

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ**

**КАРПЕЦЬ Юрій Вікторович**

УДК 581.1.036.2: 581.13

**ЗАГАРТУВАННЯ РОСЛИН КОРОТКОЧАСНОЮ ДІЄЮ  
ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР:  
ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ  
І ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ВІДПОВІДІ**

03.00.12 – фізіологія рослин

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

Київ – 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Харківському національному аграрному університеті ім. В.В.Докучаєва і в Українському науково-дослідному інституті лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук

**Колупасв Юрій Євгенович**

Харківський національний аграрний університет  
ім. В.В.Докучаєва, професор кафедри ботаніки і  
фізіології рослин

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук

**Яворська Вікторія Казимирівна**

Інститут фізіології рослин і генетики НАН  
України, завідувач відділу фізіології росту і  
розвитку рослин

кандидат біологічних наук

**Капустян Андрій Васильович**

Київський національний університет ім. Тараса  
Шевченка, доцент кафедри фізіології і екології  
рослин

Захист дисертації відбудеться «11» червня 2009 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.212.01 в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17

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

Автореферат розіслано «7» травня 2009 р.

Учений секретар спеціалізованої  
ученої ради д.б.н.

Є.Ю. Мордерер

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Вплив на рослини несприятливих (зокрема, високих) температур є одним з найбільш поширених абіотичних стресорів. На 40% територій помірного клімату Землі рослини зазнають впливу підвищених стресових температур. Цей тип стресу в період вирощування зернових зустрічається більш ніж у 50 країнах [Рейнолдс, 2007]. Особливої актуальності проблема теплостійкості рослин набуває у зв'язку з глобальним потеплінням [Моргун та ін., 2006], яке загрожує не лише сільськогосподарській сфері, а й збереженню біорізноманіття. Так, згідно з прогнозами, наступне підвищення середньої температури на 1°C може призвести до скорочення видового різноманіття рослин в Європі на третину [Thuiller et al., 2005].

Одним із механізмів захисту рослин від наслідків впливу несприятливих високих температур є теплове загартування – здатність підвищувати теплостійкість, яка пов'язана з адаптаційними змінами обміну речовин. Це явище в природних та експериментальних умовах вивчається багатьма дослідниками впродовж тривалого часу [Альтергот, 1981; Александров, 1985; Титов и др., 2006; Wahid et al., 2007]. Відомо, що підвищення теплостійкості можна досягти як довготривалим, так і короткочасним впливом підвищених температур [Титов и др., 1987]. Механізми загартування за довготривалої дії гіпертермії відносно добре досліджені, доведена участь системи індукованого білкового синтезу, у тому числі синтезу білків теплового шоку (БТШ) у прояві його ефектів [Charng et al., 2007, Xiong et al., 2007]. Менш дослідженими залишаються причини підвищення теплостійкості рослин внаслідок короткочасної (кількасекундної або кількахвилинної) дії високих температур. Існує точка зору щодо відмінності механізмів формування теплостійкості при багатогодинному і короткочасному впливі загартовуючих температур. Короткочасна загартовуюча дія гіпертермії більшістю дослідників пояснюється, передусім, змінами конформації вже існуючих білків, а не індукованим синтезом поліпептидів з іншими кінетичними характеристиками [Александров, Кислюк, 1994].

За останнє десятиліття з'явилися дані про значення систем трансдукції сигналів у формуванні стійкості рослин до абіотичних стресорів [Rentel, Knight, 2004, Kaur, Gupta, 2005]. Зокрема, показано участь іонів кальцію у формуванні теплостійкості рослин при загартуванні відносно тривалою дією високих температур [Gong et al., 1998], зміни вмісту активних форм кисню (АФК) у відповідь на гіпертермію [Dat et al., 1998]. Водночас майже не дослідженою залишається можлива роль сигнальних інтермедіатів та індукованого білкового синтезу при підвищенні теплостійкості рослин внаслідок короткочасного впливу ушкоджуючих температур. При цьому зареєстровані ефекти лаг-періоду, необхідного для розвитку теплостійкості після таких впливів [Титов и др., 1989; Александров, Кислюк, 1994], опосередковано свідчать про можливу участь у формуванні теплостійкості систем сигнальної трансдукції та індукованого білкового синтезу. Зважаючи на це, доцільним є експериментальне з'ясування ролі сигнальних інтермедіатів та

білоксинтезуючої системи у прояві ефектів загартування рослин короткочасною дією високих температур.

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

Дисертаційна робота виконувалася згідно з планами науково-дослідних робіт Харківського національного аграрного університету ім. В.В.Докучаєва (держбюджетна тема № 38.02 «Дослідження неспецифічних стресових реакцій рослин: біохімічні аспекти», р/№ 0107U005809) та Українського науково-дослідного інституту лісового господарства і агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького (держбюджетна тема №4 «Вивчити закономірності виникнення та поширення патологічних процесів у лісах України. Розробити систему лісопатологічного моніторингу та рекомендації з підвищення стійкості насаджень», р/№ 0104U005468) та в рамках договору про наукове співробітництво між УкрНДІЛГА ім. Г.М. Висоцького та ХНАУ ім. В.В. Докучаєва на 2006-2011 рр.

**Мета і завдання дослідження.** Основною метою дослідження було з'ясування значення зрушень про-/антиоксидантної рівноваги як можливого елемента передачі сигналу короткочасної загартовуючої дії високих температур та участі системи білкового синтезу у реалізації ефекту підвищення теплостійкості рослин.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

- вивчити часову динаміку змін теплостійкості рослинних об'єктів після короткочасного впливу гіпертермії;
- шляхом застосування антиоксиданту та інгібітору біосинтезу білка з'ясувати можливу участь АФК і білоксинтезуючої системи у розвитку теплостійкості рослинних об'єктів за умов загартування короткочасною дією високих температур;
- дослідити динаміку вмісту пероксидів та продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА) в рослинних об'єктах після короткочасного впливу загартовуючих температур та ушкоджуючого нагрівання;
- з використанням антагоністів кальцію та екзогенної солі кальцію оцінити можливе значення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у регуляції утворення АФК і формуванні теплостійкості за дії короткочасного загартовуючого прогріву;
- дослідити можливу участь АФК та білкового синтезу у забезпеченні змін активності і термостабільності основних антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД), каталази, пероксидази – за умов гіпертермії.

**Об'єкт дослідження:** часова динаміка і механізми загартування рослин короткочасним впливом високих температур.

**Предмет дослідження:** показники про-/антиоксидантної рівноваги (вміст пероксидів, ТБК-активних сполук – МДА), активність і термостабільність антиоксидантних ферментів, теплостійкість рослин.

