

**Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Кривохижа Марина Вікторівна

УДК 577.218

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

03.00.01 "Радіобіологія"

біологічні науки

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

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання
ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело

Кривохижа М.В.

Науковий керівник
Рашидов Намік Мамед огли
доктор біологічних наук
старший науковий співробітник

Київ – 2019

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.

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. 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. УФ-опромінення впливає на прохідність у стоматичних клітинах, змінюючи швидкість втрати води шляхом транспірації та поглинання CO₂ для фотосинтезу, та в результаті репараційних процесів викликає зміну резистентності організму в цілому.

Ключовим процесом у репродуктивній функції рослин є стадія цвітіння. Відомо, що в морфогенезі рослин, вона є однією з найбільш чутливих до стресових факторів. 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*, 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. 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.

Ключовими є гени, 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* (*AP1*) 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. Ген *RAD51* має функцію репарації та приймає участь у рекомбінації у рослин та інших еукаріот.

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*.

Наукова новизна: Вперше показано високу супресію за 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.

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. Фенотипічний та фенологічний аналіз проводили за класифікацією Бойєса (2001). На дослідні групи рослин діяли іонізуючим опроміненням у гострому одноразовому режимі, рентгенівськими променями, та у хронічному пролонгованому за допомогою джерел радіонуклідного випромінювання від $^{137}\text{CsCl}$. 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. Відносну експресію генів *AP1*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY*, *RAD51*, *PCNA2* визначали методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі. В якості референсного гену використовували ген актину *ACT2* та убіквітину *UBQ10*.

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.

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

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 *AP1* та *FT* стимулюється опроміненням. 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.

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 дослідях з вивчення ефектів дії гострого короткочасного режиму опромінення.

Результати спостережень демонструють, що найшвидші темпи розвитку характерні для рослин, які вирощені при інтенсивному білому освітленні. 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 у

рослин, що були вирощені при червоному освітленні. Характер змін експресії генів фотоперіодичного шляху за дії УФ-С вказує на стабілізуючу дію криптохромів та фототропінів на генетичні механізми регуляції квітування. 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 *PHYA-PHYE*, можна припустити, що фітохроми приймають участь у регуляції цвітіння рослин в умовах неповного спектру освітлення.

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.

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.

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

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., Сакада В.І. Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія/– К.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. – 284с
2. **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.
3. 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.
4. **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.
5. **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
6. **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.

7. 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 phytocomposites as radioprotector against acute and chronic irradiation. Journal of Radiation Researches. 2019. Vol.6. №1. P. 11-20.
8. **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.
9. Літвінов С. В., **Кривохижа М. В.**, Кухарський В. М., Рашидов Н. М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018. № 2 (73). С. 157-163.
10. **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.
11. **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
12. 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.
13. **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.

14. **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.
15. **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.
16. **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.

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.

Ionizing radiation is a powerful stress factor for all living organisms. Numerous studies of different modes, including chronic low-level exposure, represent the high vulnerability of the reproductive function of fauna and flora. The effects of radiation on the fertility of agrarian useful plants can have serious adverse effects. The study of its various responsible function components of the productivity relevant not only from a theoretical point of view but also from an agriculture practice. The UV irradiation affects the patency of the somata cells, altering the rate of water loss through transpiration and absorption of CO₂ for photosynthesis, and as a result of repair causes a change in the plant resistance.

The key process of plant development, reproduction and seed yield is the flowering stage. It is one of the most sensitive stages of plant morphogenesis to stress factors acting. The optimum time of flowering is important for effective pollination and accumulation of the required nutrients for a successful transition to the reproduction phase at ontogenesis.

Nowadays, molecular-genetic mechanisms of the transition to the generative phase have been most extensively studied in *Arabidopsis thaliana*. It makes possible to study this process at this model object under various stress factors, including acute and chronic irradiation. For plant *A. thaliana*, the flowering regulation complex is the network of more than one hundred genes. Among these, the key transcriptional factors are identified.

Arabidopsis is a long day plant, and its flowering comes with increasing daylight hours. The circadian clock plays a major role in the photoperiodic mechanism of flowering activation that exists for most plant species.

We have chosen several genes of photoperiodic pathway transcription factors to investigate. There are *CONSTANS (CO)* and *GIGANTIA (GI)*, which those associated with the circadian clock; the suppressor of photoperiodic flowering activation *FLOWERING LOCUS C (FLC)*; the floral factor *FLOWERING LOCUS T (FT)* gene, involved in the cascade signal transduction, and genes of apical meristem determination *APETALA 1 (AP1)* and *LEAFY (LFY)*. In addition to flowering genes, we have investigated the markers of the systemic response of plants to ionizing radiation, which are the proliferation gene *PCNA2* and repair gene *RAD51*. The *PCNA2* gene (proliferating cell nuclear antigen) has been found in yeast nuclei, plant and animal cells. *PCNA2* has the function of cell cycle regulation, DNA repair, replication and plays a role in genome-related processes. The *RAD51* gene has a repair function and is involved in recombination in plants and other eukaryotes.

The main aim of the work is to study the effects of different modes of ionizing and UV-C radiation on *A. thaliana* flowering, and on the expression of key genes of photoperiodic mechanism *CO*, *GI*, *FLS*, *FT*; the gene of repair *RAD51*, proliferation gene *PCNA2* and determination of floral meristem genes *AP1* and *LFY*.

Scientific novelty: the high suppression of flowering determination genes by chronic irradiation, presence of nonlinear dependence of photoperiodic mechanism genes expression change for the action of sublethal doses of ionizing radiation is shown for the first time. For the first time, the influence of the light spectrum at the activity of photoperiodic pathways genes, after UV-C irradiation of the research plants, was demonstrated.

The practical significance of the work: the obtained results are important for the organization of agricultural works on polluted with radionuclide farm and agrarian fields. These studies could be used to predict the impact of increased

radiation background on the production process and the formation of crop yields of agricultural species. The methodology of flowering genes activity analysis is perspective for the plant varieties selection for effective cultivation in contaminated areas.

Studying the effects of stress factors for the response of the photoperiodic pathway, and the influence of growing conditions on it is important to reduce the negative impact of external factors on plants. It is relevant regarding climate change in the environment, which leads to an increase in UV radiation in the ambient of the plant.

The wild type (WT) *A. thaliana* seedlings, ecotype Col 0, and mutant line *jin1* (*jasmonate insensitive*) with defective jasmonic acid receptors, to carry out the research was used. We have done the phenotypic and phenological analysis according to Boys classification (2001). We exposed the plant to acute single-time X-rays and chronic prolonged from source $^{137}\text{CsCl}$ radiation. We carried out UV-C irradiation with a wavelength of 254 nm in the phase of the developed socket. The relative expression of *AP1*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY*, *RAD51*, *PCNA2* genes by the quantitative polymerase chain reaction (PCR) in real-time were determined. The actin *ACT2* and ubiquitin *UBQ10* genes as reference genes were used in our investigations.

The results of the studies indicate the consistency in plant flowering time and the photoperiodic pathway and floral meristem identity genes activity after radiation exposure. We have found non-linear dependence of the effect of ionizing radiation and the genes expression for acute irradiation in 3-15 Gy. Irradiation in the dose of 3 Gy stimulates the genes of flowering, but, the dose in 6 Gy causes a sharp increase in the expression level of all genes.

We have shown that the stabilizing effect of jasmonic acid in the response of photoperiodic genes to irradiation. In the case of *jin1* mutants, the circadian clock genes *CO* and *GI* have a lower expression in comparison with WT. However, the expression of *AP1* and *FT* genes is stimulated by irradiation.

As it is known that the stochastic effects on the genome prevail over the target effects under the influence of the low doses of radiation. So, the relationships "dose-effect" curve of the relative expression of genes of the photoperiodic mechanism, determination of floral meristems and reparations is non-linear behaviour. Besides, comparison with the previous results showed that acute X-ray irradiation in low doses affects different from low doses of chronic irradiation. Although chronic irradiation at a dose of 3 cGy also causes stimulation of plant blooming genes in *A. thaliana*, a slight increase in the dose up to 17 cGy causes the opposite, a decrease in the activity of flowering genes are not observed in experiments to study the effects of acute short-term irradiation.

The results of observations show that rapid development rates are typical for plants grown under intensive white light. According to the results of molecular genetic analysis, the *RAD51* repair gene expression was decreased after UV-C exposure in plants grown under influence red light illumination. The character of changes in the expression of photoperiodic pathways genes for the actions of UV-C indicates the stabilizing effect of cryptochrome and phototropin on the genetic mechanisms of flowering regulation. Plants grown in the red illumination showed a decrease in the level of expression of both flowering and repair genes. It is known, that visible red light is absorbed by PHYA-PHYE phytochrome, and it can be assumed that phytochrome is involved in the plant blooming regulation.

The increase of *RAD51* gene expression indicates the activity of repair processes in cells after UV-C irradiation. Interestingly, the *RAD51* expression differs among the groups of samples which grown in white, purple and red light. The differences may be caused by the action of cryptochrome or, conversely, phytochromes, depending on the light.

In these experiments, we found changes in the expression of photoperiodic pathways genes, which depend on light illumination conditions. The activity of repair after UV-C exposure differs between groups of samples that grown in white, purple and red light. We believe that the difference between the groups

may be caused by the participation of cryptochrome or, conversely, phytochromes. It depends on the spectrum of light in which the plants were grown.

In this study, we showed the effects of ionizing and UV-C radiation on the genes of *A. thaliana* photoperiodic mechanism. Different types of irradiation have different effects on the key flowering genes. The activity trends of transcription factors of flowering regulation, reparation, and proliferation depend on the type of radiation, regime and total dose of irradiation, and light regimes of plant growth. It proved, the methodology used in the work is sensitive and informative for the study of the ionizing and ultraviolet radiation effects on the reproductive function of plants and comprehensively characterizes the flowering process for the action of ionizing radiation.

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

- 17.Дмитрієв О.П., Кравець О.П., Рашидов Н.М., Бубряк І.І., Гуца 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.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. – 284с
- 18.**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.
- 19.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.
- 20.**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.
- 21.**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
- 22.**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.
- 23.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 phytocomposites as radioprotector against acute and chronic irradiation. Journal of Radiation Researches. 2019. Vol.6. №1. P. 11-20.
- 24.**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.
- 25.Літвінов С. В., **Кривохижа М. В.,** Кухарський В. М., Рашидов Н. М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018. № 2 (73). С. 157-163.
- 26.**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.
- 27.**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
28. 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.
29. **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.
30. **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.
31. **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.
32. **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

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

AP1 - APETALA 1

CO - CONSTANS

FLS - FLOWERING LOCUS C

FT - FLOWERING LOCUS T

GI - GIGANTIA

LFY - LEAFY

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДТ - дикий тип

ІВ – іонізуюче випромінювання

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТФ - транскрипційні фактори

УФ – ультрафіолет

ЦПД – циклобутан-піримідинові димери

ЧАЕС – Чорнобильська атомна електростанція

ЗМІСТ

ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Дія хронічного та сублетального гострого випромінювання на біологічні системи	26
1.2. Характеристика УФ-випромінювання та його вплив на рослини	30
1.3. Детермінації цвітіння рослин на прикладі <i>A. thaliana</i>	33
1.4. Дослідження впливу іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на цвітіння рослин	42
1.5. Вплив іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на процеси репарації та проліферації клітин.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	49
2.1. Рослинний матеріал і умови культивування	49
2.2. Фенотипічна класифікація розвитку рослин <i>A. thaliana</i>	50
2.3. Характеристика освітлення рослин	51
2.4. Характеристика опромінення ІВ рослин	51
2.5. Характеристика УФ-опромінення рослин	52
2.6. Морфометрія та визначення часу цвітіння	53
2.7. Екстракція загальної РНК	53
2.8. Молекулярно-генетичний аналіз	55
2.9. Статистична обробка даних та розрахунок відносної експресії досліджуваних генів.....	60
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЦВІТІННЯ РОСЛИН.....	63

3.1. Вплив малих доз рентгенівського опромінення на експресію генів фотоперіодичного механізму	63
3.2. Участь шляхів жасмонадного сигналіngu у регуляції генів цвітіння <i>A. thaliana</i> під дією іонізуючого опромінення.....	77
3.3. Вплив хронічного опромінення на фотоперіодичний механізм детермінації цвітіння.....	88
3.4. Зміна експресії генів цвітіння у відповідь на УФ-С опромінення на рослини, що вирощені в культурі <i>in vitro</i> за різних умов освітленості	100
3.5. Зміна експресії генів цвітіння рослин, вирощених у ґрунті за різних умов освітленості у відповідь на УФ-С	107
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	125
ВИСНОВКИ.....	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	132

ВСТУП

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 умов 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 (AP1)* 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 виконувалася 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 опромінених 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 *AP1* та *LFY*.

Методи дослідження. Для виконання роботи використовувалися такі методи:

- фенологічний аналіз за класифікацією Бойєса (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 ІКБГІ, 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Дія хронічного та сублетального гострого випромінювання на біологічні системи

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 вразливість 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 тяжкі негативні наслідки для продукційного процесу та формування насіння, врожайності, в зв'язку з чим дослідження різних фаз морфогенеза актуально не тільки з теоретичною, але й з практичної точки зору (De Micco et al. 2011).

Питання щодо біологічних ефектів дії «малих» доз іонізуючого випромінювання (ІВ), а також проблема їх кількісної оцінки продовжують залишатися предметом численних дискусій з приводу їх впливу на біологічні системи (Дмитриев та ін., 2018; Богданов та ін., 2005).

Як відомо, радіобіологія характеризувалася розвитком досліджень на всіх рівнях біологічної організації, включаючи молекулярну і клітинну радіобіологію, розробку біологічних способів протипроменевого захисту, лікування променевих уражень та інше (Белов, 2012). Новий етап розвитку радіобіології починається з аварії на Чорнобильській АЕС у 1986 році і триває по теперішній час (Давиденко, 2011) у зв'язку з дією хронічного випромінювання та його віддалених наслідків для біоти. В той час була переглянута концепція радіаційного захисту навколишнього середовища за довготривалого впливу випромінювання від радіонуклідів. Погляд науковців з пріоритетів захисту безпосередньо людини, змістився до розуміння необхідності вивчення впливу радіації на біосферу в цілому. Проводяться роботи за науковими напрямками, таким як: вивчення

біологічної дії малих доз іонізуючого випромінювання та віддалених наслідків опромінення, дослідження комбінованих ефектів різних радіонуклідів з хімічними забруднювачами середовища; розшифровка механізмів та дії випромінювань низької інтенсивності, пошук принципово нових засобів захисту від хронічного опромінення (Рашидов та ін., 2019; Бєлов, 2012).

Не викликає сумніву, що іонізуюче випромінювання є сильним стресовим фактором для біоти. Радіобіологічний ефект залежить від характеру випромінювання, його потужності та загальної накопиченої дози (Kravets at al, 2008). Опромінення у високих дозах в короткий проміжок часу зазвичай має ефект мішені, який, в основному, пов'язаний із прямою дією енергії квантів, що безпосередньо спричиняють пошкодження молекул ДНК через поглинання енергії та утворення вільних радикалів (Гродзинський, 2011; Гродзинський та ін. 2003). У радіобіології поняття «мала доза» зазвичай пов'язують з величиною дози, при якій досліджуваний ефект починає проявлятися. При цьому верхня межа малих доз визначається по-різному в різних областях радіобіології. Питання, які дози вважати малими, залежить від критерію оцінки. При вивченні дії ІВ на організми за «малі» дози приймаються такі, які не викликають помітних порушень життєдіяльності (Журавська, 2016). Існують також підходи, засновані на мікродозиметричних дослідженнях, за якими «малою» можна вважати дозу, коли критична мішень отримує в середньому не більше однієї радіаційного події. До такої події відносять одиничний прохід іонізуючої частинки через мішень. При цьому верхня межа «малих» доз для рідкоіонізуючого випромінювання встановлюється на рівні 0,2 мГр (Богданов та ін., 2005).

При оцінці ефектів, викликаних ІВ в малих дозах за гострого опромінення, принципово важливо, що цей ефект неможливо прогнозувати шляхом екстраполяції радіобіологічних даних, отриманих при великих дозах, в область малих доз. Численні дослідження переконливо свідчили про

те, що залежність «доза - ефект» в діапазоні малих доз має не лінійний характер, а близький до синусоїдальному (Журавська, 2016).

До найважливіших аспектів радіобіології малих доз відноситься підвищена чутливість біологічних об'єктів до дії радіації, що переходить до підвищеної радиорезистентності при більш високих нелетальних дозах, а також стимулюючу дію випромінювання на зростання, розвиток та інші фізіологічні показники, назване «ефектом радіаційного гормезису». Термін було введено в 1980 м Т. Д. Лаккі. (Белов, 2012). Під поняттям “гормезис” розуміють стимулювання біосистем малими дозами різних чинників (Ивановский, 2006). У даний час існує кілька концепцій, що пояснюють природу радіаційного гормезису. Подібно до первинних механізмів пошкоджуючої дії ІВ, в основі стимулюючої дії, за припущенням авторів, теж лежить їх здатність викликати іонізацію та збудження атомів і молекул у речовині. Проте, за думкою А. М. Кузіна, за гормезис відповідає головним чином не іонізація речовини клітин при події влучання, а колективні форми електронного збудження. Імовірність збудження таких молекул, як білкові рецептори клітинних мембран, досить велика, й саме це явище лежить в основі гормезису (Гродзинський та ін., 2005).

При дослідженні особливостей радіаційної стимуляції необхідно враховувати неоднакову радіочутливість біологічних організмів та окремих тканин. Дози опромінення, що пригнічують процеси клітинного поділу, ще не здійснюють безпосереднього помітного впливу на такі фізіологічні процеси, як фотосинтез, дихання, накопичення мінеральних сполук тощо. Наприклад, пошкодження клітин апікальних меристем під впливом опромінення в сублетальних дозах призводить до ослаблення чи втрати апікального домінування та розвитку додаткових пагонів. Ці явища є проявами компенсаторних ефектів, що спричиняються пошкодженнями окремих груп клітин. Автори вважають, що стимулювання за опромінення ІВ є результатом розвитку певних пошкоджень і наступної ініціації

відновлювальних процесів компенсаторного та, в деяких випадках, гіперкомпенсаторного характеру (Гродзинський та ін., 2005).

При поясненні різних ефектів великих та малих доз радіації на біологічні об'єкти передбачається, що великі дози впливають на радіочутливі тканини, в той час як малі дози змінюють регуляторні функції радіостійких тканин. Великі дози викликають в клітинах патологічні ефекти, оскільки множинні кванти з високою енергією руйнують ДНК. Цей процес посилюється виникненням біологічно активних форм кисню, що впливає на клітинні процеси життєдіяльності. Навпаки, малі дози активізують діяльність мембран і цитозоля, не зачіпаючи генетичний апарат (Белов, 2012).

Окремим питанням до вивчення є вплив хронічного опромінення. Особливість дії хронічного опромінення на живі організми в першу чергу визначається зростанням негативного генетичного вантажу у популяціях і активними процесами репарації. Серед віддалених радіобіологічних процесів у рослин спостерігаються як безпосередні стохастичні ефекти дії радіації, так і прояви протирадіаційної активності клітин (Гродзинський, 2012; Раскоша, Башлыкова, 2017). Проте, дослідники на даний час не мають єдиного розуміння механізмів впливу хронічного опромінення на розвиток рослин. Є дані, що вказують на пригнічення росту проростків за дії хронічного опромінення, інші відзначають наявність гормезису, деякі дослідники вважають що за малих доз відсутні будь-які наслідки впливу ІВ (Міхєєв, 2018; Журавська, 2016; Гродзинський та ін., 2005; Богданов та ін., 2005).

За даними попередніх спостережень авторів, дія стресу за малих доз хронічного опромінення може знижувати стійкість рослин до дії інших стрес-факторів, особливо, біотичних. Результати, отримані незалежно в умовах вегетаційних дослідів і на польових стаціонарах в зоні відчуження ЧАЕС, свідчать про зниження стійкості рослин пшениці і жита до ураження

патогенами під впливом малих доз хронічного опромінення. Проте, виявлене авторами зниження стійкості злакових рослин за дії ІВ може бути викликано пригніченням активності інгібіторів протеїназ та послабленням захисних реакцій рослин (Дмитрієв та ін., 2011).

За хронічного випромінювання стохастичні ефекти мають більш високу вірогідність, ніж ефекти мішені (Kovalchuk at al, 2007). Хронічне опромінення дестабілізує геном, активує мобільні генетичні елементи та продукує епігенетичні зміни, які особливо впливають на роботу ключових генів метаболізму клітин (Дмитрієв та ін, 2018). Як наслідок, збільшується негативне генетичне навантаження у популяціях опромінених рослин (Гродзинський та ін. 2003).

Сублетальні дози радіації зазвичай викликають немішенні ефекти, такі як геномна нестабільність, ефект свідка, апоптозна загибель клітин, втрата здатності клітин сприймати позиційну інформацію та радіоадаптація (Гродзинський та ін. 2003, Гудков, Гродзинский, 2005).

У своєму огляді сучасних проблем радіобіології, академік Д.М. Гродзинський зазначав, що залишаються не розкритими до кінця такі проблеми, як специфіка дії інкорпорованих нуклідів, вивчення ефектів малих доз ІВ, гетерогенність розподілу радіонуклідів у структурах і органах рослин, радіоадаптація філогенетичних механізмів, ефекти спільного впливу іонізаційної радіації з іншими факторами, епігенетичні та стохастичні ефекти ІВ (Гродзинський та ін., 2012). Тому, не дивлячись на істотні успіхи у дослідженні впливу радіації на організм рослин, дія сублетальних доз на розвиток та розмноження рослин, молекулярно-генетичні механізми потребує вивчення.

1.2. Характеристика УФ-випромінювання та його вплив на рослини

В останні роки через зменшення озонового шару було визначено, що ультрафіолетове (УФ) випромінювання є високо інтенсивним стресовим

фактором (Sidler et al. 2015). Відомо, що УФ-випромінювання (в діапазоні 200–400 нм) складає близько семи відсотків від електромагнітного випромінювання Сонця. Проходячи через атмосферу, загальний потік значно зменшується, а склад УФ-випромінювання змінюється (Rozema et al., 1997; Hollo 2002). Короткохвильове УФ-С випромінювання (200–280 нм) повністю поглинається атмосферними газами. Ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі 280–320 нм, УФ-В, додатково поглинається стратосферним озоновим шаром, і тому на поверхню Землі потрапляє лише дуже незначна частка. Довгохвильовий УФ (УФ-А) з довжиною хвилі 320–400 нм озоном не поглинається та проникає на поверхню Землі (Frohnmeier, Staiger, 2003).

Проте, достовірно відомо що за останні роки озоновий шар зменшується, та все більша частка спектру ультрафіолетового випромінювання досягає Землі. Деякі хімічні речовини, такі як хлорфторуглеродні вуглеводи, які були викинуті в атмосферу призводять до виснаження озонового захисного шару. Тому є висока ймовірність, що в майбутньому рівень УФ-В та УФ-С випромінювання може збільшуватися внаслідок виснаження стратосферичного озону через забруднення атмосфери. Відповідно, зменшення стратосферного озонового шару підкреслює екологічне значення зростаючого УФ-С випромінювання на природні екосистеми та на сільськогосподарські культури. З огляду на зростаючу тенденцію потоку УФ-С на поверхню Землі, вивчення впливу УФ-випромінювання на рослини та екосистеми стає все більш актуальним питанням (Lovelli et al. 2017).

Вплив УФ-випромінювання на живі організми викликає зацікавлення у дослідників вже тривалий час (Teramura, Sullivan 1994). ДНК є однією з ключових мішеней ураження УФ для різних організмів. УФ-випромінювання викликає два найпоширеніші мутагенні та цитотоксичні ураження ДНК. Проте, у клітин є механізми репарації для відновлення пошкоджень ДНК, спричиненому УФ або будь-яким іншими стресовими

факторами. Серед них, у випадку УФ найбільш відомим механізмом відновлення є фотореактивація за допомогою фермента фотолази (Scrima et al. 2009; Sinhaa, Häder, 2002). УФ-В випромінювання викликає безліч реакцій у всіх живих організмів (Corrê, 2015). Вченими виявлено сильну кореляцію між фотоморфогенетичними реакціями, пошкодженням ДНК та УФ випромінюванням (Choi 2017, Svobodová et al. 2012, Ghetti et al. 2006). Окрім того, авторами показано важливу роль у рості та розвитку рослин (Lovelli et al. 2017).

Подальше вивчення даної проблематики передбачає проведення фізіологічних, генетичних та молекулярних досліджень, вивчення механізмів формування толерантності та стійкості до впливу УФ-випромінювання.

Рослини використовують сонячне світло для фотосинтезу і, як наслідок, піддаються УФ опроміненню, яке присутнє в сонячних променях. (Stapleton, 1992). У рослин, аналогічно фітохромам та криптохромам, різні реакції з низьким та високим рівнем флуктуації також можна було б відчувати за допомогою різних УФ-В-рецепторів (Frohnmeier, Staiger, 2003).

Ультрафіолетове випромінювання є сильним мутагенним агентом для рослин (Choi, 2017). Щоб запобігти мутації чи загибелі клітин, перед реплікацією ДНК необхідно відновити пошкодження ДНК, викликані УФ-випромінюванням. Відновлення уражень після опромінення УФ, може мати особливе значення для коректного часу цвітіння, розвитку пилку рослин. Пошкодження ДНК також повинні репаруватися перед початком процесу транскрипції. Хоча вплив УФ-С не є фізіологічно актуальним для рослин, що ростуть на сонці, випромінювання коротких хвиль (УФ-С) від герміцидних ламп часто застосовується для вивчення пошкодження ДНК тварин та бактерій, а також рослин. УФ-С використовується в першу чергу тому, що ДНК має високе поглинання енергії в діапазоні УФ-С (при 260 нм).

Ультрафіолетові короткохвильові фотони мають високу енергію, тому швидко призводять до високого рівня пошкодження ДНК (Stapleton, 1992).

Для порівняння, у клітинах тварин внесок ЦПД у загальне ураження ДНК знижується з 90% за дії УФ з довжиною хвилі 254 нм до приблизно 50% за 313 нм УФ і майже до нуля за 350 нм УФ.

Адаптація рослин до УФ випромінювання передбачає поєднання захисних та репараційних механізмів, що включають в себе не тільки безпосередньо механізми репарації ДНК, але й накопичення ультрафіолетових метаболітів, що поглинають УФ, у вакуолях епідермальних клітин, підвищення рівня антиоксидантів, захист фотосинтетичного апарату (Ulm R., Jenkins, 2015).

Рослини - надзвичайно пластичні організми, здатні адаптуватися та реагувати на зміни навколишнього середовища, що їх оточує. Вважається, що рослини здатні акліматизуватися при вирощуванні під впливом цього випромінювання і сприймають його як сигнал, без ознак стресу. Тим не менш, багато змін, викликаних УФ-В, виникають після пошкодження ДНК внаслідок впливу. (Dotto, Casati, 2017). Попередні дослідження вчених продемонстрували негативний вплив УФ-випромінювання на фотосинтез в лабораторних умовах, хоча спектр дії ефекту УФ-А та УФ-В не передбачає конкретної молекули-мішені. На рівні всього організму рослини, вплив УФ-стресу зазвичай виражається у зменшенні фотосинтезу та змінами вуглецевого та азотного обміну. Опромінення УФ може впливати на прохідність у стомах, змінюючи швидкість втрати води шляхом транспірації та швидкість поглинання CO_2 для фотосинтезу (Zlatev et al., 2012).

1.3. Детермінації цвітіння рослин на прикладі *A. thaliana*

Відомо, що однією з найбільш чутливих до стресових факторів, стадій розвитку рослин, є цвітіння. Цвітіння рослин сильно залежить від сигналів довкілля (Кривохижа, Рашидов, 2018). Квітнення в оптимальні терміни є ключовим в життєвому циклі рослин. Рослини накопичують необхідну

кількість нутрієнтів та енергії під час вегетативної фази для стабільного процесу репродукції (Parenicova, 2003; Song et al. 2013). У випадку занадто раннього цвітіння, рослини не можуть акумулювати достатньо нутрієнтів, необхідних для повноцінного розвитку та дозрівання насіння.

З наведеного розуміємо, що час розмноження - ключова адаптивна стратегія у рослин (Heyndrickx et al., 2014). Для визначення часу квітування рослинами сприймається ряд сезонних сигналів, таких як тривалість дня, температура та вологість (Andrés, Coupland, 2012). Розуміння механізмів, що регулюють час цвітіння, та вивчення генетичної архітектури варіацій цієї ознаки є важливим питанням для сільського господарства, а також для прогнозування відповіді рослин на зміну клімату. Регуляція часу цвітіння - один з найбільш вивчених етапів розвитку у рослин (Song et al. 2018). У *A. thaliana* комплекс регуляції цвітіння представлений складною мережею, що включає більше ста генів (Sasaki et al. 2017).

Формування квітів є однією з основних моделей вивчення регуляторних механізмів, які лежать в основі розвитку та еволюції рослин. З розкриттям послідовності геному арабідопсису, було охарактеризовано багато генів і регуляторних шляхів, що контролюють ініціацію, розвиток і диференціювання органів квітки (Parenicova, 2003). Припускається, що ці складні механізми регулювання необхідні для стабільного переходу рослин від вегетативного розвитку до цвітіння, навіть за умов наявності генетичних порушень чи стресових факторів з довкілля (Irish, 2010).

Як відомо, перехід від вегетативного до репродуктивного розвитку рослин послідовно та узгоджено контролюються активністю транскрипційних факторів (ТФ), які інтегрують сигнали навколишнього середовища, такі як фотоперіод, температура, наявність поживних речовин, а також ендогенні сигнали, такі як вік рослин (Wils, Kaufmann, 2017). За останні три десятиліття, ключові ТФ, які регулюють перехід до квітування та формування квітки, були вивчені у *A. thaliana* (Chen et al., 2018).

В останні роки застосовуються системні підходи для отримання повного уявлення про генетичні регуляторні мережі, що лежать в основі формування квітки (O'Maileidigh at al., 2014).

В нашій роботі ми вивчаємо активність транскрипційних факторів на різних стадіях передачі флорального сигналу, від активації генів циркадного годинника подовженням світлового дня, до етапу детермінації апікальної меристеми по флоральному типу для формування органів квітки (Рис. 1.3.1).

