



УДК: 577+57.042

РЕАКЦІЯ РОСЛИН ГОРОХУ НА ДІЮ СОЛЬОВОГО І ТЕРМІЧНОГО СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ ЗАЛЕЖНО ВІД ПОПЕРЕДНЬОГО ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

О. Г. Нестеренко, Н. М. Рашидов

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ 03143, Україна
e-mail: lena6q@ukr.net*

Метою роботи було вивчити за допомогою морфометричних вимірювань модифікуючу дію гострого іонізуючого випромінювання на формування реакції рослин на дію інших стресових факторів: засолення та підвищеної температури. Для виявлення явища точок перехресної взаємодії сигнальних систем рослин порівнювали середню швидкість росту кореня проростків гороху з теоретично очікуваною, обчисленою виходячи з адитивної взаємодії стресових чинників. Проаналізовано комбінації стресорів і виявлено, коли модифікуючий вплив одного з факторів на прояв іншого є найбільшим. Встановлено, що за умови спільної дії стресових чинників можливі кілька варіантів розвитку подій. Стресори можуть послаблювати негативний вплив один одного (антагонізм), посилювати його (синергізм) або ж результат їхньої взаємодії на рослинний організм буде дорівнювати сумі впливів кожного з факторів (адитивність). З'ясовано, що рівень відхилення від адитивності в бік синергізму або антагонізму найбільш яскраво спостерігають через 2 та 8 діб після дії стресорами. Обговорюються ймовірні механізми виявлених ефектів. Низькі дози іонізуючої радіації можуть сприяти збільшенню експресії генів, що регулюють активність антиоксидантних ферментів, концентрацію осмолітів і вторинних метаболітів, які беруть участь у роботі сигнальних систем. Попереднє іонізуюче опромінення проростків може активізувати захисні механізми рослин, вмикає перехресну взаємодію сигнальних систем, що дає рослинам змогу легше перенести подальші впливи іншими стресорами та підвищує стійкість до них. Водночас перемикання між різними сигнальними шляхами клітини може відбуватися протягом тривалого часу після закінчення безпосереднього впливу стресових чинників на рослинний організм.

Ключові слова: перехресна взаємодія сигнальних систем, стресові фактори, іонізуюча радіація, сигнальні системи клітини

ВСТУП

Є безліч несприятливих факторів, які можуть впливати на організм рослин. Величезне значення мають дослідження, пов'язані з глобальним потеплінням, засоленням ґрунтів, впливом радіації як природного, так і штучного походження [12],

зокрема, на тлі збільшення використання ядерної енергії. Вплив кожного зі стресових факторів окремо вже добре вивчено, проте у природних умовах живі організми піддаються їхньому спільному впливу, що може впливати на врожайність рослин і швидкість їх старіння [7, 17]. У разі поєднання стратегій відповіді на кожен зі стресорів виникає т. зв. перехресна взаємодія сигнальних систем, характерна для різних організмів. Вона забезпечує адекватну відповідь і формує біохімічний інструментарій для здійснення її активної реакції [3, 8, 15, 16, 18, 19]. Однак характер відповіді рослини на різні пошкоджувальні чинники охоплює як реакції неспецифічні (синтез білків теплового шоку, поліамінів та ін.), так і специфічні (синтез білків, пов'язаних із холододовим шоком, перемикання фотосинтезу на САМ-шлях та ін.), що залежать від особливостей впливу. Актуальним є дослідження того, як змінюється відповідь рослин на дію одного стресового чинника під впливом іншого, а також розкриття механізмів пристосування для розробки загальних принципів його підвищення. Відома неспецифічність і специфічність реакцій рослин свідчить про певну кореляцію частин різних генетичних підпрограм, що зводиться до підтримки гомеостазу рослинного організму в екстремальних умовах, спрямованого на подолання, ослаблення або усунення шкідливої дії стресора. Якщо рослина реагує неоднаково на кожен зі стресових впливів, як абіотичних, так і біотичних, то поєднання різних стресорів мають змусити сигнальні системи виробити одну стратегію відповіді організму, діючи спільно [2, 9, 11, 14]. Для виявлення т. зв. явища перехресної взаємодії сигнальних систем нами було запропоновано експериментальний підхід, що за морфометричними показниками дав змогу виділити відповідні комбінації стресорів і часові діапазони, коли модифікуючий вплив одного з факторів на прояв іншого має найбільший вплив. Аналіз рослин із відповідних експериментальних груп робить можливим визначення вкладу кожного з факторів на рівні геному і протеому, адже молекулярні дослідження спектра стресових білків, виділених у моменти найбільшого відхилення рослинного організму від адитивної реакції, зможе пролити світло на механізми взаємодії сигнальних систем і виявлення специфічних аспектів реакції рослин і особливості її формування у відповідь на стресові фактори [1, 4, 5].

