

ЖУК В. В.[✉], МІХЄЄВ О. М., ОВСЯННІКОВА Л. Г.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, м. Київ, 03143, вул. Академіка Заболотного, 148

[✉] vzhukv@gmail.com, (097) 672-33-64

ВЗАЄМОДІЯ ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ УЛЬТРАФІОЛЕТОМ І ЦИТОКІНІНУ В АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЯХ РОСЛИН ГОРОХУ

Мета. Завданням роботи було дослідження взаємодії хронічного ультрафіолетового В (УФ-В) опромінення і цитокініну 6-бензиламінопурину (БАП) в адаптації рослин гороху (*Pisum sativum* L.). **Методу.** Рослини гороху сорту Ароніс обприскували розчином БАП у концентрації 10^{-5} М та піддавали дії хронічного опромінення УФ-В у дозі 6 кДж/м² на день потужністю 1 Вт/м² протягом 12 діб. Упродовж дослідження вимірювали ріст та визначали масу рослин, у листках визначали вміст фотосинтетичних пігментів та ендогенного перекису водню (ПВ). **Результати.** Встановлено, що дія хронічного УФ-В опромінювання у дозі 6 кДж/м² на день на рослини гороху спричиняла затримку наростання маси рослин, синтезу фотосинтетичних пігментів та підвищувала вміст ПВ у листках. Обробка рослин БАП сприяла наростанню маси рослин гороху, стимулювала синтез фотосинтетичних пігментів, зменшувала вміст ПВ у листках за дії УФ-В. **Висновки.** Встановлено, що обробка рослин гороху БАП сприяла адаптації рослин гороху до дії хронічного УФ-В опромінення на початку дії УФ-В. Цитокініни здатні до детоксикації активних форм кисню (АФК), стимуляції формування фотосинтетичного комплексу, що сприяє росту рослин гороху в умовах хронічного УФ-В опромінення.

Ключові слова: УФ-В, БАП, *Pisum sativum* L., фотосинтетичні пігменти, адаптація.

Ультрафіолетова радіація належить до неодмінних компонентів сонячного світла, які досягають поверхні рослин на всіх широтах земної кулі. Частка УФ-В у ньому може коливатися у значних межах у різні пори року, впродовж світлового періоду доби, що зумовлюється насамперед товщиною озонового шару, висотою та широтою місцевості, забрудненням повітря. Атмосфера переважно поглинає УФ-В з довжинами хвилі, які коротші від 300 нм. Однак через озонові діри, які утворюються і збільшуються

внаслідок активної діяльності людства, проходить і короткохвильова частина УФ-В, що посилює його руйнівну дію на рослини [1].

У клітинах листового епідермісу багатьох видів рослин ідентифіковано специфічний фоторецептор для УФ-В UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), який сприймає кванти ультрафіолету й індукує сигнальний каскад, що спричиняє транскрипційну регуляцію численних генів для адаптивної регуляції метаболізму і створення комбінованого захисту [2]. До найбільш розповсюджених адаптивних відповідей рослин на УФ-В відносять накопичення у вакуолях епідермальних клітин флавоноїдів, збільшення вмісту антиоксидантів у клітинах листової паренхіми, ензимів для репарації ДНК. Рослини зазвичай перебувають за умов хронічної дії УФ-В фотонів, що призводить до підвищення ендогенного рівня АФК, головним джерелом яких є світлова фаза фотосинтезу. УФ-В промені у високих дозах виявили деструктивну дію на молекули ДНК, білків, ліпідів, фотосинтетичні пігменти, мембрани, що здатне затримувало ріст та розвиток культурних рослин, зменшувати їх продуктивність у природних умовах вирощування [3]. Проведені нами раніше дослідження дії гострого опромінення УФ-В і УФ-С та хронічного опромінення УФ-В на рослини гороху у широкому діапазоні доз виявили, що ультрафіолетове випромінювання у дозах, які перевищували 4 кДж/м² на день, необернено інгібувало ріст рослин гороху у висоту та наростання їх маси, зменшувало кількість фотосинтетичних пігментів у листках, підвищувало вміст ПВ, активність антиоксидантних ферментів, знижувало продуктивність рослин гороху [4–7]. Гостре опромінення УФ-В на рослини кукурудзи у дозах 1–16 кДж/м² викликало зменшення висоти рослин, стимулювало наростання їх маси, накопичення фотосинтетичних пігментів та збільшення вмісту ПВ у листках [8].

