

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

**НЕСТЕРЕНКО Олена Геннадіївна**

УДК 577.218

**МОДИФІКАЦІЯ РАДІОБІОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ РОСЛИН  
ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*) АБІОТИЧНИМИ СТРЕСОРАМИ**

**03.00.01 - радіобіологія**

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у лабораторії біофізики сигнальних систем відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м.Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Рашидов Намік Мамед огли**  
лабораторія біофізики сигнальних систем відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, завідувач лабораторії

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук  
**Дружина Микола Олександрович**  
Старший науковий співробітник відділу радіобіології та екології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького.  
кандидат біологічних наук, старший дослідник  
**Рябченко Наталія Миколаївна**  
Старший науковий співробітник відділу радіобіології та радіоекології Інституту ядерних досліджень НАН України.

Захист дисертації відбудеться 5 грудня 2019 р. о 13:00 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, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143.

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 теми дослідження.**

Збільшення радіаційного навантаження на біоценози, збільшення кількості та інтенсивності факторів абіотичного стресу призводить до необхідності вивчення механізмів їх взаємодії з живими організмами. Розвиток ядерних технологій, радіаційне техногенне забруднення довкілля визначає актуальність досліджень ефектів іонізуючого випромінювання (ІВ) у поєднанні з іншими абіотичними чинниками довкілля. За останні десятиліття кількість стресових факторів та інтенсивність їх впливу на рослини суттєво зросли: збільшуються площі засолених ґрунтів, солончаків, відбуваються істотні зміни у глобальній кліматичній системі тощо. Абіотичні стреси вважаються однією з головних причин втрати понад 50% врожаю сільськогосподарських культур у світі (Ashraf, 2009).

На сьогодні в модельних експериментах достатньо добре вивчені особливості реакції рослин за окремої дії абіотичних стресорів довкілля. Зокрема, проаналізовано основні аспекти відповіді на ІВ на генетичному (Кравець, 2012, Кунах, 2013) та протеомічному (Косаківська, 2006, Gicquel, 2009) рівнях, що здатні впливати на врожайність рослин і швидкість їх старіння (Martins, 2011 та Trindade, 2013). Однак питання реакції рослин на комбінації факторів, що зустрічаються в природних обставинах та сучасних умовах кліматичної нестабільності, досліджено недостатньо. У відповідь на дію всіляких стресових факторів рослина реагує включенням різних сигнальних систем для активної реакції всього організму. Відповідно, поєднання різних стресорів «змушує» сигнальні системи, діючи спільно, виробити єдину стратегію відповіді рослинного організму (Гродзинський, 2012). Для з'ясування цього питання необхідно визначити роль можливого кростоку сигнальних систем та, як результат, шляхи репрограмування та модифікації експресії генів і синтезу білків, що призводить до відповідних змін у метаболічних та біохімічних ланцюгах.

У зв'язку з цим актуальним завданням є отримання нової інформації щодо реакцій рослин на різних рівнях формування та розвитку за поєданої дії ІВ та інших абіотичних стресорів. На особливу увагу заслуговують дослідження таких маркерів індукції захисних/адаптаційних реакцій у рослин в стресових умовах як вміст вільного проліну та динаміка його коливань (Hayat, 2012), індукція транспозиції та зміна мобільності генетичних елементів, зокрема, LTR-ретротранспозонів (Ahmed, 2014). Крім того, важливим є отримання інформації щодо протеому рослинного організму, змін у складі та кількості білків, їх конформації (Danchenko, 2009) за поєданої дії ІВ та абіотичних стресорів довкілля. Такий цілісний підхід дозволить визначити особливості формування сукупної відповіді організму, зокрема кростоку сигнальних систем, та дослідити їх внесок у забезпеченні стресостійкості рослинного організму, оцінити адаптаційний потенціал в цілому.

**Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами.** Робота виконувалась з 2009 по 2019 роки у відділі біофізики і радіобіології Інституту

клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Рашидова Н.М. Дисертаційне дослідження реалізувалось у рамках проєкту FP7-PEOPLE-2013-IRSES - Marie Curie Action "International Research Staff Exchange Scheme" («Міжнародна схема обміну наукових кадрів» Марії Кюрі). Крім того, робота виконувалася в рамках бюджетних тем: III-3-08 «Епігеномна складова адаптації у рослин» (2008-2012 рр.), № держреєстрації теми 0108U00875; II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (2012-2016 рр.), № держреєстрації 0112U003077; III-7-16 «Вплив іонізуючої радіації на вторинний метаболізм у рослин» (2016-2018 рр.), № держреєстрації 0116U000028; та III-10-17 «Розробка методів упередження зниження продуктивності рослин на основі оцінки та прогнозування впливу кліматичних змін на їх метаболічні реакції та адаптивний потенціал» (2017-2021 рр.), № держреєстрації 0117U004310.

**Мета і завдання дослідження.** *Метою* роботи є дослідити морфологічну, біохімічну, молекулярно-генетичну та протеомічну реакцію модельного об'єкту - проростків гороху - на вплив абіотичних стресових факторів: дію гострого ІВ у поєднанні з засоленням або гіпертермією.

Відповідно до мети були визначені наступні *завдання*:

1. Дослідити вплив ІВ, короткочасної гіпертермії, засолення та їх комбінацій на морфометричні показники росту та розвитку проростків гороху.
2. Вивчити вміст проліну та води у коренях рослин і кореляції між ними, а також встановити зв'язок ростових реакцій з рівнем вільного проліну за поєднаної дії вище зазначених абіотичних стресових чинників.
3. Дослідити динаміку мобільних генетичних елементів рослин за дії ІВ, короткочасної гіпертермії, засолення та їх комбінацій.
4. Проаналізувати якісні та кількісні зміни у спектрі білків коренів проростків в умовах дії перерахованих стресорів.
5. Дослідити модифікації протеому для системного аналізу кростоку сигнальних систем за дії зазначених вище стресових чинників.
6. Оцінити тип взаємодії стресорів - ІВ та засолення - із погляду на зміни синтезу та складу білків.

**Об'єктом дослідження** є відповідь рослин гороху посівного (*Pisum sativum L.*) сорту Ароніс на дію ІВ, короткочасної гіпертермії, засолення та їх комбінацій.

**Предмет дослідження** – зміни на рівні протеому та геному, що відображають молекулярні, фізіологічні та ростові процеси у проростках рослин в умовах гострого опромінення та засолення/гіпертермії.

**Методи дослідження** – морфометричні, біохімічні, молекулярно-генетичні, методи комплексного дослідження протеому (виділення та розділення білків, ультрависокоєфективна рідинна хроматографія поєднана із тандемною мас-спектрометрією, ідентифікація білків через бази даних; тощо), статистичні.

**Наукова новизна.** Вперше використано комплексний системний підхід до аналізу рослинних реакцій на комбіновані пошкоджуючі абіотичні впливи,

зокрема модифікацію ефектів ІВ короткочасною гіпертермією/засоленням у проростків гороху.

Вперше у вітчизняних дослідженнях використано засоби кількісної пошукової протеоміки для системного аналізу комплексу молекулярно-біологічних реакцій та взаємодії сигнальних систем у формуванні відповіді рослинного організму на дію стресових абіотичних чинників.

Вперше визначено білки, що є спільними для сигнальних систем, індукованими дією на проростки гороху ІВ, засоленням, гіпертермією.

Вперше показано, що найпоширенішим типом взаємодії ІВ та досліджуваних абіотичних стресорів є кооперативна антагоністична взаємодія.

**Практичне значення одержаних результатів.** Одержані дані можуть використовуватися фахівцями в області радіобіології та фізіології рослин, у аграрному секторі з метою оцінки та прогнозування адаптаційного потенціалу рослин, упередження зниження їх продуктивності та врожайності в умовах дії комплексу негативних абіотичних факторів довкілля. Вивчення механізмів формування сигнальних шляхів у відповідь рослинного організму на дію абіотичних стресорів довкілля, визначення типу їх взаємодії є важливою ланкою у розробці методик зменшення негативного впливу зовнішніх факторів на рослини. Результати дослідження можуть бути застосовані для розробки та впровадження потенційних стратегій підвищення стійкості рослин до абіотичних пошкоджуючих чинників шляхом підвищення стійкості проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів за попередньої обробки ІВ.

Подальші дослідження перехресної адаптації гороху з використанням різних стресових факторів і їх комбінацій, можуть бути корисними не тільки для визначення та забезпечення оптимального рівня протекторних речовин для підвищення комплексної стрес-стійкості рослин, але і бути перспективними для внесення ясності в загальні механізми крос-адаптації рослин до стресорів.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при викладанні навчальних дисциплін та спецкурсів з радіобіології, фізіології рослин та молекулярної біології у вищих навчальних закладах.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто виконано основну частину експериментальної роботи: планування експерименту, культивування проростків гороху, проведення стресових впливів та визначення ростових реакцій, виділення та аналіз ДНК і протеому, виділення та дослідження концентрації вільного проліну, визначення його кореляції з оводненістю рослин. 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.

Здобувачем було самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз джерел літератури; проаналізовано отримані результати, написано усі розділи дисертації та значну частину тексту публікацій.

Для виконання окремих завдань дисертаційної праці, що потребували залучення унікального обладнання, здобувач пройшла стажування на базі відділу біології відтворення та розвитку Інституту генетики рослин та біотехнології Центру рослинництва та біологічного різноманіття Словацької

академії наук у рамках Міжнародної грантової програми (IRSES GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance»), де протеомічні дослідження проводилися разом з к.б.н. Данченком М.В.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні результати були представлені на 9 науково-практичних конференціях: на 3-й міжнародній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012); Українській науковій конференції «Advances in botany and ecology» (Умань, 2014); на 6-му та 7-му з'їзді Радіобіологічного товариства України (Київ, 2015 та 2019); Щорічних наукових конференціях Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, 2016 та 2017); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм» (Долина, 2016); Науково-практичному семінарі з міжнародною участю «Стресові фактори та вторинні метаболіти» (Київ, 2017); Міжнародній конференції «Симпозіум з Євразійського біорізноманіття» (Київ, 2018). Також окремі результати дисертації доповідались на щорічних звітних і наукових семінарах відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ НАН України.