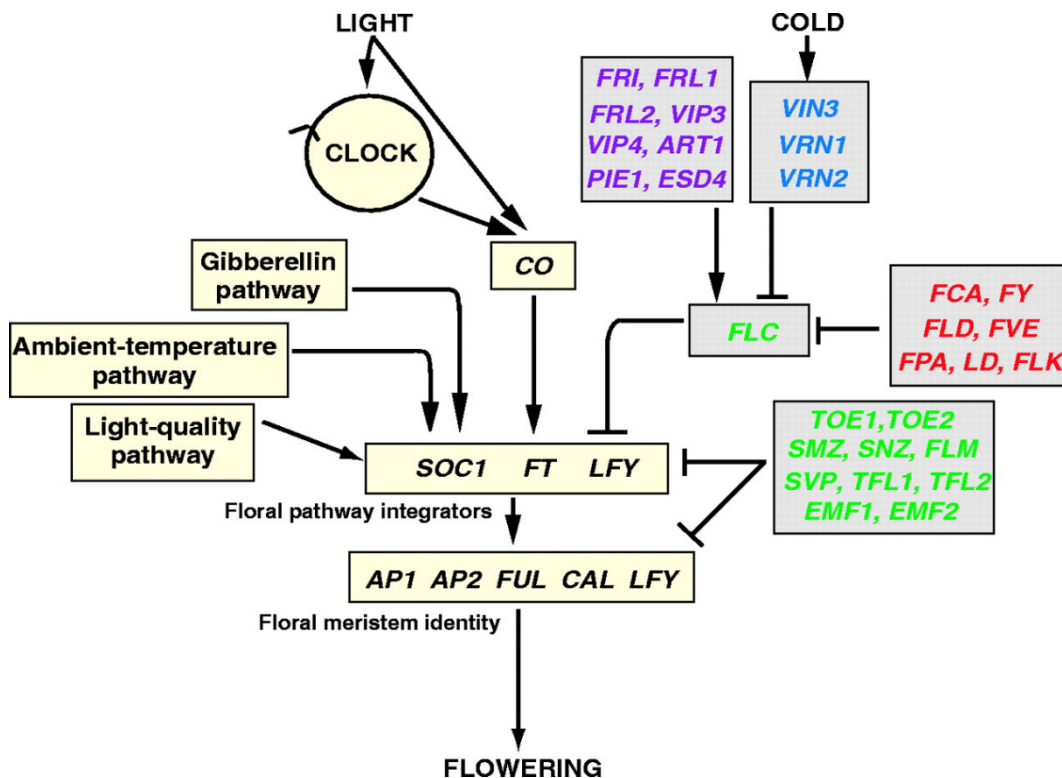


Рис.1.3.1. Схема шляхів детермінації цвітіння у *A. thaliana* (Henderson, Dean, 2004).

Основою для вивчення радіобіологічної відповіді з боку механізмів регуляції цвітіння ми взяли фотоперіодичний шлях розвитку цвітіння, як основний для рослин виду *A. thaliana*. Основним регуляторним фактором навколишнього середовища є дія довжини світлового дня, що активує гени циркадних годинників. В наступному розділі більш детально розглянуто

процес передачі флорального сигналу від ТФ циркадних годинників до диференціації флоральної меристеми.

Головним індуктором переходу до генеративного розвитку є фотоперіодизм, що впливає на циркадні ритми більшості рослин (Song et al. 2015). Так, вирізняють рослини короткого та рослини довгого світлового дня. Арабідопсис відносять до другої групи, так як його квітнення асоційоване з збільшенням тривалості світлового дня (Parenicova, 2003). Використання модельної рослини *A. thaliana*, значно покращило розуміння молекулярних механізмів, які визначають, як рослини інтегрують і використовують фотоперіодичну інформацію для координації реакції цвітіння (Shim et al. 2017; Song et al. 2018). У арабідопсиса цей механізм характеризується активацією транскрипції гена *FLOWERING LOCUS T (FT)* транскрипційним фактором *CONSTANS (CO)* в умовах довгих днів. Потім білок FT переміщується з листя до верхівки пагона, де розпочинається розвиток флоральної меристеми (Golembeski et al. 2014). В активації гену *CO* важливе значення мають фоторецептори та циркадний годинник (Shim et al. 2017).

За даними авторів, регуляція активності *CO* відбувається в клітках-супутниках флоєми в листках (Shim et al., 2017). Відомо, що для активації фотоперіодичного механізму детермінації цвітіння, ключовим є специфічний циркадний механізм у судинній тканині. Вірогідно, ТФ *CO* діє як мережевий центр для інтеграції різних зовнішніх і внутрішніх сигналів у фотоперіодичний механізм регуляції цвітіння. За своєю функцією, *CO* регулює кількість транскриптів *FLOWERING LOCUS T (FT)*, а білок FT який є флоральним фактором, переміщується від супутніх клітин листової флори до апікальної меристеми (Song et al. 2015). Також нещодавно було визначено транспортний білок, який допомагає переміщувати білок FT на від листа до апікальної меристеми (Shim et al., 2017).

На даний час визначено, що специфічна індукція гена *FT*, який кодує флоральний фактор, є головним кінцевим результатом фотоперіодичного шляху (Song et al. 2015).

В цілому, фотоперіодичні механізми регуляції цвітіння можна розділити на три частини: сприйняття світла специфічними рецепторами, активація механізмів циркадного годинника та активація ТФ, що передають сигнал до вступу рослини у репродуктивну фазу. Інформація про світло інтегрована у вроджені фотоперіодичні механізми синхронізації, керовані циркадним годинником, щоб індукувати гени, що викликають цвітіння. Під час цвітіння в арабідопсисі світло сприймається різними фоторецепторами, такими як фітохром червоного / далеко-червоного світла, фітохром (phy), і два класи фоторецепторів синього світла, криптохром та ZTL, KELCH REPEAT, F-BOX1 (FKF1) /LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2) сімейства білків. Фотоперіодична інформація в кінцевому підсумку перетворюється на рівні стенограми гена *FT* (Song et al., 2015). *FT* - це флориген, оскільки він синтезується в листках протягом довгих днів і транспортується до апікальної меристеми зйомки, щоб почати оркеструючу експресію декількох генів, що визначають флору, такі як *APETALA1* та *LEAFY* (Abe et al., 2005; Golembeski and Imaizumi, 2015), *FT* в основному індукується активатором транскрипції CO (Song et al., 2015). Тому механізм, керований генами циркадного годинника є ключовим механізмом детермінації цвітіння арабідопсису.

Правильний термін проведення переходу до квітування має вирішальне значення для репродуктивного успіху, що впливає на ранній розвиток потомства. Серед різних факторів навколишнього середовища, що впливають на час цвітіння, найважливішою є зміна тривалості дня, тобто фотоперіод. Арабідопсис, оскільки він цвіте переважно навесні, може реагує на подовження світлових днів, що викликає цвітіння, та є підходящою моделлю для вивчення фотоперіодичної регуляції цвітіння (Shim et al., 2017).

Серед інших генів регуляції цвітіння у *A. thaliana*, *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) відіграє ключову роль у термінах початку цвітіння. *FLC* зв'язує і пригнічує два гени, які сприяють цвітінню, *FT* і *SOC1*. На даний час, *FLC* пов'язується з багатьма іншими генами, що вказує на те, що він має регуляторну роль у детермінації часу цвітіння. Дослідники ідентифікували 505 сайтів зв'язування *FLC*, переважно розташованих у промоторних областях генів. Гени, що визначені як мішені *FLC*, беруть участь у шляхах розвитку рослин, багато з яких пов'язані з репродукцією. *FLC* також бере участь у вегетативному розвитку, затримуючи прогресування від юнацької до дорослої фази. Деякі гени-мішені *FLC* також пов'язані двома іншими білками MADS-box, *AP1* і *SEP3*, що дозволяє припустити, що гени MADS-box можуть діяти в мережі контролю на різних етапах життєвого циклу, в кінцевому рахунку сприяючи розвитку репродуктивна фаза рослини (Deng et al., 2011).

Власне перехід до дифференціації меристеми у *A. thaliana* регулюється групами генів, що називаються генами ідентичності флористичної меристеми, серед яких найбільш важливими є *LEAFY* (*LFY*) та *APETALA1* (*AP1*). Ці регуляторні гени були ідентифіковані у мутантів із сильними дефектами розвитку квітки. Втрата функції *LFY* призводить до часткового перетворення квіток на суцвіття пагонів (Weigel et al., 1992), тоді як мутантні рослини *ap1*, крім дефектів формування квіткових органів, мають вторинні квітки. Поєднання *lfy* з мутантами *ap1* мутантів призводить до різко посиленого фенотипу порівняно з кожним з окремих мутантів (Weigel et al., 1992), що дозволяє припустити, що ці регулятори виконують деякі надлишкові функції в контролі розвитку квіткових рослин. (O'Maileidigh et al. 2014).

Далі розглянемо взаємодію ТФ, що приймають участь у дифференціації апікальної меристеми по флоральному типу, детальніше схему зображено на Рис. 1.3.1.

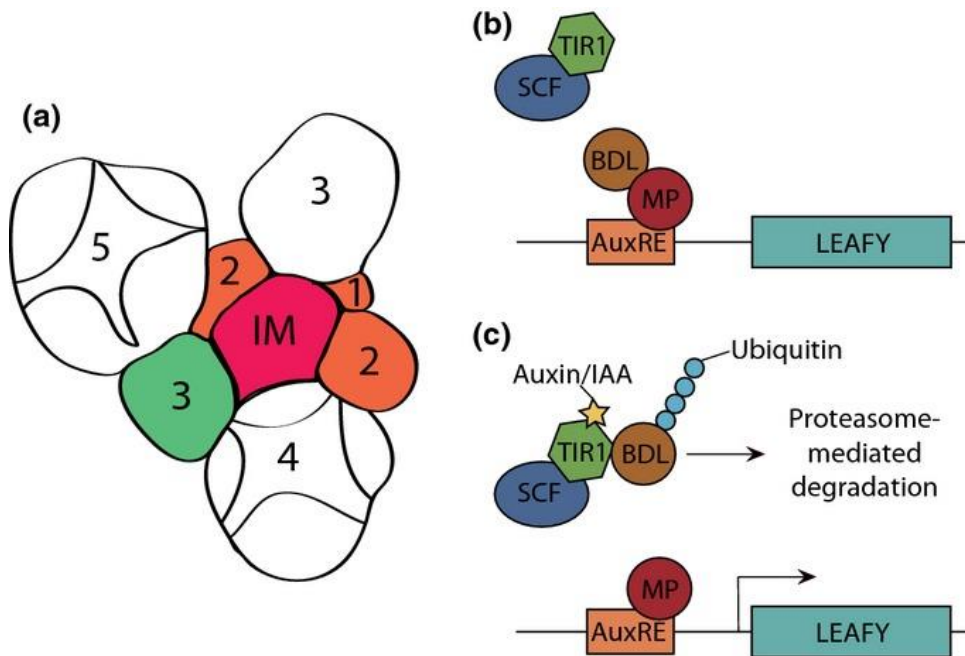


Рис. 1.3.1. Меристема суцвіття (IM) та флоральна меристема у *A. thaliana* (O'Maoileidigh et al. 2014).

(a) Після детермінації меристеми суцвіття (показаного рожевим кольором) на його боках утворюються квіткові меристеми. Помаранчеві флористичні меристеми являють собою флористичні стадії, на яких *LFY* та *AP1* виражаються, тоді як зелена флористична меристема позначає приблизну стадію, на якій активуються гени класу В і С. Цифри на квіткових меристемах вказують на приблизні флористичні стадії (Smyth et al., 1990). (b, c) Ауксинова сигналізація сприяє експресії *LFY*.

(b) За відсутності ауксину білок MONOPTEROS (MP) зв'язується BODENLOS (BDL), що запобігає транскрипційній активації *LFY*.

(c) У присутності ауксину BDL полібібіквітується завдяки взаємодії з комплексами Skp1 (S-фаза кінази) - комплексами Cullin-F-box (SCF), що містять рецептор ауксину, такий як TIR1. Це призводить до протеолітичної деградації BDL, що дозволяє транскрипційну активацію *LFY*, за допомогою MP. IAA - індол-3-оцтова кислота; AuxRE - елемент відгуку на ауксин (O'Maoileidigh et al. 2014).

Ортологи *LFY* зустрічаються на всіх наземних рослинах і мають важливе значення для розмноження покритонасінних. Ці гени також були залучені до репродуктивного розвитку в голонасінних. *LFY* кодує специфічний для рослини фактор транскрипції, який може діяти або як активатор, або репресор, залежно від контексту, включаючи ко-фактори, з якими він взаємодіє. Він контролює численні аспекти квіткового морфогенезу, включаючи філотаксис, номер органу, ідентичність органів та визначальність. Значний прогрес досягнуто в з'ясуванні молекулярних механізмів, завдяки яким *LFY* та його ортологи сприяють точному переходу до цвітіння. Ми обговорюємо сучасний стан знань в арабідопсисі, роблячи акцент на відомих генах та ко-факторах *LFY* (Siriwardana, Lamb, 2012).

Екологічні сигнали, такі як температура, фотоперіод та доступність поживних речовин, а також ендогенні сигнали (Paul et al., 2008; Wahl et al., 2013) впливають на терміни переходу до репродукції, що призводить до перетворення верхівкової меристеми рослини в меристему суцвіття і згодом до утворення квіток (Srikanth & Schmid, 2011; Andres & Coupland, 2012). Генетичні ланцюги, які інтегрують ці різні сигнали, в кінцевому рахунку зближуються, щоб активувати експресію невеликої групи генів ідентичності так званих флористичних меристем або квіткових примордіїв, які виникають з областей флоральної меристеми, де накопичується фітогормон ауксин.

Ідентичність різних видів квіткових органів визначається факторами транскрипції MADS, які взаємодіють комбінаторно (Bowman et al., 2012, Pelaz et al., 2001). Після успішної диференціації флоральної меристеми, починається процес формування органів квітки. Взаємодію ТФ, що визначають спрямування розвитку органів квітки з меристеми дослідники визначили як ABC-модель. Модель ABC вже давно є парадигмою генетики флористичного розвитку, але вона базується на філогенетичних даних (Mach, 2012). Синергетичні дослідження, що включають філогенетику,

класичні дослідження розвитку, геноміку та генетику розвитку, дали цінні нові уявлення про квіткову еволюцію взагалі та про ранню квітку зокрема. (Soltis et al., 2007).

Хоча ABC-модель було відкрито та вивчено на модельному об'єкті *A. thaliana*, подальші дослідження показали, що за таким принципом відбувається формування органів квітки також у інших видів рослин (Kanno et al. 2012).

Відповідно, органи квітки визначаються комбінаторною дією конкретних ТФ: так, А-регулятори задають формування зовнішньої оболонки чашолистків, комплексна дія А плюс В стимулюють розвиток пелюсток. Фактори А і С взаємовиключні; В плюс С вказують на формування тичинки, а С та D визначають формування органів маточки (Mach, 2012). Клонування ключових регуляторів ABC (D) виявило, що вони кодують фактори транскрипції; наприклад, регулятори арабідопсису В, С і D кодують фактори транскрипції коробки MADS (Kanno et al. 2012).

За дії ТФ ABC-моделі відбувається формування органів квітки з апікальної меристеми, що у випадку порушення диференціації меристемальних клітин призводить до аномального розвитку. В дослідженнях попередніх авторів показано, що зменшення активності генів групи А та В може викликати розвиток листя, замість пелюсток чи чашолистків (Petaz et al. 2001) та інших аномалій. Саме тому, коректна диференціація клітин флоральної меристеми є одним з ключових факторів розвитку квітки та подальшого процесу запилення.

Систематична ідентифікація ДНК-зв'язуючих сайтів та цільових генів цих ключових регуляторів показує, що вони мають спільні та унікальні набори цільових генів. Зв'язування ДНК білками MADS не ґрунтується на простому розпізнаванні певної послідовності ДНК, а залежить від структури ДНК та комбінаторних взаємодій. Гомеотичні білки MADS регулюють експресію генів за допомогою альтернативних механізмів, одним з яких

може бути модуляція структури хроматину та доступності їхніх цільових генів-промоторів (Yan et al. 2016)

1.4. Дослідження впливу іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на цвітіння рослин

Рослини відчують зміни світла та температури для регулювання часу цвітіння. При занадто ранньому цвітінні, рослина не має можливості для накопичення достатньої кількості поживних речовин, необхідних для розвитку квітки та насінини. Затримка у цвітіння призводить до браку часу для дозрівання насіння до початку холодного періоду року. Тому вивчення формування врожайності рослин під впливом стрес-факторів є важливим та перспективним напрямом.

Як ми вказували раніше, сигнали навколишнього середовища, такі як освітленість, температура, зволоження та наявність нутрієнтів мають вирішальну роль в детермінації часу цвітіння. Ці сигнали сприймаються особливими метаболічними шляхами, які дають сигнал меристемі починати розвиток по генеративному типу (Seiler, Soll i Bölter 2017, Valentim et al. 2015)

Попередньо було встановлено, що радіаційне та ультрафіолетове випромінювання викликає у рослин зміни часу цвітіння та порушення розвитку органів квітки (Mattson, Erwin, 2005). Проте, механізми відповіді генеративної системи рослини на радіацію до кінця не встановлені. В нашій роботі, для вивчення впливу іонізуючої радіації на цвітіння, досліджували гени циркадного годинника *CO* та *GI* (Kovalchuk et al, 2007; Hwang et al, 2016), ген флорального фактору *FT*, що залучений в каскадну реакцію передачі сигналу та ген детермінації апікальної меристеми по генеративному типу *AP1*.

Гени *CO*, *GI* та *FT* активуються в судинній тканині листка. Білок *FT* активує гени комплексу *MADS-box* транскрипційних факторів, що є

важливими регуляторами розвитку квітки. Ген *AP1* стимулює диференціацію флоральної меристеми (Parencicova, 2003).

Отримані результати свідчать про те, що квітучі рослини, такі як *A. thaliana*, можуть бути використані як біодозиметр, а подальші дослідження можуть бути проведені на конкретних ділянках, таких як мікроскопічний аналіз внутрішньої структури рослини з метою оцінки впливу іонізуючого випромінювання для практичного застосування. (Kurimoto et al. 2010).

Ранні етапи розвитку рослин та створення розсади особливо чутливі до біологічно ефективного УФ-В-випромінювання, включаючи метаболічні обмеження або пошкодження ДНК, коли відповідні заходи захисту ще не розроблені повністю. Зокрема, у відповідь на високу інтенсивність ультрафіолетового випромінювання спостерігали зниження біомаси розсади, пригнічене розвиток гіпокотілу чи коренів та порушення росту (наприклад, кривизна стрілянини). Крім того, види відрізняються своєю чутливістю до УФ-випромінювання. Musil (1995), наприклад, описав більш високу стійкість до УФ-В для однодольних, ніж для дводольних. Дослідження гальмування проростання, спричиненого УФ-В, були надані декількома дослідженнями на сьогодні. Існують також чіткі докази між- та внутрішньовидових відмінностей в ультрафіолетовій чутливості рослин. Однак чутливість до УФ-В інвазивних видів та наслідки для встановлення та поширення популяцій вивчаються рідко. Наприклад, ультрафіолетове випромінювання спричиняло зменшення підземної біомаси та пригнічене вегетативне розмноження *H. pilosella* individuals, а також значні зміни в морфології листків (Hock, 2015).

Як один з механізмів регуляції роботи генів є регуляція на транскрипційному рівні за допомогою мікроРНК, які беруть участь у процесах росту рослин, реакціях на стрес, розвиток генеративної системи та насіння (Jin et al. 2019).

Як вже було зазначено, опромінення УФ-В викликає ряд модифікацій росту та розвитку рослин, включаючи зміни часу цвітіння. В своїх

експериментах дослідники показали, що УФ-В опромінення викликає затримку часу цвітіння у арабідопсису. Також було визначено модифікацію експресії декількох генів часу цвітіння. Є припущення, що УФ опромінення рослин стимулює активність генів вікового механізму детермінації цвітіння, які в кінцевому рахунку викликають затримку часу квітування (Dotto et al., 2018).

В попередніх дослідженнях показано авторами показано, що УФ-випромінювання викликає зміни у морфогенезі органів квітки, зміну кольору пелюсток у рослин *Torenia fournieri* та *Torenia baillonii* (Sawangmee et al. 2011).

Вплив пролонгованого хронічного та одноразового гострого опромінення цікава дослідникам з 2 половини ХХ століття. Вже тоді було показано, що вплив рентгенівськими променями викликає виникнення білих та рожевих плям на пелюстках за розкриття квітів у гетерозиготних *Antirrhinum majus*. За дії хронічного опромінення частота мутаційних плям поверталася до спонтанного рівня приблизно через шість тижнів. Однак, дослідники спостерігали появу мутантних секторів на рослинах через кілька місяців після впливу гострої та хронічної радіації, що свідчить про індукцію стійких генетичних змін (Cuany et al. 1958).

За даними спостережень під час дослідів у Чорнобильській зоні відчуження, дослідники відмічали зниження фертильності у рослин, які зростали на радіаційно-забруднених територіях (Rashydov et al. 2012). Також були виявлені аномалії у фенології рослин, наприклад появу другого піку квітування, який був відсутній у рослин контрольної групи.

За дії хронічного низькоінтенсивного опромінення після аварії на ЧАЕС спостерігали появу у рослин радіоморфозів, в тому числі репродуктивних органів, послабленням апікального домінування та іншими аномаліями, які впливають стійкість рослин як до ІВ опромінення, так і до інших стресових навантажень (Гудков, Кудяшева, 2018).

Дослідження, проведені на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії, в лабораторних умовах вказують на зменшення фертильності та репродуктивної ефективності рослин.

Всі ці спостереження вказують на вплив рідкоіонізуючого опромінення на генеративні функції рослин. Проте механізми дії ІВ та УФ-випромінювання на шляхи детермінації цвітіння не є до кінця зрозумілими та потребують більш детальних досліджень. В даній роботі розглядаються аспекти впливу рідкоіонізуючого випромінювання на експресію ключових генів цвітіння рослин методами молекулярно-генетичного аналізу. Дослідження активності генів фотоперіодичного шляху цвітіння дають змогу охарактеризувати вплив випромінювання на процес генеративну функцію у рослин. Цвітіння є одним з найбільш радіочутливих процесів у рослин та важливим для репродуктивного успіху, особливо в умовах радіаційного забруднення. Тому вивчення радіобіологічної відповіді генетичного механізму регуляції цвітіння має важливе значення як для фундаментального розуміння проблеми, так і для агротехнічної практики.

1.5. Вплив іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на процеси репарації та проліферації клітин

В сучасних наукових статтях вчені також вказують на те, що хоча на сьогодні накопичено та опрацьовано велику кількість даних про вплив ІВ на ріст та розмноження рослин, щодо безпосереднього впливу на ДНК, все одно існують “білі плями” у вивчення біохімічних, фізіологічних та молекулярних процесів за дії опромінення ІВ та УФ, в тому числі під час репродуктивного розвитку. А, власне, реалізація генетичної інформації та молекулярні механізми є основою формування органів рослин, їх розвитку та розмноження (Gudkov et al. 2019). Вивчення дії ІВ на експресію генів рослин дає змогу зрозуміти, як саме відбувається перехід до реалізації генетичної інформації, особливо в регуляції процесів життєдіяльності, розвитку та розмноження рослин.

Паралельно з вивченням активності генів регуляції цвітіння, ми включили в дослідження гени, що є маркерами процесів репарації та проліферації клітин. Ця інформація є важливою для оцінки впливу ІВ та УФ-С на організм рослин в цілому.

Вивчення проліферативної активності клітин використовується дослідниками в якості маркерів радіочутливості рослин. В роботі Герман, Долгової на базі Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, використовували оцінку рівнів проліферативної активності клітин кореневої меристеми проростків різних сортів тритикале для оцінки радіостійкості рослин за дії опромінення ІВ (Герман, Долгова, 2014). Також дослідники показали, що частоти поділу клітин з такими цитогенетическими ушкодженнями, як хромосомні аберації і мікроядра, зменшується етапах росту, в порівнянні з неопроміненим контролем (Герман, Долгова, 2014). Проліферація також використовується у дослідженнях раку у тварин та людини, показано що ІВ індукує проліфераційну активність клітин, особливо в пухлинах (Schmidt-Ullrich et al. 1997). В дослідженнях клітин *in vitro* за дії ІВ авторами показано, що іонізуюче випромінювання активує кілька сигнальних шляхів всередині клітин, що може призвести або до збільшення рівня загибелі клітин або до збільшення проліферативної активності, що залежить від типу клітини та дози опромінення (Panyutin et al. 2017, Dent et al. 1999).

Зміни у проліферативній активності, особливо її стимуляція, матиме негативні наслідки для дифференціації апикальної меристеми по флоральному шляху та формування органів квітки. Через складність процесів утворення репродуктивних органів рослин та задіяння великої кількості регуляторних процесів, що більш детально описано у попередніх розділах, при надмірній проліферативній активності можливе виникнення помилок у детермінації флоральної меристеми.

В дослідженнях, описаних в роботі, в якості маркеру проліферативної активності ми використовували рівень експресії гену *PCNA*. *PCNA* (англ.

proliferating cell nuclear antigen, клітинний ядерний антиген проліферації) вперше був виявлений в ядрах клітин дріжджів, рослин та тварин, які знаходяться на стадії поділу. Функцією даного гену є регуляція клітинного циклу та реплікації ДНК. Також ген *PCNA* відіграє роль в процесах, що пов'язані з регуляцією клітин (Strzalka, Ziemienowicz, 2010).

Ген *PCNA* є еволюційно консервативним білком, що зустрічається у всіх еукаріотичних видів (Fukuda et al. 1995). Ген *PCNA* включений до регуляції активності ДНК-полімерази δ та є необхідним для реплікації ДНК (Schurtenberger et al. 1995), його функції пов'язані з іншими життєво важливими клітинними процесами, такими як реконструкція хроматину, репарація ДНК, регуляція клітинного циклу. Окрім того, авторами було показано, що рівень експресії гену *PCNA* пов'язаний з проліферацією або неопластичною трансформацією (Strzalka, Ziemienowicz, 2010). *PCNA* безпосередньо взаємодіє з різними білками, які беруть участь у регуляції клітинного циклу (Schurtenberger et al. 1995).

Крім проліферації, одним з найважливіших механізмів, задіяних у радіобіологічній відповіді є репарація ДНК. Порушення процесів репарації можуть призводити до зниження фертильності рослин, через наявність проблем у проходженні клітинами поділу (Rosa et al. 2013). Зниження активності репараційних процесів може призводити до порушень структури ДНК та, як наслідок, до виникнення хромосомних аномалій. Збільшення рівня генетичного вантажу, накопичених мутацій, які за дії ІВ також можуть бути викликані не коректною роботою репараційних систем, що негативно впливає на роботу генеративної системи рослин, може викликати порушення формування органів квітки та затримку у часі цвітіння. Тому для того, щоб забезпечити комплексний підхід до дослідження проблематики впливу ІВ та УФ на репродуктивну функцію рослин, ми включили у вивчення зміни експресії гену *RAD51*, що активно задіяний у клітинах живих організмів під час пострадіаційного відновлення для забезпечення

підтримки життєдіяльності рослин, нормалізації процесів росту та розвитку.

За даними досліджень авторів, у мутантів, дефективних за генами, що включені у репаративні процеси, спостерігали менші квітки, змінені пелюстки, укорочені пильовики, укорочені та потовщені стручки, зниження кількості насіння в стручках (Rosa et al. 2013).

На основі наведеної інформації можна зробити висновок, що вивчення змін експресії обраних нами генів цвітіння *CO*, *GI*, *FLC*, *FT*, *LFY* та *AP1*, а також ген проліфераційної активності *PCNA2* та репарації *RAD51*, дадуть змогу детально охарактеризувати вплив ІВ та УФ на молекулярні процеси регуляції цвітіння рослин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал і умови культивування

Для проведення досліджень в лабораторних умовах, розповсюдженим та зручним об'єктом є *A. thaliana* родини *Brassicaceae*. Арабідопсис має невеликий розмір генома ($1n = 5,135$ Mbp), короткий період циклу розвитку та зручний для культивування в лабораторних умовах. На даний час геном арабідопсису повністю відсеквеновано та він широко досліджується. Власне, на даний час досліджено більше 26,000 генів та велика кількість метаболічних шляхів. Близько 80 генів включено до шляхів регуляції цвітіння. Це робить арабідопсис ідеальним об'єктом для експериментального дослідження вивчення впливу стресових факторів молекулярно-генетичні механізми цвітіння рослин.

Для виконання досліджень, наведених у даній дисертаційній роботі використовували рослини дикого типу (ДТ), екотип Columbia 0, та рослини мутантної мутантної лінії *jin1* (*jasmonate insensitive*), екотип Columbia 0.

Мутанти *jin1* (*jasmonate insensitive 1*) проявляють чутливість до агентів окислнвого стресу метилвіологена за порівнянням з рослинами дикого типу . Показано, що гени *JIN1* та *MYC2* бере участь у регуляції експресії генів монодегідроаскорбатредуктази, ферменти синтезу аскорбата і цистеїна (Колупаев та ін. 2016).

В попередніх дослідженнях показано зниження толерантності до засолення у мутантів *jin1*, що обумовлена порушенням сигналізації жасмонату. Дослідники доводять, що відмінності в солестійкості рослин дикого типу та мутантів *jin1* зумовлені участю фактора транскрипції *JIN1/MYC2* в інших сигнальних шляхах (Yastreba et al. 2018).

Рослини культивувалися в стандартній ґрунтосуміші в умовах освітленості по типу довгого дня – 18 годин світла та 6 темряви при кімнатній температурі. Перед посадкою ґрунтосуміш стерилізували 3% розчином перманганату натрію продовж доби. Насіння стерилізували 12,5 розчином

гіпохлориту натрію та 70% етанолом. Для досліду використовувалося ~20 рослин з кожної групи. Експеримент проводиться в трикратній повторності, зразки були усереднені за допомогою створення пулів.

Частина досліджень проводили на рослинах, що вирощували не у відкритій ґрунтосуміші, а в живильному середовищі. Вказані рослини вирощували в різних умовах світла та температури. Експериментальні рослини культивували *in vitro* в чашках Петрі на субстраті MS-20 з насіння. Перед культивуванням, насіння стерилізували 25% розчином хлору та 70% етанолом.

2.2. Фенотипічна класифікація розвитку рослин *A. thaliana*

Фенотипічний аналіз проводили за класифікацією Боєса (2001). Автори створили методику для проведення фенологічного аналізу з високою пропускнуою здатністю на основі серії визначених стадій росту, які є як орієнтирами розвитку рослини, так і тригерами для збору морфологічних даних. Вказана класифікація широко використовується дослідниками у сфері молекулярної генетики та біології, особливо для вивчення стресових факторів. Дана рамкова методологія може бути використана для ідентифікації та інтерпретації фенотипічних відмінностей у рослин, що виникають внаслідок генетичних змін та/або екологічного стресу.