**Методи дослідження:** інгібіторний аналіз, спектрофотометрія, електрофорез, кількісна оцінка показників фізіологічного стану рослин та ізольованих органів, статистичний аналіз результатів експериментів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше на прикладі трьох таксономічно віддалених видів вищих рослин (*Triticum aestivum* L., *Pinus sylvestris* L., *Cucumis sativus* L.) встановлено загальний фазний характер змін теплостійкості після однохвилинної дії високих загартовуючих температур: зниження (протягом перших 0,25-1 год), зростання (близько 1-24 год) і стабілізації та початку роззагартовування (24-48 год). Продемонстровано зв'язок таких змін теплостійкості з динамікою вмісту пероксидів в рослинних тканинах.

Вперше шляхом застосування антиоксиданту доведено значення оборотного посилення утворення АФК у розвитку теплостійкості рослин після короткочасної дії загартовуючої температури. Показано залежність посилення нагромадження пероксидів, спричинюваного загартовуючим прогрівом, від кальцієвого статусу рослинних клітин.

Методом інгібіторного аналізу показано значення системи біосинтезу білка у формуванні теплостійкості рослин внаслідок короткочасної дії сублетальної температури. Продемонстровано роль білкового синтезу у підвищенні активності і термостабільності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і пероксидази) після однохвилинного загартовуючого прогріву рослин. Показана участь у цих ефектах АФК як внутрішньоклітинних месенджерів.

**Теоретичне і практичне значення одержаних результатів.** Робота розширює уявлення про перебіг адаптивних процесів у рослин за умов зміни факторів навколишнього середовища.

Продемонстровано, що рослини на ранній фазі розвитку або ізольовані органи, що зазнали короткочасної дії загартовуючих температур, можуть бути зручною моделлю для дослідження механізмів формування теплостійкості, оцінки участі у цьому процесі метаболічних і сигнальних систем.

Отримані результати можуть бути використані при розробці заходів штучного індукування стійкості рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища.

Результати досліджень і теоретичні узагальнення використовуються при читанні загального курсу «Фізіологія рослин» і спецкурсу «Фізіологія стійкості рослин» у Харківському національному аграрному університеті ім. В.В.Докучаєва. Вони можуть бути включені до програми курсу «Екологія рослин» у навчальному процесі на біологічних факультетах класичних університетів та в аграрних і педагогічних вищих навчальних закладах, а також використовуватися при проведенні досліджень в галузі фізіології стресу і адаптації рослин у наукових установах біологічного і аграрного профілю.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно здійснено інформаційний пошук і аналіз літератури, обґрунтовано мету і завдання досліджень, освоєно відповідні методи і проведено експериментальні дослідження. Інтерпретація і узагальнення результатів, підготовка матеріалів (статей і тез доповідей) до публікації проводилися особисто та за участю наукового керівника. Частина експериментів проводилася за участю студентів ННІ агробіології Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва, дослідження електрофоретичного спектра пероксидази – спільно з

доцентом кафедри екології і біотехнології ХНАУ к.б.н. В.М. Поповим. Частка особистої участі здобувача становить понад 75 %.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та результати дисертаційної роботи були представлені на III Міжнародній конференції молодих учених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція» (Одеса, 2007), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин» (Дніпропетровськ, 2007), Другому З'їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007), Міжнародній науковій конференції «Проблеми біоекології і шляхи їх вирішення» (Саранськ, Росія, 2008), Міжнародній конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Кам'янець-Подільський, 2008), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми інтродукції та акліматизації рослин» (Дніпропетровськ, 2008), III Науковій конференції молодих учених «Проблеми збереження біорізноманіття в природних та техногенно порушених екосистемах» (Кривий Ріг, 2008), Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 2008), III Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2008).

**Публікації.** Результати дисертації відображені у 16 публікаціях: 6 статей у провідних фахових журналах (з них 1 без співавторів), 10 тез доповідей на конференціях.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація складається зі вступу, 5-ти розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень, три експериментальні розділи), узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел. Робота містить 154 сторінки, з них 122 сторінки основного тексту, 26 рисунків, 4 таблиці і 1 схема, список використаних джерел із 280 найменувань на 32 сторінках.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### ОБ'ЄКТИ, УМОВИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Об'єкти досліджень.** Основним експериментальним об'єктом були етіюльовані проростки (4-добові на початку досліду) озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Частина досліджень проводили з використанням етіюльованих проростків (12-добові на початку досліду) сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) та ізольованих сім'ядолей етіюльованих проростків (4-добові на початку досліду) огірка посівного (*Cucumis sativus* L.) сорту Джерело.

Вибір таксономічно віддалених об'єктів був зроблений зважаючи на можливі відмінності у механізмах формування стійкості у рослин різних систематичних груп (зокрема, неоднаковий внесок неспецифічних і специфічних реакцій у забезпечення адаптивного потенціалу [Дроздов и др. 1984]).

Використання для досліджень етіюльованих об'єктів дозволяє уникати низки неоднозначностей, що мають місце при роботі з зеленими рослинами

(парадоксальні ефекти антиоксидантів, фотопереокиснення ліпідів тощо) [Александрюшкіна и др., 2004].

**Дослідження динаміки розвитку теплостійкості і визначення оптимальної температури однохвилинного загартовуючого прогріву.** Рослинний матеріал (проростки сосни, пшениці або ізольовані сім'ядолі огірка) на початку експерименту витримували 24 год на дистильованій воді. Далі протягом 1 хв прогрівали у водному термостаті за температур 41-51( $\pm 0,1$ )°C для проростків сосни, 38-48( $\pm 0,1$ )°C для проростків пшениці або 40-50( $\pm 0,1$ )°C для ізольованих сім'ядолей огірка. Потім певний час (0,25, 1, 6, 24 або 48 год) витримували на дистильованій воді до моменту визначення теплостійкості (проведення тестуючого (потенційно летального) прогріву). Контролем слугував варіант без загартовуючого однохвилинного прогріву, але з проведенням ушкоджуючого нагрівання.

**Тестуючий потенційно летальний тепловий стрес** створювали шляхом прогріву досліджуваних об'єктів у ванні водного термостату протягом 10 хв за температур 49 $\pm 0,1$ °C для проростків сосни, 45 $\pm 0,1$ °C для проростків пшениці або 47 $\pm 0,1$ °C для ізольованих сім'ядолей огірка.

**Обробка рослинних об'єктів екзогенними ефекторами.** Для з'ясування ролі білкового синтезу, про-/антиоксидантного та кальцієвого статусу рослинних клітин в реалізації ефектів короточасного нагріву вивчали вплив ряду ефекторів на розвиток теплостійкості досліджуваних об'єктів. Рослинні об'єкти інкубували на розчинах CaCl<sub>2</sub>, циклогексиміду (ЦГ, інгібітор білкового синтезу), іонолу (антиоксидант), LaCl<sub>3</sub> (неспецифічний блокатор кальцієвих каналів різних типів) або хлорпромазину (антагоніст кальмодуліну). Обробку рослинного матеріалу починали за 24 год до однохвилинного прогріву і продовжували протягом 24 год до моменту ушкоджуючого нагрівання.