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи опубліковано у 16 наукових працях, серед яких 2 статті у рецензованих міжнародних часописах та 4 статті у періодичних фахових виданнях України, один розділ у книзі (монографії) та 9 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

**Структура та обсяг.** Кваліфікаційна праця складається з анотації українською та англійською мовою, змісту, переліку умовних скорочень, вступу й основної частини (розділів: огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, узагальнення), висновків, списку використаних джерел, що містить 183 посилання. Обсяг роботи складає 157 сторінок тексту. Дисертація містить 21 рисунок та 9 таблиць.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі розглянуто особливості впливу ІВ, засолення та екстремальних температур на рослинний організм. Проаналізовано сучасні дані щодо основних механізмів рецепції сигналу, зокрема роль сигнальних систем. Описано морфометричні зміни при стресових впливах, роль амінокислоти проліну як протектора та активність мобільних генетичних елементів, зокрема, LTR-ретротранспозонів за абіотичного стресу. Розглянуто протеоміку у контексті дослідження взаємодії сигнальних систем, в тому числі модифікації білків за дії радіаційного чинника та при його комбінації з фактором засолення.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Об'єкт дослідження та умови вирощування рослин.** Визначення реакцій рослин на вплив стресовими чинниками проводили на проростках гороху посівного (*Pisum sativum* L.) сорту "Ароніс". Насіння пророщували у темряві в рулонній культурі при 26°C. Горох на стадії 3-4-добових проростків піддавали впливу окремих стресорів або їх комбінацій, після чого продовжували

культивування у водному середовищі без внесення додаткових поживних речовин за температури  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Характеристики стресових факторів.** Опромінення здійснювали на рентгенівській установці "РУМ-17", з потужністю дози  $89\text{ сГр/хв}$ , енергія фотонів  $180\text{ кеВ}$ , отримана проростками доза варіювалася від  $5\text{ Гр}$  до  $25\text{ Гр}$ .

Для визначення реакції на осмотичний шок, проростки піддавали короткочасному впливу розчину  $\text{NaCl}$  в концентрації  $0,22\text{ Моль/л}$  шляхом занурення коренів рослин на  $60\text{ хвилин}$ . Реакція гороху на підвищену температуру вивчалася після занурення рослин у підігріту до  $44\text{-}48^{\circ}\text{C}$  воду на час від  $4$  до  $8\text{ хвилин}$ . Часовий інтервал між дією стресорів становив  $2\text{ години}$ .

При проведенні протеомічного аналізу проростки попередньо опромінювали на установці *GammaCell GC-220 type B* ( $\text{Co-60}$ ;  $1,8\text{ Гр/хв}$ ) (*МАГАТЕ*, Відень, Австрія) у дозі  $10\text{ Гр}$  ( $5\text{ хв. } 33\text{ сек.}$ ).

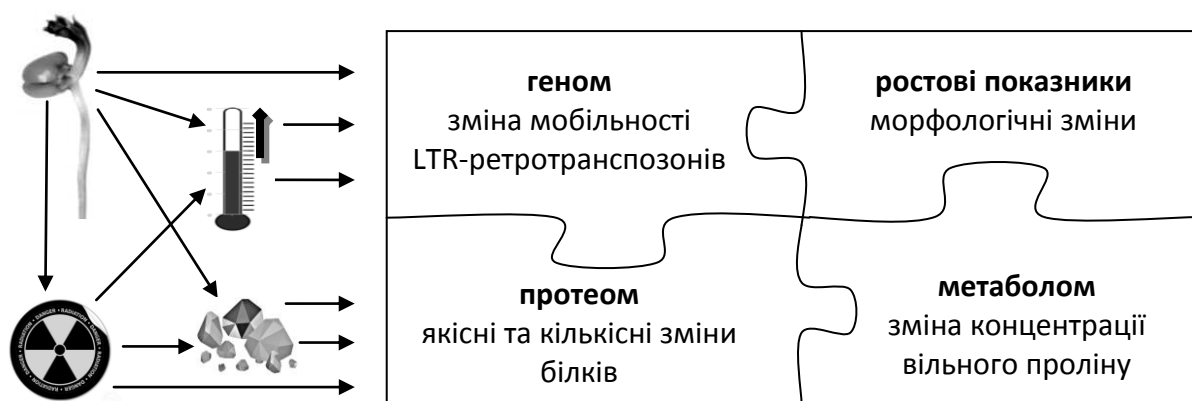


Рис. 1. Загальна схема дослідження впливу на проростки гороху іонізуючого випромінювання, засолення та високих температур і аналіз відповіді рослинного організму на різних рівнях організації.

**Морфометрія рослин гороху.** Довжину головного кореня проростків вимірювали з інтервалом у  $2\text{ доби}$  й розраховували їх відносну швидкість росту ( $\text{ВШР}$ ) і відносили її до очікуваної швидкості росту ( $\text{ОШР}$ ), як відношення приросту головного кореня в дослідному варіанті до контрольного ( $y\%$ ). Таким чином оцінювали величину і характер модифікуючого впливу засолення чи гіпертермії на ефекти іонізуючого опромінення.

**Визначення концентрації вільного проліну у зразках гороху.** Рослинний матеріал гомогенізували з азотом, пролін екстрагували  $70\%$  розчином етанолу у дистильованій воді та визначали його вміст за допомогою колориметричного аналізу з використанням нінгідрину (Carrillo, 2008). Оптичну щільність розчину продукту реакції визначали при довжині хвилі  $520\text{ нм}$  на спектрофотометрі "Ultrospec 1000" у триразовій повторності. Для визначення вмісту води, зразки після висушування зважувалися повторно, кількість води визначалась як різниця мас рослини до та після висушування.

**Аналіз мобільності LTR-ретротранспозонів.** Аналіз ДНК проводили з використанням  $7$  універсальних праймерів, комплементарні послідовностям

iPBS ділянок ретротранспозонів та 3 специфічних пар IRAP праймерів для гороху (табл.1).

Таблиця 1

Назва використаних праймерів та їх нуклеотидна послідовність

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність (5' →3' )
iPBS2228	CATTGGCTCTTGATACCA
iPBS 2230	TCTAGGCGTCTGATACCA
iPBS 2232	AGAGAGGCTCGGATACCA
iPBS2251	GAACAGGCGATGATACCA
iPBS2249	AACCGACCTCTGATACCA
iPBS2080	CAGACGGCGCCA
iPBS2074	GCTCTGATACCA
CYCLOP	F-CGATATCTCACAATCCCTGTGGAGAC R-GCAAGGAAACGGAGTGAAAGATGC
OGRE	F-TCGCGAGACCATGTCTTTTCCCAGGTTTAC R-GTGGGCTGGGCTTTAGTGAGATGCTTTCC
PIGY	F-ACGCTCGTCACATGCCCGTGGCGGTC R-ATCATCAAAGTATCATCCGCCTTAGC

Для проведення ПЛР було оптимізовано умови реакції, зокрема, температуру відпалу для кожного використаного праймера, кількість циклів, концентрацію агарози у гелі та ін. Для фракціонування продуктів ПЛР проводили горизонтальний електрофорез в 0,8-2%-ому агарозному гелі. Розміри ампліконів визначали шляхом зіставлення їх електрофоретичної рухливості в гелі з рухливістю маркерів - фрагментів ДНК відомої молекулярної маси з використанням програми Image J. Як маркер молекулярних мас використовували «GeneRuler 100 bp (Plus) DNA Ladder». Кількість дослідів варіювала від 2 до 5 для кожного праймера або їх пари.

**Екстракція та аналіз протеому проростків гороху.** Виділення білків проводили паралельно з виділенням ДНК з 500 мг сировини, концентрацію білків визначали за стандартним методом (Bradford, 1976). Обрана методика протеомічного аналізу - класичний двовимірний гель-електрофорез (2-ДЕ) з визначення кількісних та якісних змін у протеомі гороху, що включала кілька етапів. Для першого виміру було використано стрічки, на які наносили 200 мкг білку з іммобілізованим вузьким градієнтом рН 4-7 для максимального розділення найбільш багатобілкової зони поліакриламідного гелю та проведено ізоелектричне фокусування (ІЕФ) на приладі Protean IEF Cell фірми BioRad. Для другого виміру ми використали вертикальний поліакриламідний гель-електрофорез (ПААГЕ) протягом 14 годин при силі струму 10 мА. Після трикратної промивки гелів деіонізованою водою протягом 12-14 годин їх фарбували на змішувачі розчином барвника «Кумасі блу» (20% етанолу, 1,6% фосфорної кислоти, 8% сульфату амонію і 0,08% кумасі діамантового синього G-250) для візуалізації білкових плям. Відскановані денситометром цифрові зображення аналізували з використанням комплексного програмного забезпечення PDQuest, який містить оптимізовані алгоритми для виявлення



плям, їх кількісного обрахунку та порівняння їх для кожної з експериментальних груп). Статистичну значущість відмінностей між експериментальними варіантами перевіряли за допомогою критеріїв Манна-Уїтні та Кр.-Волліса.

