

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

КРИВОХИЖА МАРИНА ВІКТОРІВНА

УДК 577.218

**ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ТА УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО
ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЦВІТІННЯ РОСЛИН *ARABIDOPSIS*
*THALIANA***

03.00.01 – радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

**Дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних
наук (доктора філософії)**

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у лабораторії сигнальних систем відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Рашидов Намік Мамед огли

лабораторія сигнальних систем
відділ біофізики та радіобіології

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України, завідувач лабораторії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Хижняк Світлана Володимирівна

Національний університет біоресурсів і
природокористування України, провідний науковий
співробітник Української лабораторії якості та безпеки
продукції АПК, м. Київ

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник

Гудков Дмитро Ігоревич

Інститут гідробіології НАН України
Відділ водної радіоекології

Захист дисертації відбудеться «5» грудня 2019 р. об 11.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. академіка Заболотного, 148, м. Київ – 143, Україна, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: м. Київ, вул. академіка Заболотного, 148.

Автореферат розіслано 4 листопада 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 26.202.01
кандидат біологічних наук

К. В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність дослідження. Іонізуюче випромінювання є потужним стресовим фактором для всього живого. Численними дослідженнями результатів впливу різних режимів опромінення, включаючи хронічне опромінення з низькою потужністю, було встановлено високу уразливість репродуктивної функції у представників як тваринного, так і рослинного світу (Шевченко та ін. 1993, Гродзинський та ін. 2003). Вплив випромінювання на фертильність рослин агроландшафтів може спричинити важкі негативні наслідки для продукційного процесу, в зв'язку з чим дослідження його різних складових актуально не тільки з теоретичною, але й з практичної точки зору.

Вплив ультрафіолетового випромінювання на живі організми викликає зацікавлення у дослідників вже тривалий час (Teramura, Sullivan 1994), випромінювання коротких хвиль (УФ-С), довжиною 260 нм, швидко призводить до численних пошкоджень ДНК та застосовується для вивчення пошкодження ДНК рослин, тварин та бактерій (Dotto, Casati, 2017). УФ-опромінення впливає на прохідність у стомах, змінюючи швидкість втрати води шляхом транспірації та поглинання CO₂ для фотосинтезу (Zlatev et al., 2012), та в результаті репараційних процесів викликає зміну резистентності організму в цілому (Кравець та ін., 2013).

Ключовим процесом у репродуктивній функції рослин є стадія цвітіння. Відомо, що в морфогенезі рослин, вона є однією з найбільш чутливих до стресових факторів (Hwang et al. 2016). Цвітіння в оптимальні терміни є ключовим в онтогенезі рослин, які мають пройти запилення, накопичити необхідну кількість нутрієнтів для стабільного переходу до репродукції. На сьогодні молекулярно-генетичні механізми індукції переходу до генеративної фази найбільш широко вивчені на *Arabidopsis thaliana* (Chen et al. 2018), що робить можливим дослідження даного процесу на цьому модельному об'єкті під дією різноманітних стресових чинників, включаючи гостре і хронічне опромінення. У *A. thaliana* комплекс регуляції цвітіння є складною мережею, що включає понад сто генів, серед яких виділяють ключові транскрипційні фактори (Chen et al., 2018, Sasaki et al. 2017). Вважається, що цей складний механізм регулювання необхідний для стабільного переходу рослин від вегетативного розвитку до цвітіння, навіть за умови наявності генетичних порушень чи стресових факторів з довкілля (Irish, 2010).

Арабідопсис є рослиною довгого дня та його цвітіння настає зі збільшенням часу світлового дня. Фотоперіодичний механізм активації цвітіння існує для більшості видів, основну роль в якому відіграють циркадні годинники (Golembeski et al. 2014). Тому, метою дослідження було визначення активності генів, які пов'язані з циркадним годинником, *CONSTANS (CO)* та *GIGANTIA (GI)*; супресором фотоперіодичної активації цвітіння *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, геном флорального фактору *FLOWERING LOCUS T (FT)*, що залучений в каскадну реакцію передачі сигналу, та генами детермінації апікальної меристеми по генеративному типу *APETALA 1 (API)* та *LEAFY (LFY)* за дії іонізуючого

випромінювання. Окрім генів цвітіння, в роботі досліджували маркери системної відповіді рослин на іонізуюче випромінювання, якими є гени проліферації *PCNA2* та репарації *RAD51*. Ген *PCNA2* (*proliferating cell nuclear antigen*) виявлено в ядрах дріжджів, рослинних і тваринних клітинах. *PCNA2* має функцію регуляції клітинного циклу, відновлення та реплікації ДНК та грає роль в процесах, пов'язаних з геномом (Strzalka, Ziemienowicz, 2011). Ген *RAD51* має функцію репарації та приймає участь у рекомбінації у рослин та інших еукаріот (Manova, Gruszka, 2015).

Хоча, дослідниками було показано, що іонізуюче та УФ-випромінювання викликає у рослин зміни часу цвітіння та порушення розвитку органів квітки (Mattson, Erwin, 2005), механізми відповіді генеративної системи рослини повністю не встановлені (Kovalchuk et al, 2007; Hwang et al, 2016). У Чорнобильській зоні відчуження дослідники відмічали зниження фертильності у рослин, які зростали на радіаційно-забруднених територіях, аномалії у фенології рослин, наприклад появу другого піку цвітіння, відсутній у рослин контрольної групи, появу у рослин радіоморфозів, в тому числі репродуктивних органів, послабленням апікального домінування (Rashydov et al. 2012, Гудков, Кудяшева, 2018).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась з 2014 по 2019 роки у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та в рамках міжнародних програм та державних тем. Молекулярно-генетичний аналіз було виконано на базі відділу лісової генетики Університету Георга-Августа, Геттінген, Німеччина, в рамках проекту ID: 612587 «Plant DNA tolerance» програми міжнародних обмінів Марії Кюрі (FP7-PEOPLE-2013-IRSES). Частина експериментальної роботи виконувалась в Інституті генетики рослин та біотехнології, Нітра, Словаччина, в рамках стажування за стипендією Словацького уряду SAIA. В Інституті клітинної біології і генетичної інженерії робота виконувалась за бюджетними темами: II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (2012-2016), № держреєстрації 0112U003077, III-4-13 «Роль епігеномних механізмів в адаптогенезі рослин» (2013-2017), № держреєстрації роботи 0113U000228, III-4-18 «Вивчення молекулярно-біологічних механізмів стійкості і адаптації рослин до абіотичних і біотичних стресів» (2018-2022), № держреєстрації роботи 0118U001105.

Метою роботи є вивчення ефектів різних режимів дії рідкоіонізуючого та УФ-С випромінювання на час цвітіння рослин *A. thaliana* та експресію ключових генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння *CO*, *GI*, *FLS*, *FT*, гену репарації *RAD51*, проліферації *PCNA2* та детермінації флоральної меристеми *AP1* та *LFY*.

З огляду на мету дослідження були поставлені наступні **завдання**:

1. Проаналізувати зміни часу генеративної фази під впливом сублетальних доз гострого іонізуючого опромінення.

