

УДК 581.1.036.2

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ ИНДУЦИРОВАНИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ И СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ КРАТКОВРЕМЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2007 г. Ю. В. Карпец

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

Кратковременное закаливание этиолированных проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) путем одноминутного прогрева в ванне ультратермостата (46°C для сосны и 42°C для пшеницы) вызывало значительное повышение теплоустойчивости проростков через 24 ч после действия закаливающей температуры. Обработка проростков двух видов ингибитором белкового синтеза циклогексимидом, блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана, антагонистом кальмодулина хлорпромазином и антиоксидантом ионолом приводила к значительному уменьшению эффекта закаливания. Действие на проростки экзогенного кальция само по себе повышало их теплоустойчивость и дополнительно увеличивало выживание закаленных проростков. Эффекты кальция в значительной степени угнетались действием ионола. Сделан вывод, что развитие теплоустойчивости растений, индуцированное кратковременным высокотемпературным воздействием, включает в себя трансдукцию сигнала закаливания с участием Ca^{2+} и активных форм кислорода как внутриклеточных мессенджеров и индуцированный синтез белков.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., *Triticum aestivum* L., закаливание, теплоустойчивость, активные формы кислорода, кальций, индуцированный синтез белка

Хорошо известно, что повышения терморезистентности растений можно достичь как кратковременным, так и долговременным влиянием повышенных температур [7]. Доминирует точка зрения, согласно которой долговременное закаливание вызывает индукцию синтеза белков теплового шока и белков адаптации с длительным периодом жизни [6]. В то же время кратковременное закаливание высокими температурами может происходить и без участия белоксинтезирующего аппарата, поскольку его эффекты не устраняются ингибиторами белкового синтеза [7]. Предполагается, что подобные явления связаны с конформационными изменениями существующих белков. При этом, однако, теплоустойчивость оценивалась исследователями по показателю повышения температуры, вызывающей коагуляцию ли-

бо остановку движения цитоплазмы [2, 7]. Такой подход позволяет оценить лишь первичную терморезистентность, но не отражает вклада репаративных механизмов и, по-видимому, не может быть интегральным показателем теплоустойчивости.

В последнее десятилетие появились данные о значении систем трансдукции сигналов в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессорам [11, 14, 15]. В частности, на примере проростков табака показано, что их обработка ЕГТА, связывающим внеклеточный кальций, ослабляла развитие теплоустойчивости [12]. Сходные эффекты при тепловом закаливании проростков кукурузы вызывали блокаторы кальциевых каналов [11]. В работах Dat et al. [9, 10] показано, что повышение теплоустойчивости при тепловом закаливании растений сопровождается временным увеличением в растительных тканях содержания активных форм кислорода (АФК).

При этом, однако, названные результаты демонстрируют роль Ca^{2+} и АФК как внутриклеточных интермедиатов в эффектах относительно длительного закаливания растительных объектов повышенными температурами. В то же время в литературе практически отсутствуют прямые экспериментальные данные о роли АФК и ионов Ca^{2+} в формировании терморезистентности кратковременным закаливанием растений стрессовыми температурами. При этом зарегистрированные эффекты лаг-периода, необходимого для развития теплоустойчивости после таких воздействий, косвенно свидетельствуют о роли систем сигнальной трансдукции и индуцированного белкового синтеза в развитии теплоустойчивости [8]. В связи с этим мы оценивали роль белкового синтеза, про-/антиоксидантного и кальциевого статуса в проявлении эффекта кратковременного теплового закаливания растений на примере проростков двух таксономически отдалённых видов – сосны обыкновенной и пшеницы мягкой. Для этого проростки обрабатывали модификаторами кальциевого статуса (блокатор Ca^{2+} -каналов, антагонист кальмодулина, экзогенный Ca^{2+}), антиоксидантом и ингибитором белкового синтеза.

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили этилированные проростки сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Донецкая 48. Семена сосны проращивали в течение 12 сут, пшеницы – 4 сут при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Кратковременное закаливание создавали путём одноминутного прогрева в ванне водного ультра-термостата при температуре $46,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ для проростков сосны или $42,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ для проростков пшеницы. Тестирующие прогревы проводили в водном термостате в течение 10 мин при температурах $49,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ для сосны и $45,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ или $46,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ для пшеницы через 24 часа после закаливания. Как было установлено в предварительных опытах, именно при таких температурах закаливания и именно после 24-часового лаг-периода проявлялась максимальная теплоустойчивость обоих объектов.

