

ВИЗНАЧЕННЯ КОРЕЛЯЦІЇ МІЖ ВМІСТОМ ПРОЛІНУ ТА ВОДИ У КОРЕНЯХ *PISUM SATIVUM L.* ПІД ВПЛИВОМ АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

О. Г. НЕСТЕРЕНКО, Н. М. РАШИДОВ

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна
e-mail: lenabq@ukr.net*

Абіотичний стрес вважається однією з основних причин втрати понад 50% врожаю різних культур в усьому світі. Пролін є важливою амінокислотою, яка бере участь у захисті живих клітин та адаптації цілого організму до впливу несприятливих факторів навколишнього середовища. Високий вміст проліну є широко поширеною реакцією рослин на різні стреси, зокрема осмотичні. Тому кількісна оцінка вмісту цієї амінокислоти важлива для оцінки «кроссток» сигнальних систем і для розуміння формування толерантності до стресів у рослин. Досліджувалось як іонізуюче опромінення змінює відповідь проростків гороху на сольовий стрес. Показано, що концентрація проліну може залежати від різних факторів, включаючи різні комбінації стресорів та їх дози. Отримані дані вказують на те, що після сольового стресу з попереднім опроміненням вміст вільного проліну в коренях збільшується. Іонізуюча радіація сама по собі на початкових етапах слабо впливає на концентрацію проліну, але здатна модифікувати послідовну відповідь проростків на сіль.

Найбільшу втрату вологи коренями рослин спостерігали через два тижні після впливу пошкоджуючих факторів. Коефіцієнт кореляції проліну та рівня води становив $r = -0,87$, але з часом цей показник відновлювався і стабілізувався приблизно на 34-й день експерименту ($r = 0,32$). Це пов'язано з тим, що внесення токсичних концентрацій солі провокувало осмотичний шок, призводило до зниження приросту біомаси, довжини кореня та вмісту води в тканинах рослин в порівнянні з контролем. Таке явище може бути пов'язано зі зниженням швидкості росту, коли потреба організму у воді зменшується, а обмін речовин переводиться в режим спокою, енергетичні процеси переключаються на підтримку цілісності рослини і відновлення пошкоджень. Так як ростові показники гороху різних експериментальних груп з часом мають тенденцію до відновлення, можна припустити, що з віддаленням у часі після подолання наслідків стресу кількість вільного проліну і води у рослинах досягнуть характерних для контрольних груп значень.

*Ключові слова: пролін, сольовий стрес, вміст води, іонізуюче випромінювання, кроссток сигнальних систем, стресові фактори, *Pisum sativum L.**

Вступ. Абіотичні стреси вважаються однією з головних причин втрати понад 50% врожаю більшості сільськогосподарських культур у світі (Athar, Ashraf, 2009). Вплив кожного зі стресових факторів окремо вже добре вивчено, проте в природних умовах живі організми піддаються їх спільній дії, що може впливати на загальний стан і розвиток рослин, зниження їх врожайності і прискорення старіння. При поєднанні стратегій відповіді на кожен з стресових факторів, виникає перехресна взаємодія сигнальних систем, тобто «кроссток» (Mundy et al., 2006), в наслідок чого формуються біохімічні шляхи метаболізму для здійснення активної реакції організму. Актуальним є дослідження того, як змінюється відповідь рослин на поєднану дію абіотичних стресових чинників і пошук «точок дотику» сигнальних шляхів. Неспецифічність і специфічність реакцій рослин на вплив різних стресорів спрямована на подолання, ослаблення або усунення їх шкідливої дії на рослинний організм (Шакирова, 2001).