2. Визначити вплив хронічного рідкоіонізуючого радіаційного опромінення на час цвітіння.
3. Оцінити зміни в експресії ключових генів цвітіння, репарації та проліферації під впливом хронічного радіаційного опромінення.
4. Визначити участь сигнального гормону стресу жасмонової кислоти на активність генів цвітіння рослин.
5. Дослідити вплив УФ-С на час квітування *A. thaliana*, вирощених за освітлення різних спектрів.
6. Визначити характер змін експресії ключових генів цвітіння, репарації та проліферації рослин, культивованих у різних умовах освітлення, за дії УФ-С.
7. Визначити вплив різних умов культивування проростків на відповідь генів фотоперіодичного шляху у опроміненних УФ-С проростків.

Об'єкт дослідження: проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (*Brassicaceae*) в лабораторних умовах вирощування – у ґрунті та культурі *in vitro*.

Предмет дослідження: визначення відносної експресії ключових генів фотоперіодичного механізму *CO*, *GI*, *FLS*, *FT*, гену репарації *RAD51*, проліферації *PCNA2* та генів диференціації флоральної меристеми *API* та *LFY*.

Методи дослідження. Для виконання роботи використовувалися такі методи:

- фенологічний аналіз за класифікацією Бойсса (2001) для *A. thaliana*;
- лінійні виміри довжини листа та квітконоса;
- молекулярний аналіз за допомогою ПЛР в реальному часі;
- математичний аналіз відносної експресії генів.

Наукова новизна: Вперше показано високу супресію хронічного опромінення генів детермінації цвітіння, наявність нелінійної залежності зміни експресії генів фотоперіодичного механізму за дії сублетальних доз рідкоіонізуючого випромінювання. Вперше продемонстровано вплив спектру світла, при якому вирощували дослідні рослини, на активність генів фотоперіодичного шляху після УФ-С опромінення.

Практичне значення роботи. Отримані результати є важливими для організації сільськогосподарських робіт на радіаційно забруднених агроландшафтах. Дані досліджень можуть бути використані для прогнозування впливу підвищеного радіаційного фону на продукційний процес та формування врожайності сільськогосподарських видів рослин. Опрацьована методика аналізу активності генів цвітіння є перспективною для визначення напряму підбору сортів рослин для ефективного вирощування на забруднених територіях. Вивчення дії стресових факторів та впливу умов вирощування на відповідь фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння є важливими для розробки методики зменшення негативного впливу зовнішніх факторів на рослини у зв'язку зі змінами клімату, що призводить до збільшення УФ-радіації в довкіллі. Результати дисертаційної роботи будуть використані у викладанні навчальних дисциплін та спеціальних курсів з радіобіології, фізіології, молекулярної біології та генетики рослин у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз літературних даних за темою дисертації, визначено актуальність проблеми, сформульовано мету і завдання дослідження, написано всі розділи дисертації. Концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні положення і висновки дисертації сформульовані та обговорені здобувачем разом з науковим керівником д.б.н. Рашидовим Н.М.

Основні результати отримано здобувачем особисто або за її безпосередньої участі у виконанні експериментів. Експериментальну роботу проведено в ІКБГП, за керівництва д.б.н. Н.М. Рашидова, за участі та підтримки с.н.с. Н.К. Куцоконь, м.н.с. С.В. Літвінова, м.н.с. О.Г. Нестеренко. Молекулярний аналіз було проведено у відділі лісової генетики Університету Георга-Августа, м. Геттінген, Німеччина, за керівництва д.б.н, проф. К.В. Крутовського та за допомоги працівників відділу.

Досліди з вивчення впливу УФ-опромінення на гени цвітіння *A. thaliana* проводили в Інституті генетики рослин та біотехнології, Нітра, Словаччина, під керівництвом доктора філософії Я. Лібантової та за допомогою співробітників лабораторії генетики рослин.

Підготовка публікацій здійснювалася за керівництва Н.М. Рашидова, проф. д.б.н. К.В. Крутовського, д.б.н. Лібантової Я. та за участі С.В. Літвінова, О.Г. Нестеренко, к.б.н. М. Данченка. Особливу подяку висловлюємо за допомогу в підготовці тексту д.б.н. А.П. Кравець.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень було презентовано на міжнародній конференції «International Symposium on EuroAsian Biodiversity 2018 (SEAB-2018)», м. Київ, 7-й з'їзд Радіобіологічного товариства України з міжнародною участю", 2019, м. Київ, конференції «Біологія: від молекули до біосфери», 2015, «XXIII щорічна конференція Інституту ядерних досліджень НАН України», 2016, «Наук.-практ. конференція “Ефекти радіації та ксенобіотиків на репродуктивну систему та організм”, м. Долина, 2016, Конференція молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, 2015. Також окремі результати дисертації доповідались на наукових семінарах у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України з 2015 по 2019 рр.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, з яких 8 статей: дві статті у періодичних виданнях, індексованих у Scopus та Web of Science та 5 у виданнях, що є у переліку ДАК; та 7 тез у збірках конференцій, співавтор у 1 монографії.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, три є яких є експериментальними, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 148 сторінок, вона містить 26 рисунків, 26 таблиць, 158 цитованих джерела.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури наведено аналіз джерел, що описують вплив рентгенівського, гамма та ультрафіолетового випромінювання на рослини, а також особливості дії різних режимів опромінення: гострого одноразового та хронічного пролонгованого, які використані в дисертаційній роботі. Розглянуто механізми генетичної регуляції переходу до репродукції у *A. thaliana* за дії іонізуючого опромінення. Детально наведено опис фотоперіодичного механізму, який є основним шляхом регуляції переходу до генеративного розвитку у *A. thaliana*, який є об'єктом дослідження. Особливу увагу приділено важливості вивчення впливу хронічного опромінення у сучасній радіобіології. Проаналізовано результати попередніх досліджень щодо впливу різних типів випромінювання на генеративний розвиток рослин та активність ключових генів цвітіння відповідно різних фаз морфогенезу. Обґрунтовано використання аналізу експресії генів, як сучасної методики, що дає можливість отримати точні та релевантні дані.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал і умови культивування. Для виконання досліджень використовували проростки *A. thaliana* дикого типу (ДТ), екотип Columbia 0, та рослини мутантної лінії з дефектними (не чутливими) рецепторами жасмонової кислоти *jin1 (jasmonate insensitive)*, Col 0. Проростки культивували в стандартній ґрунтосуміші в умовах довгого дня: 18 годин освітленості та 6 годин темряви за кімнатної температури. В досліді використано 20 рослин з кожної групи. Частина досліджень проводили на проростках, вирощених *in vitro* на субстраті MS-20 з насіння. Перед культивуванням насіння стерилізували 25% розчином гіпохлориду натрію та 70% етанолом.

Фенотипічний та фенологічний аналіз проводили за класифікацією Бойєса (2001). Дана методологія використовується для ідентифікації та інтерпретації фенотипічних та фенологічних відмінностей у рослин, що виникають внаслідок генетичних змін та/або дії стресових факторів.

