

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

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Нестеренко Олена Геннадіївна

УДК 577.218

ДИСЕРТАЦІЯ

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

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

Нестеренко О.Г.

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

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Нестеренко О. Г. Модифікація радіобіологічних реакцій рослин гороху (*Pisum sativum* L.) абіотичними стресорами. –Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

У дослідженні порівнювалася біохімічна, генетична та морфологічна відповідь рослин *Pisum sativum* L. на вплив стресовими чинниками, а саме гостре іонізуюче опромінення у комбінації з засоленням або гіпертермічним шоком. Продемонстроване суттєве відхилення від аддитивності у бік синергізму або антагонізму по ростовим показникам проростків гороху. Дані по морфометричним показникам, рівень відхилення реакцій проростків гороху від адитивності в бік синергізму або антагонізму, що особливо помітне на 2 та 8 день після впливу стресорами, може вказувати на прояви явища кроссток (взаємодії сигнальних систем у процесі пошуку та формування відповіді організму на подразники). Іонізуюче випромінювання (ІВ) відіграє вирішальну роль у формуванні ростових реакцій. Попередній вплив іонізуючого опромінення модифікує та підвищує стійкість проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів, однак це явище має тимчасовий характер.

Використовуючи кількісний аналіз вільної амінокислоти проліну як стресового маркера та вторинного метаболіту, що має протекторні властивості, нами було показано наступне. Концентрація проліну у відповідь на гостре іонізуюче опромінення змінювалася не так істотно, як при дії засолення або їх комбінації. Коефіцієнт кореляції між концентрацією пролінута вмістом води становив $r = -0,87$, але з часом рівень води в рослинах відновлювався і стабілізувався приблизно $r = 0,32$ на 34-й день експерименту.

Нелінійний зв'язок між ростовими реакціями і концентрацією проліну може свідчити про наявність інших (специфічних) адаптивних реакцій рослин на стрес, тобто виникаюча «перехресна нарада» між сигнальними системами може призвести до зміни рівня речовин, що впливають на синтез проліну та його деградацію, сигнал трансдукції та адаптивний потенціал рослини в цілому.

Різні типи стресу та його комбінації можуть активувати ретротранспозони рослин і привести до їх проліферації, зруйнувавши епігенетичний сайленсінг. Найбільш активна реакція - поява нових ампліконів LTR-ретротранспозонів - виявилася на вплив іонізуючого опромінення у низьких 5 Гр та високих 20-25 Гр дозах у поєднанні з засоленням та без нього, а також нагрівання та осмотичного шоку окремо.

Запропонований нами аналіз протеомічних даних показав, що засолення, іонізуюче опромінення та їх комбінація суттєво впливають на зміну (як якісну, так і кількісну) складу синтезованих білків проростків гороху. У результаті виділення білків та проведеного аналізу 2-ВЕ електрофореграм було виокремлено 223 білкові плями, з яких 54 статистично достовірно відрізнялися від контролю або між собою хоча б для однієї з експериментальних груп.

Концентрація більшості білків змінюється у відповідь на комбінований вплив іонізуючої радіації та засолення. Серед досліджуваних білків виявилось і ті, що є складовими декількох сигнальних систем (шляхів). Найпоширенішим типом взаємодії стресорів виявилася кооперативна антагоністична взаємодія (141 білок), некооперативна адитивна або мультиплікативна (28 та 34 білків відповідно) зустрічалися рідше, некооперативна синергічна взаємодія була характерна лише для 20 білків. Це вказує на складні механізми взаємодій сигнальних систем під час формування відповіді рослин на вплив стресових факторів.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі перше використано комплексний системний підхід до аналізу рослинних реакцій на

комбіновані пошкоджуючі абіотичні впливи, а саме модифікацію ефектів ІВ короткочасною гіпертермією/засоленням у проростків гороху.

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

Вперше визначено білки, що є спільними для сигнальних систем, індукованими дією на проростки гороху ІВ, засоленням, гіпертермією. Вперше показано, що найпоширенішим типом взаємодії ІВ та досліджуваних абіотичних стресорів є кооперативна антагоністична взаємодія.

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

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

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

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

Список публікацій за темою дисертації:

1. Дмитрієв О.П., Кравець О.П., Рашидов Н.М., Бубряк І.І., Гуща М.І., Данченко М.М., Соколова Д.О., Шиліна Ю.В., Бережна В.В., Бубряк О.І., Дяченко А.І., Кривохижа М.В., Літвінов С.В., Нестеренко О.Г., Сакада В.І. Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія – К.: Паливода А.В. 2018. 284с.
2. Nesterenko, O. , Rashydov, N. Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation. International Journal of Secondary Metabolite. 2018.;5(2):94-108.
3. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Реакція рослин гороху на дію сольового і термічного стресових факторів залежно від попереднього іонізуючого опромінення ISSN 1996-4536 Біологічні Студії / Studia Biologica. 2018;12(1):65–72.
4. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М., Літвінов С.В.. Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин гороху під впливом абіотичних стресових факторів. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018;74:75-81.
5. Нестеренко О.Г., Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зміна експресії білків під час взаємодії сигнальних систем у проростків гороху під впливом

- стресових факторів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:154-162.
6. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Визначення кореляції між вмістом проліну та води у коренях *Pisum sativum* L. під впливом абіотичних стресових факторів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2017;2(9):192-196.
 7. N. Rashydov, O. Nesterenko The Problems Sustainable Remediation Of The Chernobyl Alienation Areas. Journal of Radiation Researches. Baku. 2018;5(2):13-25.
 8. Nesterenko O.G., Grodzinsky D.M. Combined effects of stress-factors (hyperthermia, UV-irradiation and salinity) on growth reactions of plants. In: 3 Intern. Conf. "Modern problems of biology, ecology and chemistry". Zaporizhya, Ukraine. May 11-13, 2012. p.83.
 9. Nesterenko O.G. Specific and nonspecific components of the plant response to the action of several stressors. In: Ukr. Sci. Conf. "Advances in botany and ecology", Uman, 9–12 September, 2014. p. 134.
 10. Нестеренко О., Ланчикова В., Рашидов Н., Гродзинський Д. Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин під впливом стресових чинників на фоні іонізуючого опромінення та без нього. У: VI з'їзд Радіобіологічного Товариства України. Київ, 5-9 жовтня 2015р. с. 97.
 11. Шевченко В.В., Літвінов С.В, Бережна В.В., Сакада В.И., Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М. Трансгенераційна пам'ять репродуктивних органів рослин на вплив стрес фактора. У: Науково-практична конференція з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм». м. Долина, Івано-Франківська обл., Україна. 4-7 жовтня 2016 р. с. 61.
 12. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М., Гродзинський Д. М. Уровень проявления ростовых реакций и концентрации эндогенного пролина у проростков гороха в ответ на разные комбинации стрессоров. У: 23

Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України. Київ, 1-5 лютого 2016 р. с.185.

13. Нестеренко Е.Г., Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Сравнительный протеомный анализ реакции проростков *P. sativum* L. на действие стрессовых факторов. У: Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України. Київ, 10 - 13 квітня 2017 р. с. 207-208.
14. Nesterenko O., Majercikova V., Klubicova K., Rashydov N. Speculations of the correlation of proline accumulation and water content in pea seedlings under combination of stress factors. In: Scientific & practical Seminar with international participation «Stress Factors & Secondary Metabolites». Kyiv, Ukraine. December 11-15, 2017. p. 8-22.
15. Nesterenko O., Danchenko M., Majercikova V., Rashydov N., Klubicova K. Proteomics approach of crosstalk in cell signaling investigation. In: “Symposium on Euroasian Biodiversity”, Kyiv. July 3-6, 2018. p. 390.
16. Нестеренко О.Г., Худолєєва Л.В., Хома Ю.А., Рашидов Н.М. Аномалії будови рослин гороху, викликані гострим іонізуючим опроміненням у поєднанні з засоленням чи гіпертермією. У: 7 з’їзд Радіобіологічного Товариства України. Київ, 1–4 жовтня 2019 р. с.98.

SUMMARY

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

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

In the study biochemical, genetic, proteomic and morphological responses of *Pisum sativum L.* on acute radiation exposure in combination with salinity or hyperthermia were analyzed. For the first time we used a complex combined approach to study reactions of the pea seedlings to stressors after preliminary irradiation. Different growth reactions and free proline content in root of the *Pisum sativum L.* seedlings for all treatments were evaluated.

The received results on growth parameters show that comparatively low doses of ionizing radiation assists plants in resistance to salt and temperature stressors, however this resistance is short-term. These data could integrally characterize molecular, genetic, structural and metabolic changes in pea seedlings on their initial growth phase. For this purpose, the average growth rate of roots was compared with the theoretically expected growth rate that was calculated as an additive interaction of stress factors. "Crosstalk" signal systems means the growth of organism's resistance to one stress factor as a result of adaptation to another stressor. It is a result of interconnection and "dialogue" of various signal systems of plant. Significant deviation from additivity towards synergism or antagonism has been demonstrated in terms of growth parameters of plants, which may indicate the appearance of signal systems crosstalk.

Osmotic or thermal stresses can modify resistance of seedlings to ionizing irradiation but this phenomenon is only temporary. Proline analysis has shown that its concentration in response to irradiation has not changed as much as under the influence of salinity or a combination of both stress factors. The quantification of this amino acid is useful to assess the physiological status of signal systems crosstalk and more generally to understand stress tolerance of

plants. On 13th day after stressors impact the high level of water losses in roots was observed. Correlation coefficient between water-cut and proline content was negative ($r=-0.87$), but over time water level in plants restored and stabilized on about 34th day of the experiment and the correlation coefficient became positive ($r=0.32$). It may be related to osmotic shock, caused by affect salt, and following decrease in growth speed, when organism's need of water somewhat decreased.

It seems that metabolism is transferred to stable state and energetic processes are switched to support of plant integrity function and reparation processes. For the first time the data concerning the impact of different types of stress and its combinations on the activity of plant mobile genetic elements were obtained. The appearance of new amplicons of LTR-retrotransposons were shown. It indicates the possible destruction of epigenetic silencing and the increasing mobility of retro-transposons.

To understand the response to acute ionizing radiation in combination with salinity proteome changes were investigated. Analysis of proteomic data showed that the stress factors being studied significantly affect to change both quality and quantitative amount in the content of pea seedlings proteins. As a result of the 2-DE analysis 223 protein spots were isolated, of which 54 statistically significantly differed in comparison with at least one of the experimental groups.

We observed modification of synthesis of some proteins that belong to important signal systems among which are transketolase, malate dehydrogenase, translation elongation factor EF-2 subunit, 14-3-3-like protein, heat shock cognate protein 80, heat shock cognate 70 kDa-like, 14-3-3-like protein Band etc. Their significant role in the stress signals transduction and in the processes of forming an active response to the unfavorable factors is confirmed by fluctuations proteins concentration between groups.

The largest number of proteins has changed in response to the combined effect of ionizing radiation and salinity. There were revealed that each factor by itself alone cause less changes in quantity of proteins than in their combination.

The most widespread type of stressors interactions that was observed - cooperative antagonistic. It indicates complex mechanisms of signaling systems crosstalk in plants' response formation to the stress factors impact.

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

Publications:

1. Dmitriev O.P., Kravets O.P., Rashydov N.M., Bubryak I.I., Gushcha M.I., Danchenko M.M., Sokolova D.O., Shylina U.V., Berezhna V.V., Bubryak O.I., Dyachenko A.I., Krivokhizha M.V., Litvinov S.V., Nesterenko O.G., Sakada V.I. Epigenetic factors of plant adaptation. Monograph - Kyiv.: Palyvoda F.V. 2018.284p. (in Ukr.)
2. Nesterenko, O. , Rashydov, N. Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation. International Journal of Secondary Metabolite. 2018.;5(2):94-108.
3. Nesterenko O. G., Rashydov N. M. Pea response to salt and thermal stresses in dependent on preliminary ionizing radiation impact. Studia Biologica. 2018;12(1):65–72. (in Ukr.)
4. Nesterenko O.G., Rashydov, N.M., Litvinov S.V. Analysis of the LTR-retrotransposons mobility in plants after abiotic stress factors impact. Scientific Issues Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University Series: Biology. 2018;74:75-81. (in Ukr.)
5. Nesterenko O.G., Litvinov S.V., Rashydov N.M. The protein expression changes during the signaling systems interaction in stressed pea seedlings. Factors in Experimental Evolution of Organisms. 2018;22:154-162. (in Ukr.)
6. Nesterenko O. G., Rashydov N. M. Evaluation of the correlation between proline and water content of the *Pisum sativum* L. roots under

- abiotic stress factors influence. Biological systems. Vol. 9. Is. 2. 2017. p.192-196. (in Ukr.)
7. N. Rashydov, O. Nesterenko The Problems Sustainable Remediation Of The Chernobyl Alienation Areas. Journal of Radiation Researches. Baku. 2018;5(2):13-25.
 8. Nesterenko O.G., Grodzinsky D.M. Combined effects of stress-factors (hyperthermia, UV-irradiation and salinity) on growth reactions of plants. In: 3 Intern. Conf. "Modern problems of biology, ecology and chemistry". Zaporizhzhya, Ukraine. May 11-13, 2012. p.83.
 9. Nesterenko O.G. Specific and nonspecific components of the plant response to the action of several stressors. In: Ukr. Sci. Conf. "Advances in botany and ecology", Uman, 9–12 September, 2014. p. 134.
 10. Nesterenko O.G., Lanchikova V., Rashydov N.M., Grodzinsky D.M. Analysis of LTR-retrotransposons activity in plants stress factors impact after ionizing irradiation and without it. In: 6th Congress of Radiobiological Society of Ukraine Kyiv, 5–9 October 2015. p. 97. (in Ukr.)
 11. Shevchenko V.V., Litvinov S.V., Berezhna V.V., Sakada V.I. Nesterenko O.G., Rashydov N.M. Transgenerational memory of reproductive organs of plants on the impact of stress factor. In: Scientific and Practical Conference with International Participation «Effects of Radiation and other Xenobiotics on the Reproductive System and Organism», Dolyna, Ukraine, 4-7 October, 2016. c. 61. (in Ukr.)
 12. Nesterenko O.G., Rashydov N.M., Grodzinsky D.M. Level of manifestation of growth reactions and concentration of endogenous proline in pea seedlings in response to different combinations of stressors. In: 23rd Sci. Conf. of Institute for Nuclear Research National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, Ukraine. February 1-5, 2016. p. 185. (in Ukr.)

13. Nesterenko O.G., Litvinov S.V., Rashydov, N.M., Comparative proteomic analysis of the *P. sativum* L. seedlings reaction to the of stress factors impact. In: 24th Sci. Conf. of Institute for Nuclear Research National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, Ukraine. April 10-13, 2017. p. 207-208. (in Ukr.)
14. Nesterenko O., Majercikova V., Klubicova K., Rashydov N. Speculations of the correlation of proline accumulation and water content in pea seedlings under combination of stress factors. In: Scientific & practical Seminar with international participation «Stress Factors & Secondary Metabolites». Kyiv, Ukraine. December 11-15, 2017. p. 8-22
15. Nesterenko O., Danchenko M., Majercikova V., Rashydov N., Klubicova K. Proteomics approach of crosstalk in cell signaling investigation. In: “Symposium on Euroasian Biodiversity”, Kyiv. July 3-6, 2018. p. 390.
16. Nesterenko O.G., Khudolieieva L.V., Khoma Yu.A., Rashydov N.M. Abnormalities of pea plants habitus caused by acute ionizing radiation in combination with salinity or hypertermia. In: 7th Congress of Radiobiological Society of Ukraine Kyiv, 1–4 October 2019. p. 98. (in Ukr.)

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами	23
Мета і завдання дослідження	23
Методи дослідження	24
Наукова новизна роботи	25
Практичне значення одержаних результатів	25
Особистий внесок здобувача	26
Апробація матеріалів дисертації	27
Структура та обсяг	27
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1 Фізичні абіотичні фактори впливу на рослинні організми та екологічний стан в Україні	28
1.2 Особливості впливу радіації, засолення та екстримальних температур на біоту та рецепція сигналу	33
1.3 Морфометричні зміни при стресових впливах та роль амінокислоти проліну як протектора	36
1.4 Активність мобільних генетичних елементів, зокрема аналіз ДНК на мобільність ретротранспозонів з довгими кінцевими повторами (LTR-retrotransposones)	39
1.5 Протеоміка для дослідження кростоку сигнальних систем. Модифікація білків сигналінгу при дії радіаційного фактору та при його комбінації з фактором засолення	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
2.1. Об'єкт дослідження та умови вирощування рослин	46
2.2 Характеристики опромінення, концентрація та час впливу сіллю або гіпертермією	47
2.3 Морфометрія рослин гороху	49

2.4 Статистична обробка даних	49
2.5 Визначення концентрації вільного проліну у зразках гороху	50
2.6 Кореляція концентрації проліну з вмістом води в коренях рослин	52
2.7 Аналіз ДНК (LTR - ретротранспозонів)	52
2.8 Виділення та аналіз білків проростків гороху після комбінованої дії іонізуючого опромінення та засолення	55
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	58
3.1 Оцінка морфометричних показників рослин <i>P.sativum</i> L. після гострого впливу іонізуючого випромінювання та абіотичних стресових чинників	58
3.2 Онтогенетичні порушення та аномалії у будові проростків, викликані стресом	67
3.3 Пролін як маркер конститутивних та індукованих захисних реакцій	70
3.3.1 Зміни вмісту проліну в коренях рослин гороху у відповідь на сольовий стрес в комбінації з попереднім тепловим шоком	73
3.3.2 Вплив теплового шоку в комбінації з попереднім іонізуючим випромінюванням на вміст проліну у проростках гороху	77
3.3.3 Концентрація вільного проліну у проростків після поєднання впливу засолення з попереднім опроміненням	78
3.3.4 Визначення кореляції між вмістом проліну та кількістю води у коренях гороху	86
3.4 Аналіз активності LTR-ретротранспозонів під впливом абіотичних стресових факторів у рослин гороху	91
3.5 Протеомічне дослідження проростків <i>P.sativum</i> L. після гострого впливу іонізуючого опромінення в поєднанні з наступним впливом сольового стресу	99

УЗАГАЛЬНЕННЯ	120
ВИСНОВКИ	130
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	132
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ	151
ДОДАТОК 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ДОСЛІДЖУВАНИХ ІДЕНТИФІКОВАНИХ БІЛКІВ	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2-BE – двовимірний гель електрофорез
CAT – каталаза
EF – фактор елонгації
EST – експресовані секвеновані послідовності
LEA – білок пізнього ембріогенезу
LTR - long terminal repeats (довгі кінцери повтори)
MALDI – лазерна десорбція іонізація за допомогою матриці
MAPK – мітоген-активуючі протеїн кінази
MSB - місадіона натрію бісульфіт
NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації
pI – ізоелектрична точка
PRPs - proline rich proteins
SCF – білковий комплекс з трьох субодиниць: Skp1, Cul1, F-box
SOD – супероксид дисмутаза
АДФ – аденозин дифосфат
АЕС - атомна електростанція
АТФ – аденозин трифосфат
АФК – активні форми кисню (ROS)
БТШ (HSP) – білки теплового шоку
ВШР - відносна швидкість росту
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕПР - ендоплазматичний ретикулум
ІВ - іонізуюче випромінювання
ІЕФ – ізоелектричне фокусування
Mr – молекулярна маса
МГЕ (ME) – мобільні генетичні елементи
МДГ малатдегідрогеназа
МС – мас-спектрометрія

НАДФН – нікотинамід динуклеотид фосфат

ОШР – очікувана швидкість росту

ПААГ – поліакриламідний гель

ПАГЕ – поліакриламід гель електрофорез

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ - перекисне окислення ліпідів

РНК – рибонуклеїнова кислота

САМ-шлях – тип метаболізму, crassulaceae acid metabolism

тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

УВЕРХ – ультрависокоефективна рідинна хроматографія

ЧАЕС – Чорнобильська атомна електростанція

ВСТУП

Стрімке зростання в довкіллі кількості та інтенсивності стресових чинників зумовлює посилення їх впливу на живі організми. Абіотичні стреси вважаються однією з головних причин втрати понад 50% врожаю сільськогосподарських культур у світі (Athar et al., 2009). Величезне значення мають дослідження, пов'язані з глобальним потеплінням, засоленням ґрунтів, впливом радіації як природного, так і штучного походження (Rashydov et al., 2012), зокрема, на тлі збільшення використання ядерної енергії. Вплив кожного зі стресових факторів окремо вже добре вивчено, проте в природних умовах живі організми піддаються їх комбінованій дії, що може впливати на загальний стан і розвиток рослин, зниження їх врожайності і прискорення старіння, що ми спостерігали для рослин зони ЧАЕС. На сьогодні в модельних експериментах достатньо добре вивчені особливості реакції рослин за окремої дії абіотичних стресорів довкілля. Зокрема, проаналізовано основні аспекти відповіді на ІВ на генетичному (Кравець, 2016; Кунах, 2013) та протеомічному (Косаківська, 2006) рівнях, що здатні впливати на врожайність рослин і швидкість їх старіння (Martins, 2011; Trindade, 2013). Однак питання реакції рослин на комбінації факторів, що зустрічаються в природних обставинах та сучасних умовах кліматичної нестабільності, досліджено недостатньо (Гродзинський, 2012). У відповідь на дію всіляких стресових факторів рослина реагує включенням різних сигнальних систем для активної реакції всього організму. При поєднанні стратегій відповіді на кожен з стресових факторів, виникає перехресна взаємодія сигнальних систем, тобто «кресток» (Mundy et al., 2006), в наслідок чого формуються біохімічні шляхи метаболізму для здійснення відповіді. Однак характер такої відповіді рослини на різні пошкоджувальні чинники охоплює як реакції неспецифічні (синтез білків теплового шоку, поліамінів, проліну та ін.), так і специфічні (синтез білків, пов'язаних із температурним шоком,

перемикання фотосинтезу на САМ-шлях та ін.), що залежать від особливостей впливу.

Важливим є дослідження того, як змінюється відповідь рослин на поєднану дію радіаційного фактору та інших абіотичних стресових чинників і пошук «точок дотику» сигнальних шляхів. а також розкриття механізмів пристосування для розробки загальних принципів його підвищення. Відома неспецифічність і специфічність реакцій рослин свідчить про певну кореляцію частин різних генетичних та епігенетичних підпрограм, що зводиться до підтримки гомеостазу рослинного організму в екстремальних умовах, спрямованого на подолання, ослаблення або усунення шкідливої дії стресора (Дмитрієв та ін., 2019). Якщо рослина реагує неоднаково на кожен з абіотичних стресових впливів, то поєднання різних стресорів мають змусити сигнальні системи виробити одну стратегію відповіді організму, діючи спільно (El-Esawi, 2017; Nguyen et al., 2016; Qi et al., 2014; Sharma et al., 2013; Qados, 2011).

Актуальність дослідження взаємодії сигнальних систем рослин зумовлена, з одного боку, відкриттям нових сигнальних шляхів, з іншого – постійною зміною кількості та інтенсивності абіотичних стресових чинників (Nesterenko & Rashydov, 2018, Нестеренко & Рашидов, 2017). Результатом функціонування сигнальних систем під дією стресових факторів є репрограмування експресії генів і синтезу білків, що призводить до системних змін у метаболічних та біохімічних шляхах. Зміни структури клітин і молекул у відповідь на стресовий чинник призводять до модифікації фізіологічних функцій, до хромосомних перебудов та інших порушень. Характерною особливістю, наприклад, іонізуючого випромінювання є здатність впливати на організм навіть в малих дозах, причому цей вплив може проявитися через певний час після опромінення (Косаковская, 2008; Rashydov & Nesterenko, 2018). Встановлено, що стійкість до одного зі стресових факторів обумовлює стійкість до інших, в тому числі й до іонізуючого випромінювання. У той же час показано, що

дія малих доз радіації за певних умов справляє стимулюючий ефект. Крім того, попередня дія на рослини малих доз радіації може індукувати їх стійкість до наступного опромінення у великих дозах, що дозволяє вести мову про радіоадаптивну реакцію. Також доведена і здатність деяких рослин розвивати системну стійкість до абіотичних факторів, наприклад, до посухи чи підвищених температур, після опромінення у стимулюючих дозах (Nesterenko, 2018).

Для виявлення так званого явища кресток - перехресної взаємодії сигнальних систем - нами було запропоновано експериментальний підхід, що дає змогу виділити відповідні комбінації стресорів і часові діапазони, коли модифікуючий вплив одного з факторів на прояв іншого має найбільший вплив. Аналіз рослин із відповідних експериментальних груп робить можливим визначення вкладу кожного з факторів на рівні морфометричних досліджень проростків гороху.

Горох посівний (*Pisum sativum* L.) є важливою сільськогосподарською культурою. Він протягом багатьох років був модельним об'єктом досліджень, не дивлячись на досить великий розмір геному - 4300 Мб. При цьому приблизно половину геному складають повторювані елементи (35–48%, з яких 20-33% – LTR-ретротранспозони). Стресові фактори мають властивість діяти на геном рослин, у результаті чого виникає вплив як на загальний стан організмів, так і на виникнення змін на генетичному та епігенетичному рівнях, що можуть передаватися спадково та відображатися у наступних поколіннях. Це може бути пов'язано і з мобільними генетичними елементами (МГЕ) рослин, зокрема, LTR-ретротранспозонами. Вони відіграють велику роль у зміні структури генома та експресії генів. Існує вірогідність утворення адресних адаптивних мутацій, що генеруються інсерціями мобільних елементів у відповідь на специфічні та неспецифічні стресові впливи. Ретротранспозони є одними з маркерів реакції рослин на стресові фактори, особливо іонізуючу радіацію, осмотичний стрес та підвищення температур.

Ретротранспозони з довгими кінцевими повторами (LTR- long terminal repeat) несуть регуляторні сайти, пізнавані деякими ядерними факторами. Крім того, LTR беруть участь в рекомбінаційних процесах, в тому числі в мітозі і в мейозі, утворюючи складні гібриди з різних ретротранспозонів (Hora, 2013). В даний час є досить велика кількість досліджень, в яких продемонстровано феномен індукції транспозиції LTR-ретротранспозонів різними факторами для різних об'єктів. Активація ретроелементів в рослинному геномі відбувається під впливом різних стресів - зневоднення, низьких або високих температур, впливу фітопатогенів та ін. У деяких дослідженнях показано, що ретротранспозиція є найбільш імовірною причиною соматональної мінливості, індукованої культивуванням *in vitro* (Campbell et al., 2011).