Обработку проростков исследуемыми соединениями (ингибитор белкового синтеза циклогексимид (ЦГ), антиоксидант ионол (бутилгидрокситолуол), блокатор кальциевых каналов LaCl_3 , антагонист кальмодулина хлпромазин (ХП), хлорид кальция) начинали за 24 ч до закаливания. После закаливания в течение 24 ч

растительный материал опытных вариантов также выдерживали на растворах исследуемых соединений. В опытах по изучению комбинированного действия CaCl_2 и ионола обработку последним начинали за 2 ч до внесения в среду CaCl_2 . Контрольные проростки инкубировали на дистиллированной воде.

Как показали специальные опыты, обработка исследуемыми соединениями в используемых концентрациях не оказывала токсического влияния на проростки в нормальных (бесстрессовых) условиях.

Выживание проростков сосны и пшеницы определяли через 7 и 4 сут соответственно после повреждающего нагрева. В каждом варианте оценивали не менее 30 проростков в двукратной повторности. Каждый опыт повторяли независимо не менее 4-х раз. На рисунках приведены средние величины и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Закаливание вызывало значительное (на 30-40 %) повышение выживания проростков сосны и пшеницы после повреждающего нагрева (рис. 1-6).

Ингибитор синтеза белка на 80S рибосомах ЦГ сам по себе существенно не влиял на теплоустойчивость проростков сосны и пшеницы. В то же время в концентрациях 4-20 мкМ антибиотик в значительной степени подавлял эффект теплового закаливания проростков обоих видов (рис. 1). Полученные нами данные не согласуются с результатами, приведёнными в работах [1, 7], где показано отсутствие угнетения эффекта кратковременного закаливания ингибиторами синтеза белка. Такое противоречие, по-видимому, связано с разными методами оценки теплоустойчивости. В работах [1, 7] оценивалась первичная теплоустойчивость по изменению температуры нагрева, вызывающего прекращение движения цитоплазмы у 50 % клеток. Выживание же растительных объектов можно рассматривать как интегральный показатель теплоустойчивости, включающий в себя как первичную устойчивость, так и эффект репарации [2].

Снятие эффекта закаливания проростков влиянием ЦГ свидетельствует о роли индуцирования белкового синтеза в формировании теплоустойчивости. Можно полагать, что подобный эффект будет зависеть от функционирования системы трансдукции стрессовых сигналов (сигнала теплового закаливания). Как уже от-

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ

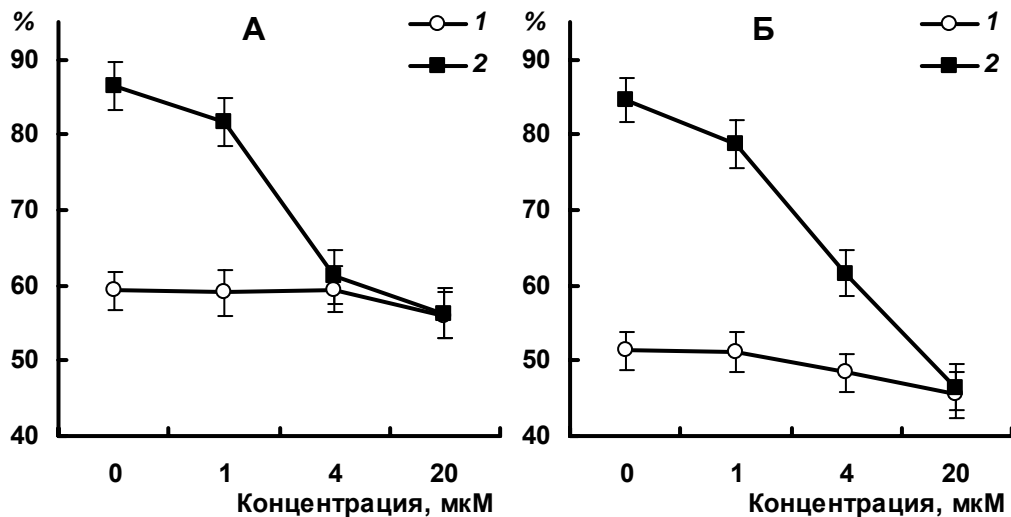


Рис. 1. Влияние закаливания и циклогексимида на выживание проростков сосны (А) и пшеницы (Б) после теплового стресса (10 мин при 49°C и 45°C для сосны и пшеницы соответственно). Тут и на рис. 2-5: 1 – не закаленные, 2 – закаленные.