© ЖУК В. В., МІХЄЄВ О. М., ОВСЯННІКОВА Л. Г.

Встановлено, що у захисті рослинних клітин від деструктивної дії УФ-В радіації беруть участь фітогормони цитокініни, які синтезуються ензиматично з аденіну у всіх частинах рослин [9]. В умовах оптимального росту цитокініни регулюють поділ та диференціацію клітин, судин, розгалуження кореня і пагона, контролюють на світлі біогенез хлоропластів, старіння листків [10]. Найбільш розповсюдженими у рослині є цитокініни зеатинового типу, які синтезуються у коренях і надходять із них у пагони. БАП утворюється і функціонує у клітинах листкового мезофілу, швидко руйнується і не накопичується у значних кількостях, що в стресових умовах призводить до його дефіциту. З'ясовано, що обробка сім'ядолей огірка водним розчином БАП перед опроміненням їх УФ-В може зменшувати ендogenous рівень АФК в тканинах [9]. Встановлено, що цитокініни здатні утилізувати вільні радикали, супероксидний аніон, підтримувати життєздатність насіння шляхом детоксикації АФК [9]. Однак роль цитокінінів у зменшенні негативної дії хронічного опромінення УФ-В на інтактні рослини дводольних все ще досліджена недостатньо.

Метою роботи було дослідження взаємодії хронічного УФ-В опромінення і цитокініну 6-БАП в адаптації рослин гороху (*Pisum sativum* L.) до дії хронічного УФ-В опромінення у період вегетативного росту і формування фотосинтетичного апарата листків.

Матеріали і методи

Рослини гороху сорту Ароніс селекції ННЦ Інституту землеробства НААН України вирощували в умовах водної культури за температури 24°C. Режим освітлення складав 16 год світла інтенсивністю 4,4 кЛк і 8 год темноти. У фазі трьох ярусів листків надземну частину рослин дослідного варіанта обприскували водним розчином 6-БАП концентрацією 10^{-5} М. Частину оброблених БАП та необроблених рослин піддавали дії хронічного УФ-В опромінення дозою 6 кДж/м² на день потужністю 1 Вт/м² протягом 12 діб, яке створювали за допомогою УФ-В ламп фірми Philips (Special fluorescent lamp). Відстань від ламп до верхівок рослин – 80 см. Контрольні рослини знаходилися окремо та були захищені від УФ-В променів скляним фільтром товщиною 5 мм. Виміри рослин і відбір проб для визначення вмісту фотосинтетичних пігментів і ендogenous ПВ у листках проводи-

ли в один і той же час. Для кожного відбору використовували 10 рослин. Зміни довжини та маси пагонів і коренів гороху визначали, як відношення їх величини у досліді до відповідних значень у контролі у відсотках. Визначення вмісту пігментів проводили за Ліхтенталером [11], ПВ за Чен та Као [12]. Кількість ПВ виражали у мікрограмах (мкг), а пігментів – у міліграмах (мг) на грам (г) сирової маси. Результати оброблені статистично за допомогою програми Microsoft Excel. На графіках наведено середні арифметичні значення та величини дисперсії.

Результати та обговорення

Встановлено, що хронічне УФ-В опромінення у дозі 6 кДж/м² на день пригнічувало ріст пагонів гороху у висоту після 6 діб дії (рис. 1 а). У наступні 6 діб дії УФ-В опромінення інгібування росту рослин у висоту продовжувалося. Припинення опромінення не спричиняло відновлення росту гороху у висоту. Обробка рослин гороху БАП до початку їх опромінення УФ-В не впливала на ріст пагона у висоту, який затримувався після 7 діб дії УФ-В. Хронічне опромінення УФ-В оброблених БАП і необроблених цитокініном рослин продовжувало пригнічувати ріст пагона у висоту до завершення дії ультрафіолету. Припинення опромінення призводило до відновлення росту гороху і у варіанті з обробкою рослин БАП, за 3 доби він досягав рівнів контролю. Опромінені УФ-В рослини без обробки БАП майже не відновили ріст у висоту і значно відставали від рослин контролю та інших варіантів.

