

НАКОПИЧЕННЯ КАЛОЗИ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ПРИ УФ-В ОПРОМІНЕННІ

О.П. БОБОШКО¹, Р.В. КОВБАСЕНКО¹, К.О. ГАЛКІНА¹,
Ю.В. СИМОНЕНКО^{1,3}, О.М. МІХЄЄВ¹, В.І. ЄМЕЛЬЯНОВ^{1,2,3}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 003143, Україна

² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

³ Інститут високих технологій Київський університет імені Тараса Шевченка, проспект Академіка Глушкова, 4, Київ, 03022, Україна

E-mail: asp.boboshko@gmail.com; rayasenko@ukr.net; galkina.k@icbge.org.ua;

yuri.simonenko@icbge.org.ua; mikhalex7@yahoo.com; vldeml@ukr.net

Автор для кореспонденції – В.І. Ємельянов, e-mail: vldeml@ukr.net

Вперше визначено ростові показники та кількість калози, накопиченої в проростках озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Ренан при опроміненні їх ультрафіолетом В у діапазоні доз 0,1–10 кДж/м². Проаналізовано відмінності ростових показників контрольних та УФ-В-опромінених рослин озимої пшениці. Відмічено інгібуючий ефект УФ-В опромінення щодо росту експериментальних рослин порівняно з контрольними, який пов'язаний з морфо-фізіологічними особливостями індукованого накопичення калози в клітинах проростків озимої пшениці. Ростові показники опромінених рослин впродовж 5 діб були меншими відносно контрольних, приріст яких у середньому складав 1,6 см на добу, та найнижчими за впливу на них дози 10 кДж/м². Проаналізовано результати щодо конститутивного та індукованого накопичення калози, як первинного захисного бар'єру в реакціях імунної відповіді, що зумовлює підвищену стійкість рослин пшениці сорту Ренан до абіотичного стресу.

Ключові слова: калоза, пшениця, УФ-В-опромінення.

Вступ. Озима м'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.) є важливою сільськогосподарською культурою. Одним із напрямків підвищення її врожайності є одержання форм, стійких до біотичних та абіотичних стресів (Chowdhury et al, 2014). Для отримання високого врожаю зернових культур необхідно проводити постійну селекцію, яка базується на використанні достатньої кількості та різноманітні генів (Stass, Horst, 2009; Mintoff et al, 2015; Li et al, 2023). Для захисту м'яких сортів пшениці від стрес-факторів використовуються інтрогресивні гени стійкості, локалізовані в чужорідних транслокаціях (Mintoff et al, 2015).

Так, генотип пшениці сорту Ренан, обраний для експериментів, має ген резистентності *Pch1*. Транслокація з цим геном широко використовується в селекції для отримання стійких продуктивних сортів цієї культури. Механізми реалізації стійкості рослин з даним геном вивчено недостатньо (Boboshko et al, 2019). Результати досліджень представлені в небагатьох публікаціях (Cook et al, 2015; Boboshko et al, 2019). Так, присутність гена *Pch1* у рослин суттєво пригнічує проростання гіфів грибів (Ballare et al, 2011) у порівнянні з лініями, які не мають даної послідовності. За наявності у рослин цього гена (Boboshko et al, 2019) спостерігалось уповільнення швидкості розвитку патогенів *Pseudocercospora herpotrichoides* (Zacchini, de Agazio, 2004). Селекційні лінії пшениці з геном *Pch1* мають не тільки підвищену стійкість до патогенних грибів *P. herpotrichoides* (Ballare et al, 1996), а також і до абіотичних несприятливих факторів навколишнього середовища (Nawrath et al, 2002), що й визначає їхню високу врожайність (Ballare et al, 1996). При цьому прояв *Pch1* гена на прикладі конкретних реакцій захисту та накопиченні певних стрес-метаболітів вивчено недостатньо (Panyuta et al, 2014).

На різних етапах свого розвитку рослинні організми зазнають численних біохімічних, морфо-фізіологічних та структурних змін, пов'язаних у тому числі із впливом на них стресових факторів навколишнього середовища (Nedukha, 2015; Boboshko et al, 2019). Механізми стійкості рослин до стресу базуються на утворенні складного ланцюга конститутивних і індукованих захисних речовин, що формують

механічні (Underwood, 2012) та біохімічні (Cle et al, 2008) імунні бар'єри. Клітинна стінка (КС) є першим захисним бар'єром рослинної клітини (Panyuta et al, 2014). В клітинних стінках у відповідь на еліситацію як біотичними, так і абіотичними чинниками, виникають зміни заряду зовнішньої поверхні плазматичної мембрани, що викликає її деполаризацію, зміни іонних потоків, послідовні біофізичні та біохімічні перетворення, які і призводять до формування імунної відповіді організму на стрес (Zeyen et al, 2002; Emelyanov et al, 2008). Однією з ранніх реакцій рослин при пошкодженні їхніх клітинних стінок гідролітичними ферментами патогенів чи комахами, або ураженням високоенергетичними потоками опромінення є їхня репарація та укріплення, що відбувається за рахунок накопичення β -1,3-глюкану — калози (Nedukha, 2015). Це найпоширеніший компонент захисту рослинних клітин (Ferrazzano et al, 2009). Калоза у рослин накопичується як конститутивно, так і у відповідь на різні типи стресів (Boboshko et al, 2019). Калоза перша з'являється в уражених клітинах у вигляді невеликих гранул уздовж клітинної стінки. Ймовірно, відкладання калози у першу чергу пов'язано із здатністю калозосинтази до її локального накопичення, як компоненту швидкої репарації клітинних стінок за принципом фермент-субстрат (Emelyanov et al, 2018). Зокрема, відкладання калози як активної захисної речовини рослин відбувається у відповідь на інфікування, що добре ілюструє утворення папіл (Chowdhury et al, 2014). Накопичення калози у рослин спостерігають при реакції надчутливої загибелі клітин (НДЧ), інфікованих вірусами (Li et al, 1993; Emelyanov et al, 2008). Водний дефіцит, температурний стрес, механічний стрес, гіпоксія, наявність важких металів у ґрунті, вплив ультрафіолету — все це викликає посилений синтез калози в рослинах (Stass, Horst, 2009; Li et al, 2023).