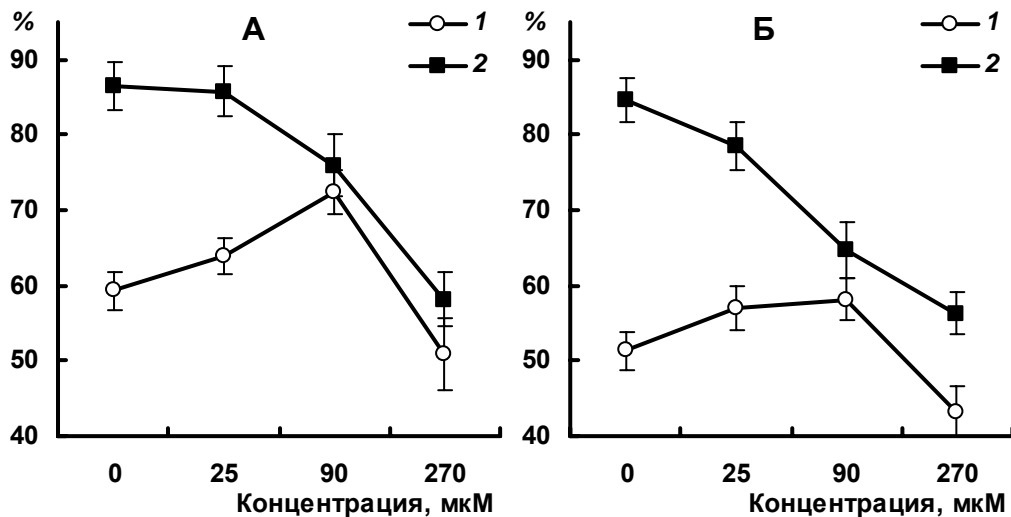


Рис. 2. Влияние закаливания и ионола на выживание проростков сосны (А) и пшеницы (Б) после теплового стресса (10 мин при 49°C и 45°C для сосны и пшеницы соответственно). Обозначения как на рис. 1.

мечалось, важными компонентами сигнальной сети являются АФК и ионы Ca^{2+} . Для выяснения их значения в процессе теплового закаливания использовали обработку растительных объектов антиоксидантом и модификаторами Ca^{2+} -статуса.

Антиоксидант ионол в концентрации 90 мкМ несколько повышал теплоустойчивость проростков двух видов (рис. 2), что, по-видимому, связано с его прямым действием как антиоксиданта и защитой растительных тканей от окислительных повреждений [5]. Более высокая концентрация антиоксиданта несколько снижала теплоустойчивость. Ионол во всех концентрациях, по крайней мере, частично, нивелировал проявление эффекта закаливания

(рис. 2), что можно рассматривать как свидетельство роли АФК в запуске реакций, необходимых для развития теплоустойчивости после закаливания.

Блокатор Ca^{2+} -каналов LaCl_3 в концентрациях 1-4 мМ сам по себе не влиял на теплоустойчивость проростков обоих видов, воздействие 5 мМ хлорида лантана снижало теплоустойчивость сосны (рис. 3). Обработка проростков сосны и пшеницы блокатором кальциевых каналов практически полностью снимала эффект повышения их теплоустойчивости, вызываемый закаливанием.