**Вживаність** рослинних об'єктів (інтактних проростків сосни та пшениці або ізольованих сім'ядолей огірка) визначали візуально через певний час (7 діб – для проростків сосни, 4 доби – для проростків пшениці та сім'ядолей огірка) з моменту впливу тестуючого прогріву.

**Аналіз біохімічних показників,** що характеризують зміни про-/антиоксидантної рівноваги в рослинних об'єктах, проводили в певних часових точках, які вибирали на підставі даних попередніх дослідів.

Вміст пероксидів у тканинах досліджуваних об'єктів визначали феротіоціанатним методом [Sagisaka, 1976]. Інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом речовин, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні сполуки, в основному МДА), за методикою, описаною Мерзляком [Мерзляк, 1978] з незначними модифікаціями.

Активність СОД (КФ 1.15.1.11) визначали, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітротетразолієм синім за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАД·Н та феназинметасульфату [Чевари и др., 1985]. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) оцінювали згідно з методикою, описаною Королюком і співавт. [Королюк и др., 1988] з деякими модифікаціями. Активність пероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали за методом Ріджа і Осборна [Ridge, Osborne, 1970].

Термостабільність розчинних форм ферментів в коренях пшениці оцінювали як залишкову їх активність після прогріву екстрактів в ультратермостаті протягом 10 хв за певних температур (38-75°C для СОД і пероксидази або 38-58°C для каталази).

Ізоферментний спектр розчинної анодної пероксидази визначали методом вертикального електрофорезу [Остерман, 1981] з деякими модифікаціями [Шарыпина и др., 2006].

**Повторність і статистична обробка результатів дослідів.** У дослідях з оцінки виживаності проростків сосни чи пшениці або ізольованих сім'ядолей огірка в кожному варіанті було по 30-35 зразків (проростків або ізольованих органів). Кожен такий дослід повторювали незалежно не менше шести разів. Біохімічні аналізи проводили у 4-6 разовій біологічній повторності. Статистичну обробку результатів здійснювали за загальноприйнятими методами. На рисунках і в таблиці наведено середні значення та їх стандартні відхилення.

### **ФОРМУВАННЯ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ РОСЛИН ПІСЛЯ КОРОТКОЧАСНОГО ВПЛИВУ ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР**

**Динаміка розвитку теплостійкості після однохвилинної дії високих температур.** Визначали динаміку розвитку теплостійкості досліджуваних об'єктів за різних температур однохвилинного прогріву. Нагрівання за температур 41-47°C не знижувало виживаність проростків *P. sylvestris*, за температури 49 і 51°C – призводило до загибелі 6 і 15% зразків, відповідно (рис. 1.А). Через 0,25 год після дії температур 41-43°C вірогідних змін теплостійкості не відбувалося, а однохвилинний вплив температур 45-51°C суттєво знижував теплостійкість проростків *P. sylvestris* аж до повної їх загибелі (варіант із температурою 51°C). Проте таке зниження теплостійкості було тимчасовим. Достовірний ефект загартування проростків *P. sylvestris* (підвищення їхньої виживаності після 10-хвилинної дії температури 49°C) виявлявся через 1 год після однохвилинного впливу температур 41-43°C, а через 6 год цей ефект спостерігали за дії широкого діапазону температур – від 41 до 51°C. Максимальний загартовуючий ефект однохвилинного прогріву відзначено через 24 год, а оптимальними температурами прогріву для проростків *P. sylvestris* були 45-47°C (рис. 1.А).

Подібні закономірності дії короткочасного нагрівання спостерігали і у проростків *T. aestivum* та *C. sativus*. Після 24 год лаг-періоду максимальною була теплостійкість проростків пшениці, що зазнавали загартовуючого нагрівання за 42°C (рис. 1.Б). Найвищу теплостійкість сім'ядолей *C. sativus* спостерігали через 24 год після однохвилинного нагрівання за температури 46°C (рис. 1.В).

Отже, для всіх досліджуваних видів після однохвилинної дії сублетальних загартовуючих температур можна виділити три фази змін теплостійкості: зниження (протягом перших 0,25 год у проростків *P. sylvestris* і *T. aestivum* та 1 год – у сім'ядолей *C. sativus*), зростання (близько 1-24 год для всіх видів) і стабілізації та початку роззагартування (24-48 год).



Рис. 1. Вплив однохвилинного прогріву на виживаність рослинних об'єктів (%) після потенційно летального теплового стресу.

А – *Pinus sylvestris*, Б – *Triticum aestivum*, В – *Cucumis sativus*.

Умовні позначення: К – контроль (виживаність незагартованих зразків);

1 – виживаність після однохвилинного нагрівання без тестуючого прогріву, 2-б – виживаність після тестуючого прогріву, здійсненого через 0,25, 1, 6, 24 і 48 год, відповідно, після однохвилинного нагрівання.

Ефект підвищення теплостійкості виявлявся за однохвилинної дії досить широкого діапазону температур, а максимальним він був після дії тих температур, які короткочасно знижували теплостійкість зразків. Можна припустити, що для найбільш повного включення захисних механізмів необхідне завдання ушкоджень рослинним об'єктам. Ймовірно, саме ушкоджуючий вплив спричиняє появу та/або збільшення вмісту в клітинах сполук, котрі є результатом певних (оборотних) порушень і водночас виконують функції сигналу, що опосередковано запускає механізми формування підвищеної резистентності. За відсутності такого сигналу (за дії нижчих температур) адаптивний потенціал рослин, очевидно, виявляється не повною мірою. Принаймні, одними з продуктів стресового метаболізму за дії ушкоджуючих температур можуть бути АФК [Suzuki, Mittler, 2006]. Наші наступні дослідження підтвердили це припущення.

**Значення біосинтезу білка, активних форм кисню та іонів кальцію у формуванні теплостійкості рослин після короткочасного впливу гіпертермії.** Зареєстровані нами ефекти лаг-періоду, необхідного для розвитку теплостійкості рослин після короткочасного загартовуючого прогріву, дали підстави припускати участь системи білкового синтезу у формуванні теплостійкості. Результати інгібіторного аналізу на прикладі проростків сосни і пшениці підтвердили це припущення. Обробка проростків ЦГ сама по собі істотно не впливала на теплостійкість сосни і пшениці. Водночас ЦГ значною мірою пригнічував ефект теплового загартовування обох видів [Карпець, 2007].

У подальших експериментах ми з'ясували, чи задіяні АФК у запуску механізмів формування теплостійкості після загартовуючого нагрівання, використовуючи попередню обробку антиоксидантом. Іонол сам по собі дещо підвищував теплостійкість досліджуваних об'єктів, але при цьому значною мірою нівелював прояв ефекту однохвилинного загартовуючого прогріву [Карпець, Колупаєв, 2008]. Таким чином, можна зробити припущення про участь АФК як вторинних месенджерів у передачі сигналу теплового впливу.