Метою роботи є вивчити дію іонізуючого випромінювання в поєднанні з іншими стресовими факторами на формування реакції рослин за допомогою морфометричних вимірювань, що інтегрально характеризують молекулярно-генетичні, структурні та метаболічні зміни на початкових фазах росту і розвитку проростків гороху.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вивчення показників росту здійснювали на проростках гороху посівного (*Pisum sativum* L.), сорту "Ароніс".

Триденні проростки піддавали впливові гострого рентгенівського опромінення за допомогою установки "РУМ-17", після чого занурювали у сольовий розчин NaCl на 60 хв або у підігріту до 44 °C воду на 4 хв (див. таблицю). Культивування рослин відбувалось у водній культурі за температури 21±2 °C. Експерименти повторювали три рази.

Було використано загальноприйнятну методику, коли об'єкт підпадає під модифікуючий вплив відповідної дози одного фактора і через певний час піддається дії другого стресора, щоб визначити спрямованість і ступінь зміни вихідного стану резистентності об'єкта.

Схема експерименту, що відображає послідовний вплив стресорів
The scheme of experiment that describes step-by-step influence of stress factors

Експериментальна група	Стресові фактори		
	Іонізуюче опромінення (Гр)	Осмотичний стрес (NaCl, mM/l)	Температурний стрес (°C)
1	0	0	RT
2	0	22	RT
3	0	0	44
4	5	0	RT
5	5	22	RT
6	5	0	44
7	10	0	RT
8	10	22	RT
9	10	0	44
10	15	0	RT
11	15	22	RT
12	15	0	44

Примітка: * RT – кімнатна температура

Comment: * RT – room temperature

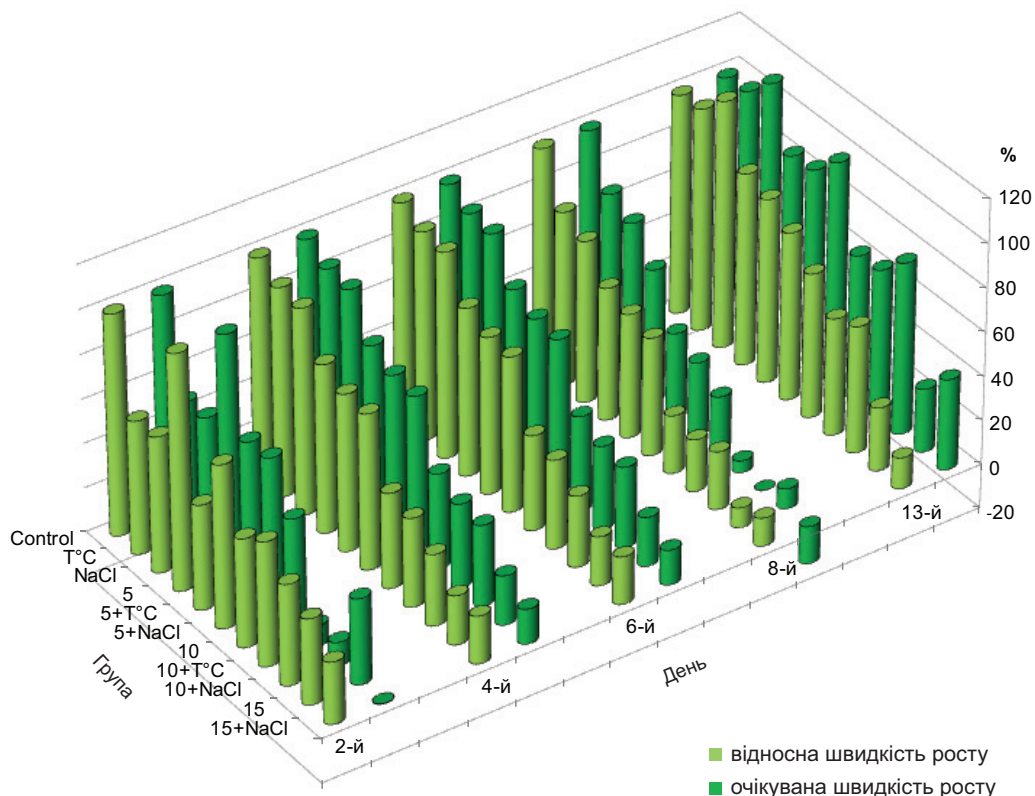
Довжину головного кореня проростків вимірювали з інтервалом 48 год і розраховували їхню відносну швидкість росту (ВШР) як відношення приросту головного кореня в дослідному варіанті до контрольного (виражали у відсотках до контролю). Маючи поточне емпіричне значення ВШР і зараховуючи його до очікуваної швидкості росту (ОШР), що є сумою впливів факторів, оцінювали величину і знак модифікуючого впливу іонізуючого опромінення. Якщо значення ВШР перевищувало теоретично розраховане, то це трактувалось як факт адаптуючого впливу іонізуючого опромінення до дії інших стресорів, а якщо його значення було меншим, то вважали, що був сенсibilізуючий вплив опромінення. Крім того, через 13 діб після опромінення проводили вимірювання довжини стебел проростків і підраховували кількість бічних коренів у головного кореня. Статистичну обробку даних здійснювали на рівні $p < 5\%$ достовірності з застосуванням стандартних методів пакету програми Microsoft Excel-2013.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