Пролін (піролідин- α -карбонова кислота, $C_5H_9NO_2$) є одним з найбільш багатофункціональних стресових метаболітів рослин. Вважається, що крім осмопротекторної функції, він виконує шаперонну, антиоксидантну, сигнально-регуляторну та інші функції (Szabados, Savoure, 2009; Carvalho et al., 2013), надає осмо- і мембранопротекторну дію, бере участь в регуляції експресії генів антиоксидантних ферментів і у зв'язуванні металів зі змінною валентністю, впливає на баланс НАД(Ф)Н / НАД(Ф). При дії абіотичних факторів, зокрема тих, що призводять до осмотичного стресу, створюються умови для найбільш вираженого прояву зазначених ефектів проліну, одночасно негативно впливаючи на вміст води у органах рослин. Критерій зміни концентрації проліну враховується для оцінки фізіологічного стану рослинних організмів. Для з'ясування рівня стресованості рослинних об'єктів ми вирішили використати як критерій взаємозв'язок між вмістом води та концентрацією проліну у коренях гороху. Метою роботи було

вивчення модифікуючої ролі гострого іонізуючого опромінення в поєднанні з засоленням на формування реакції рослин за допомогою дослідження рівня накопичення проліну та вмісту води у коренях рослин, які характеризують молекулярно-генетичні, структурні та метаболічні зміни на початкових фазах росту і розвитку проростків гороху.

Матеріали та методи. Визначення впливу стресорів здійснювали на проростках гороху посівного (*Pisum sativum* L.) сорту "Аронис". Насіння гороху пророщували в термостаті в рулонній культурі. Горох на стадії 3-денних проростків піддавався гострому впливу стресових факторів, після чого продовжував культивуватися у водній культурі. В якості модифікуючого фактора було обрано гостре іонізуюче випромінювання (потужність дози становила 89 сГр / хв, сумарна доза варіювала від 0 Гр до 25 Гр). Після опромінення проводився короточасний вплив сольовим розчином (NaCl) в концентрації 0,22 Моль/л протягом години. Протягом місяця вимірювали рівень вмісту проліну та води в коренях рослин всіх експериментальних груп. Рослинний матеріал відбирали, зважували, заморожували і зберігали при -40°C, або висушували та екстрагували пролін з сухих зразків. Для визначення вмісту води, сухі зразки зважувалися повторно.

Вміст вільного проліну визначався за допомогою колориметричного аналізу з використанням нінгідрину (Carrillo et al., 2008; Carillo, Gibon, 2011). Коріння проростків гомогенізували, для екстракції використовували розчин етанолу та води в співвідношенні 70:30. Після додавання реакційної суміші (1% нінгідрину в оцтовій кислоті з етанолом) інкубували на киплячій водяній бані при 95°C протягом 30 хвилин. Потім пробірки різко охолоджували, щоб зупинити хід реакції, центрифугували і визначали оптичну щільність розчину нінгідрин-проліну на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм. Вміст проліну визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів L-проліну.

Статистичну обробку даних здійснювали на рівні $p < 5\%$ достовірності з застосуванням стандартних методів пакета Microsoft Excel-2007.

Результати та їх обговорення. У порівнянні з іншими абіотичними факторами сіль має подвійний вплив на рослини: токсичний вплив надлишку іонів і дію осмотичного стресу (Deinlein

et al., 2014; Діденко та ін., 2016). Накопичення проліну як осмотично активної органічної речовини має сприяти утриманню води в клітинах, захисту білків від пошкоджень.

Рівень вільного проліну в контрольних варіантах був прийнятий за 100%. Ми зафіксували максимальне підвищення концентрації цієї амінокислоти через три тижні після впливу солі. Після опромінення проростків в інтервалі доз 20-25 Грей концентрація проліну в рослинах після засолення перевищувала контрольний рівень у три рази. На другий день найбільше зростання показників проліну було виявлено у випадку використання високих доз іонізуючого опромінення (15-25 Гр, до 140% від контролю) і комбінації хлориду натрію з опроміненням у дозі 5 Грей або без нього (рис. 1). Це може бути пов'язано з активацією експресії генів білків, залучених у процеси метаболізму проліну, зокрема ключового ферменту його синтезу – пролін-5-карбоксилат редуктази, – ген P5CS (Huang et al., 2013).