Характеристика освітлення. Для вивчення реакції проростків на освітлення УФ-С опромінення, дослідні рослини були розділені на п'ять груп, що попередньо культивували за червоного (довжина хвилі 610-750 нм), фіолетового (довжина хвилі 400-450 нм), нейтрально-білого (змішані хвилі з довжиною 380-750 нм) світла з потужністю LED ламп 20 Вт та 40 Вт.

Характеристика джерел опромінення. Хронічне опромінення здійснювали за допомогою джерел радіонуклідного випромінювання від $^{137}\text{CsCl}$ з інтенсивністю $6,8 \cdot 10^{-6}$ сГр/сек. Рослини проростали і знаходилися в полі випромінювання з постійною інтенсивністю впродовж вегетаційного періоду (6

тижнів). За гострого опромінення, рослини опромінювали рентгенівськими променями за допомогою лінійного прискорювача з енергією фотона 6 МеВ та потужністю 89 сГр/сек на фазі розетки 2.3 за класифікацією по Бойесу (2001) у віці 4 тижні. УФ-С опромінення проводили за допомогою УФ-С генератора з довжиною хвилі 254 нм з потужністю 30W на відстані 10 см від джерела опромінення на фазі сформованої розетки.

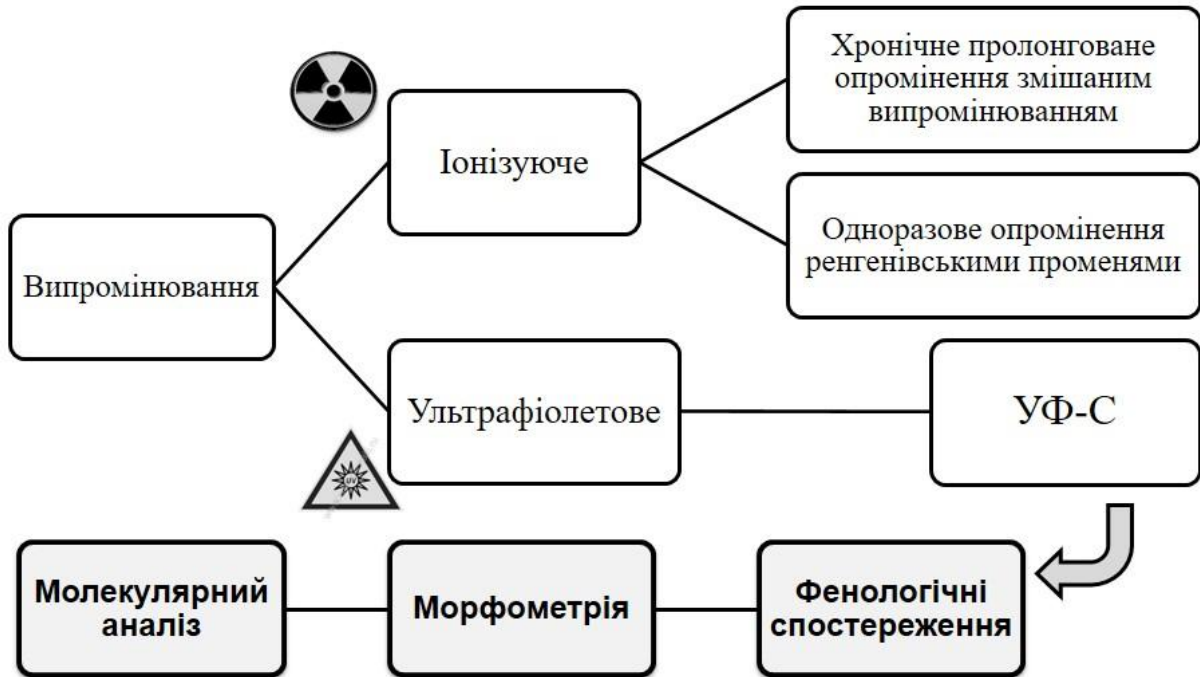


Рис.1. Схема дослідження.

Екстракція загальної РНК та отримання кДНК. Екстракція РНК проводилась за допомогою набору QIAGEN *Rneasy Plant mini kit* (Німеччина) відповідно протоколу виробника. Вимірювання концентрації РНК і оцінку чистоти виділення проводили методом спектрометрії. Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою ThermoFisher Scientific *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (США) згідно протоколу виробника. Для проведення реакції було використано 1 мкг РНК.

Молекулярно-генетичний аналіз. Відносну експресію генів *API*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY*, *RAD51*, *PCNA2* визначали методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі. Праймери для генів *RAD51*, *PCNA2* та *UBQ10* були розроблені за допомогою онлайн ресурсів NCBI Primer BLAST, послідовність праймерів для генів *API*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY* взято з літератури. В якості референсного гену використовували ген актину *ACT2* та убіквітину *UBQ10*.

Для проведення ПЛР використовували кДНК в розведенні 1:10, праймери в розведенні 1:100, майстер-мікси з флуорофорами SYBR Green (Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix). Для ампліфікації використовували тріступеневу програму з детектуванням по каналу Green.

Аналіз кожного зразка проводили у трьох технічних повторах. Для кожної пари праймерів була побудована стандартна крива для визначення коефіцієнта ефективності.

Статистична обробка даних. Статистичну обробку даних вегетативних показників проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA та t-критерієм Стьюдента. Статистичну обробку даних кількісної ПЛР проводили методом побудови стандартної кривої та визначення відносної активності генів з подвійною нормалізацією по референсним генам *ACT2*, *UBQ10* та контрольним зразкам, за допомогою програмного забезпечення REST 2009 Software (QIAGEN).

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЦВІТІННЯ РОСЛИН

Вплив низьких доз рентгенівського опромінення на експресію генів фотоперіодичного механізму. Результати досліджень вказують на наявність узгодженості у відповіді часу квітування рослин та активності генів фотоперіодичного шляху та диференціації флоральної меристеми. За «гострого» опромінення у дозі від 3 до 15 Гр було виявлено нелінійну залежність дії іонізуючого випромінювання на активність досліджуваних генів. Опромінення в дозі 3 Гр в незначній мірі стимулює гени цвітіння, проте, доза у 6 Гр викликає різке підвищення рівня експресії всіх генів. За подальшого підвищення дози до 9 та 15 Гр загальний профіль експресії навпаки зменшується (Рис. 2).