Наростання маси в оброблених БАП рослин гороху підвищувалося на 4 добу досліді як за дії УФ-В променів, так і без них порівняно з контролем (рис. 1 б). Стимуляція наростання маси гороху була короткочасною, і після 7 доби від початку опромінення відбувалася затримка збільшення маси рослин дослідного варіанта щодо контролю, яке тривало до закінчення дії УФ-В променів. Наприкінці досліді відбувалася стимуляція наростання маси рослин гороху, яка тривала не більше двох діб, після чого маса рослин у всіх дослідних варіантах знову збільшувалася, однак не досягла контрольних значень. Найбільше пригнічення наростання маси виявлено у рослин, які опромінювали УФ-В без попередньої обробки БАП.

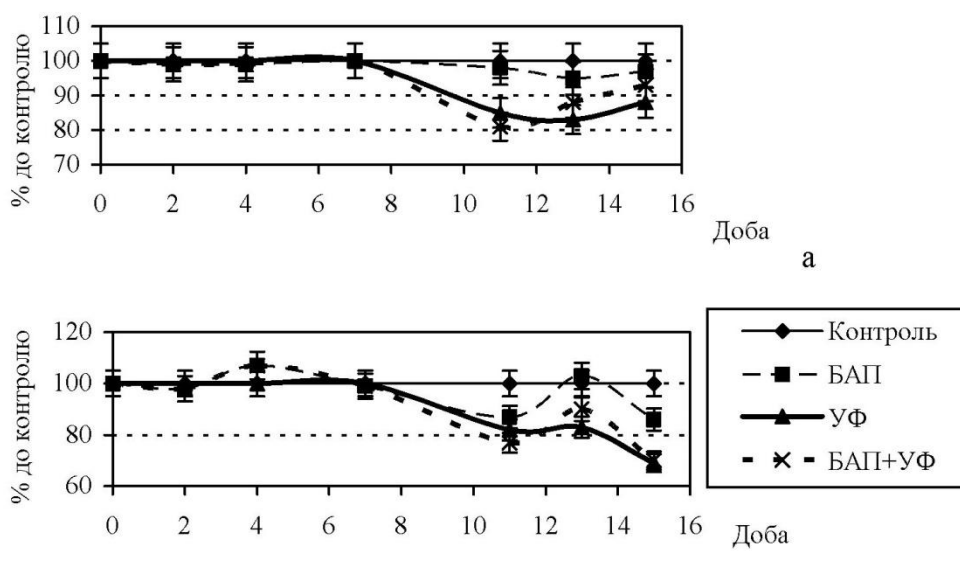


Рис. 1. Дія хронічного УФ-В опромінення та БАП на ріст рослин гороху (а – довжина пагона, б – маса рослини).

Протягом дослідження у всіх варіантах відбувся відбір зразків листків для визначення вмісту фотосинтетичних пігментів і ПВ. Встановлено, що після обробки рослин гороху БАП на 4 добу вміст каротиноїдів у листках збільшувався як за дії УФ-В, так і без неї (рис. 2 а). Опромінення рослин УФ-В без обробки рослин цитокінінами спричиняло зменшення вмісту каротиноїдів у цей же період. До 7 доби дослідження вміст каротиноїдів у листках гороху у всіх варіантах вирівнювався і став близьким до значень контролю. На 9 добу дії опромінення УФ-В вміст каротиноїдів у листках контрольного та дослідних варіантів падав, але наступної доби знову збільшувався. Припинення дії ультрафіолету призводило до зростання кількості каротиноїдів у листках рослин дослідних варіантів і вирівнювання його зі значеннями контролю у всіх варіантах, крім варіанта сумісної дії БАП і УФ-В.