У зв'язку з відкриттям виснаження стратосферного озону з'явилися дослідження щодо впливу підвищених рівнів ультрафіолетового (УФ) опромінення на рослини. Зростання доз ультрафіолету В (УФ-В), зазвичай, призводить до зниження біомаси рослин (Newsham, Robinson, 2009; Ballare et al, 2011). При високих експозиційних дозах ультрафіолету С (УФ-С)

у діапазоні доз від 5 до 50 кДж/м² спостерігається реактивація активних форм кисню (АФК) та відбувається відповідне перикисне окислення ліпідів і, як наслідок, загибель клітин протопластів, калюсу та тканин листків (Bornman et al, 1983; Danon, Callois, 1998; Zucchini, de Agazio, 2004). За допомогою флуоресцентної мікроскопії в клітинах тютюну BY-2, опромінених УФ-В, спостерігалися типові морфологічні ознаки апоптозу, такі як зморщування клітин, конденсація хроматину в перинуклеарних областях і утворення мікроядер (Lytvyn, Yemets, Blume, 2010). Певний діапазон доз УФ-опромінення може бути вигідним для процесу розвитку рослин та їхнього своєчасного реагування на повторні стресові фактори середовища (Chowdhury et al, 2014).

Вивчення рослин у відкритому ґрунті показало, що УФ-В-опромінення підвищує та стимулює їхню системну стійкість до комах у порівнянні з рослинами, які знаходилися в умовах відсутності УФ-В (Ballare et al, 1996; Mazza et al, 2013). Клітинний стрес, викликаний УФ-опроміненням, сприяє полегшенню активації відповіді «перехресна толерантність» («cross-tolerance»), в якій відбувається активація шляхів, зазвичай пов'язаних із захистом рослин від патогенів і реакцій на механічне пошкодження. Перехресна толерантність була відмічена у рослин після впливу УФ-В- або УФ-С-опромінення як зростання їхньої захисної функції при патогенезі. Останнє зумовлено посиленням активності саліцилової та жасмонової кислот або етилену, яке відбувається задля активації даними сигнальними шляхами кінцевих реакцій імунної відповіді рослин (Mackerness et al, 1999; Nawrath et al, 2002).

При опроміненні рослин УФ-С калозу виявлено у клітинних стінках *Arabidopsis thaliana* L. Впливу ультрафіолету було достатньо для прямої або побічної (можливо через покоління ROS) зміни цілісності клітинної мембрани (Mintoff et al, 2015), що, ймовірно, і призводило до локального накопичення калози як швидкої захисної реакції при первинній репарації структур клітинної стінки (Emelyanov et al, 2018) та її подальшого відновлення у місцях руйнування. В експериментах з використанням ультразвуку та механічних подразників спостерігали початкове накопичення калози

в районі плазмодесм (Currier, Webster, 1964; Galway, Mc Cully, 1987). При опроміненні рослин ультрафіолетом С у дозі 0,5 і 1 кДж/м² відкладання калози в клітинах досягало свого максимуму на 48 год експерименту (Mintoff et al, 2015).

Досі відкритими залишаються питання відносно ступеня порушення і заподіяної шкоди, змін у фізіологічному стані клітин, стимулювання певних захисних механізмів, які можуть відбуватися в рослинах за умов впливу різних доз УФ-В опромінення. Також невивченим залишається питання, яким чином даний тип стресу ініціює реакції-відповіді і які мінімальні дози УФ-В опромінення необхідні для їх активації.

Для того, щоб обмежити шкідливий вплив великих доз ультрафіолету, рослинні клітини, зазвичай, використовують захисні механізми, які допомагають їм відновлювати пошкоджені структури та, таким чином, за рахунок комплексу захисних реакцій підтримувати свою життєздатність. Завдяки фото-реактивації ультрафіолетовим випромінюванням відбувається репарація ДНК, синтез і накопичення вторинних метаболітів, таких як: флаваноїди, антоціани, токофероли і поліаміни, що мають УФ-захисні та антиоксидантні властивості (Li et al, 1993; Landry et al, 1995; Vonarx et al, 1998; Britt, 1999; Bashandy et al, 2009; Hectors et al, 2014, Zhuk et al, 2022). У дослідженнях, де рослини переважно піддавали високим рівням впливу УФ-С опромінення, пошкодження клітин спостерігали навіть візуально (Mintoff et al, 2015).

Вивчення механізмів конститутивної, індукованої та системної стійкості, пов'язаних з накопиченням калози (Boboshko et al, 2019) як незамінної захисної речовини у злаків є вельми актуальним. Маловивченими також залишаються питання щодо кількості накопичення калози та її співвідношення з приростом біомаси рослин (Panyuta et al, 2014) чи їх ростовими показниками.

Для визначення шкідливого і нешкідливого ефекту УФ-опромінення на рослини нами було докладно розглянуто літературні джерела щодо ефективних доз УФ-В та обрано їх діапазон у межах 0,1–10 кДж/м². Для експериментів було взято рослини озимої пшениці сорту Ренан (*Triticum aestivum* L.) з наявним геном *Pch1*

(Panyuta et al, 2014), який характеризується підвищеною стійкістю до вилягання, впливу патогенних грибів *P. herpotrichoides* і забезпечує високу врожайність.

Експериментальна робота передбачала проведення досліджень щодо визначення кількості накопичення калози у проростків озимої пшениці конститутивно та при УФ-В опроміненні, з'ясування впливу використаних доз ультрафіолету на ростові показники рослин обраного сорту та виявлення закономірностей у схемі: доза опромінення — ростові показники — накопичення калози.