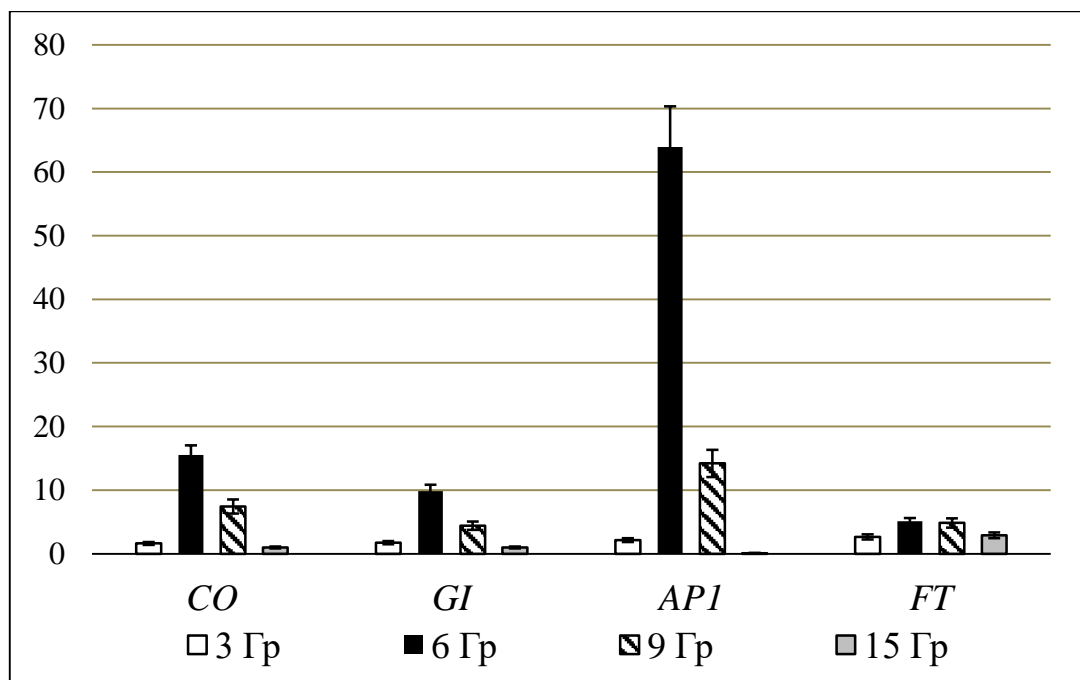


Рис. 2. Рівні експресії генів (по вертикалі) *CO*, *GI*, *API* та *FT* у *A. thaliana* під дією рентгенівського опромінення в сублетальних дозах (REST 2009, $p < 0,05$).

Необхідно відмітити, що ген *API*, який пов'язаний з диференціацією клітин апікальної меристеми по флоральному типу, значно стимулюється за дози у 6 Гр – 63,92 ($P(H1)=0,0$; 95% С.І. 54,22 - 70,96). Ми вважаємо, що занадто висока активність даного гена може викликати помилки при диференціації клітин меристеми та призводити до порушення розвитку органів квітки.

Одноразовий гострий вплив іонізуючого випромінювання на рослини має схожий ефект з хронічним впливом, але інтенсивність дії може відрізнити в 100 разів. Чутливість генів фотоперіодичного механізму є підтвердженням впливу низьких доз радіації на цвітіння рослин.

Участь шляхів жасмонатного сигналіngu у регуляції генів цвітіння за дії іонізуючого опромінення. За даними проведених досліджень були виявлені відмінності у вегетативних показниках дослідних груп. У мутантів *jin1* (*jasmonate insensitive*), дефектних по чутливості до жасмонової кислоти, при опроміненні 5 Гр спостерігали істотне збільшення довжини квітконоса порівняно з контрольною групою, але при хронічному опроміненні, істотних змін не виявлено. При порівнянні груп дикого типу (ДТ) та мутантів виявлено, що у проростків ДТ довжина квітконоса була більшою ніж у мутанта *jin1*. Дані аналізу експресії досліджуваних генів показали наявність різниці у профілях експресії генів у різних груп та відмінності між контрольними та дослідними групами. Дані активності генів за гострого та хронічного опромінення рослин ДТ та мутантів *jin1* представлені на Рис. 3.

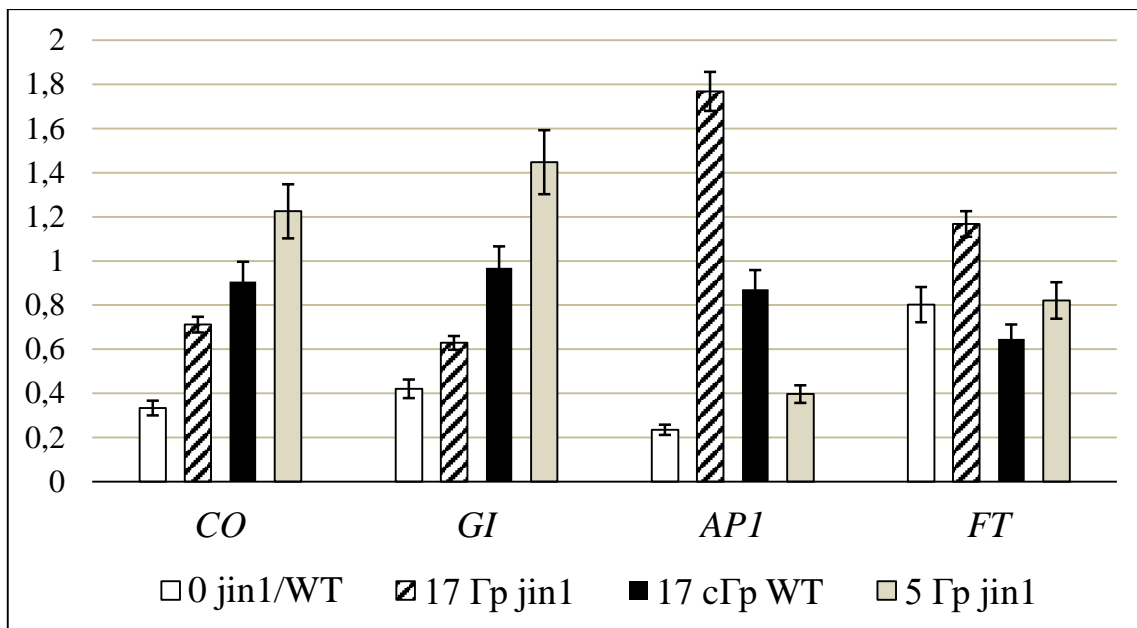


Рис.3. Порівняння експресії генів цвітіння (по вертикалі) у ДТ та мутантів *jin1* *A. thaliana* Col 0 (REST 2009, $p<0,05$).

В даному дослідженні було показано участь жасмонатного сигналіngu у відповіді генів фотоперіодичного шляху на опромінення. У мутантів *jin1*, гени циркадного годинника *CO* та *GI* мають нижчий рівень експресії, порівняно з ДТ. Проте експресія генів *API* та *FT* стимулюється опроміненням.

За даними авторів попередніх досліджень, жасмонова кислота та метілжасмонат задіяні в активації комплексу захисних реакцій рослин, важливих для формування стійкості до абіотичних і біотичних стресорів шляхом активації сигнальних мереж (Колупаєв, Карпець, 2010). Наші дослідження показали, що сигналінг жасмонової кислоти впливає на відповідь генів цвітіння. При опроміненні мутантів з порушеннями жасмонатного сигналінгу спостерігаються більш активні зміни експресії генів цвітіння. На основі отриманих результатів, можна висунути гіпотезу, що жасмонова кислота має стабілізуючий ефект на активність генів цвітіння у *A. thaliana* під час хронічного опромінення у малих дозах.

Вплив хронічного опромінення на фотоперіодичний механізм. В ході експерименту з вивчення дії хронічного опромінення, спостерігали фенологічні відмінності між контрольною і експериментальною групами. За фенологічними спостереженнями, у проростків *A. thaliana*, опромінених в дозі 3 сГр 6.3. фаза квітучання наступала на $8 \pm 2,8$ днів раніше, порівняно з контрольною групою. Проте, у рослин опромінених у дозі 17 сГр цвітіння наступало на $14 \pm 3,7$ днів пізніше, ніж у контрольній групі. Для порівняння наводимо, що у проростків, одноразово опромінених рентгенівськими променями в дозі 15 Гр, цвітіння наставало на $2 \pm 1,4$ дні пізніше, ніж у контрольній групі.