За умови спільної дії стресових чинників теоретично можливі кілька варіантів розвитку подій. Стресори можуть послаблювати негативний вплив один одного (антагонізм), посилювати його (синергізм), або ж результат їхньої взаємодії на рослинний організм буде дорівнювати сумі впливів кожного з факторів (адитивність). Останній, показаний на рисунку як ОШР, ми використовували як показник очікуваної шкоди, завданої проросткам дією кількох стресорів.

Водночас вважали, що у разі відхилення отриманих результатів від розрахованого могли вмикатися різні взаємозалежні шляхи реакцій організму на стресор. Це

відображалось у відмічених нами синергізмі й антагонізмі, що вказують на можливість “увімкнення” перехресної взаємодії сигнальних систем. Динаміка морфометричних вимірювань залежно від часу після впливу стресових факторів характеризує зміни в клітинах і органах рослин (див. рисунок).



Вплив різних доз опромінення в комбінації з гіпертермічним впливом чи засоленням на ростові показники корінців проростків гороху (2–13-та доба після опромінення)

The impact of different doses of radiation coupled with hyperthermia or salinity stresses on growth reaction of pea seedlings roots (2–13 days post-radiation term)

За вимірюваннями, проведеними через 2 доби після впливу стресових факторів на проростки гороху, побудували графік, з якого видно, що під час попереднього опромінення проростків у дозі 5 Гр із подальшим нагріванням (група 5+T°C) пригнічувальний ефект значно перевершив очікуваний. Це вказує на синергізм обох факторів у зазначених дозах. За такої умови експериментальна група (5+NaCl), що перебуває під впливом сольового стресу після опромінення в невеликій дозі 5 Гр, показала діаметрально протилежний результат: теоретично очікуване пригнічення росту рослин виявилось вищим від емпіричного, що може свідчити про роль іонізуючого випромінювання в конкретному випадку як про “пом’якшувальний” фактор за впливу сольового розчину. Це можна пояснити тим, що низькі дози іонізуючої радіації сприяють збільшенню експресії генів, які регулюють активність антиоксидантних ферментів, концентрацію осмолітів і компонентів стресових сигнальних систем [11].

Попереднє іонізуюче опромінення проростків активізувало захисні механізми рослин, що дало їм змогу легше перенести подальші дії іншими стресорами, підвищило до них стійкість [6]. Підтвердження цього ми можемо спостерігати на прикладі груп, що перебувають під впливом гіпертермії та сольового стресу, проте перед цим опромінених у дозі 10 Гр. На другий день після опромінення рівень пригнічення росту кореня становив практично 50 % від контролю, але водночас довжина кореня перевищувала теоретично очікувану на 35–47 %. За опромінення в дозі 15 Гр ми чітко спостерігали пригнічення росту рослин (38 % від контрольних значень), проте, як і у разі груп із комбінуванням 10+NaCl або 10+T°C, досить високу виживаність (на 27 % вищу від ОШР).

