

## КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 581.1

### РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ИНДУЦИРУЕМОМ ЭКЗОГЕННЫМ КАЛЬЦИЕМ НАКОПЛЕНИИ ПРОЛИНА В ОТРЕЗКАХ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ

© 2007 г. Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец,  
Т. О. Ястреб, А. И. Обозный

*Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева  
(Харьков, Украина)*

Изучали раздельное и совместное действие 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 20 мкМ раствора антиоксиданта ионола на содержание перекисей и пролина в колеоптилях пшеницы и их теплоустойчивость. Экзогенный кальций увеличивал, а ионол уменьшал содержание как перекисей, так и пролина в тканях. При комбинированной обработке антиоксидант устранял оба эффекта обработки хлоридом кальция. Раздельная обработка колеоптилей CaCl<sub>2</sub> и ионолом повышала их теплоустойчивость, хотя эффект антиоксиданта был менее выраженным. Ионол при комбинированной обработке с CaCl<sub>2</sub> снижал положительное действие последнего на теплоустойчивость колеоптилей. Высказано предположения о роли активных форм кислорода как посредников в действии экзогенного Ca<sup>2+</sup> на накопление пролина и формирование теплоустойчивости растительных тканей.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum L.*, кальций, пролин, активные формы кислорода, теплоустойчивость

Хорошо известно, что ионы кальция участвуют в формировании адаптивных реакций растений на различные стрессовые воздействия [15]. Имеются многочисленные сведения об индуцировании экзогенными ионами кальция осмо- [18], холодо- [13], теплоустойчивости [3] растений, а также их резистентности к другим стресс-факторам. Подобные защитные эффекты Ca<sup>2+</sup> лишь отчасти могут быть связаны с его способностью непосредственно повышать устойчивость белков и белково-липидных комплексов мембран к действию повреждающих агентов [14].

В последние десятилетия особое внимание уделяется выяснению роли кальция в индуцировании защитных реакций растений путем трансдукции стрессовых сигналов, приводящей к изменению экспрессии генов и перестройке

метаболизма. Так, показано значение ионов Ca<sup>2+</sup> в модификации ДНК-связывающей активности фактора транскрипции белков теплового шока (БТШ) [16], влияние цитозольного Ca<sup>2+</sup> на новообразование индивидуальных БТШ [8], участие ионов кальция в активации антиоксидантных ферментов [3], накоплении низкомолекулярных протекторов [18].

Есть сведения о способности ионов кальция в определенных условиях усиливать генерацию растениями супероксидного радикала и перекисей [11]. Правда, возможна и иная взаимосвязь между АФК и Ca<sup>2+</sup>: АФК способны усиливать выход ионов кальция в цитоплазму [19]. Предполагают, что в большинстве стадий стрессовых реакций принимают участие и Ca<sup>2+</sup>, и АФК [10]. Продемонстрирована конкретная роль как генерации АФК, так и изменений кальциевого статуса растений при действии патогенов (реакция сверхчувствительности) [12], индуцировании синтеза каллозы и фитоалексинов [1, 7]. В то же время связь между усилением образования АФК под влиянием Ca<sup>2+</sup> и ин-

*Адрес для корреспонденции:* Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный агроуниверситет, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;  
e-mail: plant\_biology@agrouniver.kharkov.com

дуцированием им конкретных защитных реакций, повышающих устойчивость растений к действию абиотических стрессоров, изучена значительно меньше.

Одной из таких реакций может быть накопление пролина. Ранее нами было показано, что повышение теплоустойчивости колеоптилей пшеницы под действием экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  сопровождалось увеличением в них содержания свободного пролина [2]. Задачей настоящей работы явилось выяснение возможного значения образования АФК в накоплении пролина колеоптилями пшеницы, которое индуцировалось экзогенным кальцием.

