

МОЖЛИВА УЧАСТЬ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У ТРАНСГЕНЕРАЦІЙНОМУ ІНДУКУВАННІ СТІЙКОСТІ РОСЛИН *Arabidopsis thaliana* ДО УФ-В ОПРОМІНЕННЯ

Вивчали вплив опромінення рослин Arabidopsis thaliana малими дозами ультрафіолету В на їх стійкість до даного фактору в наступному поколінні. Показано, що малі дози УФ-В опромінення індукують у рослин A. thaliana горметичні ефекти та адаптивну відповідь. Ступінь прояву цих ефектів в опроміненних рослин і їх неопроміненних нащадків залежить від функціонування жасмонатної і саліцилатної сигнальних систем.

Ключові слова: УФ-В, A. thaliana, адаптація, успадкування, сигнальні системи.

Изучали влияние облучения растений Arabidopsis thaliana малыми дозами ультрафиолета В на их устойчивость к данному фактору в следующем поколении. Показано, что малые дозы УФ-В облучения индуцируют у растений A. thaliana горметические эффекты и адаптивный ответ. Степень проявления этих эффектов у облученных растений и в их необлученных потомков зависит от функционирования жасмонатной и салицилатной сигнальных систем.

Ключевые слова: УФ-В, A. thaliana, адаптация, наследование, сигнальные системы.

The effect of low dose UV-B radiation of Arabidopsis thaliana on their resistance to this factor in the next generation was investigated. It was shown that low dose UV-B radiation induces gormesis and adaptive response in A. thaliana plants. The degree of manifestation of these effects in irradiated plants and their unirradiated progenies depends upon functioning of jasmonate and salicylate signal systems.

Key words : UV-B, A. thaliana, adaptation, inheritance, signal systems.

УФ-В радіація, потік якої постійно збільшується внаслідок виснаження озонового шару в атмосфері, ушкоджує ДНК, білки, мембранні структури клітин та справляє мутагенний вплив на живі істоти. У процесі еволюції рослини розвинули системи сприйняття УФ-В та ефективні захисні механізми.

У рослин функціонують різні механізми захисту від УФ-В опромінення. Головними з них є синтез УФ-поглинаючих сполук та репарація ушкоджень ДНК. Синтез УФ-поглинаючих сполук є добре вивченою захисною реакцією. Рослини здатні синтезувати ефіри гідроксикоричної кислоти, флавоноїди, флавоноли та флаволи. Уважається, що флавоноїди та деякі інші фенольні сполуки накопичуються, головним чином, у верхньому шарі епідермальних клітин і локалізовані у клітинних стінках, вакуолях та волосках листя. Вони перешкоджають УФ-В опроміненню досягти мезофільних клітин та зашкодити фотосинтезу [1].

Чутливість до УФ-В визначається балансом між ушкодженнями, що накопичуються в клітинах, та ефективністю їх репарації. Захист від ушкоджень, індукованих УФ-радіацією, є складним процесом, у якому беруть участь ферментативні та неферментативні механізми. До ферментативних механізмів належать репарація ушкоджень ДНК та елімінація активних

форм кисню. До неферментативних захисних механізмів від УФ-В належать перехоплювачі вільних радикалів: поліаміни та флавоноїди – як фільтри УФ-В опромінення.

Узагалі, захист рослин від УФ-В опромінення, пов'язаний із диференціальною експресією багатьох генів [2; 3]. Отже, адаптація рослин, підвищення їх стійкості до УФ-В опромінення має бути наслідком зміни епігенетичної регуляції цих генів.

Зміна експресії генів у рослин і пов'язані з цим модифікації їх стійкості, які відбуваються під впливом біогенних і абіогенних факторів, опосередковується різними сигнальними системами.

Після поглинання УФ-В радіації рослиною інформація має бути передана через клітину або тканину до мішені, де має проявитись відповідь. Ця передача часто позначається як шляхи трансдукції сигналу і представлена вторинними месенджерами, механізмами ампліфікації і відповідними речовинами в клітині. Компоненти цього шляху можуть включати різні сигнальні системи НАДФН-оксидазну, кальцієву, ліпоксигеназну, NO-синтазну та інші [4; 5].

