаптивных реакций растений: роль активных форм кислорода и ионов кальция. – Рукопись**

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.12 – физиология растений. Институт физиологии растений и генетики НАН Украины. – Киев, 2007

Сформулировано положение, согласно которому управляемый окислительный стресс может выступать индуктором адаптивных реакций растительного организма, которые приводят к повышению устойчивости к абиотическим стрессорам. Предложен и экспериментально обоснован гипотетический механизм взаимодействия АФК и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  как интермедиатов запуска стрессовых и адаптивных реакций растений, в соответствии с которой индуцирование устойчивости происходит при условии взаимозависимого увеличения содержания АФК в тканях и проникновения ионов кальция в цитозоль.

Показано, что эффект повышения устойчивости растений к абиотическим стрессорам экзогенными салициловой и абсцизовой кислотами и ионами кальция реализуется с участием АФК. Доказано, что в возникновении окислительного стресса, индуцированного действием на растительные ткани экзогенными салициловой кислотой и пероксидом водорода, задействованы кальциевые каналы и кальмодулин.

Экзогенные индукторы окислительного стресса способны вызывать повышение активности антиоксидантных ферментов, особенно выразительно этот эффект проявляется после повреждающего действия стрессоров. Обработка растительных объектов агентами окислительного стресса активизирует накопление полифункциональных низкомолекулярных протекторов (пролина и растворимых углеводов). Показано, что антиоксиданты угнетают их накопление, индуцированное действием салициловой кислоты и ионов кальция.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, кальций, салициловая кислота, стресс, адаптивные реакции, устойчивость, растения.

### SUMMARY

**Kolupaev Yu.Ye. Physiology-biochemical mechanisms of formation of plants adaptive reactions: role of reactive oxygen species and calcium ions. – Manuscript**



Thesis for a Doctor's degree of Biological science, specialty 03.00.12 - Plant Physiology. Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine. - Kyiv, 2007

The thesis is devoted to the research of role and ways of reactive oxygen species (ROS) and calcium ions participation in development of plants resistance against abiotic stressors. The statement according to which the controlled oxidative stress can act not as a factor of damage, but as an inducer of adaptive reactions of plant organism which leads to the increase of the resistance against abiotic stressors (hyperthermia, salts action and so forth) is formulated. The hypothetical mechanism of interaction the ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  ions as the intermediats, initiating plants stress and adaptive reactions is suggested and experimentally grounded. According to this the resistance induction occurs under the condition of the interdependent ROS contents increase in tissues and penetrations of calcium ions into a cytosol.

It is found, that the effect of plants resistance induction against abiotic stressors (damaging heating, NaCl action) by exogenous calcium ions, salicylic and abscisic acids is realized with the ROS participation.

It is also shown, that the temporary increase of ROS contents in plant tissues under the salicylic acid influence is connected rather not with catalase inhibition, as with simultaneous different changes of several oxidative metabolism enzymes activity (guaiacol peroxidase, superoxide dismutase, catalase). On the base of the received data the hypothetical mechanism of the oxidative stress appearance in plant cells under the salicylic acid influence is proposed.

It is proved, that the calcium channels and calmodulin are involved in the oxidative stress appearance induced by the exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide action on plant tissues. The data concerning the  $\text{Ca}^{2+}$ -channels role in the lipid peroxidation development in plants induced by the exogenous hydrogen peroxide are received.

It is revealed, that the joint plant tissues treatment by the exogenous calcium and hydrogen peroxide in nontoxic concentrations can lead to development of uncontrolled oxidative stress in plant objects under the heating. The combined plant tissues treatment by exogenous calcium ions and hydrogen peroxide with the subsequent damaging heating is the model of synergistic infringements of calcium and oxidative homeostasis.

The concrete reactions are defined that are physiologically important for plants resistance against abiotic stressors which develop due to the controlled oxidative stress. Besides, it is proved, that the exogenous oxidative stress inducers (hydrogen peroxide, salicylic acid, calcium ions) are capable to invoke increase of antioxidative enzymes activity, this effect is shown especially distinctly after the damaging action of stressors. With this in view the plant objects treatment by the oxidative stress agents activates accumulation of multifunctional low-molecular protectors (proline and soluble carbohydrates). It is shown, that antioxidants oppress the defense reactions of such compounds accumulation induced by the action of salicylic acid and calcium ions.

The opportunity of antioxidative system induction by means of oxidative stress agents can be a theoretical basis for development of new receptions of increase of the own protection system activity against the ROS surplus in living organisms.

**Key words:** reactive oxygen species, calcium, salicylic acid, oxidative stress, adaptive reactions, resistance, plants.