Високі дози радіації, які спочатку стримували синтез проліну після засолення, через два тижні проявили себе негативним впливом на внутрішні структури клітини. Це призвело до активації захисних реакцій рослин, а також до активної відповіді клітин як підвищенням синтезу амінокислоти, так і деградацією структур з появою вільного проліну.

Загальне збільшення концентрації проліну на 13-34 добу після стресованості може бути наслідком фізіологічної деструкції клітинних стінок і активації інтеркалярної меристеми головного кореня. У той же час, опромінені і засолені проростки накопичили більшу кількість амінокислоти, ніж просто засолені, що говорить про втрату іонізуючим опроміненням протекторних властивостей на віддалених фазах розвитку гороху. Коливання накопичення проліну під дією різних стресорів та їх комбінацій протягом часу може вказувати на виникнення на певних етапах відповіді організму кросстока сигнальних систем, внаслідок чого можуть виникати інші сполуки, які впливають на систему синтезу амінокислоти, його деградацію, передачу сигналу та адаптивний потенціал рослини в цілому.

Для з'ясування рівня стресованості рослинних об'єктів у відповідь на пошкоджуючі фактори та їх поєднання як критерій використовувався взаємозв'язок між вмістом води та концентрації проліну у рослин.

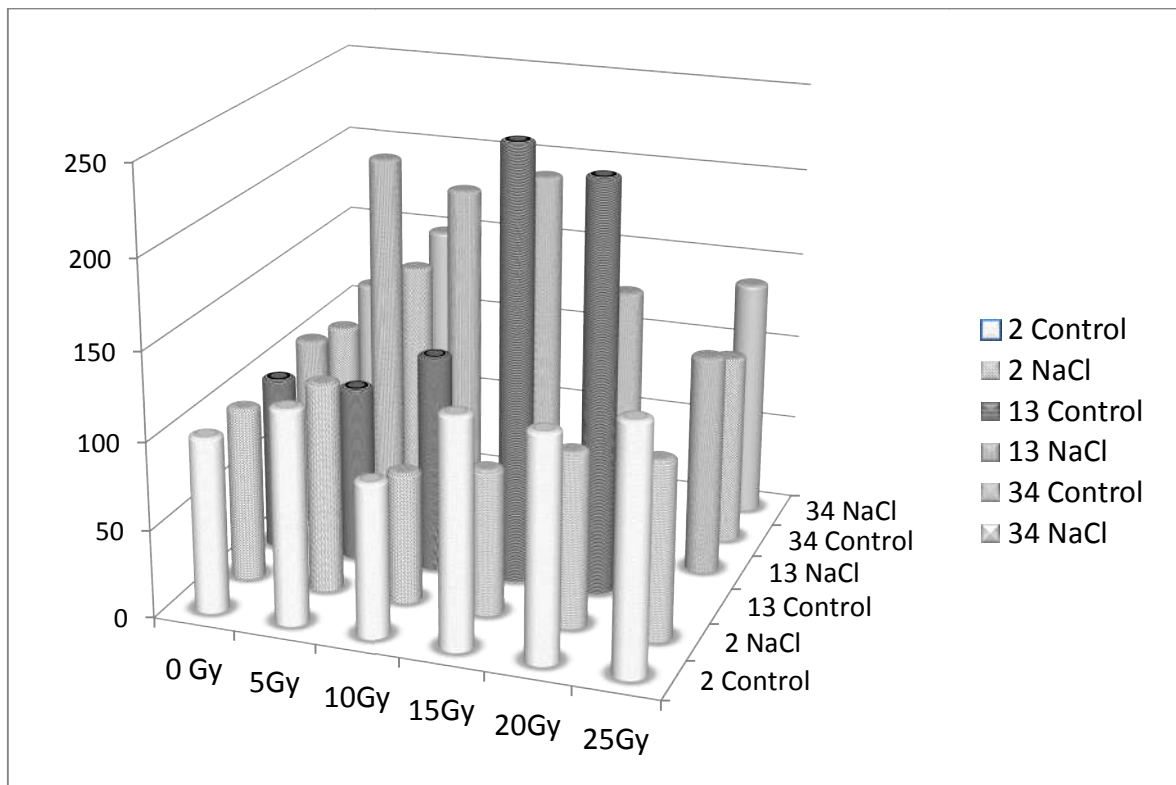


Рис. 1. Залежність концентрації вільного проліну в коренях рослин гороху через 2, 13 і 34 дні після засолення в поєднанні з попередньому опроміненням і без нього.