Загалом, гени первинної відповіді, як правило, кодують синтез регуляторних білків, які, у свою чергу, впливають на експресію інших генів, запускаючи так званий "каскадний" механізм гормонально-індукованої зміни експресії комплексу генів, необхідних для регуляції певної онтогенетичної програми (Романов, 2002) та формування відповіді організму в цілому. Взаємодію факторів, узгодженість специфічних та неспецифічних реакцій організму, спільну роботу сигнально-ефекторних метаболічних каскадів вивчено недостатньо.

Нерухомий спосіб життя рослин зумовлює необхідність розвитку захисних механізмів, які стосуються безпосередньо білоксинтезуючої системи та її функціонування. Отримання інформації щодо сукупності білків організму, змін у їх складі та концентрації під час розвитку рослин та при зміні умов існування, в тому числі при дії різноманітних стресорів, проливає світло на особливості функціонування сигнальних систем. Серед усіх стресових білків найкраще вивченими є білки теплового шоку, зокрема родини БТШ 70 і БТШ 60. Стресові білки активно взаємодіють з фітогормонами, захищають фотосинтетичну активність, беруть участь у формуванні комплексних захисних реакцій (Косаковская, 2008).

Наприклад, в умовах засолення негативний вплив пов'язаний як з осмотичним стресом, так і з токсичністю солей (Деркач & Романюк, 2016). В такому разі відбувається накопичення проміжних продуктів метаболізму, що самі є токсичними, знижується утворення нових білків та підвищується розпад вже утворених білкових комплексів та білків. Ці фактори відбиваються на розвитку та ростових показниках рослин, на метаболічних процесах (Гогуэ, 2013). Деякі амінокислоти здатні покращити загальний стан рослини, підвищити адаптаційну відповідь організму (Nesterenko, 2018).

Пролін (піролідин- α -карбонова кислота, $C_5H_9NO_2$) є одним з найбільш багатофункціональних стресових метаболітів рослин. Вважається, що крім осмопротекторної функції, він виконує шаперонну, антиоксидантну, сигнально-регуляторну та інші функції (Szabados, Savoure, 2009; Carvalho et al., 2013), надає осмо- і мембранопротекторну дію, бере участь в регуляції експресії генів антиоксидантних ферментів і у зв'язуванні металів зі змінною валентністю, впливає на баланс НАД(Ф)Н / НАД(Ф). При дії абіотичних факторів, зокрема тих, що призводять до осмотичного стресу, створюються умови для найбільш вираженого прояву зазначених ефектів у, одночасно негативно впливаючи на вміст води у органах рослин. Тому критерій зміни концентрації проліну враховується для оцінки фізіологічного стану рослинних організмів.

У зв'язку з цим актуальним завданням є отримання нової інформації щодо реакцій рослин на різних рівнях формування та розвитку за поєднаної дії ІВ та інших абіотичних стресорів. На особливу увагу заслуговують дослідження таких маркерів індукції захисних/адаптаційних реакцій у рослин в стресових умовах як вміст вільного проліну та динаміка його коливань (Hayat et al., 2012; Hong et al., 2000), індукція транспозиції та зміна мобільності генетичних елементів, зокрема, LTR-ретротранспозонів (Alzohairy, 2014). Крім того, важливим є отримання інформації щодо протеому рослинного організму, змін у складі та кількості

білків, їх конформації (Danchenko et al., 2009) у моменти найбільшого відхилення рослинного організму від адитивної реакції за поєднаної дії ІВ та абіотичних стресорів доквілля. Такий цілісний підхід дозволить визначити особливості формування сукупної відповіді організму, зокрема кростоку сигнальних систем, та дослідити їх внесок у забезпеченні стресостійкості рослинного організму, оцінити адаптаційний потенціал в цілому.

Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами. Робота виконувалась з 2009 по 2019 роки у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Рашидова Н.М. Дисертаційне дослідження реалізувалось у рамках проекту FP7-PEOPLE-2013-IRSES - Marie Curie Action "International Research Staff Exchange Scheme" («Міжнародна схема обміну наукових кадрів» Марії Кюрі). Крім того, робота виконувалася в рамках бюджетних тем: III-3-08 «Епігеномна складова адаптації у рослин» (2008-2012 pp.), № держреєстрації теми 0108U00875; II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (2012-2016 pp.), № держреєстрації 0112U003077; III-7-16 «Вплив іонізуючої радіації на вторинний метаболізм у рослин» (2016-2018 pp.), № держреєстрації 0116U000028; та III-10-17 «Розробка методів упередження зниження продуктивності рослин на основі оцінки та прогнозування впливу кліматичних змін на їх метаболічні реакції та адаптивний потенціал» (2017-2021pp.), № держреєстрації 0117U004310.

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

Відповідно до мети були визначені наступні *завдання*:

1. Дослідити вплив ІВ, короткочасної гіпертермії, засолення та їх комбінацій на морфометричні показники росту та розвитку проростків гороху.

2. Вивчити вміст проліну та води у коренях рослин і кореляції між ними, а також встановити зв'язок ростових реакцій з рівнем вільного проліну за поєднаної дії вище зазначених абіотичних стресових чинників.

3. Дослідити динаміку мобільних генетичних елементів рослин за дії ІВ, короткочасної гіпертермії, засолення та їх комбінацій.

4. Проаналізувати якісні та кількісні зміни у спектрі білків коренів проростків в умовах дії перерахованих стресорів.

5. Дослідити модифікації протеому для системного аналізу кростоку сигнальних систем за дії зазначених вище стресових чинників.

6. Оцінити тип взаємодії стресорів - ІВ та засолення - із погляду на зміни синтезу та складу білків.

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

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

Методи дослідження

Морфометричні, біохімічні, молекулярно-генетичні, методи комплексного дослідження протеому, статистичні, а саме:

- Морфометричний аналіз проростків гороху.
- Визначення концентрації вільного проліну у коренях рослин колориметричним методом.
- Аналіз активності LTR-ретротранспозонів: а) виділення тотальної ДНК; б) ПЛР з відповідними праймерами; в) горизонтальний електрофорез; г) аналіз електрофореграм та детекція нових ампліконів.

- Протеомічні дослідження: а) виділення білків; б) двовимірний гель електрофорез у ПААГ для їх якісного розділення; в) фарбування гелів колоїдним кумасі та сканування для кількісного визначення білків; г) аналіз зображень за допомогою програми "PDQuest"; г) ензиматичне розщеплення цільових білків; д) ультрависокооефективна рідинна хроматографія поєднана із тандемною мас-спектрометрією; е) ідентифікація білків через бази даних; є) встановлення їх функцій, локалізації та належності до сигнальних систем.
- Статистична обробка даних.

Наукова новизна роботи. Вперше використано комплексний системний підхід до аналізу рослинних реакцій на комбіновані пошкоджуючі абіотичні впливи, зокрема модифікацію ефектів ІВ короткочасною гіпертермією/засоленням у проростків гороху. Вперше у вітчизняних дослідженнях використано засоби кількісної пошукової протеоміки для системного аналізу комплексу молекулярно-біологічних реакцій та взаємодії сигнальних систем у формуванні відповіді рослинного організму на дію стресових абіотичних чинників. Вперше визначено білки, що є спільними для сигнальних систем, індукованими дією на проростки гороху ІВ, засоленням, гіпертермією. Вперше показано, що найпоширенішим типом взаємодії ІВ та досліджуваних абіотичних стресорів є кооперативна антагоністична взаємодія.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані дані можуть використовуватися фахівцями в області радіобіології та фізіології рослин, у аграрному секторі з метою оцінки та прогнозування адаптаційного потенціалу рослин, упередження зниження їх продуктивності та врожайності в умовах дії комплексу негативних абіотичних факторів довкілля. Вивчення механізмів формування сигнальних шляхів у відповідь рослинного організму на дію абіотичних стресорів довкілля, визначення типу їх взаємодії є важливою ланкою у розробці методик зменшення негативного впливу зовнішніх факторів на рослини. Результати

дослідження можуть бути застосовані для розробки та впровадження потенційних стратегій підвищення стійкості рослин до абіотичних пошкоджуючих чинників шляхом підвищення стійкості проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів за попередньої обробки ІВ.

Подальші дослідження перехресної адаптації гороху з використанням різних стресових факторів і їх комбінацій, можуть бути корисними не тільки для визначення та забезпечення оптимального рівня протекторних речовин для підвищення комплексної стрес-стійкості рослин, але і бути перспективними для внесення ясності в загальні механізми крос-адаптації рослин до стресорів. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при викладанні навчальних дисциплін та спецкурсів з радіобіології, фізіології рослин та молекулярної біології у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто виконано основну частину експериментальної роботи: планування експерименту, культивування проростків гороху, проведення стресових впливів та визначення ростових реакцій, виділення та аналіз ДНК і протеому, виділення та дослідження концентрації вільного проліну, визначення його кореляції з оводненістю рослин. Концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні положення і висновки дисертації сформульовані та обговорені здобувачем разом з науковим керівником д.б.н. Рашидовим Н.М. Здобувачем було самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз джерел літератури; проаналізовано отримані результати, написано усі розділи дисертації та значну частину тексту публікацій.

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

(IRSES GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance»), де протеомічні дослідження проводилися разом з к.б.н. Данченком М.В, а статистична обробка даних – з Літвіновим С.В.

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

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

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

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Фізичні абіотичні фактори впливу на рослинні організми та екологічний стан в Україні

Живі організми під час онтогенезу у різних фазах росту та розвитку неодноразово підпадають під вплив стресових факторів. Стрімке зростання в довкіллі кількості та інтенсивності стресових чинників зумовлює посилення їх впливу на рослинні об'єкти, зміна ареалу існування для яких, на відміну від тваринних організмів, ускладнена. У зв'язку з чим рослини повинні виробити шляхи протистояння зовнішнім подразникам через всебічну мобілізацію внутрішніх резервів на увіх рівнях організації організму.

Неабияке місце серед стресорів займають абіотичні пошкоджуючі чинники. Вони включають в себе і забруднення навколишнього середовища важкими металами чи радіонуклідами, і затоплення чи засуха, і засолення або критичні температури. Це може знижувати продуктивність сільськогосподарських культур у більш ніж два рази (Bray et al., 2000; Boyer, 1982), впливати на старіння (Litvinov & Rashydov, 2017), на зміни у часі цвітіння (Kryvokhyzha et al., 2018) та диференціювати розподілення видів рослин відповідно до зміни навколишнього середовища (Chaves et al., 2003).

Іонізуюча радіація є одним з найнебезпечніших факторів навколишнього середовища. Події останніх десятиліть підтвердили, що навіть новітні технології не в змозі гарантувати безперебійну роботу АЕС, особливо в умовах стихійних лих, що підтвердили аварії на японських АЕС Онагава і Фукусіма – 1 у 2011 році, не кажучи вже про екологічну катастрофу на Чорнобильській АЕС у 1986 році. Внаслідок Чорнобильської катастрофи значна територія колишнього Радянського Союзу, зокрема Білорусі та України, зазнала найбільшого забруднення. І хоча природні процеси розпаду радіонуклідів за останні роки суттєво

скорегували структуру розподілу радіонуклідів та їх концентрації (майже двократне зменшення забрудненої ^{137}Cs площі, де рівні забруднення перевищують 10 кБк/м² та трикратне зменшення території з ^{90}Sr з більш ніж 4 кБк/м²), рівень і масштаби забруднення ізотопами плутонію фактично не змінилися, а активність ^{241}Am навпаки, поступово зростає за рахунок процесів розпаду ^{241}Pu (Романчук, 2015).

Серед основних деградаційних процесів ґрунтів України є радіонуклідне забруднення (якого зазнала й значна частина осушених земель - до 10 %). Атомна енергетика України є стратегічно важливим елементом енергозабезпечення: її сьогоdnішній внесок складає близько 50% електроенергії, що виробляється у країні. Відповідно до Національної доповіді про стан навколишнього середовища в Україні у 2014 році, на атомних електростанціях здійснюється первинна переробка відходів, тимчасове зберігання (Бондар та ін., 2016). На 2016 рік Міністерством екології та природних ресурсів України було озвучено причини прогнозованого зростання обсягу радіоактивних відходів у нашій державі. Він зросте внаслідок:

- повернення в Україну високоактивних радіоактивних відходів після переробки в Російській Федерації відпрацьованого ядерного палива українських атомних електростанцій;
- експлуатації існуючих ядерних установок як внаслідок продовження строку їх експлуатації, так і планування введення в дію нових;
- поводження з відпрацьованим ядерним паливом, що тимчасово зберігається на українських АЕС;
- виводу з експлуатації ядерних установок та об'єктів, призначених для поводження з радіоактивними відходами;
- виводу з експлуатації Чорнобильської АЕС.
- проведення робіт на радіоактивно забруднених територіях та об'єктах

Отже, якщо концентрація радіоактивних елементів як природного, так і штучного походження в приземному шарі атмосфери знаходиться у більш-менш стабільному стані, то горизонтальна й вертикальна міграція цих радіонуклідів не викликала значного перерозподілу їх у природних і штучних ландшафтах, що обумовлює небезпечний рівень іонізуючої радіації на значних територіях України, зокрема, для рослин.

Ще одним зі стресорів, що суттєво впливають на рослини, є засолення ґрунтів. Вважається, що в тій чи іншій мірі засолено близько чверті всіх ґрунтів нашої планети. Надлишок солей у ґрунтового розчині є токсичним для більшості рослин. Найбільш шкідливими є легкорозчинні солі, які порівняно легко потрапляють до клітини.: NaCl , MgCl_2 , CaCl_2 . Менш токсичними вважаються важкорозчинні солі: CaSO_4 , MgSO_4 , CaCO_3 . Найнебезпечнішими є карбонатно - содове засолення. Карбонати швидко розкладаються і в ґрунті накопичується велика кількість іонів Na^+ , що призводить до формування сильного лужного середовища. Менша токсичність сульфатного засолення порівняно з хлоридним, зокрема, пов'язана з тим, що на відміну від іона Cl^- іон SO_4^{2-} в невеликих кількостях необхідний для нормального мінерального живлення рослин, і шкідливий тільки його надлишок. Негативний вплив засолення на рослину проявляється як в безпосередній дії на цитоплазму надлишку іонів Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , так і у погіршенні водного режиму рослин (Новикова & Тихоненко, 2004).

Аналізуючи розподіл земель України за якісним станом ґрунтового покриву (сільгоспугіддя та рілля), можна дійти висновку, що лише близько 20 % ґрунтів лишаються без ознак погіршення за останні десятиліття. За узагальненими даними за 2016 рік, серед решти земель – 8,95 % це засолені ґрунти (слабо повторно, середньо та сильно , солончаки). Крім того, кризова ситуація і на осушених землях виникає в результаті засолення заплавних земель і солонцевих комплексів, що погіршує не тільки екологічну, а й продовольчу безпеку країни. Що стосується

Київської області, тут надмірне навантаження на земельні угіддя області, у тому числі високий ступінь сільськогосподарської освоєності і розораності території, є однією з причин, що спричиняють активізацію ряду негативних процесів. У структурі земельного фонду Київщини значні площі займають ґрунти з незадовільними властивостями – змиті, дефльовані, засолені, солонцюваті, перезволожені тощо.

На сьогодні беззаперечним фактом є зміни у глобальній кліматичній системі. Вони зумовлені в першу чергу активною господарською діяльністю людини. Глобальне потепління вважається доведеним, а математичне моделювання змін та процесів у майбутньому вказує на невтішні прогнози, зокрема, й для України. (Степаненко, 2015)

Температурний режим є дуже важливим фактором нормально розвитку рослинного організму, адже його віхдження від оптимуму може спричинити метаболічні порушення, а значні температурні коливання – загибель усієї рослини. Згідно з деякими прогнозами, підвищення середньої температури на 1°C може призвести до скорочення видового різноманіття рослин в Європі на третину (Thuiller, 2005), середньодобове зростання температури на 1 градус може знижувати врожайність на 15% (Athar, 2009), зокрема, рису (Колодяжная, 2009).

Важливість дослідження реакції рослин на гіпертермію існує не тільки на рівні сільськогосподарської проблеми, але й в контексті, наприклад, радіаційної безпеки. В першу чергу це стосується водойм-охолоджувачів при АЕС. Атомна електростанція і водойма-охолоджувач утворюють єдину природно-техногенну систему, функціонування основних елементів якої взаємопов'язане і взаємозумовлено. Нормальна робота системи технічного водопостачання електростанції можлива тільки в тому випадку, якщо якість надходять в неї вод, знаходиться не нижче певного рівня. Багато в чому це залежить від рівня розвитку водних фітоценозів. Важливим аспектом експлуатації водойм-охолоджувачів також є захист його берегів від руйнування, якому в чималому ступені перешкоджає

освіту прибережних заростей. З цих причин в деяких випадках в водоймах-охолоджувачах навіть проводиться цілеспрямоване розведення деяких видів водних рослин (Кацман, 2004).

З вище зазначеного, можна зробити висновок, що існує загальна тенденція погіршення екологічного стану в Україні та світі. Зміна агрокліматичних умов зростання сільськогосподарських культур значною мірою впливає на їх продуктивність, антропогенний вплив здатен посилювати негативні наслідки для рослин, а фактор іонізуючої радіації, як природного, так і техногенного походження, може суттєво модифікувати як реакції організмів на інші чинники, так і знижувати врожайність загалом. Це відбувається шляхом зміни на генетичному та епігенетичному рівнях, на рівні протеому на посттрансляційних модифікацій та ін., що здатні проявити себе навіть через певний час після припинення дії стресора на рослинний організм. Варто зазначити, що , аналіз даних щодо зони ЧАЕС показав, що стан фауністичної компоненти екосистем не лише не погіршився, а й суттєво поліпшився, а рівень генетичної мінливості компенсується механізмами популяційної динаміки, що забезпечує протікання мікроеволюційних процесів – добір адаптивних генетичних структур. При цьому фауністичні зміни не можуть не зачіпати й флору прилеглих територій та її видовий склад (Гайченко та ін., 2010), тобто зміни флори та фауни взаємопов'язані.

Вплив на рослину може відбуватися як гостро, так і протягом тривалого часу. Стресові фактори, в свою чергу, можуть діяти як спільно, так і по черзі. Вплив кожного зі стресорів окремо вже добре вивчено, проте у природних умовах живі організми піддаються їхньому спільному впливу, що може впливати на врожайність рослин (та цвітіння) і швидкість їх старіння (Martins, 2011; Klubíková, 2012; Trindade, 2013).

Тому актуальним є дослідження того, як змінюється відповідь рослин на дію одного стресового чинника під впливом іншого, як от природні коливання зволоження, радіаційного фону, кліматичні зміни, до яких

додається вплив антропогенного фактора, а також розкриття механізмів пристосування для розробки загальних принципів його підвищення. Адже здатність рослинного організму до адаптації у змінних умовах навколишнього середовища так чи інакше залежить від активності фотосинтезу та процесів на різних етапах життя, що визначають розвиток, синтез білків, продуктивність та врожайності (Chaves et al., 2011).

З огляду на вищесказане, у наступному розділі розглядатимуться особливості впливу радіації у комбінації з засоленням та екстремальними температурними впливами..

1.2 Особливості впливу радіації, засолення та екстремальних температур на біоту та рецепція сигналу

Дослідження взаємодії біологічних об'єктів з абіотичними факторами або їх комбінаціями проливає світло на особливості їх функціонування, росту та розвитку, адаптації, зміни біологічних властивостей та продуктивності, як на молекулярному, так і на організменному рівнях. Відсутність єдиних принципів загальної теорії біологічних систем зумовлена продовженням накопичення фактів на стиках різних наук, що породжує постійну появу великої кількості гіпотез та припущень (Гудков, 2003).

Для системного аналізу даних необхідно враховувати зміни не лише на генетичному, протеомічному, метаболічному рівнях для кожного з факторів, а й звертати увагу на фазу розвитку рослини, механізми рецепції та формування сигналу під дією стресового чинника, на модифікацію сигналу іншими стресорами, що у свою чергу значно ускладнює опис та розуміння реакцій відповіді організмів на стрес (Cramer et al., 2011).

Глобальний підхід системної біології з використанням сучасних методів та постгеномних методологій, таких як цілісний аналіз транскриптому, метаболому та протеому, інтегрованих на базі біоінформатики, покликаний змінити та поглибити наші уявлення про

складні процеси, функціонування та реакції рослинних організмів (Mochida & Shinozaki, 2011).

Як відомо, рецепція та подальша передача сигналу від стресора не однакова для різних абіотичних чинників, як і формування відповіді на них рослиною.

Коли рівень фактору перевищує фонові показники, тобто поріг чутливості, виникає перехід організму від нормальної життєдіяльності до стану стресу. За Сельє, стрес є неспецифічною реакцією організму на будь-які пошкоджуючі чинники та включає в себе умовно три фази: тривоги, адаптації та виснаження. Вважається, що реакції пристосувального і стресового характеру можна визначити терміном аклімація, або адаптація, тобто стан підвищеної стійкості до повторного впливу тим чи іншим стресором (Костюк & Михеев, 1997), завдяки чому формується стійкість до несприятливих факторів середовища. Як конститутивна, так і індукована компонента стійкості є генетично детермінованими. Водночас, індуковані механізми здатні формуватися у процесі життя рослини. Первинні сигнали від стресорів розпізнаються (як специфічними рецепторами, так і шляхом детекції клітиною пошкоджень молекул та ін.) та «вмикають» сигнальні системи та каскади, які, у свою чергу, здатні взаємодіяти та модифікувати одна одну, викликаючи координовану взаємодію.

Внаслідок реалізації специфічних та неспецифічних реакцій формується оптимальний біохімічний інструментарій для активної відповіді організму, подолання наслідків стресу та підтримання життєдіяльності організму.

Різні типи хемосигнальних систем рослин можуть активуватися цитокінінами, етиленом і брасиностероїдами, є двокомпонентними, що включають в себе в якості сенсора рецепторні протеїнкінази, а також багатоконпонентні наділені убіквітілігазної активністю SCF-комплекси, що активуються ауксином, гіберелінами і жасмонатом. Нещодавно у рослин були виявлені сигнальні системи, включаючі в себе рецептори

серпантинного типу і пов'язані з ними гетеротримерні G-білки, які широко поширені у тварин і грибів (Шпаков, 2009). Однією з найважливіших функцій G-білків є участь у функціонуванні цілого ряду сигнальних систем клітин рослин (аденілатціклазна, MAP-кіназна, фосфатидатна, кальцієва, ліпоксігеназна, НАДФН-оксидазна (супероксидазна) та NO-синтазна) (Тарчевський, 2002). За Тарчевським, схему взаємодії зовнішніх сигналів з рецепторами клітини, можна описати наступним чином: сигнал змінює конформацію рецепторних білків (рецептори знаходяться у плазмалемі, цитозолі, можуть активуватися під дією неспецифічної зміни структури ліпидної складової плазмалеми, зміна мембранного потенціалу та ін.) взаємодіють з факторами регуляції транскрипції, фосфорилування яких призводить до їх активації та наступною взаємодією з промоторними зонами певних генів, що призводить до зміни їх експресії. Цей механізм включає рецепцію, перетворення, передачу сигналу на промоторні ділянки генів, програмування експресії генів, зміна спектра синтезованих білків і функціональний відповідь клітини, наприклад, індукцію імунітету до фітопатогенів або стійкість до абіотичних стресів. В якості сигнальних молекул або елісаторів, що виявляють індукційну активність, можуть виступати різні органічні сполуки-ліганди і їх комплекси: амінокислоти, олігосахариди, поліаміни, феноли, карбонові кислоти і ефіри вищих жирних кислот (арахідонової, ейкозапентаєнова, оленів, жасмонової і ін.), гетероциклічні та елементоорганічні сполуки, в тому числі деякі пестициди та ін.. У якості вторинних елісаторів, що синтезуються клітиною і включаються до сигнальних шляхів, можуть виступати фітогормони та деякі інші сполуки.

Що стосується реакції рослин на гіпертермічні стреси, варто зазначити наступні нюанси (Mittler et al., 2012). Температура впливає практично на всі структури і компоненти клітин одночасно і теоретично будь-яка з них може виступити в якості терморекцептора. Висока

температура викликає збільшення плинності плазмалеми, внаслідок чого активуються кальцієві канали і зростає концентрація іонів кальцію всередині клітини, активується ліпоксигеназна сигнальна система. Усередині клітини іони кальцію активують кальційзв'язуючий білки і кальційзалежні протеїнкінази, які в свою чергу активують мітоген-активуючі протеїнкінази. Одночасно з цим розвивається окислювальний стрес і накопичуються АФК, які також можуть активувати транскрипційні фактори. У ядрі клітини змінюється доступність хроматину для транскрипційного апарату. Трохи пізніше в ендоплазматичному ретикулумі також може розвивається стрес. Отже, зміни відбуваються не лише у мембранних структурах і цитоскелеті, відбувається не тільки ремоделювання хроматину, зміна швидкості іонних потоків і різних біохімічних реакцій, накопичення сигнальних молекул різної природи і т. д., а й зміна конформації білків, порушення їх синтезу і посилення розпаду (Нилова и др., 2017).

Такі процеси призводять наслідків, що реалізуються на тканинно-органному рівні, коли ми можемо спостерігати морфометричні прояви, зміни, що стосуються розмірів, форми, забарвлення та ін. усієї рослини. , а зміни на генетичному та протеомічному рівнях призводити до зміни кількості захисних речовин, зокрема, проліна.

1.3 Морфометричні зміни при стресових впливах та роль амінокислоти проліну як протектора

Зовнішні фактори навколишнього середовища, залежно від їх інтенсивності та тривалості впливу, здатні впливати на ріст та розвиток рослинних організмів. Методи оцінки стійкості до чинників можуть бути прямими та непрямими. До перших відноситься облік ростових параметрів, таких як висота і товщина стебла, приріст довжини коренів, кількість бічних коренів та пагонів, листків, вміст води (оводненість)

органів (Dasgan et al, 2002.), схожість насіння та час до настання генеративної фази та інших.

Серед аномалій, що виявляються при прямих методах оцінки, де-які можуть виникати несистематично. Дія високих температур тягне за собою цілий ряд небезпек для рослин: сильне зневоднення і висушування, опіки, руйнування хлорофілу, незворотні розлади дихання та інших фізіологічних процесів, припинення синтезу білків і посилення їх розпаду, накопичення отруйних речовин, зокрема аміаку. При дуже високих температурах різко підвищується проникність мембран, а потім настає теплова денатурація білків, коагуляція цитоплазми і відмирання клітин. Це може призводити до зупинки росту, «завмирання» апікальної меристеми за загального пригнічення розвитку.

Окрім аномалій, що характерні для будови наземної та підземної частини рослин, часто зустрічаються і морфологічні відхилення у будові квіток. Такий тератогенез характерний перш за все для рослин, що перебувають у забруднених фітотоксикантами середовищах, наприклад, промислових зонах Донбасу (Ліханов, 2004).