Метою нашого дослідження було з'ясування можливої ролі саліцилатної і жасмонатної сигнальних систем у формуванні стійкості рослин A. thaliana до

Таблиця 1

Вплив адаптуючого УФ-В опромінення проростків *A. thaliana* на швидкість росту кореня після ушкоджуючого опромінення

Варіанти УФ-В опромінення, Дж/м ²	Приріст довжини кореня, %		
	1	2	5
Контроль	100	100	100
170	81	46	78
35+3 год+170	89	93	101

Разом із тим, лінійної залежності ефекту від дози УФ-В випромінювання не виявлено. При значно більших дозах (до 3-5 кДж/м²) швидкість росту кореня у Col-0 і дефіцитних за саліцилатною сигнальною системою (*Nah G*) рослин не відрізнялася або навіть дещо перевищувала цей показник у неопромінених рослин. У рослин, дефектних за жасмонатною сигнальною системою (*Jin*), при опроміненні в даних дозах виявлено 10-35 % пригнічення росту кореня. Не виключено, що обидві сигнальні системи беруть участь у формуванні стійкості рослин *A. thaliana* до УФ-В, але роль жасмонатної системи більша.

Отже, одноразове опромінення 3-5-денних проростків у малій дозі призводить до формування захисної реакції (адаптивної відповіді) уже протягом трьох годин. У природних умовах УФ-В опромінення відбувається кожен день протягом усього онтогенезу. Можливість успадкування стійкості до УФ-В показана в ряді публікацій. Зокрема, це встановлено для семи екотипів *A. thaliana* і їх F₁ гібридів [6]. Вплив на рослини *Arabidopsis* стресів, у тому числі засолення, УФ-С, холоду, спеки і вимокання приводить до вищої частоти гомологічної рекомбінації, збільшення метилування геному, більшої толерантності до стресів у необробленого потомства [7]. Проте, ці трансгенераційні ефекти не зберігаються в наступних поколіннях. Тому наступним завданням було з'ясувати, чи відбувається за таких умов адаптація і як змінюється здатність до адаптації з віком рослин.

Було показано, що кількість стручків, утворених рослинами, які в різному віці зазнали впливу адаптуючих й ушкоджуючих доз УФ-В опромінення (див. Матеріали...) змінювалася в залежності від дози, генотипу і вікової групи. Однак, у цілому, у діапазоні доз 100-500 Дж/м² спостерігали зростання генеративного потенціалу. Найбільшим воно було в рослин молодшої групи Col-0 і приблизно на тому ж рівні у *Nah G*. Аналіз кількості стручків після ушкоджуючого опромінення (6 кДж/м²) свідчить про виникнення адаптивної відповіді після опромінення рослин даних двох генотипів у малих дозах. У рослин, дефектних за жасмонатною сигнальною системою (*Jin*), очевидно, найнижчий адаптивний потенціал. Адаптивна відповідь у першій віковій групі не формується, а додаткове тест-опромінення посилює негативний ефект. Здатність до формування адаптивної відповіді зменшувалася з віком у рослин усіх досліджених генотипів.

Таким чином, періодичне опромінення рослин *Athaliana* протягом більшої, особливо початкової, частини онтогенезу малими дозами УФ-В призводить до горметичних ефектів і формування адаптивної відповіді. Насіння (F₁), зібране на рослинах, які зазнали

УФ-В опромінення, а також вивчення успадкування адаптивних змін у наступних поколіннях.

Матеріали і методи. Досліди проводили на рослинах *A. thaliana* дикого типу (екотип Columbia – Col-0), а також трансгенних рослинах, нездатних накопичувати саліцилову кислоту внаслідок експресії бактеріального гена саліцилатгідроксилази (*Nah G*) і мутантах, нечутливих до жасмонату (*Jin*).

Стерильне насіння (3 % H₂O₂:етанол = 1:1, 4 хв.) висівали в чашки Петрі на стерильне агаризоване середовище Ленгріджа-Квітко і після двох-трьох діб стратифікації в холодильнику встановлювали чашки з нахилом для пророщування при температурі 22-25°C (8 год. – темрява, 16 год. – світло). Чашки з 3-5-денними проростками опромінювали різними дозами УФ-В при знятій кришці (3 лампи Philips TL 20W/RS, λ = 280-320 нм, відстань – 20 см, 11,7 Вт/м²). Ефект різних доз оцінювали за довжиною коренів опромінених і неопромінених проростків через 3-5 діб після опромінення або в проростків наступного покоління, які не зазнали опромінення.

В іншій серії дослідів рослини *A. thaliana* вирощували в пластикових посудинах на піску, зволоженому середовищем Ленгріджа-Квітко (4 рослини на посудину). Починаючи з триденного віку і до початку утворення бутонів (33 доби), рослини опромінювали в адаптуючих дозах 100, 250 і 500 Дж/м² один раз на добу щодня або з інтервалом у 2-3 доби. Рослини молодшої (3-15 діб), середньої (16-22 діб) і старшої (25-33 діб) вікових груп зазнали 5-6 адаптуючих опромінь. Через три доби після останнього адаптуючого опромінення рослини кожної серії опромінювали в ушкоджуючій дозі 6 кДж/м². Вплив опромінення оцінювали за кількістю стручків, що утворилися.