Fig. 1. Free proline concentration in the roots of pea in 2, 13 and 34 days after salinization, with or without irradiation.

Для цього визначали коефіцієнт кореляції на 2, 13 і 34 день експерименту (після впливу чинниками) і порівнювали вміст проліну в коренях гороху (мг/мл) з оводненням рослин (%) (рис. 2).

Найбільша втрата вологи коренями спостерігалася через два тижні після впливу стресорами. Коефіцієнт кореляції (r) був негативним $-0,87$, коли суха маса досягала 18%, але відновлювався і стабілізувався (на рівні приблизно 10% с.м.) через місяць після початку експерименту. Це пов'язано з тим, що внесення

токсичних концентрацій солі провокувало осмотичний шок, призводило до зниження приросту біомаси, довжини кореня рослин і вмісту води в тканинах рослин у порівнянні з контролем. У роботах по пшениці (Сакарийаво и др., 2001) було показано, що більш стійкі сорти показують відносно менше накопичення проліну у відповідь на одиницю зменшення вмісту води, і показана нами залежність може свідчити про різні ступені реалізації адаптаційних процесів у рослин.

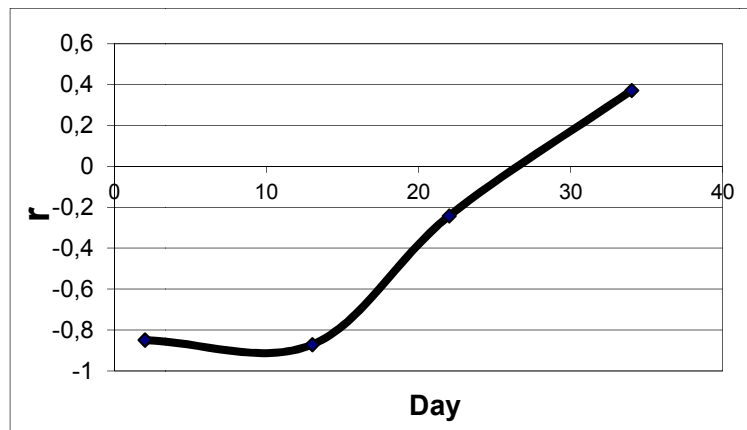


Рис. 2. Коефіцієнт кореляції між концентрацією проліну та вмістом води в коренях гороху з віддаленням у часі від моменту впливу стресових факторів

Fig. 2. Changes in correlation between proline level/content and water content in roots after the stressors influence

Було продемонстровано, що відновлення рівня води у коренях рослин через 22-34 дні росло і досягало максимальних значень, в деяких випадках перевищуючи контрольні значення.

Зменшення швидкості росту рослин нерідко пов'язують зі зменшенням вмісту води в тканинах організму. Була виявлена неоднозначність взаємозв'язків між проліном і вмістом води, так як спочатку спостерігалось зниження відносного вмісту води і наростання водного дефіциту, незважаючи на акумуляцію проліну після стресу (Французова и др., 2013). Через 3-4 тижні після початку експерименту спостерігали вже слабку але позитивну кореляцію ($r = 0.32$) між показниками. Концентрація амінокислоти зростала в порівнянні з першими днями після стресу і її рівень все ще перевищував контрольні значення, але одночасно з цим відбулася стабілізація водного статусу коренів. Коливання вмісту як води, так і проліну в проростків гороху може бути пов'язано з тим, що після дії стресових чинників на організм відбувається зміна гормонального статусу рослин. Це призводить до гальмування росту, при цьому і потреби організму у воді дещо зменшуються. Обмін речовин переводиться в режим відносного спокою, енергетичні процеси перемикаються на підтримку цілісності рослини, відновлення і репарацію пошкоджень. Також можливо, з огляду на роль проліну в передачі сигналу після стресових впливів, можливе його переміщення в інші органи рослин.