Вміст хлорофілів *a* та *b* значно зменшувався на 4 добу дії УФ-В у необроблених БАП рослин (рис. 2 б, в). В оброблених БАП листках рослин гороху вміст хлорофілів у цей же період підвищувався за дії УФ-В опроміненних та без неї. При цьому зростання кількості хлорофілу *a* випереджало відповідне збільшення хлорофілу *b*. До 7 доби дослідження у листках опроміненних і неопроміненних УФ-В рослин вміст хлорофілів *a* і *b* підвищувався і наближався до значень контролю. Впродовж наступних двох діб дослідження вміст хлорофілів падав у всіх варіантах, але

найбільше у контрольному. Протягом 9–11 доби дослідження відзначено підвищення вмісту хлорофілу в листках гороху, яке було більш значимим у дослідних варіантах порівняно з контрольним. Завершення дії УФ-В не призводило до відновлення накопичення хлорофілів. Упродовж усього періоду проведення дослідів співвідношення хлорофілів *a* і *b* залишалося незмінним і становило близько 2:1. Зміни вмісту досліджених нами фотосинтетичних пігментів відбувалися синхронно.

Вміст ПВ у листках оброблених БАП рослин гороху зменшувався через 2 доби за дії хронічного опромінення УФ-В та без неї (рис. 2 г). На 4 добу дослідження вміст ПВ у всіх варіантах дослідження вирівнювався з контролем і залишався незмінним протягом наступних 4 діб, після чого за дії УФ-В променів почав збільшуватися і найбільше зростав вже після припинення опромінення на 15 добу дослідження. У цей же період у листках контрольних та оброблених БАП і неопроміненних рослин гороху вміст ПВ поступово знижувався.

Проведені нами дослідження впливу обробки гороху водним розчином цитокініну БАП за умов хронічного УФ-В опромінення показали, що дія екзогенного цитокініну проявилася у стимуляції наростання маси, збільшенні вмісту фотосинтетичних пігментів, зменшенні кількості ПВ порівняно з варіантом, у якому опромінювали УФ-В рослини без обробки БАП.