Матеріали та методи. Проростки озимої пшениці сорту Ренан (*Triticum aestivum* L) вирощували на піщаному ґрунті. Насіння пшениці висаджували у горщики по 100 штук. Експерименти проводили на 7-ми денних проростках озимої пшениці впродовж наступних 5 діб.

Рослини піддавали дії УФ-В, джерелом якого був випромінювач — ОБМ-150 М з двома лампами Philips special fluorescent lamp потужністю 35 Вт. При калібруванні була встановлена відстань від ламп до поверхні ґрунту, яка становила 44 см та дорівнювала 2 Вт/м². Час опромінення (у секундах), який потрібен для того, щоб отримати необхідні дози — 0,1, 1 та 10 кДж/м², розраховували за формулою:

$$T = \frac{D}{P}.$$

Отримано наступні часові інтервали експозиції рослин: 100 Дж/м²: 2 Вт/м² = 50 с; 1000: 2 = 500 с = 8 хв 20 с; 10000:2 = 5 000 с = 83 хв 20 с.

Контрольні зразки під час опромінення експериментальних рослин тримали у темряві. Через зазначений вище час опромінення горщики з експериментальними рослинами поступово переносили в темряву до контрольних. По закінченню опромінення останніх експериментальних зразків дозою 10 кДж/м² всі горщики з рослинами переносили в культуральну кімнату з інтенсивністю освітлення 20 кЛк/м² і світловим періодом 16 год. Виміри ростових показників та відбір рослинного матеріалу для визначення кількості накопиченої калози проводили кожні 24 год впродовж 5 діб.

Виділення та кількість калози визначали за методом Каусса (Kauss et al, 1989) з модифі-

каціями (Emelyanov et al, 2008). Флуоресценцію розчину вимірювали за допомогою спектрофлуориметра СДЛ-2 («ЛОМО», СРСР). Довжина хвилі детекції становила 490 нм, довжина хвилі збудження — 397 нм. Для побудови кривої калібрування використовували свіжий розчин штучно синтезованого β -1,3-глюкану — пахімана в діапазоні концентрацій від 0,2 до 20 мкг/мл (люб'язно наданий проф. Т. Боллером, Швейцарія) (Emelyanov et al, 2008). Використовуючи калібрувальний графік інтенсивності люмінесценції пахіману визначали кількість калози та виражали її у мкг-еквівалентах пахімана/мг сирової маси рослинного матеріалу (сгрм).

В експериментах використовували барвник аніліновий блакитний («Sigma», США). Всі інші реактиви для приготування розчинів згідно методики Каусса були представлені виробниками Укрреактивпрому (Україна).

Досліди проводили у триразовому біологічному та аналітичному повторах. Результати опрацьовували статистично з використанням програми Microsoft-Excel. На графіках наведено середньо-арифметичні значення та величини дисперсії.

Результати та їх обговорення. В результаті роботи було виявлено, що середній приріст за довжиною у контрольних рослин пшениці сорту Ренан з 7 до 12 доби експерименту становив біля 1,6 см за добу. Середні ростові показники у проростків після опромінення у дозах від 0,1 до 10 кДж/м² на початок експерименту (0 год, 7 доба) у середньому складали: у контрольному варіанті — 17,1 см, у горщиках з рослинами, опроміненими УФ-В дозами 0,1 та 1 кДж/м² — 18 см, а дозою 10 кДж/м² — 16,7 см (рис. 1).

На 24 год експерименту (8 доба) рослини контрольного варіанту мали середнє значення ростових показників 19,8 см, опромінених у дозі 0,1 кДж/м² — 21,3 см, 1 кДж/м² — 20,4 см та 10 кДж/м² — 20 см. При цьому достовірних відмінностей у значеннях ростових показників рослин, опромінених у вищезазначених дозах УФ-В між собою та рослинами контролю, як на 0, так і на 24 год експерименту, виявлено не було (рис. 1). При порівнянні значень ростових показників проростків пшениці сорту Ренан на 0 та 24 год експерименту було вияв-

лено їх зростання, як у рослин контролю, так і у рослин, опромінених всіма використаними дозами УФ-В (рис. 1). У рослин контрольного варіанту на 24 год експерименту довжина проростків у середньому зростала на 2,7 см порівняно з контролем. У рослин, опромінених дозами 0,1 та 10 кДж/м², середнє значення ростових показників у порівнянні з минулою добою були вищими на 3,3 см, а у рослин, опромінених дозою 1 кДж/м², спостерігався найменший їхній приріст у довжину, який у середньому складав 2,4 см.

Через 48 год експерименту середнє значення ростових показників у контрольному варіанті рослин сорту Ренан зростало на 1,9 см. У рослин, опромінених у дозах УФ-В у діапазоні від 0,1 до 10 кДж/м², спостерігалось призупинення приросту проростків у довжину, яке суттєво не відрізнялось від показників експериментальних рослин за минулу добу (рис. 1).

На 72 год експерименту спостерігали відсутність зростання довжини як опромінених, так і контрольних рослин даного сорту. На 96 год експерименту середні значення ростових показників у контролі відрізнялися від показників на 72 год та збільшувалися на 2 см, і становили у середньому 23,6 см. Середні значення ростових показників рослин, опромінених дозами 0,1; 1 і 10 кДж/м², мали тенденцію до зростання у порівнянні з попередньою добою та становили: 0,3; 0,6 та 1 см у відповідності до збільшення дози, але при цьому не мали значних розбіжностей з середніми показниками експериментальних рослин за минулу добу (рис. 1).

Через 120 год значення ростових показників у контролі зростали на 1 см та становили у середньому 25,2 см. У експериментальних рослин середні значення ростових показників збільшувалися на 1,5 та 1,1 см відповідно при дозах опромінення 0,1 та 1 кДж/м², але не мали розбіжностей у порівнянні зі значенням попередньої доби (рис. 1).