Висновки. В результаті експериментів було показано, що рівень накопичення вільного проліну і коренях гороху у відповідь на абіотичні стресові фактори коливається в широких межах.

Коефіцієнт кореляції між концентрацією проліну та вмістом води становив $r = -0.87$, але з часом рівень води в рослинах відновлювався і стабілізувався приблизно на 34-й день експерименту ($r = 0.32$). Концентрація проліну у відповідь на гостре іонізуюче опромінення змінювалася не так істотно, як при дії засолення або комбінації засолення та опромінення.

Здатність до одночасного збільшення різних типів стійкості вказує на функціонування в рослинах неспецифічних механізмів, які призводять до підвищення стійкості, чого достатньо для включення процесу формування спеціалізованих механізмів стійкості через кроссток сигнальних систем. Оскільки ростові показники гороху з часом мають тенденцію до вирівнювання, можна припустити, що з відтермінуванням у часі після подолання наслідків сольового стресу, кількість вільного

проліну і води у коренях рослин досягне значень, характерних для контрольних груп.

Подяка. Автори висловлюють вдячність співробітникам Інституту генетики рослин і біотехнології Словацької Академії Наук за надання можливості проведення досліджень, зокрема Katarina Klubicova та Viera Majercikova.

Список літератури

1. Athar H.R., Ashraf M. Strategies for Crop Improvement Against Salinity and Drought Stress: An Overview // Salinity and Water Stress. Tasks for Vegetation Sciences, vol 44. / Ashraf M., Ozturk M., Athar H. (eds). – Springer, 2009. – P. 1-18. doi: 10.1007/978-1-4020-9065-3_1
2. Carillo P., Gibon Y. Protocol: Extraction and determination of proline [online]. – 2011. – Available from: https://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline – [accessed 10 December 2017]
3. Carrillo S., López E., Casas M. M. et al. Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs // J. Appl. Phycol. – 2008. – Vol. 5, № 20. – P. 721–728.
4. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo // Mol. Biol. Rep. – 2013. – Vol. 40. – P. 3269–3279.
5. Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. Plant salt-tolerance mechanisms // Trends Plant Sci. – 2014. – Vol. 19, No 6. – P. 371–379.
6. Huang Z., Zhao L., Chen D., Liang M., Liu Z., Shao H., Long X. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem Artichoke plantlets // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, No 4. – P. 62–85.
7. Mundy J., Nielsen H.B., Brodersen P. Crosstalk // Trends Plant Sci. – 2006. – Vol. 11. – P. 63–64.
8. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2009. – V. 15, № 2. – P. 89–97.
9. Діденко Н.О., Волков Р. А., Панчук І. І. Вплив сольового стресу на вміст проліну та поліфенольних сполук у *Arabidopsis thaliana* // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 35–39.
10. Сакарийаво О.С., Холодова В.П., Мещеряков А.Б. Изменение содержания воды и пролина у разных по засухоустойчивости сортов пшеницы в ходе адаптации к водному дефициту и на этапе восстановления // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. – 2001. – С. 89–94.
11. Французова В.П., Олюнина Л.Н., Веселов А.П. Изменения водного режима проростков пшеницы при кратковременном гипертермическом

воздействии // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. – 2013. – 1(1). – С. 136-139.

12. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.