Іонізуюча радіація, як сильний пошкоджуючий чинник, здатна викликати мутаційні процеси у клітинах рослин, що виливається у калусоподібні новоутворення в окремих органах, викликати необоротні процеси у меристемах, сприскити асиметрію у будові листків та квіток. Давно відомо, що оскільки відбувається деактивація клітин, щоділяться і розвиваються аномалії в накопиченні біологічно активних речовин, підтримці градієнтів їх концентрацій, то природно очікувати порушення корелятивних фізіологічних зв'язків в організмі (Гродзинський, 1989).

Це підтверджується багатьма прикладами: аномаліями форм пластинок листа, що свідчать про порушення корелятивних зв'язків між центрами зростання листової пластинки, збільшенням розгалуження (порушення корелятивних зв'язків в апікальному домінуванні і супідрядність останньому розвитку латеральних бруньок), зменшенням

числа квіток і плодів (порушення корелятивних зв'язків в органогенезі) і таке інше.

За дії засолення також пригнічується вегетативний ріст, скорочується тривалість вегетаційного періоду (Bayat et al, 2012; Maksimovic et al, 2012). На етапі вегетативного росту існує залежність між концентрацією солі у середовищі та розмірами рослини, кількістю та площею листків, масою сирової та сухої речовини (Porcel et al, 2015; Gamalero et al. 2009; Flowers, 2004).

Зміна проникності мембран, характерна для нагрівання, засолення та опромінення іонізуючою радіацією, тісно пов'язана з водним стресом та може супроводжуватися зменшенням оводненості тканин. Однією із стратегій боротьби з цим у рослин є синтез великої кількості осмотично активних речовин, наприклад проліну, який накопичується в рослинах при різних несприятливих факторах середовища, в тому числі за посухи і засоленні (Raymond, 2002).

Метаболізм цієї амінокислоти досліджувався досить багато (Singh, 2017). Його синтез та деградація залежать від багатьох факторів, а концентрація може залежати не лише від активності генів синтезу або деградації, що докладно продемонстрували автори (Turkan, 2011), а й від кількості так званих пролін-багатих-білків, що деградують із вивільненням цієї амінокислоти. Синтез проліну відбувається в цитозолі та, ймовірно, також у хлоропласті, деградація проліну здійснюється в мітохондріяхі.

Крім добре відомої функції як інертного осмоліта, при дії стресорів виконує цілий ряд інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь в регуляції експресії деяких генів. В останні роки відбувається інтенсивне накопичення результатів досліджень функцій проліна (Szabados, 2009).

Як окрема функція в даний час розглядається антиоксидантна роль у. Так, екзогенний пролін, зменшуючи вміст активних форм кисню (АФК), запобігав програмованій загибелі мутантного грибного патогена люцерни

Colletotrichum trifolii з порушенням утворення АФК (Chen, 2005), усував індукавану екзогенним перексидом водню фрагментацію ДНК і загибель пухлинних клітин людини (Krishnan, 2008). Показано захисний вплив проліну на рослини в умовах окисного стресу, викликаного перексидом водню (Сошинкова, 2013), що особливо актуально за умов впливу іонізуючим опроміненням.

Для оцінки ефективності дії проліну як осмотротектору необхідно звернути увагу на корелятивний зв'язок між його концентрацією та оводненістю тканин рослини.

Існують дослідження (Іванов, 2013), коли у варіантах без засолення і з низькою концентрацією солі (0,05-0,10 М NaCl) накопичення проліну відбувалося аж до точки мінімальної оводнення тканин і швидко зменшувалася з відновленням поливу, що узгоджується з поширеною думкою про функції проліна як осмотично активної речовини. При цьому, на відміну від старого листа, в молодих накопичувався швидше, чим, можливо, і пояснюється їхня підвищена стійкість до дії стресових факторів.

Дослідження концентрації цієї амінокислоти за умов впливу абіотичних стресових факторів, зокрема, іонізуючого опромінення та його спільної дії з засоленням або гіпертермією допоможе краще зрозуміти особливості його метаболізму та ролі усигнальних каскадів і захисних реакцій рослинних організмів.

1.4 Активність мобільних генетичних елементів, зокрема аналіз ДНК на мобільність ретротранспозонів з довгими кінцевими повторами (LTR-retrotransposones)

Не менш значущими є дослідження впливу стресу на МГЕ. Вважають, що транспозиційна активність МГЕ викликає до 80% спонтанних мутацій і є основною причиною їх виникнення. Однак МГЕ можуть виконувати і ряд корисних функцій в геномі клітини. Успадковані еукаріотами від

прокаріотичних МГЕ пройшли з ними довгий шлях еволюції і стали незамінними при виконанні таких функцій як рекомбінація в клітинах імунної системи ссавців, підтримання теломер у дріжджів і процес репарації двониткових розривів ДНК у дріжджів. У клітині, в свою чергу, виникли пристосування, спрямовані на генетичний контроль процесу транспозиції і зниження шкідливих наслідків від незапланованих переміщень МГЕ, найбільш значущим і глобальним з яких можна вважати механізм метилювання ДНК.

Показано, що транспозиції мобільних генетичних елементів можуть бути індуковані стресовими факторами зовнішнього середовища або колонізацією нових екологічних ніш (Vieira et al, 2002; Чересиз, 2008; Jurka et al, 2011). Також передбачається, що зміни в представленості МГЕ можуть сприяти або бути пов'язані з появою нових генотипів або ліній, субпопуляцій або популяцій, рас чи видів.

Мобільні генетичні елементи виконують такі функції: кодують білки, відповідальні за їх переміщення та реплікацію, викликають багато спадкових зміни в клітинах, внаслідок чого утворюється новий генетичний матеріал, призводить до новоутворень, вбудовуючись в різні ділянки хромосом, вони інактивують або посилюють експресію клітинних генів, являються важливим фактором біологічної еволюції.

Ретротранспозони - мобільні елементи, що становлять значну фракцію повторюваних послідовностей ДНК еукаріотичних організмів. Ці МЕ переміщаються по механізму «copy-and-paste» («копіювання» і «вбудовування») транспозиції, використовуючи РНК-посередник. Вважається, що радіаційне опромінення запускає процес нестабільності генома, який зберігається тривалий час. Сам механізм індукції транспозиції після впливу радіацією інтерпретують наступним чином: під дією радіації в ДНК відбувається розрив ланцюгів ДНК і копії ретротранспозона «заліковують» розриви ДНК, т. е. їх індукція є відповіддю на розриви ДНК (Ратнер та ін., 2001). Також показано, що збільшення

рівня пошкоджень ДНК веде до індукції репаративних процесів, а деякі ретроелементи здатні самі брати участь у відновленні розривів ДНК.

Відповідно до теорії МакКлінток, транспозони є джерелом геномної нестабільності і в свою чергу генотоксичний стрес може сприяти їх мобілізації (McClintock, 1984). Тобто, не просто зовнішні екологічні умови, а саме різка зміна клітинного мікрооточення, що носить характер стресу, слугує індуктором переміщень МГЕ. В той же час, вважається, що, не дивлячись на досить добру вивченість питання впливу температури на мобільність генетичних елементів загалом у різних організмів, варто з обережністю відноситися до екстраполяції отриманих даних, адже дані, отримані для конкретного типу МГЕ та на окремій популяції, лінії або виді, можуть бути закономірними лише для цього конкретного випадку (Caru et al., 2000).

Ще однією формою клітинного стресу, для якого було показано участь в індукції багатьох МЕ для різних видів рослин та тварин, що належать до різних родин і навіть класів, є геномний або генотоксичний стрес, що призводить до появи різних форм ушкоджень ДНК під дією зовнішніх або клітинних факторів. Показано, що різні форми ушкоджень ДНК, викликані іонізуючим випромінюванням або мітоміцином С, мобілізують переміщення ретротранспозонів з довгими кінцевими повторами сімейства *Tu* у дріжджів і *gypsy* у *Drosophila* (Farkash & Prak, 2006).

Ще одним прикладом стресової активації МГЕ, що руйнують чи послаблюють механізм епігенетичного сайленсінгу, є індукція переміщень рослинних ретротранспозонів під дією певних стресових факторів, зокрема, показано, що холодний шок веде до сильнішого гіпометилування ДНК рослинних клітин і активації ретротранспозонів у кукурудзи (Casacuberta & Santiago, 2003).

Одним з механізмів індукції як ДНК-транспозонів, так і ретроелементів, є підвищений рівень транскрипції МГЕ, що веде до

підвищених концентрацій функціональних білків МГЕ, необхідних для транспозиції, а в разі ретротранспозонів - і геномної РНК. Це може забезпечуватися, зокрема, наявністю стресіндукованого промотора, що регулюється клітинними факторами, які беруть участь в індукції стресової відповіді клітин. Так, наявність hsp-подібного промотора у мобільних елементів *DIRS-1* у *Dictiostellum* (Zuker et al., 1984), *copia* і *mariner* у *Drosophila* (Strand & McDonald, 1985; Capu et al., 2000) робить активацію цих МЕ залежною від ряду стресових факторів, які індукують систему білків теплового шоку. Як припускають автори, протеолітичний каскад, що запускається стресом, веде до вивільнення транскрипційних факторів, необхідних для індукції генів стресового захисту і одночасно активують ті МЕ, промотори яких містять сайти зв'язування цих транскрипційних факторів (Чересиз и др., 2008).

Отже, в клітині існують механізми підтримки динамічної рівноваги між рівнем спонтанної активності мобільних генетичних елементів, що приводить до порушень структури генома, і генетично-контрольованими переміщеннями, що мають важливі генетичні функції. Індуковане порушення цих механізмів може мати серйозні наслідки як на рівні усього організму (Юрченко, 2011), тому варто приділити увагу тому, як поведуть себе ретротранспозони під дією як окремих стресорів, так і їх послідовного та комбінованого впливу, зокрема засолення та гіпертермії, поєднаних з попереднім іонізуючим опроміненням, а також проаналізувати такі зміни та їх наслідок на рівні усього протеому рослин.

1.5 Протеоміка для дослідження кростоку сигнальних систем. Модифікація білків сигналіngu при дії радіаційного фактору та при його комбінації з фактором засолення

Відповідь на вплив стресорами відбувається на різних рівнях організації організмів. Якщо одні дозволяють спостерігати зміни неозброєним оком (морфологічні, на рівні органів та тканин), то інші

можна фіксувати лише на молекулярному рівні (ДНК, білки). Останній заслуговує на особливу увагу, адже є однією з найважливіших ланок регулювання гомеостазу організму. Білки, зміни їх складу, конформації, кількості, модифікація є ключовими як на початкових етапах детекції та передачі сигналу, так і на етапі реалізації відповіді рослини, виробленні та втіленні стратегії виживання та адаптації.

Живі організми на будь-якому рівні реагують на опромінення через складну мережу взаємопов'язаних сигнальних каскадів та мереж, через які здійснюється регуляція життєдіяльності особини. Методи скринінгу, що охоплюють аналіз на рівні постгеномному, мають великий потенціал для скринінгу усієї метаболічної мережі.

Однією з таких методик є двовимірний електрофорез у поліакриамідному гелі, тобто 2-ДЕ у ПААГ (Friedman et al, 2009; Arruda et al, 2011). Він дозволяє розділити білки спочатку відповідно до їх ізоелектричної точки, де сумарний заряд білка дорівнює нулю; після чого білки розділяють безпосередньо за їх розміром. Варто зазначити, що протеомічні дані слід інтерпретувати обережно, тому що часто відсутня чітка кореляція вмісту мРНК та білку, а належна ідентифікація білків ускладнена у зв'язку з нестачею даних по послідовностям ДНК.

В той же час відомо, що на клітинному і субклітинному рівні стрес-реакція рослинних організмів включає комплекс процесів як на генетичному (транскрипційному) так і на молекулярному (посттранскрипційному, метаболічному, протеомічному) рівні, через регуляцію активності ферментів (Nie et al, 2007). В результаті формується та змінюється низка метаболічних шляхів, що ведуть до утворення десятків тисяч вторинних продуктів, що виконують протекторну функцію, а сам організм налаштовується на виживання та подолання наслідків стресових впливів. Виділяють чотири основні групи функцій білків, що вимагають посттрансляційної модифікації бічних радикалів.

Для появи функціональної активності ряду білків необхідна наявність у їх складі конкретних ковалентно зв'язаних з поліпептидними ланцюгами складних органічних молекул, що безпосередньо і приймають участь у проявах цієї активності, тобто перетворення неактивних каталітично білків у ферменти. До другої групи модифікацій відносяться ті, що забезпечують регуляцію біохімічних процесів, змінюючи активність ферментів. Наступна група - зміни, що стосуються введення "міток" у білки задля забезпечення конкретної внутрішньоклітинної локалізації білків. І, нарешті, ті зміни та процеси, що так чи інакше відповідають за формування певної просторової структури білків (Кнорре и др., 2009).

Отже, під впливом безпосередньо стресорів змін зазнає не лише генетичний матеріал через мутації, репараційні процеси після пошкоджень та ін., а і модифікуються білки. До прикладу, білки теплового шоку (БТШ), що представлені кількома групами. Кожна з них має кількох представників і кодується, як правило, кількома генами, при чому остаточні їх характеристики, тобто місце на 2-ДЕ мапі, визначається модифікаціями, що здійснюються вже після їх синтезу.

Серед них, наприклад, фосфорилювання. Стресор може викликати зміни в мРНК, синтезованих в клітині раніше, відбувається модифікація білкових факторів трансляції та рибосомних білків. Крім того, наприклад, мРНК БТШ мають відмінності від мРНК звичайних білків. Це обумовлює ослаблення, а потім і припинення синтезу звичайних білків в клітинах і перемикає апарат білкового синтезу на синтез БТШ.

Разом транскриптоміку та протеоміку вивчали на прикладі сольового й холодового стресів у листках картоплі (Evers et al, 2012). При цьому виявили значну відмінність у експресії транскриптома та протеома, а протеомічні дані є більш повними та можуть давати більше можливостей при вивченні посттрансляційних модифікацій, ніж просто аналіз транскрипому.

Прикладом може слугувати й пролін як і важлива амінокислота у рослин та тварин, і як вторинний страсовий метаболіт. Окрім конкретних змін на рівні експресії генів, було виявлено і хімічні модифікації, завдяки яким водневі зв'язки, що утримують молекулу у певній конфігурації, визначають її здатність до впізнавання мішеней і, відповідно, активність.

Подібні модифікації білків та амінокислот, що можуть виникати під дією різних екзогенних та ендогенних факторів, визначають місцезнаходження молекул на протеомічних мапах, відхилення від "звичного" місцезнаходження у разі зміни ізоелектричної точки, приєднанні нової групи чи зміни конформації. На даний момент, на жаль лише виділення та секвенування слабо можуть пролити світло на біологічну роль сигнальних шляхів (de la Fuente van Bentem et al., 2006) та їх взаємодію. В той же час, диференціальна протеоміка дозволяє накопичувати вичерпні дані по білкам, що у майбутньому, інтегрувавши дані отримані за допомогою інших методів, дозволить відстежувати конкретні зміни у процесах в тому числі на рівні сигнальних систем.

Отримання даних щодо протеомічних, метаболічних, генетичних та морфологічних змін покликані пояснити, чи відбувається на різних рівнях кресток сигнальних систем та як формування відповіді рослин на абіотичні стресори модифікується іонізуючим випромінюванням.

Таким чином, реакція рослинного організму в умовах змінного та де-коли агресивного середовища, у якому стресові фактори часто можуть впливати комбіновано, передбачає наявність ряд процесів. Починаючи від сприйняття й трансдукції сигналу, закінчуючи формуванням біохімічної відповіді, що контролюється складною системою та включає у себе величезну кількість генів. Проведення біоінформатичного аналізу на різних рівнях організації організму, врахування морфометричних змін, генетичних перебудов, модифікації білків та їх експресії, мусить пролити світло на відхилення реакції рослин на один стресовий чинник під впливом іншого та зрозуміти взаємодія та переключення сигнальних шляхів.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт дослідження та умови вирощування рослин

Визначення реакцій рослин на вплив стресовими чинниками проводили на проростках гороху посівного (*Pisum sativum L.*) сорту "Аронис". Горох має відносно дрібну кореневу систему, що спрощує проведення лабораторних досліджень. Він глікофіт, не переносить солоні ґрунти. Це морозостійкий, але нежаростійкий вид. В той же час здатен виявляти стійкість до спекотної погоди під час цвітіння. На ранніх стадіях розвитку підвищення температури, навіть короточасне, є критичним. Для оптимального росту гороху рекомендується діапазон рН ґрунту від 6,0 до 6,8. За деякими даними, для вегетуючої рослини ЛД₁₀₀ становить близько 46 Гр (Стеблюк, 2013), тому у дослідженні було використано дози, що не перевищують ЛД₅₀.

У запропонованих нами дослідах перебране насіння гороху пророщували у термостаті в темряві у рулонній культурі в фільтрувальному папері при 26°C.



Рисунок 2.1 Культивування проростків гороху у водній культурі та проведення морфометричних вимірювань.

Культивування проростків, починаючи з третього-четвертого дня після проростання, відбувалося у водному середовищі без внесення додаткових поживних речовин (рис.2.1) при температурі 22 ± 2 , освітленості 2286 ± 224 Люкс і темносвітловому циклі 16 ч світла і 8 годин темряви, природному радіаційному фоні ($0,13 \pm 1$ мкЗв / год.).

Горох на стадії 3-4-х добових проростків піддавали впливу стресорами або їх комбінаціями, після чого продовжували культивування в водній культурі. (таблиця 2.1)

Таблиця 2.1

Схема експерименту, що відображає послідовний вплив стресорів.

Примітка: *КТ – кімнатна температура

Варіант (експериментальна група)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Стресовий фактор	Доза іонізуючого опромінення, Гр	0	0	0	5	5	5	10	10	10	15	15	15	20	20	20	25	25	25
	Концентрація NaCl у розчині, mM/l	0	22	0	0	22	0	0	22	0	0	22	0	0	22	0	0	22	0
	Гіпертермічний стрес, °C	КТ	КТ	44	КТ	КТ	44	КТ	КТ	44	КТ	КТ	44	КТ	КТ	44	КТ	КТ	44

2.2 Характеристики опромінення, концентрація та час впливу сіллю або гіпертермією

В якості основного стресового чинника було обрано гостре іонізуюче випромінювання. Опромінення проводили за допомогою рентгенівської установки "РУМ - 17" (Національного інституту раку МОЗ України, Київ), потужність дози становила 89 сГр/хв, енергія фотонів 180кеВ, отримана проростками доза варіювалася від 0 Гр до 25 Гр.

Для визначення реакції на осмотичний шок, проростки піддавали короткочасному впливу сольовим розчином (NaCl) в концентрації 0,22 Моль/л шляхом занурення коренів рослин на 60 хвилин. За цієї концентрації, як показали попередні досліді, швидкість росту головного кореня зменшується приблизно на 50%.

Реакція гороху на підвищену температуру вивчалася після занурення рослин віком 3-4 дні у підігріту до 44-48°C воду на час від 4 до 8 хвилин.

Часовий інтервал між дією стресорів становив 2 години.

При проведенні протеомічного аналізу проростки попередньо опромінювали на установці Gammacell GC.-220 type B (Кобальт-60; 1,8 Гр/хв) (Міжнародна агенція з атомної енергії або МАГАТЕ (англ. International Atomic Energy Agency), Відень, Австрія) наступним чином: 5 Гр – 2 хв 46 сек, 10 Гр – 5 хв 33 сек, 15 Гр – 8 хв 20 сек, 20 Гр – 11 хв 7 сек (рис. 2.2)



Рисунок 2.2 Гамма-установка Gammacell GC.-220 type B, що була використана для опромінення проростків ІВ. Міжнародна агенція з атомної енергії, Вена, Австрія.

2.3 Морфометрія рослин гороху

З метою визначення спрямованості і ступеня зміни вихідного стану резистентності об'єкта було використано загальноприйняту методику, коли об'єкт підпадає під вплив певної дози одного фактора і через визначений час застосовується другий стресор.

Довжину головного кореня проростків вимірювали з інтервалом в 48 годин і розраховували їх відносну швидкість росту (ВШР) як відношення приросту головного кореня в дослідному варіанті до контрольного (виражали у відсотках до контролю).

Маючи поточне емпіричне значення ВШР, і відносячи його до очікуваної швидкості росту (ОШР), що є сумою впливів факторів в разі адитивної відповіді на стресори, оцінювали величину і знак модифікуючого впливу засолення (гіпертермії) на відповідь на іонізуюче опромінення.

Якщо значення ВШР перевищувало теоретично розраховане, то це трактувалося як факт адаптуючого впливу, а якщо його значення було меншим, то вважали, що мав місце сенсibiliзуючий вплив. Зіставляючи поточне значення ОШР з контрольним, оцінювали величину і знак модифікуючого впливу (прояв антагонізму, аддитивності або синергізму). Отримане відношення виражали у відсотках до контролю.

Крім того, через 13 діб після опромінення проводилися вимірювання довжини стебел проростків і підрахунок кількості бічних коренів.

2.4 Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних здійснювали на рівні $p < 5\%$ достовірності з застосуванням стандартних методів пакета Microsoft Excel-2007 та Microsoft Excel-2013, програм Microsoft Office 2010. Повторюваність дослідів – трикратна. При проведенні аналізу протеому рослин, дані аналізували окремо з використанням програми SPSS 13.0.

2.5 Визначення концентрації вільного проліну у зразках гороху

Для визначення рівня амінокислоти проліну, протягом місяця вимірювали його концентрацію у коренях рослин усіх експериментальних груп.

Нінгідрин реагує з усіма амінокислотами, що мають α -аміно-групу, даючи фіолетове забарвлення, за винятком проліну або оксипроліну, в реакції з якими нінгідрин дає жовте (помаранчеве) забарвлення. Цей колориметричний аналіз є кількісним і забезпечує одержання достовірних даних про вміст проліну, його чутливість становить близько 1 нмоль.

Пролін характеризується високою розчинністю в полярних розчинниках і може бути легко екстрагованим шляхом нагрівання рослинних тканин протягом 30 хв в чистому етанолі або у воді. Ми використовували для екстракції розчин етанолу і води в співвідношенні 70:30.

Рослинний матеріал (150-200 мг) відбирали, заморожували і зберігали при -40°C або висушували при кімнатній температурі і екстрагували пролін з сухих зразків. З огляду на те, що при стресових умовах рівень інших нінгідрин-залежних сполук невисокий (Carillo & Gibon, 2011), немає необхідності використовувати толуол (бензол, ксилол) для елюювання хромофора.

Тому ми використовували цей простий, швидкий і відносно нешкідливий нінгідриновий метод, який дає можливість визначення вільного проліну з досить високою точністю (Carillo et al., 2008). Крім того, ми постаралися виключити додатковий вплив на колір реакції в процесі аналізу і використовували тільки коріння рослин.

З цією метою коріння проростків гомогенізували в керамічних ступках за допомогою піску і змішували з розчином води та спирту, після чого центрифугували і відбирали надосадову рідину в чисту пробірку, щоб позбутися від піску, залишків клітинних стінок та іншого. Перша екстракція дозволяє екстрагувати більше 93% проліну (Carillo et al., 2008).

Далі додавали реакційну суміш (1% нінгідрину в оцтовій кислоті з етанолом) і інкубували на киплячій водяній бані при 95 °С протягом 30 хвилин. Потім різко охолоджували пробірки, переносючи їх на лід, щоб зупинити хід реакції.

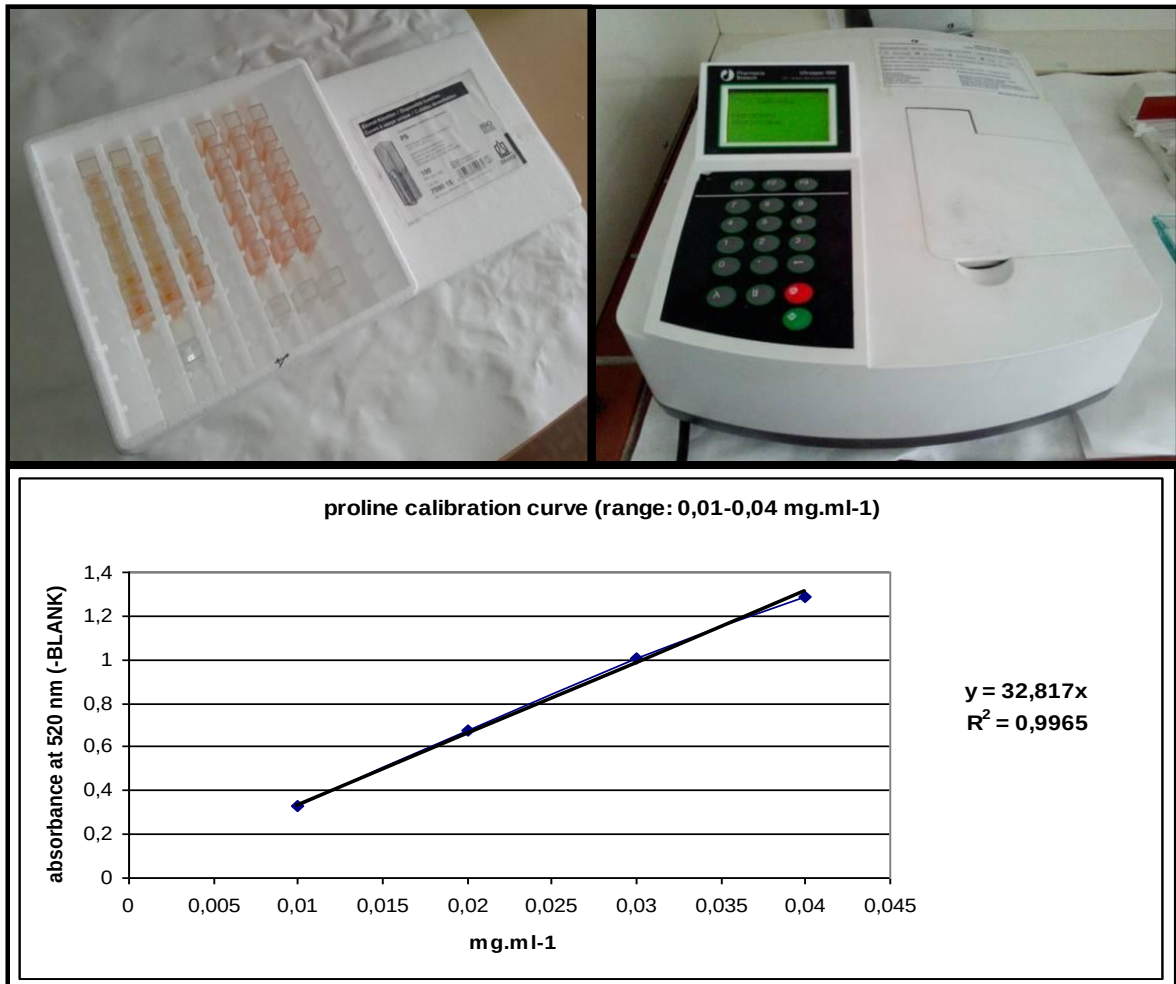


Рисунок 2.3. Пластикові одноразові кювети з розчином нінгідрин-проліну (зверху зліва) для визначення оптичної щільності рідини на спектрофотометрі “Ultrospec 1000”(зверху спрева). Три технічні повторності. Знизу: калібрувальна крива для визначення концентрації вільного проліну. По горизонталі: концентрація проліну, мг/мл. По вертикалі – поглинання хвилі 520 нм.