Плями, концентрація білків у яких статистично відрізнялися, були вирізані із гелю. Для ензиматичного розщеплення білків фрагменти гелю переносили до пробірки з подальшим промиванням для видалення барвника та солі. Далі проводили їх зневоднення ацетонітрилом та регідратацію розчином трипсину (час розщеплення білків при 37 °С - близько 15 год.) Після двократного екстрагування розчином (60% ацетонітрил, 1% мурашина кислота) зразки висушували за допомогою центрифужного вакуумного випарювання для їх збереження при -80 °С і подальших аналізів.

Для ідентифікації білків отримані суміші після розщеплення пептидів розділяли шляхом ультрависококоефективної рідинної хроматографії (УВЕРХ). Отримані з використанням мас-спектрометрії дані (з застосуванням мас-спектрометрії MALDI-TOF або іонізатору типу електроспрей - ESI) порівнювали за допомогою онлайн-інструментів з даними бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> та сайту UniProt. Ідентифіковані білки, концентрація яких відрізнялася між групами, були охарактеризовані за допомогою баз онлайн-сервісів типу BLASTP (NCBI).

**Статистична обробка даних.** Статистичну обробку даних здійснювали на рівні  $p < 5\%$  достовірності з застосуванням стандартних методів програми Excel пакетів Microsoft 2007, 2010, 2013. При проведенні аналізу протеому рослин, дані аналізували додатково з використанням програми SPSS 13.0. Біологічна та технічна повторюваності дослідів, де не вказано інше, трикратна.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Оцінка морфометричних показників рослин *P.sativum* L. після гострої дії стресових чинників.** Як відомо, при поєднаній дії стресових чинників теоретично можливі кілька варіантів розвитку подій. Стресори можуть послаблювати негативний вплив один одного (антагонізм), посилювати його (синергізм) або ж результат їх взаємодії на рослинний організм буде дорівнювати сумі впливів кожного з факторів (адитивність). Останній, показаний на рис.1 як ОШР, ми використовували як показник очікуваної шкоди, завданої проросткам адитивною дією декількох стресорів. При цьому вважали, що при відхиленні отриманих результатів від розрахованого могли вмикатися різні, взаємозалежні шляхи реакцій організму на стресор. Це відображалось у відмічених нами синергізмі та антагонізмі, що вказують на можливість «увімкнення» кростока, який змінював загальну динаміку морфометричних показників залежно від часу після впливу стресовими факторами і характеризував зміни на рівні клітин і органів рослин (рис. 2).

За вимірами, проведеними через 2 доби після впливу стресових факторів на проростки гороху, визначили, що при попередньому опроміненні проростків в дозі 5 Гр з подальшим нагріванням (група 5+Т°С) пригнічуючий ефект значно

перевершив очікуваний, що вказує на синергізм обох факторів у зазначених дозах. При цьому експериментальна група (5+NaCl), що знаходилася під впливом сольового стресу після опромінення в невеликій дозі 5 Гр, показала діаметрально протилежний результат: теоретично очікуване пригнічення росту рослин виявилось вище емпіричного, що може свідчити про роль ІВ в конкретному випадку як про «пом'якшуючий» фактор при впливі сольового розчину. Це може бути пояснено тим, що низькі дози іонізуючої радіації сприяють збільшенню експресії генів, що регулюють активність антиоксидантних ферментів, концентрацію осмолітів та компонентів стресових сигнальних систем.

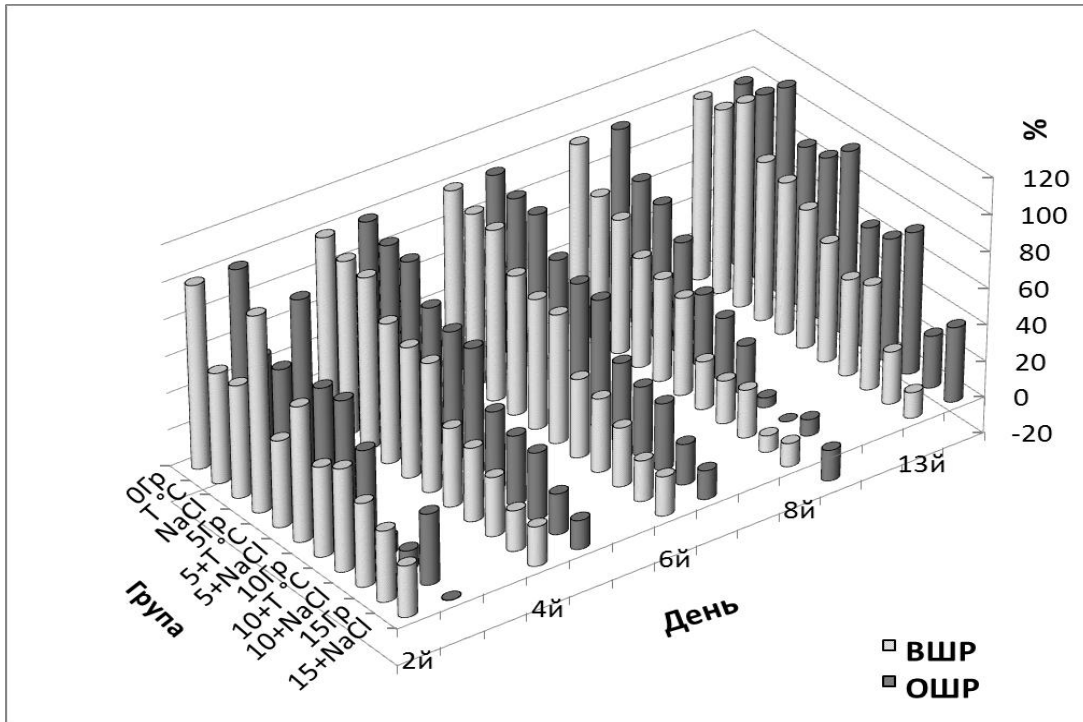


Рис. 2. Вплив різних доз опромінення в комбінації з гіпертермічним впливом або засоленням на ростові показники корінців проростків гороху (2-13 доба після опромінення).

Попереднє іонізуюче опромінення проростків активізувало захисні механізми рослин, що дозволило їм легше перенести подальші дії іншими стресорами, підвищило до них стійкість. Підтвердження цьому ми можемо спостерігати на прикладі груп, що зазнали впливу гіпертермії і сольового стресу, проте перед цим були опромінені в дозі 10 Гр. У перші дні після опромінення (у варіанті з 10 Гр) швидкість росту проростків, які піддавалися температурному шоку, була вищою, ніж у групи тільки опромінені рослин, що вказує на антагоністичну взаємодію. Такі однотипні реакції можна розглядати в якості загальнобіологічних: зниження тотальної активності синтетичних процесів, деградація білоксинтезуючого апарату, катаболізм біополімерів, синтез стресових білків, підвищення синтезу та активації гідролітичних ферментів, утворення необхідних для термінового захисту клітин сполук. Отже, індукція відгуку рослинного організму на стресовий фактор за морфометричними показниками припадає на перші кілька днів експерименту.

Протягом наступних 6 діб відбулося відносно вирівнювання ростових реакцій головного кореня гороху та відзначалася близька подібність між показниками теоретичними – очікуваними та емпіричними, що може свідчити про основний внесок ІВ у формування ростових реакцій у цей період. При цьому на 8-му добу ефект антагонізму різних за своєю природою стресорів стає більш помітним. Довжина головного кореня на момент вимірювання через 13 діб після початку експерименту ні в одній з груп не перевищувала теоретично очікувану. Проте найбільший приріст показника до контрольних значень спостерігався за дії ІВ у дозах до 10 Гр (на 13 день став перевищувати 85-50 % в порівнянні з 60-23% на восьмий день для 5 Гр та 10 Гр відповідно) Поява бічних коренів, які повністю були відсутні на початку експерименту, підтверджує, що внаслідок значного пригнічення росту головного кореня в результаті впливу стресорів, функція його частково починає замінюватися бічним корінням. Коливання ростових характеристик проростків гороху під дією різних стресорів і їх комбінацій протягом довгого часу може вказувати на виникнення на певних етапах відповіді організму кростока сигнальних систем. Це призводить до індукції/активації сполук, які впливають на систему синтезу протекторних речовин, зокрема проліну, його деградацію, передачу сигналу та зміну адаптивного потенціалу рослини в цілому.

Окрім досліджуваних ростових параметрів спостерігались порушення онтогенезу та органогенезу, зокрема, архітектури кореневої системи. Ці аномалії практично не зустрічалися серед проростків контрольної групи. Водночас, деякі з них були більш характерними для певної групи стресорів. Поява двох або трьох точок росту стебла замість однієї була характерна частіше для рослин після термічного шоку та для опромінених у високих дозах проростків. У опромінених рослин переважали аномалії, пов'язані зі змінами зон активно проліферуючих клітин, зокрема, потовщення у точці росту. Після засолення або засолення у комбінації з опроміненням підземної частини рослини спостерігались некротичні зміни апікальної меристеми та головного кореня. В такому разі виживання проростка забезпечувалося ініціацією утворення бічних коренів. Крім того, спостерігалась деформація як бічних, так і головного кореня, аномально швидке видовження пагона за рахунок подовження міжвузля з одночасним збереженням кількості та розмірів листків та коренів, що можна пов'язати з хвилеподібним стрибком розтягнення клітин, поодинокі випадки морфодевіантів з порушенням симетрії листкової пластинки, практично рівними вусиками, малими порівняно з контрольною групою листками чи їх кількістю та змінами в забарвленні. Усі перераховані аномалії можуть бути пов'язані як з індивідуальною чутливістю рослин, рівнем захисних сполук типу проліну, так і з пошкодженням ДНК, зі змінами в експресії генів, зокрема, через міграцію ретротранспозонів та «увімкнення» ними певних генів, посттрансляційними модифікаціями білків та змінами у шляхах сигнальних систем, зумовлених прямою чи опосередкованою дією засолення, іонізуючої радіації та підвищених температур на проростки гороху.