У перші дні після опромінення (у варіанті з 10 Гр) швидкість росту проростків, які піддавали температурному шоку, була вищою, ніж у групи тільки опромінених рослин, що свідчить про модифікуючий вплив іонізуючої радіації на вплив гіпертермії у бік антагонізму. Це явище спостерігається у перші 8 діб після опромінення з подальшим засоленням. Як відомо, до перших етапів неспецифічної відповіді клітин рослин на вплив різноманітних стресорів належить цілий комплекс тією чи іншою мірою однотипних реакцій. Їх можна розглядати як загальнобіологічні: зниження тотальної активності синтетичних процесів, деградація білоксинтезуючого апарату, катаболізм біополімерів, синтез стресових білків, підвищення синтезу й активації гідролітичних ферментів, утворення необхідних для термінового захисту клітин сполук. Виходить, що початковий період відгуку рослинного організму на стресовий фактор, зафіксувати який можна морфометричними методами і на який припадають ранні біологічні ефекти, включаючи репарацію, а також зміна кількох клітинних циклів, припадає саме на перші кілька днів експерименту.

Гальмування метаболізму в клітинах рослин на початковій фазі відповіді на стресор можна називати захисним. Воно має неспецифічний характер. Зниження активності метаболічних процесів під час стресу має захисно-приспосувальний характер і перешкоджає розвитку самоушкодження, зберігаючи тим самим життєвий потенціал клітин для подальшої репарації. Отже, у першу фазу впливу стресора в клітинах рослин знижується інтенсивність властивого нормі метаболізму і вмикаються процеси, які не характерні для звичайних умов існування, котрі, однак, мають тимчасовий характер. Інтенсивність і тривалість катаболічних процесів під час стресу не мають виходити за рамки необоротних змін (неминуче ведуть до загибелі), тому, ймовірно, в клітинах повинні утворюватись і накопичуватись стреслімітуючі фактори [10]. Першу фазу стресової реакції у формуванні адаптації рослин до пошкоджень можна розглядати як термінову, але недосконалу адаптацію, тоді як у період II фази поступово виникають довготривалі механізми адаптації за дії на організм стресових факторів середовища. Таким чином, I фаза стресової відповіді не тільки передуює адаптації до змін умов середовища, але й відіграє в ній істотну, активну роль. У процесі адаптації до стресових факторів, які за рівнем впливу на організм не призводять до необоротних наслідків, клітини рослин зазнають змін анаболічного характеру. Це призводять до поступової активації метаболічних процесів, що виражаються в активації хроматину, транскрипції та трансляції, зниженні активності багатьох гідролітичних ферментів і стабілізації активності інших, відновленні активності фотосинтезу й дихання, ростових процесів [1, 3, 4, 11]. Тобто в цей період організм переходить на новий режим життєдіяльності, що сприяє формуванню пристосувальних реакцій, серед яких дедалі важливішого

значення для рослини набувають специфічні. Виходячи з графіка, з віддаленням за часом від моменту впливу стресового чинника ми спостерігаємо “вирівнювання” загальної картини, тобто вся система, отримавши потужний поштовх у вигляді кількох гострих впливів стресора, почала поступове відновлення до характерних показників опроміненних у відповідних дозах груп рослин.

Протягом наступних 6 діб реакція рослин виглядає так, наче вплив іонізуючим опроміненням відігравав основну та вирішальну роль у формуванні ростових реакцій. У цей час відбулося відносно вирівнювання ростових реакцій головного кореня гороху та відзначалася близька подібність між показниками теоретичними – очікуваними й емпіричними – отриманими в ході експерименту.

Вплив різних доз гострого опромінення та інших стресових факторів на ріст проростків гороху через 8 днів після впливу стресорів також характеризується схожою з показниками попередніх днів динамікою розвитку: чітко проглядається крива дозової залежності, закономірна для даного діапазону доз. Ефект антагонізму різних за своєю природою стресорів також стає більш помітним: попереднє опромінення в дозах 10 Гр і 15 Гр перед впливом сольового стресу і гіпертермії значно поліпшило ростові показники рослин порівняно з очікуваними. Так, якщо за одночасного опромінення та засолення проростків очікувалося повне припинення росту, спостерігали повільну регенерацію головного кореня на рівні близько 10 % від контролю. Ефект антагонізму впливу середніх доз (10 Гр та 44°C) у комбінуванні з термічним шоком (експериментальна група 9) є короткочасним і найбільш вираженим через 2 доби після впливу стресорами.