### МЕТОДИКА

Объектом исследования явились колеоптиль озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Донецкая 48. Условия проращивания семян и подготовка растительного материала подробно описаны нами ранее [3]. Колеоптиль, отделенные от четырехсуточных этиолированных проростков, инкубировали в течение 18-20 ч на 2%-ном растворе сахарозы (контроль), 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 20 мкМ растворе антиоксиданта ионола (бутилгидрокситолуол) ("Fluka", США) либо их комбинации. В последнем случае ионол вносили за 2 ч до добавления в среду инкубации колеоптилей хлорида кальция. Все растворы готовили на 2%-ной сахарозе. Концентрации веществ выбирали на основании результатов предварительных опытов. По истечении времени инкубации определяли суммарное содержание перекисей в колеоптилях по методу Sagisaka [20], содержание свободного пролина по Bates [9] и оценивали теплоустойчивость колеоптилей путем их прогрева в ванне водного термостата при температуре  $43,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  в те-

чение 10 мин [3]. Количество выживших колеоптилей определяли через 48 ч после прогрева.

Повторность независимых опытов трехкратная. На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка колеоптилей 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  вызвала достоверное увеличение содержания в них перекисей (рис. 1). Под действием ионола количество перекисей в тканях снижалось приблизительно в 1,5 раза. При комбинированной обработке колеоптилей хлоридом кальция и ионолом антиоксидант полностью снимал эффект повышения содержания перекисей, вызываемый экзогенными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

Воздействие  $\text{CaCl}_2$  на отрезки колеоптилей приводило к повышению содержания в них пролина (рис. 1). При обработке колеоптилей ионолом содержание пролина в них снижалось. Антиоксидант также полностью снимал вызываемое ионами  $\text{Ca}^{2+}$  повышение содержания пролина.

Экзогенный  $\text{CaCl}_2$  повышал теплоустойчивость отрезков колеоптилей (рис. 2). Подобное, хотя и менее выраженное действие, оказывал и ионол в используемой концентрации. Повидимому, это связано с прямым защитным (антиоксидантным) действием ионола как сквенджера свободных радикалов [5]. При комбинированной обработке колеоптилей  $\text{CaCl}_2$  и ионолом их теплоустойчивость не отличалась от величин, наблюдаемых в варианте с одним ионолом. Иными словами, ионол сам по себе оказывая положительное влияние на теплоустойчивость, частично снимал эффект ее повышения, вызываемый экзогенным  $\text{CaCl}_2$ . Такие

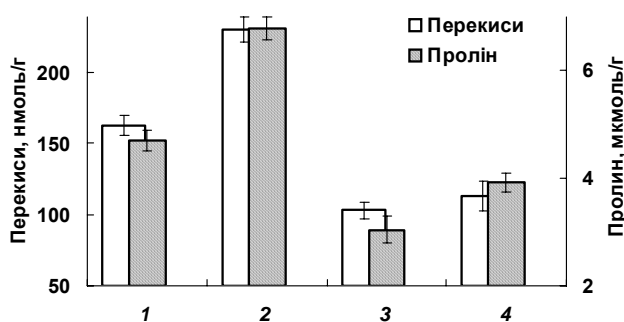


Рис. 1. Содержание перекисей (в пересчете на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , нмоль/г сухого вещества) и свободного пролина (мкмоль/г сухого вещества) в колеоптилях пшеницы. Здесь и на рис. 2: 1 – контроль, 2 – 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 3 – 20 мкМ ионол, 4 – 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  + 20 мкМ ионол.

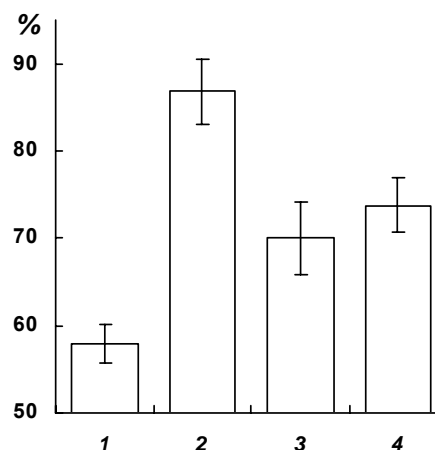


Рис. 2. Вживання (%) колеоптилей пшеницы после повреждающего нагрева.