Центрифугували 1 хвилину при 10000 rpm, відбирали супернатант, переносили у пластикові одноразові кювети і визначали оптичну щільність

розчину нінгідрин-зв'язаного проліну при довжині хвилі 520 нм на спектрофотометрі "Ultrospec 1000" (Рис.2.3) виробника Pharmacia Biotech в триразовій повторності.

Вміст проліну визначали за калібрувальною кривою (рис. 2.3), побудованою з використанням стандартних розчинів L-проліну в концентрації від 0,04 до 1 ммоль, в такому ж розчині з етанолом і водою, що і для екстракції. Графік та розрахунки будувалися та розраховувалися з застосуванням стандартних методів пакета Microsoft Excel. При розрахунках рівень вільного проліну в контролі був прийнятий за 100%.

2.6 Кореляція концентрації проліну з вмістом води у коренях рослин

Протягом місяця ми визначали вміст проліну та води в рослинах всіх експериментальних груп. Рослинний матеріал відбирали, зважували, заморожували і зберігали при -40°C або висушували та екстрагували пролін з сухих зразків. Для визначення вмісту води, сухі зразки зважували повторно. Вміст вільного проліну визначали за допомогою колориметричного аналізу з використанням нінгідрину (Carrillo, 2008; Carillo & Gibon, 2011).

2.7 Аналіз ДНК (LTR - ретротранспозонів)

У визначені терміни після впливу стресовими чинниками на проростки гороху, з них було виділено тотальну ДНК за стандартною загальновідомою методикою Rogers & Bendich (Rogers & Bendich, 1994). Якісну та кількісну оцінку ДНК проводили з використанням гель-електрофорезу та спектрофотометричного аналізу на спектрофотометрі NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Для вивчення фрагментів ДНК, нами було обрано 7 універсальних праймерів, комплементарні послідовностям іPBS ділянок ретротранспозонів (7 штук) (Kalendar, 2010), а також 3

специфічні пари IRAP праймерів, що вже були використані у дослідженнях гороху (Smykal, 2006).

Назва праймерів та їх нуклеотидні послідовності, оптимальна температура відпалу та ін. представлені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристика використаних праймерів

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність (5' → 3')	Оптимальна температура відпалу, °C	Кількість ампліконів	Кількість нових ампліконів
iPBS2228	CATTGGCTCTTGATACCA	54	11	0
iPBS 2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	52	6	0
iPBS 2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	55	7	0
iPBS2251	GAACAGGCGATGATACCA	53	8	0
iPBS2249	AACCGACCTCTGATACCA	51	17	0
iPBS2080	CAGACGGCGCCA	63	5	0
iPBS2074	GCTCTGATACCA	49	7	5
CYCLOP	F–CGATATCTCACAATCCCTGTGGAGAC R–GCAAGGAAACGGAGTGAAAGATGC	64	6	3
OGRE	F–TCGCGAGACCATGTCTTTTCCCAGGTTTAC R–GTGGGCTGGGCTTTAGTGAGATGCTTTCC	71	10	0
PIGY	F–ACGCTCGTCACATGCCCCGTGGCGGTC R–ATCATCAAAGTATCATCCGCCTTAGC	64	4	0

Для проведення ПЛР ампліфікації, використовували 15 мкл реакційної суміші наступного складу: 0.5-1.2 мкл ДНК, 7.5 мкл Maxima Hot Start Master Mix (включає в себе буфер, Taq-полімеразу, dNTP та Mg₂Cl), 1,2 мкл праймерів (Thermo Fisher Scientific).

З метою забезпечення максимального виходу і специфічності продукту в кожному конкретному випадку проведення ПЛР було оптимізовано умови реакції, зокрема, температуру отжигу для кожного

використаного праймера та кількість циклів. Загалом, ампліфікацію проводили при умовах первинної денатурації при 95°C протягом 3-5 хвилин, далі 25-35 циклів (денатурація при 95°C 25-45 секунд, отжиг залежно від праймерів при відповідних температурах 30-70 секунд, та елонгації при 72°C протягом 2-2,5 хвилин), кінцевій елонгації при 72°C 10 хвилин з подальшим зберіганням при 4 °C.

Для фракціонування продуктів ПЛР-реакції проводили горизонтальний електрофорез в 1-2%-ому агарозному гелі (концентрацію якого також варіювали та підбирали для оптимізації візуалізації фрагментів ДНК під час сканування), в присутності бромистого етидію. Гель поміщали до камери з 1xTE-буфером (10 mM Tris -HCl, pH 7.5-8.0, 1 mM EDTA). Електрофорез проходив при постійній напрузі 60-70 V, протягом 60-150 хвилин (рис.2.4). Гелі фотографували в проникаючому УФ світлі цифровим фотоапаратом. Розміри ампліконів аналізованих зразків ДНК визначали шляхом зіпівставлення їх електрофоретичної рухливості в гелі з рухливістю маркерів - фрагментів ДНК відомої молекулярної маси з використанням програми Image J. В якості маркера молекулярних мас використовували «GeneRuler 100 bp (Plus) DNA Ladder», (Thermo Fisher Scientific).



Рисунок 2.4 Використане під час дослідження обладнання для ампліфікації ДНК, електрофорезу ДНК у агарозному гелі та білків у ПААГ

Аналізували отримані в результаті ампліфікації електрофореграми з чітко помітними та розділеними ампліконами, кількість яких варіювала в залежності від використання відповідного праймера. Кількість дослідів варіювала від 3 до 5 для кожного праймера (пари праймерів).

2.8 Виділення та аналіз білків проростків гороху після комбінованої дії іонізуючого опромінення та засолення

Виділення білків проводили паралельно з виділенням ДНК з 500 мг сировини за стандартною методикою з використанням фенолу та осадження амоній ацетатом. Концентрацію білків визначали за інтенсивністю забарвлення з використанням реагенту Бредфорда порівнюючи зі стандартними розчинами бичачого альбуміну сироватки. Для кожного гелю використовували аліквоти білків 50 мкг, що були розведені та попередньо підготовані і зберігалися при -80°C .

Під час експерименту з визначення кількісних та якісних змін у протеомі гороху за умов гострого впливу іонізуючої радіації, засолення та їх комбінації було використано методику класичного двовимірного гелі-електрофорезу (2-ДЕ), що включала кілька етапів.

Для першого виміру було використано стрічки з іммобілізованим вузьким градієнтом рН 4-7 для максимального розділення найбільш багатобілками зони та проведено ізоелектричне фокусування (ІЕФ) на приладі Protean IEF Cell фірми BioRad. Для другого виміру ми використали вертикальний поліакриламід гелі-електрофорез (ПАГЕ) протягом 14 годин при силі струму 10 мА (Рис. 2.5).

Після трикратної промивки гелів деіонізованою водою протягом 12-14 годин їх фарбували на обертовому змішувачі розчином барвника «Кумасі блу» (20% етанолу, 1,6% фосфорної кислоти, 8% сульфату амонію і 0,08% кумасі діамантового синього G-250) для візуалізації білкових плям. Відскановані денситометром цифрові зображення (рис. 2.5) аналізували з використанням комплексного програмного пакету (версії) PDQuest, який

містить оптимізовані алгоритми для виявлення плям, їх кількісного обрахунку (площа та інтенсивність забарвлення, відфільтрація фону, співставлення аналогічних плям на гелях групи (плями присутні мінімум на 2 з 3 гелів) та порівняння їх для кожної з експериментальної груп).



Рис. 2.5 Обладнання, використане під час проведення аналізу білків, а саме для проведення першого розміру, виділення білків, фарбування, сканування та підствічування гелів для вирізання плям.

Статистичну обробку даних за допомогою програми Excel пакету Microsoft Office 2010 та SPSS 13.0. Перед проведенням статистичних тестів для оцінки достовірності змін масиви експериментальних даних перевіряли на однорідність розподілу повторностей досліду. У зв'язку з високою варіацією даних у якості параметра оцінки концентрації білків було використано медіану. Застосування медіанних оцінок зумовило використання непараметричних критеріїв і статистик для порівняння відмінностей між варіантами досліду і контролем. Тому статистичну значущість відмінностей між експериментальними варіантами перевіряли за допомогою критеріїв Манна-Уїтні та Крускала-Волліса.

Плями, концентрація білків у яких статистично відрізнялися, були вирізані із гелю. Для ензиматичного розщеплення білків фрагменти гелю переносили до пробірки з подальшим трикратним промиванням їх розчином (50 % ацетонітрил, 50 мМ бікарбонат амонію) для видалення барвнику та солі. Далі проводили їх зневоднення ацетонітрилом та регідrataцію розчином трипсину (20 μ г ліофілізованого модифікованого ензиму для секвенування розчиненого у 1 мл 50 мМ бікарбонату амонію). Час, необхідний для розщеплення білків при 37 °С, становив близько 15 год. Після двократного екстрагування розчином (60% ацетонітрил, 1% мурашина кислота) зразки висушували за допомогою центрифужного вакуумного випарювання для їх збереження для подальших аналізів при -80 °С.

Для ідентифікації білків отримані суміші після розщеплення пептидів розділяли шляхом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ). Отримані з використанням мас-спектрометрії дані (з застосуванням мас-спектрометрії MALDI-TOF або іонізатору типу електроспрей (ESI) (Gábrišová, 2016) порівнювали за допомогою онлайн-інструментів з даними бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> та сайту UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Для кожної з чотирьох експериментальних груп (контрольні проростки, проростки опромінені у дозі 10 Гр, проростки після культивування в умовах засолення, проростки після впливу обох стресових чинників) було проаналізовано по три гелі. Ідентифіковані білки, концентрація яких відрізнялася між групами, були охарактеризовані за допомогою баз онлайн-сервісів типу BLASTP (NCBI) за амінокислотною послідовністю. Загалом було порівняно 223 білкові плями, з яких статистично достовірними виявилися зміни у 54 плям, ідентифіковано з них було 39 білків.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Оцінка морфометричних показників рослин *P.sativum* L. після гострого впливу іонізуючого випромінювання та абіотичних стресових чинників

При спільній дії стресових факторів на живі організми теоретично можливі кілька варіантів розвитку подій. Стресори можуть послаблювати негативний вплив один одного (антагонізм), посилювати його (синергізм) або ж результат їх взаємодії на рослину буде дорівнювати сумі впливів кожного з факторів (адитивність). Останній, розрахований нами як очікувана швидкість росту (ОШР), ми використовували як показник очікуваної шкоди, завданої проросткам спільною дією кількох пошкоджуючих чинників.

При цьому вважали, що при відхиленні отриманих результатів від розрахованого могли вмикатися різні, взаємозалежні шляхи реакцій організму на стресор. Це відображалось у відмічених нами синергізмі та антагонізмі, що вказують на можливість «увімкнення» кростока сигнальних систем. Емпіричним — відносною швидкістю росту (ВШР) — був показник середньої довжини коренів гороху кожної з експериментальної груп, виражений у відсотках до контролю.

Динаміка морфометричних показників в залежності від часу (2, 4, 8, 13 доба) після впливу стресовими факторами здатна інтегрально характеризувати зміни онтогенезу рослин на молекулярному та організменному рівнях.

За даними вимірів, проведених через дві доби після впливу стресових факторів на проростки гороху (рис. 3.1), видно, що при попередньому опроміненні проростків в дозі 5 Гр з подальшим нагріванням (група 5+Г°С) пригнічуючий ефект значно перевершив очікуваний, що вказує на синергізм обох факторів у зазначеній дозі.

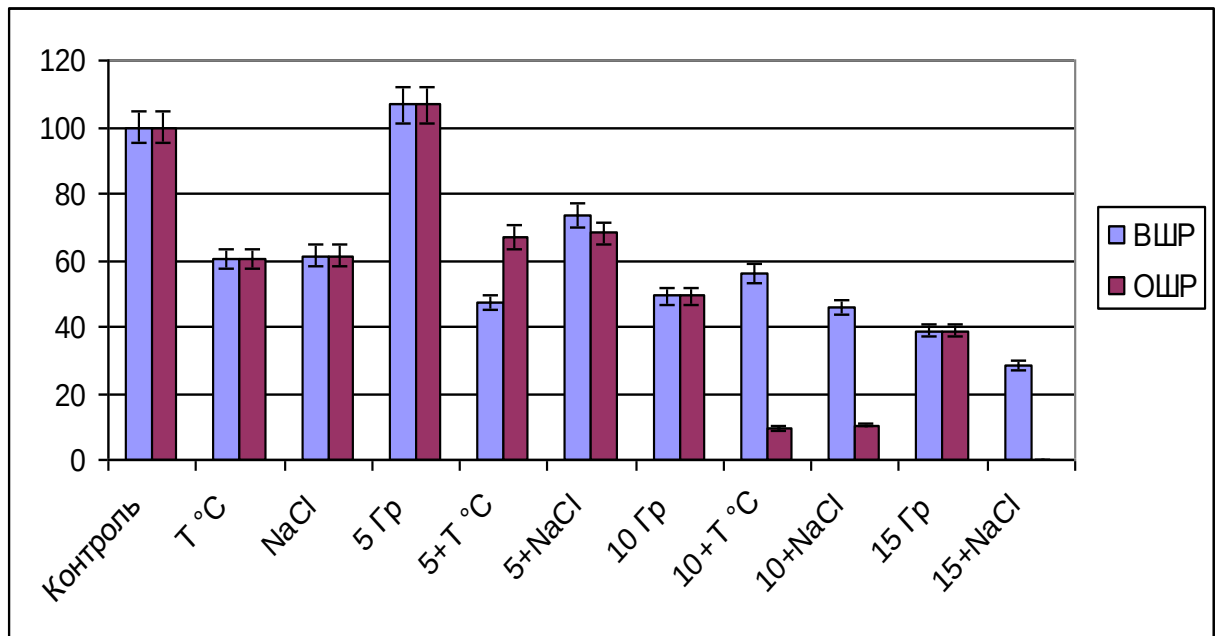


Рисунок 3.1. Вплив різних доз іонізуючого опромінення (від 0 до 15 Гр) у комбінації з гіпертермічним (44 °C) або сольовим (NaCl, 22 мМ) впливом на ростові показники коренів проростків гороху (2 доба після опромінення). По осі y – відсотки, у перерахунку до контролю, по осі x – експериментальна група рослин: 1-контроль, 2-т (гіпертермія), 3-NaCl, 4-5 Гр, 5 – 5 Гр + t, 6 – 5 Гр + NaCl, 7 - 10 Гр, 8 – 10 Гр + t, 9 - 10 Гр + NaCl, 10 - 15 Гр, 11 - 15 Гр + NaCl. ВШР - відносна швидкість росту, ОШР - очікувана швидкість росту

При цьому експериментальна група (5+NaCl), що знаходилася під впливом сольового стресу після опромінення в невеликій дозі 5 Гр, показала діаметрально протилежний результат: теоретично очікуване пригнічення росту рослин виявилось вище емпіричного, що може свідчити про роль іонізуючого випромінювання в конкретному випадку як про «пом'якшуючий» фактор при впливі сольового розчину. Це може бути пояснено тим, що низькі дози іонізуючої радіації сприяють збільшенню експресії генів, що регулюють активність антиоксидантних ферментів, підвищують концентрацію осмолітів та компонентів стресових сигнальних систем (Rashydov et al., 2012), таких як, наприклад, вільна амінокислота

пролін. Попереднє іонізуюче опромінення проростків активізувало захисні механізми рослин, що дозволило їм легше перенести подальший вплив інших стресорів, підвищило до них стійкість (Пахомова, 1996). Підтвердження цьому ми можемо спостерігати на прикладі груп, що знаходилися під впливом гіпертермії та сольового стресу і попередньо опромінених в дозі 10 Гр. На другий день після опромінення рівень пригнічення росту кореня становив практично 50% від контролю, але при цьому довжина кореня перевищувала теоретично очікувану на 35-47%. При опроміненні в дозі 15 Гр ми чітко спостерігали пригнічення росту рослин (38% від контрольних значень), проте, як і у випадку груп з комбінуванням 10+NaCl або 10+T°C, досить високу виживаність - на 27% вищу від ОШР.

У перші 2 дні після опромінення (у варіанті з 10 Гр) швидкість росту проростків, які піддавали дії температурного шоку, була вищою, ніж у групи тільки опромінених рослин, що вказує на модифікуючий вплив іонізуючої радіації на вплив гіпертермії у бік антагонізму. Це явище спостерігали у перші 8 діб після опромінення з подальшим засоленням.

Як відомо, до перших етапів неспецифічної відповіді клітин рослин на вплив різноманітних стресорів, відноситься цілий комплекс в тій чи іншій мірі однотипних реакцій. Їх можна розглядати в якості загальнобіологічних: зниження тотальної активності синтетичних процесів, деградація білоксинтезуючого апарату, катаболізм біополімерів, синтез стресових білків, підвищення синтезу та активації гідролітичних ферментів, утворення необхідних для термінового захисту клітин сполук. Виходить, що початковий період відгуку рослинного організму на стресовий фактор, зафіксувати який можна морфометричними методами, і на який припадають ранні біологічні ефекти, включаючи репарацію, а також зміна декількох клітинних циклів, припадає саме на ранні етапи розвитку проростків.

Гальмування метаболізму в клітинах рослин на початковій фазі відповіді на стресор можна називати захисним. Воно має неспецифічний характер. Зниження активності метаболічних процесів при стресі має захисно-пристосувальний характер і перешкоджає розвитку самоушкодження, зберігаючи тим самим життєвий потенціал клітин для подальшого відновлення. Таким чином, в першу фазу впливу стресора в клітинах рослин знижується інтенсивність властивого нормі метаболізму і вмикаються процеси, які не характерні для звичайних умов існування, які, однак, мають тимчасовий характер.

Інтенсивність і тривалість катаболічних процесів при стресі не повинні виходити за рамки необоротних змін, що неминуче ведуть до загибелі, тому, ймовірно, в клітинах повинні утворюватися і накопичуватися стрес-лімітуючі фактори (Nguyen et al., 2016). Першу фазу стресової реакції при формуванні адаптації рослин до пошкоджуючих впливів можна розглядати в якості термінової, але недосконалої адаптації, тоді як в період II фази поступово активуються довготривалі механізми адаптації при дії на організм стресових факторів середовища.

Таким чином, I фаза стресової відповіді не тільки передуює процесу адаптації до змін умов середовища, але і грає в ній істотну роль. В процесі адаптації до стресових факторів, які за рівнем впливу на організм не призводять до незворотних наслідків, клітини рослин зазнають змін анаболічного характеру, котрі призводять до поступової активації метаболічних процесів, що виражаються в активації хроматину, транскрипції та трансляції, зниженні активності багатьох гідролітичних ферментів і стабілізації активності інших, відновленні активності фотосинтезу і дихання, ростових процесів.

Тобто, в цей період організм переходить на новий режим життєдіяльності, що сприяє формуванню пристосувальних реакцій, серед яких все більш важливого значення для рослини набувають специфічні реакції. Виходячи з графіка, наведеного на рис. , з віддаленням за часом від

моменту впливу стресового чинника ми спостерігаємо «вирівнювання» загальної картини, тобто вся система, отримавши потужний поштовх у вигляді декількох гострих впливів стресора, почала поступове відновлення до рівня характерних показників опромінених у відповідних дозах груп рослин.

Протягом наступних 4 діб реакція рослин виглядає так, наче вплив іонізуючого опромінення відігравав основну та вирішальну роль у формуванні ростових реакцій (рис. 3.2).

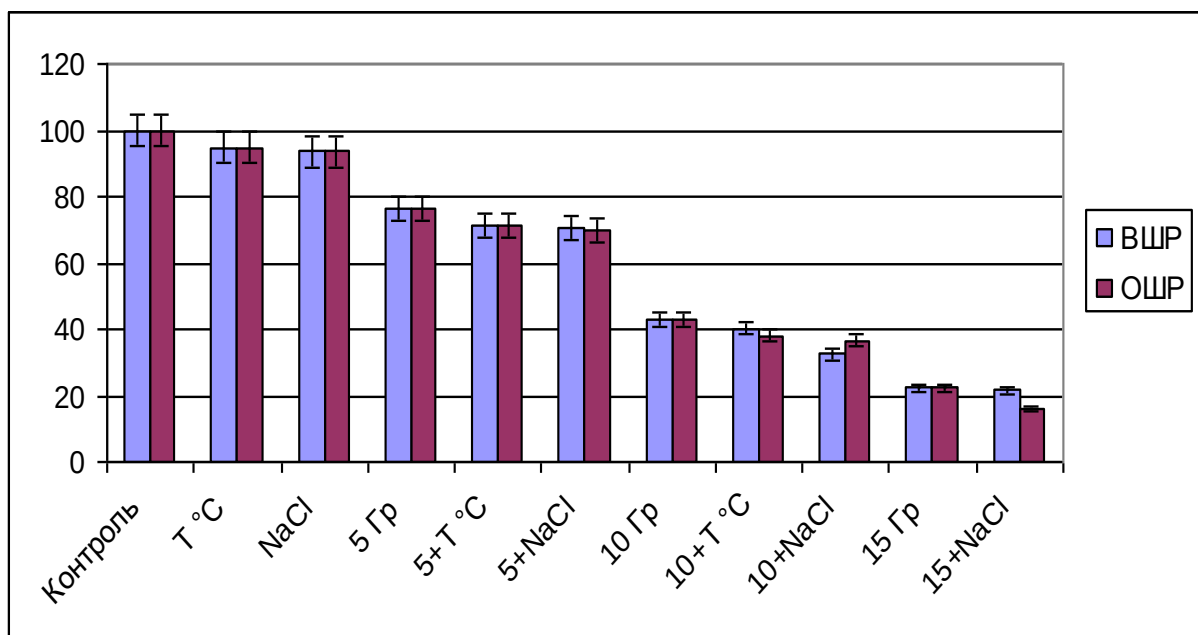


Рисунок 3.2. Вплив різних доз іонізуючого опромінення в діапазоні 0-15 Гр у комбінації з гіпертермічним (44 °C) або сольовим (NaCl, 22 мМ) впливом на ростові показники коренів проростків гороху (4 доба після опромінення). По осі y – відсотки, у перерахунку до контролю, по осі x – експериментальна група рослин: 1-контроль, 2-т (гіпертермія), 3-NaCl, 4- 5 Гр, 5 – 5 Гр + t, 6 – 5 Гр + NaCl, 7 - 10 Гр, 8 – 10 Гр + t, 9 - 10 Гр + NaCl, 10 - 15 Гр, 11 - 15 Гр + NaCl. ВШР - відносна швидкість росту, ОШР - очікувана швидкість росту.

Вплив різних доз гострого опромінення та інших стресових факторів на ріст проростків гороху через 8 днів після впливу стресорів також характеризується схожою з показниками попередніх днів динамікою розвитку: проглядається дозова залежність, закономірна для даного діапазону доз, тобто пропорційно з підвищенням дози іонізуючого опромінення спостерігається зниження інтенсивності росту коренів рослин (рис. 3.3).

При цьому ефект антагонізму різних за своєю природою стресорів також стає більш помітним: попереднє опромінення в дозах 10 Гр і 15 Гр перед впливом сольового стресу і гіпертермії значно поліпшило ростові показники рослин в порівнянні з очікуваними.

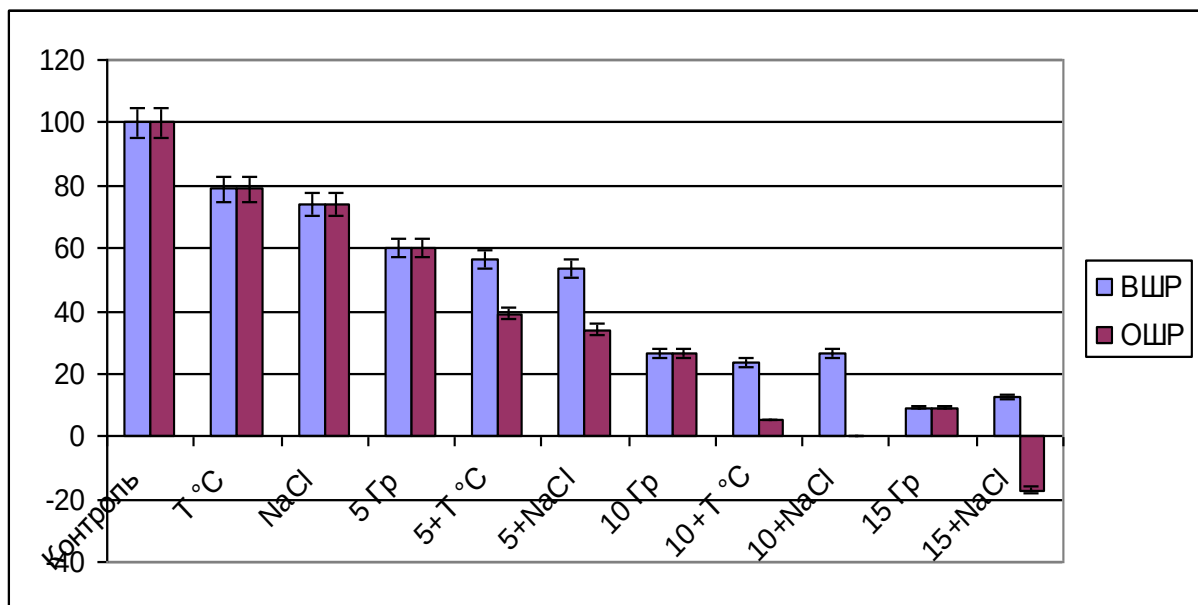


Рисунок 3.3 Вплив різних доз іонізуючого опромінення в дозах 0-15 Гр у комбінації з гіпертермічним (44 °C) або сольовим (NaCl, 22 мМ) впливом на ростові показники коренів проростків гороху (8 доба після опромінення). По осі y – відсотки, у перерахунку до контролю, по осі x – експериментальна група рослин: 1-контроль, 2-т (гіпертермія), 3-NaCl, 4- 5 Гр, 5 – 5 Гр + t, 6 – 5 Гр + NaCl, 7 - 10 Гр, 8 – 10 Гр + t, 9 - 10 Гр + NaCl, 10 - 15 Гр, 11 - 15 Гр + NaCl. ВШР - відноснв швидкість росту, ОШР - очікувана швидкість росту.