Довжина головного кореня на момент останнього вимірювання через 13 діб після початку експерименту в жодній із груп не перевищувала теоретично очікувану. Але цей показник почав наближатися до контрольних значень, особливо для доз до 10 Гр (на 13-й день почав перевищувати 85–50 % порівняно з 60–23 % на 8-й день для 5 Гр і 10 Гр відповідно). Особливо це було характерне для рослин після впливу засолення: 23 % різниці для 5 Гр, 20 % і 27 % для 10 Гр та 15 Гр. Це можна пояснити тим, що зменшення швидкості росту рослин нерідко пов'язують зі зменшенням вмісту води у тканинах організму. Крім того, ефект від стресорів майже через два тижні після впливу міг проявитись в одночасній активації захисних реакцій рослин із активною відповіддю клітин і деградацією структур з появою вільного проліну [13].

Поява бічних коренів, яких зовсім не було на початку експерименту, своєрідна і підтверджує, що внаслідок значного часткового пригнічення росту головного кореня в результаті впливу стресорів функція його частково починає замінюватися бічним корінням. Коливання ростових характеристик проростків гороху під дією різних стресорів і їхніх комбінацій протягом довгого часу може вказувати на виникнення на певних етапах відповіді організму перехресної взаємодії сигнальних систем. Це призводить до виникнення різних сполук, які впливають на систему синтезу протекторних речовин, зокрема, проліну, його деградацію, передачу сигналу й адаптивний потенціал рослини загалом.

ВИСНОВКИ

Рівень відхилення від адитивності в бік синергізму або антагонізму, що найбільш яскраво спостерігається через 2 та 8 діб після дії стресорами, може вказувати на прояви явища перехресної взаємодії сигнальних систем. Водночас на перемикання

між різними сигнальними шляхами захисних систем вказує той факт, що в період між 2 та 8 добами росту рослин їхня реакція виглядає так, наче вплив іонізуючим опроміненням відігравав основну та вирішальну роль у формуванні ростових реакцій (незалежно від подальшого засолення чи нагрівання), коли показники ОШР і ВШР принципових відмінностей для більшості груп не мали. Іонізуюче опромінення здатне покращити реакцію проростків гороху на засолення, що відображається у підвищенні через 2 доби після обробки стресорами ростових показників на 12 % порівняно з тільки засоленими рослинами. Це підтверджує, що попередній вплив іонізуючого опромінення модифікує та підвищує стійкість проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів, однак це явище має тимчасовий характер.

1. Drok E.N., Mamenko P.M., Omelchuk S.V., Kosakivska I.V. Features of symbiotic system and production of ethylene in varieties of *Glycine max* (L.) Merr., differing on resistance to abiotic stressors. **The Bull. Charkovsky Natl. Agr. Univ**, 2014; 3(33): 21–28. (In Ukrainian). [Google Scholar]
2. El-Esawi M. **Introductory Chapter: Hormonal Regulation in Plant Development and Stress Tolerance, Phytohormones – Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses**, Dr. Mohamed El-Esawi (Ed.), **InTech**, 2017. [DOI: 10.5772/intechopen.69806]
3. Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Curr Opin Plant Biol**, 2006; 9(4): 436–442. [PMID: 16759898] [DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.014]
4. Hossain Z., Nouri M.Z., Komatsu S. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. **Proteome Res**, 2012; 11(1): 37–48. [PMID: 22029473, DOI: 10.1021/pr200863r]
5. Kolupaev Yu.Ye., Kosakivska I.V. The role of signal systems and phytohormones in realization of plants stress response. **Ukr. Bot. J**, 2008; 65(3): 418–430. (In Ukrainian). [Google Scholar]
6. Kumar P., Sharma V., Yadav P., Singh B. Gamma Ray Irradiation for Crop Protection Against Salt Stress. **Defence Life Science Journal**, 2017; 2(3): 292–300. [DOI: 10.14429/dlsj.2.11670]
7. Martins A.C. Change and Aging Senescence as an Adaptation. **PLoS ONE**, 2011; 6(9): 1–12. [DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024328>]
8. Mundy J., Nielsen H.B., Brodersen P. Crosstalk. **Trends in Plant Science**, 2006; 11(2): 63–64. [Google Scholar]
9. Nguyen D., Rieu I., Mariani C., van Dam N. How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. **Plant Mol. Biol**, 2016; 91: 727–740. [DOI: 10.1007/s11103-016-0481-8, PMID: PMC4932144]
10. Pahomova V.M., Chernov E.A. Some features of the inductive phase of nonspecific plant adaptive syndrome. **Proceedings of the RAS (Biol.)**, 1996; 6: 705–715. (In Russian).
11. Qi W., Zhang L., Xu H., Wang L., Jiao Z. Physiological and molecular characterization of the enhanced salt tolerance induced by low-dose gamma irradiation in *Arabidopsis seedlings*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2014; 25(2): 1010–1015. [DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.086]
12. Rashydov N., Kliuchnikov O., Seniuk O., Gorovyy L., Zhidkov A., Ribalka V., Berezhna V., Bilko N., Sakada V., Bilko D., Borbuliak I., Kovalev V., Krul M., Petelin G. Radiobiological Characterization Environment around Object “Shelter”. **In book: Nuclear Power Plant**. Soon Heung Chang (Ed.), 2012; 7: 231–279. [DOI: 10.5772/38969; Google Scholar]
13. Sergeeva L., Bronnikova L. Proline-mediated tobacco reactions on salinization impct. **East. Europ. L. Ukrainska National Univ. (Bot.)**, 2016; 12(4): 15–19. [DOI: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nvnu_2016_12_4]
14. Sharma R., Vleeschauwer D., Sharma M., Ronald P. Recent Advances in Dissecting Stress-Regulatory Crosstalk in Rice. **Molecular Plant**, 2013; 6(2): 250–260. [DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/sss147>]
15. Stork P., Schmitt J. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. **Trends in Cell Biology**, 2002; 12(6): 258–266 [PMID: 12074885, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02294-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02294-8)]