**Пролін як маркер конститутивних та індукованих захисних реакцій.** Оскільки горох є відносно радіо- і солечутливою рослиною, в експерименті

очікувано виявили суттєві коливання концентрацій проліну у всіх експериментальних групах. Через тиждень після дії сольовим і гіпертермічним стресорами вимірювали вміст проліну у проростках гороху. При нагріванні рівень амінокислоти виявився значно вищим контрольних значень і досягав 140%. Це свідчить про сильніший ефект підвищеної температури на проростки у порівнянні з сольовим стресом. При цьому підвищення вмісту проліну, як після впливу осмотичного шоку, температури, так і після дії ІВ, можна пояснити також і його походженням: коливання вмісту амінокислоти може бути наслідком деградації пролін-вмісних білків клітинних мембран. Крім того, відомий транзитивний характер акумуляції проліну, тому не виключається його участь в системах передачі стресового сигналу. Отже, можна припустити, що засолення, яке впливало на корені проростків, після гіпертермії провокувало передачу сигналу в наземні органи рослин і запускало там синтез захисних сполук. Як наслідок, рівень проліну у рослин після засолення і теплового шоку в комбінації, був нижчим за контрольні показники, адже пролін-багаті білки ще не деградували, а пролін, що синтезувався, слугував трансдукції сигналу в листки гороху. У разі попереднього опромінення проростків, що піддавали потім дії гіпертермії, рівень цієї амінокислоти зростав до 150% від контролю. Такий тип взаємодії стресорів можна класифікувати, як потенціювання, тобто варіант, коли радіація сама по собі на концентрацію проліну в коренях рослин сильно не впливає, але може модифікувати дію гіпертермії.

Найбільше зростання показників проліну на 2-у добу було виявлено у разі використання високих доз іонізуючого опромінення, коли при дозах 15-25 Гр його рівень сягав 140% від контролю та у випадку комбінації впливу хлориду натрію з опроміненням в дозі 5 Гр або без нього (рис. 3).

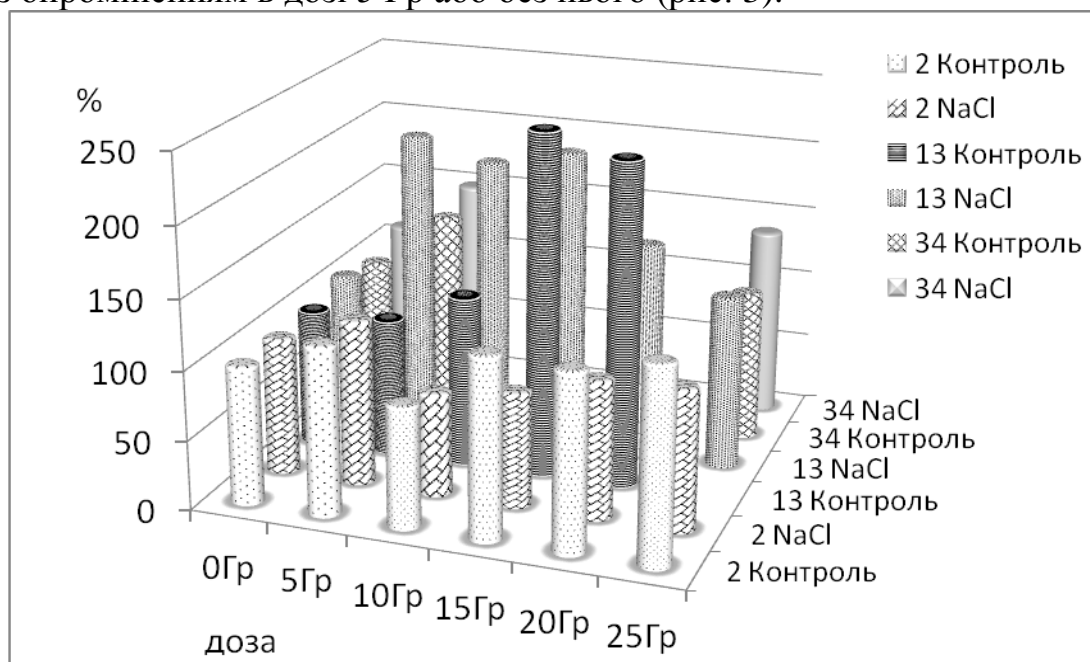


Рис. 3. Концентрація вільного проліну в коренях рослин гороху через 2-34 дні після ІВ в комбінації з засоленням і без нього (% від контролю).

Це може бути пов'язано з активацією експресії генів, залучених у процес синтезу амінокислоти. На 34-ту добу після початку експерименту концентрація проліну у рослин, які зазнали впливу засолення, в комбінації з попереднім опроміненням або без, залишалася трохи вищою контрольних показників в середньому на 20%, і тільки при поєднанні засолення з високою дозою опромінення 25 Гр зберігалася відмінність (до 50%). Можна припустити, що з часом відбувається процес відновлення рослин і, відповідно, вирівнювання концентрацій амінокислоти.

На 2-у добу, як і у випадку з гіпертермією, при опроміненні у дозах 10 і 15 Гр, рівень проліну становив близько 75 і 80% відповідно, та на 4-у добу експерименту при опроміненні у дозі 20 Гр (75% від контролю), концентрація проліну була вищою у проростків після засолення, порівняно з рослинами, що піддавали попередньому опроміненню. Це справедливо для ранніх термінів відповіді організму на радіацію, оскільки в подальшому зникає опосередкована дія радикалів та пероксиду водню на вміст проліну і його концентрація починає залежати від інших чинників, зокрема АБК, іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . На 13, 22 і 34 день опромінені і засолені проростки накопичили більшу кількість проліну, ніж просто засолені, що говорить про втрату протекторного впливу ІВ розвиток гороху у віддалені фази росту. З іншого боку, у проростків гороху в цей час швидкість росту головного кореня переходить у фазу уповільнення, а приріст бічних коренів збільшується, що пов'язано з деструкцією клітинних стінок і активацією інтеркалярної меристеми головного кореня, що веде до збільшення кількості проліну особливо на 13 і 34 день після впливу стресових факторів. Ми вважаємо, що проліну притаманна більшою мірою не осморегуляторна, а протекторна функція. Неоднозначність даних щодо накопичення проліну при дії різних стресорів і їх комбінацій може вказувати на утворення на певних етапах відповіді рослин інших сполук, що впливають на систему синтезу амінокислоти, її деградацію, передачу сигналу.

**Визначення кореляції між вмістом проліну та оводненістю коренів.** Як відомо, накопичення проліну як осмотично активної речовини сприяє утриманню води в клітині. Максимальне підвищення концентрації проліну фіксували через 22 доби після впливу стресорів, його концентрація перевищила контрольний рівень у 3 рази при дозах опромінення 20-25 Гр. Було визначено значення кореляції між концентрацією проліну та оводненістю коренів після дії стресових факторів. На 2, 13, 22 і 34 день експерименту цей показник становив -0,85; -0,87; -0,24 та 0,32 відповідно. При цьому загальний вміст води в коренях проростків гороху коливався від 82 до 94%, залежно від віку рослин і стресових факторів, що застосовувалися. Найбільша втрата вологи підземними органами рослин спостерігалася через 13 діб після впливу стресорів, але кількість води відновлювалася і стабілізувалася через 34 доби після початку експерименту. Це пов'язано з тим, що внесення токсичних концентрацій солі в середовище культивування провокувало осмотичний шок, що призводило до зниження приросту біомаси і вмісту води в тканинах рослин в порівнянні з контролем.

ІВ підвищило стійкість до подальшого сольового і температурного впливів на рослини, однак цей ефект виявився короточасним. Очевидно, що в основі

спостережуваних змін ростових реакцій та накопичення стресових метаболітів, зокрема, проліну, у рослин при дії стресових факторів, лежать і зміни активності генів та формування нових епігенетичних патернів. Одним з механізмів перемикання епігенетичних програм є функціонування мобільних генетичних елементів, тому на наступному етапі нами були досліджені зміни активності ретротранспозонів під впливом таких стресових факторів як ІВ, підвищена температура та засолення.

**Аналіз активності LTR-ретротранспозонів під впливом абіотичних стресових факторів у рослин гороху.** Стресові фактори викликають зміни стану геному рослин, що зумовлює вплив на їхній загальний стан, цвітіння, врожайність, швидкість старіння тощо, що може бути пов'язано і з функціонуванням мобільних генетичних елементів (МГЕ) рослин, зокрема, LTR-ретротранспозонів. Існує вірогідність утворення адресних адаптивних мутацій, що генеруються інсерціями мобільних елементів у відповідь на специфічні та неспецифічні стресові впливи, тому активність ретротранспозонів є одним з маркерів реакції рослин на стресові фактори. Серед LTR-ретротранспозонів цікавими та найбільш багаточисельними є ретротранспозони *Ty3/gypsy*, зокрема OGRE (33%), PIGY (1,5%) та CYCLOP (близько 1%). LTR-ретротранспозони відіграють певну роль у створенні генетичної пластичності і адаптації у відповідь на екологічний стрес.

Під час аналізу за IRAP-PCR маркерами ДНК рослин через 3 різні проміжки часу було використано 3 пари праймерів, та за iPBS-PCR – 7 праймерів, в результаті чого отримано 81 амплікон різних розмірів. Кількість нових фрагментів склала 8 та була характерна для середньої частини спектра (склала приблизно 350-1650 п.н.). Найбільша кількість ампліконів виявилася при використанні iPBS праймера 2249, а найвища інформативність праймера була характерна для iPBS 2074 (рис.4).