У роботі наведено наведено 30 стадій росту рослини, що охоплюють весь життєвий цикл рослини з проростання насіння, цвітіння та плодоношення, які застосовуються для проведення фенологічного аналізу (Рис. 2.2.1). Фенологічні таблиці також показують час, необхідний для рослини дикого типу Col-0, щоб досягти кожної стадії, за вирощування у стандартних екологічних умовах з використанням 16-годинної тривалості світлового дня (Boyes et al., 2001).

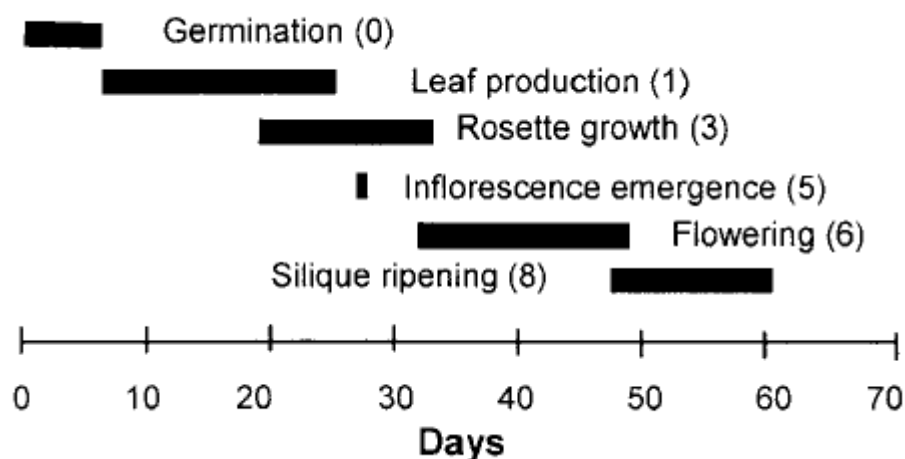


Рис. 2.2.1. Схема хронологічного прогресу основних етапів розвитку *A. thaliana* за даними Боеса та ін. (Boyes at al., 2001).

Серед дослідників, набір даних авторів вважається надійною репрезентацією розвитку *A. thaliana* дикого типу, з якою можна порівняти мутантні лінії та рослини, що піддаються екологічному впливу.

2.3. Характеристика освітлення рослин

Рослини були розділені на п'ять груп, що культивували у білому спектрі світла при температурі 24°C, червоному при 24°C, фіолетовому при 21°C і 24°C та оранжевому спектрах за температури 21°C. Для вирощування рослин застосовували червоне (довжина хвилі 610-750 нм), фіолетове (довжина хвилі 400-450 нм), нейтральне біле (змішані хвилі з довжиною 380-750 нм) освітлення з потужністю LED ламп 20 Вт та 40 Вт

2.4. Характеристика опромінення ІВ рослин

В якості стрес-фактора використовували гостре радіаційне опромінення в малих дозах (напівлетальна доза для *A.thaliana* LD50=150 Гр). Хронічне опромінення відбувається за рахунок радіації $^{137}\text{CsCl}$ з загальною дозою 3 та 17 сГр, інтенсивністю опромінення $6,8 \cdot 10^{-6}$ сГр/сек.

Рослини знаходилися в полі випромінювання з постійною інтенсивністю з фази насінини до фази цвітіння, впродовж 6 тижнів. Контрольна група рослин вирощувалася в ідентичних умовах за виключенням дії радіації.

При гострому режимі опромінення, рослини, віком 4 тижні на фазі розетки опромінювалися рентгенівськими променями з інтенсивністю випромінювання 89 сГр/сек. Загальна доза складала 5 Гр. Рослини з експериментальної групи опромінювали на стадії стрілки 5.0 (Boyes et al. 2001), на 21 день вегетації.

В якості стрес-фактора використовували гостре радіаційне опромінення в малих дозах (напівлетальна доза для проростків *A.thaliana* $LD_{50}=300$ Гр). Рослини з експериментальної групи опромінювали на стадії стрілки 5.0, на 21 день вегетації. Опромінення здійснювали рентгенівськими променями в загальній дозі 3, 6, 9 та 15 Гр за допомогою лінійного прискорювача з енергією фотона 6 MeV та потужністю 89 сГр/сек (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Для вивчення впливу радіації на активність ключових генів цвітіння ми обрали низькі дози рентгенівського опромінення, які не будуть приводити до тотального порушення систем життєдіяльності рослини. У виборі дози опромінення ми виходили з попередніх даних досліджень лабораторії (Litvinov, Rashydov, 2018).

2.5. Характеристика УФ-опромінення рослин

В ході експерименту з кожного з варіантів були виділені контрольна та дослідна групи рослин. Експериментальні групи були опромінені УФ-С впродовж 10 хв на відстані 10 см від джерела опромінення на фазі сформованої розетки 2.3 за класифікацією по Боєсу (2001). Опромінення проводили за допомогою УФ-С генератора з довжиною хвилі 254 нм з потужністю 30W. Рослини опромінювали впродовж 1, 2 та 5 хвилин на відстані 10 см від джерела опромінення.

2.6. Морфометрія та визначення часу цвітіння

Після опромінення, з інтервалом в 3 дні, проводили заміри показників росту рослин, такі як довжина стрілки, розмір листа та діаметр розетки.

В ході росту рослин фіксували фази розвитку. За час настання фази розвитку приймали вступ 30% рослин у відповідну фазу.

2.7. Екстракція загальної РНК

Для аналізу експресії генів цвітіння використовували метод полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. Визначення експресії генів визначається за допомогою вимірювання концентрації фрагменту матричної РНК досліджуваного гену у зразку. Для цього з тканини рослин виділяється тотальна РНК та проводиться реакція зворотної транскрипції. Ефективне виділення і очищення нуклеїнових кислот є важливою складовою для цілісних молекулярно-біологічних експериментів. Отримання недеградованої, очищеної від забруднень РНК - важливий вихідний етап, успішне виконання якого визначає можливості подальшого аналізу.

Через тиждень після опромінення проводять екстракцію РНК для аналізу відмінностей у експресії генів при різних в контрольних та експериментальних групах. Екстракція РНК проводилась за допомогою набору *QIAGEN RNeasy Plant mini kit* (Німеччина).

Процедура RNeasy являє собою добре встановлену технологію очищення РНК.

Технологія виділення РНК на мембрані на основі кремнезему має селективне зв'язування. У наборі використовується високосольова буферна система, що дозволяє до 100 мкг РНК довше 200 баз зв'язуватися з кремнієвою оболонкою RNeasy.

Біологічні зразки спочатку лизують і гомогенізують у присутності денатуруючого гуанідино-тіоціанат-буфера, що інактивує РНКазу для забезпечення виділення інтактною РНК. Додають етанол для

зв'язування, і зразок потім наносять на колонку RNeasy Mini, де загальна РНК зв'язується з мембраною, через яку вимивають забруднювачі за допомогою буферів для відмивання РНК. РНК потім елюють у 30–100 мкл води.

За допомогою процедури RNeasy виділяються всі молекули РНК довжиною понад 200 нуклеотидів. Процедура забезпечує збагачення мРНК, оскільки більшість РНК, що <200 нуклеотидів (таких як 5.8S рРНК, 5S рРНК і тРНК, які разом складають 15-20% від загальної РНК) вибірково виключаються.

Наступним кроком ми провели синтез кДНК за допомогою *ThermoFisher Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (США). Для проведення ПЛР-аналізу необхідно провести синтез ДНК на матриці РНК. Відповідно, в результаті реакції ми отримуємо ДНК, яка містить послідовність матричної РНК. Реакцію зворотної транскрипції проводили згідно протоколу виробника, для проведення реакції було використано 1 мкг РНК.

В експерименті по вивченню впливу УФ-опромінення на рослини, для екстракції РНК використовували класичний фенол-хлороформний метод (Буй та ін. 2016). Екстракцію РНК для аналізу відмінностей у експресії генів при різних умовах освітлення та температури культивування в контрольних та експериментальних групах проводили на стадії стрілкування та початку цвітіння 5.1 (Boyes, 2001).

Для виділення РНК фенол-хлороформним методом, 100 мг рослинної тканини гомогенізували в рідкому азоті. Після гомогенізації інкубовані при кімнатній температурі в присутності хлороформу, потім проводили преципітацію ізопропанолом. Розшарування рідин проводили центрифугуванням на високих обертах 10000 G. Після підсушування осаду РНК проводили елюцію.

Вимірювання концентрації РНК і оцінку чистоти виділення проводили методом спектрометрії.

2.8. Молекулярно-генетичний аналіз

Метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) базується на детекції специфічної ділянки гену та накопичення її в ході реакції ампліфікації. В основі методу ПЛР лежить процес реплікації ДНК, який включає три етапи: денатурація, розплітання подвійної спіралі і розбіжність ниток; утворення коротких дволанцюжкових ділянок ДНК, які служать затравки для синтезу нових ланцюгів та третій етап - подовження обох ланцюгів, в результаті компліментарного добудовування в напрямку від 5' до 3' кінця молекули ДНК (Лопатина, 2016).

Серед ПЛР методик найбільш сучасною є технологія детекції нуклеїнових кислот шляхом використання інтеркалюючих барвників (Сверстюк та ін, 2014). Використання флуоресцентних барвників дозволяє камері приладу відслідковувати накопичення рівня сигналу. Методика ПЛР в реальному часі дає можливість отримання інформації про наявність, кількість і можливі зміни в послідовності нуклеїнових кислот безпосередньо під час реакції, що істотно спрощує, вкорочує і здешевлює ПЛР-аналіз. Кількісний аналіз за допомогою ПЛР в реальному часі, відрізняє рекордно низький коефіцієнт варіації і найбільш широкий лінійний діапазон, що дозволяє розглядати даний метод (серед будь-яких альтернативних) в якості пріоритетного методу визначення концентрації нуклеїнових кислот в досліджуваних пробах (Алексеев и др. 2006).

В ході реакції ДНК зразків змішуються з реакційною сумішшю, до складу якої входять штучно синтезовані олігонуклеотиди - праймери, які комплементарні ділянці ДНК аналізованого зразка та забезпечують специфічність реакції; Tag ДНК-полімераза - термостабільний фермент, що забезпечує добудовування 3'-кінця другого ланцюга ДНК, для ПЛР в реальному часі використовують сучасну полімеразу "гарячого старту", яка активується при 95° та допомагає уникнути не специфічної реакції між праймерами; суміш дезоксинуклеотидтрифосфатов для синтезу

комплементарної ділянки ланцюга ДНК; інтеркалюючий барвник або специфічні зонди - для аналізу експресії генів найчастіше використовується флуоресцентний барвник SYBR Green; ПЛР-буфер - суміш катіонів та аніонів, що забезпечують оптимальні умови для реакції (Алексеев и др. 2006, Сверстюк та ін. 2014).

Для ПЛР в реальному часі використовуються одноразові поліпропіленові пробірки з герметичними кришками з оптично прозорого пластику чи ПЛР-планшети, таким чином, знижується ризик контамінації. Пробірки встановлюються в термостат - ампліфікатор, який працює в циклічному температурному режимі (Рис. 2.8.1., 2.8.2.).



Рис. 2.8.1. Прилад для ПЛР в реальному часі, що було використано в дослідженнях, виробництва компанії Analitik Jena (Німеччина).



Рис. 2.8.2. Прилад Light Cycler Nano для ПЛР в реальному часі, що було використано в дослідженнях, виробництва компанії Hoffmann-La Roche (Швейцарія).

При нагріванні пробірок до 95°C молекули аналізованих зразків ДНК розплітаються з утворенням двох одноланцюгових молекул. Праймери приєднуються до одноцепочечної ДНК-мішені і обмежують шуканий фрагмент. При температурі близько 55-60°C ДНК праймери утворюють

водневї зв'язки з матрицею зразка, за наступного кроку температура змінюється до 72°C та в цей час полімераза добудовує другий ланцюжок ДНК з 3' кінця праймера (Лопатина, 2016). При кожному циклі ампліфікації синтезовані раніше фрагменти знову копіюються ДНК полімерази. При цьому відбувається експоненціальне збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК. Концентрація вихідних специфічних фрагментів ДНК збільшується приблизно як 2^N , де N - кількість циклів (Алексеев и др. 2006). Програма ампліфікація залежить від властивостей праймерів та мети дослідження та може відрізнятися в залежності від дослідження.

У даному експерименті ми визначити відносну експресію генів *AP1*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY*, *RAD51*, *PCNA2* та *UBQ10* методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції. Для виконання аналізу використовували праймери для генів *AP1*, *GI*, *FT*, *CO*, *FLC*, *LFY*, послідовність яких взято з літератури. Праймери для генів *RAD51*, *PCNA2* та *UBQ10* були розроблені за допомогою онлайн ресурсів NCBI Primer BLAST (Табл. 2.8.1).

Табл. 2.8.1 Праймери для ПЛР в реальному часі, що використовували для аналізу експресії ключових генів цвітіння *A. thaliana*

Ген	Прямий праймер	Зворотній праймер	Джерело
<i>AP1</i>	AGGGAAAAAATTCTTAG GGCTCAACAG	GCGGCGAAGCAGCCA AGGTTGCAGTTG	Riboni et al. 2013
<i>CO</i>	TGGCTCCTCAGGGACTCA CTACAA	TTGACTCCGGCACAAC ACCAGT	Czechowski et al. 2004
<i>FLC</i>	TTCAACTGGAGGAACACC TTGA	CATGAGTTCGGTCTTC TTGGC	Czechowski et al. 2004
<i>FT</i>	CTAGCAACCCTCACCTCC GAGAATA	CTGCCAAGCTGTGCGAA ACAATATAA	Riboni et al. 2013
<i>GI</i>	AATTCAGCACGCGCCTAT TG	GTTGCTTCTGCTGCAG GAACTT	Riboni et al. 2013

<i>LFY</i>	AAATGCCCCACCAAGGT GACGAAC	ACTCGCTCCTGATTTCT TCGCGTA	Czechowski et al. 2004
<i>RAD</i> 51	TGGAGCAGCGTAGAAAC CAG	AGCTGTTCGACAGGGA AAGG	Genbank accession #NM_113188
<i>PCN</i> A2	TTCGACTGTTCGACCACA GG	AAAGAGACACCAACG CGACA	Genbank accession #NM_128510
<i>UB</i> Q10	CACACTCCACTTGGTCTT GCGT	TGGTCTTTCCGGTGAG AGTCTTCA	Genbank accession #NM_001084 884

В якості референсного гену використовували ген актину *ACT2* та *UBQ10* (Volkov R.A. et al, 2003). Для проведення ПЛР використовували кДНК в розведенні 1:10, праймери в розведенні 1:100, флуорофори SYBR Green (Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix).

Для проведення ампліфікації використовували стандартну програму для визначення експресії генів *Arabidopsis thaliana* (Табл. 2.8.2). Для ампліфікації використовували триступеневу програму ампліфікації з температурою відпалу 55°C, детекцію проводили по каналу детектування флуоресцентного сигналу Green.

Табл. 2.8.2. Програма ампліфікації приладу Bioline quant 55.

	T, °C	Час, сек	Кількість циклів
Циклювання 1	95	90	1
Циклювання 2	95	20	

	55	20	38 з детекцією флуоресцентного сигналу
	72	40	
Циклювання 3	72	4 хв	1
	45	60	
	55	60	
Циклювання 4	55	10	1

Довжина ПЛР продукту кДНК гену *AP 1* становить 242 п.н., *GI* - 75 п.н., *LFY* - 60 п.н., *FT* - 160 п.н., *CO* - 325 п.н., *RAD51* - 82 п.н., *PCNA2* - 70 п.н., *ACT 2* - 71 п.н.

Ефективність ПЛР оцінювали за показником *Ct value* - кількість циклів при якому відбувається перетин підняття кривої рівня флуоресценції рівня порогового значення (Рис. 2.8.3). Порогове значення флуоресцентного рівня складало 0,03. Аналіз кожного зразка проводили у трьох технічних повторях.

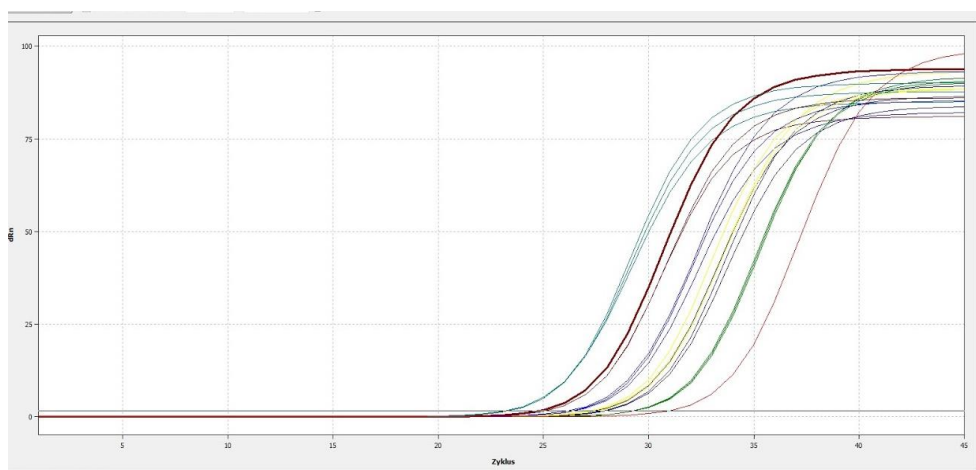


Рис. 2.8.3. Крива флуоресцентного сигналу під час ПЛР аналізу в реальному часі.

Відтворюваність та якість проведення реакцій перевіряли за допомогою аналізу кривих плавлення, представлених на Рис. 2.8.4. За успішного перебігу реакції криві мають утворювати одноманітні піки, розмір яких може різнитися в залежності від концентрації досліджуваного фрагмента.

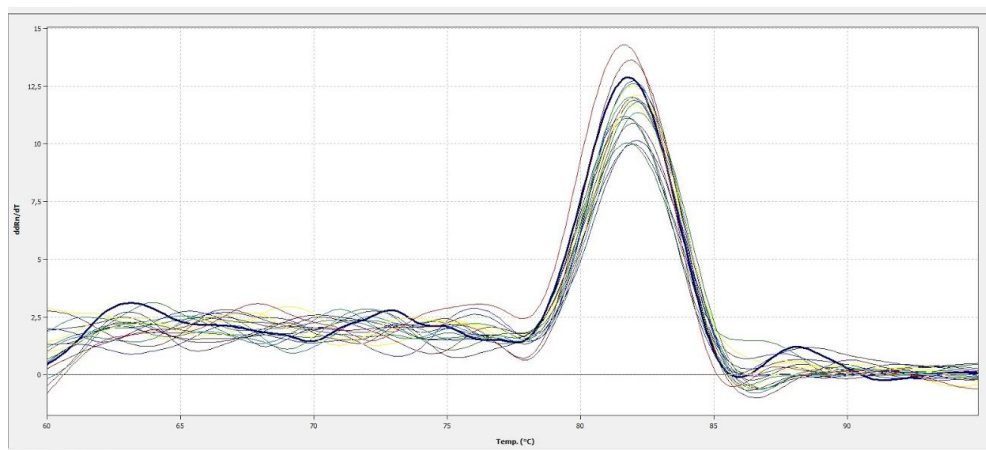


Рис. 2.8.4. Дані флуоресцентного сигналу отримані під час ПЛР аналізу в реальному часі.

Для кожного з праймерів була побудована стандартна крива для визначення коефіцієнта ефективності праймера. Для побудови стандартної кривої проводили ПЛР п'яти розведень зразку: зразок без розведення, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. З метою контролю відсутності контамінації на кожен праймер ставили негативний контрольний зразок, до складу якого входила реакційна суміш та буфер для елюції.

2.9. Статистична обробка даних та розрахунок відносної експресії досліджуваних генів

Статистичну обробку даних вегетативних показників проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA (Algina J, Olejnik S. 2003). Дисперсійний аналіз дає можливість порівняти різницю між показниками між групами та різноманіття в групі. На основі цієї різниці ми

робимо заключення чи є достовірна значуща відмінність між контрольними та дослідними групами рослин.

Для порівняння двох груп - контрольної та дослідної за показниками довжини листа та квітоноса, використовували t-критерій Стюдента.

Статистичну обробку даних кількісної ПЛР методом побудови стандартної кривої та визначення відносної активності генів з подвійною нормалізацією по референсному гену *ACT2*, *UBQ10* та контрольним зразкам проводили за допомогою програми REST 2009 (Pfaffl et al. 2002).

Програмне забезпечення REST 2009 є автономним інструментом для аналізу даних експресії генів з кількісних експериментів ПЛР у реальному часі. Аналіз або кількісне визначення відносної експресії генів використовує експресію референсних генів для нормалізації рівнів експресії досліджуваних генів в різних зразках. Цей метод дозволяє коригувати кількісні дані ПЛР, наприклад, для компенсації варіацій, обумовлених відмінностями завантаження зразків (REST 2009 Software User Guide).

Відносну експресію визначали за середнім фактором експресії, який розраховувався для кожного досліджуваного гену. Стандартний алгоритм REST 2009 розраховує ефективність з використанням нахилу стандартної кривої наступним чином:

$$E = 10^{-1/\text{нахил}} - 1$$

Нормалізація за референсним геном

При оцінці коефіцієнта експресії вибірки, проміжне значення абсолютної концентрації обчислюється з використанням наступної формули:

$$\text{Концентрація} = \text{ефективність}^{\text{середня } CP(\text{контроль}) - \text{середня } CP(\text{зразок})}$$

При використанні одного референсного гена, рівень експресії обчислюють, використовуючи концентрації досліджуваного гену і єдиного референсного гену.

При використанні кількох референсних генів, для розрахунку відносної експресії окремих генів можна використовувати середнє

геометричне значення всіх концентрацій референсних генів, оскільки оцінки концентрації змінюються експоненціально.

Для забезпечення 95% довірчих інтервалів для визначення співвідношень експресії, використовували методики завантаження “bootstrapping” без припущення щодо нормальності або симетричного розподілу. Хоча перевірка гіпотези дає міру того, чи є результат статистично значущим, довірчий інтервал надає діапазон, який можна перевірити на семантичне значення.

Для визначення, чи існує значна різниця між дослідними та контрольними зразками, при цьому беруться до уваги питання ефективності реакції та нормалізації нормативного гена використовували дослідження гіпотез. Оскільки розрахунки нормалізації та ефективності включають співвідношення та множинні джерела помилок, було б надзвичайно важко розробити традиційний статистичний тест, тому застосовуються методи рандомізації.

Випробування гіпотези P (H_1), зазначене в таблиці результатів, представляє ймовірність альтернативної гіпотези про те, що різниця між експериментальною та контрольною групами обумовлена лише випадковою. Щоб розробити сильний тест для рандомізації, ми використовуємо наступний сценарій рандомізації: «якщо будь-яке сприйняте зміна між зразками та контролем обумовлено лише випадковим, то ми можемо випадково поміняти значення між 2 групами і не бачити більшої різниці, ніж різниця між первинними групами. »

Тест гіпотези виконує 10 000 випадкових перерозподілів вибірок і елементів управління між групами, і підраховує кількість разів, коли відносне вираження для випадково призначеної групи більше, ніж вибіркові дані.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЦВІТІННЯ РОСЛИН

3.1. Вплив малих доз рентгенівського опромінення на експресію генів фотоперіодичного механізму

Ефект дії малих доз ІВ на даний час ще потребує детальних досліджень, особливо у частині молекулярно-генетичних досліджень. Відомо, що ефекти мішені за дії високих доз радіації викликають істотні пошкодження ДНК та інших макромолекул в клітинах рослин, що часто призводить до загибелі організму чи популяції. Відповідно, рослини з найбільш пошкодженим геномом елімінуються з популяції, що виключає можливість передачі в наступних поколіннях вантажу мутацій та пошкоджень ДНК. Елімінація радіочутливих видів є одним з механізмів відповіді екосистем на гостре опромінення ІВ, що спостерігали під час аварії на ЧАЕС (Гродзинський та ін., 2012).

Дія малих доз не викликає настільки видимих наслідків, тому тривалий час ця тема залишалася поза увагою дослідників. Хоча, ефекти малих доз ІВ можуть як раз накопичуватися у популяції та мати пролонговану дію, передаватися у вигляді генетичних пошкоджень з покоління у покоління. Дія сублетальних доз зазвичай супроводжується підвищенням активності репараційних процесів, що викликає мутації в геномі рослин (McCormick, Platt, 1962). Через те, що рівень мутагенезу зазвичай не такий критичний, ніж у випадку дії великих доз ІВ, то елімінації організмів з популяції не відбувається, що призводить до передачі мутацій з покоління в покоління. Дана гіпотеза також підтверджується роботами дослідників (Кравець та ін. 2011,). Наприклад, показано, що при дослідженні виникнення хромосомних аберацій проростків гороху, виявлено що пороговим для виживання рівнем ушкодження апікальної меристеми кореня є 44-48% аберацій, проте, перевищення рівня у 50% пошкоджень хромосом призводить до активації механізмів апоптозу (Кравець та ін. 2011). Тенденція до збільшення рівня

хромосомних аберацій також спостерігається і в дослідженнях на лімфоцитах людини, що дає розуміння універсальності дії ІВ на клітини рослин та тварин (Шмакова та ін., 2003). Також в своїх дослідженнях, Шмакова та ін. показують явище гіперчутливості ліній клітин до дії малих доз ІВ, що вказує на актуальність вивчення впливу сублетальних доз ІВ на молекулярно-генетичному рівні, що є більш інформативним, ніж вивчення фенотипічних проявів та побудови кривих виживання.

На сьогодні дана проблема вивчається методами системної біології, кткими як протеомний аналіз (Danchenko et al. 2009), та попередні дослідження авторів вказують на наявність радіоадаптації рослин, що вирощували на радіоконтомінованих територіях ЧАЕС.

За даними спостережень дослідників, за дії сублетальних доз радіації виявлено зниження фертильності організмів, в тому числі як рослин (Klubicová et al. 2012) та тварин, так і людини (Дергилев и др. 2012).

В даному розділі ми наводимо дані експериментів, в яких вивчали вплив сублетальних доз на експресію генів фотоперіодичного шляху детермінації цвітіння *A. thaliana*. Як відомо, арабідопсис є рослиною довгого дня та фотоперіодичний шлях є основним (Murai, 2013). Крім того, на час цвітіння можуть впливати й інші механізми регуляції цвітіння, такі як автономний та верналізаційний шляхи.

Як ми вже вказували в попередніх розділах, в діапазоні малих доз радіобіологічні ефекти мають стохастичний характер, що викликаний не прямим поглинанням енергії квантів та, внаслідок цього, ушкодженням молекулам ДНК та клітинних органел, а активацією чи навпаки пригніченням роботи біомолекул клітин. Наслідки дії ІВ в малих дозах можуть проявлятися в незначній мірі на більш високих рівнях організації: фенотип, репродукція та популяції (Boratyński et al. 2016, Real et al, 2004).

Для дослідження Схему взаємодії досліджуваних генів у каскадній реакції детермінації цвітіння надано на Рис. 3.1.2.

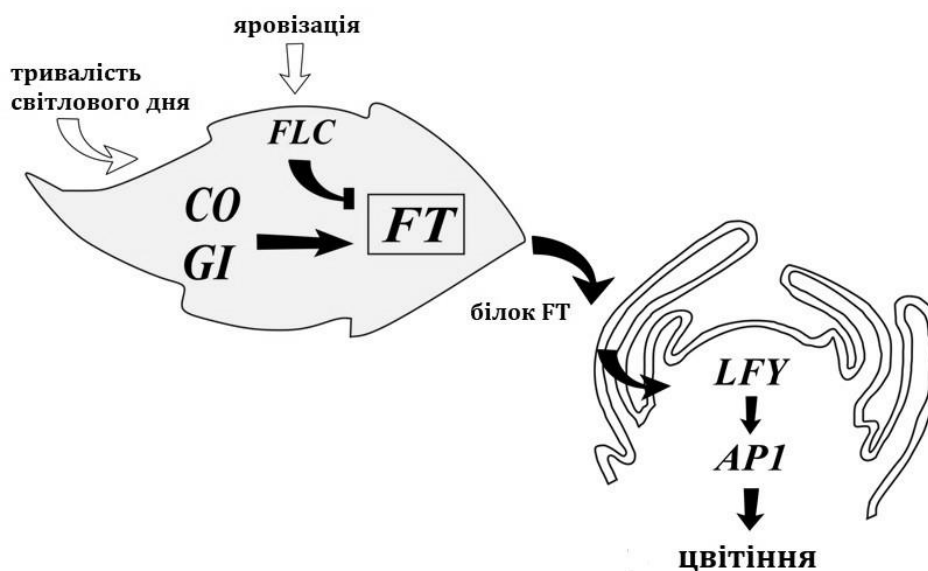


Рис. 3.1.1. Схема взаємодії досліджуваних генів цвітіння у *A. thaliana*

За опромінення рослин в дозах з 3 до 15 Гр, ми не спостерігали статистично значущих відмінностей у ростових показниках. Дані, раніше отримані в попередніх експериментах показали що опромінення рослин в дозах значно менше ніж LD_{50} викликає стимулювання активності генів. Опромінення в дозі 3 Гр стимулює активність генів цвітіння в незначній мірі. Доза 6 Гр викликає різке підвищення рівня експресії всіх генів цвітіння. За подальшого підвищення дози до 9 та 15 Гр загальний профіль експресії зменшується. Результати наших досліджень вкладаються в концепцію ієрархічності формування ієрархічної відповіді та даними літературних джерел, що підтверджують тенденцію, що за сублетальних доз опромінення ефекти слабо проявляються на рівні фенотипу, проте їх можна відстежити за допомогою молекулярно-генетичних, біохімічних та фізіологічних досліджень.

За опромінення у дозі 3 Гр, експресія генів циркадного ритму *CO* та *GI* збільшується до 1,621 (інтервал 95% С.І. 1.284 - 2.000, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,033$) та 1,735 (інтервал 95% С.І. 1.563 - 1.984, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,026$) відповідно з середнім фактором експресії. Дані наведено у Табл. 3.1.1.

Табл. 3.1.1. Зміна експресії генів цвітіння *A. thaliana* під дією гострого опромінення за дози 3 Гр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% С.І.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	1.621	1.398 - 1.919	1.284 - 2.000	0,033	↑*
<i>GI</i>	1.735	1.608 - 1.912	1.563 - 1.984	0,026	↑*
<i>AP1</i>	2.148	1.820 - 2.589	1.659 - 2.744	0	↑*
<i>FT</i>	2.659	2.523 - 2.804	2.514 - 2.809	0	↑*
<i>ACT2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

За збільшення дози опромінення до 6 Гр у дослідних рослин спостерігали істотне збільшення рівня експресії гену *CO* відповідно середнього фактору експресії 15,51 (інтервал 95% С.І. 11,487 - 21,416; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0,013$) та гену *GI* відповідно середнього фактору експресії 9.85 (інтервал 95% С.І. 7,078 - 14,515; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0,02$) (Табл. 3.1.2).