Зважаючи на тісний зв'язок між АФК та іонами кальцію як компонентами єдиної мережі передачі стресових сигналів [Rentel, Knight, 2004], можна очікувати на модифікацію ефектів короткочасного загартовуючого прогріву блокаторами кальцієвих каналів, антагоністами кальмодуліну і екзогенними солями кальцію. Для перевірки цього припущення вивчали вплив хлориду лантану, хлорпромазину і хлориду кальцію на формування теплостійкості проростків пшениці та сосни після загартовуючого прогріву.

Обробка проростків сосни і пшениці блокатором кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  практично повністю знімала ефект підвищення їх теплостійкості,

спричинюваний загартовуючим прогрівом. Хлорпромазин принаймні частково усував ефекти теплового загартування проростків обох видів, що можна розглядати як свідчення ролі кальмодуліну в індукуванні терморезистентності загартовуючої температурою. Екзогенний кальцій підвищував виживаність проростків після ушкоджуючого нагрівання і викликав додаткове зростання теплостійкості проростків при поєднанні із загартовуючим прогрівом. Це свідчить про участь іонів кальцію у процесах формування теплостійкості рослин після короткочасного загартовуючого прогріву.

### **ЗМІНИ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЇ РІВНОВАГИ У РОСЛИН ЗА ДІЇ ЗАГАРТОВУЮЧОГО І УШКОДЖУЮЧОГО ПРОГРІВІВ**

**Вміст пероксидів і продуктів пероксидного окиснення ліпідів у рослин за впливу гіпертермії і антиоксиданту.** Наведені вище дані про пригнічення антиоксидантом іонолом індукованого короткочасним нагріванням розвитку теплостійкості проростків *Pinus sylvestris* і *Triticum aestivum* та сім'ядолей *Cucumis sativus* дозволяють припустити значення зрушень про-/антиоксидантної рівноваги для запуску адаптивних реакцій. У зв'язку з цим було вивчено динаміку змін вмісту групи відносно стабільних АФК – пероксидів – в об'єктах дослідження після загартовуючого та ушкоджуючого прогрівів (рис. 2).

Рис. 2. Вміст пероксидів (мкмоль  $H_2O_2$ /г сухої речовини) в проростках *P. sylvestris* (А), в коренях проростків *T. aestivum* (Б) і сім'ядолях *C. sativus* (В).

1 – контроль (вода), 2 – загартовуючий прогрів (1 хв при 42°C – для *T. aestivum* або при 46°C – для *P. sylvestris* і *C. sativus*), 3 – іонол (90 мкМ – для *P. sylvestris* і *T. aestivum* або 270 мкМ – для *C. sativus*), 4 – загартовуючий прогрів + іонол, 5 – ушкоджуючий прогрів, 6 – загартовуючий прогрів + ушкоджуючий прогрів, 7 – іонол + ушкоджуючий прогрів, 8 – загартовуючий прогрів + іонол + ушкоджуючий прогрів;

а – одразу після 24 год обробки іонолом (контроль – інкубація на воді); б, в, г і д – відповідно через 5, 15 хв, 1 і 24 год після загартовуючого прогріву; е і є – відповідно через 15 хв і 1 год після тестуючого прогріву; ж – через 24 год після тестуючого прогріву або через 48 год після загартовуючого прогріву.

У проростках *P. sylvestris* в контрольному варіанті впродовж всього періоду спостережень (48 год) вміст пероксидів суттєво не змінювався (рис. 2.А, крива 1). Через 15 хв після загартовуючого прогріву відбувалося істотне підвищення вмісту пероксидів, але вже через 1 год кількість пероксидів знижувалася і через 24 год досягала рівня контролю (рис. 2.А, крива 2). Іонол викликав незначне зниження вмісту пероксидів, але при цьому повністю нівелював ефект зростання вмісту АФК, спричинюваний дією загартовуючої температури (рис. 2.А, криві 3, 4). Наступне ушкоджуюче нагрівання призводило до зниження вмісту пероксидів в проростках контрольного варіанта через 1-24 год (рис. 2.А, крива 5). В усіх дослідних варіантах (з попередньою дією на проростки загартовуючого прогріву, іонолу або їх комбінації) також відзначалося зниження вмісту пероксидів в проростках *P. sylvestris*. При цьому абсолютні значення вмісту АФК в цих варіантах були дещо меншими від контрольних (рис. 2.А, криві 6-8). У загартованих проростках, що не зазнавали

ушкоджуючого нагрівання, через 48 год від початку досліду вміст пероксидів не відрізнявся від величин контролю, у варіантах з іонолом – був дещо меншим (рис. 2.А).

Схожу загальну динаміку вмісту пероксидів спостерігали і у коренях *T. aestivum*. В контролі (без нагрівання та дії іонолу) вміст пероксидів був практично незмінним (рис. 2.Б, крива 1). Уже через 5 хв після загартовуючого прогріву (42°C, 1 хв) спостерігалось зростання кількості пероксидів, його максимум відзначався через 15 хв, а через 1 год після загартовуючого прогріву він знижувався до значень контролю (рис. 2.Б, крива 2). Обробка іонолом знижувала вміст пероксидів і нівелювала підвищення їх кількості, що відбувалося внаслідок загартовуючого прогріву (рис. 2.Б, криві 3, 4). Подальше ушкоджуюче нагрівання призводило до підвищення вмісту пероксидів у коренях пшениці контрольного варіанта через 24 год (рис. 2.Б, крива 5). В усіх дослідних варіантах (загартовуючий прогрів, іонол, загартовуючий прогрів + іонол) після ушкоджуючого нагрівання відзначалося зниження вмісту пероксидів (рис. 2.Б, криві 6-8).

Загартовуючий прогрів спричиняв тимчасове підвищення вмісту пероксидів у сім'ядолях *C. sativus*, максимум якого відзначався через 1 год, надалі (до 24 год) вміст пероксидів у зразках цього варіанта знижувався (рис. 2.В, крива 2). Іонол, як і в експериментах з іншими об'єктами, знижував вміст пероксидів у сім'ядолях і нівелював ефект його підвищення, спричинюваний загартовуючим нагріванням (рис. 2.В, криві 3, 4). Після дії ушкоджуючої температури впродовж першої години вміст пероксидів в усіх варіантах досліду змінювався неістотно (рис. 2.В, криві 5-8). Через 24 год він підвищувався у загартованих сім'ядолях до рівня контролю (рис. 2.В, крива 2).