Дані фенологічних спостережень узгоджуються з даними молекулярно-генетичних досліджень. Аналіз відносної експресії ключових генів фотоперіодичного механізму свідчить, що опромінення викликає статистично значущі зміни в активності досліджуваних генів (Рис.4).

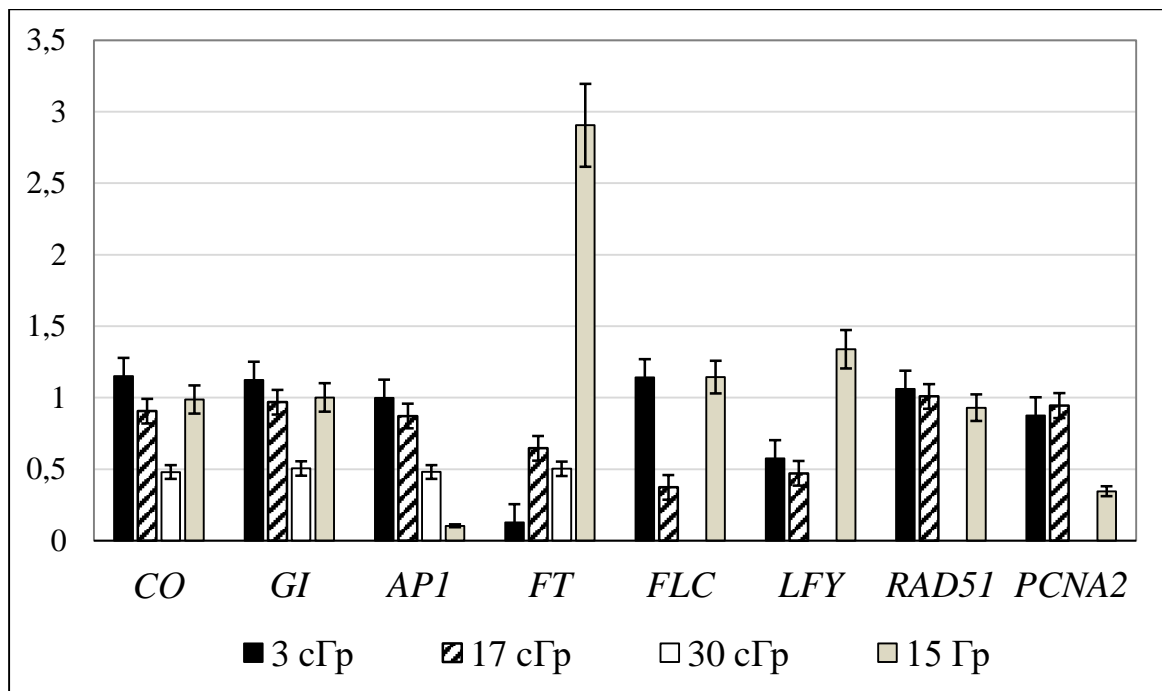


Рис. 4. Експресія шести генів цвітіння (по вертикалі) *RAD51*, *PCNA2* генів в *A. thaliana* за різних режимів дії іонізуючого опромінення (REST 2009, $p < 0,05$). 3 сГр, 17 сГр, 30 сГр – хронічне пролонговане опромінення, 15 Гр – гостре одноразове.

Дослідження показали, що хронічне опромінення впливає на гени фотоперіодичного механізму в більшій мірі, ніж гостре. Показано, що хронічне опромінення, за збільшення дози в 5 разів (з 3 до 17 сГр) викликає протилежний ефект на початок переходу до репродуктивного розвитку та на експресію генів цвітіння. Цікавим є те, що хронічне опромінення в дозі 17 сГр має більш виразний ефект ніж за гострого опромінення. За дії малих доз хронічного опромінення (3 сГр) стимулюється активність репараційних процесів, що відбувається після активації процесів поділу клітин. Проте, при підвищенні дози до 17 сГр процеси репарації пригнічуються.

Як відомо, за дії малих доз опромінення переважають стохастичні ефекти на геном, порівняно з ефектами «мішені» за дії напівлетальних доз, тому крива «доза-ефект» показників відносної експресії генів фотоперіодичного механізму, детермінації флоральної меристеми та репарації має нелінійний характер. Крім того, порівняння з попередніми результатами показало, що гостре рентгенівське опромінення в малих дозах має ефект, відмінний від малих доз хронічного опромінення. Хоча хронічне опромінення в дозі 3 сГр також викликає стимуляцію генів цвітіння рослин у *A. thaliana*, незначне підвищення дози до 17 сГр викликає навпаки, зниження активності генів цвітіння, що не простежується у дослідах з вивчення ефектів дії гострого короткочасного режиму опромінення.

Зміна експресії генів цвітіння у відповідь рослин на УФ-С за різних умов освітлення в умовах *in vitro*. Фенологічні дані показують, що проростки, вирощені в освітленні фіолетового та оранжевого спектру мають затримку у розвитку на $6 \pm 0,6$ днів.

Результати спостережень демонструють, що найшвидші темпи розвитку характерні для рослин, які вирощені при інтенсивному білому освітленні: фазу стрілкування 5.1 (Boyes, 2001) спостерігали на 17 день, фазу квітування 6.1 спостерігали на 20 день, фазу цвітіння 6.3 спостерігали на 23 день. Для проростків, що культивували при червоному та фіолетовому освітленні, перехід до фази 5.1 спостерігали на 20 день, 6.1 стадію цвітіння спостерігали на 23 день. Рослини, які культивували при оранжевому та фіолетовому освітленні досягли фази розвитку 5,1 на 24 день.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу, експресія гену репарації *RAD51* знижувалася після дії УФ-С в дослідній групі у порівнянні з контрольною групою з середнім значенням рівня експресії 0.379 ($P(H1) = 0.000$, 95% C.I. 0.192 - 0.764) у рослин, що були вирощені при червоному освітленні.

Для генів циркадних ритмів *CO* та *GI* після дії УФ-С було зафіксовано зниження експресії. Варто зазначити, що рівень експресії фактору диференціації меристеми по флоральному шляху *API*, навпаки збільшується при дії УФ-С порівняно з контролем. Аналогічні дані ми також спостерігали у дослідах з вивчення впливу рентгенівського випромінювання.

Навпаки, у рослин, вирощених в умовах освітлення з фіолетовим та оранжевим спектром, показано зниження рівня експресії *API* для дослідної групи з коефіцієнтом 0.023 ($P(H1) = 0.000$, 95% C.I. 0.007 - 0.078). Аналогічний результат

був показаний для іншого транскрипційного фактору *LFY* (Рис.5).