Табл. 3.1.2. Зміна експресії генів цвітіння *A. thaliana* під дією гострого опромінення за дози 6 Гр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% С.І.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	15.511	12.504 - 20.550	11.487 - 21.416	0,013	↑*
<i>GI</i>	9.85	7.664 - 12.825	7.078 - 14.515	0,02	↑*
<i>AP1</i>	63.921	56.734 - 75.263	49.217 - 76.963	0	↑*
<i>FT</i>	5.113	3.887 - 6.984	3.668 - 7.390	0	↑*
<i>ACT2</i> **	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

За дози опромінення до 9 та 15 Гр спостерігали зниження відносної активності генів циркадного годинника (Табл. 3.1.3-3.1.4). За опромінення у дозі 9 Гр відносний рівень експресії гену *CO* становить 7,409 (інтервал 95% С.І. 5,787 - 8,776; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0,0$), відносний рівень експресії гену *GI* становить 4.404 (інтервал 95% С.І. 3,743 - 5,643; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0,016$).

Табл. 3.1.3. Зміна експресії генів цвітіння *A. thaliana* під дією гострого опромінення за дози 9 Гр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% С.І.	P(H1)	Тренд
-----	-----------	--------------	----------	-------	-------

<i>CO</i>	7.409	6.299 - 8.553	5.787 - 8.776	0	↑*
<i>GI</i>	4.404	3.798 - 4.986	3.743 - 5.643	0.016	↑*
<i>AP1</i>	14.206	12.68 - 17.068	10.66 - 17.485	0	↑*
<i>FT</i>	4.849	4.278 - 5.404	4.037 - 5.492	0	↑*
<i>ACT2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

За опромінення у дозі 15 Гр відносний рівень експресії гену *CO* становить 0.987 (інтервал 95% С.І. 0,879 - 1,097; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0.797$), відносний рівень експресії гену *GI* становить 1,002 (інтервал 95% С.І. 0,846 - 1,146; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H1)=0.96$), що становить на рівні значення контрольної групи (Табл. 3.1.4).

Табл. 3.1.4. Зміна експресії генів цвітіння *A. thaliana* під дією гострого опромінення за дози 15 Гр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% С.І.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	0.987	0.879 - 1.097	0.807 - 1.183	0.797	
<i>GI</i>	1.002	0.846 - 1.146	0.773 - 1.221	0.96	

<i>LFY</i>	1.339	0.955 - 1.944	0.933 - 2.385	0.185	
<i>FLC</i>	1.145	0.599 - 1.890	0.407 - 2.201	0.678	
<i>AP1</i>	0.104	0.086 - 0.129	0.074 - 0.144	0	↓*
<i>RAD51</i>	0.93	0.404 - 1.999	0.303 - 2.251	0.832	
<i>FT</i>	2.905	0.987 - 15.840	0.941 - 23.129	0.369	
<i>PCNA2</i>	0.346	0.269 - 0.423	0.238 - 0.488	0	↓*
<i>UBQ10**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Для флорального фактору *FT* за опромінення у дозі 3 Гр спостерігали незначне стимулювання активності відповідно середнього фактору експресії 2,659 (інтервал 95% С.І. 1,659 - 2,744; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). Для гену детермінації меристеми по флоральному типу *AP1*, за опромінення в дозі 3 Гр спостерігали рівень відносної експресії 2,15 (інтервал 95% С.І. 1,66 - 2,74; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$).

На графічному зображенні (Рис. 3.1.2) ми можемо порівняти рівні експресії досліджуваних генів проростків, що було опромінено за дози у 3 Гр.

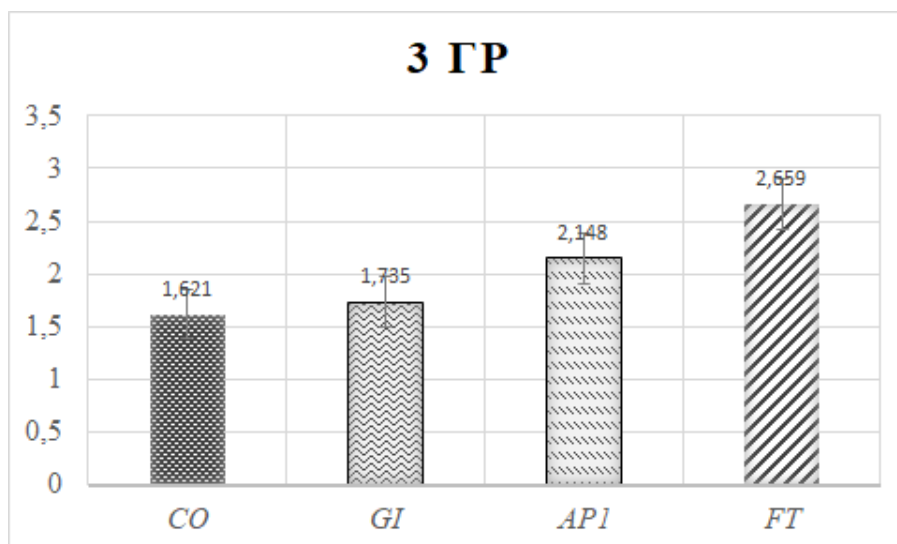


Рис. 3.1.2. Тренд змін експресії генів цвітіння *A. thaliana* за дії гострого опромінення у дозі 3 Гр, порівняно з референсним геном.

За опромінення у дозі 3 Гр ми спостерігаємо, що найбільший рівень експресії було визначено для гену *FT*, а найменший для гену циркадного годинника *CO*. Хоча всі гени стимулюють свою активність порівняно з контролем та референсним геном, проте в дослідженні виявлено різницю між різними генами ТФ, що знаходяться на різних ланках сигнального шляху детермінації цвітіння.

За дії опромінення у дозі 6 Гр, рівень експресії гену *FT* становить 5,113 (інтервал 95% С.І. 3,668 - 7,390; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). Для гену детермінації меристеми по флоральному типу *AP1*, за опромінення в дозі 6 Гр рівень експресії складає 63,92 (інтервал 95% С.І. 54,22 - 70,96; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$).

На Рис. 3.1.3. продемонстровано, що тренди експресії генів фотоперіодичного шляху змінюються, якщо порівняти з профілями експресії досліджуваних генів за дії гострого опромінення у дозі 3 Гр. За дози 6 Гр, найбільший рівень експресії виявлено у гену диференціації флоральної меристеми *AP1*.

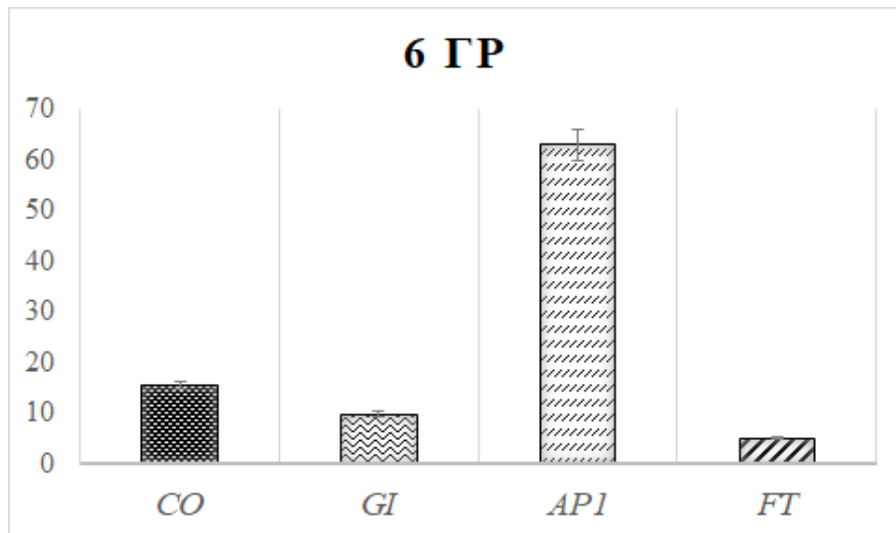


Рис. 3.1.3. Тренд змін експресії генів цвітіння *A. thaliana* порівняно з референсним геном, за дії гострого опромінення у дозі 6 Гр.

Така тенденція може бути показником реакції з боку меристеми, а експресія гену *FT* навпаки, має найнижчий рівень, порівняно з трендами за опромінення у дозі 3 Гр. Відмінності у тенденціях змін експресії генів цвітіння при збільшенні дози опромінення вказує на залучення різних рівнів фотоперіодичного шляху регуляції цвітіння.

За підвищення дози опромінення до 9 Гр активність гену *FT* становила 4,849 (інтервал 95% С.І. 4,037 - 5,492; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). Для гену детермінації меристеми по флоральному типу *AP1*, за опромінення в дозі 9 Гр спостерігали рівень відносної експресії 14,21 (інтервал 95% С.І. 10,67 - 17,49, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). Тенденцію впливу іонізуючого випромінювання на рослини наведено на Рис. 3.1.4.

Окрім збільшення рівня експресії гену *AP1*, значне збільшення активності демонструє ген циркадного годинника *CO* (Рис. 3.1.4.).

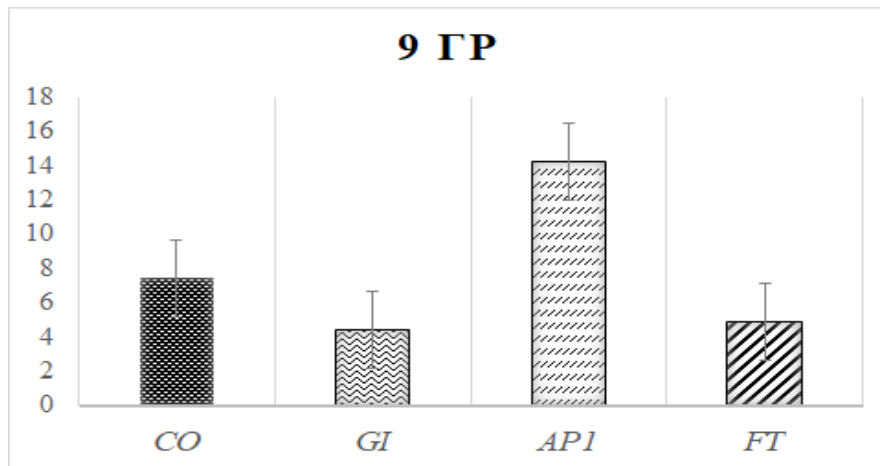


Рис. 3.1.4. Тренд змін експресії генів цвітіння *A. thaliana* за дії гострого опромінення у дозі 9 Гр.

За підвищення загальної дози гострого опромінення загальний тренд зберігає схожість з трендом змін експресії генів фотоперіодичного шляху, що спостерігали за опромінення у дозі 9 Гр.

За опромінення у дозі 15 Гр активність гену *FT* становила 2,905 (інтервал 95% С.І. 0,269 - 0,423; критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). За збільшення дози до 15 Гр спостерігали різке падіння активності гену детермінації меристеми *AP1* до 0,10 (0,09 - 0,13).

Підвищення загальної дози опромінення до 15 Гр навпаки, викликало пригнічення активності майже всіх генів цвітіння, окрім *FT*. По досліджуваним показникам прослідковується нелінійна залежність дії малих доз на експресію генів цвітіння, що характеризується підвищенням експресії генів детермінації цвітіння за дози 6 та 9 Гр, та пригніченням за дози у 15 Гр.

Дане явище ілюструє прояв стохастичних ефектів дії ІВ у сублетальних дозах (Рис. 3.1.5).

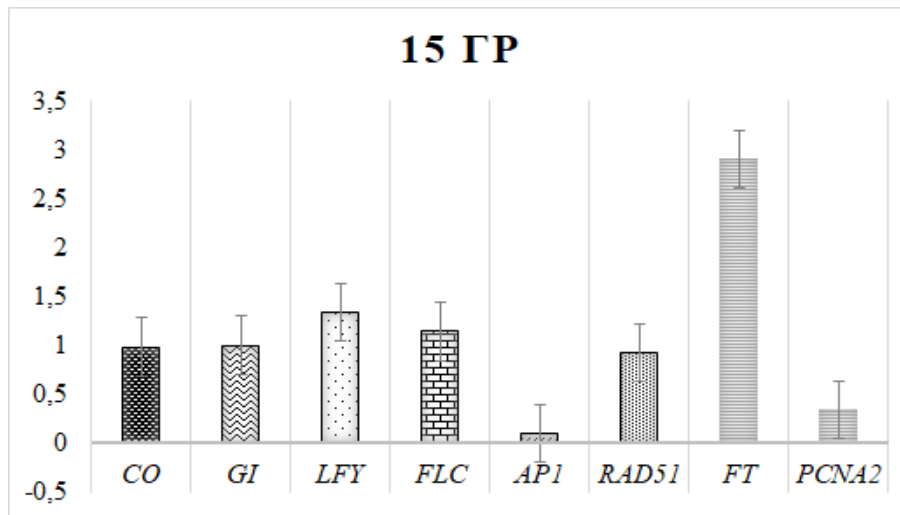


Рис. 3.1.5. Тренд змін експресії генів цвітіння *A. thaliana* за дії гострого опромінення у дозі 15 Гр.

Недавні дослідження авторів демонструють що високі дози гострого опромінення (100 Гр та вище) викликають затримку в цвітінні рослин та змінюють експресію ключових генів цвітіння. Вони показали що активність генів асоційованих з фотосистемами II та I, системами передачі сигналів та транскрипційними факторами чутлива до гострого опромінення під час репродуктивної фази розвитку рослин. Гени цвітіння також знижують свою активність за опромінення сухого насіння у дозі 800 Гр.

Отримані результати проведеного дослідження демонструють що малі дози опромінення мають стимулюючий ефект на експресію досліджуваних генів цвітіння. Проте, деякі гени можуть бути більш чутливі ніж інші. Для гену *AP1* показано різке підвищення активності за опромінення у дозі 6 Гр. Дане явище можна пояснити тим, що клітини меристеми, в яких проходять активні процеси поділу та росту є найбільш чутливими до дії радіації. Гени пов'язані з циркадним годинником чутливі до дії стресових факторів. За нашим припущенням, це пов'язано з тим, що вони знаходяться на початку ланцюга транскрипційних факторів передачі трансмісивного флорального сигналу.

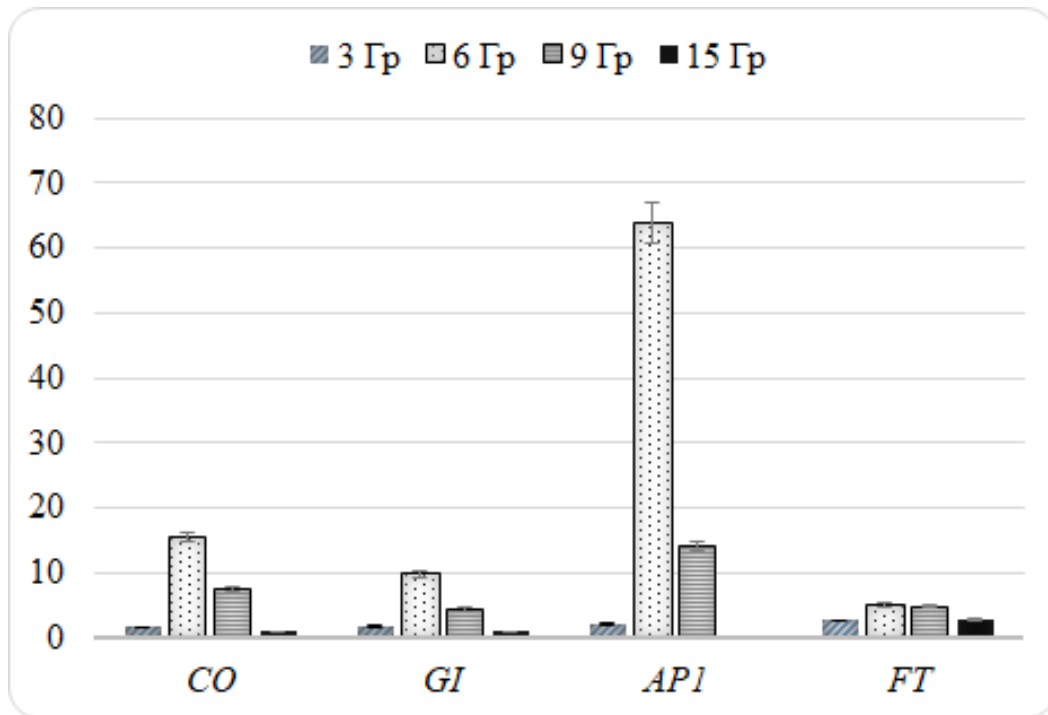


Рис. 3.1.5. Порівняння *CO*, *GI*, *AP1* та *FT* генів цвітіння у *A.thaliana* під дією рентгенівського опромінення в дозах 3, 6, 9 та 15 Гр.

Гени *CO* та *FT* включені в фотоперіодичний механізм активації цвітіння, що передає циркадний сигнал. Так як *A. thaliana* є рослиною довгого дня, то перехід від вегетативного до генеративного типу розвитку рослини відбувається під час отримання сигналу про подовження світлового дня. Чутливість генів фотоперіодичного механізму є підтвердженням впливу низьких доз радіації на цвітіння рослин.

Як відомо, вплив стресових факторів, таких як низькі температури, нітратний стрес, зневоднення чи недостатність нутрієнтів, має стимулюючий ефект на цвітіння рослин. З рис. 3.1.3. зрозуміло, що ген *FT* стимулюється завсіх доз, що підтверджує вищевказану гіпотезу.

В попередніх дослідженнях ми виявили, що хронічне опромінення в малих дозах (3 сГр) має стимулюючий ефект на гени цвітіння рослин. В даному дослідженні ми показали, що малі дози гострого опромінення також мають стимулюючий ефект на гени фотоперіодичного механізму. Проте опромінення в вищій дозі (15 Гр) призводить до зниження активності генів

цвітіння, що також було показано в попередніх дослідженнях. Одноразовий гострий вплив стресового фактора на рослини має схожий ефект з хронічним впливом, але інтенсивність дії чинника може відрізняти в 100 разів. Дані наведені у розділі 3.3, що описує вплив хронічного опромінення на активність генів цвітіння.

Як відомо, дія малих доз опромінення переважає стохастична дія на геном, порівняно з мішенном ефектом за напівлетальних дозах, тому крива доза-ефект має нелінійний характер. Подібна нелінійність кривої доза-ефект за малих дозах радіації також було показано для генів репарації. Тому ефект опромінення на гени цвітіння рослин в низьких дозах вірогідно викликаний задіянням сигнальних систем. 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. В даному дослідженні ми виявили, що опромінення рослин малими дозами рентгенівським опроміненням, а власне в дозі до 10 Гр викликає ефект підвищення активності генів цвітіння.

На нашу думку, вищесказане може бути пов'язано з включенням різних механізмів відповіді сигнальних систем на стресові фактори, які можуть відрізнятися залежно від інтенсивності та пролонгованості їх дії. Дані наших досліджень показують, малі дози, що одноразовий гострий вплив стресового фактора на рослини має схожий ефект з хронічним впливом радіації, але інтенсивність останньої дії чинника може відрізняти в 100 разів.

Окрім дослідження генів цвітіння, було проведено також аналіз хімічного складу листя *A. thaliana*, який показав відмінності у експериментальних та контрольних зразках (Літвінов та інші. 2018).

Аналізуючи літературні дані ми також виявили, що Kurimoto та інші (2010) також вивчали вплив рентгенівського випромінювання на *A. thaliana*, генерованого лінійного прискорювача з потужністю 6 MeV у дозах 0,5 Гр, 5

Гр, 50 Гр і 150 Гр. Опромінення відбувалося у одноразовому та фракціонованому режимах однієї із трьох різних життєвих стадій, у віці 15 днів, 20 днів і 25 днів. Автори використовували для оцінки як фізіологічної та фізичної дії ІВ вимірювання активності фотосинтезу та частоти дихання, флуоресценцію хлорофілу (співвідношення f_v/f_m та вихід), висоту рослини, загальну площу листя, стовбурову масу, листову масу та надземну біомасу. Результати досліджень авторів продемонстрували, що важливу роль в інтеграції радіаційних ефектів відіграє вік проростків на момент опромінення, та наявність більших відмінностей у опромінених рослин *A. thaliana* порівняно з контрольними групами у зростанні та розвитку рослин, порівняно з внутрішніми фізіологічними реакціями. Автори зазначають, що саме рослини під час цвітіння можуть бути використані як біодозиметр (Kurimoto et al. 2010).

В наших дослідженнях ми також показали чутливість факторів, що впливають на репродуктивну систему рослин до дії ІВ. Відповідно ми маємо аналогію з попередніми дослідженнями впливу ІВ на фенологію рослин, що свідчить про коректність використаного підходу, та доповнює тему дослідженнями молекулярно-генетичних процесів.

Узагальнюючи сказане, зазначимо, що одноразове іонізуюче випромінювання за сублетальних доз має стимулюючий ефект на більшість генів фотоперіодичного шляху цвітіння у арабідопсиса. За опромінення у дозі від 3 до 15 Гр було виявлено нелінійну залежність дії фактору на активність генів цвітіння. У дозі 15 Гр активність більшості генів знижувалася. Необхідно відмітити, що ген *API*, який пов'язаний з диференціацією клітин апікальної меристеми по флоральному типу, значно стимулювався за дози у 6 Гр. Ми вважаємо, що занадто висока активність даного гена може викликати помилки при диференціації клітин меристеми та призводити до порушення розвитку органів квітки.

При дослідженні особливостей радіаційної стимуляції необхідно враховувати неоднакову радіочутливість біологічних організмів та окремих

тканин. Дози опромінення, що пригнічують процеси клітинного поділу, ще не здійснюють безпосереднього помітного впливу на такі фізіологічні процеси, як фотосинтез, дихання, накопичення мінеральних сполук тощо. Проте пошкодження Стимуляція росту і формоутворення в рослин під впливом опромінення в сублетальних дозах може зумовлюватися процесами, пов'язаними з ушкодженнями клітин апікальних меристем, ослабленням апікального домінування, що супроводжується розвитком додаткових пагонів. Ці явища є проявами компенсаторних ефектів, що спричиняються пошкодженнями окремих груп клітин. Стимулюючі дози знаходяться на межі пошкоджуючих, тобто є підпороговими, при них розвиваються субпошкодження на рівні спостережуваного параметра, а на нижчих рівнях організації відбувається значне ураження їх складових елементів. Стимуляція при опроміненні є результатом розвитку певних пошкоджень і наступної ініціації відновлювальних процесів компенсаторного, точніше гіперкомпенсаторного, характеру. (Гродзинський та ін., 2005).

3.2. Участь шляхів жасмонадного сигналінгу у регуляції генів цвітіння *A. thaliana* під дією іонізуючого опромінення

У даному розділі ми обговорюємо результати, отримані у дослідженнях дії рентгенівського опромінення на рослини ДТ та мутантну лінію з дефектом рецепторів жасмонатного сигналінгу. Вказані дослідження допоможуть виявити роль механізму сигналінгу жасмонової кислоти у регуляції генів цвітіння *A. thaliana* за дії ІВ.

Фітогормони грають регуляторну роль у процесах росту, розвитку та переходу між фенологічними фазами у рослин. Окрім того, вони мають відігравати важливу атаку в реакціях, що ростуть на діючих внутрішніх і зовнішніх факторів. Серед усіх гормонів, що регулюють процеси життєдіяльності та розвитку рослин, вчені виділяють так звані «гормони

стресу, до яких відносять абсцизову кислоту (АБК), етилен, brassinosteroids, саліцилати та жасмонати. Проте, на даний час залишається не до кінця зрозумілими складні шляхи їх взаємодії, то особливо участі у процесах розвитку рослин та, в особливості, вплив на репродуктивну функцію рослин. Це твердження є характерним також для жасмонатів - жасмонової кислоти, метилжасмоната, активних кон'югаторів ЖАК із ізолеїцином та іншими амінокислотами (Yastreb et al. 2018).

Вивчення впливу жасмонової кислоти на молекулярні процеси, пов'язані з цвітінням рослин є актуальним питанням для дослідників, особливо за дії абіотичних стресових факторів, якими є опромінення ІВ та УФ. Для вивчення цього питання, в дослідження ми взяли мутантну лінію рослин *jin1*, що є дефективною по чутливості до дії жасмонатів та, відповідно, можна виключити з переліку факторів участь сигналіngu жасмонової кислоти у формуванні радіобіологічної відповіді.

За даними проведених досліджень були виявлені відмінності у вегетативних показниках дослідних груп. Групи відрізнялися достовірно за показником довжини квітконоса (Рис.3.2.1). У рослин групі *jin1* при гострому опроміненні 5 Гр спостерігали істотне збільшення довжини квітконоса відносно контрольної групи, при хронічному опроміненні істотних змін не виявлено. При порівнянні груп рослин ДТ та мутантів виявлено що у рослин ДТ довжина квітконоса була більшою ніж у мутанта *jin1*.

Дані морфометричного аналізу показують, що жасмонатний сигналінг приймає участь у процесах росту та розвитку рослин за дії ІВ. Збільшення висоти квітконоса за дії стимулюючої дози ІВ у *jin1* свідчить про стабілізуючий ефект на ріст рослин. Надмірно активний ріст супроводжується інтенсивним поділом клітин та може призводити до збільшення мутацій та накопичення генетичного вантажу.

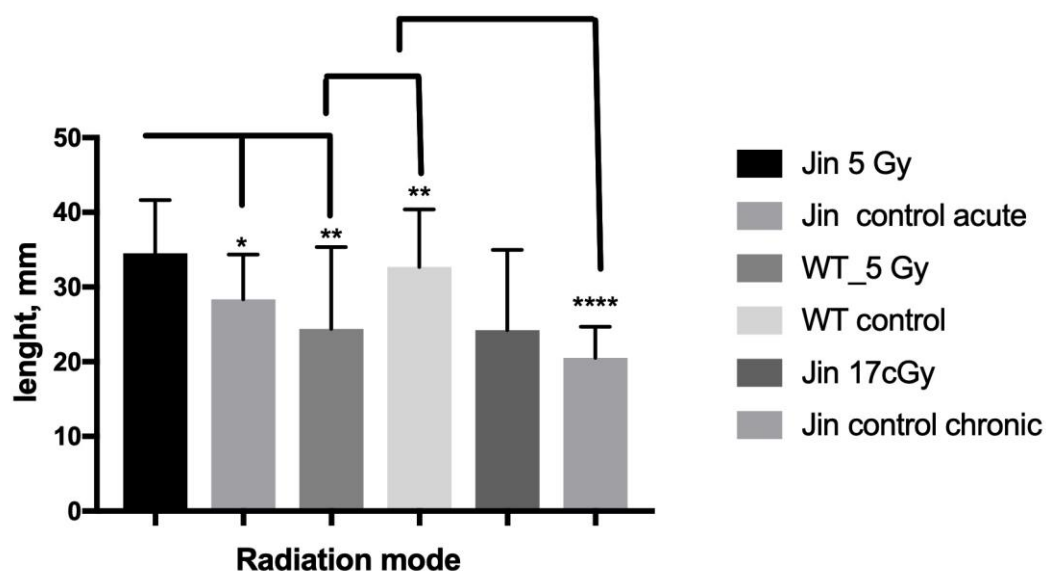


Рис. 3.2.1. Показники висоти квітконоса у групах рослин *A. thaliana*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Дані аналізу експресії генів цвітіння показали наявність різниці у профілях експресії генів у різних груп рослин та відмінності між контрольними та дослідними групами. Дані представлені у Табл. 3.2.1-3.2.3. Рослини мутантної лінії *jin1* відрізняються від рослин ДТ зниженою експресією генів: *CO* з середнім фактором 0,333, 95% C.I.=0,295 - 0,380, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$; *GI* з середнім фактором 0,42, 95% C.I.=0,393 - 0,441, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,021$; *AP1* з середнім фактором 0,235, 95% C.I.=0,212 - 0,263, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,021$ (Табл. 3.2.1).

Табл. 3.2.1. Відмінності експресії генів фотоперіодичного шляху детермінації цвітіння рослин мутантної лінії *jin* та ДТ *A. thaliana* екотипу

Col 0

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	0.333	0.311 - 0.369	0.295 - 0.380	0	↓*
<i>GI</i>	0.42	0.393 - 0.441	0.386 - 0.453	0.021	↓*
<i>AP1</i>	0.235	0.212 - 0.263	0.198 - 0.276	0.021	↓*

<i>FT</i>	0.802	0.734 - 0.857	0.719 - 0.920	0.061	↓
<i>Act2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Тренд змін експресії вказує на те, що у мутанта *jin1* експресія генів цвітіння *CO*, *GI*, *AP1* та *FT* зменшена, порівняно з контрольною групою та референсним геном, що продемонстровано на Рис. 3.2.2. Особливо, активність гену *AP1* істотно знижується до 0,3, порівняно з референсним значенням 1, найбільш близько до референсу знаходиться значення експресії гену *FT*, що є рівно 0,7.

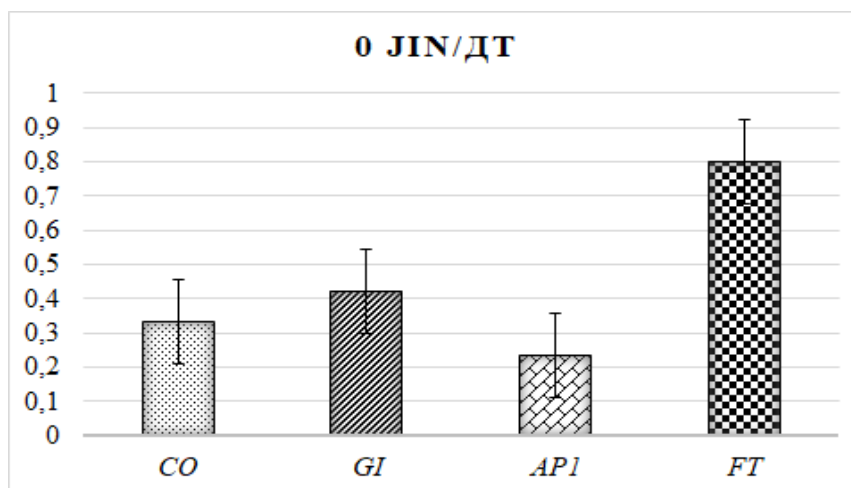


Рис. 3.2.2. Тренд експресія генів цвітіння рослин мутантної лінії *jin1* та WT *A. thaliana* екотипу Col 0 порівняно з референсним геном так контрольною групою.