Після ушкоджуючого нагрівання вміст одного з кінцевих продуктів ПОЛ (МДА) в попередньо загартованих рослинних об'єктах був нижчим порівняно з незагартованими, що свідчить про менший розвиток окиснювальних пошкоджень у загартованих рослин [Карпець та ін., 2008].

При порівнянні динаміки змін теплостійкості досліджуваних рослинних об'єктів з динамікою вмісту в них пероксидів досить чітко простежувалося наступне. У період зниження теплостійкості у перші 0,25 год після однохвилинного нагрівання в проростках *P. sylvestris* і коренях *T. aestivum* відзначалося зростання вмісту пероксидів. У сім'ядолях *C. sativus* після однохвилинного загартовуючого прогріву період зниженої теплостійкості і підвищеного вмісту пероксидів тривав довше – до 1 год. Надалі, після сплеску вмісту пероксидів, в усіх видів відбувалося підвищення теплостійкості. Водночас на підставі результатів експериментів з антиоксидантом іонолом можна досить однозначно стверджувати про причетність зростання вмісту АФК до запуску процесу формування теплостійкості після короткочасної дії загартовуючої температури. Антиоксидант не лише усував короткочасний підйом вмісту пероксидів, спричинюваний загартовуючим прогрівом, а й викликав супресію підвищення теплостійкості усіх трьох досліджуваних об'єктів – проростків *P. sylvestris*, *T. aestivum* та сім'ядолей *C. sativus*.

**Можливе значення кальцію у змінах вмісту пероксидів.** Враховуючи зв'язок між кальцієм та АФК як сигнальними месенджерами, можна припустити, що індуковане короточасним загартовуючим прогрівом посилення утворення АФК і процес формування теплостійкості залежать від кальцієвого статусу клітин. З метою перевірки такого припущення досліджували роздільний і сумісний вплив загартовуючого прогріву, блокатора кальцієвих каналів та екзогенного кальцію на динаміку вмісту пероксидів в коренях проростків пшениці.

Як і в попередніх серіях експериментів (рис. 2), після дії загартовуючої температури 42°C спостерігалось короточасне підвищення вмісту пероксидів в коренях (таблиця). 24 годинна обробка коренів проростків хлоридом кальцію також викликала підвищення кількості пероксидів у них. Водночас у коренях проростків, попередньо оброблених хлоридом кальцію, через 0,25-1 год після загартовуючого прогріву відбувалося зниження вмісту пероксидів. Таке явище може бути пов'язане зі спричиненою кальцієм більш ранньою активацією антиоксидантних ферментів (можливо, іще на стадії передобробки хлоридом кальцію або в момент впливу загартовуючої температури) [Колупаєв, 2008].

Обробка проростків розчином блокатора кальцієвих каналів  $\text{LaCl}_3$  сама по собі дещо зменшувала вміст пероксидів у них і повністю знімала спричинюване кальцієм збільшення кількості цієї АФК. Крім того, вплив лантану пригнічував ефект підвищення вмісту пероксидів у коренях через 0,25 год після загартовуючого прогріву (таблиця).

Підвищення вмісту пероксидів у коренях проростків за дії іонів кальцію може бути пов'язане з активацією ним НАДФН-оксидази та форм пероксидази, причетних до генерації АФК [Keller et al., 1998, Bakarjewa et al., 2001, Sagi, Fluhr, 2006]. Таким чином, генерація пероксидів в клітинах коренів пшениці значною мірою залежить від їх кальцієвого статусу. Можна припустити, що надходження кальцію в цитозоль передувало збільшенню вмісту АФК, яке відбувалося одразу після дії загартовуючої температури.

## **ВПЛИВ КОРОТКОЧАСНОГО ЗАГАРТОВУЮЧОГО ПРОГРІВУ РОСЛИН НА ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ**

Як показано вище, короточасний загартовуючий прогрів спричинював оборотне посилення генерації АФК (пероксидів). Виникає запитання: чи могли такі короточасні зміни призводити до модифікації активності антиоксидантних ферментів? Більшість досліджень, в яких показано підвищення активності антиоксидантних ферментів рослин, стосується їх довготривалої аклімації за підвищених температур [Zhou et al., 1995, Guo et al., 2004], ефекти ж короточасної дії високих температур практично не досліджені. Зважаючи на це, ми оцінювали динаміку активності основних антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і пероксидази) в коренях і пагонах проростків пшениці за дії на них загартовуючої і ушкоджуючої високих температур.

**Вміст пероксидів (мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ / г сухої речовини) у коренях проростків пшениці за дії загартовуючого прогріву (1 хв,  $42^\circ\text{C}$ ), хлориду кальцію (50 мМ) і хлориду лантану (4 мМ)**

Варіант досліджу	Час від початку експерименту, год						
	24	24,25	25	48	72	49	72
	До загартовуючого прогріву	Час після загартовуючого прогріву, год				Час після ушкоджуючого прогріву, год	
0,25		1	24	48	1	24	
Контроль	2,71±0,14	—	2,73±0,17	2,59±0,12	2,82±0,14	2,43±0,16	3,51±0,13
Загартування	—	3,26±0,15	2,70±0,14	2,56±0,13	2,76±0,14	2,28±0,17	2,21±0,11
$\text{CaCl}_2$	3,24±0,12	—	3,17±0,15	2,77±0,11	2,84±0,12	2,40±0,14	2,67±0,14
Загартування + $\text{CaCl}_2$	—	2,68±0,17	2,25±0,13	2,49±0,15	2,80±0,10	2,53±0,17	2,59±0,10
$\text{LaCl}_3$	2,44±0,15	—	2,44±0,19	2,43±0,14	2,78±0,18	2,54±0,19	2,84±0,12
Загартування + $\text{LaCl}_3$	—	2,41±0,16	2,57±0,18	2,42±0,17	2,86±0,13	2,56±0,17	2,90±0,16
$\text{CaCl}_2$ + $\text{LaCl}_3$	2,39±0,13	—	2,49±0,16	1,98±0,21	2,71±0,15	2,64±0,20	3,07±0,14
Загартування+ $\text{CaCl}_2$ + $\text{LaCl}_3$	—	2,57±0,14	2,42±0,12	1,95±0,16	2,69±0,11	2,85±0,15	3,06±0,17

Рис. 3. Активність ( $E$ , умовн. од./г сухої речовини · хв) – **A**) і термостабільність (% залишкової активності після прогріву екстрактів ферменту – **B**) СОД (**I**), каталази (**II**) і пероксидази (**III**) коренів пшениці за дії загартовуючого прогріву, ЦГ та іонолу.

1 – контроль, 2 – загартовуючий прогрів (1 хв за 42°C), 3 – ЦГ (20 мкМ), 4 – загартовуючий прогрів + ЦГ, 5 – іонол (150 мкМ), 6 – загартовуючий прогрів + іонол;

$a$  – до початку експозиції проростків на розчинах ЦГ або іонолу,  $b$  – після 24 год обробки проростків ЦГ або іонолом,  $v, z$  – відповідно через 1 і 24 год після загартовуючого прогріву або (та) 25 і 48 год впливу ЦГ або іонолу.