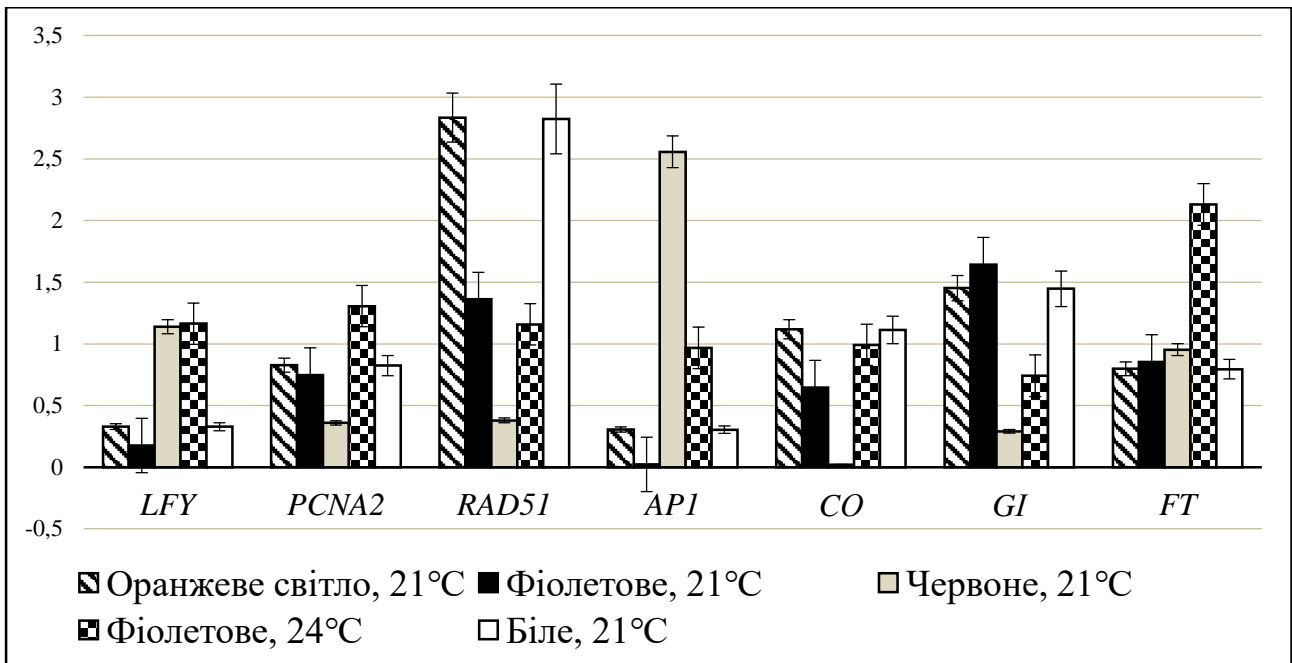


Рис. 5. Графік змін рівня експресії генів цвітіння та репарації за УФ-опромінення у рослин, вирощених в різних умовах освітлення (REST 2009, $p < 0,05$).

Характер змін експресії генів фотоперіодичного шляху за дії УФ-С вказує на стабілізуючу дію криптохромів та фототропінів на генетичні механізми регуляції квітіння. Рослини, що були вирощені в освітленні червоного спектру, показали зниження рівня експресії як генів цвітіння, так і маркеру репараційних процесів. Як відомо, видиме червоне світло поглинається фітохромами РНУА-РНУЕ, можна припустити, що фітохроми приймають участь у регуляції цвітіння рослин в умовах неповного спектру освітлення.

Зміна експресії генів цвітіння рослин, вирощених у ґрунті за різних умов освітленості у відповідь на УФ-С. Результати, отримані в даному експерименті перетинаються з попередніми, що вказує на релевантність методичних підходів. За результатами фенологічних спостережень, рослини з групи, вирощених в білому інтенсивному освітленні та за температури 24°C вступали до фази бутонізації 5.1 згідно класифікації Бойеса (2001) на 24-й день вегетації. Перехід до фази квітіння 6.3 на 27-й день, стадія плодоношення 8 наступала на 31-й день вегетації та з 36-го дня спостерігали початок в'янення рослин. Проростки, вирощені у фіолетовому освітленні, на 31-й день вегетації починали бутонізацію, фаза 5.1 та на 36-й день 30% рослин мали відкриті квіти. У рослин, вирощених у червоному світлі за температури 24°C, фазу бутонізації 5.1 спостерігали на 27-й день вегетації, фазу цвітіння 6.1 - на 31-й день, стадію плодоношення 8 - на 36-й день від посадки.

Впродовж періоду вегетації рослин проводили заміри довжини листа. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) показав, що існують статистично значущі відмінності між групами рослин, які були вирощені за різних умов

освітлення (міжгруповий коефіцієнт $SS=1.04$, коефіцієнт в межах групи $SS=458.11$, $F_{emp} > F_{crit}$, $p < 0.05$).

Порівняльний аналіз експресії ключових генів цвітіння показав відмінності між контрольними та опромінення УФ-С групами ($p < 0,05$). Тенденції експресії досліджуваних генів цвітіння залежали від спектрів світла: червоного, фіолетового і білого. За нашими спостереженнями, експресія генів *API*, *GI*, *CO* і *RAD51* підвищувалася після дії стресового фактору. В той же час, суттєвих змін в активності генів *CO* і *FT*, що вказувало б на наявність відповіді на стресовий фактор, не спостерігалось.

Проте, підвищення експресії гена *RAD51* вказує на активність процесів репарації в клітинах після УФ-С опромінення. Цікавим є те, що експресія *RAD51* має відмінності серед груп зразків, які вирощувалися в білому, фіолетовому і червоному освітленні. Відмінності можуть бути викликані дією криптохромів або, навпаки, фітохромів, що залежить від світла в якому вирощували дану групу.

В даних експериментах було виявлено зміни в експресії генів фотоперіодичного шляху регуляції цвітіння, які залежать від умов освітлення. Активність репараційних процесів після дії УФ-С має відмінності серед груп зразків, які вирощувалися в білому, фіолетовому і червоному освітленні. Ми вважаємо, що різниця між групами може бути викликана участю криптохромів або, навпаки, фітохромів, що залежить від спектру світла в якому вирощували рослини.

ВИСНОВКИ

В роботі було показано ефекти впливу іонізуючого та УФ-С випромінювання на гени фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння рослин *A. thaliana*. Різні типи опромінення мають відмінні ефекти на експресію ключових генів цвітіння, тренди зміни активності генів транскрипційних факторів регуляції цвітіння, репарації та проліферації залежать від типу випромінювання, режиму та загальної дози опромінення, світлових режимів вирощування рослин. Обґрунтовано, що методологія та підхід, який було використано в роботі, є чутливим та інформативним для дослідження впливу іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на репродуктивну функцію рослин та всебічно характеризує процес цвітіння за дії іонізуючого випромінювання.

1. За даними фенологічних спостережень показано, що хронічне опромінення в низьких дозах 3 сГр викликає раннє цвітіння, навпаки, за збільшення дози до 17 сГр та більше, дія хронічного опромінення, викликає затримку цвітіння. Гостре опромінення викликає аналогічні ефекти на репродуктивну фазу, проте, за дії доз на порядок більших, а саме, опромінення у дозі 3-6 Гр викликає раннє цвітіння, в дозі 9-15 Гр - затримку у часі цвітіння порівняно з контрольною групою рослин.