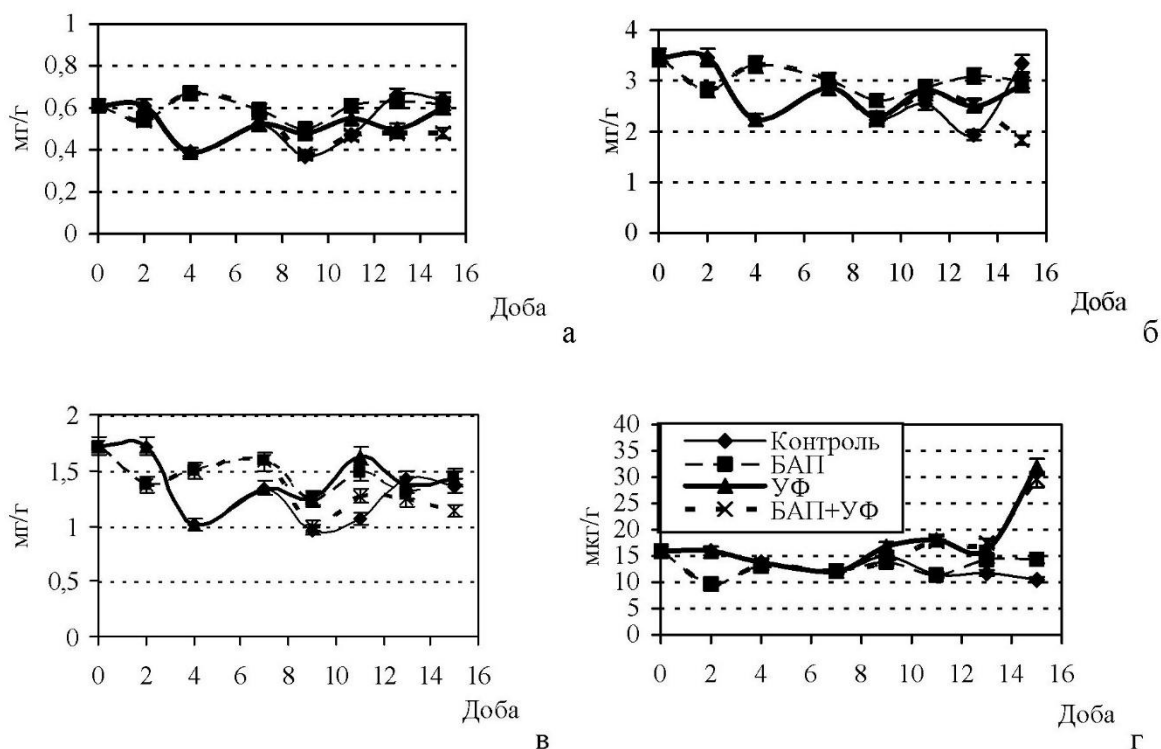


Рис. 2. Вплив хронічного УФ-В опромінення та БАП на вміст фотосинтетичних пігментів та ПВ у листках гороху (вміст а – каротиноїдів, б – хлорофілу *a*, в – хлорофілу *b*, г – ПВ).

Найбільші ефекти від дії екзогенного цитокініну відзначали на 4 добу дослідження. Вони проявилися у стимуляції наростання маси рослин та синтезу фотосинтетичних пігментів за впливу хронічного опромінення УФ-В та без нього. У відновний період після припинення дії УФ-В променів оброблені БАП рослини відновлювали накопичення маси, у той час як у необроблених опромінених рослин наростання маси падало порівняно з рослинами контролю. Обробка розчином цитокініну стимулювала накопичення фотосинтетичних пігментів на початку дії ультрафіолету у період, коли у необроблених рослин воно пригнічувалося. Зниження вмісту ПВ у листках гороху після обробки БАП відбувалося лише протягом 2 діб, що вказує на короткочасність дії фітогормону. Таким чином, обробка рослин гороху до початку їх опромінення УФ-В зменшувала вміст ПВ, який належить до найбільш розповсюджених форм АФК, стимулювала синтез фотосинтетичних пігментів.

Накопичення АФК у надмірних кількостях створює оксидний стрес, який спричиняє руйнівну дію на клітинні структури. Дія УФ-В призводить до деструкції білків активного центру фотосистеми II, що створює дисбаланс у продукуванні й утилізації АФК у світловій фазі

фотосинтезу [2]. Водночас АФК належать до неодмінних компонентів сигнальних систем рослин, продукуються і в оптимальних умовах, беруть участь у регуляції процесів росту та розвитку, рухів замикальних клітин продихів, взаємодіють з ендogenousними фітогормонами [13]. Захисна функція цитокінінів в умовах дії абіотичних стресів встановлена давно, однак їх здатність до безпосередньої детоксикації АФК, утилізації вільних радикалів, які утворюються за дії УФ-В, встановлена лише нещодавно [9]. БАП відноситься до природних фітогормонів, здатний легко проникати у клітини, включатися до пулу ендogenousних цитокінінів, що зумовлює його позитивну дію на рослини за дії стресу. Виявлене нами зменшення ендogenousного вмісту ПВ у листках гороху після обробки рослин водним розчином БАП за дії ультрафіолету могло бути зумовлене його участю в утилізації АФК. Зменшення стресового навантаження на рослини дозволило їм адаптуватися до дії хронічного УФ-В опромінювання, стимулювати синтез фотосинтетичних пігментів, що сприяло процесам фотосинтезу і забезпечувало ростові процеси необхідними ресурсами й енергією. Тривалість дії екзогенного цитокініну була короткою, однак дозволила рослинам гороху адаптуватися до