За хронічного опромінення мутантів *jin1* спостерігати пониження рівня експресії порівняно з контролем у генів *CO* з середнім фактором 0,712, 95%

C.I.=0,550 - 0,905, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,012$; *GI* з середнім фактором 0,629, 95% C.I.=0,537 - 0,712, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,028$. При хронічному опроміненні в однаковій дозі рослин ДТ, спостерігали зменшення активності гену *AP1* з середнім значенням 0,872 (95% C.I.=0.803 - 0.940, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,028$). Детальніше дані наведено у Табл. 3.2.2.

Табл. 3.2.2. Результати експресії генів фотоперіодичного шляху цвітіння рослин *jin1 A. thaliana* за хронічного режиму опромінення у дозі 17 сГр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	0.712	0.620 - 0.855	0.550 - 0.905	0.012	↓*
<i>GI</i>	0.629	0.565 - 0.697	0.537 - 0.712	0.028	↓
<i>AP1</i>	1.768	1.301 - 2.144	1.231 - 2.246	0.074	↑*
<i>FT</i>	1.168	0.971 - 1.413	0.908 - 1.486	0.35	↑
<i>ACT2</i> **	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

На Рис. 3.2.3. продемонстровано, що у групи мутантних рослин, експресія генів циркадного годинника пригнічується, а експресія генів *FT* та *AP1* навпаки збільшується. Дане явище може свідчити про залучення інших шляхів регуляції цвітіння рослин, крім фотоперіодичного шляху, на що

вказує пригнічення генів циркадного годинника. При цьому, пригнічення генів детермінації флоральної меристеми та флорального фактору ми не спостерігаємо.

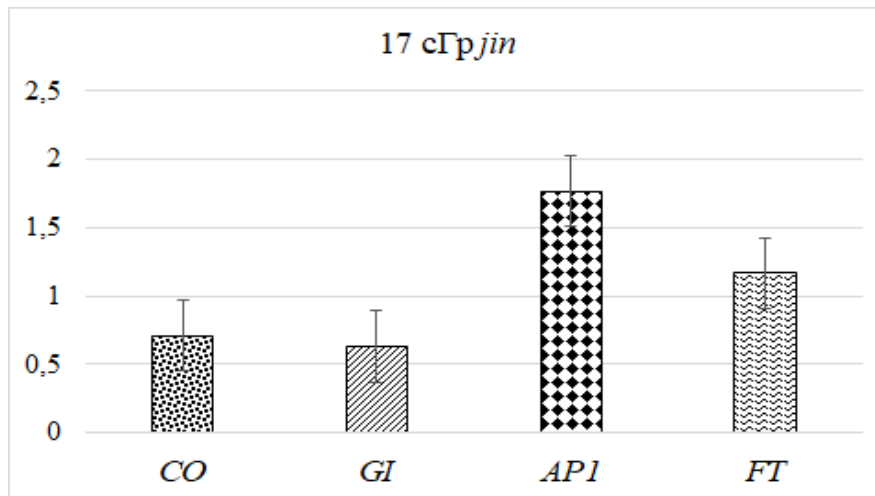


Рис. 3.2.3. Експресія генів фотоперіодичного шляху цвітіння рослин *jin1 A. thaliana* за хронічного режиму опромінення у дозі 17 сГр порівняно з референсним геном.

Для порівняння, у Табл. 3.2.3. наведено дані з активності генів фотоперіодичного шляху цвітіння рослин мутантної лінії ДТ за хронічного режиму опромінення у дозі 17сГр. Зі збільшенням дози ІВ ми спостерігали зміну у відповіді генів цвітіння, проліферації та репарації: від стимулювання, до, навпаки, пригнічення експресії. Дані молекулярно-генетичних досліджень узгоджуються з даними фенологічного аналізу. Якщо у меншій дозі, 3 сГр, ми спостерігали раннє цвітіння, порівняно з контрольною групою, то за дози 17 сГр було продемонстровано як пригнічення експресії генів, так і затримку у вступу рослин до репродуктивного процесу.

Табл. 3.2.3. Результати експресії генів цвітіння рослин мутантної *A. thaliana* лінії ДТ за хронічного режиму опромінення у дозі 17сГр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% С.І.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	0,906	0.576 - 1.321	0.531 - 1.462	0,582	
<i>GI</i>	0,969	0.854 - 1.100	0.772 - 1.190	0,718	
<i>AP1</i>	0,872	0.830 - 0.929	0.803 - 0.940	0	↓*
<i>FT</i>	0,647	0.352 - 1.010	0.273 - 1.541	0,404	↓
<i>UBQ10</i> **	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Тренди експресії генів цвітіння вказують, що порівняно з опроміненням групи мутантних рослин, рослини ДТ не демонструють зниження активності генів циркадного годинника *CO* та *GI*, проте демонструють зниження експресії гену *FT* та *AP1* (Рис 3.2.3).

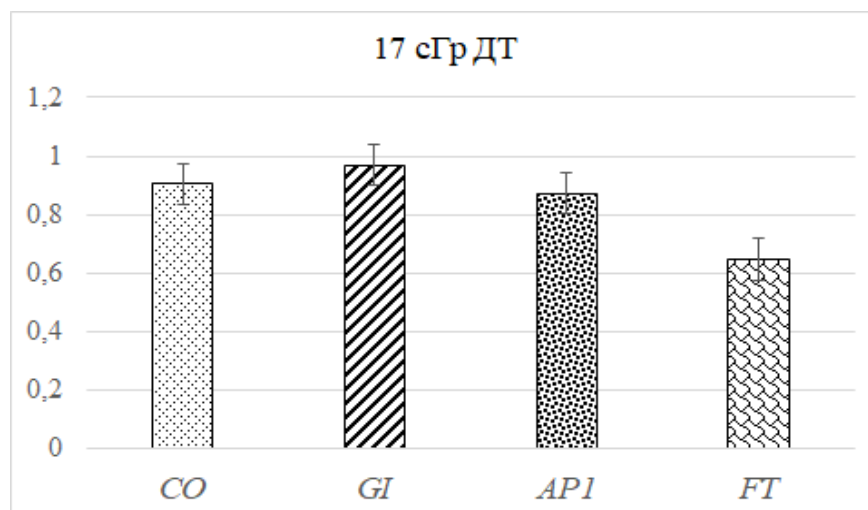


Рис. 3.2.3. Експресія генів цвітіння рослин *A. thaliana* ДТ за хронічного режиму опромінення у дозі 17сГр

Відповідно, хоча гени ТФ початкового етапу ланцюга передачі сигналу від навколишнього середовища до апікальної меристеми не демонстрували змін експресії, проте зниження експресії флорального фактору, за нашим припущенням, призводить до затримки у передачі сигналу до початку репродукції. Зниження гену дифференціації флоральної меристеми також може впливати на процес формування органів квітки, та викликати затримку у розвитку флоральної меристеми та меристеми суцвіття.

За гострого опромінення у сублетальній дозі, експресія гену *GI* збільшувалася до рівня 1,448 (95% C.I.=1,130 - 1,804, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,041$). Активність гену *AP1* навпаки зменшувалася до середнього показника 0.397 (95% C.I.=0.349 - 0.461, критерій перевірки відповідності гіпотезі $P(H_1)=0,0$). Детальніше дані наведено у Табл. 3.2.4.

Табл. 3.2.4. Результати експресії генів фотоперіодичного шляху цвітіння рослин мутантної лінії *jln A. thaliana* за гострого режиму опромінення в дозі 5 Гр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	1.225	1.167 - 1.272	1.143 - 1.294	0.092	↑
<i>GI</i>	1.448	1.202 - 1.652	1.130 - 1.804	0.041	↑
<i>AP1</i>	0.397	0.349 - 0.461	0.322 - 0.485	0	↓*
<i>FT</i>	0.821	0.676 - 0.913	0.667 - 1.134	0.202	↓
<i>Act2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

У порівняння з даними опромінення рослин ДТ, що детально наведені у попередньому розділі. За опромінення рослин *A. thaliana* Col0 ДТ, ми спостерігали істотне збільшення рівня експресії гену диференціації флоральної меристеми *AP1* (Рис. 3.1.3). Проте, при опромінення рослин мутантної лінії, ми навпаки спостерігаємо, що рівень активності гену *AP1* зменшується, що говорить про зменшення стимулюючого ефекту малих доз ІВ без участі жасмонатного сигналінгу. Гени циркадного годинника при цьому стимулюються до активності, проте сигнал не передається далі по фотоперіодичному шляху, про що свідчить зниження активності генів ТФ, задіяних на наступних фазах.

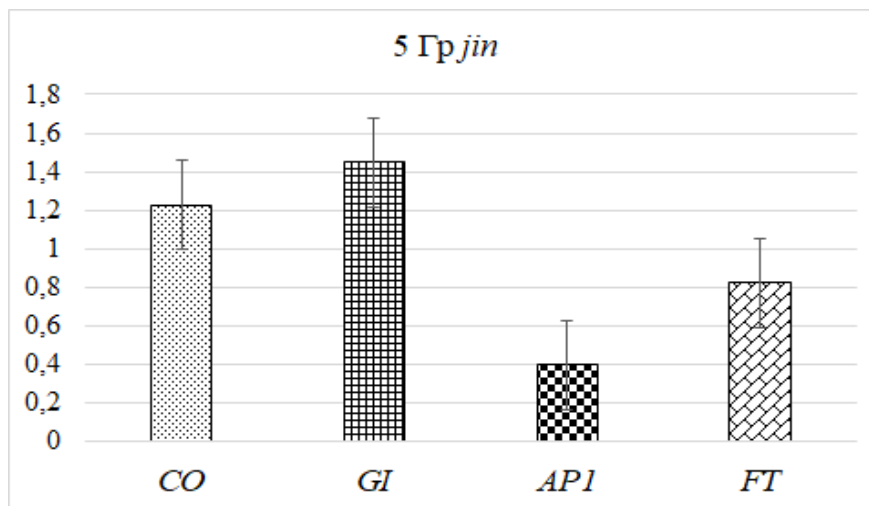


Рис. 3.2.3. Експресія генів цвітіння рослин *A. thaliana* мутантної лінії *jin1* за гострого режиму опромінення в дозі 5 Гр

В нашому дослідженні ми показали участь жасмонатів у активності відповіді генів цвітіння на опромінення. Порівняння рівня експресії генів цвітіння у рослин ДТ та мутантів *jin* показали відмінності у профілях активності досліджуваних генів (Рис.3.3.5.). На основі результатів нашого дослідження, ми можемо висунути гіпотезу, що жасмонова кислота має

стабілізує ефект на активність генів цвітіння у рослин *A. thaliana* при опроміненні малими дозами. Окрім того, показано вплив жасмонатів у «включенні» основного шляху передачі сигналу навколишнього середовища, що спостерігали при порівнянні даних експресії ТФ різних етапів трансдукції сигналу до початку репродуктивного переходу у мутантів та ДТ.

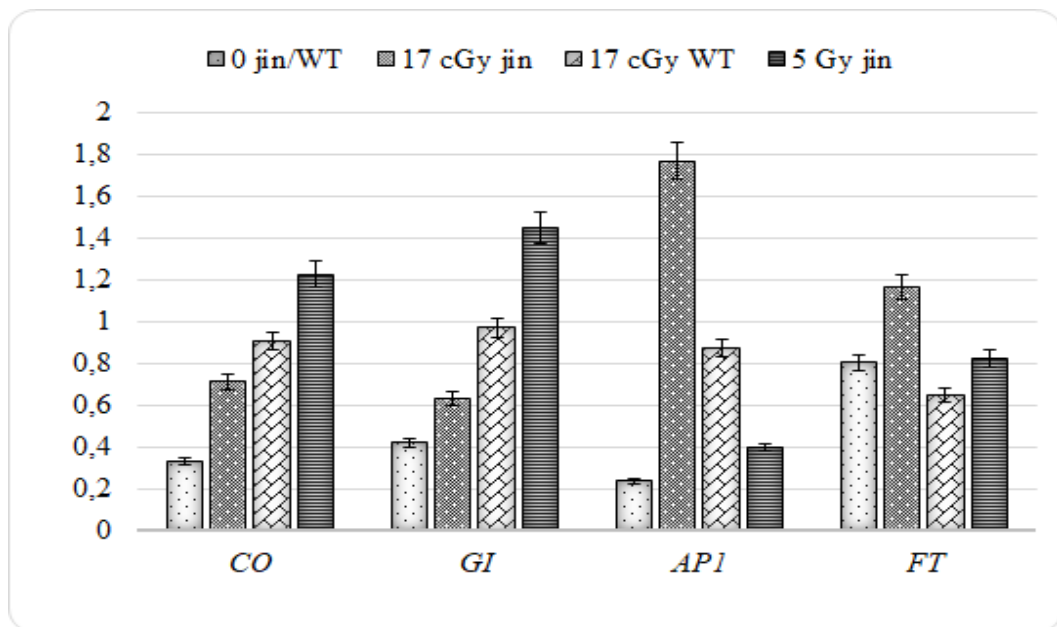


Рис.3.3.5. Порівняння експресії генів цвітіння у рослин ДТ та мутантів *jin1 A. thaliana* Col 0.

За даними авторів попередніх досліджень, жасмонової кислота і метілжасмонат задіяні в активації цілого комплексу захисних реакцій рослин, важливих для формування стійкості до абіотичних і біотичних стресорів. шляхом активації сигнальних мереж в цілому (Колупаєв, Карпець, 2010). Наші дослідження показали, що сигналінг жасмонової кислоти впливає на відповідь генів цвітіння, при опроміненні мутантів з порушеннями жасмонадного сигналінгу ми спостерігали більш активні зміни експресії генів цвітіння.

В попередніх дослідженнях впливу жасмонової кислоти на відповідь рослин на абіотичні стреси, автори вивчали вплив сольового стресу і екзогенної жасмонової кислоти на вміст осмолітов і флавоноїдів в листі чотиритижневих рослин *A. thaliana* ДТ (Col-0) і мутантів *jin1*. В результаті дослідження було виявлено вплив жасмонової кислоти на стрес-індуковану відповідь рослин (Ястреб, 2016).

Низькі температури, нітратний стрес, зневоднення чи недостатність нутрієнтів, має стимулюючий ефект на цвітіння рослин (Marín et al. 2011). Наші результати показують, що у мутантів з порушеннями сигналіngu жасмонової кислоти гени *CO*, *GI* знижують активність генів цвітіння, еквівалентно ДТ. Проте, гени *AP1* та *FT* навпаки проявляють збільшення активності, порівняно з опроміненням рослин ДТ.

Автори попередніх досліджень вказують на стохастичний ефект малих доз радіації на геном рослин, порівняно з мішенном ефектом великих доз гострого опромінення (Литвинов, 2018). За даними наших попередніх результатів, гостре рентгенівське опромінення в малих дозах має ефект, відмінний від малих доз хронічного опромінення (Kryvokhyzha et al., 2018).

Стабілізуюча та протекторна дія жасмонової кислоти також була описана при вивченні участі жасмонадного сигналіngu у відповіді на інші абіотичні стреси, такі як посуха, засоленість, температура та інші. Автори показали, що обробка насіння жасмоновою кислотою зменшувала пригнічення росту рослин, викликане посухою (Луговая, 2014). Дані проведеного дослідження також корелюють з результатами інших авторів, що підтверджую нашу гіпотезу щодо впливу жасмонової кислоти на активність генів цвітіння, які є чутливими до дії стресових факторів.

Проте, на даний час залишається неясним механізм залучення жасмонадного сигналіngu до регуляції активності генів цвітіння під дією стресових факторів. Це питання залишається цікавим та перспективним для подальших досліджень зв'язку стресових факторів та регуляції цвітіння у рослин.

Як коротке резюме підрозділу, наводимо що, в даному дослідженні було показано участь жасмонадів у активності відповіді генів цвітіння на опромінення. Виявлено відмінності у профілях активностей генів у рослин ДТ та мутантів *jin1*. У мутантів з порушеннями сигналіngu жасмонової кислоти, гени *CO*, *GI* знижують активність генів цвітіння, еквівалентно ДТ. На відміну від *AP1* та *FT*, які проявляють стимулюються за опромінення. Висунуто гіпотезу, що жасмонова кислота має стабілізуючий ефект на активність генів цвітіння у рослин *A. thaliana* за опромінення малими дозами.

3.3. Вплив хронічного опромінення на фотоперіодичний механізм детермінації цвітіння

Вивчення дії хронічного випромінювання стало особливо актуальним у зв'язку з аварією на ЧАЕС. Після забруднення радіонуклідами значних природних та сільськогосподарських територій, перед вченими стало питання рекультивації забруднених територій та використання їх для сільського господарства. Для цього в першу чергу необхідно було проведення досліджень на вплив хронічного опромінення ІВ не тільки на людину, в контексті захисту організму, а й дослідження впливу ІВ на екосистему в цілому та на окремі компоненти живої природи. На територіях Чорнобильської зони відчуження науковці проводили дослідження, що направлені на міграцію радіонуклідів в природних екосистемах, вплив на наземні та водні біоценози, вплив радіоактивного випромінювання на рослини, тварини та гриби. Хоча власне під час аварії екосистеми зазнали гострого опромінення, що мало наслідки на всіх рівнях біоти, хронічне пролонговане опромінення від радіонуклідів, що потрапили в природне середовище продовжувало діяти протягом років (Гродзинський та ін., 2012).

В ході досліджень були виявлені тенденції впливу ІВ на живі організми, в тому числі виявлені особливості впливу хронічного опромінення на живі організми. Одним з найважливіших моментів, що спостерігали дослідники,

було показано погіршення роботи репродуктивної системи та зменшення фертильності як у тварин, так і у рослин.

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.

В попередніх розділах ми розглянули дію так званого гострого, одноразового опромінення з високою енергією фотона, на активність генів цвітіння *A. thaliana*. Проте, хронічне пролонговане опромінення має відмінності за своєю дією на організм рослин. Тому, для більш повного розуміння впливу ІВ на регуляцію цвітіння рослин в даному розділі ми наводимо результати досліджень дії хронічного опромінення на активність генів фотоперіодичного шляху арабідопсиса та їх обговорення.

Для вивчення впливу хронічного опромінення рослини зростали в полі змішаного випромінювання від розчину хлориду цезію від посадки насіння до стадії плодоношення. За цей час рослини отримують дозу хронічного опромінення. Розрахунок дози триває до стадії 6.3. по Бюсу (Boyes et al. 2001), коли ми фіксували час цвітіння. Фенологічні спостереження проводили для того, щоб виявити чи були відмінності між часом цвітіння опромінених рослин та контрольних груп. Дані наведено у таблиці 3.3.1

Табл. 3.3.1. Зміни у часі цвітіння за хронічного режиму опромінення рослин *A. thaliana* у порівнянні з контрольною групою.

Режим опромінення	Зміни часу цвітіння
3 сГр, хронічне	8 ± 2,8 днів раніше

17 сГр, хронічне	14 ± 3,7 днів пізніше
------------------	-----------------------

Відповідно, за нашими спостереженнями, 6.3.фаза цвітіння наступала у рослин *A. thaliana*, опромінених в дозі 3 сГр на $8 \pm 2,8$ днів раніше, порівняно з рослинами контрольної групи. Проте, у рослин опромінених у дозі 17 сГр цвітіння наступало на $14 \pm 3,7$ днів пізніше, ніж у контрольній групі.

У попередніх дослідженнях на території Чорнобильської зони відчуження, у рослин що зростали за дії хронічного опромінення на забруднених ділянках, спостерігали порушення фенологічного розвитку рослин. Автори продемонстрували, що у рослин з забруднених радіонуклідами територій спостерігається наявність двох піків цвітіння, що не є характерним явищем для рослин, що зростають у звичайних умовах. окрім того, дослідниками помічена висока частоти появи морфозів органів квітки (Рашидов та ін. 2012). В наших дослідженнях ми також показуємо зміну часу цвітіння за дії хронічного опромінення ІВ рослин.

Дані фенологічних спостережень узгоджуються також з даними молекулярно-генетичних досліджень. Аналіз відносної експресії ключових генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння показав, що опромінення викликає статистично значущі зміни в активності досліджуваних генів. Відповідно, за малих доз опромінення - 3 сГр, експресія гену циркадного ритму збільшувалася до показника 1,152 (1,087-1,217 95% C.I.) порівняно зі значенням референсного гену =1. Дані аналізу відносної експресії наведено у таблиці 3.3.2. Проте, експресія гену *FT* достовірно зменшувалася до 0,128 (0,021-0,396 95% C.I.). Експресія інших генів істотно не змінилася порівняно з контрольною групою.

Табл. 3.3.2. Експресія генів *A. thaliana* за хронічного опромінення у дозі 3 сГр

Ген	Експресії	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H)	Тренд*
<i>CO</i>	1.152	1.119-1.191	1.087-1.217	0.000	↑*
<i>GI</i>	1.125	1.006-1.252	0.941-1.342	0.090	↑
<i>LFY</i>	0.576	0.177-1.268	0.130-1.481	0.257	↓
<i>FLC</i>	1.142	0.744-1.646	0.533-2.251	0.535	↑
<i>AP1</i>	0.998	0.866-1.126	0.809-1.243	0.948	↓
<i>RAD51</i>	1.062	0.907-1.193	0.869-1.369	0.594	↑
<i>FT</i>	0.128	0.043-0.368	0.021-0.396	0.000	↓*
<i>PCNA2</i>	0.875	0.744-1.040	0.690-1.082	0.210	↓
<i>UBI10**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Доза 3сГр хронічного опромінення має не значний стимулюючий ефект на гени цвітіння рослин, окрім гену флорального фактору *FT* (Рис. 3.3.1). Аналогічну тенденцію можемо спостерігати за гострого опромінення у дозі 3 Гр, що наведено у розділі 3.1.

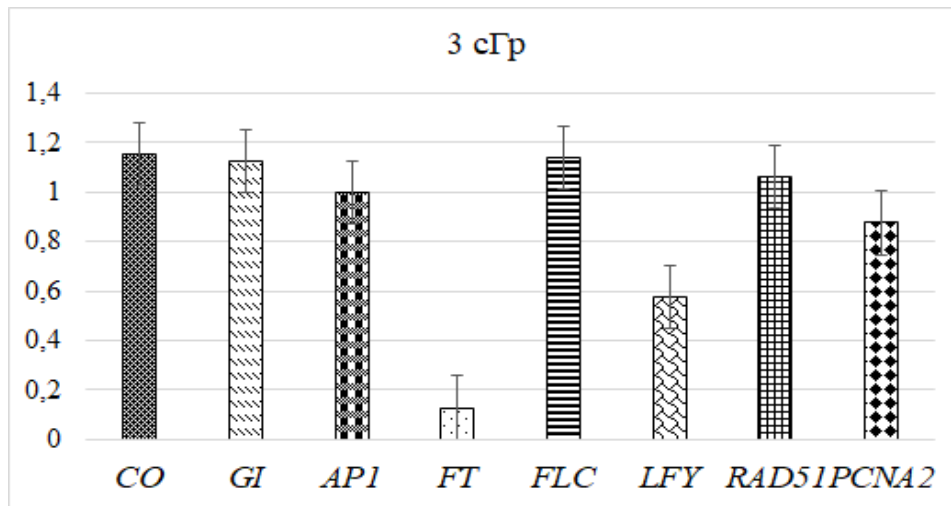


Рис. 3.3.1. Експресія генів *A. thaliana* за хронічного опромінення у дозі 3 сГр

За підвищення дози хронічного опромінення до 17сГр, експресія генів всіх пригнічувалася порівняно з контрольною групою. Проте, статистично значущі тренди виявлено тільки для генів *AP1* та *LFY*, середнім фактором експресії 0,471 при довірчому інтервалі 0,941-1,342 95% С.І. та 0,872 при інтервалі 0,803-0,940 95% С.І. відповідно (Табл. 3.3.3).

Табл. 3.3.3. Експресія генів *A. thaliana* за хронічного опромінення у дозі 17 сГр

Ген	Експресії	Довірчий інтервал	95% С.І.	P(H)	Тренд*
<i>CO</i>	0.906	0.576-1.321	0.531-1.462	0.582	↓
<i>GI</i>	0.969	0.854-1.100	0.772-1.190	0.718	↓
<i>LFY</i>	0.471	0.374-0.594	0.306-0.687	0.008	↓*
<i>FLC</i>	0.374	0.172-0.979	0.094-1.020	0.051	↓
<i>AP1</i>	0.872	0.830-0.929	0.803-0.940	0.000	↓*
<i>RAD51</i>	1.009	0.764-1.443	0.760-1.445	0.900	↑
<i>FT</i>	0.647	0.352-1.010	0.273-1.541	0.404	↓
<i>PCNA2</i>	0.945	0.824-1.082	0.801-1.176	0.536	↓

<i>UBI10</i> **	1				
-----------------	---	--	--	--	--

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

В наших експериментах 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. Хронічне опромінення в дозі 17 сГр має більш виразний ефект ніж при гострому опроміненні (Рис. 3.3.2).

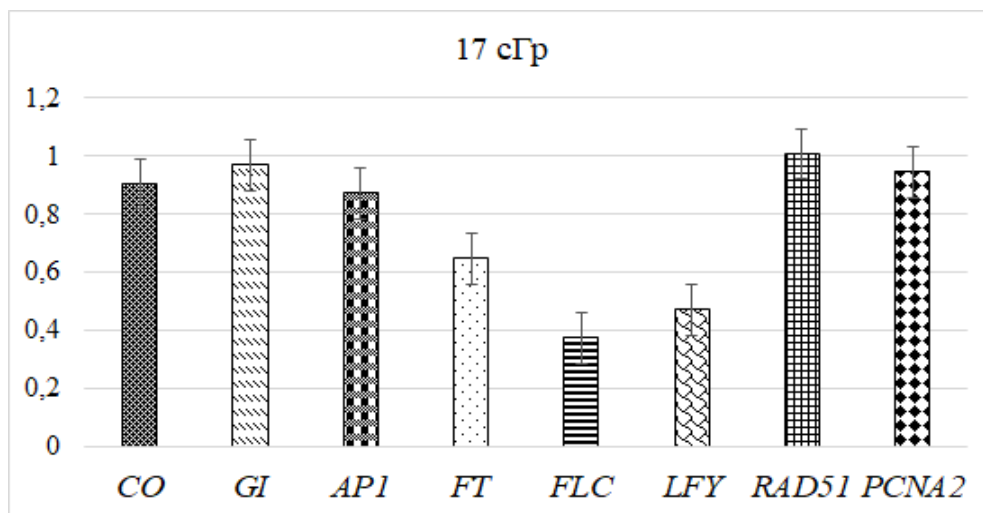


Рис. 3.3.2. Тренд активності генів *A. thaliana* за хронічного опромінення у дозі 17 сГр

Опромінення у дозі 30 сГр викликає істотне падіння експресії генів цвітіння (Табл. 3.3.4). 30 сГр це висока доза для хронічного пролонгованого опромінення, що викликає пригнічення репродукції у рослин. Гени циркадного годинника, передачі флорального сигналу та детермінації

флоральної меристеми знаходяться на приблизно однаковому рівні 0,5, порівняно зі значенням референсу 1. Це може свідчити, що за дози 30 сГр, хронічне опромінення викликає пригнічення активності генів цвітіння, не залежно від етапу та залучення їх до конкретних функцій у переході до репродуктивного розвитку.

Табл. 3.3.4. Експресія генів *A. thaliana* за хронічного опромінення у дозі 30 сГр

Ген	Експресія	Стд. похибка	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>CO</i>	0,48	0.443 - 0.515	0.424 - 0.543	0	↓
<i>GI</i>	0,506	0.446 - 0.548	0.435 - 0.614	0	↓
<i>AP1</i>	0,481	0.370 - 0.602	0.336 - 0.719	0	↓
<i>FT</i>	0,504	0.447 - 0.556	0.435 - 0.613	0,037	↓
<i>ACT</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Хронічне опромінення впливає на гени фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння в більш значній мірі ніж гостре. Наші дослідження також показали, що хронічна радіація не тільки впливає на експресію генів цвітіння, але й має ефект на початок генеративної фази, відмінний від ефектів гострого короткотривалого опромінення (Рис.3.3.3).

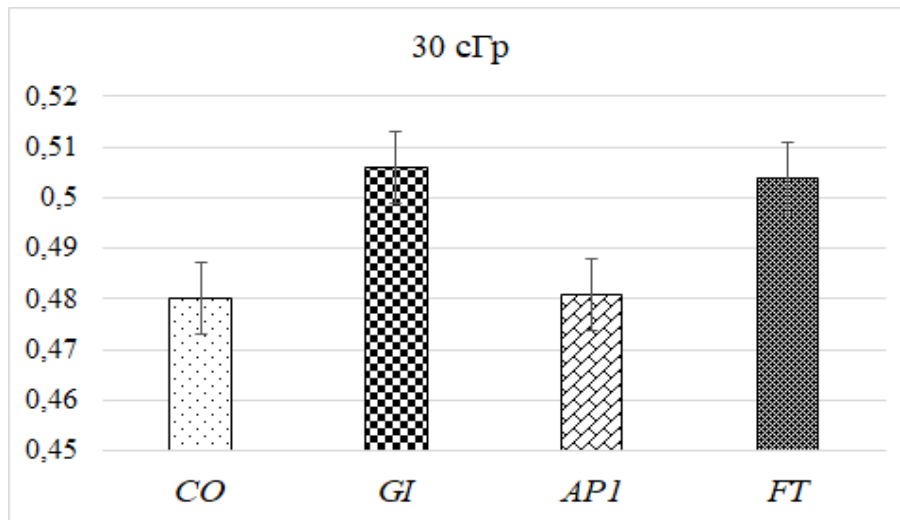


Рис. 3.3.3. Експресія генів *A. thaliana* за опромінення у дозі 30 сГр

В ході експерименту помічено, що популяція має високу ступінь гетерогенності. Це явище пов'язане з тим, що хронічне опромінення у низьких дозах викликає індивідуальні ефекти у рослин (Hwang et al., 2016). В радіобіології добре відомо, що радіаційний фактор викликає широку варіативність у живих системах (Kovalchuk et al., 2007).

Більш значна ефективність хронічного опромінення, порівняно з гострим, була показана в попередніх роботах співробітників відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ, в тому числі в дослідженнях рослин, що були вирощені на радіаційно забруднених територіях Чорнобильської зони відчуження (Danchenko, 2017). Дані літератури демонструють, що високі дози гострого опромінення (100 та 200 Гр) викликають затримання часу цвітіння рослин та спричиняють зміни експресії деяких груп генів (Hwang et al. 2016). Тренди зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння наведено у Рис. 3.3.4.