Загартування проростків пшениці однохвилинною дією сублетальної високої температури спричиняло підвищення активності антиоксидантних ферментів та їх термостабільності (% залишкової активності після прогріву екстрактів протягом 10 хв при 50°C для СОД і каталази або 66°C для пероксидази) (рис. 3). Такий ефект, очевидно, відбувалося за рахунок посилення біосинтезу більш термостабільних ізоформ ферментативних білків, оскільки пригнічувалося інгібітором біосинтезу білка ЦГ.

Ймовірними сигнальними месенджерами, які беруть участь в активації цього процесу, можуть бути АФК, адже ефекти змін активності і термостабільності названих ферментів значною мірою нівелювалися антиоксидантом іонолом (рис. 3).

На прикладі пероксидази продемонстрована поява нових ізоферментів в коренях проростків пшениці через 1 і 24 год після однохвилинної дії температури 42°C. Даний ефект загартовуючого прогріву усувався ЦГ [Карпець та ін., 2008].

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

На прикладі трьох таксономічно віддалених видів вищих рослин – *T. aestivum*, *P. sylvestris*, *C. sativus* – показано ідентичний фазний характер зміни теплостійкості і вмісту пероксидів у тканинах після короточасного впливу сублетальної температури. Через 0,25-1 год після загартовуючого прогріву спостерігалось підвищення вмісту пероксидів і зниження теплостійкості, надалі – 1-24 год – зменшення вмісту пероксидів і зростання теплостійкості. Після цього (24-48 год) мало місце поступове підвищення вмісту пероксидів до величин контрольного (без загартування) варіанта і стабілізація теплостійкості або тенденція до її зниження (ефект роззагартування). Схематично криві зміни вмісту пероксидів у рослинному матеріалі і динаміки теплостійкості наведені на рис. 4.

Рис. 4. Фазність змін вмісту пероксидів і формування теплостійкості рослин.

Необхідно зауважити, що фазність змін про-/антиоксидантної рівноваги на прикладі кількох рослинних об'єктів раніше була встановлена для мікрогравітаційного стресу [Барабой и др., 1991]. Але в цих експериментах досліджувалася безперервна довготривала дія стрес-фактора (мікрогравітації), а не розвиток пролонгованої реакції після короточасної дії стресора. У нашому

випадку схожа фазність показана для формування стійкості після короткочасної (загартовуючої) дії стрес-фактора (гіпертермії). При цьому чітко відзначається фаза «тривоги» зі збільшеним вмістом АФК і зниженою резистентністю рослин, фаза адаптації зі зниженим вмістом АФК і підвищеною резистентністю і фаза регенерації – поступового повернення стійкості і показників про-/антиоксидантної рівноваги до вихідного рівня (див. рис. 4). Отже, в усіх досліджуваних видів теплостійкість істотно зростала після певного лаг-періоду: через 24 год після однохвилинного загартовуючого нагрівання. При цьому ефект підвищення теплостійкості виявлявся за однохвилинної дії досить широкого діапазону температур, а максимальним він був після дії тих температур, що короткочасно знижували теплостійкість зразків. На підставі результатів наших експериментів можна зробити припущення, що саме ушкоджуючий вплив спричиняє появу в клітинах сполук, котрі є результатом певних (оборотних) порушень і водночас виконують функції сигналу, що опосередковано запускає механізми формування підвищеної резистентності. За відсутності або недостатньої сили такого сигналу (за дії нижчих температур) адаптивний потенціал рослин, очевидно, виявляється не повною мірою. Як свідчать отримані нами результати, учасниками формування (передачі) такого сигналу є АФК. Ще одним обов'язковим компонентом складної системи передачі дії гіпертермії на рослини є іони кальцію.

Ймовірна послідовність розвитку адаптивних реакцій рослин на гіпертермію може бути такою. Дія температури на гіпотетичний(і) сенсор(и) призводить до відкриття кальцієвих каналів і надходження кальцію в цитозоль. Іншою ранньою реакцією може бути активація ферментів, причетних до нагромадження АФК, або зниження активності ферментів, які елімінують АФК. Ефекти надходження кальцію в цитозоль і нагромадження АФК є взаємопов'язаними.  $\text{Ca}^{2+}$  і АФК здатні взаємно посилювати стресовий сигнал. Цей сигнал за посередництва інших компонентів трансдукції сигналів передається в геном, відбувається посилення експресії генів, причетних до формування адаптивних реакцій.

Однією з таких досліджених нами захисних реакцій була зміна активності і термостабільності антиоксидантних ферментів. Нам вдалося показати ефект зростання активності СОД, каталази і пероксидази в рослинних тканинах після короткочасної дії сублетальних температур. Водночас спостерігалось підвищення термостабільності всіх цих ферментів, особливо через 24 год після впливу сублетальної температури [Карпець та ін., 2008]. Ефект підвищення активності і термостабільності названих ферментів усувався інгібітором біосинтезу білка ЦГ, що можна розглядати як свідчення синтезу антиоксидантних ферментів за дії на рослини загартовуючих температур. Посередниками у ймовірному індукуванні синтезу більш термостабільних ізоформ антиоксидантних ферментів, очевидно, є АФК, адже підвищення активності і термостабільності СОД, каталази і пероксидази нівелювалося обробкою рослинного матеріалу антиоксидантом.

Таким чином, в цілому короткочасний вплив на рослини сублетальних температур призводить до зростання їх теплостійкості. При цьому, однак,

формування теплостійкості включає фазу тимчасового її зниження (див. рис. 4). Ймовірно, саме на цій суто стресовій фазі (стадія «тривоги») відбувається активація сигнальних систем, яка забезпечує запуск адаптивних реакцій. Проявами такої активації, очевидно, є зареєстроване нами кальційзалежне посилення генерації АФК (рис. 2, таблиця).

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено й обґрунтовано положення, згідно з яким короткочасний (однохвилинний) вплив сублетальних температур після певного лаг-періоду викликає підвищення теплостійкості рослин, при цьому передача сигналу гіпертермії включає зміни про-/антиоксидантного балансу, а формування теплостійкості відбувається за участю білоксинтезуючої системи.

1. Істотне зростання теплостійкості рослин можливе після короткочасного впливу підвищених температур відносно широкого діапазону. Максимальний загартовувачий ефект після певного лаг-періоду чинять сублетальні температури, одразу після впливу яких спостерігається короткочасне зниження теплостійкості рослинних об'єктів.

2. Динаміка формування теплостійкості і змін вмісту пероксидів якісно не відрізняється у трьох таксономічно віддалених видів вищих рослин – *Pinus sylvestris*, *Triticum aestivum* і *Cucumis sativus*.