2. Результати молекулярно-генетичного аналізу свідчать, що хронічне опромінення призводить до зниження активності генів *CO*, *GI*, *FT*, *FLS*, *API*, *LFY*

фотоперіодичного шляху в дозі в 100 разів нижчій, ніж за гострого опромінення. Вперше показано, що вплив хронічного пролонгованого опромінення на експресію ключових генів регуляції цвітіння більш ефективний, ніж одноразового опромінення рентгенівськими променями.

3. Вперше, на основі аналізу відносної експресії генів цвітіння *A. thaliana*, виявлена нелінійна залежність зміни експресії генів цвітіння *CO*, *GI*, *FLS*, *FT* за дії сублетальних доз рідкоіонізуючого випромінювання. При порівнянні відповіді генеративної системи рослина на стресовий чинник було показано, що за культивування рослин у спектрі білого світла спостерігається прискорення цвітіння, синій та червоний спектр призводить до затримки часу цвітіння.

4. Вперше встановлено, що УФ-С опромінення стимулює експресію генів циркадних годинників *CO* та *GI*, а також впливає на процеси диференціації клітин апікальної меристеми за флоральним шляхом, що може викликати порушення розвитку органів квітки.

5. Доведено, що у мутантів *jin1* (*jasmonate insensitive*), Col 0 з дефектними (не чутливими) рецепторами до жасмонової кислоти, рівень експресії генів цвітіння *CO*, *GI*, *API* знижений, порівняно з рослинами дикого типу *A. thaliana* Col 0. Дані вказують на участь жасмонової кислоти у механізмах циркадного годинника та диференціації флоральної меристеми за дії стресових факторів.

6. Показано, що гостре опромінення в дозі до 10 Гр викликає зростання експресії генів фотоперіодичного шляху у дикого типу, але експресія гену *API* знижується у мутанта по жасмонадному сигнальному шляху *jin1*, що безпосередньо вказує на участь сигналіngu жасмонової кислоти у стабілізації процесів регуляції переходу до репродукції у рослин.

7. Вперше було показано значення умов культивування у відповіді рослин на УФ-С опромінення. За отриманими результатами виявлено, що спектр світла, в якому вирощували дослідні рослини, впливає на активність генів цвітіння після УФ-С опромінення. Експериментальні дані вказують на участь криптохромів та фітохромів, фототропінів в стабілізації впливу УФ-С опромінення на експресію генів цвітіння та репарації.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії:

Дмитрієв О.П., Кравець О.П., Рашидов Н.М., Бубряк І.І., Гуща М.І., Данченко М.М., Соколова Д.О., Шиліна Ю.В., Бережна В.В., Бубряк О.І., Дяченко А.І., **Кривохижа М.В.**, Літвінов С.В., Сакада В.І. Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія/– К.: ПАЛІВОДА А.В., 2018. – 284с. – *здобувачем проведено роботу з літературними даними, участь у написанні тексту монографії.*

Статті у виданнях, що включені до наукометричних баз даних (Scopus, Web of Science):

1. **Kryvokhyzha M.V.**, Krutovsky K.V., Rashydov N.M., Differential expression

of flowering genes in *Arabidopsis thaliana* under chronic and acute ionizing radiation, International journal of radiation biology. 2018. doi: 10.1080/09553002.2019.1562251. P. 1-9. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, частину аналіз літературних джерел, написання статті.*

2. Danchenko M., Klubicova K., **Krivohizha M.V.**, Berezhna V.V., Sakada V.I., Hajduch M., Rashydov N.M. Systems biology is an efficient tool for investigation of low-dose chronic irradiation influence on plants in the Chernobyl zone, Cytology and Genetics. 2016. Vol. 50.№6. P. 400-414. – *здобувачем проведено роботу з літературними даними, участь у написанні та редагуванні огляду.*

Статті у фахових виданнях:

1. **Kryvokhyzha M.V.**, Krutovsky K.V., Rashydov N.M. The role of jasmonate signaling pathway in plant's flowering genes response to ionizing radiation. The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders. 2019. Vol. 7, № 1. doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.1.1200. P.46-51. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання статті.*

2. **Kryvokhyzha M.** Libantova Y., Rashydov N. Influence of short-wavelength ultraviolet light on genes expression in *Arabidopsis thaliana* plants. Biotechnologia Acta. 2019. V. 12, No 3, doi.org/10.15407/biotech12.03.057. P. 57-66. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання статті.*

3. **Кривохижа М.В.**, Рашидов Н.М. Вплив низьких доз рентгенівського опромінення на гени фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин. Ядерна фізика та енергетика. 2019. Т. 20. № 3. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання статті.*

4. Rashydov N.M., Nesterenko O.G., Berezhna V.V., Sakada V.I., **Kryvokhyzha M.V.**, Raksha-Slusareva Ye.A., Slusarev A.A., Rashidova Sh.M. Investigation the selenium-comprising chicory phytochemicals as radioprotector against acute and chronic irradiation. Journal of Radiation Researches. 2019. Vol.6. №1. P. 11-20. – *здобувачем проведено роботу з літературними даними, участь у написанні статті.*

5. **Кривохижа М.В.**, Рашидов Н.М., Зміна експресії генів цвітіння у відповідь на УФ-С опромінення рослин *Arabidopsis thaliana* вирощених за різних умов освітленості та температурного режиму. Biological systems. 2018. Vol. 10. Is. 1. doi.org/10.31861/biosystems2018.01.008. P. 1-4.

6. Літвінов С. В., **Кривохижа М. В.**, Кухарський В. М., Рашидов Н. М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heunh.* Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018. № 2 (73). С. 157-163. – *здобувачем проведено частину експериментальної роботи та аналізу результатів.*

Тези доповідей конференцій:

1. **Кривохижа М.В.**, Рашидов Н.М. Вплив УФ-С на фенологічні зміни та експресію генів цвітіння у *Arabidopsis thaliana*. Тези доповідей 7-го з'їзду Радіобіологічного товариства України Київ, 1–4 жовтня 2019 р., с.81. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання тез.*

2. **Kryvokhyzha M**, Rashydov N, Krutovsky K. Biodiversity Aspect Expression of Key Flowering Genes in Arabidopsis Thaliana under Different Mode Ionizing Radiation, Abstract eBook SEAB-2018, Kiev, Ukraine. p.333 – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання тез.*

3. Litvinov S., Rashydov N., **Krivohizhaya M**. Radiation-induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. / Book of Abstracts. Sixth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, 18.06. – 22.06. 2018, Ohrid, Macedonia. – P. 35. – *здобувачем проведено частину експериментальної роботи та аналізу результатів.*

4. **Kryvokhyzha M.V.**, Krutovsky K.V., Rashydov N.M. The low-doses of ionizing radiation impact on generative phase of *Arabidopsis thaliana*, the 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity 05-08 July 2017, Minsk - BELARUS, p. 271. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання тез.*

5. **Кривохижа М.В.**, Рашидов Н.М. Обґрунтування критичності мішеней серед генів цвітіння до радіаційного опромінення у рослин / XXIII щорічна конференція Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, 01-05 лютого 2016 року): тези доповідей. — Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2016. - с. 171-172. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання тез.*

6. **Кривохижа М.В.**, Крутовський К.В., Рашидов Н.М. Влияние радиационного облучения на активность генов цветения у *Arabidopsis thaliana*. Наук.-практ. конференція “Ефекти радіації та ксенобіотиків на репродуктивну систему та організм” (м. Долина, 4-7 жовтня 2016): тези доповідей. - Долина, 2016. - с. 74. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання тез.*

7. **Кривохижа М.В.** Біоінформатичний аналіз консервативності ключових генів цвітіння *Arabidopsis thaliana*. Мат. Конференції «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, 2–4 грудня 2015. С. 30. – *здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз результатів, аналіз літературних джерел, написання статті.*

АНОТАЦІЯ

Кривохижа М.В. Вплив іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на цвітіння рослин *Arabidopsis thaliana*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 "Радіобіологія". – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національна академія наук України, Київ, 2019.