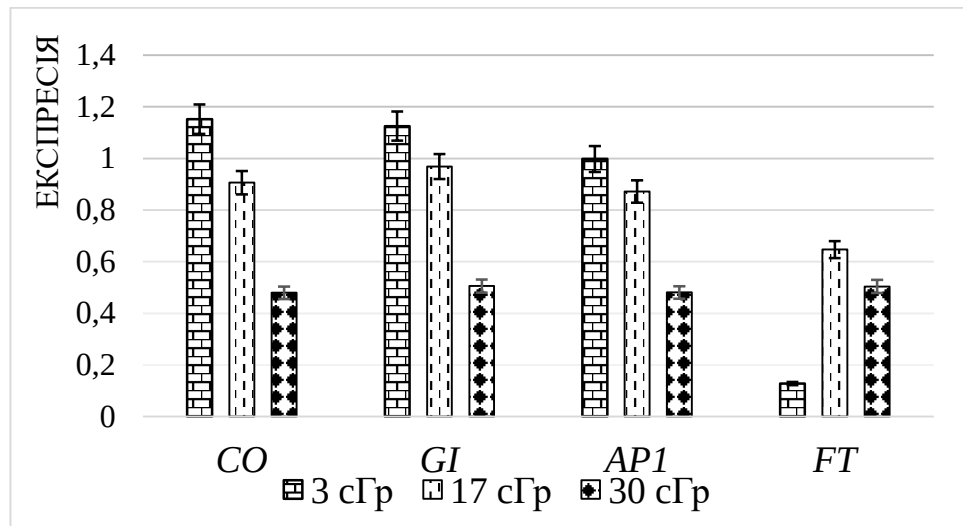


Рис. 3.3.4. Експресія генів шести генів цвітіння і *RAD51*, *PCNA2* генів *A. thaliana* при всіх трьох різних режимах впливу іонізуючого опромінення.

Наші результати показали, що характер змін активності генів фотоперіодичної залежить не тільки від загальної дози, але й від режиму опромінення. Наприклад, хронічна та гостра радіація впливає по-різному на квітування, репарацію та проліферацію. Попередньо, схожі дані отримали автори (Kovalchuk et al., 2007) в вивченні диссимулярної відповіді геному на низькі дози хронічного та гострого опромінення у мишей.

Наші дані демонструють, що різні дози радіації спричиняють відмінні ефекти у генів ініціації цвітіння (Рис. 3.3.4). Це означає, що деякі гени більш чутливі до дії факторів навколишнього середовища, ніж інші. В наших дослідженнях показано, що гени *CO*, *AP1* та *PCNA2* найбільш чутливі до хронічного режиму дії іонізуючої радіації. Чутливість генів *CO* та *AP1* до радіаційного випромінювання, вірогідно, є доказом їхнього залучення до стрес-індукованої регуляції цвітіння.

В наших дослідженнях, ми продемонстрували, що радіаційне випромінювання є сильним стресовим фактором, що впливає на час ініціації цвітіння та експресію ключових генів цвітіння, репарації та проліферації. Недавні дослідження показали, що стресові фактори можуть бути причиною

раннього чи пізнього цвітіння (Takeno, 2012). Стрес-індуковане раннє цвітіння також може бути викликане низькими температурами, нітратним стресом чи нестача нутрієнтів (Marín et al., 2011).

У рослин, що зростають в Чорнобильській зоні відчуження, на територіях забруднених радіонуклідами, спостерігали порушення росту. У таких рослин спостерігали недорозвинутий габітус та появу другого піку цвітіння (Rashydov et al., 2012).

Відповідно, експресія ген циркадного ритму *CO* стимулюється за дози в 3 сГр хронічного опромінення. Така зміна активності гену *CO* узгоджується з тим, що рослини даної експериментальної групи вступали в генеративну фазу на 8 днів раніше, ніж контрольна група. Навпаки, за більш високої дози 17 сГр експресія більшості генів пригнічувалася. Такий тренд зміни експресії генів цвітіння також корелює з достовірно більш пізнім цвітінням в експериментальній групі.

Ефекти хронічного іонізуючого опромінення мають схожість з ефектами дії інших абіотичних стресових чинників, таких як УФ-радіація, посуха чи високі температури (Llorens et al., 2015). Відповідно, механізм стрес індукованого цвітіння є важливим для адаптації рослин до умов навколишнього середовища (Takeno, 2012).

Також, в недавніх роботах автора було продемонстровано раннє цвітіння *A. thaliana* у відповідь на посуху, УФ-випромінювання та патогени, наприклад інфекція *Fusarium oxysporum* (Takeno, 2016). В нашій роботі ми показали, що радіація у дозі 3 сГр викликає раннє цвітіння, як інші стресові фактори.

Результати опублікованих раніше робіт демонструють, що флоральний фактор *FT* включено до механізму активації цвітіння під дією стресових факторів (Takeno, 2012). Проте, в нашій роботі ми не спостерігали суттєвого підвищення експресії гену *FT* у випадку більш раннього цвітіння, як описано в інших роботах (King et al., 2008). Експресія гена циркадного годинника *CO* навпаки, стимулювалася під дією радіації, що викликало

ранний перехід до генеративної фази розвитку рослини. Наші дослідження показали, що ефект хронічного опромінення за дози у 17 сГр схожий з реакціями рослинного організму на УФ-В, описані в попередніх роботах (Grodzinsky et al., 2007).

Показано, що хронічне опромінення у дозі 17 та 30 сГр викликає затримку у цвітінні. Гени детермінації цвітіння, за винятком гену *AP1*, пригнічуються під дією іонізуючої радіації.

Схоже на дію хронічної радіації, деякі абіотичні стреси, такі як холод, осмотичний стрес, засоленість, викликають затримку у цвітінні (Srinivasan et al. 1999; Kotula et al. 2015). Низькі температури викликають деградацію білка CO у убіквітиново-протеосомному механізмі (Jung et al. 2012). Інфікування патогенами разом з високими температурами, засухою чи засоленістю також спричиняє зміни часу цвітіння у арабідопсиса. Такі зміни відбуваються через втручання у процеси фотоперіодичного механізму (Kazan and Lyons, 2016). Засолення впливає на експресію гена флорального фактору *FT*, його транскрипційний та пост-транскрипційний рівень (Li et al. 2007). Сольовий стрес також викликає деградацію протеїну *GI* та негативно впливає на експресію гену *CO* (Melgar et al. 2012). В дослідженнях впливу стресових факторів на цвітіння рослин, автори попередніх робіт показують, що засуха також є сильним чинником впливу на час цвітіння рослин. На рослинах апельсину, авторами показано, що засуха викликає затримку цвітіння внаслідок чого за 4 тижні (Riboni et al. 2014). Це явище негативно впливає на врожайність та викликає втрати продуктивності рослин.

Проте, механізм виникнення пост-радіаційних ефектів на цвітіння досі залишається недостатньо зрозумілим. Високі дози опромінення, більше ніж 1кГр викликають деструктивні процеси у клітинах рослин (Kovacs, Keresztes 2002). Навпаки, гамма-опромінення середньої інтенсивності за дози 100-400 Гр також викликає затримку у переході до репродуктивної фази розвитку та знижує життєздатність рослин (Marcu et al. 2013).

Як ми вже зазначали, відомо, що іонізуюче опромінення викликає продукцію вільних радикалів та іонів в біологічних тканинах (Riley, 1994). Вільні радикали можуть спричинювати пошкодження чи модифікації ключових компонентів клітини, білків, ферментів, гормонів, які включені до важливих фізіологічних чи біохімічних процесів в онтогенезі рослин. Проте, морфологічні, структурні та функціональні зміни залежать від потужності та тривалості дії опромінення (Marcu et al. 2013).

Після аналізу низьких та більш високих доз хронічного опромінення, ефекти на гени фотоперіодичного шляху цвітіння та репарації, ми можемо зазначити, що існує кореляція між відповіддю на стресові фактори з боку генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння та репарації.

Як узагальнення даного розділу, наводимо що наші дослідження показали, що іонізуюча радіація в хронічному режимі опромінення має вплив на фотоперіодичний механізм детермінації цвітіння у рослин. Підвищення експресії генів циркадного ритму *CO* та *GI* викликає раннє цвітіння. Пригнічення експресії гену *AP1*, навпаки, викликає затримку цвітіння під дією хронічного та гострого режимів опромінення. За дії низької дози хронічної радіації (3 сГр) стимулюється активність репараційних процесів, що слідує за активацією процесів поділу клітин. Проте, при підвищенні дози до 17 та 30 сГр процеси репарації пригнічуються.

Порівнюючи тенденції, виявлені в дослідження дії ІВ за гострого та хронічного режиму опромінення показали наявність спільних рис у відповіді генів фотоперіодичного шляху цвітіння. В обох випадках ми спостерігаємо наявність нелінійної залежності у кривих «доза-ефект», що узгоджується з даними літератури. Тренд зміни експресії генів цвітіння за гострого режиму опромінення ІВ змінюється зі збільшенням дози. За низьких доз, до 10 Гр, відбувається стимуляція генів ТФ фотоперіодичного шляху, зі збільшенням дози – до 15 Гр, експресія ТФ навпаки, знижується порівняно з контрольною групою. За хронічного опромінення ІВ, ми

спостерігаємо схожу тенденцію, зі збільшенням дози, гени ТФ, що залучені у регуляцію цвітіння, змінюють свою відповідь, від стимуляції до пригнічення експресії. Отримані дані показують, що дія хронічної радіації на проліфераційну активність клітин відрізняється від дії гострого короткочасного опромінення.

Ймовірно, це явище можна пояснити активацією процесів репарації ДНК під дією хронічного опромінення у дозі 3 сГр. Ми вважаємо, що гени *AP1* та *CO* грають важливу роль у цвітіння, яке відбувається під дією стресових факторів.

Наші результати показують, що хронічне, так само як і гостре опромінення, має вплив на гени цвітіння, репарації та проліферації. Активність генів фотоперіодичного механізму, репарації та проліферації по різному реагує на хронічне та гостре опромінення.

Автори попередніх досліджень вказують на важливість процесу запилення на прояв геномної нестабільності рослин (Мамедли, Гродзинский, 2007). Час цвітіння має ключове значення для запилення, особливо для рослин що запилюються комахами.

В подальших розділах ми розглянемо ефекти дії ультрафіолетового випромінювання на фотоперіодичний шлях регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*. Збільшення ультрафіолетового випромінювання також потенційно викликає затримку цвітіння та втрати врожайності рослин.

3.4. Зміна експресії генів цвітіння у відповідь на УФ-С опромінення на рослини, що вирощені в культурі *in vitro* за різних умов освітленості

Ультрафіолетове опромінення з короткою довжиною хвилі може спричинювати зміни в конформації ДНК-протеїнових комплексів (Choi 2017). УФ-випромінювання викликає ДНК-тринуклеотиди та індукує фотопошкодження структур клітин, що супроводжуються зазвичай генерацією реактивних форм кисню (Brem et al. 2017). Проте, у деяких випадках УФ-С опромінення не викликало окремих ефектів на біологічні

процеси у рослин. Так, в попередніх дослідженнях, за опромінення УФ-С рослин чебрецю, дослідники не спостерігали значних змін швидкості окислення між обробленими УФ-С та необробленими зразками в однакових концентраціях (Dogu-Baykut at al. 2014) .

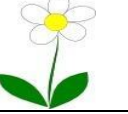
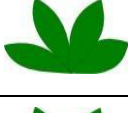
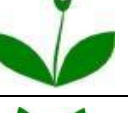
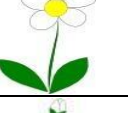
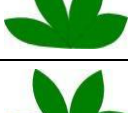
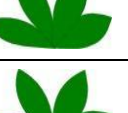
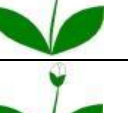
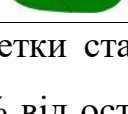
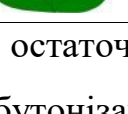
ДНК є однією з ключових мішеней ураження УФ для різних організмів. УФ-випромінювання викликає два найпоширеніші мутагенні та цитотоксичні ураження ДНК (Choi 2017). Відомо, що УФ-В випромінювання викликає безліч реакцій у всіх живих організмів (Corrê, 2015). Нещодавні дослідження також вказують, що УФ грає важливу роль у рості та розвитку рослин (Lovelli at al. 2017). Це робить актуальним вивчення впливу УФ-С на фенологічні фази розвитку рослин, та, в особливості на репродукцію. Молекулярно-генетичні дослідження допоможуть виявити зміни в активності ключових генів цвітіння за дії УФ-С.

В послідуючих розділах ми обговоримо вплив УФ-опромінення на гени цвітіння рослин та вплив умов вирощування на відповідь рослин на травматичний чинник. В якості джерела опромінення було використано УФ-С, який активно впроваджуються як модель дії стресових та пошкоджуючих факторів.

Рослини, які були взяті у дослід вирощували за різних умов освітленості. Для розгляду впливу світла на стресову відповідь, використовували освітлення з різними спектрами.

Результати фенотипічних та фенологічних досліджень показали, що найшвидші темпи розвитку характерні для рослин, вирощених у інтенсивному білому освітленні та при 24°C: фазу стрілкування 5.1 (Boyes, 2001) спостерігали на 17 день, фазу цвітіння 6.1 спостерігали на 20 день, фазу цвітіння 6.3 спостерігали на 23 добу (Табл. 3.4.1.).

Табл. 3.4.1. Фенологічний календар рослин *A. thaliana*, вирощених в різних умовах освітленості та температури (Boyes, 2001)

Світло	Вік, дні	Фаза розвитку		Вік, дні	Фаза розвитку		Вік, дні	Фаза розвитку	
Інтенсивний білий 24°C	17	5.1		20	6.1		23	6.3	
Червоний 24°C		3.8			5.1			6.1	
Фіолетовий 24°C		3.8			5.1			6.1	
Оранжевий 21°C		3.6			3.8			5.1	
Фіолетовий 21°C		3.6			3.8			5.1	

3.6. – розмір розетки становить 50% від остаточного; 3.8. – розмір розетки становить 80% від остаточного; 5.1 – бутонізація; 6.1. – одиничні рослини мають відкриті квіти; 6.3. – 30% рослин мають відкриті квіти.

Для рослин, що культивували при червоному та фіолетовому світлі при 24°C, перехід до фази 5.1 спостерігали на 20 день, 6.1 стадію цвітіння спостерігали на 23 день (Табл. 3.4.1.). Рослини, які культивували у світлі оранжевого та фіолетового спектру за температури 21°C досягли фази розвитку 5,1 на 24 день (Табл. 3.4.1.). Фенологічні дані показують, рослини, вирощені в фіолетовому та оранжевому освітленні та при температурі 21°C мають затримку у розвитку на 6 днів.

За допомогою стандартної кривої визначали коефіцієнти відносної експресії з нормалізацією по референсному гену. Рівень експресії референсного гену *ACT2* було прийнято за одиницю. В розрахунку проводилася подвійна нормалізація результатів за рівнем експресії референсного гену та контрольною групою. У рослин, що були вирощені в освітленні червоного спектру, при температурі культивування 24°C, ген репарації *RAD51* також показано зниження експресії в дослідній групі у

порівнянні з контрольною групою з середнім значенням рівня експресії 0.379 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.192 - 0.764).

Серед генів цвітіння, зниження експресії було показано для гена циркадних ритмів *CO* в дослідній групі з коефіцієнтом експресії рівному 0.021 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.011 - 0.041). Експресія гену циркадних ритмів *GI* також знижується при УФ-опроміненні у порівнянні з контрольною групою з середнім коефіцієнтом 0.291 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.144 - 0.595). Рівень експресії фактору транскрипції *AP1*, що приймає участь у детермінації меристеми по флоральному шляху навпаки збільшується при УФ-опроміненні порівняно з контролем з середнім коефіцієнтом рівня експресії 2.557 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 1.194 - 6.399).

Для рослин, вирощених в умовах освітлення з фіолетовим спектром за температури 21°C, показано зниження рівня експресії транскрипційного фактору *AP1* для дослідної групи з коефіцієнтом 0.023 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.007 - 0.078). Аналогічний результат був показаний для іншого транскрипційного фактору *LFY*, експресія даного гену зменшується під впливом УФ-опромінення з коефіцієнтом 0.177 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.069 - 0.455). Для рослин, що були вирощені в освітленні оранжевого спектру при температурі 21°C результати аналізу експресії генів були аналогічними до попереднього варіанту. Так, рівень експресії гену *LFY* знижується в дослідній групі порівняно з контрольною групою за середнім коефіцієнтом 0.33 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.172 - 0.633). Також показано зниження експресії *AP1* для дослідної групи рослин за коефіцієнтом 0.306 ($P(H_1) = 0.000$, 95% C.I. 0.116 - 0.818). Для групи рослин, що культивувалися в умовах освітлення з фіолетовим спектром за температури 24°C статистично значущих змін експресії серед досліджуваних генів виявлено не було (Рис. 3.4.1.).

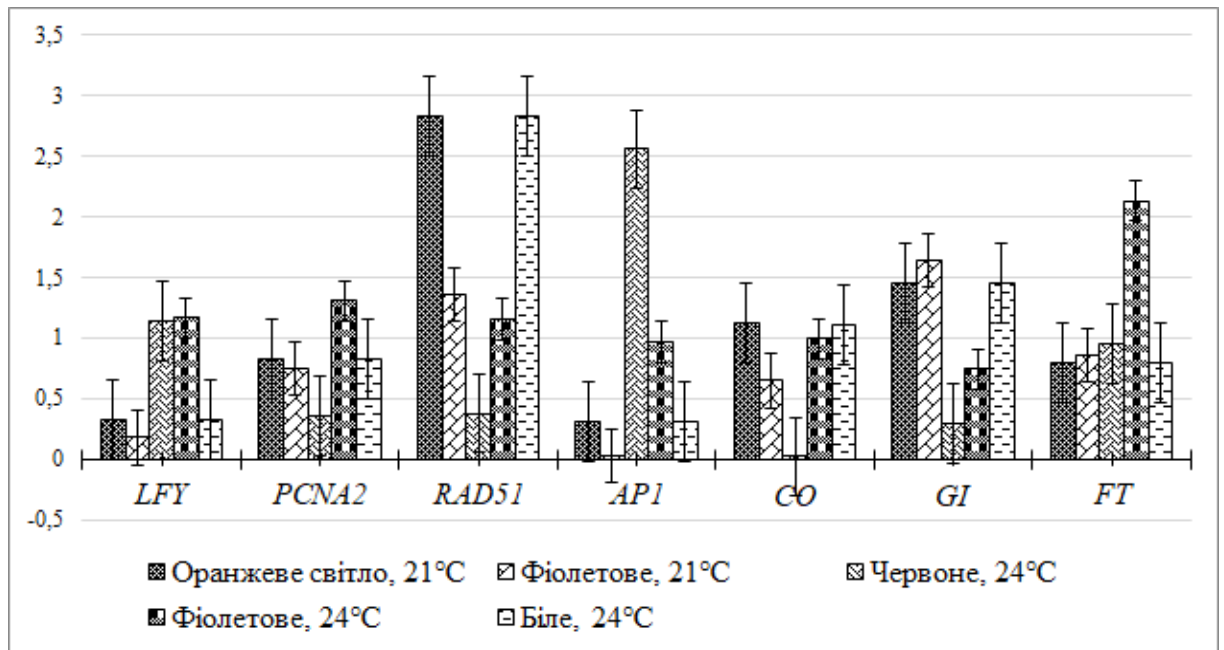


Рис. 3.4.1. Графік змін рівня експресії генів цвітіння та репарації при УФ-опроміненні у рослин *A. thaliana*, вирощених в різних умовах освітлення

За результатами експерименту можна зазначити, що рослини, які вирощувалися в світлі червоного, оранжевого та фіолетового спектру з запізненням вступали в відповідні стадії розвитку - стрілкування, бутонізацію та цвітіння, ніж рослини, що зростали у білому світлі (Табл. 3.4.1.). Ці дані свідчать про необхідність світла повного спектру для активації генів циркадних ритмів та включення їх в каскад транскрипційних факторів фотоперіодичного шляху. Дані про вплив червоного та синього світла на активність білків у рослинах було показано у попередніх роботах (Muneer at all, 2018).

Якщо прийняти до уваги той факт, що рослини, які росли в червоному та фіолетовому освітленні мають різні зміни в експресії генів, ми можемо зробити припущення про участь відповідних фоторецепторів у відповіді на УФ-опромінення. Про це свідчать зміни в даних експресії досліджуваних генів, що ми можемо спостерігати для рослин, які вирощені у в освітленні різного спектру (Рис. 3.4.1). При впливі УФ-опромінення в однаковій дозі, у рослин з різних груп спостерігали як значне підвищення, наприклад для гену

AP1, так і зменшення рівня експресії в залежності від світлових умов вирощування.

Характер змін експресії генів цвітіння під дією УФ вказує на стабілізуючу дію криптохромів та фототропінів на генетичні механізми регуляції цвітіння. Рослини, що були вирощені в освітленні червоного спектру показали зниження рівня експресії як генів цвітіння, так і маркеру репараційних процесів. Так як відомо, що видиме червоне світло поглинається фітохромами *PHYA-PHYE*, то ми можемо припустити, що фітохроми приймають участь у регуляції цвітіння рослин в умовах освітлення неповного спектру. Блакитне світло сприймається криптохромами *CRY1* і *CRY2*, але при зменшенні червоного спектра у світлі ми також спостерігали затримку у цвітінні, порівняно з вирощуванням рослин у білому світлі (Seiler et al. 2017).

Як відомо, ген *RAD51* відповідає за репараційні процеси після УФ-опромінення. Вирощування рослин при оранжевому приводить до збільшення активності гену *RAD51* (Рис. 3.4.1). В той час для світла фіолетового спектру, як для 24°C так і для 21°C стимулювання активності генів не відбувається. Це можливо пов'язано з тим, що довжина хвилі світла для вирощених в умовах короткохвильового освітлення має здатність подавляти репараційні процеси. Для гену *PCNA2*, відповідального за проліферацію клітин, за вирощування в освітленні червоного та оранжевого спектру спостерігається стимулювання поділу клітин, про що свідчить збільшення активності цього гену. Це явище можна пояснити залученням криптохромів та їх впливом на регуляцію цвітіння рослин. Гени циркадного годинника *CO* та *GI* аналогічно збільшують свою активність при вирощуванні в освітленні червоного та оранжевого спектру, що свідчить про взаємозв'язок циркадних ритмів та поділу клітин (Рис. 3.4.1).

УФ-С опромінення, навпаки, знижує активність генів *LFY* та *AP1*. Для рослин, вирощених в світлі червоного та оранжевого спектрах освітлення зниження активності генів детермінації флоральної меристеми може бути

пов'язане з тим залученням активності фітохромів в регуляцію цвітіння у *A. thaliana*.

За даними попередніх робіт, УФ-опромінення має вплив на біомасу, ефективність фотосинтезу та розмір листя у сільсько-господарських рослин (Teramura, Sullivan, 1994). Результати наших досліджень показують, що ультрафіолет також має істотний вплив на цвітіння рослин, що також має важливе значення для вирощування сільськогосподарських культур.

Недавні дослідження показали, що вирощування рослин у освітленні різних спектрів впливає на стресову стійкість у рослин (Muneer et al., 2018). Наші дані також підтверджують, що світло певного спектру впливає на відповідь рослин на дію стресового фактору.

Автори попередніх досліджень показали, що підвищені рівні УФ-випромінювання спричиняють істотні зміни росту та розвитку рослин та їх фізіології (Lovelli et al., 2017).

Але не з'ясованим залишається питання механізму участі фоторецепторів на активність генів цвітіння, що потребує проведення додаткових досліджень, більш детального вивчення взаємодії транскрипційних факторів що приймають участь у регуляції цвітіння рослин за різних умов культивування. Має інтерес для науки дослідження впливу умов вирощування рослин на відповідь на стресові чинники, такі як засуха, засоленість, оксидативний стрес. Ці дослідження допоможуть в майбутньому сформувати стресостійкі сорти сільськогосподарських рослин, які будуть пристосованими для умов змін клімату та здатними до вирощування в несприятливих куточках планети.

У висновку даного блоку зазначаємо, що УФ-С опромінення є супресором експресії генів *LFY* та *AP1*. Ми припускаємо, що у відповіді на УФ-С опромінення приймають участь відповідні фоторецептори, такі як фітохроми та криптохроми. Про це свідчать зміни в даних експресії досліджуваних генів, що ми можемо спостерігати для рослин, які вирощені за світла відповідних спектрів. Для рослин, вирощених в червоному та

оранжевому освітленні, зниження активності генів детермінації флоральної меристеми може бути пов'язане з тим залученням активності фітохромів в регуляцію цвітіння у *A. thaliana*. Наші дані підтверджують, що спектр світла впливає на відповідь рослин на дію стресового фактору.

3.5. Зміна експресії генів цвітіння рослин, вирощених у ґрунті за різних умов освітленості у відповідь на УФ-С

Як було вказано раніше, рослини піддаються впливу УФ-випромінювання, яке присутнє у сонячних променях. УФ-С включає хвилі, довжиною від 280 нм чи нижче. В природних умовах, ці високоенергетичні хвилі поглинаються озоном і не мають дії у складі сонячного світла на земній поверхні. Тому, у звичайних умовах вирощування сільськогосподарських рослин, вплив ультрафіолетового світла на рослини не спостерігається.

У попередніх дослідженнях авторів, було продемонстровано перспективу застосування ультрафіолетового опромінення (УФ-С) на парникові декоративні рослини. Дослідниками показано, перспективне використання УФ-С для збільшення гілок та зменшення висоти рослин, а в деяких ситуаціях дію на час цвітіння (Bridgen, 2016).

В даному підрозділі ми більш детально розглянемо вплив УФ-С опромінення на гени фотоперіодичного шляху детермінації цвітіння. Даний експеримент проводили на рослинах, вирощених у відкритому ґрунті за різних умов освітлення. Аналіз показників росту та вегетації показали відмінності у росту рослин та їх розвитку серед груп рослин, що були вирощені за дії різних умов опромінення.

За результатами фенологічних спостережень, проростки арабідопсиса вступали в фазу цвітіння 5.1 за класифікацією Боесса (2001) на 24 день вегетації (Табл. 3.5.1).

Табл. 3.5.1. Фенологічні зміни розвитку рослин *A. thaliana*, вирощених за умов освітлення різного спектру

Світло	Вік, дні	Фаза розвитку		Вік, дні	Фаза розвитку		Вік, дні	Фаза розвитку		Вік, дні	Фаза розвитку	
Червоне	24	3.8		27	5.1		31	6.1		36	8	
Інтенсивне біле		5.1			6.3			8			9	
Фіолетове		3.6			3.8			5.1			6.3	
Біле		3.6			3.8			5.1			6.3	

3.6. – розмір розетки становить 50% від остаточного; 3.8. – розмір розетки становить 80% від остаточного; 5.1 – бутонізація; 6.3. – 30% рослин мають відкриті квіти; 8.0 – плодоношення; 9.0 – в'янення.

Рослини з групи, вирощених в білому інтенсивному освітленні та при температурі 24°C вступали до фази бутонізації 5.1 згідно класифікації Бойеса (2001) на 24-й день вегетації (Табл. 3.5.1). Перехід до фази цвітіння 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. Рослини, що були вирощені за фіолетового освітлення 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 при температурі 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.

У *A. thaliana*, що були вирощені у білому світлі (20 Вт) за температури 24°C, початок фази бутонізації 5.1. було зафіксовано на 31-й день вегетації, фазу цвітіння 6.3 спостерігали на 36-й день (Табл. 3.5.1).

Впродовж періоду вегетації рослин, також проводили заміри довжини листа. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) показав, що існує статистично значущі відмінності між групами рослин, які були вирощені за різних умов освітлення (міжгруповий коефіцієнт $SS=1.04$, коефіцієнт в межах групи $SS=458.11$, $F_{\text{emp}} > F_{\text{crit}}$, $p < 0.05$). Характерні тренди продемонстровано на Рис. 3.5.1.

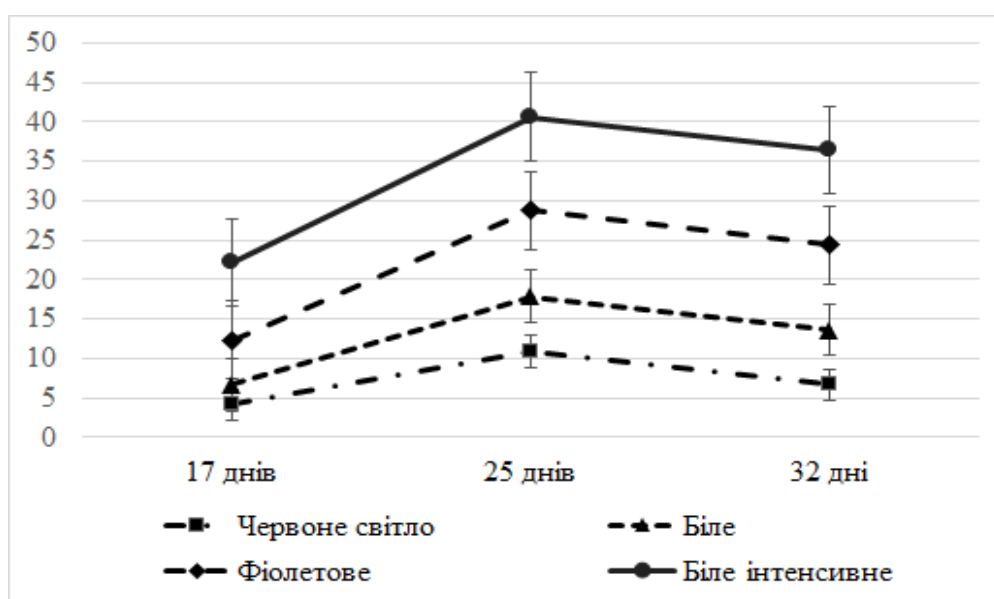


Рис. 3.5.1. Динаміка росту розеткового листа *A. thaliana* в залежності від умов освітлення.

За параметром довжини листа, рослини вирощені у червоному світлі мали статистично значущі відмінності від рослин, що були вирощені у білому світлі ($t_{\text{emp}} > t_{\text{crit}}$, $p < 0.05$), в той же час як було показано відмінності від групи проростків що зростали у інтенсивному білому світлі ($t_{\text{emp}} > t_{\text{crit}}$, $p < 0.05$) та фіолетовому ($t_{\text{emp}} > t_{\text{crit}}$, $p < 0.05$).

Довжина листя рослин, вирощених у білому світлі достовірно відрізнялася від рослин вирощених у білому світлі з більш високою потужністю ($t_{emp} > t_{crit}$, $p < 0.05$) та фіолетовому ($t_{emp} > t_{crit}$, $p < 0.05$).

Відповідно, довжина листа у рослин що зростали за білому світлі з більш високою потужністю відрізнялася від рослин, що вирощували у фіолетовому світлі ($t_{emp} > t_{crit}$, $p < 0.05$).