3. У процесі формування теплостійкості після короткочасної дії високих температур виокремлюються три фази: зниження резистентності, її підвищення і регенерації (або «роззагартування»). При цьому виявляється зворотна залежність між вмістом АФК (пероксидів) і резистентністю рослин.

4. Тимчасове зростання вмісту пероксидів в тканинах після короткочасного загартовувачого прогріву необхідне для подальшого формування теплостійкості рослин. Обробка рослинних об'єктів антиоксидантом іонолом нівелювала зростання вмісту пероксидів і розвиток теплостійкості.

5. Спричинюване короткочасною дією загартовувачої температури зростання вмісту пероксидів в рослинних тканинах відбувається за участю цитозольного кальцію, оскільки усувається блокатором кальцієвих каналів.

6. Попереднє загартування рослин короткочасною дією високих температур призводить до зниження окиснювальних пошкоджень, які реєстрували за вмістом продукту ПОЛ (МДА), після дії ушкоджуючого прогріву.

7. Короткочасний загартовувачий прогрів викликає підвищення активності і термостабільності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і пероксидази) в рослинних тканинах. Такі ефекти відбуваються за участю АФК (як сигнальних посередників) і системи біосинтезу білків, оскільки нівелюються антиоксидантом та інгібітором білкового синтезу.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ



1. Карпец Ю.В. О возможных механизмах индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы мягкой и сосны обыкновенной кратковременным действием высокой температуры / Ю.В. Карпец // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 63-70.
2. Карпец Ю.В. Влияние кратковременного теплового закаливания и повреждающего нагрева на показатели про-/антиоксидантного равновесия в проростках пшеницы / Ю.В. Карпец, Ю.Е. Колупаев, Т.О. Ястреб, А.И. Обозный // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 53-59.
3. Карпець Ю.В. Значення окиснювального стресу в індукованні теплостійкості проростків пшениці короткочасною дією супероптимальної температури / Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 3. – С. 245-252.
4. Карпець Ю.В. Динаміка розвитку теплостійкості рослин після короткочасного теплового загартування: зв'язок з флуктуаціями вмісту пероксидів / Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв // Укр. ботан. журн. – 2008. – Т. 65, № 5. – С. 733-742.
5. Карпець Ю.В. Роль активних форм кисню у підвищенні термостабільності антиоксидантних ферментів коренів пшениці після теплового загартування / Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв, Л.І. Мусатенко // Доп. НАН України. – 2008. – № 12. – С. 136-140.
6. Карпец Ю.В. Содержание пероксидов в корнях проростков пшеницы при гипертермии в зависимости от кальциевого статуса их клеток / Ю.В. Карпец, Ю.Е. Колупаев // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 33-40.
7. Karperts Yu. The Participation of Reactive Oxygen Forms in Plants Heat Hardening / Yu. Karperts, T. Yastreba, O. Oboznii, Yu. Kolupaev // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. Materials of III Int. conf. (Odesa, 15-18 May 2007) – Odesa, 2007. – P. 30.
8. Карпець Ю.В. Супресія антиоксидантом іонолом ефектів короткочасного теплового загартування рослин / Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв, Т.О. Ястреб, О.І. Обозний // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин. Мат-ли Всеукр. науково-практ. конф., (ДніпрНУ, 22-23 травня 2007 р.). – Дніпропетровськ, 2007. – С. 59-60.
9. Карпець Ю.В. Залежність ефекту короткочасного теплового загартування рослин від утворення активних форм кисню і кальцієвого статусу клітин / Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв // 2-ий 3'їзд Українського товариства клітинної біології. (КНУ ім. Тараса Шевченка, 23-26 жовтня 2007 р.). Збірник тез. – К., 2007. – С. 243.
10. Karperts Yu.V. The participation of reactive oxygen species in the plants heat resistance induction at the short-term hardening by superoptimum temperatures / Yu.V. Karperts, Yu.Ye. Kolupaev // Bioecological problems and means of solution. Materials of Int. conf. (Saransk, Russia, 15-18 May 2008). – Saransk, 2008. – P. 202-203.

11. Karperts Yu.V. Possible mechanisms of increase of antioxidative enzymes thermostability in *Triticum aestivum* plantlets at the short-term heat hardening / Yu.V. Karperts, Yu.Ye. Kolupaev // Актуальні проблеми ботаніки та екології. Мат-ли Міжнар. конф. мол. учених (м. Кам'янець-Подільський, 13-16 серпня 2008 р.). – Кам'янець-Подільський, 2008. – С. 281-282.
12. Карпець Ю.В. Вплив короткочасного теплового загартування на активність антиоксидантних ферментів проростків пшениці / Ю.В. Карпець // Сучасні проблеми інтродукції та акліматизації рослин. Тези доп. Міжнар. наук.-практ. конф. до 75-річчя Бот. саду Дніпропетр. нац. ун-ту (ДніпрНУ, 8-11 вересня 2008 р.) – Дніпропетровськ, 2008. – С. 48-49.
13. Карпець Ю.В. Модифікація антиоксидантом іонолом ефектів теплового загартування проростків пшениці на показники про-/антиоксидантного балансу / Ю.В. Карпець, Т.О. Ястреб, О.І. Обозний, А.О. Вайнер // Проблеми збереження біорізноманіття в природних та техногенно порушених екосистемах. Мат-ли III Наук. конф. мол. учених (м. Кривий Ріг, 16-18 вересня 2008 р.). – Кривий Ріг, 2008. – С. 85-87.
14. Карпец Ю.В. Изменение термостабильности супероксиддисмутазы корней проростков пшеницы после кратковременного теплового закаливания / Ю.В. Карпец, А.И. Обозный, А.А. Вайнер, Ю.Е. Колупаев // Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти. Мат-ли Міжнар. наук. конф. (ХНУ ім. Каразіна, 13-15 жовтня 2008 р.). – Харків, 2008. – С. 82-83.
15. Карпець Ю.В. Залежність окиснювального сплеску при тепловому загартуванні рослин від кальцієвого статусу клітин / Ю.В. Карпець // Біологія: від молекули до біосфери. Мат. III Міжнар. конф. мол. науковців (ХНУ ім. Каразіна, 18-21 листопада 2008 р.). – Харків, 2008. – С. 277-278.
16. Карпець Ю.В. Механізм зміни термостабільності пероксидази коренів пшениці при короткочасному тепловому загартуванні / Ю.В. Карпець, О.І. Обозний, В.М. Попов // Біологія: від молекули до біосфери. Мат. III Міжнар. конф. мол. науковців (ХНУ ім. Каразіна, 18-21 листопада 2008 р.). – Харків, 2008. – С. 279-280.

### АНОТАЦІЯ

**Карпець Ю.В. Загартування рослин короткочасною дією високих температур: особливості передачі сигналу і фізіологічної відповіді. – Рукопис**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. – Київ, 2009

Дисертація присвячена вивченню фізіологічних механізмів процесу теплового загартування рослин після короткочасного впливу на них гіпертермії (сублетальні температури).