Результати та обговорення. Показано, що 3-5-денні проростки *A. thaliana* (Col-0) є високочутливими до УФ-В опромінення. Після опромінення в дозі 170 Дж/м² помітне істотне зменшення швидкості росту кореня протягом наступних трьох діб (таблиця), хоча величина ефекту дещо варіювала в різних дослідах (три повторності). Опромінення проростків у дозі 35 Дж/м² також призводило до деякого уповільнення росту кореня.

Ефект ушкоджуючого опромінення (170 Дж/м²) був набагато меншим, якщо йому передувало (за три години) опромінення в дозі 35 Дж/м². Очевидно, ця доза є адаптуючою й індукувала процеси, які вже протягом трьох годин приводили до адаптації і зменшували негативний вплив ушкоджуючої (170 Дж/м²) дози УФ-В опромінення.

Так, при 3-годинному інтервалі між адаптуючим і ушкоджуючим опроміненням (35+3 год+170), приріст довжини кореня з 46-81 % після одного лише ушкоджуючого опромінення (170 Дж) зростав у різних дослідах до 89-100 %.

Одержані дані свідчать, що опромінення рослин у малих дозах приводить до адаптації і зменшення негативного впливу ушкоджуючих доз УФ-В опромінення. Підвищення стійкості до УФ-В опромінення вже протягом 3-х годин свідчить про те, що в цьому процесі задіяні механізми фотореактивації.

УФ-В опромінення в F₀, пророщували протягом трьох діб у чашках Петрі. Триденні проростки опромінювали в дозі 10 кДж/м² або ж залишали неопроміненими і через три доби вимірювали довжину коренів.

Показано, що адаптує опромінення рослин F₀ усіх трьох генотипів призводить до стимуляції росту коренів у рослин наступного (F₁) неопроміненого покоління (рисунок 1).

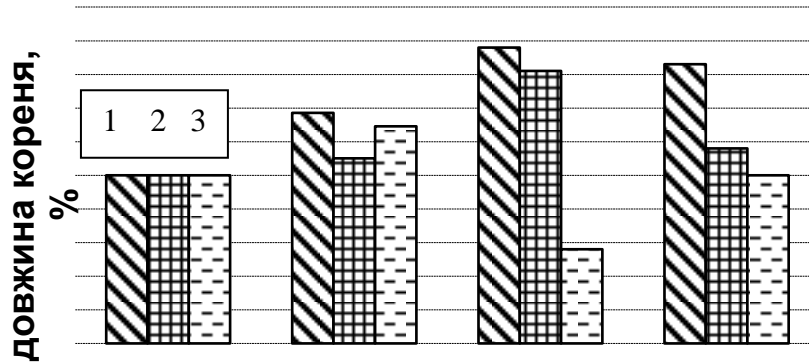


Рис. 1. Вплив УФ-В опромінення рослин *A. thaliana* (доза 100 Дж/м²) у F₀ на довжину кореня проростків у F₁; 1, 2, 3 – молодша, середня і старша вікові групи

Однак, є відмінності в прояві стимуляції залежно від віку рослин і дози опромінення. У рослин Col-0 істотна стимуляція є лише при мінімальній адаптуєчій дозі 100 Дж. У рослин, дефектних за саліцилатною (*Nah G*) і жасмонатною (*Jin*) сигнальними системами, максимальна стимуляція показана також при 100 Дж, але вона істотна також і при 250 і 500 Дж. Помітно, що зі старінням рослин їх здатність до стимуляції в F₁ зменшується.

Опромінення в дозі 10 кДж/м² справляло менш шкідливий вплив на проростки F₁, які сформувалися з насіння у варіантах, що зазнали адаптуєчого опромінення в F₀ у всіх трьох генотипів. Виявлена тенденція до зменшення адаптивної відповіді з віком рослин.

Висновки. Таким чином, УФ-В опромінення рослин у малих дозах на різних стадіях онтогенезу протягом вегетації в F₀ призводить до формування і трансгенераційної передачі гормезису і адаптивної відповіді. Ступінь прояву досліджених ефектів залежав від віку рослин і функціонування жасмонатної і саліцилатної сигнальних систем. Стимуляція й адаптивна відповідь найбільша в молодих рослин і зменшується зі зростанням їх віку на момент адаптуєчого опромінення. Рослини дикого типу (Col-0) і дефектні за саліцилатною сигнальною системою (*Nah G*) виявились більш стійкими до великих доз УФ-В опромінення, ніж жасмонат-дефектні. Це дозволяє висловити припущення, що ліпоксигеназна сигнальна система, активними компонентами якої є жасмонова кислота та жасмонат [8], задіяна у передачі трансгенераційного сигналу та індукції стійкості рослин *A. thaliana* до УФ-В.