впливу УФ-В променів, дозволила їм підтримувати ендogenous рівень ПВ протягом усього періоду дії ультрафіолету однаковим у контрольному та дослідних варіантах. Різне зростання вмісту ПВ в листках відбувалося вже після завершення опромінення, що зумовлено старінням листків, деградацією клітинних структур, у процесі якої збільшується вміст ПВ у перокси-сомах під час утилізації нефункціональних компонентів клітин. Тривалість існування молекул цитокінінів незначна, вони швидко руйнуються в процесі метаболізму, однак їх дія призводить до стимуляції поділу клітин, синтезу пігментів, біогенезу хлоропластів, формування фотосинтетичного апарату, розвитку провідної системи [10]. Отримані нами результати свідчать, що саме такий відносно короткочасний імпульс, який спричинила достресова обробка рослин гороху БАП, сприяв адаптації рослин гороху до умов хронічного опромінення УФ-В. Використання екзогенних цитокінінів і їх аналогів під час вирощування і зберігання рослин стало можливим за здешевлення виробництва таких препаратів, однак обмежується недостатністю даних про їх конкретну дію в умовах абіотичних стресів, зокрема й ультрафіолету. Продовження досліджень захисної дії цитокінінів в умовах дії ультрафіолетового опромінювання дозволить виявити нові можливості зменшення шкідливого впливу його квантів на культурні рослини.

Висновки

Встановлено, що обробка рослин гороху водним розчином БАП у концентрації 10^{-5} М до початку дії хронічного УФ-В опромінення у дозі

6 кДж/м² на день зменшувала деструктивний вплив ультрафіолетових променів, сприяла адаптації рослин, стимулювала наростання маси за дії стресового чинника і у відновний період. Обприскування гороху розчином БАП стимулювало накопичення фотосинтетичних пігментів у листках і сприяло їх синтезу у період дії ультрафіолету. Дія екзогенного БАП зменшувала ендogenous вміст ПВ у листках на початку періоду опромінення рослин УФ-В, що дозволило їм адаптуватися й утримувати вміст ПВ упродовж усього терміну впливу УФ-В на одному рівні з контролем та іншими неопроміненними рослинами. Здатність БАП до проникнення у клітини епідермісу і включення у пул ендogenous цитокінінів прискорює і посилює ефект обробки в умовах дії стресу, дозволяє брати участь у регуляції метаболізму, детоксикації АФК, зменшенні руйнівної дії квантів УФ-В на компоненти рослинних клітин. Тривала дія хронічного опромінення УФ-В на рослини гороху зменшувала вплив екзогенного БАП, що призводило до наростання деструктивних процесів, збільшення вмісту ПВ, зменшення кількості фотосинтетичних пігментів, що могло бути зумовлено прискоренням старіння листового апарату в умовах надмірного УФ-В випромінювання. Продовження досліджень ролі цитокінінів у відповіді рослин на ультрафіолетове опромінення дозволить з'ясувати можливості їх практичного використання для реалізації потенційної продуктивності культурних рослин у нестабільних та несприятливих умовах навколишнього середовища.

References

- Jansen M.A.K., Hectors K., O'Brien N.M., Guisez Y., Pottersd G. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 2008. Vol. 178. P. 449–458. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.04.010.
- Hayes S., Sharma A., Fraser D.P., Fankhauser Ch., Jenkins G.I., Franklin K.A. UV-B Perceived by the UVR8 photoreceptor inhibits plant thermomorphogenesis. *Curr. Biol.* 2017. Vol. 27. P. 120–127. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.004.
- Kakani V.G., Reddy K.R., Zhao D., Sailaja K. Field responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and forest meteorology.* 2003. Vol. 120. P. 191–218. doi: 10.1016/j.agrformet.2003.08.015.
- Zhuk V.V., Mikhteyev A.N., Ovsyannikova L.G. Adaptation of corn plants to chronic ultraviolet irradiation. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2018. Vol. 22. P. 246–251. [in Ukrainian] / Жук В.В., Міхеев О.М., Овсяннікова Л.Г. Адаптація рослин кукурудзи до хронічного ультрафіолетового опромінення. *Фактори експериментальної еволюції.* 2018. Т. 22. С. 246–251. doi: 10.7124/FEEO.v22.956.
- Mikhteyev A.N., Zhuk V.V., Ovsyannikova L.G., Grodzinsky D.M. Hormesys effect of UV-C irradiation on pigment complex and antioxidant enzymes of leaves cells *Pisum sativum* L. *Reports of NAS of Ukraine.* 2016. № 11. P. 99–103. [in Ukrainian] / Міхеев О.М., Жук В.В., Овсяннікова Л.Г., Гродзинський Д.М. Гормезисний вплив УФ-С опромінення на пігментний комплекс і антиоксидантні ферменти клітин листків *Pisum sativum* L. *Доповіді НАН України.* 2016. № 11. С. 99–103. doi: 10.15407/dopovidi2016.11.099.
- Zhuk V.V., Mikhteyev A.N., Ovsyannikova L.G. The photomorphogenetic reaction of pea plants (*Pisum sativum* L.) on ultraviolet irradiation effect. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2017. Vol. 20. P. 179–183. [in Ukrainian] / Жук В.В., Міхеев О.М., Овсяннікова Л.Г. Фотоморфогенетична відповідь рослин гороху (*Pisum sativum* L.) на дію ультрафіолетової радіації. *Фактори експериментальної еволюції.* 2017. Т. 20. С. 179–183.