Отже, у рослин пшениці сорту Ренан при їх опроміненні дозами 0,1 та 10 кДж/м² ріст проростків пригнічувався у порівнянні з контролем, починаючи з 48 год експерименту (рис. 1). Опромінення проростків ультрафіолетом В у дозі 1 кДж/м² з 0 до 24 год дослід-

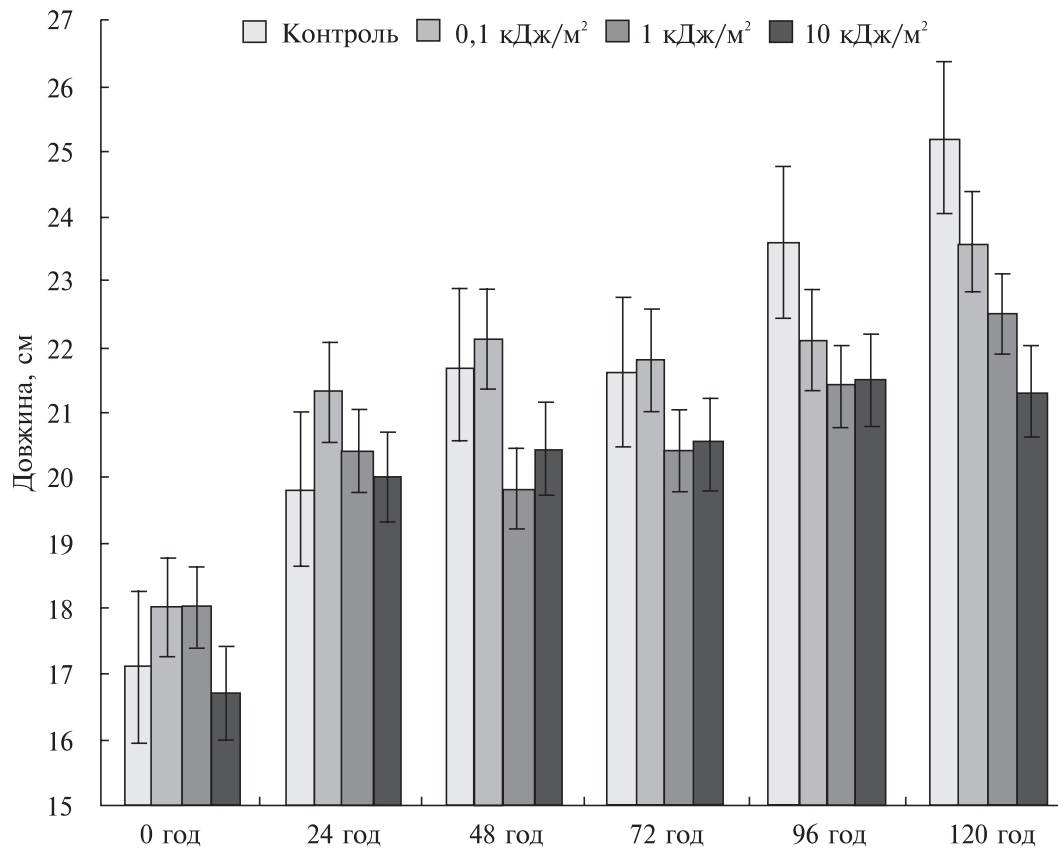


Рис. 1. Ростові показники контрольних і УФ-В опромінених рослин

ження стимулювало приріст рослин в середньому на 2,4 см, а на 48 год приріст призупинявся та відповідав значенням минулої доби – 20,4 см. Середні ростові показники контрольних та всіх експериментальних рослин на 72 год дослідження майже не змінювались у межах середньостатистичної похибки порівняно з показниками минулої доби. На 96 і на 120 год дослідження ростові показники рослин пшениці, опромінених у дозах 1 та 10 кДж/м², були достовірно нижчими за контроль (рис. 1). Після опромінення 7-ми денних проростків пшениці УФ-В впродовж 5-ти добового експерименту було відмічено, що приріст у довжину для всіх варіантів рослин сорту Ренан затримувався у порівнянні з контрольними проростками даного сорту починаючи з 48 год, впродовж всього експерименту їх параметри зростали дуже несуттєво (рис. 1). Таким чином, вплив УФ-В опромінення на рослини пшениці мав інгібуючий ефект щодо приросту рослин у

довжину порівняно з контрольними рослинами даного сорту.

Наступний етап дослідження передбачав визначення кількості накопичення конститутивної та УФ-В індукованої калози при опроміненні рослин пшениці у діапазоні доз від 0,1 до 10 кДж/м², яке тривало з 7 до 12 доби, та подальшим порівняльним аналізом її накопичення. Результати досліджень щодо визначення кількості конститутивного відкладання калози на 24 год експерименту у контрольних варіантах становило близько 0,9 мкг-екв пахімана/мг сирої маси рослинного матеріалу (мкг-екв/мг смрм) (рис. 2). Кількість її накопичення поступово збільшувалась впродовж 120 год. До 72-ої год експерименту її кількість в середньому зростала на 0,2 мкг-екв/мг смрм за добу. Після 72-ої год досліджень кількість калози збільшувалась у середньому на 0,4 мкг-екв/мг смрм. Максимальний вміст калози в проростках контрольних рослин спостерігали на 120 год дослідження, який був