Так, якщо при одночасному опроміненні та засоленні проростків очікувалося повне припинення росту, спостерігали повільну регенерацію головного кореня на рівні близько 10 % від контролю. Ефект антагонізму впливу середніх доз у комбінуванні з термічним шоком (група 10+T°C) виявляється короткочасним та найбільш виражений через дві доби після впливу стресорами.

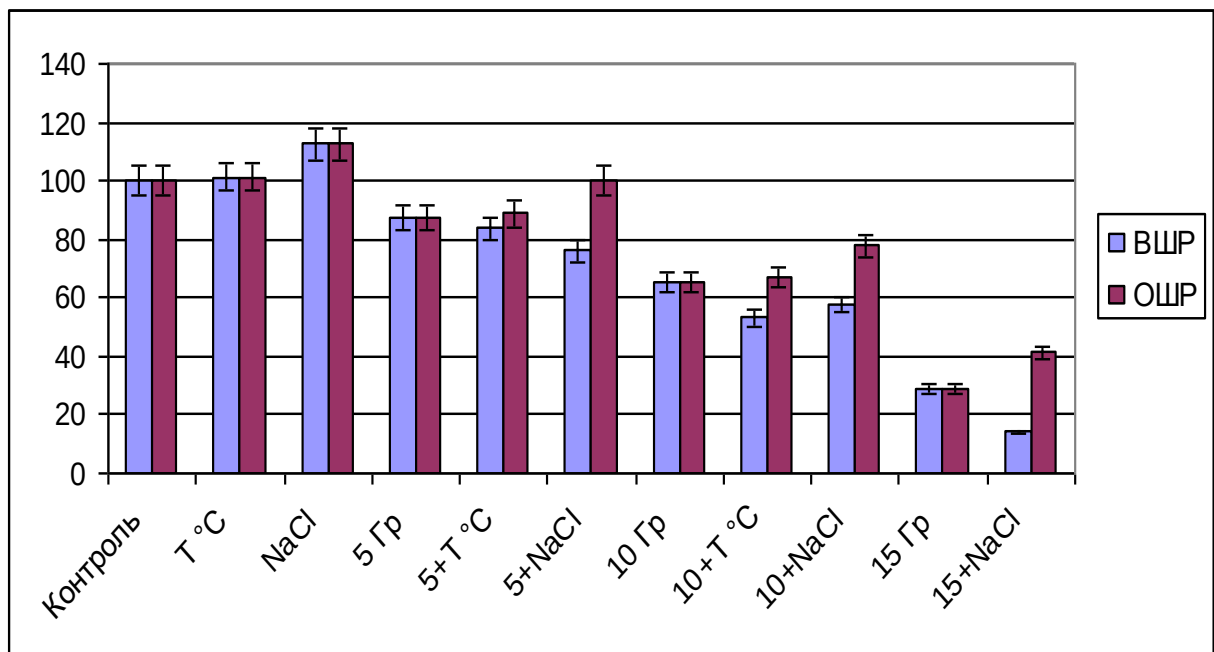


Рисунок 3.4 Вплив різних доз іонізуючого опромінення в дозах 0-15 Гр у комбінації з гіпертермічним (44 °C) або сольовим (NaCl, 22 мМ) впливом на ростові показники коренів проростків гороху (13 доба після опромінення). По осі y – відсотки, у перерахунку до контролю, по осі x – експериментальна група рослин: 1 - контроль, 2 - t (гіпертермія), 3-NaCl, 4-5 Гр, 5 – 5 Гр + t, 6 – 5 Гр + NaCl, 7 - 10 Гр, 8 – 10 Гр + t, 9 - 10 Гр + NaCl, 10 - 15 Гр, 11 - 15 Гр + NaCl. ВШР - відносна швидкість росту, ОШР - очікувана швидкість росту.

Довжина головного кореня на момент останнього вимірювання через 13 діб після початку експерименту ні в одній з груп не перевищувала

теоретично очікувану (рис. 3.4). Але цей показник почав наближатися до контрольних значень, особливо для доз до 10 Гр (на 13 день став перевищувати 85-50 % в порівнянні з 60-23% на восьмий день для 5 Гр та 10 Гр відповідно).

Особливо це було характерно для рослин після впливу засолення: 23% різниці для 5 Гр, 20 % та 27 % для 10 Гр та 15 Гр. Це можна пояснити тим, що зменшення швидкості росту рослин нерідко пов'язують зі зменшенням вмісту води в тканинах організму. Крім того, ефект від стресорів майже через два тижні після впливу міг проявитися у одночасній активації захисних реакцій рослин з активною відповіддю клітин і деградацією структур з появою вільного проліну (Stork & Schmitt, 2002).

Для кращої візуалізації зміни ростових реакцій проростків у динаміці по днях, що демонструє відхилення показників (довжини кореня, у % до контрольних значень) від адитивності в один чи інший бік та , відповідно, модифікуючий вплив іонізуючої радіації на абіотичні чинники, було створено загальний об'єднуючий рисунок (рис. 3.5).

Поява бічних коренів, які повністю були відсутні на початку експерименту, дещо специфічна та неоднозначна, але підтверджує, що внаслідок значного пригнічення росту головного кореня в результаті впливу стресорів, як іонізуючого випромінювання, так і засолення, гіпертермії та їх комбінації з ІВ, функція його частково починає замінюватися бічним корінням.

Коливання ростових характеристик проростків гороху під дією різних стресорів і їх комбінацій протягом довгого часу може вказувати на виникнення на певних етапах відповіді організму кростока сигнальних систем. Це призводить до утворення різних сполук, які впливають на систему синтезу протекторних речовин, зокрема проліну, його деградацію, передачу сигналу та адаптивний потенціал рослини в цілому.

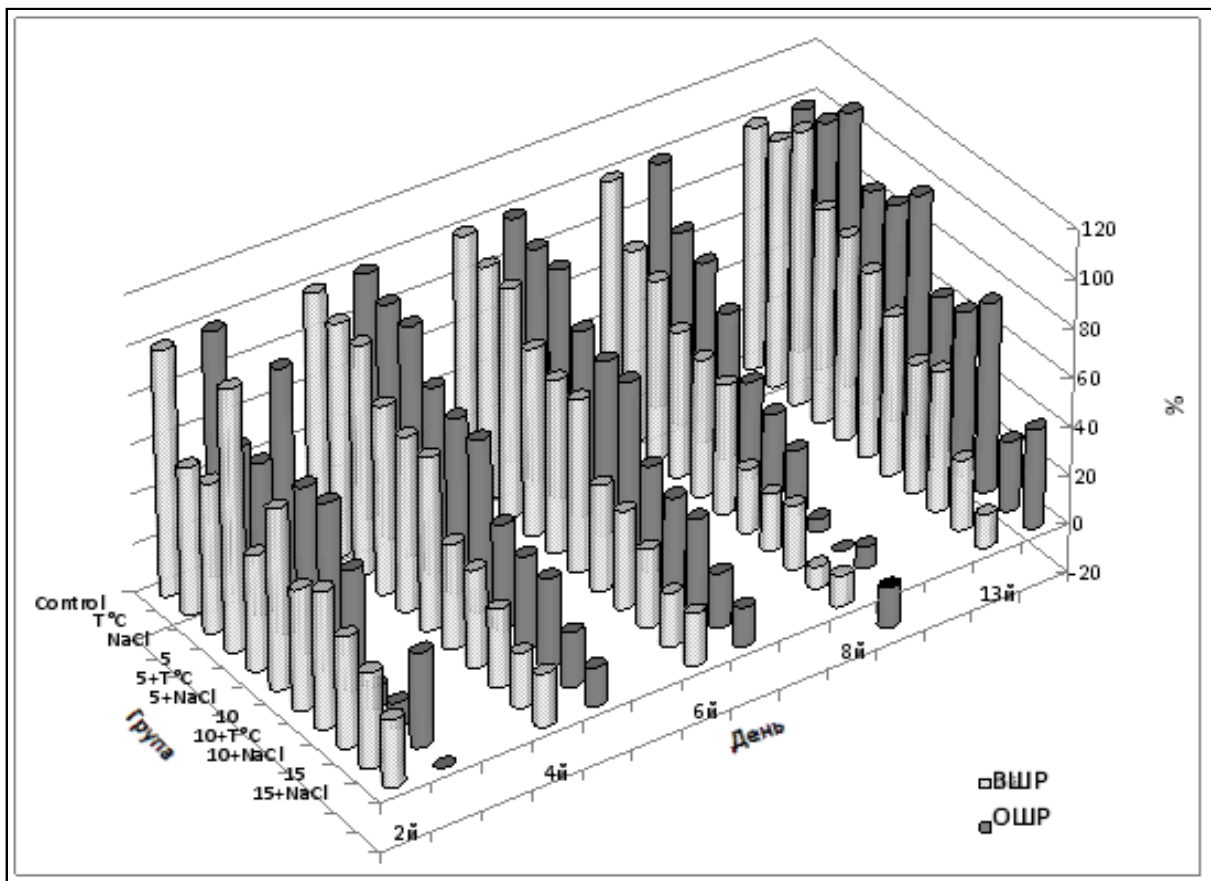


Рисунок 3.5 Вплив різних доз опромінення в комбінації з гіпертермічним впливом чи засоленням на ростові показники корінців проростків гороха (2-13 доба після опромінення). Експериментальна група рослин: 1-контроль, 2- t (гіпертермія), 3-NaCl, 4- 5 Гр, 5 – 5 Гр + t , 6 – 5 Гр + NaCl, 7 - 10 Гр, 8 – 10 Гр + t , 9 - 10 Гр + NaCl, 10 - 15 Гр, 11 - 15 Гр + NaCl. ВШР - відносна швидкість росту, ОШР - очікувана швидкість росту

З викладеного вище можна зробити наступні висновки, що рівень відхилення від адитивності в бік синергізму або антагонізму, що найбільш яскраво спостерігається через дві та вісім діб після дії стресорів, може вказувати на прояви явища кростоку. При цьому, на перемикання між різними сигнальними шляхами захисних систем вказує той факт, що в період між 2 та 8 добами росту рослин, їх реакція виглядає так, що вплив іонізуючого випромінювання відігравав основну та вирішальну роль у формуванні ростових реакцій (незалежно від подальшого засолення чи

нагрівання), впливаючи на прояв реакції на інші абіотичні стресори, коли показники ОШР та ВШР принципових відмінностей для більшості груп не мали.

Іонізуюче опромінення здатне покращити реакцію проростків гороху на засолення, що відображається у підвищенні через дві доби після обробки стресорами ростових показників на 12% у порівнянні з рослинами, які зазнали тільки впливу засолення. Це підтверджує, що попередній вплив іонізуючого опромінення підвищує стійкість проростків до дії осмотичного або гіпертермічного стресів, що модифікують відповідь рослин, однак це явище має тимчасовий характер.

3.2 Онтогенетичні порушення та аномалії у будові проростків, викликані стресом

Окрім досліджуваних ростових параметрів – швидкості росту рослин, формування бічних коренів – ми аналізували й поодинокі випадки порушення онтогенезу та органогенезу, зокрема, архітектуру кореневої системи. Ці аномалії практично не зустрічалися серед проростків контрольної групи (рис.3.6а). Водночас, деякі з них були характерними для певної групи стресорів. Серед фенотипових відхилень, пов'язаних із впливом досліджуваних стресових чинників на проростки гороху, було виділено наступні (рис.3.6).

Поява двох або трьох точок росту стебла замість однієї (рис.3.6б) була характерна частіше для рослин після термічного шоку та для опромінених у високих дозах проростків, ніж для проростків гороху, що зазнали впливу засолення. Це може бути пов'язано з особливостями дії стресорів: для дослідження впливу хлориду натрію у сольовий розчин занурювали лише корені рослин, що виключало безпосередній контакт стебла з сіллю. Водночас, поява нових точок росту для коренів була характерною саме для проростків, що зазнали впливу засолення.

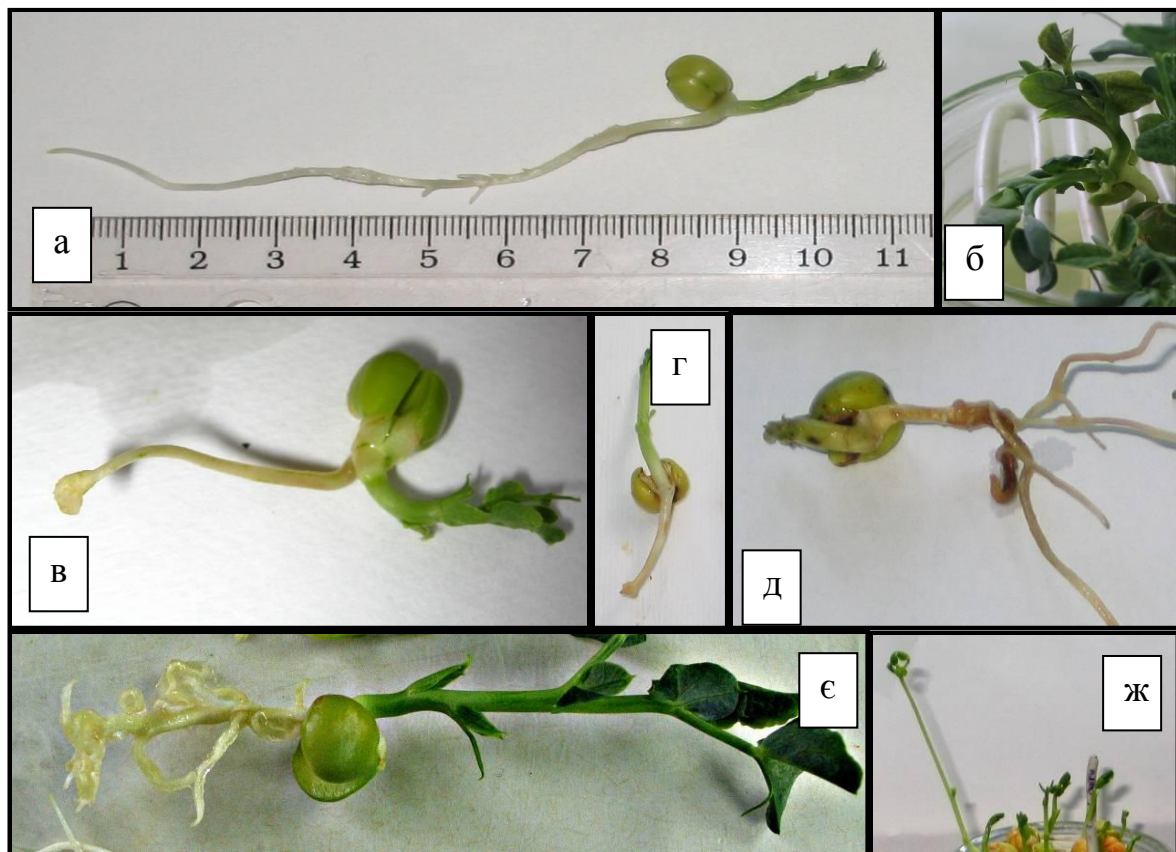


Рисунок 3.6 Типи пов'язаних з ростом та розвитком проростків порушень, викликаних іонізуючою радіацією, засоленням, підвищенням температури або їх спільною дією. а- нормальна рослина гороху; б – пригнічення апікальної меристеми верхівкової бруньки і як наслідок три точки росту апікальної меристеми пагона; в, г – гіперплазія (калусоподібне потовщення) кореня; д – некроз частини головного кореня та поява бічних; є – відхилення від умовної норми товщини, довжини, напрямку росту та кількості бічних та головного коренів; ж – аномально великі міжвузля стресованих проростків поряд з типовими рослинами, 2 дні після впливу стресорів.

Переважаю для опромінених рослин були характерними аномалії, пов'язані зі змінами зон активно проліферуючих клітин. Зокрема, у районі зони поділу корінців гороху після високих доз опромінення (близько 20 Гр), разом зі сповільненням загальних темпів росту кореня, могли

з'являтися потовщення у точці росту (рис. 3.6в-г). Такі схожі на калус зони надалі (в разі, якщо проросток виживав) ставали місцем розгалуження кореня, що робило його схожим на щітку.

Після засолення або засолення у комбінації з іонізуючим опроміненням підземної частини рослини ми іноді спостерігали некротичні зміни апікальної меристеми та головного кореня. В такому разі виживання проростку забезпечувалося ініціацією утворення бічних коренів вище зони некрозу (рис.3.6д).

Ще однією характерною реакцією на стресори різного походження, але високої інтенсивності, була деформація як бічних, так і головного кореня (рис.3.6е), що зберігалася у конкретної рослини протягом усього періоду проведення експерименту. Кілька проростків з усіх експериментальних груп практично не відрізнялися від контрольних зразків, за винятком довжини міжвузлів пагона (рис.3.6ж). Таке аномально швидке видовження пагона з одночасним збереженням кількості та розмірів листків та коренів може бути пов'язане з хвилеподібним стрибком розтягнення клітин. При цьому, можливо, мало місце також підвищення експресії генів, опосередковано чи напряду пов'язаних з ростом та розтягненням клітин стебла, через міграцію ретротранспозонів та «увімкнення» ними певних генів, ділянок ДНК. Окрім представлених на рисунках, траплялися також поодинокі випадки орфодевіантів з порушенням симетрії литкової пластинки, практично рівними вусиками, малими порівняно з контрольною групою листками чи їх кількістю та змінами в забарвленні. Подібні аномалії характерні та описані для багатьох видів рослин, що перебувають в умовах техногенних екосистем, зокрема, Донбасу. Їх за морфо-функціональним критерієм автор запропонував розділити на три групи аномалій (в будові вегетативних та генеративних органів рослин): нейтральні, негативні (деструктивні) та позитивні (преадаптаційні). Нейтральні зміни ознак, на думку дослідників, істотно не впливають на функціональні можливості органів; негативні порушення

органів приводять до повної або часткової втрати важливих функцій; позитивні ж зміни супроводжуються поліпшенням функціональних можливостей рослинних організмів та дозволяють їм краще адаптуватися до умов забрудненого та стресового середовища; їх запропоновано розглядати як преадаптаційні. (Ліханов, 2004). Усі перераховані аномалії можуть бути пов'язані як з індивідуальною чутливістю рослин, так і з пошкодженням ДНК, зі змінами в експресії генів, посттрансляційній модифікації білків та змінами у шляхах сигнальних систем, зумовлених прямою чи опосередкованою дією засолення, іонізуючої радіації та підвищених температур на проростки гороху. Цю гіпотезу частково можна перевірити аналізами активності ретротранспозонів рослин та спектру білків, концентрація яких змінювалася у відповідь на ті чи інші пошкоджуючі фактори.

3.3 Пролін як маркер конститутивних та індукованих захисних реакцій

В природних умовах живі організми зазнають комбінованого впливу стресових факторів, як в гострому, так і в хронічному режимі, що може впливати на загальний стан і розвиток рослин, зниження їх врожайності і прискорення старіння (Martins et al., 2011; Trindade et al., 2013).. При поєднанні відповіді на кожен зі стресових факторів, виникає так званий перетин або «перехресна нарада» сигнальних систем, тобто кресток (Mundy, 2006). Він забезпечує оптимальну відповідь організму, формуючи специфічний або неспецифічний біохімічний інструментарій для здійснення захисної реакції рослини (Fujita et al., 2006; Kang & Saltveit, 2001; Wei et al., 2014) при, зокрема, сольовому стресі (Hurst et al., 2002). Наприклад, як при радіаційному, так і при тепловому шоці відбувається зміна активності СОД (супероксиддисмутази). Також подібними до ефектів опромінення є зміни активності каталази у відповідь на сольовий

стрес (Ахмад и др., 2010, Morgan et al., 2008). Однією з універсальних відповідей рослин на абіотичний стрес є зміни рівня проліну.

Пролін (піролідин- α -карбонова кислота, $C_5H_9NO_2$) – гетероциклічна амінокислота, в якій атом азоту входить у склад вторинного, а не первинного, аміну. Він може існувати в двох оптично ізомерних формах - L і D. Пролін є одним з найбільш багатофункціональних стресових метаболітів рослин. Окрім давно встановленої осмопротекторної функції, пролін виконує шаперонну, антиоксидантну, сигнально-регуляторну та інші функції (Corvalho et al., 2013; Szabados & Savoure, 2009). Крім того, він виконує і ряд функцій, не пов'язаних з адаптацією рослин до дії стресорів, виконуючи роль сигналу для переходу до цвітіння або сприяючи нормальному розвитку пилку і насіння (Funck et al., 2012).

Пролін виконує пряму антиоксидантну, осмо- та мембранопротекторну дію, бере участь в регуляції експресії генів антиоксидантних ферментів і в зв'язуванні металів зі змінною валентністю, впливає на баланс НАД(Ф)Н/НАД(Ф). Кількість конститутивного проліну у рослинному організмі зазвичай може визначати його подальшу реакцію на різні стресові чинники, їх інтенсивність та черговість впливу, а зміни вмісту проліну можуть бути показником життєдіяльності організму в стресових умовах.

Регуляція метаболізму проліну відбувається як на генетичному, так і на епігенетичному рівнях. При цьому відзначається певна залежність між кількістю конститутивного проліну та інтенсивністю його накопичення у відповідь на стрес, зокрема СОД, що виникає при іонізуючому опроміненні та засоленні. Показано, зокрема, що у листках рослини *Thellungiella salsuginea* високий рівень конститутивного проліну співпадав з його інтенсивною акумуляцією у відповідь на сольовий стрес (Сергєєва & Броннікова, 2016). Початкове (перші кілька годин) зниження конститутивного рівня цієї амінокислоти у відповідь на окисний стрес вказує на його витрачання на «гасіння» синглетного кисню. Подальше ж

його повернення до початкового рівня з поступовим зростанням могло бути результатом активації його біосинтезу, індукованого наростанням інтенсивності окисного стресу. Було показано, що відновлення вмісту проліну в листках дійсно відбувалося шляхом активації експресії гена *P5CS1* і відсутності істотних змін в транскриптах гена деградації проліну (*PDH*) (Бакуліна, 2010).

Прикладом епігенетичної регуляції також може слугувати дослід, в якому вивчали вплив місадіона натрію бісульфіту (*MSB*) на солестійкість рослин арабідопсису та на метилювання цитозину на фоні сольового стресу. Зокрема, *MSB* призводить до стану гіпометилювання в промоторній області генів, що беруть участь в біосинтезі (*P5CS1*) і деградації (*ERD5*) проліну, впливаючи головним чином на стан ділянок CHG і CHH (де H є будь-який нуклеотид, крім G) сайтів DNA. Виявлені епігенетичні зміни корелюють з експресією генів *P5CS1* (upregulation – позитивна регуляція) і *ERD5* (downregulation – негативна регуляція), що веде до зміни накопичення проліну (Borges et al., 2003). Після проведення дослідження фізіолого-біохімічних механізмів стійкості рослин картоплі до високої температури з використанням клітинної біотехнології автори дійшли висновку, що стабільними виявилися зміни, викликані дією високих температур, тоді як у соматоклональних ліній при більш низькій температурі вони з часом губилися, тобто проявлявся епігенетичний ефект на рівні рослин-регенерантів (Авгонова & Дарвозієв, 2002).

Аналіз рівня метилювання ДНК, чутливого до Саузерн-блот аналізу, показав, що у 2 з 3 генів, *P5CS* і δ -*OAT*, було більш виражене деметилювання сайтів ДНК рослин наступного покоління після дії стресорів, ніж в контролі. Мабуть, деметилювання ДНК сприяло накопиченню проліну шляхом зміни у регуляції експресії генів *P5CS* і δ -*OAT* у відповідь на осмотичний стрес (Zhang et al., 2013). Було висловлене припущення про різні механізми процесу адаптації Cd-стійких ліній

тютюну до засолення, що може бути обумовлено епігенетичними змінами метаболізму проліну (Сакарийаво, 2001).

З огляду на те, що метилування ДНК пов'язане майже з усіма метаболічними процесами регуляції експресії генів, автори висловлюють припущення, що епігенетична модифікація і біосинтез проліну, ймовірно, пов'язані між собою. Щоб перевірити це, вони досліджували, чи пов'язано накопичення проліну, викликане осмотичним стресом (15% поліетиленгліколю), з модифікаціями метилування ДНК у рослин рису. Вони оцінювали рівень метилування ДНК і експресію 3 ключових генів (*P5CR*, *P5CS* і δ -*OAT*), залучених в біосинтез проліну, і виміряний вміст цієї амінокислоти як при осмотичному стресі, так і в контрольних умовах. Після осмотичного стресу рослини накопичували більш високі концентрації проліну в листках при зниженні рівня метилування ДНК, тобто спостерігався зв'язок з епігенетичним станом ДНК, при чому ця регуляція була стійкою та успадковувалася наступним поколінням.

3.3.1 Зміни вмісту проліну в коренях рослин гороху у відповідь на сольовий стрес в комбінації з попереднім тепловим шоком

Через тиждень після дії сольовим і гіпертермічним стресорами вимірювали вміст проліну у проростках гороху. При нагріванні, як в комбінації з засоленням, так і без нього, рівень амінокислоти виявився значно вищим контрольних значень (рис. 3.7). Це говорить про те, що підвищення температури провокує більш сильний та/або пролонгований ефект на проростки, ніж сольовий стресовий фактор.

Короткочасний нагрів з подальшим засоленням знижував вміст проліну в коренях рослин в порівнянні з просто засоленими проростками. Однак при вдвічі більш тривалому нагріванні рівень амінокислоти максимально зростав. Його рівень перевищував показники як контрольної групи проростків, так і груп стресованих сіллю і сіллю в комбінації з

гіпертермією. Але при цьому ефект нагрівання мав модифікуючий вплив на процес накопичення проліну.

Досліди Чудінової, проведені на проростках пшениці, що піддавалися дії засолення з гіпертермією, демонстрували, що співвідношення амінокислоти в коренях і наземних частинах рослин має позитивну кореляцію (Чудінова & Суворов, 2011). У зв'язку з цим, ми в своїх дослідженнях використовували підземну частину гороху, проектуючи результати, отримані на коренях, на всю рослину в цілому.