References

1. Athar H.R., Ashraf M. Strategies for Crop Improvement Against Salinity and Drought Stress: An Overview // Salinity and Water Stress. Tasks for Vegetation Sciences, vol 44. / Ashraf M., Ozturk M., Athar H. (eds). – Springer, 2009. – P. 1-18. doi: 10.1007/978-1-4020-9065-3_1
2. Carillo P., Gibon Y. Protocol: Extraction and determination of proline [online]. – 2011. – Available from: https://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline – [accessed 10 December 2017]
3. Carrillo S., López E., Casas M. M. et al. Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs // J. Appl. Phicol. – 2008. – Vol. 5, № 20. – P. 721–728.
4. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo // Mol. Biol. Rep. – 2013. – Vol. 40. – P. 3269–3279.
5. Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. Plant salt-tolerance mechanisms // Trends Plant Sci. – 2014. – Vol. 19, No 6. – P. 371–379.
6. Huang Z., Zhao L., Chen D., Liang M., Liu Z., Shao H., Long X. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem Artichoke plantlets // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, No 4. – P. 62–85.
7. Mundy J., Nielsen H.B., Brodersen P. Crosstalk // Trends Plant Sci.- 2006. – Vol. 11. - P. 63-64.
8. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2009. – V. 15, № 2. – P. 89–97.
9. Didenko N.O., Volkov R. A., Panchuk I. I. Effects of saline stress on proline and polyphenolic compounds content in *Arabidopsis thaliana* // Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems). – 2016. –8(1). – P. 35–39. (In Ukrainian).
10. Sakariyavo O.S., Holodova V.P., Mescheryakov A.B. Izmenenie soderzhaniya vodyi i proli- na u raznyih po zasuhoustoychivosti sortov pshenitsyi v hode adaptatsii k vodnomu defitsitu i na etape vosstanovleniya // Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. Series: Biology. – 2001. – P. 89–94. (In Russian).
11. Frantsuzova V.P., Olyunina L.N., Veselov A.P. The changes of water regime of wheat seedlings following brief hyperthermia // Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. Series: Biology. – 2013. – 1(1). – P. 136–139. (In Russian)..
12. Shakirova F.M. Nespetsificheskaya ustoychivost rasteniy k stressovym faktoram i ee regulatsiya. – Ufa: Gilem, 2001. – 160 p. (In Russian).

EVALUATION OF THE CORRELATION BETWEEN PROLINE AND WATER CONTENT OF THE *PISUM SATIVUM* L. ROOTS UNDER ABIOTIC STRESS FACTORS INFLUENCE

O. G. Nesterenko, N. M. Rashydov

Abiotic stress is considered to be one of the main reasons for the loss of more than 50% harvest of different crops worldwide. The proline is an important amino acid takes part on protection living cell as well as adaptation processes against adverse environment stress factors. The effects of ionizing radiated pea seedlings with coupled salinity stress factor were investigated. Different growth reactions and free proline content depend of water-cut in root of the Pisum sativum seedlings were determined. High-level synthesis of proline is a widespread response observed in plants experiencing various stresses, in particular osmotic stresses. Therefore the quantification of this amino acid is very useful to assess the physiological status signal systems crosstalk and more generally to understand stress tolerance of plants is relevant. The concentration of proline depends of different factors, including different combinations of stressors and their doses. Our data potentiation indicates that after salt stress with preliminary irradiation, the content of free proline in the roots have increased. Radiation by its own does not affect proline content of a plant significantly, but could modify the salt effect. On 13th day after stressors influence the high level of water losses in roots was observed. Correlation coefficient between water-cut and proline content was negative ($r=-0.87$), but over time water level in plants restored and stabilized on about 34th day of the experiment and the correlation coefficient became positive ($r=0.32$). It may be related to osmotic shock, caused by affect salt, and following decrease in growth speed, when organism's need of water somewhat decreased. It seems that metabolism is transferred to stable state and energetic processes are switched to support of plant integrity function and reparation.

Key words: stress factors, proline, salt stress, water-cut, ionizing radiation, water content, signal systems crosstalk, Pisum sativum L.

Отримано редколегією 14.10.2017