результаты полностью согласуются с полученными нами ранее на примере интактных проростков пшеницы [5].

На основании выявленного эффекта супрессии антиоксидантом индуцируемого кальция повышения теплоустойчивости можно полагать, что для реализации по крайней мере некоторых защитных реакций, индуцируемых ионами  $Ca^{2+}$ , необходимо повышение содержания АФК. По-видимому, к таким реакциям относится и накопление пролина.

Как известно, пролин в условиях действия стрессоров может выполнять мультифункциональную роль [6]. Она проявляется не только в осморегуляторной (важна при стрессах, сопровождающихся обезвоживанием) и протекторной функциях, но и в антиоксидантной. Показано, что пролин обладает способностью защищать от повреждения белки и мембраны путем инактивации свободных радикалов. Для проявления подобных эффектов достаточно относительно небольшого увеличения его содержания. Предполагается, что антиоксидантные эффекты пролина могут быть неспецифическими (мало зависимыми от природы стрессора) и проявляться на стадии стрессовой реакции растений, еще до включения специфических механизмов долговременной адаптации [6].

Итак, в настоящей работе нам удалось показать, что снятие антиоксидантом ионолом эффекта повышения содержания перекисей в колеоптилях, вызываемого  $CaCl_2$ , приводило к одновременному блокированию накопления пролина, которое также вызывала обработка экзогенным  $Ca^{2+}$ . Таким образом, можно полагать, что накопление пролина в растениях индуцируется экзогенным кальцием при участии АФК. В пользу этого предположения свидетельствует и показанный нами ранее эффект увеличения содержания пролина в растительных тканях после непосредственной их обработки экзогенной  $H_2O_2$  [4].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. Роль  $Ca^{2+}$  как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов и каллозы в культуре клеток *Allium cepa* L. // Физиология растений. - 1997. - Т. 44, № 3. - С.385-391.
2. Колупаев Ю.С., Акинина Г.С. Влияние  $Ca^{2+}$  на компоненты системы антиоксидантного захвата в колеоптилях пшеницы за условий теплового стресса // Живлення рослин: теорія і практика. - К.: Логос, 2005. - С. 71-81.
3. Колупаев Ю.Е., 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.
4. 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.
5. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Супрессия антиоксидантом ионолом повышения теплоустойчивости проростков пшеницы, индуцируемого ионами кальция // Там же. - 2006. - Вип. 2(9). С. 21-30.
6. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. - 1999. - Т. 46, № 2. - С. 321-336.
7. Перковская Г.Ю., Кравчук Ж.Н., Гродзинский Д.М., Дмитриев А.П. Индукция активных форм кислорода и фитоалексинов в культуре клеток лука (*Allium cepa*) биогенными элиситорами из гриба *Botrytis cinerea* // Там же. - 2004. - Т. 51, № 5. - С. 680-685.
8. Трофимова М.С., Андреев И.М., Кузнецов Вл.В. Кальций как внутриклеточный регулятор синтеза БТШ96 и термотолерантности клеток растений при гипертермии // Там же. - 1997. - Т. 44, № 4. - С. 511-516.
9. Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies // Plant and Soil. - 1973. - V. 39. - P. 205-210.
10. Bolwer C., Fluhr R. The role calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance // Trends Plant Sci. - 2000. - V. 5, N 6. - P. 241-246.
11. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cell of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment // Plant Sci. - 2002. V. 163, N 3. - P. 653-660.
12. Grant M., Brown I., Adams S. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for oxidative burst and hypersensitive cell death // Plant J. - 2000. - V. 23, N 4. - P. 441-450.
13. Guo L.-H., Chen S.-N. Gong M. Influence of heat shock and calcium on corn plantlets chilling resistance // J. Yunnan Univ. Natur. Sci. - 2003. - V. 25, N 5. - P. 449-452.
14. Hirschi K.D. The calcium conundrum. Both verstile nutrient and specific signal // Plant Physiol. - 2004. - V. 136. - N 1. - P. 2438-2442.

