

# 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 опромінених рослин і їх неопромінених 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, мембрани структури клітин та спрямлює 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 вивчену захисною реакцією. Рослини здатні синтезувати ефіри гідроксикоричної кислоти, флавоноїди, флавоноли та флавони. 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, кальціеву, ліпоксигеназну, NO-сінтазну 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 <sup>2</sup>	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 випромінення не виявлено. При значно більших дозах (до 3-5 кДж/м<sup>2</sup>) 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 ушадкування стійкості до УФ-В показана в ряді публікацій. Зокрема, це встановлено для семи екотипів *A. thaliana* і їх F<sub>1</sub> 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/м<sup>2</sup> 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/м<sup>2</sup>) 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 *A. thaliana* 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 ушадкування адаптивних змін у наступних поколіннях.

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

Стерильне насіння (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: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 пророшування 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/м<sup>2</sup>). 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/м<sup>2</sup> один раз на добу щодня або з інтервалом у 2-3 доби. Розсадини молодшої (3-15 діб), середньої (16-22 діб) і старшої (25-33 діб) вікових груп зазнали 5-6 адаптуючих опромінень. Через три доби після останнього адаптуючого опромінення рослини кожної серії опромінювали в ушкоджуючій дозі 6 кДж/м<sup>2</sup>. 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/м<sup>2</sup> 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/м<sup>2</sup> також призводила до деякого уповільнення росту кореня.

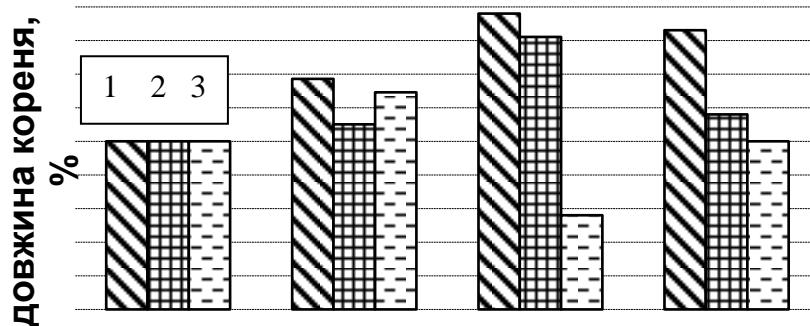
Ефект ушкоджуючого опромінення (170 Дж/м<sup>2</sup>) був набагато меншим, якщо йому передувало (за три години) опромінення в дозі 35 Дж/м<sup>2</sup>. Очевидно, ця доза є адаптуючою й індукувала процеси, які вже протягом трьох годин приводили до адаптації і зменшували негативний вплив ушкоджуючої (170 Дж/м<sup>2</sup>) 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 фотoreактивації.

УФ-В опромінення в F0, пророщували протягом трьох діб у чашках Петрі. Триденної проростки опромінювали в дозі 10 кДж/м<sup>2</sup> або ж залишали неопроміненими і через три доби вимірювали довжину коренів.

Показано, що адаптуюче 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/м<sup>2</sup>) 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 адаптуючій 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/м<sup>2</sup> справляло менш шкідливий вплив на проростки F1, які сформувалися з насіння у варіантах, що зазнали адаптуючого опромінення в F0 у всіх трьох генотипів. Виявлено 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 її адаптивна відповідь найбільша в молодих рослин і зменшується зі зростанням їх віку на момент адаптуючого опромінення. Рослини дикого типу (Col-0) і дефектні за саліцилатною сигнальною системою (*Nah G*) виявилися 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<sup>+</sup>, депополяризація мембрани, синтез H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, окиснення глутатіону. У цитоплазмі опромінених клітин збільшується концентрація Ca<sup>2+</sup>, який накопичується також в ядрі і навколо нього.

УФ-В опромінення є сильним індуктором синтезу патоген-залежніх (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 октадекатріеноної та гексадекатріеноної жирних кислот [8].

Наслідком включення ліпоксигеназної сигнальної системи є утворення оксигенованих похідних жирних кислот – оксиліпінів, багато з яких індукують 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 B. A. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection / B. 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. Oravecz, [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 F<sub>1</sub> hybrids/ J. Torabinejad, M. M. Caldwell // J. Hered. – 2000. – 91(3). – Р. 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. Саліцилова кислота в рослинництві / О. М. Лапа, Р. В. Ковбасенко, В. М. Ковбасенко, О. П. Дмитріев. – Київ : Колобіг. – 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. – Р. 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. – Р. 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).

© Гуша 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.

**ДМИТРІЄВ Олексадр 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.