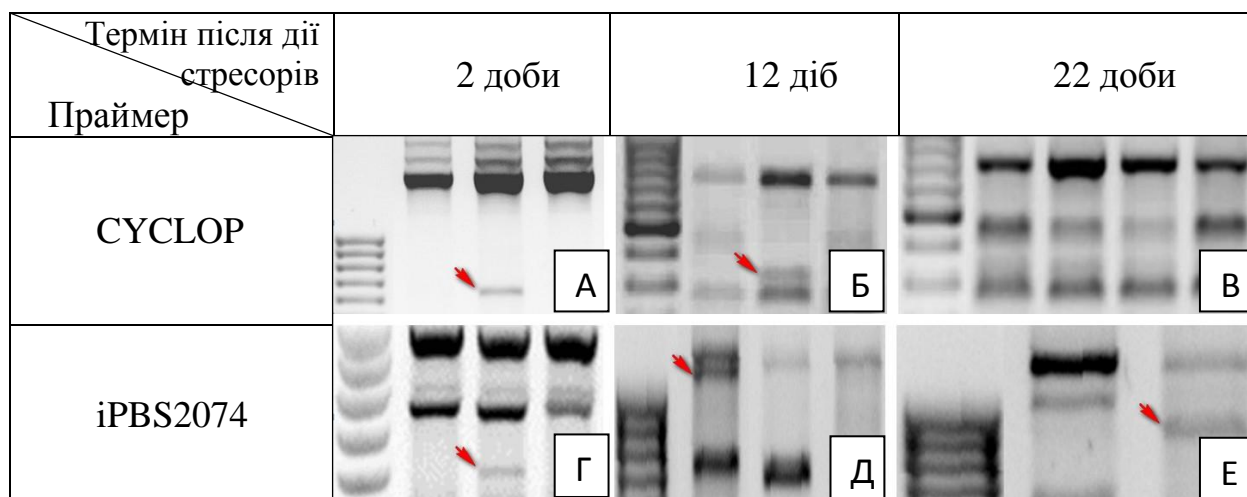


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу тотальної ДНК з використанням праймерів iPBS2074 та CYCLOP через 2-22 доби після стресорів.

На відміну від морфометричних показників, з часом кількість переміщених (скопійованих) LTR ретротранспозонів очікувано не знизилася, адже інсерції

цих МГЕ мають стабільний характер, хоча на реалізацію відповіді геному потрібен певний час.

Електрофореграми ДНК при застосуванні праймера 2074 продемонстрували більшу частоту виникнення ампліконів. Через два дні після опромінення та впливу засолення/нагрівання на електрофореграмі з'явився амплікон розміром близько 700 п.н. у рослин, опромінених у дозі 20 Гр. Через 12 діб після впливу стресорів було виявлено нові фрагменти для групи 25 Гр+NaCl розміром 1280 п.н., а для груп NaCl та 5 Гр – амплікони розміром близько 1650 та 1550 п.н., відповідно. При цьому для групи «засолених» рослин була характерна відсутність фрагменту розміром близько 350 п.н. Це може бути пояснено тим, що еволюційно доцільним було виникнення у клітинах механізму, спрямованого на генетичний контроль процесів транспозиції і зниження негативних наслідків від переміщення мобільних елементів. Тому відсутність старого фрагмента може спостерігатися через метилювання ДНК - найбільш значущий та глобальний шлях контролю за поведінкою МГЕ.

Через 22 доби поява амплікону у розмірі 750 п.н. відбулася у групі 20 Гр+NaCl з одночасною відсутністю більшого амплікона розміром приблизно 800 п.н. Для праймерів ретротранспозону CYCLOP було характерне наступне: амплікон близько 700 п.н. з'явився на електрофореграмі у ДНК рослин через дві доби після температурного стресу. Через 12 діб нові фрагменти розмірами близько 380 та 1200 п.н. було відмічено для групи рослин 5 Гр+NaCl. За 22 доби після дії пошкоджуючих чинників значних змін ДНК з використанням CYCLOP виявлено не було. При використанні праймера Pigu, ДНК-профілі гороху за кількістю ампліконів через 2, 12, 22 доби після дії стресорів не змінювалися для жодної з груп та стабільно становили 4. Також стійкими до активації мобільності стресорами виявилися праймери 2228, 2230, 2232, 2251, 2249, 2080, OGRE. Можливо, знаходячись у ділянках висококонсервативного гетерохроматину, вони виявилися менш доступними для ферментів. Крім того, існує висока ймовірність втрати ретротранспозоном своєї активності. Зміни у послідовностях ДНК, які відбуваються в результаті транспозиції LTR-ретротранспозонів, можуть мати як негативний вплив, так і відігравати позитивну роль в індукції адаптивних процесів та формуванні захисної відповіді рослинного організму через потенційне втручання у функції генів і геномів в цілому в процесі онтогенезу. У зв'язку із зростанням генетичної нестабільності, в свою чергу, можуть проявлятися такі радіобіологічні реакції, як гормезис, адаптивна відповідь або радіаційно-індуковане старіння.

Таким чином, результати дослідження свідчать про підвищення мобільності МГЕ гороху у відповідь на абіотичні стресові чинники, зокрема опромінення та осмотичний стрес. Активація ретротранспозонів у відповідь на стресовий вплив визначається здатністю їх промоторів реагувати на фактори сигнальних шляхів, які регулюють адаптацію рослин до абіотичних стресів.

**Протеомічне дослідження проростків *P.sativum* L. після гострого впливу ІВ у дозі 10 Гр в поєднанні з наступним впливом сольового стресу.** Пошукова протеоміка дозволяє провести одночасний моніторинг змін сотень білків, які беруть участь у процесах функціонування клітин, сигнальних



шляхах, подоланні наслідків радіаційного стресу. Застосування сучасної протеоміки дає можливість виявляти білки, вміст яких зазнав змін внаслідок впливу різних факторів, зокрема ІВ та ІВ у поєднанні з засоленням (рис.5).

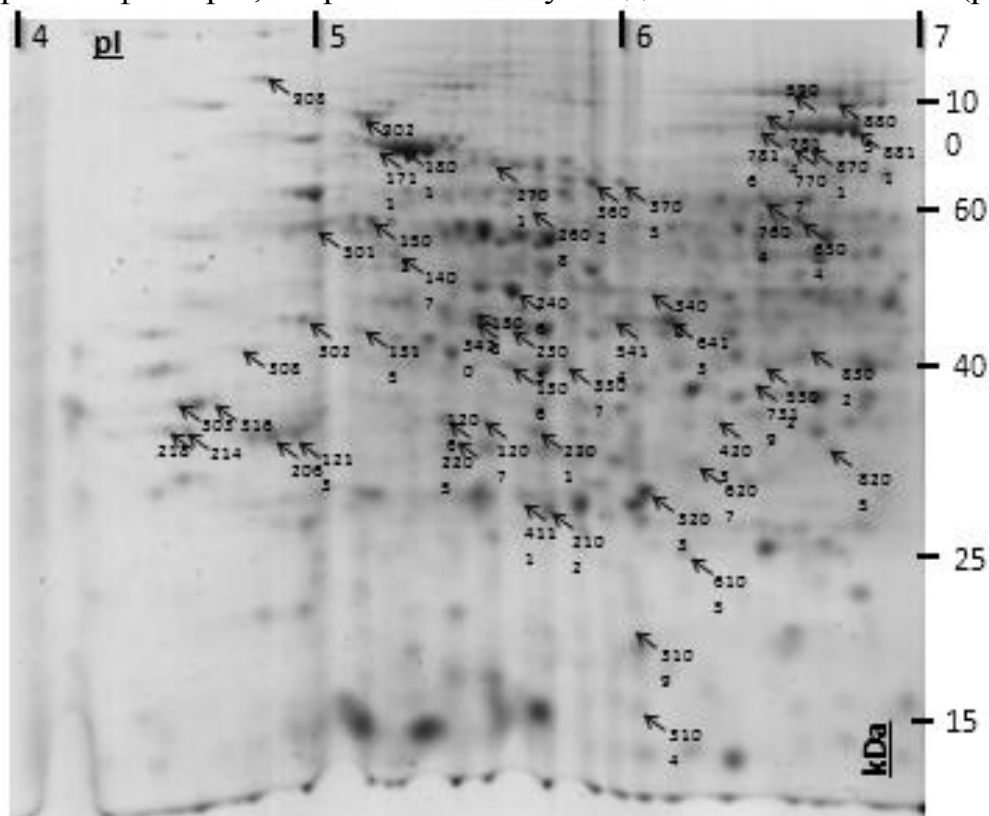


Рис. 5. Протеомічна мапа, на якій вказано білки, що змінилися у відповідь на вплив стресових чинників та їх комбінацій на рослини гороху.

У результаті проведеного аналізу 2-ДЕ електрофореграм було виокремлено 223 білкові плями, з яких 54 статистично достовірно відрізнялися від контролю хоча б для однієї з експериментальних груп (рис.5). Білки, концентрація яких відрізнялася між групами, були охарактеризовані за допомогою баз онлайн-сервісів типу BLASTP (NCBI), з них було ідентифіковано 39 білків.

Серед усіх білків, що були присутні принаймні на двох гелях із трьох, найбільшу кількість склали білки з молекулярною масою від 30 до 60 кДа (51 %), менше третини - білки масою 60–120 кДа (31 %) (рис.6).