Антагонист кальмодулина XII в концентрационном диапазоне 5-50 мкМ существенно

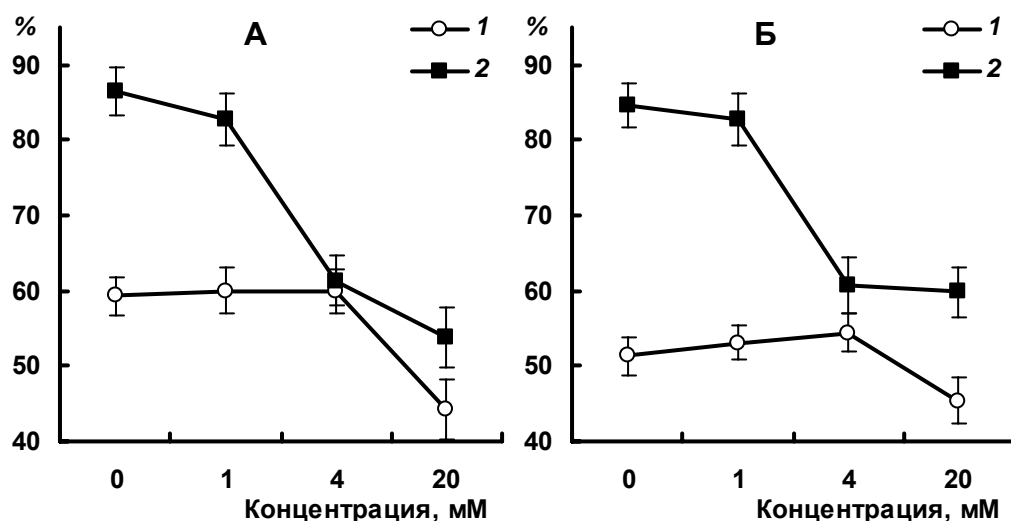


Рис. 3. Влияние закаливания и хлорида лантана на выживание проростков сосны (А) и пшеницы (Б) после теплового стресса (10 мин при 49°C и 45°C для сосны и пшеницы соответственно). Обозначения как на рис. 1.

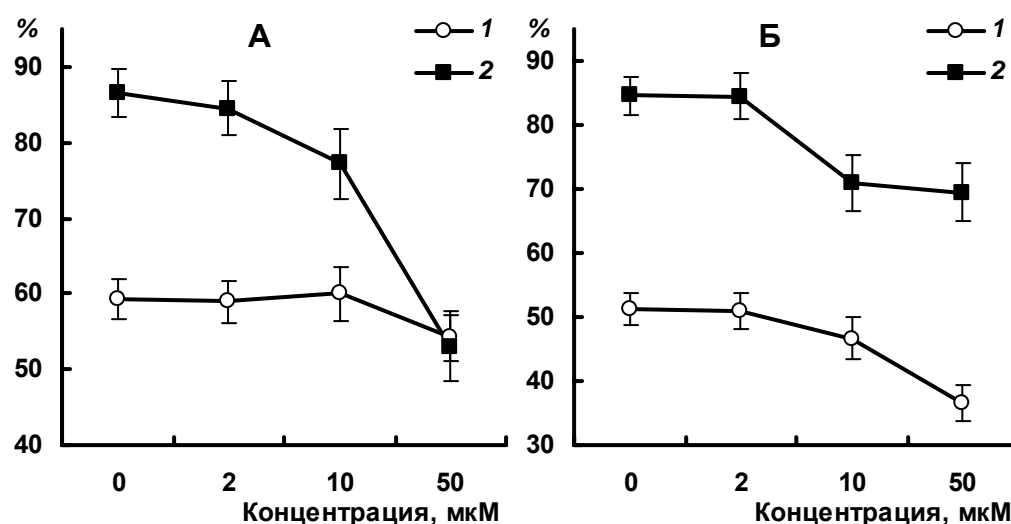


Рис. 4. Влияние закаливания и хлорпромазина на выживание проростков сосны (А) и пшеницы (Б) после теплового стресса (10 мин при 49°C и 45°C для сосны и пшеницы соответственно). Обозначения как на рис. 1.

не влиял на выживание проростков сосны после повреждающего нагрева, концентрация 50 мкМ снижала теплоустойчивость проростков пшеницы (рис. 4). В исследуемом диапазоне концентраций ХП, по крайней мере, частично снимал эффекты теплового закаливания, что можно рассматривать как свидетельство роли кальмодулина в индуцировании терморезистентности при действии закаливающей температуры.

Ингибирование эффекта закаливания блокаторм Ca^{2+} -каналов и антагонистом кальмодулина свидетельствует о важной роли Ca^{2+} как вторичного мессенджера в формировании терморезистентности.