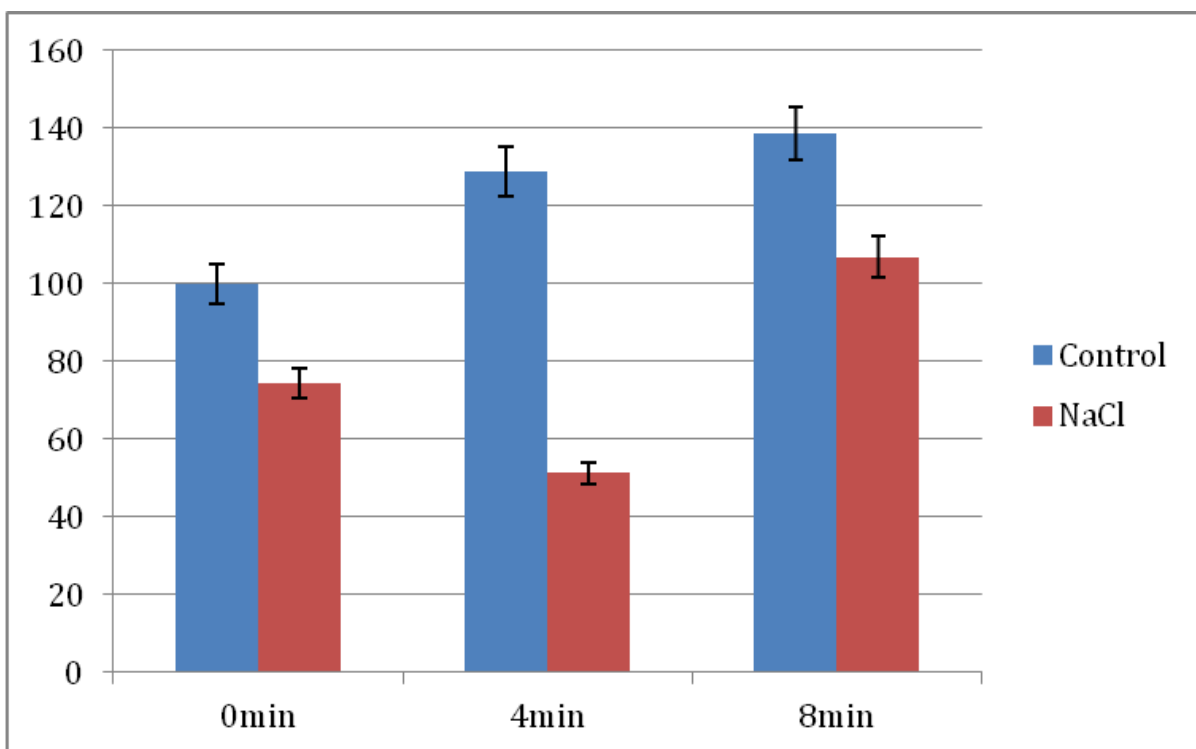


Рисунок 3.7 Залежність концентрації проліну від тривалості гіпертермічного впливу після засолення (4 та 8 хвилин нагрівання по осі x). 7 днів після впливу стресорами. Процентний вміст від контролю (вісь y).

Раніше було показано, що інгібуючий ефект росту проростків кукурудзи при засоленні збільшувався за подальшої гіпертермії, однак при цьому короточасні нагрівання рослин до 40 °C помітно знижували цей ефект (Чудінова и др., 2005). Через два дні після впливу стресорами на

проростки пшениці спостерігалася найбільша акумуляція проліну (в 4-5 разів вище у порівнянні з контролем) при одночасній дії гіпертермії і засолення (Чудінова & Суворов, 2011).

Цікаво, що прогрів проростків до 44 °C протягом і 4, і 8 хвилин, провокував різке підвищення вмісту проліну, на 40 % вище контрольних значень. І при цьому його рівень у рослин після наступного засолення значно відрізнявся. Зменшився рівень проліну майже наполовину в порівнянні з показниками групи після засолення при 4 хвилинах гіпертермії і всього на чверть перевищив його при 8 хвилинах. Це може бути пов'язано з кількома обставинами.

По-перше, підвищення вмісту проліну, як після осмотичного шоку, так і після впливу іонізуючого випромінювання, можна пояснити його походженням: амінокислота була наслідком деградації пролін-вмісних білків клітинних мембран. Відомо, що збагачені проліном протеїни (proline rich proteins, PRPs) задіяні у формуванні клітинних стінок. (Сергеева & Броннікова, 2016). У нашому експерименті у груп рослин, що піддавалися комбінації стресорів у вигляді засолення і досить тривалого прогрівання протягом 8 хвилин, мабуть, відбувалася деградація більшості білків, яка приводила в тому числі до пригнічення росту рослин і значного підвищення вмісту проліну в коренях. В даний час встановлено, що дія будь-якого стресового чинника супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК) (супероксид аніон, гідроксил аніон, перекис водню), які ушкоджують білки, нуклеїнові кислоти і викликають перекисне окиснення ліпідів в мембранах клітин. Підтвердження цьому є у дослідях Карташова на *Thellungiella halophila* (Карташов и др., 2006)

З іншого боку, було раніше показано, що попереднє нагрівання проростків гороху до 35 градусів нівелювало зниження рівня білка і ДНК у рослин після засолення (Чудінова и др., 2011), що ми й спостерігаємо в експерименті при комбінації засолення і гіпертермії протягом 4 хвилин.

Не варто виключати і такий варіант пояснення різного рівня накопичення проліну у різних групах рослин. Раніше було виявлено здатність сперміну і проліну до дальнього транспортування по ксилемі і флоемі від органів, підданих тепловому шоку, до інших частин рослин. З огляду на транзитний характер їх акумуляції при дії гіпертермії, можна припустити їх участь в системах передачі стресового сигналу. Наприклад, показали аналогічний хід акумуляції проліну і сперміну в листі *Mesembryanthemum crystallinum* в умовах засолення і несуттєві зміни вмісту обох сполук при дії підвищених температур. Це може вказувати на те, що біосинтез проліну регулюється осмотичним фактором так само, як і біосинтез сперміну. Отже, можна припустити, що засолення, яке впливало на корені проростків, після гіпертермії провокувало передачу сигналу в наземні органи рослин і запускало там синтез захисних сполук. Як наслідок, рівень проліну у рослин після засолення і теплового шоку (4 хвилини) в комбінації, був нижчим за контрольні показники, адже пролін-багаті білки ще не деградували, а пролін, що синтезувався, слугував трансдукції сигналу в листки гороху.

Є припущення (Кузнецов, 1999), що тепловий шок сам по собі не індукує синтез проліну, а лише робить рослини компетентними відповісти на наступне засолення накопиченням даного осмоліта. До сих пір залишається невідомою природа рецептора, за допомогою якого рослинна клітина сприймає температурний сигнал. Припускають, що при зміні в'язкості мембран може відбуватися відкривання кальцієвих каналів (Карпець & Колупаєв, 2009) і активація кальцій залежних шляхів трансдукції сигналу в геном (Трунова, 2007). Важливими інтермедіатами можуть бути і активні форми кисню або продукти перекисного окиснення ліпідів (Чудінова и др., 2011), які виникають також і під час дії гострого іонізуючого опромінення на живі організми.

3.3.2 Вплив теплового шоку в комбінації з попереднім іонізуючим випромінюванням на вміст проліну у проростках гороху

Для вивчення реакції рослин і накопичення ними проліну у відповідь на дію радіаційного фактора, нами була проведена наступна серія дослідів.. Проростки гороху піддавали дії теплового шоку використовуючи нагрівання до 44 °C протягом 4 хвилин. В якості пошкоджуючого фактора виступало гостре іонізуюче опромінення в дозах до 20 Гр. Через два дні після впливу стресорами відбирали рослинний матеріал, визначали рівень проліну (рис. 3.8) і порівнювали отримані дані.

Варто зазначити, що концентрація досліджуваної амінокислоти у відповідь на опромінення змінювалася несуттєво. Однак цікавим є те, що при попередньому опроміненні у проростків, що піддавали дії гіпертермії, рівень цієї амінокислоти зростав суттєво. Такий тип взаємодії стресорів можна класифікувати, як потенціювання, тобто варіант, коли радіація сама по собі на концентрацію проліну в коренях рослин сильно не впливає, але може модифікувати дію гіпертермії. Показником цього є збільшення рівня амінокислоти в півтора раза як в порівнянні з контрольною групою, так і з групою тільки прогрітих рослин.

Для амінокислот характерна різна стійкість до іонізуючої радіації, що залежить, до всього іншого, від того, у вільному стані вони знаходяться, чи включені до складу білкової молекули. Так, тирозин білку при опроміненні руйнується швидше, ніж вільний, а фенілаланін, аргінін, пролін і гістидин в складі білка більш стійкі. Як давно вважається, ароматичні і гетероциклічні амінокислоти за чутливістю до іонізуючого випромінювання можуть бути поставлені в наступний ряд: гістидин> фенілаланін> тирозин> триптофан, а найбільш стабільними по відношенню до опромінення є пролін і оксипролін.

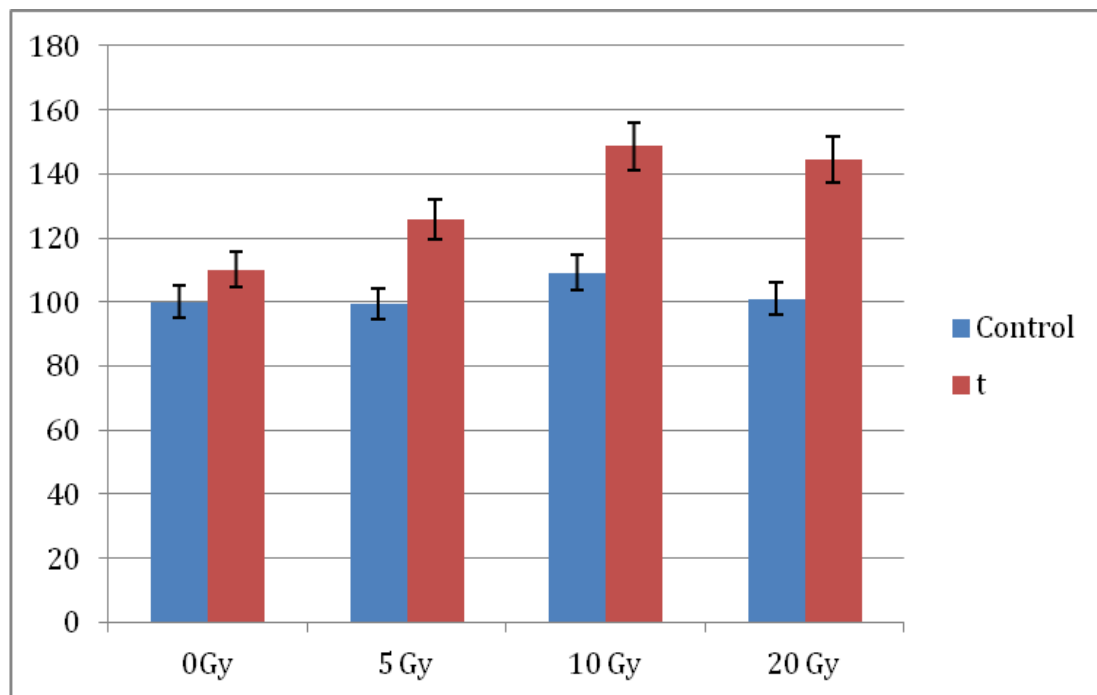


Рисунок 3.8 Накопичення проліну проростками гороху через 2 дні після впливу гіпертермії і попереднього опромінення. По осі y - процентний вміст від контролю, по осі x - доза ІВ.

Отже, як і після дослідження ростових показників, ми показали, що найчастіше спостерігається адитивна взаємодія стресорів, індукованих кожним агентом. Наявність синергічної чи антагоністичної взаємодії залежить від співвідношення доз або часу або інтенсивності цих факторів.

Існує «оптимальна» доза ІВ, при якій синергічне посилення радіаційного ефекту максимальне, а будь-яке відхилення цього співвідношення від оптимального призводить до зниження синергічного взаємодії.

3.3.3 Концентрація вільного проліну у проростків після поєднання впливу засолення з попереднім опроміненням

Відомо, що у багатьох рослин вміст вільного проліну в наземних і підземних органах різниться не суттєво і в основному корелює, хоча деякі роботи свідчать і про те, що особливості його накопичення в коренях і пагонах вказують на тканинспецифічність накопичення цієї амінокислоти.

З віддаленням у часі від моменту впливу стресорів його концентрація в різних частинах рослини вирівнюється. Так, автори відзначають, що кількість проліну в контрольних варіантах не трансгенних рослин (дикий тип) вже на 14 день досліду в обох частинах рослин не відрізнявся. (Михальська и др., 2013). У нашому дослідженні для підвищення достовірності вимірювання проліну ми теж визначали вміст амінокислоти в коренях проростків гороху.

Зміна вмісту проліну в коренях рослин порівняно з контрольними значеннями може служити кількісною мірою стресу. Застосування цієї амінокислоти, яка, як відомо, накопичується в вегетативних органах рослин в умовах абіотичного стресу, було запропоновано навіть для фітоіндикації як показник хімічного забруднення довкілля (Даніліна & Фролов, 2015)

Чим більше рослина підпадає під вплив несприятливих умов зовнішнього середовища, тим вищий вміст проліну в її тканинах. Неодноразово показано, що у більш чутливих до стресорів рослин рівень цієї амінокислоти підвищується більшою мірою в порівнянні зі стійкими видами. (Кирилов & Козьмик, 2013). Горох є досить радіо- і солечутливою рослиною, у зв'язку з чим в експерименті очікувалося побачити досить сильний відгук метаболічного апарату та коливання концентрацій проліну як захисної амінокислоти у всіх експериментальних групах.

У однорічних рослин, за різними даними, момент зростання концентрації проліну фіксують як вже через 30 хвилин після початку впливу засолення у проса (Вайнер и др., 2013), 4 годин у арабідопсиса після впливу засолення NaCl (Діденко та ін., 2016), так і на 7-10 добу у тютюну (Сергєєва & Броннікова, 2016).

Особливість впливу хлориду натрію, в порівнянні з іншими абіотичними факторами, полягає в подвійній природі його дії: це як токсичний вплив надлишку іонів (Na^+ , Cl^-), так і через створення осмотичного стресу (Deinlein et al., 2014; Hasegawa et al., 2000; Sneha et al.,

2013). Сольовий стрес призводить до надвідновлення електронтранспортного ланцюга і до зростання утворення активних форм кисню (АФК), а отже, і до оксидативного стресу (Falleh et al., 2012).

Під час засолення в клітині проникають іони Na^+ і Cl^- . Ці токсичні іони приводили до посиленої акумуляції проліну, що закономірно, оскільки роль проліну як амінокислоти, пов'язаної зі стресом, добре відома (Szabados & Savoure, 2010; Сергєєва та ін., 2015). Це показано також в роботах з солями кадмію. Встановлено, що іони Cd^{2+} є найбільш сильними екотоксикантами, що тягне за собою активацію клітинних механізмів стресостійкості рослин, обумовлену накопиченням вільного проліну. (Тажибаєва & Масимгазієва, 2013)

У наших експериментах найбільше зростання показників проліну на другий день було виявлено в разі використання високих доз іонізуючого опромінення, коли при дозах 15-25 Гр його рівень сягав 140% від контролю та у випадку комбінації впливу хлориду натрію з опроміненням в дозі 5 Гр або без нього (рис. 3.9).

Це може бути пов'язано з активацією експресії генів, залучених у процес синтезу і деградації проліну. Так, для листків арабідопсиса було показано, що через 12 годин після стресової обробки хлоридом натрію у концентраціях 100 і 150 мМ рівень мРНК гена, що кодує ключовий фермент синтезу проліну *P5CS* (піролін-5-карбоксилат редуктаза) зростає в 2,5 і 3,5 рази, відповідно (Liu & Zhu, 1997).

В шляхах синтезу та деградації проліну у вищих рослин задіяно близько 20 генів (Kavi Kishor et al., 2005). Серед них особливо варто виділити два гена - *AtP5CS2* і *AtP5CS1*. Відомо, що обидва гена активуються низькою температурою, посухою, наявністю підвищених концентрацій солі, осмотичним стресом. Вони контролюють синтез *P5CS* (піролін-5-карбоксилатсинтетази), ключового біфункціонального ферменту біосинтезу проліну, що є «вузьким пляшковим горлечком» в

біосинтезі цієї амінокислоти і грає головну роль при стресових впливах (Чудинова & Суворов, 2011).

Іншим ферментом синтезу проліну є орнітінамінотрансфераза (*OAT*). Однак роль цього гена в контролі стресостійкості рослин поки залишається під питанням, оскільки його тип експресії відрізняється від типових стрес-специфічних варіантів. (Колодяжная и др., 2009).

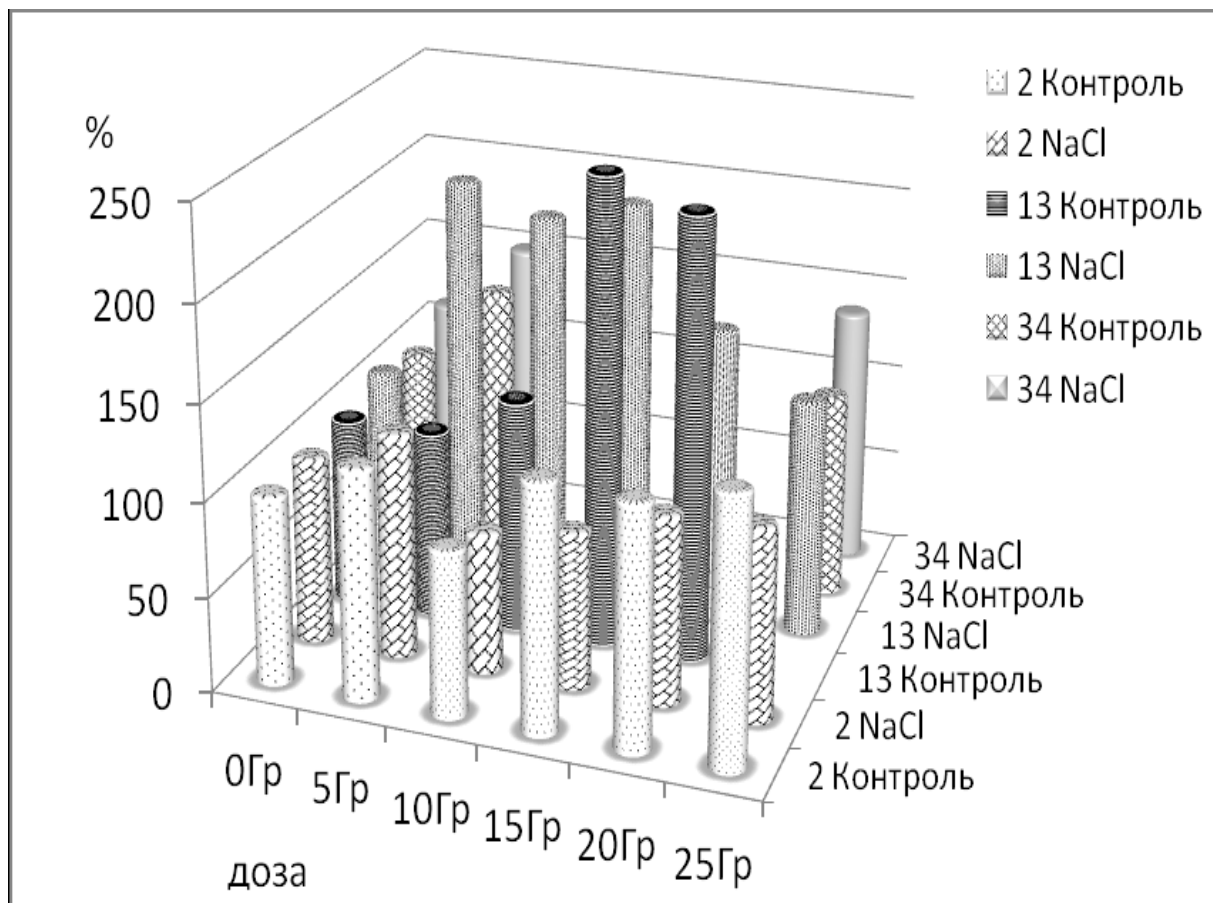


Рисунок 3.9 Концентрація вільного проліну в корнях рослин гороху через 2-34 дня після засолення (в комбінації з опроміненням і без нього). Процентний вміст від контролю (вісь у). Доза ІВ - вісь х, день експерименту (2 дні після впливу стресорами, 13 та 34) - вісь z.

Ще понад півстоліття для вивчення синтезу кожної з амінокислот в певних кількостях, що в свою чергу забезпечує синтез специфічних білків, стали виділяти і отримувати культури мікроорганізмів, в тому числі, з

природних джерел. Так, відомі штами дикого типу, які накопичують в середовищі глютамінову кислоту, пролін або валін. Ауксотрофні мутанти відбираються на селективних середовищах після впливу на суспензії бактеріальних культур фізичними (наприклад, ультрафіолетове або іонізуюче випромінювання) і хімічними факторами. У таких мутантів з'являється дефектний ген, що детермінує фермент, без якого не може здійснюватися біосинтез певної амінокислоти.

Крім того, ген *P5CS* з *Vigna aconitifolia* кодує біфункціональний ензим, що володіє каталітичними активностями γ -глютамілкінази і глютаміл- γ -семіальдегід-дегідрогенази - використовувався для трансформування рослин. Цей ензим каталізує перетворення глютаматы у пірролін-5-карбоксилат, який потім відновлюється до проліну. Підвищення концентрації осмотика сприяє збільшенню осмотичного потенціалу (зниження водного потенціалу) і полегшенню виживання в умовах водного дефіциту. У випадку з нашими даними стосовно зміни вмісту проліну під впливом випромінювання або засолення, для пояснення ролі проліну в крос-адаптації рослин, було б інформативним провести пошук подібних генів і сполук-посередників, які впливають на рівень їх експресії та передачу сигналу.

Відомо, що серед численної групи рослинних протеїнів існують особливі, збагачені проліном білки (proline rich proteins, PRPs). Вони задіяні в компартментах клітинних стінок (Колодяжная и др., 2009; Кравец и др., 2012). В їх молекулах залишки проліну організовані в мотиви, які повторюються, і до яких може приєднуватися гідроксипролін. Завдяки цьому формуються внутрішньо- і міжмолекулярні перехресні зв'язки, що забезпечують структуру клітинної стінки. У разі порушення цілісності стінок клітин пролін вивільняється. На 13-ту добу ми відзначали його суттєве зростання. Це відносилось до всіх груп рослин, де стресові фактори впливали окремо, або в комбінації. Винятком стали рослини в групі, опромінєній в дозі 5 Гр, де концентрація амінокислоти не

відрізнялася вірогідно від контролю. Це може бути пов'язано з тим, на що вказують результати попередніх дослідів, де аналізували ростові реакції проростків (рис.3.5) і де була виявлена навіть стимуляція росту коренів при настільки не критичній дозі. Можливо, пролін, що почав утворюватися в перші дні відповіді рослини (другу добу, коли вміст амінокислоти був на 20% вище контролю), на фоні незначних пошкоджень в подальшому був залучений в синтез інших необхідних клітині сполук. При цьому, високі дози радіації все ще стримували синтез проліну після засолення. У цьому діапазоні доз, мабуть, як і в експериментах з тютюном, результати яких, наведені в літературі, можна погодитися з твердженням дослідників, які вважають, що оскільки патологічна дія солі пов'язана з проникненням токсичних іонів всередину клітини, то на сьому-десяту добу (в нашому випадку, тринадцяту), ймовірно, починався їх негативний вплив на внутрішні структури клітини. Це призвело до активації захисних реакцій рослин і як до активного підвищення синтезу проліну, так і до деградації структур з вивільненням вільного проліну (Сергєєва & Броннікова, 2016)

На 34-ту добу після початку експерименту концентрація проліну у рослин, які зазнали впливу засолення, в комбінації з попереднім опроміненням або без, залишалася трохи вищою контрольних показників в середньому на 20 відсотків, і тільки при поєднанні засолення з високою дозою опромінення 25 Гр зберігалася велика відмінність в 50 відсотків. Можна припустити, що згодом, мабуть, відбувається процес відновлення рослин і, відповідно, вирівнювання концентрацій амінокислоти.

Цікавим був ще той факт, що через 90 днів після впливу стресорів на проростки гороху, накопичення проліну, за нашими даними, виявився нижчим контрольного.

В результаті експериментів, проведених на рослинах проса, авторами було зроблено висновок про роль пероксиду водню, що генерується за участю НАДФН-оксидази, в запуску реакцій, необхідних для адаптації рослин до засолення, зокрема, в індукуванні накопичення проліну.

Передобробка проростків пероксидом водню або інгібітором НАДФН-оксидази знімала як підвищення вмісту пероксиду водню, викликане сольовим стресом у рослин проса, так і накопичення проліну (Колупаев & Ястреб, 2013). Потрібно взяти до уваги те, що під впливом іонізуючого випромінювання, крім прямої передачі енергії молекулам, в присутності кисню утворюються різні продукти радіолізу, які мають окисні властивості, зокрема, пероксид водню H_2O_2 . Тобто не варто виключати ролі пероксиду водню в спостережуваному явищі на 2-й день при опроміненні у дозах 10 і 15 Гр, коли рівень проліну становив близько 75 і 80% від контролю відповідно, та на 4-й день експерименту при опроміненні дозою 20 Гр, коли концентрація проліну була приблизно 75% від контролю), і концентрація проліну була вищою у проростків після засолення, порівняно з рослинами, що піддавалися попередньому опроміненню.

Це справедливо для ранніх фаз відповіді організму на радіацію, адже в четвертій фазі відповіді (Давидов, 2007) фізико-хімічні та біологічні зміни властивостей молекул визначають клітинні пошкодження, формується активна відповідь організму. Тривалість цієї фази може затягнутися на тривалий період аж до всього життя рослини. Тобто, на наступних етапах знімається опосередкована дія радикалів і перекису водню на рівень вмісту проліну та його концентрація починає залежати від інших чинників. Наприклад, накопичення проліну може регулюватися АБК, іонами Ca^{2+} (Сакарийаво и др., 2001; Сергеева, 2011). АБК активує синтез проліну і цілого ряду стресових білків: аквапоринів, дегідринів, осмотина, ферментів синтезу проліну і сприяє запасанню гідратної води під час осмотичного стресу, гальмує синтез РНК і звичайних білків. Показано, що Ca^{2+} і ряд інших неорганічних сполук модифікують активність проліндегідрогенази - ферменту, який контролює катаболізм цієї амінокислоти (Французова и др., 2013)

На 13, 22 і 34 день опромінені і засолені проростки накопичили більшу кількість проліну, ніж просто засолені, що говорить про втрату протекторного впливу іонізуючого випромінювання на віддалених фазах розвитку гороху. З іншого боку, у проростків гороху в цей час швидкість росту головного кореня переходить в фазу уповільнення, а приріст бічних коренів збільшується, що пов'язано з деструкцією клітинних стінок і активацією інтеркалярної меристеми головного кореня, що веде до збільшення кількості проліну особливо на 13 і 34 день після впливу стресових факторів (Нестеренко та ін., 2018).