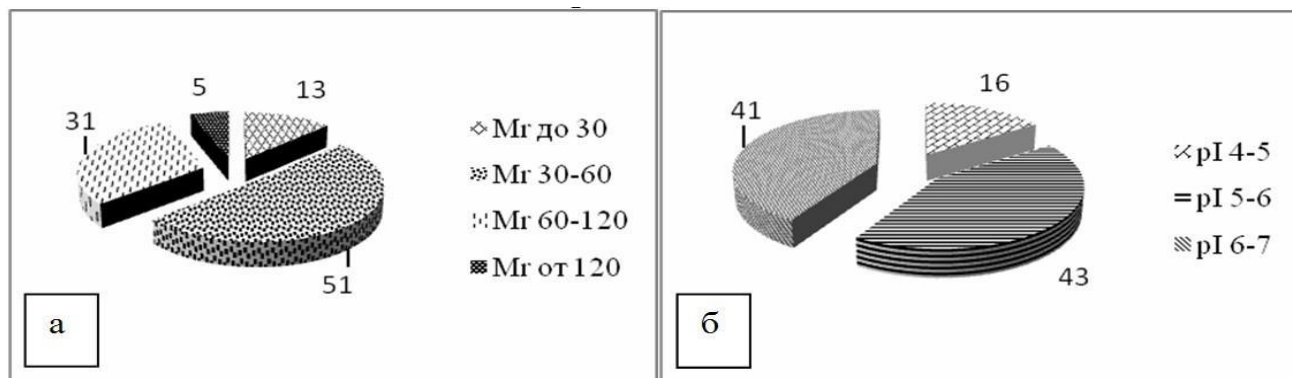


Рис. 6. Розподіл білків за молекулярними масами Mr(а) та іонними силами pI(б).



Найменше виявилося білків із молекулярною масою менше 30 кДа (13 %) та більше 120 кДа (5 %) (рис. 6а). При цьому розподіл за pI (ізоелектрична точка) був таким: майже однакова кількість білків з pI у діапазоні 5–6 та 6–7 (43 % і 41 % відповідно) та 16 % білків з 4–5 pI (рис. 6б). Варто зазначити той факт, що деякі з ідентифікованих білків мали не характерні значення pI та молекулярну масу, що відрізняється від зазначених у літературі та базах даних. Це пов'язано з тим, що під дією стресових факторів та індукованих ними каскадами реакцій, білки можуть дещо змінювати свою конформацію; можливе фосфорилування білків, що може здійснюватися по різним амінокислотним залишкам. Зокрема, в даний час увагу дослідників привертає фосфорилування білків по тирозиновому залишку що має значення в регуляції низки метаболічних процесів і відповідей рослин на різні стресори, в тому числі, на засолення. Усі білки після проведення статистичної обробки було розділено за рівнем експресії на групи (рис. 7) відповідно до фактора, який мав найбільший вплив на концентрацію білків в гелі, тобто інтенсивність синтезу та деградації білків. Зміна концентрації найбільшої кількості білків спостерігалась у відповідь на поєднаний вплив іонізуючої радіації та засолення (11 % загальної кількості виокремлених білків). Деякі з цих білків були ідентифіковані у різних близьких видів рослин (боби, нут, люцерна, соя), що з високою ймовірністю характерні для проростків гороху.

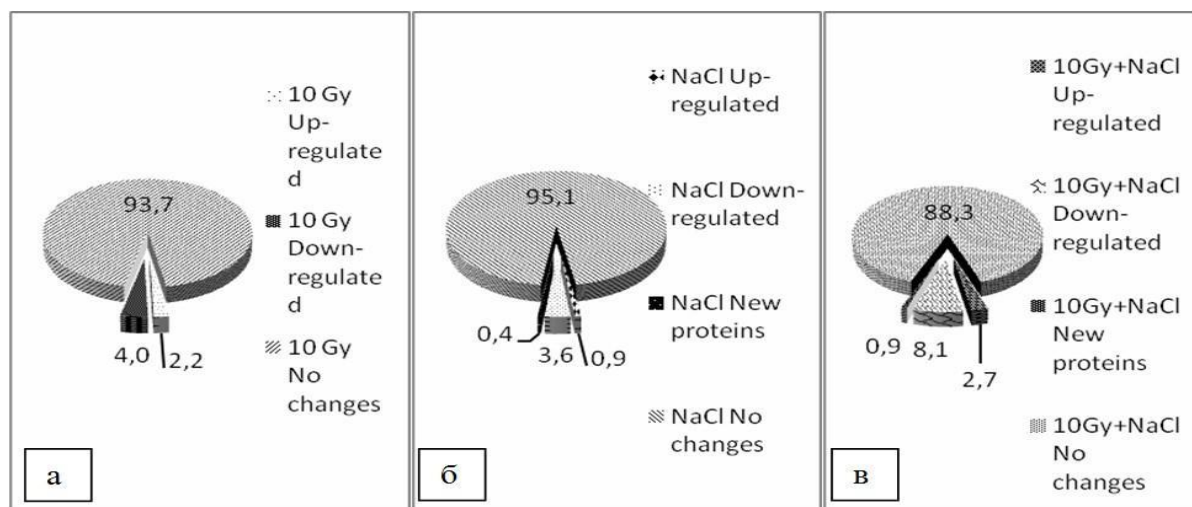


Рис. 7. Зміна концентрації білків у відповідь на дію стресових факторів: а – опромінення; б – засолення; в – їх комбінації (де Up-regulated та Down-regulated це, відповідно, збільшення чи зменшення кількості білків)

Два з ідентифікованих білків - білки теплового шоку рослин. Їх молекулярна маса дещо вища за очікувану, що може вказувати на модифікацію білків, приєднання до них невеликих білків, функціональних груп, зміну структури. Білки родини БТШ 70 запобігають нагромадженню денатурованих поліпептидів, що утворюються внаслідок різних типів стресу, вступають в короточасні взаємодії з новосинтезованими цитоплазматичними білками, сприяють укладанню останніх у нативну конформацію, реагують підвищенням концентрації на різні стресові фактори. Виходячи з отриманих даних, на їх

концентрацію більший вплив має ІВ у порівнянні із засоленням. При цьому за умов поєднаної дії стресорів синтез обох ідентифікованих білків пригнічувався, що може вказувати на «перемикання» сигнальних шляхів під час реакції рослинного організму на комбінований стрес через 2 доби після впливу.

Супресії за впливу комбінації стресорів зазнали білки родини 14-3-3, що виступають у ролі регуляторів апоптозу, клітинного циклу, поділу, транскрипції, реплікації, функціонування іонних каналів, організації цитоскелету у клітинах еукаріот. Перенесення залишку фосфорної кислоти супроводжується зміною заряду, що часто призводить до істотних конформаційних перебудов, які впливають на структуру, властивості та функціональну активність білків. Ми спостерігали зменшення концентрації цього білка у відповідь на сольовий та комбінований стрес (для ізоформи 14-3-3В на 11 % та 100% у порівнянні з контролем, для ізоформи 14-3-3 на 58 % і 100 %, відповідно). При цьому у відповідь на дію радіації концентрація ізоформи 14-3-3В зростала у 3,1 рази, а ізоформи 14-3-3 у 2,2 рази.

Білки малатдегідрогенази (МДГ), дещо відрізнялися за рІ (6,5 та 6,7 відповідно) і молекулярною масою (41,98 кДа та 43,52 кДа). МДГ є одним із найважливіших ферментів рослинного метаболізму та представлена чотирма дегідрогеназами, дві з яких мають оксидоредуктазну активність, а дві інші – декарбоксилуючу. Ідентифіковані ізоформи або посттрансляційні модифікації МДГ по різному реагували на дію стресових чинників. Так, концентрація однієї з них у варіанті рослин, що піддавали впливу засолення або опромінення, в порівнянні з контролем значно знижувалася, але за комбінованої дії стресорів концентрація становила 107 % від показника контрольних рослин. Вміст іншої, навпаки, за комбінованої дії факторів знизилася вдвічі (до 51% від контролю). Але дія іонізуючої радіації призвела до зростання концентрації цього ферменту у 1,7 рази, а засолення спровокувало майже повну його відсутність (7 % від контрольної величини). МДГ відносять до ферментів окисних реакцій САМ-шляху. Цикл трикарбонових кислот – ключовий етап клітинного дихання, однією з ланок якого є перетворення малата за допомогою малатдегідрогеназного комплексу.

Білок молекулярною масою 122,37 кДа ідентифікований як транскетолаза. Його вміст в умовах комбінованої дії опромінення та засолення зріс до 130% порівняно з контролем. Оскільки транскетолаза є важливим ферментом циклу Кальвіна, збільшення його кількості може вказувати на активацію темної фази фотосинтезу та підвищення синтезу вуглеводів. Водночас за умови опромінення рослин вона складала 69% від контролю. Єдиний ідентифікований білок, концентрація якого значно зростала як у відповідь на кожний із стресорів окремо, так і за їх комбінованої дії – це фактор елонгації трансляції EF-2 (далі ФЕТ), що є гомологом прокаріотичного фактора EF-G. ФЕТ відіграє значну роль у процесах росту, розвитку та регуляції життєдіяльності рослин, тобто у здійснюваному рибосомами синтезі білків. У зв'язку з цим ріст його кількості у проростках дослідних варіантів може вказувати як на активацію клітинної відповіді в процесі адаптації, так і на відновлення розвитку рослинного організму через дві доби після стресового впливу. Кожен з ідентифікованих

білків, концентрація якого змінювалася внаслідок дії стресових факторів чи їх комбінацій, впливає на реакції організму на пошкоджуючі чинники та може відігравати важливу роль у передачі сигналів і, як результат, у взаємодії сигнальних систем рослин. Загалом 223 виявлені білки можна розділити на групи за принципом впливу на зміни їх концентрації в залежності від характеру взаємодії стресорів (табл.2), де З- NaCl, ІВ- іонізуюче випромінювання, Е- ефект.