Известно, что экзогенный Ca^{2+} может повышать теплоустойчивость растительных объектов [3, 4]. Более того, в литературе имеются сведения об отсутствии эффекта суммации действия теплового закаливания и экзогенного Ca^{2+} в повышении теплоустойчивости, на основании чего авторами сделан вывод о сходстве механизмов действия закаливания и Ca^{2+} . Одним из таких механизмов может быть повышение термостабильности белков [3]. В то же время в цитируемой работе [3] оценивалось влияние ионов Ca^{2+} и закаливания на первичную теплоустойчивость. Как уже отмечалось, такая оценка исключает выявление вклада репарации и, воз-

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ

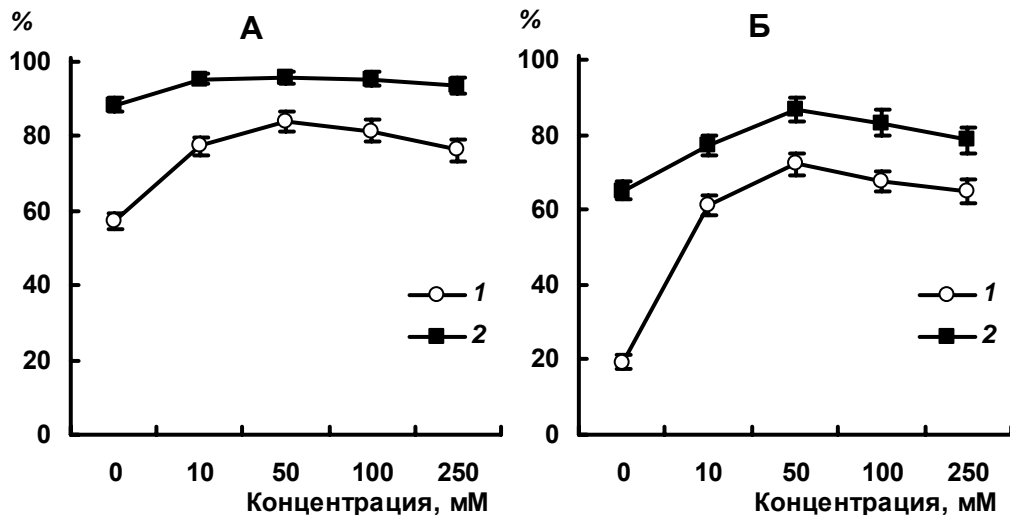


Рис. 5. Влияние закаливания и ионов кальция на выживание проростков пшеницы после теплового стресса (10 мин при 45,0°C (А) и 46,5°C (Б)). Обозначения как на рис. 1.

можно, других составляющих интегральной теплоустойчивости.

В связи с этим представляло интерес оценить влияние экзогенного Ca^{2+} на процесс развития теплоустойчивости после теплового закаливания растений.

В первых сериях опытов по изучению комбинированного действия Ca^{2+} и закаливания, в которых использовалась температура тестирующего прогрева 45,0°C, не было выявлено достоверных эффектов суммации их влия-

ния. Но при обработке проростков экзогенным Ca^{2+} в широком концентрационном диапазоне совместно с закаливанием прослеживалась тенденция к дополнительному повышению теплоустойчивости.

В связи с этим в дальнейших опытах по изучению комбинированного действия Ca^{2+} и закаливания температура тестирующего прогрева была увеличена до 46,5°C. Как показали результаты экспериментов, сочетание действия эффективных концентраций Ca^{2+} с закаливанием при более жестком стрессе привело к достоверному дополнительному повышению теплоустойчивости проростков по сравнению с влиянием Ca^{2+} или закаливанием в отдельности (рис. 5).

Ионол в значительной степени уменьшал влияние Ca^{2+} и эффект совместного действия закаливания и экзогенного кальция на теплоустойчивость проростков пшеницы. При этом влияние закаливания подавлялось антиоксидантом в большей степени, чем действие Ca^{2+} (рис. 6).

Менее существенное снятие ионолом эффектов экзогенного кальция, вероятно, объясняется способностью ионов Ca^{2+} непосредственно повышать термостабильность белков и устойчивость мембранных комплексов [2, 13].

Есть основания полагать, что дополнительное повышение теплоустойчивости проростков при сочетании действия Ca^{2+} и закаливания может быть связано как со стабилизацией белков и биомембран под действием Ca^{2+} , так и с индуцированием с его помощью систем передачи стрессовых сигналов и, как следствие, за-