Ми вважаємо, що проліну притаманна більшою мірою не осморегуляторна, а протекторна функція. Авторами підтверджено (Франко & Мело, 2000), що він впливає на внутрішньоклітинну регуляцію процесів між цитоплазмою і вакуолями, регулює рН цитозолі, захищає ферменти і внутрішньоклітинні структури, інактивує вільні радикали, є джерелом вуглецю та азоту для відновлення після дії стресу, бере участь у передачі сигналу під дією стресових факторів. акумуляція проліну може бути пов'язана з окремими типами стресорів (Nakashima et al., 1998; Моисеева и др., 2012), однак взаємозв'язок проліну з осмотолерантністю не завжди очевидна і однозначна (Mani et al., 2002).

Неоднозначність даних щодо накопичення проліну при дії різних стресорів і їх комбінацій може вказувати на утворення на певних етапах відповіді рослин інших сполук, що впливають на систему синтезу амінокислоти, її деградацію, передачу сигналу. Експерименти показали, що першим підвищується рівень проліну, а вже пізніше, до нього приєднуються поліфенольні сполуки (Діденко та ін., 2016). У деяких рослин зареєстроване більш ніж стократне підвищення проліну у відповідь на стресові чинники (Liang et al., 2013), зокрема, засолення (Miranda et al., 2014) Високий рівень вільного проліну в солестійких і солечутливих генотипів був проявом різноспрямованих реакцій. Отже, його абсолютні значення не можуть бути однозначним показником солестійкості.

(Сергєєва & Броннікова, 2016). Крім того, необхідно також враховувати ймовірність появи інших протекторних осмотично активних речовин, особливо у рослин.

Подальші дослідження перехресної адаптації гороху з використанням різних стресових факторів і їх комбінацій, аналогічно дослідам з горохом і перехресним культивуванням в розчинах ПЕГ і NaCl (Гаджієва и др., 2010), можуть бути корисні не тільки як спосіб створення певного рівня проліну в тканинах проростків для підвищення комплексної стрес-стійкості рослин, але і бути перспективними для внесення ясності в загальні механізми крос-адаптації рослин до стресорів.

3.3.4 Визначення кореляції між вмістом проліну та кількістю води у коренях гороху

Як відомо, крім синтезу шокових білків, при несприятливих умовах в клітинах зростає вміст вуглеводів і проліну, які беруть участь в захисних реакціях, стабілізуючи цитоплазму. У геномі рослин записана спеціальна програма, пов'язана з подоланням наслідків стресу, зокрема при водному дефіциті та засоленні у ряду рослин (ячмінь, шпинат, бавовник та ін.), концентрація проліну в цитоплазмі яких може зростати в 100 разів і більше. Завдяки своїм гідрофільним групам пролін може утворювати агрегати, які ведуть себе як гідрофільні колоїди. Цим пояснюється висока розчинність проліну, а також здатність його зв'язуватися з поверхневими гідрофільними залишками білків. Незвичайний характер взаємодії агрегатів проліну з білками підвищує розчинність білків і захищає їх від денатурації.

Накопичення проліну як осмотично активної органічної речовини сприяє утриманню води в клітині. Амплітуда коливань вмісту проліну залежить від безлічі факторів. Концентрація цієї амінокислоти зростає в рази, десятки або сотні разів залежно від виду рослин, типу стресового чинника, тривалості його впливу, часу, що пройшов після впливу фактора.

Ми фіксували максимальне підвищення концентрації проліну через 22 дні після впливу стресорами, його концентрація перевищила контрольний рівень в три рази при дозах 20-25 Гр.

У зв'язку з викладеним вище для з'ясування рівня відгуку рослинних об'єктів на дію стресових факторів ми вирішили використати як критерій взаємозв'язок між вмістом води і концентрацією проліну у рослин (рис. 3.10). З цією метою визначали значення кореляції на 2, 13, 22 і 34 день експерименту (після дії стресових факторів) і співставляли вміст проліну в групах проростків (виражений в мг/мл) з оводненістю рослин (процентний вміст води в коренях, %).

Оводненість коренів рослин гороху, що не зазнавали впливу стресу, була відносно високою і становила 90-92%, при цьому в ході експерименту загальний вміст води в коренях проростків гороху коливався від 82 до 94%, залежно від віку рослин і стресових факторів, що застосовувалися.

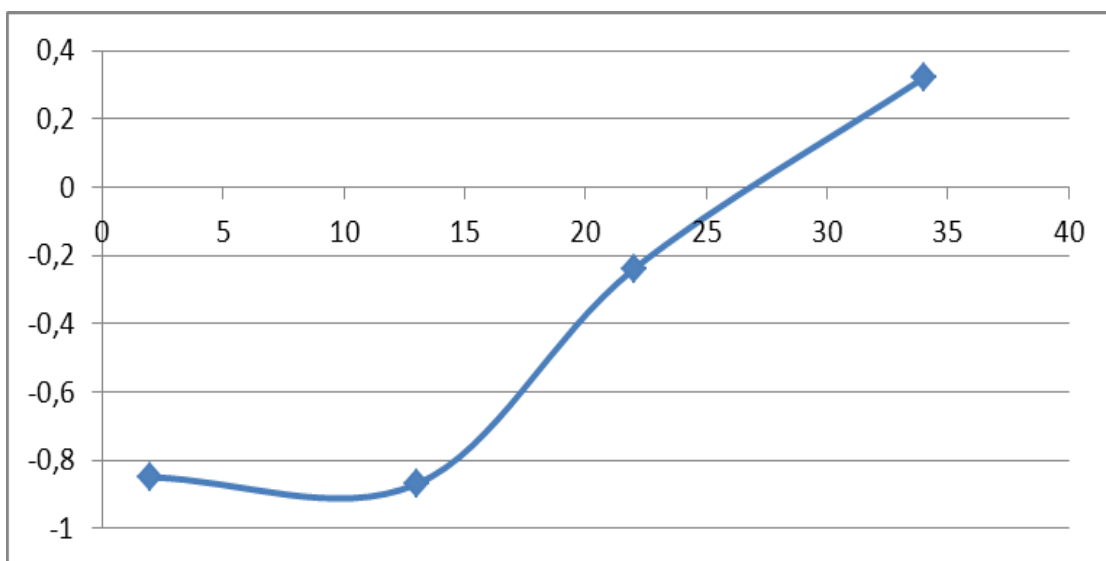


Рисунок 3.10 Зміни коефіцієнта кореляції між вмістом проліну (концентрацією вільної амінокислоти) і оводненістю коренів з віддаленням у часі від моменту впливу стресорами (по вертикалі – значення коефіцієнта кореляції, по горизонталі - дні)

Найбільша втрата вологи підземними органами рослин нами спостерігалася через 13 днів після впливу стресорами. Коефіцієнт кореляції на той момент складав $r = -0,87$, коли суха вага досягала 18% від сирої ваги, але відновлювалася і стабілізувалася на рівні приблизно 10% через 34 дні після початку експерименту. Це пов'язано з тим, що внесення токсичних концентрацій солі в середовище культивування провокувало осмотичний шок, що призводило до зниження приросту біомаси і довжини кореня рослин, а також вмісту води в тканинах рослин в порівнянні з контролем.

Аналогічний результат був продемонстрований авторами на пшениці у відповідь на додавання солей нікелю (Стеценко та ін., 2011). У процесі аналізу саме на перших етапах, в перші два тижні експерименту, звернув на себе увагу виразний негативний зв'язок між оводненістю тканин кореня і вмістом в них проліну, коли кореляція складала $r = -0,85$ (2 дні) та $r = -0,87$ (13 днів). Однак, вже через тиждень вона почала збільшуватися і складала $r = -0,24$ (22 дні від впливу стресорами).

Перерахунок вмісту проліну на суху масу рослин, який дозволяє усунути вплив відмінностей в оводненості тканин коренів в контрольному і дослідних варіантах, також показав, що в перші дні рослини накопичували до 20 разів більше проліну, ніж через 34 дні після впливу стресорів. Як припустили дослідники (Сакарійаво и др., 2001), такого роду залежність може свідчити про різні ступені економічності реалізації адаптаційних процесів у рослин. При порівнянні різних сортів рослин одного виду, вони також показали, що більш стійкі сорти показують відносно менше накопичення проліну у відповідь на одиницю зменшення вмісту води (на 1%). При цьому, вони помітили, що внесення екзогенного проліну призводило не тільки до зростання оводненості рослин пшениці, але і збільшувало вміст заліза та знижувало інтенсивність перекисного окислення ліпідів.

Нами було показано, що відновлення рівня оводненості рослин досягало в цей період максимальних значень, іноді навіть перевищуючи контрольні значення. У цей час - через 34 дні після початку експерименту - спостерігаємо вже слабку позитивну кореляцію ($r = 0.32$) між оводненістю коренів і вмістом проліну (рис. 3.10). Концентрація амінокислоти впала в порівнянні з гострою фазою реакції - першими днями після стресу, проте її рівень все ще перевищував контрольні значення і одночасно з цим відбулася стабілізація водного статусу коренів.

Зменшення швидкості росту рослин нерідко пов'язують зі зменшенням відносного вмісту води в тканинах організму, але при відновленні відносного вмісту води відбувалося зростання даного параметра (Веселов и др., 2003.).

В роботі авторів показана неоднозначність взаємозв'язку між концентрацією проліну і вмістом води, оскільки спостерігалось зниження відносного вмісту води і наростання водного дефіциту, незважаючи на акумуляцію проліну в процесі прогріву. (Французова и др., 2013)

Не виключено, що коливання вмісту води і проліну у проростків гороху може бути пов'язане з тим, що після дії стресових чинників на організм відбувається зміна гормонального статусу рослин. Це призводить до гальмування росту, при цьому і потреби організму у воді дещо зменшуються. Обмін речовин переводиться в режим спокою, енергетичні процеси переключаються на підтримку цілісності рослини і репарацію пошкоджень. Можна припустити, що з віддаленням у часі, після подолання наслідків стресу, обидва показники досягнуть значень, характерних для контрольних груп рослин.

Виходячи з результатів проведених досліджень, можна зробити наступні висновки. Виживання рослин в умовах дії шкідливого чинника передбачає проходження ними якісно різних етапів - стрес-реакції (неспецифічної реакції) і спеціалізованої адаптації, що розрізняються за своїми біологічними функціями, тривалості. Виходячи з отриманих даних,

рівень відхилення від адитивності в бік синергізму або антагонізму при поєднаній дії стресорів може вказувати на прояв явища кростоку, що ми могли спостерігати через 2 і 4 дні після опромінення проростків. Іонізуюче опромінення підвищило стійкість до подальшого сольового і температурного впливів на рослини, однак цей ефект виявився короткочасним.

Наслідки стресу для рослин, судячи з результатів вимірів на 13 і 34 дні після впливу факторів, з часом нівелювалися. Крім того, спостерігали відновлення ростової функції з часом при всіх застосованих дозах радіації, але в разі накладення гіпертермії або сольового стресу це відновлення відбувалося більш активно. Скоріше за все, є загальні компоненти відновних реакцій після впливу цих трьох стресів. У початковий період дії стресора на рослину відбувається одночасне підвищення стійкості і до інших стрес-факторів, яке в подальшому може змінюватися поверненням до вихідного рівня, що ми й спостерігали.

Здатність до одночасного зростання різних типів стійкості вказує на функціонування у рослин неспецифічних механізмів, які призводять до підвищення стійкості, чого достатньо для включення з часом процесу формування спеціалізованих механізмів стійкості.

Очевидно, що в основі спостережуваних змін ростових реакцій та накопичення стресових метаболітів, зокрема, проліну, у рослин при дії стресових факторів, лежать зміни активності генів і формування нових епігенетичних патернів. Одним з механізмів переключення епігенетичних програм є функціонування мобільних генетичних елементів. Нами були досліджені зміни активності ретротранспозонів під впливом таких стресових факторів як іонізуюче опромінення, підвищені температури, засолення, а також за комбінованої дії ІВ та гіпертермії або ІВ та засолення, що діяли на рослини гороху послідовно.

3.4 Аналіз активності LTR-ретротранспозонів під впливом абіотичних стресових факторів у рослин гороху

Стресові фактори викликають зміни стану геному рослин, що зумовлює вплив як на загальний стан рослинних організмів, так і на їх цвітіння, врожайність, швидкість старіння. Такі зміни на генетичному та епігенетичному рівнях можуть передаватися спадково та відображатися у наступних поколіннях. Це може бути пов'язано і з функціонуванням мобільних генетичних елементів (МГЕ) рослин, зокрема, LTR-ретротранспозонів. Вони відіграють велику роль у зміні структури генома та експресії генів (Соколова & Кравец, 2014). Існує вірогідність утворення адресних адаптивних мутацій, що генеруються інсерціями мобільних елементів у відповідь на специфічні та неспецифічні стресові впливи. Активність ретротранспозонів є одним з маркерів реакції рослин на стресові фактори, особливо іонізуючу радіацію, осмотичний стрес та підвищення температур.

Всі МГЕ за способом переміщення можуть бути згруповані в два основні класи: ретротранспозони (мають ретровірусне походження), що переміщуються за допомогою РНК-посередника за принципом «копіювання та вставка», і ДНК-транспозони, коли переміщується безпосередньо ДНК. До класу ретротранспозонів належать також LTR-елементи. Вони за своєю організацією вважаються складнішими за будь-які інші транспозони (Wessler et al., 1995; Jianxin et al., 2004). Під час інтеграції до геному "хазяїна" LTR-ретротранспозони частіше вбудовуються до метильованих гетерохроматинових ділянок, при цьому деякі з них можуть інтегрувати також і до активних ділянок геному та спричиняти інерційні мутації (Burt et al., 2005).

Серед LTR-ретротранспозонів цікавими та найбільш багаточисельними є ретротранспозони *Ty3/gypsy*, зокрема *OGRE* (33%), *PIGY* (1,5%) та *CYCLOP* (близько 1%). LTR-ретротранспозони відіграють

певну роль в створенні генетичної пластичності і адаптації у відповідь на екологічний стрес (Ungerer & Kawakami, 2013; Woodrow et al., 2010).

Ретротранспозони з довгими кінцевими повторами несуть регуляторні сайти, пізнавані деякими ядерними факторами. Крім того, LTR беруть участь в рекомбінаційних процесах, в тому числі в мітозі і в мейозі, утворюючи складні гібриди з різних ретротранспозонів (Hoga & Malik, 2013). В даний час є досить велика кількість досліджень, в яких продемонстровано феномен індукції транспозиції LTR-ретротранспозонів різними факторами для різних об'єктів. Активація ретроелементів в рослинному геномі відбувається під впливом різних стресів - зневоднення, низьких або високих температур, впливу фітопатогенів та ін.

У деяких дослідженнях показано, що ретротранспозиція є найбільш імовірною причиною соматональної мінливості, індукованої культивуванням *in vitro* (Campbell et al., 2011).

Наразі проведено дослідження поведінки LTR-ретротранспозонів залежно від часу впливу стресорів та їх комбінацій, вегетаційної фази онтогенезу та віддаленості за часом від моменту впливу. Паралельно з іншими методами спостереження за організмами такі дослідження дають можливість зрозуміти роль МГЕ у генетичній мінливості рослин та динаміки їх геномів; у формуванні відповіді особин у процесі адаптації до стресорів. Для молекулярного аналізу було виділено ДНК для кожної з груп рослин та проведено ПЦР (з детекцією у агарозному гелі) екстрагованої ДНК з використанням специфічних праймерів для LTR-ретротранспозонів.

Метод іPBS-ампліфікації заснований на фактично універсальній присутності тРНК-комплексу в якості сайту зв'язування праймерів зі зворотньою транскриптазою як у ретровірусів, так і в LTR-ретротранспозонів, що необхідно для ініціації зворотної транскрипції під час циклу реплікації. Висококонсервативні PBS послідовності характерні для різних сімейств LTR ретротранспозонів, і оскільки тРНК зв'язується з

PBS-областю для ініціації зворотної транскрипції, послідовність цього регіону комплементарна послідовності 3'-кінця тРНК (Kalendar et al., 2010).

Під час аналізу за IRAP-PCR маркерами ДНК рослин з 15 експериментальних груп через 3 різні проміжки часу було використано 3 пари праймерів, та за iPBS-PCR 7 праймерів, в результаті чого отримано загалом 81 амплікон різних розмірів, при цьому загальна кількість нових фрагментів склала 8 штук та була характерна для середньої частини спектра (складала приблизно 350-1650 п.н.).

Найбільша кількість ампліконів виявилася при використанні iPBS праймеру 2249, а найвища інформативність праймера була характерна для iPBS 2074 під час аналізу ДНК рослин, які культивувалися протягом 2 днів після впливу стресорів на рослинний організм (рис.3.11)

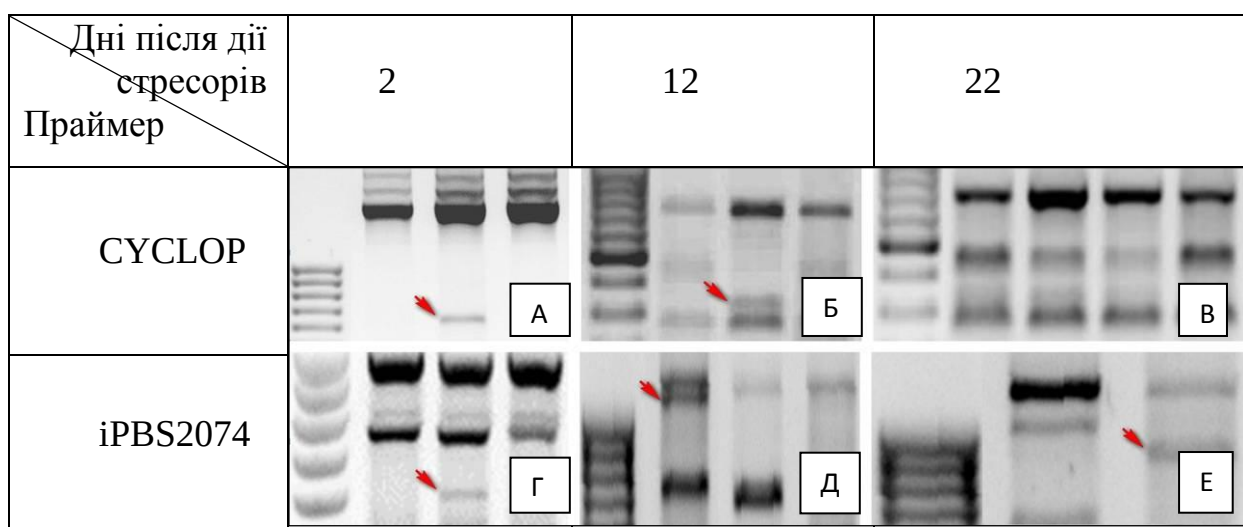


Рисунок 3.11 Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу тотальної ДНК рослин з використанням праймерів: iPBS 2074: А - 2 дні, Б – 12 днів, В - 22 дні. CYCLOP: Г - 2 дні, Д – 12 днів, Е - 22 дні. Стрілками вказано нові амплікони

У попередніх дослідженнях аналіз морфометричних показників проростків у відповідь на модифікуючу дію іонізуючого випромінювання при формуванні реакції рослин на дію інших стресових факторів показав,

що рівень відхилення від адитивності в бік синергізму або антагонізму найбільш яскраво спостерігається у рослин через дві та вісім діб після дії стресорів (Нестеренко & Рашидов, 2018) (Рис. 3.5).

З віддаленням за часом від моменту впливу стресового чинника ми спостерігали «вирівнювання» загальної картини морфометричних змін, тобто вся система, отримавши потужний поштовх у вигляді гострих впливів стресорів, почала поступове відновлення до характерних показників опромінених у відповідних дозах груп рослин. Однак, кількість переміщених (скопійованих) LTR ретротранспозонів очікувано не знизилася, адже інсерції цих МГЕ мають стабільний характер, хоча на реалізацію відповіді геному і потрібен час. Маркери iPBS (inter primer binding site) є специфічними до сайтів зв'язування тРНК, тобто після вставки попередня копія залишається. Мутації, що створюються інсерціями ретротранспозону, виявляються стабільними на відміну від мутацій, що викликаються ДНК-транспозонами, оскільки останні при переміщенні вирізують свою вихідну копію з генома і вже потім вбудовуються в інший сайт, в той час як копія ретротранспозону, вбудувавшись, вже нікуди не зникає (Llorens et al., 2011).

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

відсутність старого фрагменту може спостерігатися через метилювання ДНК - найбільш значущий та глобальний шлях контролю за поведінкою МГЕ (Yoder et al., 1997). Через 22 дні поява амплікону у розмірі 750 п.н. відбулася у групі 20 Гр+NaCl з одночасною відсутністю більшого амплікона розміром приблизно 800 п.н.

CYCLOP – це порівняно недавно відкритий ретротранспозон, досить поширений у деяких бобових та представлений 5000 копій у геномі гороху (Chavanne et al., 1998). Електрофореграма за участі праймера *CYCLOP* продемонструвала наступне. Амплікон близько 700 п.н. з'явився на електрофореграмі у ДНК рослин через дві доби після температурного стресу. Через 12 діб нові фрагменти розмірами близько 380 та 1200 п.н. було відмічено для групи рослин 5 Гр+NaCl. За 22 дні після дії пошкоджуючих чинників значних змін для ДНК з використанням *CYCLOP* виявлено не було. Показано, що у радіоіндукованій активації ретротранспозонів беруть участь транскрипційні фактори теплового шоку і (Faure et al., 1996; Васильєва, 1997).

МГЕ для власної активації використовують такі механізми контролю генної експресії, як транскрипційні фактори і метилювання ДНК, а також схильні до розривів сайти ДНК. Активація МГЕ може відбутися з декількох причин, зокрема, внаслідок віддаленого схрещування, коли значне збільшення розміру геному призводить до тимчасової активації транспозонів (Bennetzen, 2004), збільшення пошкоджень хромосом, як після дії ІВ, коли збільшення кількості репараційних подій у таких клітинах, можливо, призводить до пригнічення активності метилаз та інших факторів формування гетерохроматину. Активація рослинних ретротранспозонів нерідко відбувається внаслідок проникнення інфекції та пошкодження клітинної стінки (Bennetzen, 1993).

При використанні праймера *PIGY*, ДНК-профілі гороху за кількістю ампліконів через 2, 12, 22 доби після дії стресорів не змінювалися для жодної з груп та стабільно становили 4. Також стійкими до активації

мобільності стресорами виявилися праймери 2228, 2230, 2232, 2251, 2249, 2080, *OGRE* та *PIGY* (рис. 3.12 та таблиця 2.2).

Можливо, знаходячись у ділянках висококонсервативного гетерохроматину, вони виявилися менш доступними для ферментів. Крім того, існує висока ймовірність втрати ретротранспозоном своєї активності. Відомо, що вставка ретротранспозону поблизу гена може істотно впливати на його експресію. В разі вбудовування ретротранспозону всередині самого гена може безпосередньо змінитися його генна структура і функції, що може привести до утворення мутацій та до руйнування епігенетичного сайленсінгу.

Крім того, існує, принаймні, два шляхи регуляції активності мобільних елементів, один із яких залежить від транспозона, а інший забезпечується рослинним організмом. Перший полягає у схильності транспозонів до власної інактивації. Другий – у процесі епігенетичного пригнічення активності транспозона (Bennetzen, 2004; Feschotte & Pritham, 2007).

Цікавою особливістю LTR-ретротранспозонів є можливість інсерції у довгі кінцеві послідовності інших ретротранспозонів, завдяки чому утворюються великі кластери неактивних мобільних елементів, які можуть становити до 3/4 геномної ДНК (SanMiguel, 1996). Автори вважають (Шпильчин & Терновська, 2010), що більшість LTR-ретротранспозонів дефектні, бо містять внутрішні делеції та мають перебудови, які перешкоджають активності даних елементів. Проте відсутність активності транспозонів може спостерігатися і у тих випадках, коли вони входять до складу рослинного геному в структурно інтактному стані. Це пов'язано з 5-метилуванням цитозину, який міститься в транспозонних послідовностях у ділянці 5'-CG-3' та 5'-CNG-3', що, як відомо давно, який пригнічує активність генів, призводить до інактивації і МГЕ також (Chandler & Walbot, 1986; Kashkush & Khasdan, 2007).