Загалом, про молекулярні механізми, що беруть участь у сприйнятті УФ-В та подальшої трансдукції сигналу, відомо ще небагато. Установлено, що під впливом УФ-В відбувається ряд змін у плазмалемі рослинних клітин [9], а саме – витікання K⁺, деполаризація мембрани, синтез H₂O₂, окиснення глутатіону. У цитоплазмі опромінених клітин збільшується концентрація Ca²⁺, який накопичується також в ядрі і навколо нього.

УФ-В опромінення є сильним індуктором синтезу патоген-залежних (PR) білків у рослин, які утворюються у відповідь на біотичні та абіотичні стреси. Індуковане УФ-В опроміненням накопичення PR-білків у листі тютюну інгібується антиоксидантами та циклогексимідом, що свідчить про необхідність АФК та синтезу білку для трансдукції сигналу [10].

Механічні подразнення, поранення некротрофними патогенами активують ліпоксигеназний сигнальний шлях та подальший синтез стресових білків. Одним із продуктів цього шляху є жасмонат, що може утворюватись у ході окиснювальної деградації октадекатрієнової та гексадекатрієнової жирних кислот [8].

Наслідком включення ліпоксигеназної сигнальної системи є утворення оксигенованих похідних жирних кислот – оксиліпінів, багато з яких індуюють експресію «захисних» генів. Родина оксиліпінів нараховує декілька десятків сполук, причому постійно з'являються повідомлення про відкриття нових її представників [4]. І хоча конкретні молекулярні механізми активації генів різними оксиліпінами ще недостатньо вивчені, можливо, що останні здатні викликати експресію генів, що кодують білки, які беруть участь у підвищенні стійкості рослин до УФ-В опромінення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Caldwell M. M. Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants / M. M. Caldwell, R. Robberecht, S. D. Flint // *Physiol. Plant.* – 1983. – 58. – P. 445–450.
2. Brown V. A. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection / V. A. Brown, C. Cloix Jiang [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2005. – 102. – P. 18225–18230.
3. Ulm R. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis / R. Ulm, A. Baumann, A. Oravec, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – 101 (5). – P. 1397–402.
4. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М. : Наука. – 2002. – 294 с.

5. Дмитриев А. П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс / А. П. Дмитриев // Физиол. растений. 2003. № 3. – С. 1–10.
6. Torabinejad J. Inheritance of UV-B tolerance in seven ecotypes of *Arabidopsis thaliana* Heynh. and their F₁ hybrids/ J. Torabinejad, M. M. Caldwell // J. Hered. – 2000. – 91(3). – P. 228–233.
7. Boyko A. Transgenerational Adaptation of Arabidopsis to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer-Like Proteins / A. Boyko, T. Blevins, Y. Yao, A. Golubov, A. Bilichak, [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – 5 (3): e9514. doi:10.1371/journal.pone.0009514.
8. Лапа О. М. Салициловая кислота в растениеводстве / О. М. Лапа, Р. В. Ковбасенко, В. М. Ковбасенко, О. П. Дмитриев. – Киев : Колобиг. – 2011. – 75 с.
9. Murphy T. M. Photoinactivation of superoxide synthases of the plasma membrane from rose (*Rosa damascena* Mill.) cells / T. M. Murphy, H. Vu // Photochem. Photobiol. – 1996. – 64. – P. 106–109.
10. Green R. UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species / R. Green, R. Fluhr // Plant Cell. – 1995. – 7. – P. 203–212.

Рецензенти: **Кутлахмедов Ю. О.**, д.б.н., професор Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ);
Петрук В. Г., д.х.н., професор Вінницького національного технічного університету (м. Вінниця).

© Гуща М. І., Шиліна Ю. В., Дмитрієв О. П., 2013 Дата надходження статті до редколегії 09.04.2013 р.

ГУЩА Микола Іванович – к.б.н., старший науковий співробітник відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ.

Коло наукових інтересів: радіаційна біологія, радіаційна екологія, проблеми адаптації організмів, імунітет рослин.

ШИЛІНА Юлія Володимирівна – к.б.н., старший науковий співробітник відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ.

Коло наукових інтересів: радіаційна біологія, радіаційна екологія, екологія мікроорганізмів, імунітет рослин.

ДМИТРИЄВ Олександр Петрович – член-кореспондент НАН України, професор, д.б.н., завідувач лабораторії імунітету рослин відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України.

Коло наукових інтересів: імунітет рослин, індукована стійкість, біотехнології захисту рослин, радіаційна екологія.