16. Taylor J.E., McAinsh M.R. Signalling crosstalk in plants: emerging issues. **J. Exp. Bot.**, 2004; 55(395):147–9. [PMID: 14673021, DOI: 10.1093/jxb/erh060]
17. Trindade L., Aigaki T., Peixoto A. A novel classification system for evolutionary aging theories. **Front Genet.**, 2013; 4(25): 1–8. [PMCID: PMC3589719, DOI: 10.3389/fgene.2013.00025]
18. Tripathi D., Tanaka K. A crosstalk between extracellular ATP and jasmonate signaling pathways for plant defense. **Plant Signal Behav.** 2018 [Epub ahead of print] [DOI: 10.1080/15592324.2018.1432229]
19. Wei J., van Loon J.J., Gols R. Reciprocal crosstalk between jasmonate and salicylate defence-signalling pathways modulates plant volatile emission and herbivore host-selection behavior. **J. Exp Bot.**, 2014; 65(12): 3289–3298. [DOI: 10.1093/jxb/eru181, PMCID: PMC4071845]

PEA RESPONSE TO SALT AND THERMAL STRESSES IN DEPENDENCE ON PRELIMINARY IONIZING RADIATION IMPACT

O. G. Nesterenko, N. M. Rashydov

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine
148, Zabolotnyi St., Kyiv 03143, Ukraine
e-mail: lena6q@ukr.net*

It is important to find specific and non-specific aspects of plant response reactions during adaptation, to understand the pathways of signaling systems crossing and their interaction. To detect the points of signaling systems interaction a set of experiments was suggested. The pea seedlings were irradiated by X-ray. Additionally, some seedlings after irradiation were exposed to hyper thermal stress or to the osmotic stress. The aim of research was to study the modifying effect of ionizing radiation on other abiotic stress factors impact such as salinity and temperature. Morphometric measurements were used to estimate plant's response on stresses. These data can integrally characterize molecular, genetic, structural and metabolic changes in pea seedlings on their initial growth phase. For this purpose, the average growth rate of roots was compared with the theoretically expected growth rate that was calculated as an additive interaction of stress factors. "Crosstalk" means the growth of organism's resistance to one stress factor as a result of adaptation to another stressor. It is a result of interconnection and "dialogue" of various signal systems of plant. The time frame of the modifying influence of one stressor had the greatest impact on the appearance of another was found. The level of deviation from additive to synergistic or antagonistic model of stressors interaction may indicate the crosstalk effect. It was shown that crosstalk is most pronounced on second and eighth days after treatments impact. Preliminary ionizing irradiation of seedlings could modify and increase the resistance to subsequently osmotic or thermal stress impact but this phenomenon was short-term. At other phases of experiment the expected growth rates and empirical average growth rates nearly matched. It may be explained by crosstalk pathways switching.

Keywords: crosstalk, stress factors, ionizing radiation, signal systems

Одержано: 05.02.2018