За даними літератури показано, що застосування ультрафіолетового опромінення може або затримати цвітіння, або спричинити більш раннє цвітіння, залежно від видів рослин та дози. У деяких випадках посилене розгалуження супроводжується затримкою цвітіння (Bridgen, 2016). В наших дослідженнях ми більш широко розкриваємо вплив УФ-С на цвітіння рослин та показуємо вплив чинника на молекулярно-генетичні механізми регуляції цвітіння.

За даними авторів попередніх досліджень впливу УФ-В на розвиток рослин (Zuk-Golaszewska et al., 2003), показано, що ультрафіолет призводить до зниження вмісту хлорофілу в листях, зменшення площі листа, та в деяких випадках викликає скручування листя та вкорочення пагонів рослин.

Порівняльний аналіз експресії ключових генів цвітіння показав деякі відмінності між контрольними та опромінення УФ-С групами ($p < 0,05$). Група рослин з білим освітленням показала зміни в рівнях експресії ключових генів цвітіння після дії УФ-С (Табл. 3.5.2-4).

Наприклад, для рослин вирощених у освітленні білого кольору:

а) рослини, опромінені протягом 1 хв променями УФ-С: експресія генів *RAD51* і *GI* підвищувалася в експериментальній групі, порівняно з рослинами контрольної групи, до рівня 2,936 і 1,49, відповідно. Проте, експресія гену *CO*, який бере участь у регуляції циркадного циклу, знижується з середнім коефіцієнтом 0,648 для експериментальних рослин (Табл. 3.5.2.).

Табл. 3.5.2. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин, що вирощені за білого освітлення, викликані УФ-С впродовж 1 хв.

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% С.І.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	2.936	1.939 - 4.492	1.490 - 5.841	0	↑
<i>AP1</i>	12.255	4.570 - 33.291	2.358 - 70.686	0.062	↑
<i>Co</i>	0.648	0.586 - 0.716	0.577 - 0.728	0	↓*
<i>Gi</i>	1.494	1.273 - 1.757	1.161 - 1.925	0	↑*
<i>FT</i>	1.233	0.665 - 2.286	0.424 - 3.793	0.667	↑
<i>PCNA2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

б) 3 хв УФ-С: активність генів *RAD51* і *AP1* стимулюється в експериментальній групі рослин середнім коефіцієнтом 5,519 і 31,685. Експресія генів *CO* і *GI* пригнічується у опромінених рослин за коефіцієнтом 0,49 і 0,561 (Табл. 3.5.3).

Порівняно з дією 1 хв УФ-С опромінення, ми спостерігаємо зниження експресії генів *CO* та *GI* зі збільшенням дози, що говорить про нелінійну дозову залежність впливу УФ-С опромінення на гени цвітіння *A. thaliana*.

Табл. 3.5.3 Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana* що вирощені за білого освітлення, викликані УФ-С впродовж 3 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% С.І.	P(H1)	Тренд
-----	-----------	-------------------	----------	-------	-------

<i>RAD51</i>	5.519	3.430 - 8.431	3.118 - 9.986	0.049	↑*
<i>AP1</i>	31.685	16.502 - 73.653	9.321 - 108.277	0	↑*
<i>CO</i>	0.49	0.383 - 0.564	0.377 - 0.572	0.034	↓*
<i>GI</i>	0.561	0.473 - 0.686	0.406 - 0.764	0.022	↓*
<i>FT</i>	0.998	0.625 - 1.933	0.426 - 2.255	0.918	↓
<i>PCNA2</i> **	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

в) 5 хв УФ-С: експресія генів *RAD51*, *AP1*, *CO* і *FT* стимулюється в експериментальних групах порівняно з контрольною групою з коефіцієнтом 46.869, 87.018, 137.253 і 6.15 порівняно (Табл. 3.5.4).

Зі збільшенням часу опромінення УФ-С до 5 хв ми спостерігаємо різке підвищення активності генів *AP1*, *CO* та *FT*, що вказує на те, що 5 хв УФ-С опромінення є ефективною дозою для впливу УФ-С на фотоперіодичний механізм регуляції цвітіння та циркадні годинники.

Результати наших досліджень узгоджуються також з даними попередніх авторів, які показують вплив УФ-В та озону на репродукцію рослин (Крупа, Jager, 1996). Проте, треба зазначити що УФ-С є більш жорстким стресовим фактором через високу інтенсивність та більшу прохідну здатність хвиль.

Табл. 3.5.4 Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за білого освітлення, викликані УФ-С впродовж 5 хв.

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	46.869	30.683 - 72.202	24.564 - 90.040	0	↑*
<i>AP1</i>	87.018	39.391 - 192.333	37.248 - 203.375	0	↑*
<i>CO</i>	137.253	110.717 - 179.260	109.005-182.074	0	↑*
<i>GI</i>	1.678	0.351 - 8.065	0.288 - 9.822	0.611	↑
<i>FT</i>	6.15	3.322 - 11.095	3.078 - 12.423	0.026	↑*
<i>PCNA2**</i>	1				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Якщо проаналізувати динаміку зміни експресії генів цвітіння рослин, то ми спостерігаємо нелінійну залежність, більшість досліджуваних генів демонструє різке підвищення експресії за 5 хв дії УФ-С випромінювання. Аналогічну тенденцію показано й для гену репарації *RAD51*, що свідчить про різку активізацію репараційних процесів. Також аналогічну тенденцію ми спостерігаємо для генів *CO* та *AP1*, які також демонструють різке підвищення рівня експресії за 5 хв опромінення УФ-С. Підвищення активності гену *AP1*, вірогідно казує на активізацію процесів диференціації апікальної меристеми по флоральному типу. Надмірна активність цього гену може пришвидчувати процеси перетворення клітин, що призведе до порушення комбінаторної взаємодії генів ABC-моделі. Така неузгодженість в результаті може порушити коректний процес формування органів квітки, що викличе затримку у часі цвітіння та негативно вплине на запилення та розвиток насінин.

Ген *CO* також демонструє чутливість до УФ-С впливу, що вказує на задіяння механізму циркадного годинника. Циркадні годинники є чутливою ланкою до впливу факторів довкулля, таких як освітлення, тому опромінення УФ-С має вплив на сприйняття сигналів навколишнього середовища рослинами.

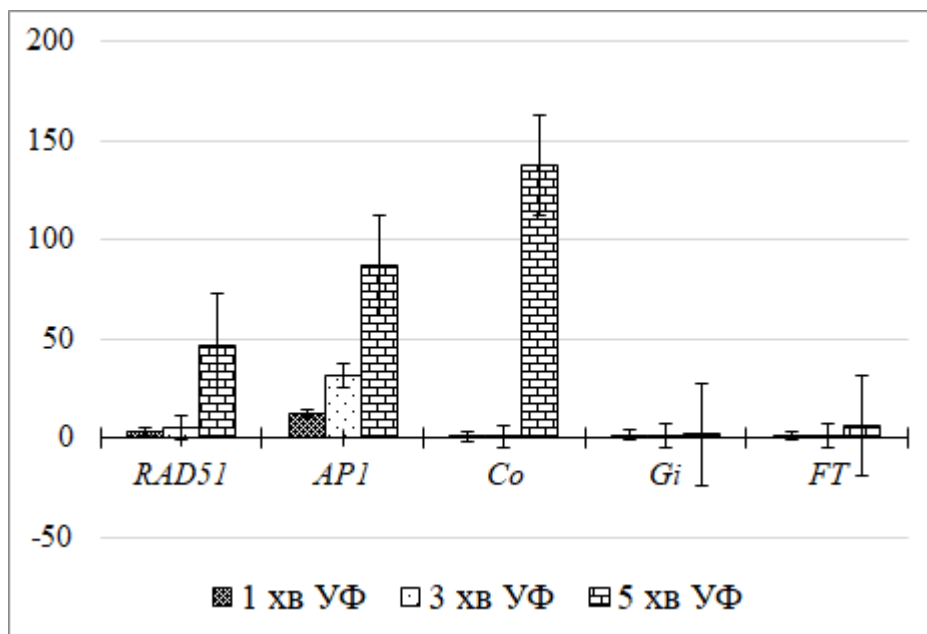


Рис. 3.5.2. Динаміка експресії генів цвітіння рослин *A. thaliana*, вирощених під білим світлом з УФ-С.

В наших дослідженнях, ми спостерігали ще одну особливість активності деяких генів цвітіння, репарації та проліферації у рослин, які культивували у фіолетовому освітленні після УФ-опромінення (Табл 3.5.5-7):

а) 1 хв УФ-С: експресія генів *API*, *GI* і *FT* в експериментальних групах знижується у порівнянні з рослинами контрольної групи (середній фактор 0,029, 0,444 і 0,074). Детальніше наведено у Табл. 3.5.5.

Табл. 3.5.5. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за фіолетового освітлення, викликані УФ-С впродовж 1 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	4.57	1.080 - 19.487	0.872 - 24.120	0.174	↑
<i>CO</i>	0.264	0.213 - 0.326	0.206 - 0.338	0.075	↓
<i>GI</i>	0.444	0.343 - 0.577	0.299 - 0.663	0	↓*
<i>FT</i>	0.074	0.047 - 0.117	0.044 - 0.125	0.041	↓*
<i>AP1</i>	0.029	0.020 - 0.038	0.018 - 0.041	0	↓
<i>ACT2**</i>	2.286				
<i>PCNA2**</i>	0.438				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

б) 3 хв УФ-С: активність гену *AP1* підвищується в дослідних групах (середній коефіцієнт 4,966). Дані наведено у Табл. 3.5.6.

Табл. 3.5.6. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за фіолетового освітлення, викликані УФ-С впродовж 3 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	4.455	1.017 - 19.538	0.929 - 21.385	0.268	↓
<i>CO</i>	0.467	0.402 - 0.543	0.388 - 0.562	0.077	↓
<i>GI</i>	1.236	1.045 - 1.462	0.930 - 1.647	0.183	↑

<i>FT</i>	0.949	0.755 - 1.192	0.707 - 1.274	0.772	↓
<i>AP1</i>	4.966	3.155 - 7.823	2.939 - 8.397	0.037	↑*
<i>ACT2**</i>	0.242				
<i>PCNA2**</i>	4.137				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

с) 5 хв УФ-С: експресія гену *FT* підвищується в експериментальній групі (у порівнянні з контрольною групою) відповідно середнього значення 1,748. Проте, експресія гену *CO* знижується до значення 0,401 в експериментальній групі (Табл. 3.5.7).

Дані демонструють різну ступінь відповіді досліджуваних генів на УФ-С опромінення для рослин, що вирощені у фіолетовому світлі. І хоча ген циркадного годинника *CO* демонструє зниження активності, то ген флорального фактору *FT* навпаки підвищується, що вказує відмінну дію чинника на різні ланки фотоперіодичного шляху. Також, за даної дози опромінення ми спостерігаємо тренд підвищення активності гену *RAD51*, що вказує на ймовірне активізацію репараційних процесів.

Табл. 3.5.7. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за фіолетового освітлення, викликані УФ-С впродовж 5 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
	я				

<i>RAD51</i>	4.462	1.030 - 19.387	0.904 - 22.069	0.283	↑
<i>CO</i>	0.401	0.340 - 0.471	0.329 - 0.488	0.042	↓
<i>GI</i>	0.792	0.700 - 0.896	0.640 - 0.982	0.135	↓
<i>FT</i>	1.748	1.579 - 1.936	1.480 - 2.065	0.022	↑*
<i>AP1</i>	4.18	3.893 - 4.489	3.687 - 4.743	0.057	↓
<i>ACT2**</i>	0.214				
<i>PCNA2**</i>	4.672				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

На рис. 3.5.3. ми спостерігаємо нелінійну залежність експресії генів цвітіння та репарації *A. thaliana* за різних доз УФ-С опромінення та відмінність у відповіді різних генів.

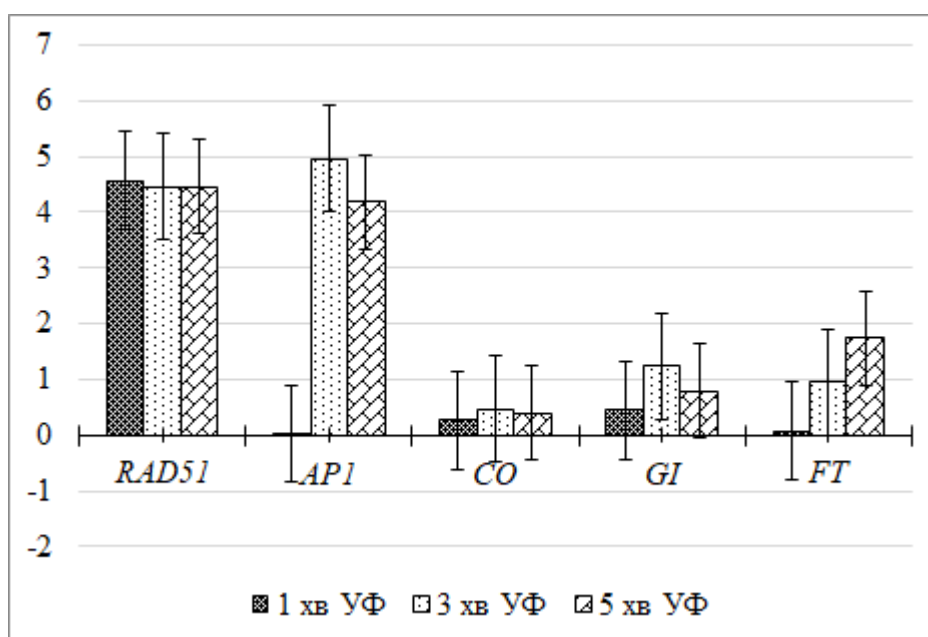


Рис. 3.5.3. Динаміка експресії генів цвітіння рослин *A. thaliana*, вирощених під фіолетовим світлом з УФ-С.

Так, ген *RAD51*, що відповідальний за репараційні процеси, стимулюється за усіх доз опромінення. Гени ТФ фотоперіодичного механізму детермінації цвітіння демонструють найбільший ступінь підвищення активності за 3 хв опромінення, що знижується при збільшенні часу опромінення до 5 хв.

Експресія ключових генів цвітіння після УФ-опромінення у рослин, що зростали у червоному світлі, описана в табл. 3.5.8-10. Порівнюючи тренди зміни активності досліджуваних генів рослин *A. thaliana*, зазначаємо, що крива «доза-ефект» у даному випадку також має нелінійний характер, проте виявлені відмінності у відповіді окремих генів на УФ-С опромінення.

а) 1 хв УФ-С опромінення: експресія гену *AP1* стимулюється до значення 2,782. Навпаки, активність генів *GI*, *CO*, *FT* і *RAD51* в експериментальних групах зменшується до значення 0,171, 0,134, 0,025 і 0,450, відповідно (Табл. 3.5.8.).

Табл. 3.5.8. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за червоного освітлення, викликані УФ-С впродовж 1 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	0.868	0.813 - 0.924	0.800 - 0.967	0.049	↓
<i>AP1</i>	2.782	2.419 - 3.309	2.329 - 3.436	0	↑
<i>CO</i>	0.134	0.104 - 0.166	0.101 - 0.179	0.034	↓
<i>GI</i>	0.171	0.157 - 0.191	0.151 - 0.194	0	↓*
<i>FT</i>	0.025	0.024 - 0.026	0.023 - 0.027	0	↓*
<i>ACT2**</i>	1.929				
<i>PCNA2**</i>	0.518				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Для гену репарації *RAD51*, на відміну від групи рослин, вирощених за фіолетового освітлення, за опромінення УФ-С впродовж 1 хв, спостерігається пригнічення активності. У рослин, вирощених за фіолетового освітлення, репараційні процеси навпаки стимулюються.

б) 3 хв УФ-С: *AP1* і *FT* знижується в експериментальних групах до середнього значення 0,586 і 0,445 у порівнянні з контрольною групою. Активність гену *CO* стимулюється до значення 2,644 (Табл.3.5.9).

Табл. 3.5.9. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за червоного освітлення, викликані УФ-С впродовж 3 хв.

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	0.759	0.629 - 0.876	0.591 - 0.993	0.153	↓
<i>AP1</i>	0.586	0.484 - 0.686	0.452 - 0.797	0	↓*
<i>CO</i>	2.644	2.486 - 2.890	2.434 - 2.955	0	↑
<i>GI</i>	2.552	2.386 - 2.780	2.236 - 2.897	0.097	
<i>FT</i>	0.445	0.372 - 0.533	0.347 - 0.572	0	↓*
<i>ACT2</i> **	0.76				
<i>PCNA2</i> **	1.316				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

с) 5 хв УФ-опромінення: експресія генів *FT* і *RAD51* регулюються в експериментальній групі до значення 5,214 і 1,914, відповідно (Табл. 3.5.10).

Табл. 3.5.10. Зміни експресії генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння у рослин *A. thaliana*, що вирощені за червоного освітлення, викликані УФ-С впродовж 5 хв

Ген	Експресія	Довірчий інтервал	95% C.I.	P(H1)	Тренд
<i>RAD51</i>	1,914	1.755 – 2.041	1.713 – 2,183	0	↑
<i>AP1</i>	1.368	0.915 – 1.978	0.783 – 2.432	0.195	
<i>CO</i>	0.794	0.547 – 1.117	0.531 – 1.203	0.345	↓
<i>GI</i>	1.518	1.334 – 1.760	1.283 – 1.786	0.054	
<i>FT</i>	5.214	3.962 – 6.861	3.824 – 7.108	0	↑
<i>ACT2**</i>	0.76				
<i>PCNA2**</i>	1.316				

↑* - достовірне підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓* - достовірне зниження експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↑ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

↓ - тренд підвищення експресії гену порівняно з референтним геном=1;

** - референсний ген.

Аналізуючи тренди змін експресії досліджуваних генів у рослин *A. thaliana*, які були попередньо вирощені за фіолетового освітлення (Рис. 3.5.2.) та червоного (Рис. 3.5.3.), можна помітити зміни у тенденціях відповіді, що вказує на вплив умов освітлення на відповідь генів цвітіння на УФ-С опромінення. Тренди в обох випадках мають нелінійних характер залежності, але відрізняються по деяким генам, таким як *RAD51*, *AP1* та *FT*.

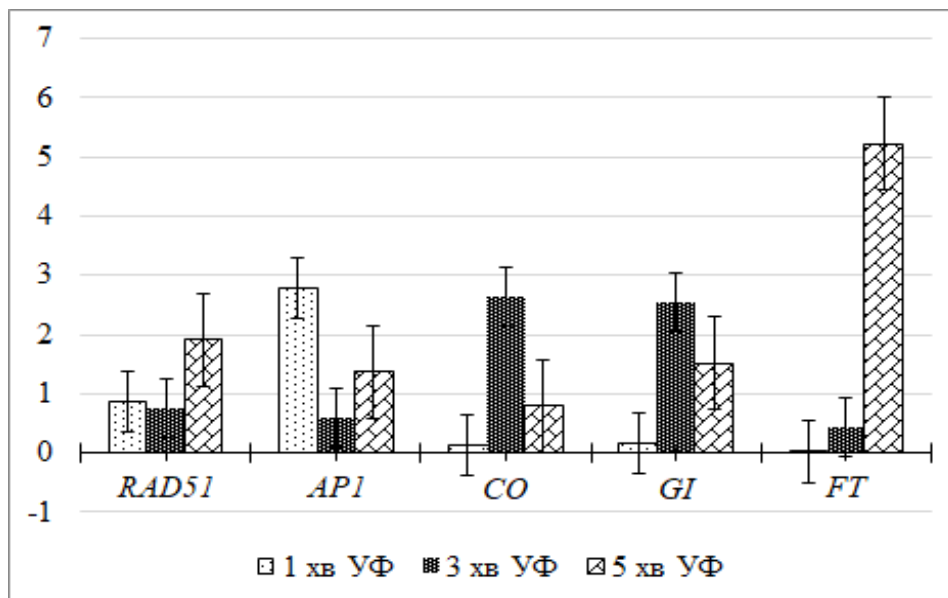


Рис. 3.5.3. Динаміка експресії генів цвітіння рослин *A. thaliana*, вирощених під червоним світлом з УФ-опроміненням.

Для генів *RAD51* та *FT*, у рослин, що вирощені за червоного світла, спостерігаємо пік підвищення активності за опромінення УФ-С впродовж 5 хв, а у рослин, вирощених за фіолетового освітлення, пік рівня експресії відповідає 3 хв опромінення УФ-С. Ген *AP1*, навпаки, демонструє найбільший рівень експресії за час опромінення UV-C 1 хв.

Спостереження за фенологічними змінами рослин свідчать про необхідність повного спектру сонячного світла для вчасної активації гена циркадних годин. Відомо, що фоторецептори PHYA-PHYE приймають видиме червоне світло. Ми припускаємо, що фітохроми також залучені до регулювання часу цвітіння, особливо у світла неповного спектрі. Фоторецептори CRY1 і CRY2 приймають блакитне світло (D'Amico-Damiao, Carvalho, 2018).

Однак зменшення кількості червоного світла при освітленні, викликане затримкою часу цвітіння, порівняно з часом цвітіння рослин, вирощених у білому світлі. Цю тему також було розкрито більш детально в останніх дослідженнях (Seiler, 2017).

Наші результати показали, що тенденції експресії досліджуваних генів цвітіння залежать від спектра світла. За нашими спостереженнями, експресія генів *AP1*, *GI*, *CO* і *RAD51* підвищувалася після дії стресового фактору. В той же час, значущих змін в активності генів *CO* і *FT*, що вказувало б на наявність відповіді на стресовий фактор, не спостерігалася.

Вважаємо, що виявлені в наших дослідженнях зміни активності генів залежать від умов освітлення. Окрім того, підвищення експресії гена *RAD51* вказує на активність процесів репарації в клітинах рослин після УФ-опромінення (Litvinov, Rasydov, 2017). Проте, 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 рослин.

Крім того, в наших експериментах не було виявлено значних змін експресії генів цвітіння після УФ-опромінення у *A. thaliana*, які культивували у фіолетовому світлі. Ми припускаємо, що у рослин, що було вирощено у червоному та фіолетовому освітленні, спостерігали різну відповідь з боку фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння через включення до реакції на стресовий чинник різних фоторецепторів. Наприклад, однакові дози УФ-опромінення викликають різні зміни тренду експресії гену *AP1* в різних групах (Рис. 3.5.2-5).

Як відомо, ген *RAD51* бере участь у процесах репарації після опромінення УФ та іонізуючого випромінювання. Зростання червоного світла викликає збільшення активності *RAD51* (табл. 3.5.3). У той же час підвищення активності гену *RAD51* у рослин, вирощених у фіолетовому та білому світлі, спостерігається лише на у випадку опромінення 5 хв УФ-опромінення. Це може бути пов'язано з довжиною хвилі освітленості. Ми вважаємо, що більш коротка довжина хвилі може пригнічувати процеси репарації в клітинах рослин.

Попередні дані показують, що опромінення УФ впливає на формування біомаси рослин, фотосинтез та розмір листків сільськогосподарських рослин (Teramura, Sullivan, 1994). Наші результати також продемонстрували, що УФ-випромінювання також суттєво впливає на процеси відновлення клітин та цвітіння. Інші автори, в останніх дослідженнях, повідомляють про аналогічні дані (Muneer et al., 2018). Вони показали, що різні умови освітлення впливають на стресостійкість рослин.

Наші результати узгоджуються з даними попередніх досліджень впливу УФ-С на розвиток та фенологію рослин. Автор показує, що кількість ультрафіолетового світла, яке отримує теплична рослина, є критичним для його реакції. Занадто висока дозування опромінення УФ-С буде спалювати рослини, а занадто низька не матиме ефекту. Правильне застосування ультрафіолетового світла зменшує кінцеву висоту рослини та збільшує розгалуження парникових рослин. При відповідному дозуванні світло УФ-С збільшує розгалуження деяких видів і збільшує кількість вирощених квітів. Це дозволяє уникнути необхідності прищипувати рослини та застосовувати регулятори росту рослин. Також, в даному дослідженні наголошується, що застосування ультрафіолетового опромінення може або затримати цвітіння, або спричинити більш раннє цвітіння, залежно від видів рослин та дози. У деяких випадках посилене розгалуження супроводжується затримкою цвітіння (Bridgen, 2016).

Однак, по теперішній час залишається актуальним питання про вплив фоторецепторів рослини на експресію генів фотоперіодичного шляху детермінації цвітіння під дією стресових факторів. Це явище потребує більш глибоких досліджень факторів транскрипції, які включені в регуляцію цвітіння. Питання впливу умов вирощування на реакцію рослин на стресові фактори є цікавим для науки і сільського господарства. Особливо цікавим для науковців є питання вирощування рослин в умовах посухи, підвищеної солоності та оксидативного стресу.

Подібні дослідження допоможуть в майбутньому створювати стресостійкі сорти сільськогосподарських рослин, які можна вирощувати в умовах зміни клімату або несприятливих місцях планети (Xie et al., 2019).

Узагальнюючи наведене, зазначимо, що в даних експериментах було виявлено зміни в експресії генів фотоперіодичного шляху регуляції цвітіння, які залежать від умов освітлення. Активність репараційних процесів після УФ-опромінення 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.

Різну відповідь з боку фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння спостерігали у рослин, які було вирощено у червоному та фіолетовому освітленні. Такі відмінності показано для тренду експресії гену диференціації флоральної меристеми *AP1*.

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.

Зміна у активності транскрипційних факторів MADS-box, що комбінаторно діють та приймають участь у цвітіння також має вплив і на інші процеси життєдіяльності клітини. Окрім функції регуляції цвітіння, вони також залучені до процесів росту, регуляції експресії інших генів (Klug et al. 1999). В нашій роботі ми акцентували увагу на дії іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на процес цвітіння рослин, тому участь даних ТФ на інші аспекти розвитку рослин є перспективним для проведення подальших досліджень.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Радіобіологічні ефекти вищих рослин викликають інтерес з боку як фундаментальної науки, так і в практиці сільського господарства. Радіобіологічні ефекти складають ієрархічну структуру з основних рівнів: молекулярно-генетичний, рівень індивідуальних ефектів на організм рослин, до яких можна віднести роботу функцій життєдіяльності, росту та розвитку, рівень репродукції, який складають ефекти ІВ на роботу генеративної системи рослин, утворення та розвиток насіння, трансгенераційні ефекти, популяційні ефекти. Основою прояву радіобіологічної відповіді є молекулярно-генетичні ефекти впливу ІВ та УФ-С, що на наступному рівні переходить на рівень індивідуальних ефектів в організмі рослини, та в подальшому викликає репродуктивні ефекти, що впливає на врожайність. В найбільш широкому рівні радіобіологічні ефекти проявляються в популяціях та рослинних угрупованнях.

В наших дослідженнях ми вивчали радіобіологічні ефекти на репродуктивному рівні рослин модельного об'єкта *A. thaliana*. Ключовим процесом у репродуктивній функції рослин є стадія цвітіння. Відомо, що в морфогенезі рослин, вона є однією з найбільш чутливих до стресових факторів. 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 *A. thaliana*, 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. 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.

В нашій роботі ми вивчаємо активність транскрипційних факторів на різних стадіях передачі флорального сигналу, від активації генів циркадного годинника подовженням світлового дня, до етапу детермінації апікальної меристеми по флоральному типу для формування органів квітки.

Метою дослідження було визначення активності генів *A. thaliana*, 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 (AP1)* 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. Ген *RAD51* має функцію репарації та приймає участь у рекомбінації у рослин та інших еукаріот. Залежність взаємодії цих генів та взаємозв'язок між досліджуваними ТФ показано на Рис.1.3.1.1. (Розділ 1), де продемонстровано схеми детермінації цвітіння у *A. thaliana* (Henderson, Dean, 2004). Наші дані показують вплив ІВ та УФ на різні етапи шляху детермінації цвітіння у *A. thaliana*, від механізмів сприйняття сигналів середовища, до механізму диференціації апікальної меристеми та розвитку органів квітки.

В даній 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 залежать від типу випромінювання, режиму та загальної дози опромінення.

За результатами проведених досліджень зазначаємо, що одноразове іонізуюче випромінювання у сублетальних дозах має стимулюючий ефект на більшість генів фотоперіодичного шляху цвітіння у арабідопсиса. За опромінення у дозі від 3 до 15 Гр було виявлено нелінійну залежність дії фактору на активність генів цвітіння. У дозі 15 Гр активність більшості генів знижувалася. Необхідно відмітити, що ген *AP1*, який пов'язаний з дифференціацією клітин апікальної меристеми по флоральному типу, значно стимулювався за дози у 6 Гр. Ми вважаємо, що занадто висока активність даного гена може викликати помилки при дифференціації клітин меристеми та призводити до порушення розвитку органів квітки.

У дослідженні впливу сигналінгу жасмонової кислоти нами було показано участь жасмонадів у активності відповіді генів цвітіння на опромінення. 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. Виявлено відмінності у профілях активностей генів у рослин ДТ та мутантів *jin1*. У мутантів з порушеннями сигналінгу жасмонової кислоти гени *CO*, *GI* знижують активність генів цвітіння у порівнянні з рослинами ДТ. На відміну від *AP1* та *FT*, які, навпаки, проявляють стимулюються за дії ІВ. Висунуто гіпотезу, що жасмонова кислота має стабілізуючий ефект на активність генів цвітіння у рослин *A. thaliana* за опромінення малими дозами. За даними проведених досліджень були виявлені відмінності у вегетативних показниках дослідних груп. 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.

Наші дослідження впливу хронічного пролонгованого опромінення ІВ показали, що іонізуюча радіація в хронічному режимі опромінення має вплив на фотоперіодичний механізм детермінації цвітіння у рослин. Підвищення експресії генів циркадного ритму *CO* та *GI* викликає раннє цвітіння. Пригнічення експресії гену *AP1*, навпаки, викликає затримку цвітіння під дією хронічного та гострого режимів опромінення. За дії низької дози хронічної радіації (3 сГр) стимулюється активність репараційних процесів, що слідує за активацією процесів поділу клітин. Проте, при підвищенні дози ІВ до 17 сГр за хронічного режиму опромінення 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 дослідях з вивчення ефектів дії гострого короткочасного режиму опромінення.

У рослин, що зростали та розвивалися за освітлення з різними спектрами та потужності фотосинтертично-активної радіації, показано різний рівень стійкості до подальшого УФ-С опромінення. Багаточисельні літературні дані, та результати наших досліджень показують, що УФ-опромінення є супресором експресії генів *LFY* та *AP1*. Ми припускаємо, що у відповіді на УФ-опромінення приймають участь відповідні фотосинтетичні структури, такі як фітохроми та криптохроми, що грають визначальну роль. Про це свідчать зміни в даних експресії досліджуваних генів цвітіння *CO*, *GI*, *FT*, *LFY* та *AP1*, що ми можемо спостерігати для

рослин, які вирощені у освітленні з різними спектрами світла. Для рослин, вирощених за світла червоного та оранжевого спектру зниження активності генів детермінації флоральної меристеми *LFY* та *AP1* може бути пов'язане з тим залученням активності фітохромів в регуляцію цвітіння у *A. thaliana*. Наші дані підтверджують, що освітлення відповідного спектру впливає на відповідь рослин на дію стресового фактору.