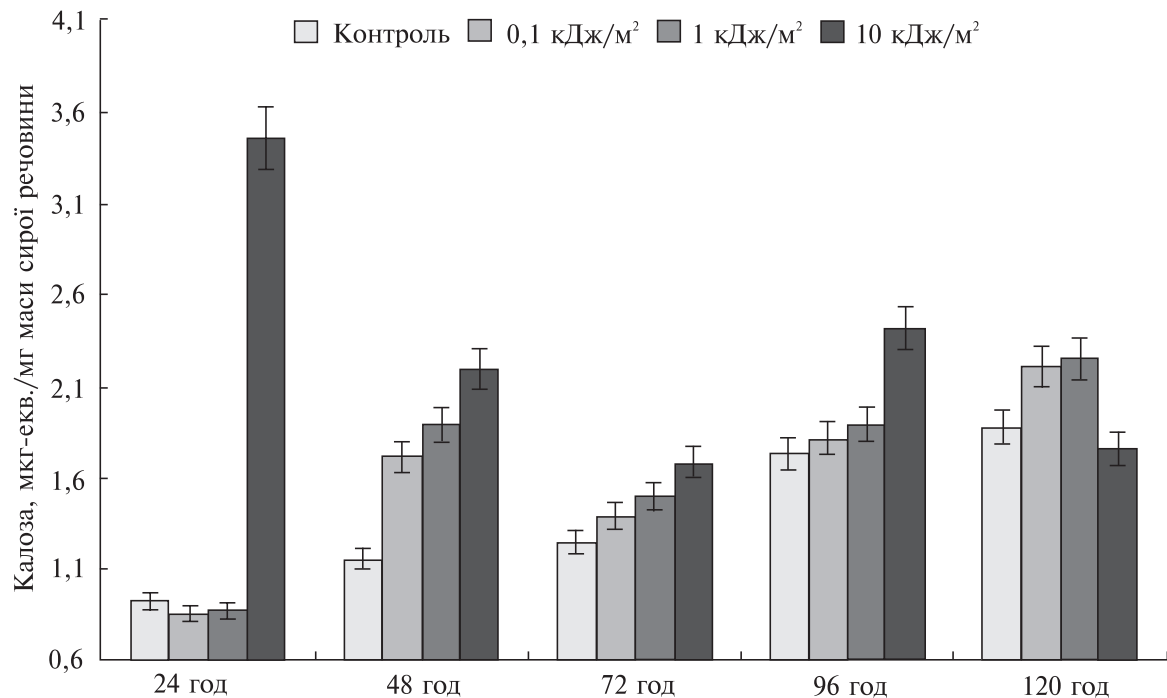


Рис. 2. Вміст калози у рослин пшениці сорту Ренан за умов УФ-В опромінення

більше ніж у 2 рази вищим порівняно з 24 год експерименту, і становив у середньому 1,88 мкг-екв/мг смрм.

Проростки пшениці експериментальних зразків, які піддавали дії УФ-В опромінення у дозах від 0,1 до 10 кДж/м², характеризувалися наступними показниками щодо кількості відкладеної калози в рослинних клітинах. Кількість накопичення калози на 24 год експерименту після опромінення у дозах 0,1 та 1 кДж/м² становило 0,87 та 0,88 мкг-екв/мг смрм відповідно, що було меншим навіть за середні значення у контрольних рослин, які становили 0,9 мкг-екв/мг смрм. Отримані результати за умов використання зазначених доз опромінення знаходились у межах середньостатистичної похибки (рис. 2). За умов впливу дози опромінення 10 кДж/м² вміст калози зростав у порівнянні з контролем у середньому в 2,8 рази та становив 3,4 мкг-екв/мг смрм, що було найбільшою її кількістю накопичення за весь термін експерименту. Такі розбіжності у кількості накопичення калози на 24 год експерименту можуть бути пояснені тим, що доза опромінення 10 кДж/м² мала суттєвий пошкоджуючий ефект на рослини

(Mintoff et al, 2015), який призвів до множинних ушкоджень клітинної стінки. Враховуючи наявність великої кількості локальних конститутивних ферментативних комплексів калозосинтази (Boboshko et al, 2019), рослинні клітини мали можливість відновлювати свої структури як за рахунок індукованого генетично-детермінованого синтезу калози, так і за рахунок глюкози, що входить до складу зруйнованих УФ-В опроміненням ділянок клітинних стінок. Це опосередковано підтверджується результатами досліджень щодо реакцій імунної відповіді, виявлених у тканинах рослин цибулі (Emelyanov et al, 2018). В цьому дослідженні було показано, що рослинні клітини лусок *Allium cepa* при їх інокуляції патогенними грибами за рахунок роботи своїх гідролітичних ферментів та калозосинтази були здатні формувати гранули калози як особистий захисний бар'єр з молекул ¹⁴C-глюкози, яка входила до складу структур патогенних грибів *Botrytis allii* та *Botrytis cinerea*. Тобто глюканазі рослинних клітин цибулі були здатні отримувати мономери та, можливо, олігомери глюкози з β-1,3-глікозидним зв'язком, з яких за допомогою рослинних комп-

лексів калозосинтази і формувався механічний захисний бар'єр — калоза.

Окрім того, логічним є припущення, що при роботі комплексу калозосинтази за принципом фермент-субстрат глюкозовмісні структури клітинної стінки рослин, пошкоджені ферментами патогенних грибів, також стають субстратом для синтезу калози задля швидкого відновлення цілісності клітинної стінки (Emelyanov et al, 2008, Emelyanov et al, 2018). Враховуючи пошкоджуючий ефект дози 10 кДж/м² (Mintoff et al, 2015) та раніше проведені роботи нашої групи щодо індукованого накопичення калози у рослин пшениці під час патогенезу (Boboshko et al, 2019), можна стверджувати, що частина калози була використана для швидкого первинного відновлення зруйнованих ділянок клітинної стінки. Високо ймовірно, що це відбувалось і за рахунок глюкози, яка вивільнилася з пошкоджених структур КС. Такий перебіг подій добре пояснює неймовірно високий рівень накопичення калози у 8-ми денних проростків пшениці опромінених дозою 10 кДж/м² у порівнянні з кількістю її відкладання при інокуляції рослин такого ж віку даного сорту при використанні максимальних титрів патогену, яке було проведено в попередніх експериментальних дослідженнях, та які не приводили до таких високих кількісних показників накопичення цієї універсальної захисної речовини (Boboshko et al, 2019).