На прикладі трьох таксономічно віддалених видів вищих рослин – *Pinus sylvestris* L., *Triticum aestivum* L., *Cucumis sativus* L. – показано ідентичний

фазний характер змін теплостійкості і вмісту пероксидів у тканинах після короткочасного впливу сублетальної температури.

Тимчасове зростання вмісту пероксидів в тканинах після короткочасного загартовуючого нагрівання необхідне для подальшого формування теплостійкості рослин. Обробка рослинних об'єктів антиоксидантом іонолом нівелювала зростання вмісту пероксидів і розвиток теплостійкості. З використанням блокатора кальцієвих каналів показана залежність посилення нагромадження пероксидів, спричинюваного загартовуючим прогрівом, від кальцієвого статусу рослинних клітин.

Методом інгібіторного аналізу продемонстровано значення системи біосинтезу білків у формуванні теплостійкості рослин внаслідок короткочасної дії сублетальної температури.

Після короткочасної дії загартовуючої температури відбувалося підвищення активності і термостабільності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази і пероксидази). Дані ефекти усувалися обробкою рослинних об'єктів інгібітором біосинтезу білка та антиоксидантом.

Зроблено висновок, що короткочасний (однохвилинний) вплив сублетальних температур після певного лаг-періоду викликає підвищення теплостійкості рослин, при цьому передача сигналу гіпертермії включає зміни про-/антиоксидантного балансу у рослинних тканинах, а формування теплостійкості відбувається за участю білоксинтезуючої системи.

**Ключові слова:** теплове загартування, теплостійкість, активні форми кисню, кальцій, біосинтез білка, антиоксидантні ферменти

## АННОТАЦИЯ

**Карпец Ю.В. Закаливание растений кратковременным действием высоких температур: особенности передачи сигнала и физиологического ответа. – Рукопись**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – физиология растений. Институт физиологии растений и генетики НАН Украины. – Киев, 2009

Диссертация посвящена изучению физиологических механизмов процесса теплового закаливания растений после кратковременного влияния на них гипертермии (сублетальные температуры).

На примере трех таксономически отдаленных видов высших растений – *Pinus sylvestris* L., *Triticum aestivum* L., *Cucumis sativus* L. – показан идентичный фазный характер изменений теплоустойчивости и содержания пероксидов в тканях после кратковременного влияния сублетальной температуры.

Временное повышение содержания пероксидов в тканях после кратковременного закаливающего прогрева необходимо для последующего формирования теплоустойчивости растений. Обработка растительных объектов антиоксидантом ионолом нивелировала увеличение содержания пероксидов и развитие теплоустойчивости. С использованием блокатора кальциевых каналов показана зависимость усиления накопления пероксидов, вызываемого закаливающим прогревом, от кальциевого статуса растительных клеток.

Методом ингибиторного анализа продемонстрировано значение системы биосинтеза белков в формировании теплоустойчивости растений в результате кратковременного воздействия сублетальной температуры.

После кратковременного воздействия закаливающей температуры происходило повышение активности и термостабильности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы). Данные эффекты устранялись обработкой растительных объектов ингибитором биосинтеза белка и антиоксидантом.

Сделан вывод, что кратковременное (одноминутное) влияние сублетальных температур после определенного лаг-периода вызывает повышение теплоустойчивости растений, при этом передача сигнала гипертермии включает изменения про-/антиоксидантного баланса в растительных тканях, а формирование теплоустойчивости происходит с участием белоксинтезирующей системы.

**Ключевые слова:** тепловое закаливание, теплоустойчивость, активные формы кислорода, кальций, биосинтез белка, антиоксидантные ферменты

### SUMMARY

**Karpets Yu.V. Plants hardening by short-term action of high temperatures: features of signal transduction and physiological response. – Manuscript**

Thesis for Candidate (Ph. D) degree of biological sciences, specialty 03.00.12 – Plant Physiology. Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine. – Kyiv, 2009

The thesis is devoted to studying the physiological mechanisms of process of heat hardening of plants after the short-term influence of hyperthermia (sublethal temperatures) on them. The importance of shifts of pro-/antioxidative balance as the possible element of signal transduction of short-term hardening action of high temperatures and the participation of protein biosynthesis system in the realization of effect of heat resistance increase of plants have been researched.

On the example of three taxonomicly remote species of higher plants – *Pinus sylvestris* L., *Triticum aestivum* L., *Cucumis sativus* L. – the identical phase character of change of heat resistance and peroxides content in tissues after the short-term influence of sublethal temperature is shown. Within 0,25-1 hour after hardening heating the increase of peroxides content and decrease of heat resistance was observed, in the further (1-24 hours) the reductions of peroxides amount and growth of heat resistance occurred. After that (24-48 hours) the gradual increase of peroxides content up to the values of control (without hardening) variant and the stabilization of heat resistance or the tendency to its decrease (effect of unhardening) took place.

Temporary increase of peroxides content in tissues after the short-term hardening heating is necessary for the following formation of plants heat resistance. The treatment of plant objects with antioxidant ionol leveled the increase of peroxides content and the development of heat resistance.

The dependence of intensifying of peroxides accumulation, caused by hardening heating, on the calcium status of plant cells is shown with use the blocker of calcium channels.

The importance of system of protein biosynthesis in formation of plants heat resistance after the short-term action of sublethal temperature is proved by the method of inhibitory analysis.

The increase of activity of antioxidative enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) was registered after the hardening influence of high temperature. At the same time, the increase of thermostability of these enzymes, especially within 24 hours after the action of hyperthermia, was observed. The effect of increase of activity and thermostability of antioxidative enzymes was removed by the inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide that testifies to probable synthesis of these enzymes at the action of hardening temperatures on plants. Reactive oxygen species, obviously, are the messengers in the induction of synthesis of more thermostable isoforms of antioxidative enzymes as the increase of activity and thermostability of superoxide dismutase, catalase and peroxidase was levelled by the treatment of plant objects with antioxidant.

It is shown, that the oxidative damages of plants, which were registered by the content of product of lipid peroxidation (malonic dialdehyde), after the action of damaging heating were more significant in not hardened plants in comparison with experimental plants which were subjected to preliminary one-minute hardening action of high temperatures.

It is drawn a conclusion, that the short-term influence of sublethal temperatures after the certain lag period causes the increase of plants heat resistance, thus the signal transduction of hyperthermia includes the changes of pro-/antioxidative balance in plant tissues, and the formation of heat resistance occurs at the participation of protein synthesis system and is accompanied by the intensifying of functioning of enzymatic antioxidants.

**Key words:** heat hardening, heat resistance, reactive oxygen species, calcium, protein biosynthesis, antioxidative enzymes