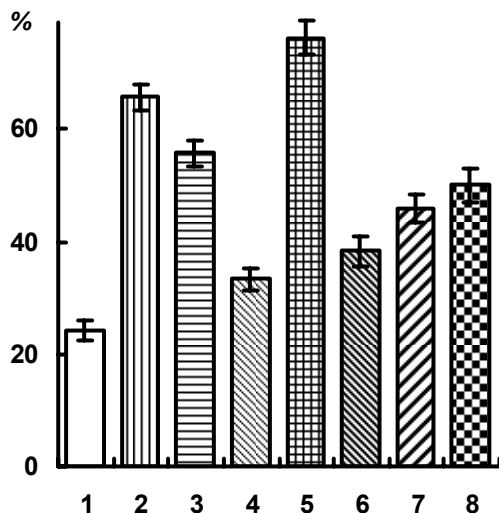


Рис. 6. Влияние закаливания, хлорида кальция (50 мМ) и ионола (90 мкМ) на выживание проростков пшеницы после теплового стресса (10 мин, 46,5°C): 1 – контроль; 2 – закаливание; 3 – кальций; 4 – ионол; 5 – закаливание + кальций; 6 – закаливание + ионол; 7 – кальций + ионол; 8 – закаливание + кальций + ионол.

пуском тех механизмов устойчивости, которые не могут быть активированы только закаливанием. С учётом возможных связей между Ca^{2+} и АФК представляло интерес сравнить влияние иона на эффекты модификации теплоустойчивости, вызываемые сочетанием действия Ca^{2+} и закаливания.

Антиоксидант в значительной степени (более чем на 26 %) подавлял повышение теплоустойчивости, вызываемое сочетанным действием закаливания и ионов кальция (рис. 6). При этом степень подавления теплоустойчивости ионолом в варианте с сочетанием действия кальция и закаливания была приблизительно такой же, как и в варианте с одним закаливанием. Этот факт в какой-то мере может свидетельствовать в пользу предположения о роли АФК в реализации эффектов и кальция, и закаливания. Не исключено, что при посредничестве АФК закаливание и экзогенный кальций могут индуцировать разные защитные механизмы, поскольку антиоксидант подавлял вызываемое ионами Ca^{2+} дополнительное увеличение теплоустойчивости при сочетанном действии кальция и закаливания.

Безусловно, такие рассуждения априорны и требуют целого комплекса экспериментальных доказательств. В первую очередь необходимо количественно оценить степень интенсификации образования АФК, вызываемую закаливанием, ионами кальция и их сочетанным действием.

В целом же, на основании проведенных нами экспериментов с использованием ингибитора белкового синтеза, антагонистов кальция и антиоксиданта, можно утверждать развитие теплоустойчивости растений, индуцированное кратковременным высокотемпературным воздействием, включает в себя трансдукцию сигнала закаливания с участием Ca^{2+} и АФК как внутриклеточных мессенджеров и индуцированный биосинтез белков. Системы, задействованные в реализации эффектов кратковременного закаливания, вероятно, не зависят от таксономической принадлежности растений, поскольку сходные феномены угнетения эффекта кратковременного теплового закаливания указанными соединениями проявлялись практически в одинаковой степени у двух таксономически отдаленных видов – сосны обыкновенной и пшеницы мягкой.

Необходимо заметить, что выявленные феномены проявлялись при оценке интегрального показателя теплоустойчивости, который

зависит как от первичной теплоустойчивости, так и от репарационной способности растительных клеток. Полученные результаты не согласуются с данными авторов, которые определяли первичную теплоустойчивость растительных клеток после закаливания. Развитие первичной теплоустойчивости при кратковременном тепловом закаливании, вероятно, может происходить за счет механизмов, не связанных с индуцированным биосинтезом белка [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Акимова Т.В., Мешкова Е.А., Тутов А.Ф.* Динамика теплоустойчивости клеток листа при локальном и общем прогреве проростков пшеницы в присутствии 6-бензиламинопурина // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2002. – № 9(1). – С. 31-36.
2. *Александров В.Я.* Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
3. *Барабальчук К.А.* Влияние ионов кальция, марганца, магния и калия на устойчивость растительных клеток // *Цитология.* – 1970. – Т. 12, № 5. – С. 609-621.
4. *Колупаев Ю.Е.* Кальций и стрессовые реакции растений // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24-41.
5. *Колупаев Ю.С., Карпец Ю.В.* Активні форми кисню як посередники в індукуванні теплостійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 242-248.
6. *Кузнецов Вл.В.* Индуцибельные системы и их роль при адаптации растений к стрессорным факторам: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Кишинев, 1992. – 74 с.
7. *Тутов А.Ф., Дроздов С.Н., Таланова В.В., Акимова Т.В.* О механизмах повышения теплоустойчивости растений при краткосрочном и длительном действии высоких температур // *Физиология растений.* – 1987. – Т. 34, № 1. – С. 171-177.
8. *Тутов А.Ф., Акимова Т.В., Крупнова И.В.* Особенности начального периода холодной и тепловой адаптации растений (феноменологический аспект) // *Физиология растений.* – 1989. – Т. 36, вып. 4. – С. 717-723.
9. *Dat J.F., Delgado H.L., Foyer C.H., Scott I.M.* Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 116. – P. 1351-1357.