На 48 та 72 год експерименту у рослин, опромінених дозою 10 кДж/м², спостерігалось поступове зниження кількості накопичення калози до 2,2 та 1,69 мкг-екв/мг смрм відповідно (рис. 2), яке, можливо, зумовлене її ферментативним перетворенням в інші конститутивні структури клітинної стінки — целюлозу (Chowdhury et al, 2014) та інші. На 96 год експерименту знову відбувалося підвищення рівня індукованого накопичення калози до значення 2,43 мкг-екв/мг смрм, а на 120 год її кількість зменшувалась до рівня контрольних рослин, тобто реакція накопичення калози досягала свого фізіологічного максимуму (Emelyanov et al, 2008). Можливо, це пов'язано з відновленням зруйнованих опроміненням структур клітинної стінки у каскаді захисних реакцій рослин пшениці у

відповідь на УФ-В опромінення. Окрім репарації пошкоджених структур клітинної стінки, калоза одночасно може виступати в ролі основи для формування інтегральних дисипативних структур — захисних кластерів (Chowdhury et al, 2014), які забезпечуватимуть системну стійкість оновленої клітинної стінки до повторних впливів як абіотичних, так і біотичних стресових факторів (Zeyen et al, 2002). В перспективі остання теза потребує проведення додаткових мікроскопічних досліджень.

На 24 год експерименту кількість індукованої калози за умов впливу доз 0,1 та 1 кДж/м² майже співпадала із значеннями контролю в межах середньостатистичної похибки, а на 48 год суттєво зростала порівняно із значеннями у контролі — 1,17 мкг-екв/мг смрм та становила 1,72, і 1,9 мкг-екв/мг смрм відповідно. При цьому кількість накопичення калози у даних експериментальних рослин була нижчою, ніж у рослин, опромінених дозою 10 кДж/м². На 72 год експерименту кількість калози зменшувалась у порівнянні з попередньою добою, а, починаючи з 96 год, знову зростала до рівня 48 год та, враховуючи середньостатистичну похибку, була у межах кількості відкладання калози у контрольних рослин пшениці, але значно меншими за кількість калози у рослин, опромінених дозою 10 кДж/м². На 120 год експерименту кількість накопичення калози у зразках, опромінених УФ-В у дозах 0,1 та 1 кДж/м², продовжувала поступово зростати в середньому до рівня 2,21 і 2,22 мкг-екв/мг смрм відповідно і була вищою за контроль та експериментальні рослини, піддані опроміненню дозою 10 кДж/м² приблизно на 0,35 мкг-екв/мг смрм (рис. 2). Періодичні коливання кількості накопичення калози та зменшення її показників вродовж п'яти діб дослідження може бути логічно пояснено тільки наявністю ферментативного перетворення калози як тимчасової структури для подальшого відновлення цілісності КС досліджуваних рослин, що були піддані УФ-В опроміненню, та її біохімічному перетворенню в інші конститутивні або/та інтегральні структури клітинної стінки. У разі опромінення рослин стимулюючими дозами 0,1 та 1 кДж/м² відбувається формування інтегральних комплексних сполук з наявною

в них калозою (Chowdhury et al, 2014), які у подальшому онтогенезі можуть забезпечувати рослинам пшениці системну стійкість до повторного стресу.

Повертаючись до питання інгібування росту рослин сорту Ренан при опроміненні УФ-В, необхідно розглянути можливі причини даного ефекту. Зменшення довжини проростків цього сорту за дії стресу може бути пов'язано з накопиченням калози в плазмодесмах. У вищих рослин плазмодесми регулюють транспорт поживних речовин і сигнальних молекул між клітинами (Wu et al, 2018). Певна кількість накопичення калози визначає розмір плазмодесм, що, у свою чергу, впливає на їхню проникність (Wu et al, 2018). Від зміни проникності плазмодесм залежить розвиток продихів і ситовидних трубок флоєми, фототропізм і транспорт через флоему (Song et al, 2016; Barratt et al, 2011). Мутант *Arabidopsis gsl8/chor* продемонстрував накопичення калози в плазмодесмах, що впливало на розвиток продихів і фототропну реакцію шляхом регулювання розподілу регулятора розвитку продихів ауксину (Han et al, 2014). Ген *Arabidopsis GSL7* регулює відкладання калози в плазмодесмах на ранній стадії розвитку ситовидних трубок, що призводить до формування меншої кількості пор плазмодесм і впливає на транспорт у флоємі (Barratt et al, 2011). Отже, контролюючи сигнали розвитку та механізм транспортування через симпласти різних речовин, накопичення калози у плазмодесмах може корегувати онтогенетичні програми розвитку рослин, наслідком чого, можливо, і стало зменшення приросту рослин пшениці сорту Ренан у довжину за дії УФ-В.

Гранули калози також є механічним бар'єром і місцем накопичення антимікробних вторинних метаболітів, у тому числі фенолів та поліфенолів (Cle et al, 2008), різноманітних ароматичних сполук. Як патогенез, так і УФ-опромінення викликає пролонговане у часі накопичення фітоалексинів (Karou et al, 2005; Mintoff et al, 2015). Останні виконують роль як фунгітоксинів пролонгованої дії в зонах локального патогенезу (Gupta, Tripathy, 2011), так і речовин індукованої системної стійкості, які забезпечують підвищену стійкість до повторного впливу абіотичних чинників (Zeyen

et al, 2002). Стрес-індуковані інтегральні структури сприяють механічному укріпленню рослинного організму, наприклад, визначають стійкість рослин пшениці до вилягання (Boboshko et al, 2019). Тобто ароматичні сполуки, вступаючи у хімічний зв'язок з гранулами калози, формують стійкий біохімічно-механічний захисний бар'єр (McLusky et al, 1999). Внаслідок взаємодії даного структурно-біохімічного конгломерату з іншими компонентами клітинної стінки утворюються захисні кластерні структури, які зумовлюють підвищену стійкість рослинних тканин до повторного стресу, дії патогенів (Zeyen et al, 2002), високоенергетичних квантів сонячного опромінення (Newman et al, 2007) тощо. Крім того, синтезовані рослиною ароматичні сполуки є природною альтернативою хімічним засобам контролю патогенезу сільськогосподарських культур (Ferrazzano et al, 2009), що, безперечно, можна використовувати у захисті рослин ініціацією підвищення системного імунітету шляхом попереднього праймування (Emelyanov et al, 2008). Синтез та накопичення стрес-метаболітів у рослин (Newman et al, 2007), під час якого виникають патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs), призводять до виникнення так званого тривимірної системного імунітету (Zipfel, 2008).