В роботі представлені фенологічні спостереження, морфометричні дані та результати молекулярно-генетичного аналізу рослин *A. thaliana*, які попередньо були опромінені рентгенівським, гамма і ультрафіолетовим випромінюванням у гострому і хронічних режимах. Дані свідчать, що хронічне опромінення, у порівнянні з гострим режимом, на порядок ефективніше діє на експресію генів фотоперіодичного механізму *CO*, *GI*, *FLC*, *FT*, диференціації апікальної меристеми *API*, *LFY*, репарації *RAD51* і проліферації *PCNA2*. Показано наявність нелінійної залежності в зміні експресії ключових генів цвітіння *A. thaliana*.

Ключові слова: Ключові слова: гостре і хронічне опромінення, гамма-випромінювання, УФ-С, цвітіння, транскрипційні фактори, експресія генів, *Arabidopsis thaliana*.

АННОТАЦИЯ

Кривохижа М.В. Влияние ионизирующего и ультрафиолетового излучения на цветение растений *Arabidopsis thaliana*. - Квалификационная научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.01 "Радиобиология". - Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальная академия наук Украины, Киев, 2019.

В работе представлены фенологические наблюдения, морфометрические данные и результаты молекулярно-генетического анализа растений *A. thaliana*, которые предварительно подвергали воздействию рентгеновским, гамма и ультрафиолетовым облучением в остром и хроническом режимах. Данные свидетельствуют, что хроническое облучение, по сравнению с острым режимом облучения, на порядок эффективнее действует на экспрессию генов фотопериодического механизма *CO*, *GI*, *FLC*, *FT*, дифференциации апикальной меристемы *API*, *LFY*, репарации *RAD51* и пролиферации *PCNA2*. Показано наличие нелинейной зависимости в изменении экспрессии ключевых генов цветения *A. thaliana*.

Ключевые слова: острое и хроническое облучение, гамма-излучение, УФ-С, цветение, транскрипционные факторы, экспрессия генов, *Arabidopsis thaliana*.

SUMMARY

Krivokhizha M.V. The effect of ionizing and ultraviolet radiation on the flowering of *Arabidopsis thaliana* plants. – Manuscript of the qualification scientific project.

Doctoral thesis for the PhD title application in 03.00.01 "Radiobiology". – Institute Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The aim of the study was to investigate the different modes of ionizing and UV-C radiation effects on the *A. thaliana* plants flowering time and the expression of the photoperiodic pathways genes *CO*, *GI*, *FLS*, *FT*, the repair gene *RAD51*, proliferation gene *PCNA2* and differentiation of meristem genes *API*, *LFY*. The doctoral thesis firstly was been shown the high suppression of flowering determination genes by chronic irradiation and presence of gene expression changes nonlinear dependence under the action of ionizing radiation sublethal doses. The influence of the light spectrum in which the experimental plants were grown on the activity of the photoperiodic genes after UV-C irradiation was firstly demonstrated.

The object of study was *A.thaliana* (*L.*) *Heynh* (*Brassicaceae*) seedlings cultured in soil and *in vitro* in laboratory conditions. The following methods were used to perform the work: phenological analysis according to Boyes' (2001) classification for *A.thaliana*, acute exposure of plants with X-rays, chronic irradiation of seedlings from the ¹³⁷CsCl radionuclide source, UV-C irradiation with a wavelength of 254 nm, molecular analysis using real-time PCR and mathematical analysis of relative gene expression was worked.

According to the results of the research, the effect of ionizing radiation on the genetic mechanisms of flowering regulation is significantly dependent on the type of radiation, the mode of exposure: acute or prolonged chronic, total dose and previous conditions of plant cultivation. It is substantiated that the methodology and approach used in the our investigations are sensitive and informative for the study of the influence of rare ionizing radiation on the reproductive function of plants.

The phenomenal observation shown that chronic irradiation delay flowering time for a dose of 17 cGy and more. At a dose of 3 cGy, on the contrary it demonstrated the early flowering. In interval of doses 3-6 Gy of acute X-ray exposure provides early flowering, but within acute doses 9-15 Gy delay the flowering time of the plants comparing the control group.

Using the relative expression analyses we found that it is established chronic irradiation contributes to the efficiency of effects on the *CO*, *GI*, *FT*, *FLS*, *API*, *LFY* genes than acute exposure. It was proved that mutants *jin1 Col-0* (insensitive to jasmonates partway) with defective (not sensitive) receptors to rod acid, the level of expression of genes of flowering *CO*, *GI*, *API* destroyed, added with the content of wild type *A. thaliana Col 0*. The data indicates the involvement of jasmine acid in the circadian clock and the development of a floral meristem for such stressors. It is shown that acute radiation up to 10 Gy uses wild-type photoperiodic gene expedition, but the expression of the *API* gene is placed in the mutant *jin1*, which requires indicating the

signal requiring the presence of an acid in the regulation for reproduction.

According to comparisons of the responses of the general systems to the radiation exposure, it was shown that for the cultivation of results in optimal white light it is manifested by the accelerated flowering, the blue and red spectrum illumination, which leads to the delay of flowering time. UV-C irradiation has for the first time been found to stimulate the expression of *CO* and *GI* circadian clock genes, and apical meristems can be found at various positions for floral growth possibilities, which can be considered for a whole plant. Our study showed that results were achieved in response to UV-C irradiation and this was understandable. For the results obtained, it was found that the light spectrum in which the research plants were produced had an effect on the activity of flowering genes post UV-C irradiation.

The results of researches were printed in 17 scientific papers, of which 9 peer reviewed articles and 7 abstracts in conference proceedings. Published papers fully reflect the main content of the dissertation.

Keywords: ionizing radiation, ultraviolet radiation, X-rays, gamma radiation, UV-C, photoperiodic pathway, flowering, *Arabidopsis thaliana*, transcription factors, acute irradiation, chronic irradiation.

**Підписано до друку 31.10.2019 р. Формат 60x90 1/16.
Папір офсетний. Умовн. др. арк. 0,9
Друк різнограф. Тираж 100 прим. Зам. № 3110/01.**

**Надруковано ФОП Гузік О.М.
Податковий номер №2705814113
м. Київ, вул.Богдана Гаврилишина, 16
Тел.: 338-16-61.**