7. Zhuk V.V., Mikheyev A.N., Ovsyannikova L.G. The pea development after UV-B irradiation. *Modern Phytomorphology*. 2017. Vol. 11. P. 111–116. [in Ukrainian] / Жук В.В., Міхєєв О.М., Овсяннікова Л.Г. Розвиток рослин гороху після дії УФ-В опромінення. *Сучасна фітоморфологія*. 2017. Т. 11. С. 111–116. doi: 10.5281/zenodo.1050465.
8. Zhuk V.V., Mikheyev A.N., Ovsyannikova L.G. Adaptive reactions of corn plants to acute ultraviolet radiation. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2019. Vol. 25. P. 225–230. [in Ukrainian] / Жук В.В., Міхєєв О.М., Овсяннікова Л.Г. Адаптивна реакція рослин кукурудзи на дію гострого ультрафіолетового випромінювання. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 225–230. doi: 10.7124/FEEO.v22.956.
9. Kataria S., Guruprasad K.N. Interaction of cytokinins with UV-B (280-315 nm) on the expansion growth of cucumber cotyledons. *Horticult Int J*. 2018. Vol. 2. P. 46–54. doi: 10.15406/hij.2018.02.00025.
10. Warner T., Schmulling Th. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol*. 2009. Vol. 12. P. 527–538. doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.002.
11. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*. 1987. Vol. 148. P. 350–382. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
12. Chen L.M., Kao C.H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 1999. Vol. 40. P. 283–287.
13. Swanson S., Gilroy S. ROS in plant development. *Physiol. Plant*. 2010. Vol. 138. P. 384–392. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x.

ZHUK V.V., MIKHEEV A.N., OVSYANNIKOVA L.G.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: vzhukv@gmail.com

INTERACTION OF CHRONIC ULTRAVIOLET RADIATION AND CYTOKININ IN ADAPTIVE REACTIONS OF PEA PLANTS

Aim. The goal of this study was to study the interaction of chronic ultraviolet (UV-B) radiation and cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in the adaptation of pea plants (*Pisum sativum* L.) to the effect of chronic UV-B irradiation.

Methods. Pea plants cultivar Aronis were sprayed by BAP solution in concentration 10^{-5} M before the effect of chronic UV-B radiation at doses of 6 kJ/m² per day with a power of 1 W/m² for 12 days. During this time, the growth of plants and their mass were measured, the content of photosynthetic pigments and endogenous hydrogen peroxide (HP) were determined in the leaves. **Results.** It was established that the effect of chronic UV-B radiation at a dose of 6 kJ/m² per day on pea plants caused a delay in plant mass accumulation, synthesis of photosynthetic pigments and increasing HP content in leaves. Treatment plants by BAP increased mass, stimulated synthesis of photosynthetic pigments, reduced the content of HP in the leaves of pea plants during the UV-B radiation. **Conclusions.** It was shown that treatment of pea plants by BAP caused the adaptation of pea plants at the beginning of UV-B radiation. Cytokinins are capable to detoxify reactive oxygen species, stimulate formation of photosynthetic complex that promotes growth of pea plants under chronic UV-B radiation.

Keywords: UV-B, BAP, *Pisum sativum* L., photosynthetic pigments, adaptation.