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ

10. *Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M.* Changes in salicylic acid and antioxidant during induced thermotolerance in mustard seedlings // *Ibid.* – 1998. – V. 118. – P. 1455-1461.
11. *Gong M., Li Y.J Dai Xum Tian Mei, Li Z.-G.* Involvement of calcium and calmoduline in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings // *J. Plant Physiol.* – 1997.- V. 150. – P. 615-621.
12. *Gong M., Van der Luit A. H., Knight M.R., Tre-wavas A.J.* Heat-shock – induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedling in relation to thermotolerance // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 116, N 1. – P.429-437.
13. *Gomes-Lepe B. E., Lee-Stadelmann O. K. J., Polta J. P., Stadelmann E. S.* Effect of octyleguanidine on cell permeability and of her protoplasmic properties of *Allium cepa* epidermal cells // *Ibid.* – 1979. – V. 64, N 1. – P.136-138.
14. *Lin S., Zhang Z.* Effect of cold acclimation and $CaCl_2$ on total soluble protein, CaM and freezing resistance of *Populus tomentosa* seedlings // *Forest Stud. China.* – 2002. – V. 4, N 1. – P. 5-12.
15. *Suzuki N, Mittler R.* Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 45-51.

Поступила в редакцию
05.10.2007 г.

ABOUT POSSIBLE MECHANISMS OF THE HEAT RESISTANCE INDUCTION OF SOFT WHEAT AND SCOTCH PINE PLANTLETS BY SHORT-TERM HEAT ACTION

Yu. V. Karpets

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

Short-term hardening of the scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) and winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.) bleached-out plantlets by one-minute heating in the bath of ultrathermostat (46°C for a pine and 42°C for wheat) caused substantial increase of plantlets heat resistance through 24 hours after hardening temperature action. Treatment of two species plantlets by the protein synthesis inhibitor cycloheximide, calcium channels blocker lanthanum chloride, antagonist of calmodulin chlorpromazine and antioxidant ionol led to significant reduction of effect of hardening. The action of exogenous calcium on plantlets in itself raised their heat resistance and in addition increased a survival of the hardened plantlets. Effects of calcium were substantially oppressed with the ionol action. It is drawn a conclusion, that the development of plants heat resistance, induced by the short-term high-temperature influence, includes the hardening signal transduction with participation of the Ca^{2+} and reactive oxygen species as the endocellular messengers and the induced proteins synthesis.

Key words: *Pinus sylvestris* L., *Triticum aestivum* L., hardening, heat resistance, reactive oxygen species, calcium, induced protein synthesis

ПРО МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ІНДУКУВАННЯ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ І СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ КОРОТКОЧАСНОЮ ДІЄЮ ВИСОКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Ю. В. Карпець

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

Короткочасне загартування етіологованих проростків сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) і озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) шляхом однохвилинного прогрівання у ванні ультратермостата (46°C для сосни і 42°C для пшениці) викликало значне підвищення теплостійкості проростків через 24 год після дії загартовуючої температури. Обробка проростків

КАРПЕЦ

двох видів інгібітором білкового синтезу циклогексимідом, блокатором кальцієвих каналів хлоридом лантану, антагоністом кальмодуліну хлорпромазином і антиоксидантом іонолом призводила до значного зменшення ефекту загартування. Вплив на проростки екзогенного кальцію сам по собі підвищував їх теплостійкість і додатково збільшував виживання загартованих проростків. Ефекти кальцію значною мірою пригнічувалися дією іонолу. Зроблений висновок, що розвиток теплостійкості рослин, індукованої короткочасною високотемпературною дією, включає трансдукцію сигналу загартування з участю Ca^{2+} і активних форм кисню як внутрішньоклітинних месенджерів та індукований синтез білків.

Ключові слова: *Pinus sylvestris L., Triticum aestivum L., загартування, теплостійкість, активні форми кисню, кальцій, індукований синтез білка*