Таким чином, у рослин пшениці сорту Ренан можуть мати місце унікальні механізми захисної відповіді на стрес за участі калози, які забезпечують гнучку систему синтезу та трансформації молекулярних структур в інші конгломерати, що призводить до формування системної стійкості рослин до повторного впливу несприятливих факторів середовища (Boboshko et al, 2019). Останнє може бути пов'язано з наявністю у рослин даного сорту транслокаційного гена *Pch 1*, який, у свою чергу, може бути відповідальним за більш високий рівень синтезу калози у порівнянні з іншими сортами озимої пшениці (Boboshko et al, 2019).

Щодо з'ясування ролі гена *Pch1* у формуванні конститутивного та індукованого накопичення калози у рослин пшениці сорту Ренан і, можливо, інших стрес-метаболітів, їхньої ролі у системній стійкості рослин цього сорту можуть дати відповідь експерименти по виключенню даного гена за допомогою анти-

смісловій РНК (Sanders, Hiatt, 2005) або редагування гена *Pch1* з використанням CRISPR – Cas системи (Sontheimer, Barrangou, 2015).

Таким чином, в експериментальній роботі вперше визначено ростові показники та кількість калози, накопиченої в проростках озимої пшениці сорту Ренан при опроміненні їх ультрафіолетом В. Виявлено, що середній приріст проростків пшениці за 5 діб у контрольних варіантах становив у середньому 1,6 см/добу. Встановлено, що після впливу УФ-В опромінення у дозах від 0,1 до 10 кДж/м² приріст рослин озимої пшениці пригнічувався у порівнянні з контролем. Ростові показники за 5 діб експерименту в середньому були меншими відносно контролю та найменшими за впливу дози 10 кДж/м². Вплив УФ-В опромінення мав інгібуючий ефект щодо приросту рослин у довжину порівняно з контролем, що пов'язано з морфологічними особливостями індукованого накопичення калози у рослин озимої пшениці даного сорту. Частина калози, зафіксована у 8-ми денних проростках рослин сорту Ренан за умов опромінення у дозі 10 кДж/м², може бути синтезованою у тому числі і за рахунок пошкоджених структур клітинної стінки, які містили глюкозу. Це добре пояснює неймовірно високий рівень індукованого накопичення калози, якого не спостерігалось у порівнянні з інокуляцією рослин максимальними титрами патогену.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу було виконано в рамках бюджетного фінансування ІКБГІ НАН України за науковою темою № III-4-18 Вивчення молекулярно-біологічних механізмів стійкості і адаптації рослин до абіотичних і біотичних стресів.

CALLOSE ACCUMULATION IN WINTER WHEAT SEEDLINGS UNDER UV IRRADIATION

О.П. Boboshko, R.V. Kovbasenko,
К.О. Halkina, Yu.V. Symonenko,
А.М. Mikheev, V.I. Emelyanov

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv,
Ukraine 148 Akademika Zabolotnoho St., 03143
Institute of Plant Physiology and Genetics of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine 31/17
Vasylkivska St., 03022

E-mail: asp.boboshko@gmail.com; rayasenko@ukr.net;
galkina.k@icbge.org.ua; yuri.simonenko@icbge.org.ua;
mikhalex7@yahoo.com; vldeml@ukr.net

For the first time, the growth parameters and the amount of callose accumulated in the seedlings of winter soft wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Renan were determined under irradiation with ultraviolet B in the dose range of 0.1–10 kJ/m². The differences in growth parameters of control and UV-B-irradiated winter wheat plants were analyzed. The inhibitory effect of UV-B irradiation on the growth of experimental plants in comparison with control plants was noted, which is associated with the morphological and physiological features of the induced accumulation of callose in the cells of winter wheat seedlings. The growth performance of irradiated plants within 5 days was lower than that of the control plants, whose growth averaged 1.6 cm per day, and the lowest at a dose of 10 kJ/m². The results of constitutive and induced accumulation of callose as a primary protective barrier in the immune response reactions, which leads to increased resistance of wheat plants of Renan variety to abiotic stress, were analyzed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ballare CL, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ (1996) Solar Ultraviolet-B Radiation Affects Seedling Emergence, DNA Integrity, Plant Morphology, Growth Rate, and Attractiveness to Herbivore Insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol* 112(1):161–170. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.161>
- Ballaré CL, Caldwell MM, Flint SD, Robinson SA, Bornman JF (2011) Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10(2):226–41. <https://doi.org/10.1039/c0pp90035d>
- Barratt DH, Kölling K, Graf A, Pike M, Calder G, Findlay K, Zeeman SC, Smith AM (2011) Callose synthase *GSL7* is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155(1):328–41. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166330>
- Bashandy T, Taconnat L, Renou JP, Meyer Y, Reichheld JP (2009) Accumulation of flavonoids in an ntrb mutant leads to tolerance to UV-C. *Mol Plant* 2(2):249–58. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn065>
- Boboshko O, Emelyanov V, Panyuta O, Taran N