Більш детальні дослідження показали, що за дії УФ-С опромінення було виявлено зміни в експресії генів репарації та проліфераційної активності також залежать від умов освітлення. Активність репараційних процесів після УФ-опромінення 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 світла відповідного спектру, в якому вирощували рослини.

Ефект дії малих доз ІВ та УФ на даний час ще потребує детальних досліджень, особливо у частині молекулярно-генетичних досліджень. Відомо, що ефекти мішені за дії високих доз радіації викликають істотні пошкодження ДНК та інших макромолекул в клітинах рослин, що часто призводить до загибелі організму чи популяції. Відповідно, рослини з найбільш пошкодженим геномом елімінуються з популяції, що виключає можливість передачі в наступних поколіннях вантажу мутацій та пошкоджень ДНК. Елімінація радіочутливих видів є одним з механізмів відповіді екосистем на гостре опромінення ІВ, що спостерігали під час аварії на ЧАЕС.

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*, *AP1*, *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*, *AP1* 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 *AP1* знижується у мутанта по жасмонадному сигнальному шляху *jin1*, що безпосередньо вказує на участь сигналізу 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahmad M, Jarillo J, Smirnova O, Cashmore R. Cryptochrome blue-light photoreceptors of Arabidopsis implicated in phototropism. *Nature*. 1998. Vol. 392. P. 720–23.
2. Algina J, Olejnik S. Conducting power analyses for ANOVA and ANCOVA in between-subjects designs. *Evaluation & the Health Professions*. 2003. Vol. 26. N 3. P. 288-314.
3. Andrés F., Coupland G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*. 2012. Vol. 13. P. 627–639.
4. Bernier G, Périlleux C. A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal*. 2005. Vol. 3. №. 1. P. 3–16.
5. Boratyński Z., Arias J.M., Garcia C., Mappes T., Mousseau T.A., Møller A.P., Muñoz Pajares A.J., Piwczyński M., Tukalenko E. Ionizing radiation from Chernobyl affects development of wild carrot plants. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. Article number: 39282.
6. Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M. The ABC model of flower development: then and now. *Development*. 2012. Vol. 139. Is. 22. P.4095-4098.
7. Boyes D., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The plant cell online*. 2001. Vol. 13. №7. P. 1499–1510.
8. Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. Vol. 107. P. 101–9.
9. Bridgen M.P. Using ultraviolet-C (UV-C) irradiation on greenhouse ornamental plants for growth regulation. *Acta Hortic*. 2016. Vol. 1134. Vol. 49-56.

10. Bridgen M.P. Using ultraviolet-C (UV-C) irradiation on greenhouse ornamental plants for growth regulation. ISHS Acta Horticulturae. 2016. Vol. 1134: VIII International Symposium on Light in Horticulture.
11. Brown C, Schuerger A, Sager J. 1995. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting, J Am Soc Hortic Sci. Vol. 120. N.5. P. 808-13.
12. Cashmore A, Jarillo J, Wu Y, Liu D. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. 1999. Vol. 284. P. 760–66.
13. Chen D., Yan W., Fu L.Y., Kaufmann K. Architecture of gene regulatory networks controlling flower development in *Arabidopsis thaliana*. Nature Communications. 2018. Vol. 9. Article number: 4534.
14. Chen Y.T., Chang Ch.Ch., Chen Ch.W., Chen K.Ch., Chu Y.W. MADS-Box Gene Classification in Angiosperms by Clustering and Machine Learning Approaches. Front Genet. 2018. Vol. 9. N 707.
15. Cohena K., Miloa Sh., Sharmab Sh., Savidor A., Covoa Sh. Ribonucleotide reductase from *Fusarium oxysporum* does not Respond to DNA replication stress. DNA Repair. 2019. E102674.
16. Corrê M.P. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. An Bras Dermatol. 2015. Vol. 90. Is. 3. P. 297–310.
17. Cuany R.L., Sparrow A.H., Pond V. Genetic response of *Antirrhinum majus* to acute and chronic plant irradiation. Molecular Genetics and Genomics. 1958, Vol. 89, Is. 1. P. 7–13.
18. Czechowski T., Rajendra P., Stitt B.M., Scheible W.R., Udvardi M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. Plant Journal. 2004. Vol. 38, № 2. P. 366–379.
19. D’Amico-Damiao V., Carvalho R. F. Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants. Front Plant Sci. 2018, V. 9 P. 1897.

20. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, et al. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment. *J Proteome Res*. 2009. Vol. 8. No.6. P.2915–22.
21. 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.
22. De Micco V., Arena C., Pignalosa D., Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2011. Vol. 50. Is.1. P. 1–19.
23. Deng W., Ying H., Helliwell C.A., Taylor J.M., Peacock W.J., Dennis E.S. FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *PNAS*. 2011. Vol. 108. №16. P. 6680-6685.
24. Dent P., Reardon D.B., Park J.S., Bowers G., Logsdon C., Valerie K., Schmidt-Ullrich R. Radiation-induced Release of Transforming Growth Factor α Activates the Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Carcinoma Cells, Leading to Increased Proliferation and Protection from Radiation-induced Cell Death. *Mol Biol Cell*. 1999. Vol. 10. N. 8. P. 2493–2506. Panyutin I.V., Holar S.A., Neumann R.D., Panyutin I.G. Effect of ionizing radiation on the proliferation of human embryonic stem cells. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. Article number: 43995.
25. Dogu-Baykut E., Gunes G., Decker E.A. *Food Chem*. 2014. Vol. 15. N.157. P.167-73.
26. Dotto M., Casati P., Review: Developmental reprogramming by UV-B radiation in plants. *Plant Science*. 2017. P. 96-101.
27. Dotto M., Gómez M.S., Soto M.S., Casati P. UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 2018. Vol. 41. № 6. P. 1394-1406.
28. Dougher T, Bugbee B. 2001. Evidence for yellow light suppression of lettuce growth. *Photochem Photobiol*. Vol. 73. N 2. P.208-12.

29. Fina J, Casadevall R, Abdelgawad H, Prinsen E, Markakis M, Beemster G, Casati P. 2017. UV-B inhibits leaf growth through changes in growth regulating factors and gibberellin levels. *Plant Physiol.* 2017. Vol. 74. N 2. P.1110-1126.
30. Frohnmeier H, Staiger D. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. *Balancing Damage and Protection Plant Physiology.* 2003. Vol. 133. №4. P. 1420-1428.
31. Fukuda K., Morioka H., Imajou S, Ikeda S, Ohtsuka E, Tsurimoto T. Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1995. Vol. 270 N38. P.22527-34.
32. Gasperini A, Sanchez S, Doiron A, Lyles M, German G. Non-ionising UV light increases the optical density of hygroscopic self assembled DNA crystal films. *Scientific Reports, Springer US.* 2017. P. 1–10.
33. Ghetti F., Checcucci G., Bornman J.F. *Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models.* Springer Science & Business Media. 2006. 288 p.
34. Gill S.S., Anjum N.A., Gill R., Jha M., Tuteja N. DNA Damage and Repair in Plants under Ultraviolet and Ionizing Radiations. *The Scientific World Journal.* 2015. Article ID 250158. 11 p.
35. Golembeski G.S., Kinmonth-Schultz H.A., Song Y.H., Imaizumi T. Photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Adv Bot Res.* 2014. Vol. 72. P.1-28.
36. Gudkov S.V. Grinberg M.A., Sukhov V., Vodeneev V. Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. *Journal of Environmental Radioactivity.* 2019. Vol. 202. P. 8-24.
37. Gupta S.K., Sharma M., Deebe F., Pandey V. Plant Response. UV-B Radiation. 2017. P. 217–258.
38. Henderson I.R., Dean C. Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development.* 2004. Vol. 131 №16. P.3829-3839.

39. Heyndrickx K.S., de Velde J.V., Wang C., Weigel D., Vandepoele K. A Functional and Evolutionary Perspective on Transcription Factor Binding in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell. 2014. Vol. 26. № 10. P. 3894-3910
40. Hock M., Beckmann M., Hofmann R.R., Bruelheide H., Erfmeier A. Effects of UV-B radiation on germination characteristics in invasive plants in New Zealand. 2015. NeoBiota Vol. 26. P. 21-37.
41. Hollo F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. Micron. 2002. Vol. 33. №2. P. 179-97.
42. Huo H., Wei S., Bradford K.J. DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) Regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. Vol. 113. Is. 15. E2199–E2206.
43. Hwang S.G., Kim D.S., Kim J.B., Hwang J.E., Park H.M., Kim J.H., Jang C.S. Transcriptome analysis of reproductive-stage *Arabidopsis* plants exposed gamma-ray irradiation at various doses. International Journal of Radiation Biology. 2016. Vol. 92. No. 8. P:451-465.
44. Irish V. The ABC model of floral development. Current Biology. Elsevier Ltd. 2017. Vol. 27. R853–R909.
45. Irish V. The flowering of *Arabidopsis* flower development. The Plant Journal. 2010. Vol. 61. №6. P. 1014-28.
46. Jin Y., Liu L., Hao X., Harry D.E., Zheng Y., Huang Y., Huang J. Unravelling the MicroRNA-Mediated Gene Regulation in Developing *Pongamia* Seeds by High-Throughput Small RNA Profiling. Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. Is. 14. P. 3509.
47. Kanno A., Saeki H., Kameya T., Saedler H., Theissen G. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). Plant Molecular Biology. 2003. Vol. 52. Is. 4. P. 831–841.
48. Kaufmann K., Wellmer F., Muiño J.M., Ferrier T., Wuest S.E., Kumar V., Serrano-Mislata A. et al. Orchestration of Floral Initiation by APETALA1. Science. 2010. Vol. 328, Is. 5974. P. 85-89.

49. King R, Hisamatsu T, Goldschmidt E, Blundell C. 2008. The nature of floral signals in arabidopsis. I. Photosynthesis and a far-red photoreponse independently regulate flowering by increasing expression of FLOWERING LOCUS T (FT). J Exp Bot. 59 (14): 3811–20.
50. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, et al. Soybeans Grown in the Chernobyl Area Produce Fertile Seeds that Have Increased Heavy Metal Resistance and Modified Carbon Metabolism. PLoS ONE. 2012. Vol. 7. Is. 10.
51. Klug A. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. J Mol Biol. 1999. Vol. 293. N2. P. 215–8.
52. Kovalchuk I., Molinier J., Youli Y., Arkhipov A., Kovalchuk O. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. Mutation Research. 2007. Vol. 624. No. 1. P. 101–113.
53. Kravets A.P., Gatilova G.D., Grodzinskiĭ D.M. Dynamics of the yield of cytogenetic anomalies in the meristem of sprouts in chronic seed irradiation. Radiation Biology. Radioecology. 2008. Vol. 48. N 3. P. 313-317.
54. Kravets A.P., Sokolova D.A. Evaluation of Factors Indicating Epigenetic polymorphism through Population of Maize Seedlings. Cytology and genetics. 2018. Vol. 48. № 3. C. 31-38.
55. Krupa S.V., Jager H.J. Adverse effects of elevated levels of ultraviolet (UV)-B radiation and ozone (O₃) on crop growth and productivity. in book: Global climate change and agricultural production. FAO, Rome, Italy. 1996. Ch.7.
56. 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.
57. 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. P.1-9.

58. 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. P.46-51
59. Kurimoto T., Constable J.V., Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana*. Health Phys. 2010. Vol.99. N1. P:49-57.
60. Litvinov S., Rashydov N. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. genes AtKu70, AtRAD51 and AtRad1 to X-ray radiation. Journal of Agricultural Science and Technology. 2017, V. 7, P. 52–60.
61. Litvinov S.V., Rashydov N.M. The relative radiosensitivity of the mutant *Arabidopsis thaliana* Atmsh2 SALK_002708 in the range of sublethally doses of radiation exposure. Nuclear physics and energy. 2018. Vol. 19, No. 2. P. 145.
62. Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X, Lin C. Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. Genes and Development. 2011. Vol. 25. N 10. P. 1029–34.
63. Liu Ch., Xi W., Shen L., Tan C., Yu H. Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. Developmental Cell. 2009. Vol. 16. Is.5. P. 711-722.
64. Liu F., Xu Y., Zhou L., Ali As., Jiang H., Zhu S., Li X. DNA Repair Gene ZmRAD51A Improves Rice and Arabidopsis Resistance to Disease. Int J Mol Sci. 2019. Vol. 20. N. 4. P. 807.
65. Llorens L., Badenes-Pérez F.R., Julkunen-Tiitto R., Christian Z., Fereres A., Jansen M.A.K. The role of UV-B radiation in plant sexual reproduction. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 2015. Vol. 17. No. 3. P:243-254.
66. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues Analytical Biochemistry. 1987. Vol. 163 N. 1. P. 16-20
67. Lovelli S., Candido V., Scopa A. Effects of UV-C radiation on common dandelion and purple coneflower: First results. International Journal of Plant Biology. 2017. Vol. 8. N. 7255. P. 61-65

68. Mach J. A Petunia Twist on the ABC Model of Floral Organ Specification. *The Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 2237.
69. Marí-Beffa M., Knight J. Key Experiments in Practical Developmental Biology. Cambridge University Press. 2005. 382p.
70. Marín I., Castro I.L., Bartetzko L., Searle I., Coupland G., Stitt M., Osuna D. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*. 2011. Vol. 233. No. 3. P:539–552.
71. Mattson N.S., Erwin J.E. The impact of photoperiod and irradiance on flowering of several herbaceous ornamentals. *Scientia Horticulturae*. 2005. Vol. 104. N 3. P. 275-292.
72. McCormick F., Platt R.B. Effects of ionizing radiation on a natural plant community. *Radiation Botany*. 1962. Vol. 2. Is. 3. P. 161-164.
73. Muneer S., Park Y.G., Jeong B.R. Red and blue light emitting diodes (leds) participate in mitigation of hyperhydricity in in vitro-grown carnation genotypes (*dianthus caryophyllus*). *Journal of plant growth regulation*. 2018. Vol.37. Iss.2. P. 370–379.
74. Murai K. Homeotic Genes and the ABCDE Model for Floral Organ Formation in Wheat. *Plants (Basel)*. 2013. Vol. 2. N.3. P. 379–395.
75. Ó'Maoiléidigh D.S., Graciet E., Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytologist*. 2014. Vol. 201. P. 16–30.
76. Parenicova L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New openings to the MADS world. *The Plant Cell Online*. Vol. 15. N. 7. 2003. P. 1538.
77. Pelaz S., Tapia-López R., Ralvarez-Buylla E., Fyanofsky M. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 2001. Vol. 11, Is. 3. P. 182-184.
78. Pfaffl M, Horgan G, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30. N. 9. e36.

79. Rashydov N. et al. Radiobiological characterization environment around object "Shelter". Chapter 7 in Nuclear Power Plant, edit. by Soon Heung Chang, 2012. P. 231-279.
80. Rashydov N., Kliuchnikov O., Seniuk O. et al. Radiobiological characterization environment around object "Shelter". Chapter 7 in Nuclear Power Plant, edit. by Soon Heung Chang. 2012. p. 231-279.
81. 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 phytocomposites as radioprotector against acute and chronic irradiation. Journal of Radiation Researches. 2019. Vol.6. №1, P. 11-20.
82. Real A., Sundell-Bergman S. Knowles J.F., Woodhead D.S., Zinge I. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. J. Radiol. Prot. 2004. Vol. 24. P. 123–137.
83. REST 2009 Software User Guide, QIAGEN GmbH. 2009. 28 p
84. Riboni M, Test AR, Galbiati M, Tonelli C, Conti L. Environmental stress and flowering time: The photoperiodic connection. Plant Signaling & Behavior. 2014. Vol. P. 1–5.
85. Rosa M., Scheid O. M. DNA Damage Sensitivity Assays with Arabidopsis Seedlings. Bio-protocol. 2014. Vol. 4. N7. P. e1093.
86. Rosa M., Von Harder M., Cigliano R.A., Schlögelhofer P., Scheid O.M. The Arabidopsis SWR1 Chromatin-Remodeling Complex Is Important for DNA Repair, Somatic Recombination, and Meiosis. The Plant Cell. 2013. Vol. 25. N 6. P. 1990-2001.
87. Rozema J, Lenssen G, Van De Staaij J, Tosserams M, Visser A, Broekman R. Effects of UV-B radiation on terrestrial plants and ecosystems: interaction with CO₂ enrichment. Plant Ecology. 1997. Vol. 128. P. 183–91.
88. Sampson B, Cane J. Impact of enhanced ultraviolet-B radiation on flower, pollen, and nectar production. American Journal of Botany. 1999. Vol.86. N 1. P. 108–14.

89. Sasaki E., Frommlet F., Nordborg M. The genetic architecture of the network underlying flowering time variation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2017.
90. Sawangmee W., Taychasinpitak Th., Jompuk P., Kikuchi Sh. Effects of Gamma-ray Irradiation in Plant Morphology of Interspecific Hybrids between *Torenia fournieri* and *Torenia baillonii*. *Kasetsart J. Nat. Sci.*. 2011. Vol. 45. P. 803 - 810.
91. Schmidt-Ullrich R.K., Mikkelsen R.B., Dent P., Todd D.G., Valerie K., Kavanagh B.D., Contessa J.N., Rorrer W.K., Chen P.B. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene*. 1997. Vol. 15. P. 1191-1197.
92. Schurtenberger P., Egelhaaf S.U., Hindges R., Maga G., Jónsson Z.O., May R.P., Glatter O., Hübscher U. The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering. *J Mol Biol*. 1998. Vol. 275. N:123-32.
93. Scrima A., Koníčková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey Ph.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P., Thomä N.H. Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the *DDB1–DDB2* Complex. *Cell*. 2008. Vol. 135. Is. 7. P. 1213-1223.
94. Seiler F., Soll J., Bölter B., Comparative Phenotypical and Molecular Analyses of *Arabidopsis* Grown under Fluorescent and LED Light. *Plants (Basel)*. 2017. Vol. 6. No.2. E24.
95. Shim J.S., Kubota A., Imaizumi T. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. *Plant Physiology*. 2017. Vol. 173. № 1. P. 5-15.
96. Sinhaa R.P., Häder D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2002. Vol.1. P. 225-236.
97. Siriwardana N.S., Lamb R.S. The poetry of reproduction: the role of LEAFY in *Arabidopsis thaliana* flower formation. *Int. J. Dev. Biol*. 2012. Vol. 56. P. 207 - 221.

98. Soltis D.E., Chanderbali A.S., Kim S., Buzgo M., Soltis P.S. The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms. *Annals of Botany*. 2007. Vol. 100. Is. 2. P.: 155–163.
99. Song Y, Ito Sh, Imaizumi T. Flowering time regulation: in leaves. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. 2013. Vol. 18. №10. P. 575–83.
100. Song Y. H., Shim J. S., Kinmonth-Schultz H. A., Imaizumi, T. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. Vol. 66. P. 441–464.
101. Song Y.H., Kubota A., Kwon M.S., Covington M.F., Lee N., Taagen E.R., Cintrón D.L., Hwang D.Y. Molecular basis of flowering under natural long-day conditions in *Arabidopsis*. *Nature Plants*. 2018. Vol.4. P. 824–835.
102. Stapleton A.E. Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *The Plant Cell*. 1992. Vol. 4. P. 1353-1358.
103. Strzalka W., Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.* 2011. Vol. 107. N7. P. 1127–1140.
104. Sulpice R., Tsukaya H., Nonaka H., Mustardy L., Chen T.H., Murata N. Enhanced formation of flowers in salt-stressed *Arabidopsis* after genetic engineering of the synthesis of glycine betaine. *Plant J.* 2003. Vol. 36. N2. P. 165-76.
105. Svobodová A.R., Galandáková A., Šianská J., Doležal D., Lichnovská R., Ulrichová J., Vostálová J. DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. *Archives of Dermatological Research*. 2012. Vol. 304. Is. 5. P. 407–412.
106. Takeno K. Stress-induced flowering. In *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. 2012. P. 331–345.
107. Takeno K. Stress-induced flowering: The third category of flowering response. *Journal of Experimental Botany*. 2016. Vol. 67, No. 17. P:4925–4934.

108. Teramura A., Sullivan J.H. Effects of UV-B Radiation on Photosynthesis and Growth of Terrestrial Plants. *Photosynthesis Research*. 1994. Vol. 39. Iss. 3. P. 463–473.
109. The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. Vol. 408. N 6814. P. 796–815.
110. Ulm R., Jenkins G.I. Q&A: How do plants sense and respond to UV-B radiation? *BMC Biol*. 2015. №13. P. 45.
111. Valentim F, Mourik S, Posé D, Kim M, Schmid M, van Ham R, Busscher M, Sanchez-Perez G, Molenaar J, Angenent G, Immink R, van Dijk A. A quantitative and dynamic model of the Arabidopsis flowering time gene regulatory network. *PLoS One*. 2015. Vol. 10. №2. P. E0116973.
112. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schöffl F. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J. Experiment. Bot*. 2003. V.54 P. 2343-2349.
113. Wils C.R., Kaufmann K. Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2017. Vol. 1860, Is. 1. P. 95-105.
114. Wing S.L., Boucher L.D.. Ecological aspects of the cretaceous flowering plant radiation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. Vol. 26. P. 379-421.
115. Xie Z., Charles M.T., Charlebois D., Rolland D., Roussel D., Deschênes M., Dubé C., Khanizadeh S., Fan J. Preharvest exposure to UV-C radiation: impact on strawberry fruit quality. *Acta Hortic*. Vol. 1079. P. 589-592.
116. Xu M.Y., Zhang L., Li W.W., Hu X.L., Wang M.B. Fan Y.L., Zhang Ch.Y., Wang L. Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65. №. 1. P. 89–101.

117. Yan W., Chen D., Kaufmann K. Molecular mechanisms of floral organ specification by MADS domain proteins. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016. Vol. 29. P. 154-162.
118. Yang Y., Jiang Zh, Guo J., Yang X., Xu N., Chen Zh., Hao J., Li J., Pang J., Shen Ch., Xu M. Transcriptomic analyses of *Chrysanthemum morifolium* Ramat under UV-B radiation treatment reveal variations in the metabolisms associated with bioactive components. *Industrial Crops and Products*. 2018. Vol. 124. P. 475–486.
119. Yano A., Fujiwara K., Plant lighting system with five wavelength-band light-emitting diodes providing photon flux density and mixing ratio control. *Plant Methods*. 2012. Vol. 8. P. 46.
120. Yastreba T.O., Kolupaev Yu.E., Shvidenko N.V., Dmitriev A.P. Action of methyl jasmonate and salt stress on antioxidant system of *Arabidopsis* plants defective in jasmonate signaling genes. *Ukr. Biochem. J.* 2018. Vol. 90. N 5. P.50-59.
121. Zlatev Zl.S., Lidon F.J.C., Kaimakanova M. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emir. J. Food Agric.* 2012. Vol. 24, №6. P. 481-501.
122. Zuk-Golaszewska K., Upadhyaya M.K., Golaszewski J. The effect of UV-B radiation on plant growth and development. *PLANT SOIL ENVIRON.* 2003. Vol. 49. Is.3. P. 135–140.
123. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) научное приборостроение. 2006. Т. 16. № 3. С. 132–136.
124. Али-заде Г.И. Влияние УФ-С и УФ-В излучений на первичные процессы фотосинтеза и каталазную активность в клетках *Dunaliella*. *Современные проблемы науки и образования*. 2009. №4. 174 с.
125. Белов А.А. Воздействие загрязнения природной среды радионуклидами на древесно-кустарниковую растительность. *Радиационная экология леса*. 2012. №2. С.19-31.

126. Богданов И.М., Сорокина М.А., Маслюк А.И. Проблема оценки эффектов воздействия «малых» доз ионизирующего излучения. Бюллетень сибирской медицины. 2005. № 2. С. 145-151.
127. Буй Д.Д., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Простой малозатратный метод выделения РНК из растительного материала. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Т. 19. С. 93-96.
128. Васильев Д.В., Кузьменков А.Г., Дикарева Н.С., Гераськин С.А. Влияние хронического облучения и погодных условий на популяции сосны обыкновенной произрастающие на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Научное обозрение. Биологические науки. 2016. № 6. С. 14-19.
129. Герман Е.Ю., Долгова Т.А. Исследования по цитофизиологии и радиационной генетике растений на биостанции Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2014. Вип. 20. №1100. С.: 22-28.
130. Гродзинський Д.М. Вісн. НАН України. 2011. N 5. С.12-17.
131. Гродзинський Д.М. Індуковані гострим та хронічним гамма опроміненням пошкодження генеративної системи у *Arabidopsis thaliana* (р. Columbia). III з'їзд з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія), Київ, 21-25 трав. 2003. 2003. С. 180.
132. Гродзинський Д.М. Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: монографія; Ін-т клітин.біології та генет. інженерії НАН України. К.: Наук. думка. 2008. 373 с.
133. Гродзинський Д.М., Дембновецький О.Ф., Левчук О.М., Пацюк Ф.Н. Радіобіологічні та радіоекологічні дослідження Чорнобильської катастрофи вченими НАН України. Вісн. НАН України. 2012. № 6. С. 30-40.
134. Гродзинський Д.М., Шиліна Ю.В., Міхєєв О.М., Гуща М.І. Радіаційний гормезис – ретроспектива і сучасність. Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. 2005. № 3. Ч. 2. С. 17-30.

135. Гродзинський, Д.М., Гуща, М.І., Дмитрієв, О.П., Коломієць, О.Д., Кравець, О.А., Кравець, О.П., Кутлахмедов, Ю.О., Куцоконь, Н.К., Міхєєв, О.М., Пчеловська, С.А. and Рашидов, Н.М., 2008. Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: наук. вид. К.: Наук. думка. 2008. 373 с.
136. Гудков И.Н., Гродзинский Д.М. Радиобиологические эффекты у растений в зоне радиационного влияния аварии на Чернобыльской АЭС сегодня. Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз: матеріали міжнар. конф., Київ, 22-24 берез. 2005 р. К.: Вид-во НЦРМ АМН України 2005. С. 122-128.
137. Гудков І.М., Кудяшева А.Г. Вплив радіоактивного забруднення середовища природними і штучними радіонуклідами на наземні угруповання рослин та тварин. Науковий журнал «Біологічні системи: теорія та інновації». 2018. Т. 270. С. 31-44.
138. Давиденко В. М. Радіобіологія. Миколаїв: Видав. МДАУ. 2011. 265 с.
139. Дергилев А. А., Палыга Г. Ф., Чибисова О. Ф., Иванов В. Л., Панфилова В. В., Жаворонков Л. П. Радиация и сперматогенез: экспериментальная оценка онтогенетических эффектов при остром облучении в нестерилизующих дозах. Радиация и риск (Бюллетень НРЭР). 2012. Т. 21. №4. С. 1-10.
140. Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М., Гуща И.И., Крыжановская М.С. Влияние хронического облучения на устойчивость растений к биотическому стрессу в 30-километровой зоне отчуждения Чернобыльской АЭС. Физиология растений. 2011. Т. 58. №6. С. 922–929.
141. 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.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. 284с

142. Журавская А.Н. Биологические эффекты малых доз ионизирующих излучений (обзор). Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2016. № 2 (82). С. 94-102.
143. Ивановский Ю.А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? Вестник ДВО РАН. 2006. №6. С.86-91.
144. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Луговая А.А. Роль жасмонатов в адаптации растений к действию абиотических стрессоров. Физиология растений и генетика. 2016. Т. 48. № 2. С. 95-111.
145. Кравец А.П., Соколова Д.А, Венгжен Г.С., Гродзинский Д.М. Изменение профиля метилирования ДНК при фракционированном УФ-С облучении проростков. Цитология и генетика. 2013. Т. 47. № 1. С. 37–43.
146. Кравец А.П., Соколова Д.А., Венгжен Г.С., Гродзинский Д. М. Влияние фракционированного УФ-С облучения на изменение профиля метилирования функционально различных последовательностей ДНК и выход нестабильных хромосомных aberrаций у проростков кукурузы. Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. №6. С. 583 – 591.
147. Кравец Е.А., Михеев А.Н., Овсянникова Л.Г. , Гродзинский Д.М. Критический уровень радиационного повреждения апикальной меристемы корня и механизмы ее восстановления у *Pisum sativum* L. Цитология и генетика. 2011. № 1. С. 24-34.
148. Кривохижа М.В., Рашидов Н.М., Зміна експресії генів цвітіння у відповідь на УФ-С опромінення рослин *Arabidopsps thaliana* вирощених за різних умов освітленості та температурного режиму. Biologicalsytems. Vol. 10. Is. 1. 2018
149. Літвінов С. В., Кривохижа М. В., Кухарський В. М., Рашидов Н. М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018. Том. 2. Вип. 73. С. 157-163

150. Лопатина А.Б. Химические основы проведения полимеразной цепной реакции. *Advances in current natural sciences*. 2016. № 4. С.38-42
151. Мамедли С., Гродзинский Д. Роль типа опыления в проявлении радиационно-индуцированной нестабильности генома у растений. *Доп НАН України*. 2007. Вип 7. С. 165–70.
152. Михеев А.Н. Модификация онтогенетической адаптации. Киев: Фитосоциоцентр, 2018. 396 с.
153. Раздайковин А. Н., Белов А. А. Сравнительный анализ состояния древостоев сосны Брянской обл. при разной плотности загрязнения почвы цезием-137. *Радиационная экология леса*. 2012. №1. С. 16-20.
154. Раскоша О.В., Башлыкова Л.А. Цитогенетические эффекты хронического воздействия ионизирующего излучения в малых дозах. *Современные проблемы науки и образования*. 2017. № 4.
155. Сверстюк А.С, Бігуняк Т.В., Перевізник Б.О. Огляд методів та моделей полімеразно-ланцюгової реакції. *Медична інформатика та інженерія*. 2014. С. 97-100
156. Тертышная Ю.В., Левина Н.С., Елизарова О.В. Воздействие ультрафиолетового излучения на всхожесть и ростовые процессы семян пшеницы. *С/х машины и технологии*. 2017. № 2. С.31-36.
157. Шевченко В. А., Печкуренок В.Л., Абрамов В.И. Радиационная генетика природных популяций: Генетические последствия Кыштымской аварии. М.: Наука, 1993. 218 с.
158. Шмакова Н.Л., Насонова Е.А., Красавин Е.А., Мельникова Л.А., Фадеева Т.А. Индукция хромосомных aberrаций и микроядер в лимфоцитах периферической крови человека при действии малых доз излучения. *Препринт Объединенного института ядерных исследований*. Дубна. 2003. 20с.