Таблиця 2

## Характеристика взаємодії стресових факторів

Схема взаємодії факторів	Тип взаємодії стресорів	Кількість білків (з 223)
$E=Z+IB$	Не кооперативний адитивний	28 (13%)
$E=3 \times IB$	Не кооперативний мультиплікативний	34 (15%)
$E \gg Z+IB, E \gg 3 \times IB$	Кооперативний синергічний	20 (9%)
$E \ll Z+IB, E \ll 3 \times IB$	Кооперативний антагоністичний	141 (63%)

Визначення типу взаємодії стресових факторів ґрунтується на аналізі змін концентрації білків після дії опромінення, засолення та їх комбінації. Відгук організму неможливо передбачити, виходячи лише з інформації про ефекти окремого впливу кожного з факторів. Тому ефекти (Е) зміни експресії певного білка, залежно від впливу кожного зі стресорів (З - засолення, ІВ - іонізуюче випромінювання) та характеру взаємодії стресорів із погляду величини ефекту зміни концентрації білка, поділили на чотири типи. Виходячи з отриманих даних щодо концентрації білків, було визначено, що найбільш вираженим є кооперативний антагоністичний ефект. Це явище притаманне для 63% білків. Для них величина ефекту впливу комбінації факторів виявилася значно нижчою за очікувану в разі адитивної та мультиплікативної взаємодії факторів. Протилежна ситуація склалася для 20 виділених білків, для яких ефект комбінованої дії значно перевищував теоретично очікуваний. Також були визначені білки, на експресію яких опромінення та засолення впливали адитивно або мультиплікативно (28 та 34 білків з 223 відповідно) Такі результати можуть вказувати на складні механізми регуляції експресії генів і синтезу білків у відповідь на комбіновані стреси, а також на комплексну систему адаптації організмів до дії пошкоджуючих чинників та на взаємодію сигнальних систем під час формування реакції рослин на стрес на молекулярному рівні. Серед 54 білків зі зміненою концентрацією за особливістю впливу стресорів було ідентифіковано наступні (табл.3)

Таблиця 3

Протеїни, ідентифіковані після гострого впливу ІВ у дозі 10 Гр у поєднанні з наступним впливом сольового стресу

№	10 Гр, Білки	
1	↑20,1	Short-chain alcohol dehydrogenase SAD-C
2	↑3,1	14-3-3-like protein B

Таблиця 3(продовження)

Протеїни, ідентифіковані після гострого впливу ІВ у дозі 10 Гр у поєднанні з наступним впливом сольового стресу

№	10 Гр, Білки			
3	↑2,5	Acyl-CoA N-acyltransferase (NAT) family protein		
4	↓1,5	transketolase, chloroplastic		
5	↓1,9	Vitamin B-12-independent methionine synthase		
6	↓2,1	Uncharacterized protein		
7	↓2,2	Actin-related protein 4A		
8	↓2,7	Sucrose synthase		
9	↓3,8	Malate dehydrogenase		
10	↓4,0	DREPP plasma membrane protein (as salt stress root protein RS1		
№	NaCl, Білки			
1	індукція	Isoflavone reductase		
2	↑2,2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase		
3	↑1,3	Pathogenesis-related protein 10a		
4	↓1,3	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase		
5	↓1,3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial		
6	↓2,0	Peroxioredoxin		
7	↓2,0	Aldo/keto reductase		
8	↓4,1	Monodehydroascorbate reductase		
9	↓14,9	Malate dehydrogenase		
№	NaCl+10 Гр, Білки			
1	індукція	L-ascorbate peroxidase, cytosolic		
2	індукція	Beta-D-glucoside glucohydrolase		
3	↑5,1	isoflavone reductase-like protein		
4	↑4,7	Translation elongation factor EF-2 subunit		
5	↑3,5	Zinc finger CCCH domain protein / Znf_CCCH_sf		
7	↑2	Phosphoglycerate kinase		
8	↑1,6	Lipoxygenase		
9	↓3,4	Vitamin B-12-independent methionine synthase		
10	↓5,5	Uncharacterized protein		
11	↓9,2	V-type proton ATPase catalytic subunit A		
12	↓31,9	26S protease regulatory subunit 6A like A		
13	супресія	14-3-3-like protein		
14	супресія	Late embryogenesis abundant protein / response to desiccation		
15	супресія	Elongation factor 1-beta		
16	супресія	Heat shock cognate protein 80		
17	супресія	Patellin-like protein		
18	супресія	Heat shock cognate 70 kDa-like protein		
19	супресія	Processing peptidase		
(10 Гр + NaCl) взаємодією індуковані білки				
№	10 Гр	NaCl	10 Гр +NaCl	Білки
1	↓1,6	↑2,8	-	probable NAD(P)H dehydrogenase (Quinone) FQR1-like 2
2	↑2,7	↓1,8	супресія	Aldo/keto reductase/NADP-dependent oxidoreductase domain superfamily

Проведений біоінформатичний аналіз одержаних даних дозволяє стверджувати, що проходження сигнальних процесів при комбінованій взаємодії радіаційного фактора і засолення провокує взаємодію сигнальних систем та відхилення від звичної стратегії відповіді організму на певний фактор.

## ВИСНОВКИ

В роботі надано комплексну характеристику реакції рослин гороху (*Pisum sativum* L.) на ІВ та її модифікацію абіотичними стресорами. Встановлено існування різних типів взаємодії абіотичних стресових факторів різної природи при їх впливі на рослинні організми, а саме засолення, гіпертермії та ІВ, що може вказувати на прояви явища кростоку сигнальних систем. З використанням молекулярно-генетичних та біохімічних методів проаналізовано особливості поведінки мобільних генетичних елементів та накопичення проліну, сучасні протеомічні методи дозволили визначити характер взаємодії сигнальних шляхів.

1. Виявлено відхилення морфометричних показників реакцій проростків гороху від адитивності в бік синергізму або антагонізму, що може вказувати на прояви явища кростоку. Цей синергізм та антагонізм особливо помітні на 2-у та 8-у добу після впливу стресорами. Попередній вплив ІВ змінює стійкість проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів, однак це явище має тимчасовий характер.

2. Динаміка змін ростових реакцій та концентрації проліну на різних етапах росту є нелінійною та може свідчити про наявність специфічних реакцій рослин на стрес, зокрема кростоку сигнальних систем. Засолення та гіпертермічний стрес мали істотніший вплив на кількість цієї амінокислоти, ніж ІВ. Кореляція між концентрацією проліну та вмістом води у перші дні після стресових впливів була від'ємною ( $r = -0,87$ ). З часом рівень води в рослинах відновлювався і стабілізувався ( $r = 0,32$ ) приблизно на 34-у добу експерименту, що може вказувати на те, що осмопротекторна функція проліну не є основною.

3. Застосовані види стресу та його комбінації можуть активувати мобільні генетичні елементи, зокрема, LTR-ретротранспозони і привести до їх проліферації, зруйнувавши епігенетичний сайленсінг. Найбільш активна реакція – поява нових ампліконів - виявилася за впливу ІВ у відносно низьких (5 Гр) та високих (20-25 Гр) дозах у поєднанні із засоленням та без нього, а також за окремої дії нагрівання та осмотичного шоку.

4. Аналіз протеомічних даних показав, що ІВ, засолення та їх комбінація суттєво впливають на синтез білків проростків гороху. У результаті виділення білків та проведеного аналізу 2-ВЕ електрофореграм було виокремлено 223 білкові плями, з яких 54 статистично достовірно відрізнялися від контролю або між собою хоча б для однієї з експериментальних груп.

5. Вперше показано, що концентрація більшості білків змінюється у відповідь на комбінований вплив іонізуючої радіації та засолення. Серед досліджуваних білків виявилися такі, що є невід'ємними для підтримання життєдіяльності та є важливими складовими сигнальних систем.

6. Вперше виявлено, що найпоширенішим типом взаємодії досліджуваних стресорів виявилася кооперативна антагоністична взаємодія (141 білок), некооперативна адитивна або мультиплікативна (28 та 34 білків відповідно) зустрічалися рідше, некооперативна синергічна взаємодія була характерна лише для 20 білків, що вказує на істотну взаємодію сигнальних систем під час формування відповіді рослин на вплив зазначених стресових факторів.

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті (*Здобувачем проведено експеримент та аналіз отриманих даних та літературних джерел та написано значну частину тексту публікації*):

1. 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., Нестеренко О.Г., Сакада В.І. Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія – К.: Паливода А.В. 2018. 284с. (*провела усі експериментальні дослідження, описані у розділі 6 та частину розділу 1 монографії, інтерпретувала дані та зробила висновки, написала текст*)

2. Nesterenko, O. , Rashydov, N. Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation. International Journal of Secondary Metabolite. 2018.;5(2):94-108. (*повністю провела експеримент, включаючи виділення та аналіз концентрації проліну, проаналізувала сучасну тематичну літературу, провела збір та статистичну обробку даних, сформулювала основні висновки та положення, написала і переклала текст статті*)

3. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Реакція рослин гороху на дію сольового і термічного стресових факторів залежно від попереднього іонізуючого опромінення ISSN 1996-4536 Біологічні Студії / Studia Biologica. 2018;12(1):65–72. (*провела лабораторні експерименти, проаналізувала отримані дані, сформулювала висновки та написала текст статті*)

4. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М., Літвінов С.В.. Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин гороху під впливом абіотичних стресових факторів. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018;74:75-81. (*було пророщено рослини гороху, проведено дослід з впливу на них стресовими чинниками, виділено ДНК, проведено ПЛР та електрофорез, проаналізовано отримані дані, проведено пошук та аналіз відповідної літератури, сформульовано висновки та написано текст статті*)

5. Нестеренко О.Г., Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зміна експресії білків під час взаємодії сигнальних систем у проростків гороху під впливом стресових факторів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:154-162. (*підготувала рослинний матеріал, спланувала експеримент з відповідними дозами стресорів, екстрагувала протеїни та ДНК, провела 2-ВЕ, проаналізувала електрофореграми за допомогою комплексної програми PDQuest, виділила білки, сформулювала висновки та написала текст статті*)

6. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Визначення кореляції між вмістом проліну та води у коренях *Pisum sativum* L. під впливом абіотичних стресових факторів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2017;2(9):192-196. *(провела вплив стресорами, культивування і виділення та визначення концентрації проліну, аналіз даних, зробила заключення та підготувала текст статті)*

7. N. Rashydov, O. Nesterenko The Problems Sustainable Remediation Of The Chernobyl Alienation Areas. Journal of Radiation Researches. Baku. 2018;5(2):13-25. *(проведено аналіз отриманих даних та літературних джерел та написано частину тексту публікації)*

Тези доповідей *(Для кожної з яких здобувачем сплановано та проведено дослід, проаналізовано та інтерпретовано дані, написано текст тез):*

1. Nesterenko O.G., Grodzinsky D.M. Combined effects of stress-factors (hyperthermia, UV-irradiation and salinity) on growth reactions of plants. In: 3 Intern. Conf. "Modern problems of biology, ecology and chemistry". Zaporizhya, Ukraine. May 11-13, 2012. p.83.