- (2019) Constitutional and Induced Accumulation of Callose and Phenol Compounds as Elements of Systemic Resistance in Winter Wheat Sprouts. *Cytol Genet* 53(5):35–45. <https://doi.org/10.3103/S0095452719050049>
- Bornman J, Evert R, Mierzwa R (1983) The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma* 117:7–16. <https://doi.org/10.1007/BF01281779>
- Britt AB (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Sci* 4:20–25. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(98\)01355-7](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(98)01355-7)
- Chowdhury J, Henderson M, Schweizer P, Burton RA, Fincher GB, Little AC (2014) Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. *New Phytol* 3(204):650–660. <https://doi.org/10.1111/nph.12974>
- Cle C et al (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69 (11):2149–2156. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.024>
- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BP (2015) Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Ann Rev Phytopathol* 53:541–563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>
- Currier HB, Webster DH (1964) Callose formation and subsequent disappearance: studies in ultrasound stimulation. *Plant Physiol* 39:843–847. <https://doi.org/10.1104/pp.39.5.843>
- Danon A, Gallois P (1998) UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437:131–136. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01208-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01208-3)
- Emelyanov VI, Kravchuk JN, Poliakovskiy SO, Dmitriev OP (2008) Callose accumulation during treatment of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cells with biotic elicitors. *Cytol Genet* 42(2):21–28. PMID: 18630116
- Emelyanov VI, Polyakovskiy SA, Sakada VI, Grodzinskiy DM (2018) Plant cells formed their protective structures use molecules of phytopathogenic microorganisms. *Reports NAS of Ukraine* 3:110–115. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.03.110>
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Natale De A, Pollio A (2009) Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 80(20):255–262. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.04.006>
- Galway ME, McCully ME (1987) The time course of the induction of callose in wounded pea roots. *Protoplasma* 139:77–91. <https://doi.org/10.1007/BF01282278>
- Gupta SK, Tripathi SC (2011) Fungitoxic Activity of *Solanum torvum* against *Fusarium sacchari*. *Plant Prot Sci* 47(3):83–91. <https://doi.org/10.17221/56/2010-PPS>
- Han X et al (2014) Auxin-callose-mediated plasmodesmal gating is essential for tropic auxin gradient formation and signaling. *Dev Cell* 28:132–146. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.008>
- Hectors K, Van Oevelen S, Geuns J, Guisez Y, Jansen MAK, Prinsen E (2014) Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 152:219–230. <https://doi.org/10.1111/ppl.12168>
- Karou D, Dicko MH, Simpore J, Traore AS (2005) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr J Biotechnol* 4:823–828. <https://edepot.wur.nl/33530>
- Kauss H, Jeblick W, and Domard A (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178(3):385–392. PMID: 24212905
- Landry LG, Chapple CC, Last RL (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109:1159–1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1159>
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5:171–179. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.2.171>
- Li N, Lin Z, Yu P, Zeng Y, Du S, Huang LJ (2023) The multifarious role of callose and callose synthase in plant development and environment interactions. *Front Plant Sci* 14:1183402. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1183402>
- Lytvyn D I, Yemets A I, Blume YB (2010) UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. *Environ Exp Bot* 68(1):51–57. <https://doi.org/10.1016/j>
- Mackerness SAH, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* 22: 1413–1423. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00499.x>
- Mazza CA, Gimenez PI, Kantolic AG, Ballare CL (2013) Beneficial effects of solar UV-B radiation on soybean yield mediated by reduced insect herbivory

- under field conditions. *Physiol Plant* 147:307–315. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01661.x>
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-30-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J* 17(5):523–534. ISSN: 0960-741
- Mintoff SJ, Rookes JE, Cahill DM (2015) Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 17(3):703–11. <https://doi.org/10.1111/plb.12286>
- Nawrath C, Heck S, Parinshawong N, Metraux JP (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14:275–286. <https://doi.org/10.1105/tpc.010376>
- Nedukha OM (2015) Callose: localization, functions, and synthesis in plant cells. *Cytol Genet* 49(1):49–57. <https://doi.org/10.3103/S0095452715010090>
- Newman MA, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M (2007) Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacteria lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* 13:69–84. <https://doi.org/10.1177/0968051907079399>
- Newsham KK, Robinson SA (2009) Responses of plants in polar regions to UVB exposure: a metaanalysis. *Global Change Biol* 15:2574–2589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01944.x>
- Sanders RA, Hiatt W (2005) Tomato transgene structure and silencing. *Nat Biotechnol* 3(23):287–289. PMID 15765076
- Song L, Wang R, Zhang L, Wang Y, Yao S (2016) CRR1 encoding callose synthase functions in ovary expansion by affecting vascular cell patterning in rice. *Plant J* 88:620–632. <https://doi.org/10.1111/tbj.13287>
- Sontheimer EJ, Barrangou R (2015) The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. *Hum Gene Ther* 26(7):413–24. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.091>
- Stass A, Horst WJ (2009) Callose in Abiotic Stress. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides* 499–524. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373971-1.00015-7>
- The patent for utility model 389960, Ukraine, A01N 1/04. Method of infection to assess the stability of winter wheat to the pathogen tserkosporelozu, Panyuta O.O. Belava V.N Taran N.Y. Bull. № 9. Applications. 01/11/2013. Publish. 05/12/2014 (in Ukraine)
- Underwood W (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Front Plant Sci* 4(8):48–593. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- Vonarx E, Mitchell H, Karthikeyan R, Chatterjee I, Kunz B (1998) DNA repair in higher plants. *Mutat Res* 400:187–200. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(98\)00043-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00043-8)
- Wu SW, Kumar R, Iswanto ABB, Kim JY (2018) Callose balancing at plasmodesmata. *J Exp Bot* 69:5325–5339. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery317>
- Zacchini M, de Agazio M. (2004) Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiol Biochem* 42:445–450. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.007>
- Zeyen RJ, Carver TLW, Lyngkjær MF (2002) Epidermal cell papillae. *The Powdery Mildews: a comprehensive treatise*, MN, USA: APS Press 107–125
- Zhuk VV, Mikheev AN, Ovsyannikova LG (2022) Effect of chronic ultraviolet b radiation on pea plants. *Factors in Experimental Evolution of Organisms* 30:67–72. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v30.1463> (in Ukraine)
- Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>

Надійшла в редакцію 05.11.2024
Після доопрацювання 20.11.2024
Прийнята до друку 18.03.2025