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

15. Knight H. Calcium Signalling during Abiotic Stress in Plants // Intern. Rev. Cytol. – 2000. – V. 195. – P. 269-324.
16. Li B., Liu H.-T., Sun D.-Ye., Zhou R.-G. Ca<sup>2+</sup> and calmodulin modulate DNA-binding activity of maize heat shock transcription factor in vitro // Plant and cell Physiol. – 2004. V. 45, N 5. – P. 627-634.
17. Liang J., Li Yu-H., Zhang R.-R.-F. Zhu Z. Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> influence on the physiological characteristics grafted seedlings of Casuarina equisetifolia under NaCl-stress // Acta ecol. Sin. – 2004. - V. 24, N 5. – P. 1073-1077.
18. Nayyar H., Kaushal S.K. Alleviation of negative effects of water stress in two contrasting wheat genotypes by calcium and abscisic acid // Biol. Plant. – 2002. – V. 45, N 1. – P. 65-70.
19. Rentel M.C., Knight M.R. Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis // Plant Physiol. – 2004. - V. 135. - P. 1471-1479.
20. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Ibid. – 1976. – V. 57. – P. 308-309.

Поступила в редакцію  
29.01.2007 г.

## ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PROLINE ACCUMULATION IN THE WHEAT COLEOPTILES PIECES INDUCED BY THE EXOGENOUS CALCIUM

Yu. Ye. Kolupaev, Yu. V. Karpets, T. O. Yastreb, O. I. Oboznyi

*V. V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkov, Ukraine)*

Separate and combined influence of 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 20 μM solution of the antioxidant ionol on the content of peroxides and proline in wheat coleoptiles and their heat resistance have been studied. The exogenous calcium enlarged, and ionol reduced content as peroxides, and proline in tissues. At the combined treatment antioxidant removed both of the effects of calcium chlorid treatment. Coleoptiles treatment by CaCl<sub>2</sub> and ionol separately raised their heat resistance though the effect of the antioxidant was less expressed. Ionol at the combined treatment with CaCl<sub>2</sub> reduced its positive action on coleoptiles heat resistance. It is come out with assumptions of the role of reactive oxygen species as messengers in influence of exogenous Ca<sup>2+</sup> on the proline accumulation and formation of plant tissues heat resistance.

**Key words:** *Triticum aestivum L., calcium, proline, reactive oxygen species, heat resistance*

## РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ІНДУКОВАНОМУ ЕКЗОГЕННИМ КАЛЬЦІЄМ НАГРОМАДЖЕННІ ПРОЛІНУ У ВІДРІЗКАХ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ

Ю. Є. Колупаєв, Ю. В. Карпець, Т. О. Ястреб, О. І. Обозний

*Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

Вивчали роздільну й сумісну дію 5 mM CaCl<sub>2</sub> і 20 мкМ розчину антиоксиданту іонолу на вміст пероксидів і проліну в колеоптилях пшениці та їх теплостійкість. Екзогенний кальцій збільшував, а іонол зменшував вміст як пероксидів, так і проліну в тканинах. За комбінованої обробки антиоксидант усував обидва ефекти обробки хлоридом кальцію. Обробка колеоптилів CaCl<sub>2</sub> та іонолом окремо підвищувала їх теплостійкість, хоча ефект антиоксиданту був менш вираженим. Іонол за комбінованої обробки з CaCl<sub>2</sub> знижував позитивний вплив останнього на теплостійкість колеоптилів. Висловлено припущення про роль активних форм кисню як посередників у дії екзогенного Ca<sup>2+</sup> на нагромадження проліну і формування теплостійкості рослинних тканин.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum L., кальцій, пролін, активні форми кисню, теплостійкість*