2. Nesterenko O.G. Specific and nonspecific components of the plant response to the action of several stressors. In: Ukr. Sci. Conf. "Advances in botany and ecology", Uman, 9–12 September, 2014. p. 134.

3. Нестеренко О., Ланчикова В., Рашидов Н., Гродзинський Д. Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин під впливом стресових чинників на фоні іонізуючого опромінення та без нього. У: VI з'їзд Радіобіологічного Товариства України. Київ, 5-9 жовтня 2015р. с. 97.

4. Шевченко В.В., Літвінов С.В., Бережна В.В., Сакада В.И., Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М. Трансгенераційна пам'ять репродуктивних органів рослин на вплив стрес фактора. У: Науково-практична конференція з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм». м. Долина, Івано-Франківська обл., Україна. 4-7 жовтня 2016 р. с. 61.

5. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М., Гродзинський Д. М. Уровень проявления ростовых реакций и концентрации эндогенного пролина у проростков гороха в ответ на разные комбинации стрессоров. У: 23 Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень Нан України. Київ, 1-5 лютого 2016 р. с.185.

6. Нестеренко Е.Г., Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Сравнительный протеомный анализ реакции проростков *P. sativum* L. на действие стрессовых факторов. У: Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України. Київ, 10 - 13 квітня 2017 р. с. 207-208.

7. Nesterenko O., Majercikova V., Klubicova K., Rashydov N. Speculations of the correlation of proline accumulation and water content in pea seedlings under combination of stress factors. In: Scientific & practical Seminar with international participation «Stress Factors & Secondary Metabolites». Kyiv, Ukraine. December 11-15, 2017. p. 8.

8. Nesterenko O., Danchenko M., Majercikova V., Rashydov N., Klubicova K. Proteomics approach of crosstalk in cell signaling investigation. In: "Symposium on Euroasian Biodiversity", Kyiv. July 3-6, 2018. p. 390.

9. Нестеренко О.Г., Худолєєва Л.В., Хома Ю.А., Рашидов Н.М. Аномалії будови рослин гороху, викликані гострим іонізуючим опроміненням у поєднанні з засоленням чи гіпертермією. У: 7 з'їзд Радіобіологічного Товариства України. Київ, 1–4 жовтня 2019 р. с.98.

Також окремі результати дисертації доповідались на щорічних звітних і наукових семінарах відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ НАН України.

#### АНОТАЦІЯ

*Нестеренко О. Г.* Модифікація радіобіологічних реакцій рослин гороху (*Pisum sativum L.*) абіотичними стресорами. – 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.

У дослідженні було проаналізовано біохімічну, генетичну, протеомічну та морфологічну відповідь рослин на вплив абіотичних стресорів: гострого іонізуючого опромінення у комбінації з засоленням або гіпертермією. Суттєве відхилення реакцій від аддитивності у бік синергізму або антагонізму може вказувати на прояви явища кресток сигнальних систем. Попередній вплив опромінення модифікує подальшу стійкість проростків, однак це явище має тимчасовий характер. Показано нелінійний зв'язок між ростовими реакціями і концентрацією проліну. Вперше отримано дані щодо впливу різних стресорів та їх комбінацій на мобільність ретротранспозонів рослин. Вперше використано комплексний комбінований підхід, що включає аналіз протеомічних даних, який показав, що ІВ, засолення та їх комбінація суттєво впливають на зміну, як якісну, так і кількісну, складу білків проростків гороху. Найпоширенішим типом взаємодії стресорів виявилася кооперативна антагоністична взаємодія, що вказує на складні механізми формування відповіді.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, взаємодія стресових факторів, кресток сигнальних систем, пролін, мобільні генетичні елементи, протеоміка.

#### АННОТАЦИЯ

*Нестеренко Е. Г.* Модификация радиобиологических реакций растений гороха (*Pisum sativum L.*) абиотическими стрессорами. - Квалификационный 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 исследовании были проанализированы биохимический, генетический, протеомический и морфологический ответ растений на влияние абиотических



стрессовых факторов: острого ионизирующего облучения в комбинации с засолением или гипертермией. Существенное отклонения реакций от аддитивности в сторону синергизма или антагонизма может указывать на проявления явления кроссток сигнальных систем. Облучения модифицирует дальнейшую стойкость проростков, однако это явление носит временный характер. Показана нелинейная связь между ростовыми реакциями и концентрацией пролина. Впервые получены данные относительно влияния различных стрессоров и их комбинаций на мобильность ретротранспозонов растений. Впервые использовано комплексный комбинированный подход, включающий анализ протеомических данных, который показал, что ИО, засоление и их комбинация существенно влияют на состав, как качественный, так и количественный, белков проростков гороха. Самым распространенным типом взаимодействия стрессоров оказался кооперативный антагонистический, что указывает на сложные механизмы формирования ответа.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, взаимодействие стрессовых факторов, кроссток сигнальных систем, пролин, мобильные генетические элементы, протеомика.

## SUMMARY

*Nesterenko O.G.* Modification of radiobiological reactions of pea plants (*Pisum sativum L.*) with abiotic stressors.

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

In the study biochemical, genetic, proteomic and morphological responses of *Pisum sativum L.* on acute radiation exposure in combination with salinity or hyperthermia were analyzed. For the first time we used a complex combined approach to study reactions of the pea seedlings to stressors after preliminary irradiation. Different growth reactions and free proline content in root of the *Pisum sativum L.* seedlings for all treatments were evaluated. The received results on growth parameters show that comparatively low doses of ionizing radiation assists plants in resistance to salt and temperature stressors, however this resistance is short-term. These data could integrally characterize molecular, genetic, structural and metabolic changes in pea seedlings on their initial growth phase. For this purpose, the average growth rate of roots was compared with the theoretically expected growth rate that was calculated as an additive interaction of stress factors. “Crosstalk” signal systems means the growth of organism’s resistance to one stress factor as a result of adaptation to another stressor. It is a result of interconnection and “dialogue” of various signal systems of plant. Significant deviation from additivity towards synergism or antagonism has been demonstrated in terms of growth parameters of plants, which may indicate the appearance of signal systems crosstalk. Osmotic or thermal stresses can modify resistance of seedlings to ionizing irradiation but this phenomenon is only temporary. Proline analysis has shown that its concentration in response to irradiation has not changed as much as under the influence of salinity or a combination of both stress factors. The quantification of this amino acid is useful to

assess the physiological status of signal systems crosstalk and more generally to understand stress tolerance of plants. On 13th day after stressors impact the high level of water losses in roots was observed. Correlation coefficient between water-cut and proline content was negative ( $r=-0.87$ ), but over time water level in plants restored and stabilized on about 34th day of the experiment and the correlation coefficient became positive ( $r=0.32$ ). It may be related to osmotic shock, caused by affect salt, and following decrease in growth speed, when organism's need of water somewhat decreased. It seems that metabolism is transferred to stable state and energetic processes are switched to support of plant integrity function and reparation processes. For the first time the data concerning the impact of different types of stress and its combinations on the activity of plant mobile genetic elements were obtained. The appearance of new amplicons of LTR-retrospoons were shown. It indicates the possible destruction of epigenetic silencing and the increasing mobility of retro-transposons. To understand the response to acute ionizing radiation in combination with salinity proteome changes were investigated. Analysis of proteomic data showed that the stress factors being studied significantly affect to change both quality and quantitative amount in the content of pea seedlings proteins. As a result of the 2-DE analysis 223 protein spots were isolated, of which 54 statistically significantly differed in comparison with at least one of the experimental groups. We observed modification of synthesis of some proteins that belong to important signal systems among which are transketolase, malate dehydrogenase, translation elongation factor EF-2 subunit, 14-3-3-like protein, heat shock cognate protein 80, heat shock cognate 70 kDa-like, 14-3-3-like protein B and etc. Their significant role in the stress signals transduction and in the processes of forming an active response to the unfavorable factors is confirmed by fluctuations proteins concentration between groups. The largest number of proteins has changed in response to the combined effect of ionizing radiation and salinity. There were revealed that each factor by itself alone cause less changes in quantity of proteins than in their combination. The most widespread type of stressors interactions that was observed - cooperative antagonistic. It indicates complex mechanisms of signaling systems crosstalk in plants' response formation to the stress factors impact.

Keywords: ionizing irradiation, signal system crosstalk, proteomics, mobile genetic elements, stress factors interaction, proline.