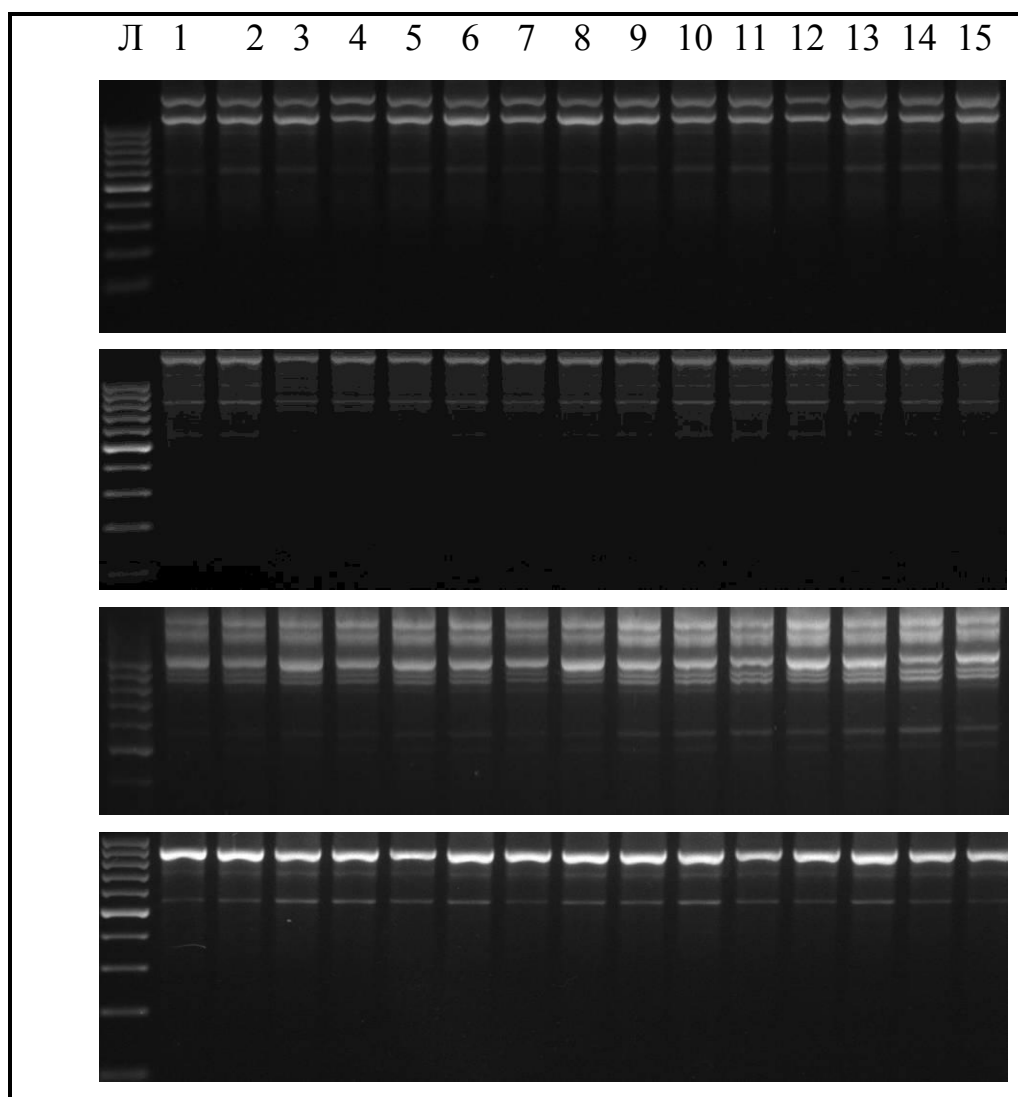


Рисунок 3.12 Приклади електрофореграм продуктів ПЛР-аналізу тотальної ДНК рослин через 2 дні після впливу стресовими чинниками з використанням праймерів (зверху вниз): 2232, 2228, *ORGE*, *PIGY*. Зліва направо: «лінійка» (Л), експериментальні групи: 1-контроль, 2-NaCl, 3-t (гіпертермія), 4- 5 Гр, 5- 10 Гр, 6 – 15 Гр, 7 – 20 Гр, 8 – 5 Гр + NaCl, 9 – 5 Гр + t, 10 – 10 Гр + NaCl, 11 – 10 Гр + t, 12 – 15 Гр + NaCl, 13 – 15 Гр + t, 14 – 20 Гр + NaCl, 15 – 20 Гр + t.

Регуляторні послідовності є досить варіабельними, що може вказувати і на те, що ретротранспозони також здатні до розвитку шляхом модифікації власних регуляторних елементів (Grandbastien, 1998). Дослідниками (Woodrow et al., 2011). було виділено ретротранспозон типу *Ty1-Copia*, названий *Ttd1a*, що активізується у відповідь на засолення у рослин. Вони

показали, що він розташований поруч з геном, що відповідає за стійкість. Мобілізація цього елемента може відігравати важливу роль в реакції на екологічні стреси. Отримані дані демонструють роль стресорів у появі нових ампліконів, зокрема, перенесення ретротранспозонів, у відповідь на вплив радіації, засолення, підвищеної температури. Ці дані підтверджують, що рівень пристосування до змін навколишнього середовища може визначатися не лише за рахунок епігенетичної регуляції геному в цілому, але і за рахунок мобільності LTR ретротранспозонів та вже їх безпосереднього впливу на геном рослини-господаря.

Зміни у послідовностях ДНК, які відбуваються в результаті транспозиції LTR-ретротранспозонів шляхом копіювання на вбудовування назад в геном, можуть мати як негативний вплив, так і відігравати позитивну роль в індукції адаптивних процесів та формуванні захисної відповіді рослинного організму через потенційне втручання у функції генів і геномів в цілому в процесі онтогенезу. Це властиво не для усіх досліджуваних ретротранспозонів та не в однаковій мірі. У зв'язку із зростанням генетичної нестабільності, в свою чергу, можуть проявлятися такі радіобіологічні реакції, як гормезис, адаптивна відповідь або радіаційно-індуковане старіння, які, знову ж, пов'язані з активацією мобільності генетичних елементів.

Таким чином, результати дослідження свідчать про підвищення мобільності МГЕ гороху у відповідь на абіотичні стресові чинники, зокрема опромінення та осмотичний стрес. Активація ретротранспозонів у відповідь на стресовий вплив визначається здатністю їх промоторів реагувати на фактори сигнальних шляхів, які регулюють адаптацію рослин до абіотичних стресів. Це може відігравати важливу роль та мати відображення як на рівні морфологічних змін, так і на рівні протеому. Тому для кращого розуміння впливів ІВ та абіотичних стресорів на рослини, важливо провести протеомічні дослідження.

3.5 Протеомічне дослідження проростків *P.sativum* L. після гострого впливу іонізуючого опромінення в поєднанні з наступним впливом сольового стресу

Результатом функціонування сигнальних систем є репрограмування експресії генів і синтезу білків, що призводить до змін протеому. І навпаки, зміни у білках під дією стресорів здатні впливати на перенаправлення процесів у сигнальних шляхах.

Застосування сучасної пошукової протеоміки, що проводить одночасний моніторинг змін великої кількості білків, які беруть участь у процесах функціонування клітин, їх здатності да активної відповіді на стресори та адаптації, відповідно, усього рослинного організму, робить можливим виявити ті з них, вміст яких зазнав змін внаслідок впливу різних факторів. У літературі описано використання протеоміки для вивчення сигнальних шляхів, фізіології рослин, а також радіаційного стресу (Azimzadeh et al., 2014).

Ми застосували даний підхід для дослідження комбінованого впливу іонізуючого опромінення та засолення на рослини гороху. При визначенні кількісних та якісних змін у протеомі гороху за умов гострого впливу іонізуючої радіації, засолення та їх комбінації було використано методику класичного двовимірного гель-електрофорезу (2-ДЕ), що включала кілька етапів, описаних у методичній частині.

Для кожної з чотирьох експериментальних груп для аналізу було відібрано по 3 зображення пофарбованих відсканованих 2-В електрофореграм. З використанням можливостей програми PDQuest було штучно створено так званий "майстер-галь" (рис. 3.13, зліва), тобто зображення, на якому знаходилися аналогічні плями для кожного з 12 гелів (рис.3.13, справа), враховуючи форму плям, показники Mr та pI білків. Подальший аналіз проводився тільки для тих з них, що були присутні принаймні на 2 гелях з 3 технічних повторностей.

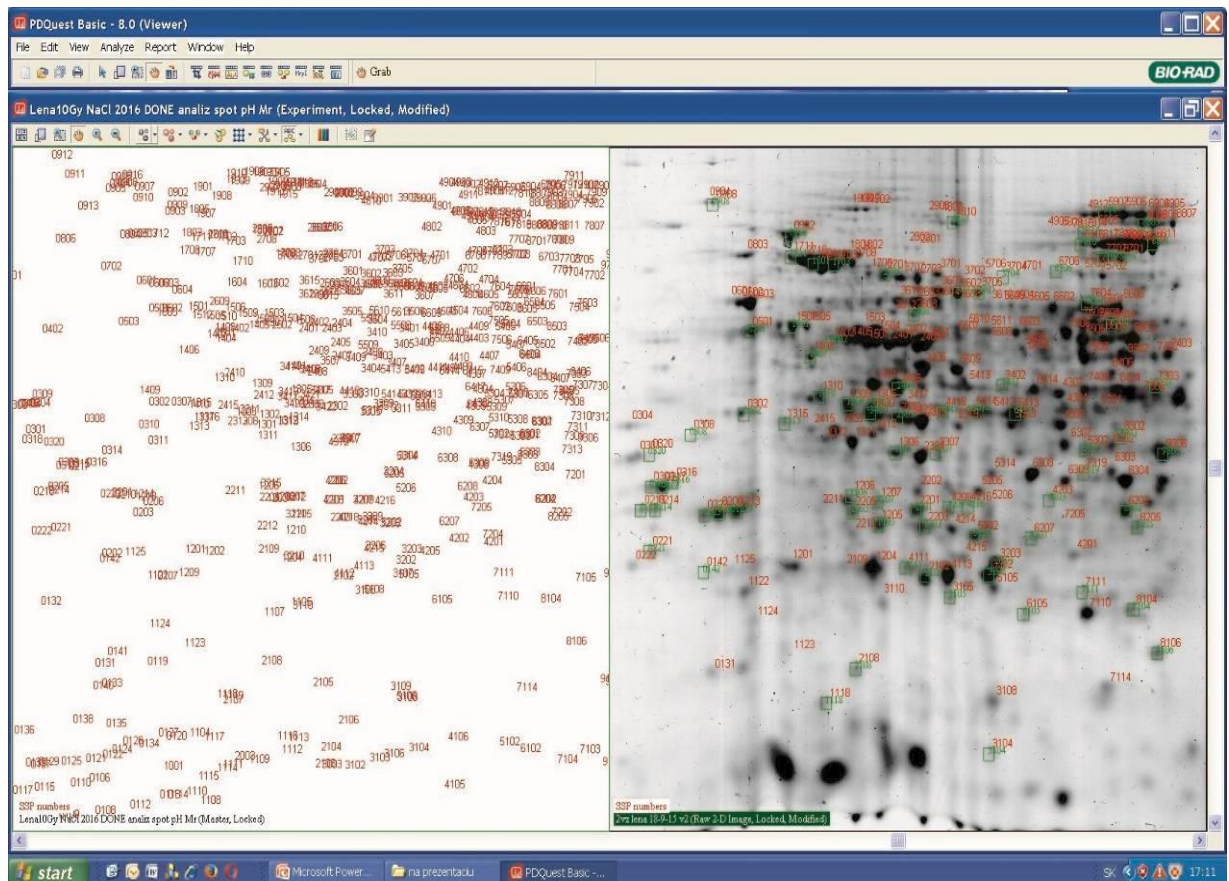


Рисунок 3.13 Візуалізація усіх точок, знайдених на відсканованих 2-В електрофореграмах та синтезований програмою PDQuest "майстер-гель" для подальшого порівняння його з кожним з відсканованих гелів.

У результаті проведеного аналізу 2-ДЕ електрофореграм було виокремлено 223 білкові плями та проведено статистичний аналіз. Він показав, що з 223 плям 54 статистично достовірно відрізнялися від контролю хоча б для однієї з експериментальних груп (Рис. 3.14). Білки, концентрація яких відрізнялася між групами, були охарактеризовані за допомогою баз онлайн-сервісів типу BLASTP (NCBI) та Uniprot, з них, використовуючи MALDI або Esi, було ідентифіковано 39 білків. 15 білкових плям не вдалося ідентифікувати, зокрема, й з причини наявності дуже малої концентрації білку на більшості гелів та неможливості повторної спроби ідентифікації вже вирізаних та виділених з гелю білків у разі виникнення проблем на етапі виділення.

Характеристики усіх 54 плям (додаток 2) містить у собі наступні відомості. Колонка Score характеризує інтегральний показник надійності ідентифікації білка. Це функція ряду, що дозволяє оцінити точність ідентифікації. У нашому випадку частина білків, що була ідентифікована з MALDI, мала Score із Mascot, а білки з ESI, відповідно, Score з ProteinLynx, що різняться між собою алгоритмами обчислення інтегралів відповідних параметрів.

Так, Score протеїну у випадку Mascot є сумою score пептидів, що є логарифмічною функцією достовірності, а для ProteinLynx це теж сума score пептидів, але помножена на коефіцієнт інтенсивності сигналу. Загалом, кожен пептид, якому відповідає колонка ID білка таблиці 9 додатку 2, ідентифікований з більш ніж 95% ймовірністю (загальноприйнятий критерій - принаймні 2 пептиди на 1 білок). Колонка Accession (Ідентифікаційний номер) містить у собі шифр відповідного білка, що полегшує пошук відомостей про нього у базах даних (зокрема, його пошук у базах даних <https://www.uniprot.org/>). Стовпчики Mr/pI містять експериментально встановлені та теоретично знайдені за базами даних показники молекулярної маси та ізоелектричної точки для кожного білку. Peptides - це кількість достовірно ідентифікованих пептидів у послідовності для кожного конкретного білку, а Coverage - це відсоток самої послідовності, який покривають ці пептиди.

Використовуючи вказані у розділі матеріалів та методів програми SPSS Statistics та стандартний пакет Microsoft Excel, в першу чергу нами було перевірено узгодженість даних в трьох повторностях 2-D за відносним вмістом білків в зразках шляхом розрахунку коефіцієнта конкордантності Кендалла. У всіх варіантах досліду, так само як і в контролі, коефіцієнт конкордантності дуже малий і не перевищує 0,1. Виходячи з цього, замість середнього арифметичного, що може призвести до зміщення оцінки відносної концентрації білків, ми використали медіану. Медіанна оцінка концентрації зумовлює необхідність

використання непараметричних критеріїв і статистик для порівняння відмінностей між варіантами досліду і контролем. За допомогою непараметричних тестів Краскела-Уолліса і U-критерію Манна-Уїтні були проведені множинні порівняння концентрацій білків у всіх варіантах досліду і парні порівняння відмінностей по концентрації кожного з варіантів від контролю. Таким чином, було відібрано 73 плями з 223-х, що містяться в гелях, для яких існують значущі відмінності між дослідним варіантами і контролем.

Для відібраних 73-х білків був проведений однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. Виділення головних ефектів на основі частки дисперсії концентрації, залежною від кожного з трьох видів впливу, проводили за допомогою суми квадратів другого типу. В результаті вдалося розділити білки на 4 групи: 1) білки, концентрація яких сильніше змінюється під впливом радіації; 2) білки, концентрація яких сильніше змінюється під впливом сольового стресу; 3) білки, концентрація яких сильніше змінюється за умови комбінованої дії радіації і сольового стресу; 4) білки, концентрація яких змінюється як в результаті дії радіації і (або) засолення, так і в умовах комбінації дії цих факторів.

Як результат вдалося згрупувати 54 білків в 4 зазначених вище групи, що містили: 1) 14 білки; 2) 11 білків; 3) 26 білки; та 4) 4 білки, що відображено у таблицях 3.2-3.5 та на рисунку 3.14. Характер змін вмісту білків може бути описаний як індукція/супресія (поява/зникнення білкового продукту під впливом фактора) або апрегуляція/дерегуляція (збільшення/зниження його концентрації). Індукція білків більш характерна для впливу опромінення в порівнянні з сольовим стресом і комбінованим впливом радіації і сольового стресу.

На заключному етапі аналізу був проведений факторний аналіз варіації концентрації білків виділених нами 4-х груп методом головних компонент. За допомогою виділення головних компонент ми виявили узгоджену варіацію концентрацій білків, яка може свідчити про

функціональний взаємозв'язок між ними або про те, що вони беруть участь в одних біохімічних шляхах відповіді на той чи інший стресовий вплив. Для всіх груп білків отримані статистично достовірні двохфакторні рішення, виходячи з яких нами визначено підгрупи (кластери) протеїнів, концентрація яких змінюється синхронно (таблиця 3.6).

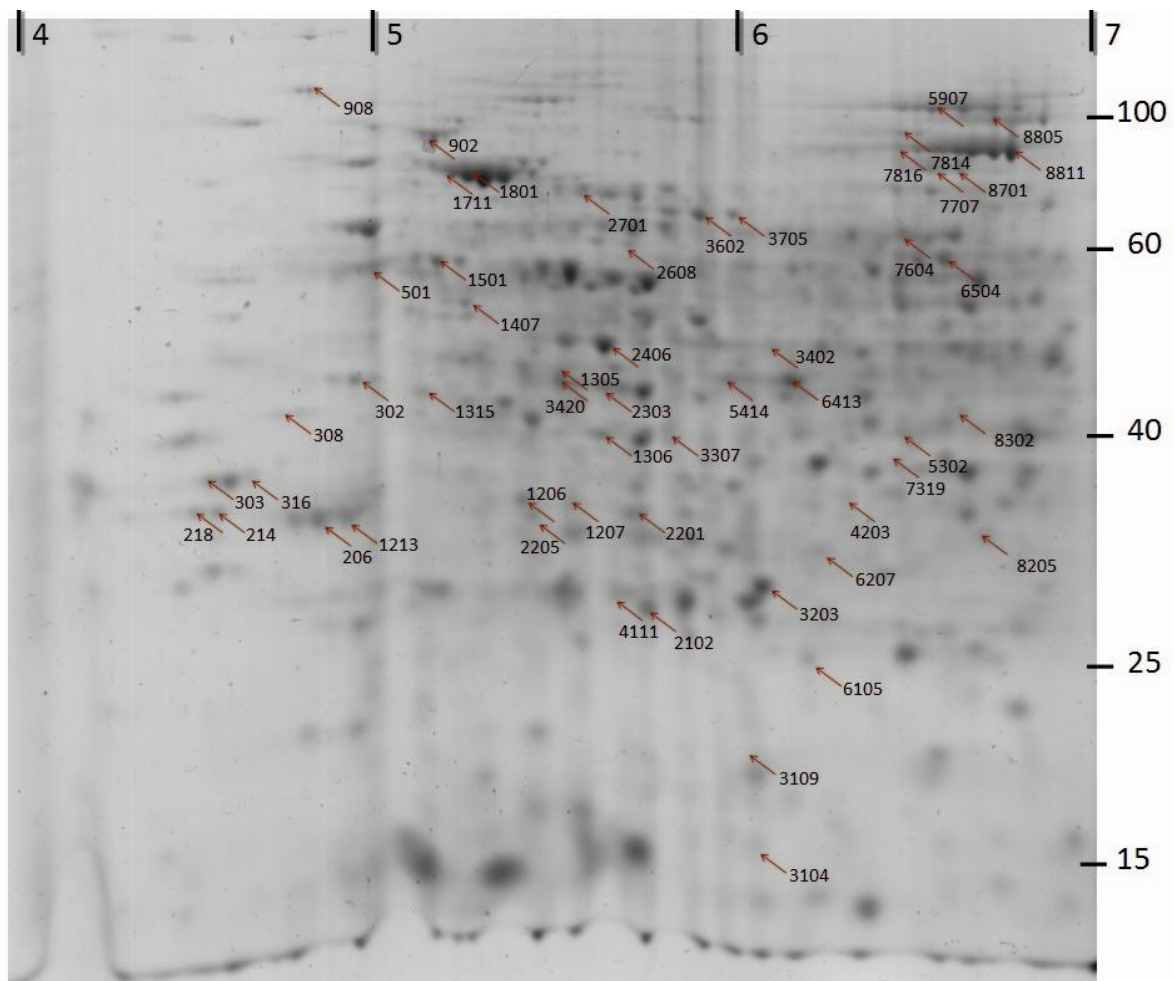


Рисунок 3.14 Візуалізація продуктів 2-вимірного електрофорезу білків у ПААГ, де стрілками вказано на плями, концентрація білків яких була статистично достовірно відмінна для хоча б однієї з експериментальних груп (по вертикалі - Mr, по горизонталі - pI).

Аналіз білкових плям за показниками молекулярних мас та ізоелектричних точок показав наступне. Серед усіх білків, що були

присутні принаймні на двох гелях із трьох, найбільшу кількість склали білки з молекулярною масою від 30 до 60 кДа (51 %), менше третини - білки масою 60–120 кДа (31 %). Найменше виявилося білків із молекулярною масою менше 30 кДа (13 %) та понад 120 кДа (5 %) (рис. 3.15а). При цьому розподіл за pI (ізоелектрична точка) був таким: майже однакова кількість білків з pI у діапазоні 5–6 та 6–7 (43 % і 41 % відповідно) та 16 % білків з 4–5 pI (рис. 3.15б).

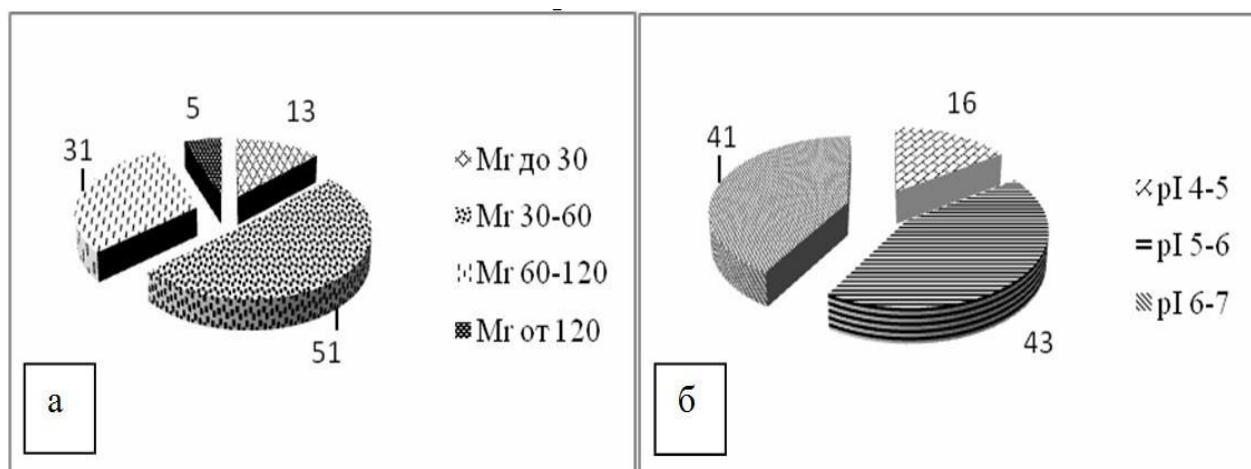


Рисунок 3.15 Розподіл проаналізованих білків за молекулярними масами Mr (а) та іонними силами pI (б) на 2-В електрофореграмах.

Варто відмітити той факт, що деякі з ідентифікованих білків мали не характерні значення pI та молекулярну масу, що відрізняється від зазначених у літературі та базах даних. Це пов'язано з тим, що під дією стресових факторів та індукованих ними каскадами реакцій, білки можуть дещо змінювати свою конформацію; можливе фосфорилювання білків, що може здійснюватися по різним амінокислотним залишкам.

Зокрема, в даний час увагу дослідників привертає фосфорилювання білків по тирозину, що має значення в регуляції ряду метаболічних процесів (Hunter, 2009) і відповідей рослин на різні стресори, в тому числі, на засолення.

Усі білки після проведення статистичної обробки було розділено за рівнем експресії на групи (рис. 3.16) відповідно до фактора, який мав найбільший вплив на концентрацію білків в гелі, тобто інтенсивності синтезу та деградації білків відповідно до дії певного чинника.

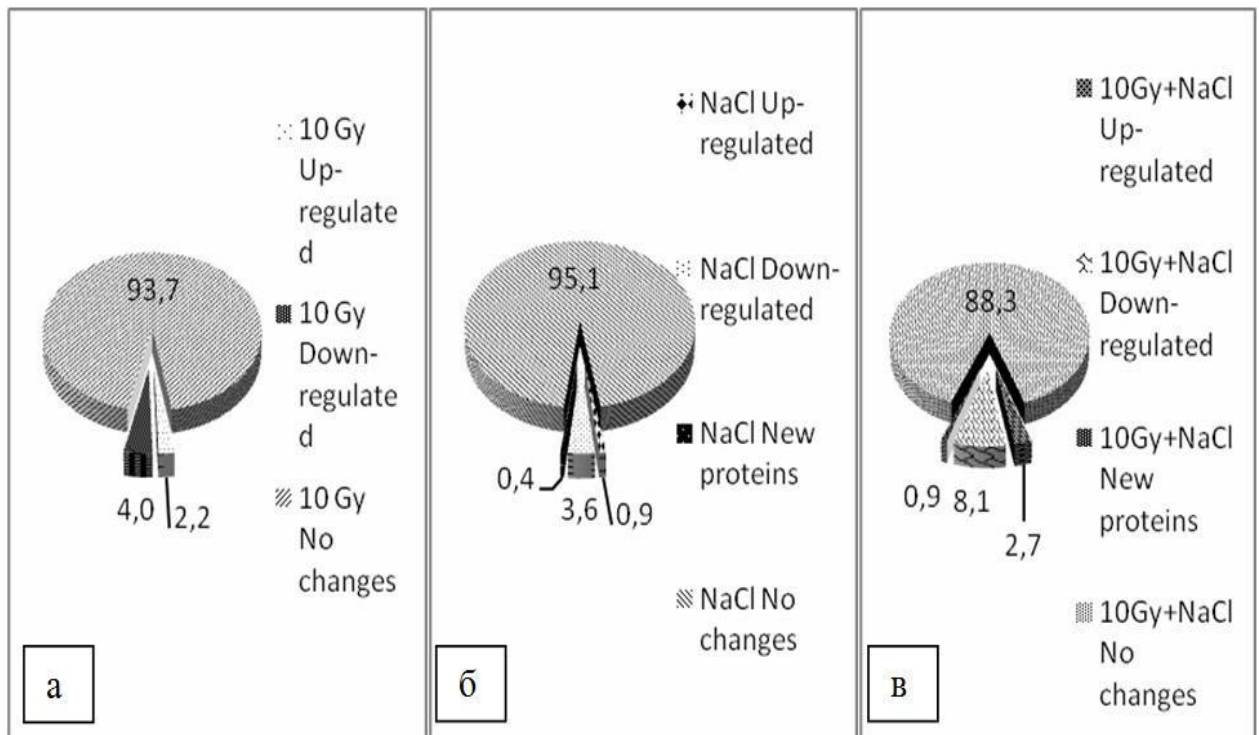


Рисунок 3.16 Зміна концентрації білків у відповідь на дію стресових факторів: а - опромінення, б – засолення та їх комбінації (в).

Зміна концентрації найбільшої кількості білків спостерігалась у відповідь на поєднаний вплив іонізуючої радіації та засолення (11 % загальної кількості виокремлених білків). Частка білків, концентрація яких суттєво змінилася після сольового стресу та опромінення, становила 4,6 % та 5,9 % відповідно (рис. 3.16 а, б). При цьому частка білків, вміст яких зріс у відповідь на стресори, була найбільшою у варіанті 10Гр+NaCl – 2,5 % (рис. 3.16 в), дещо менше їх було у варіанті опромінених проростків (2,1 %), а у рослин після осмотичного шоку вона становила всього 0,8 %.

Ми виділили групу білків, що можуть відігравати ключову роль у взаємодії сигнальних шляхів, а відповідно у процесах захисту та адаптації рослинних організмів. Вісім плям, що відповідають ідентифікованим нами білкам, представлено у табл. 3.1

Деякі з цих білків були ідентифіковані у різних видів рослин, зазвичай близьких до гороху (боби, нут, люцерна, соя), але з високою ймовірністю характерні для проростків гороху.

Таблиця 3.1

Характеристики деяких ідентифікованих білків

Стресові фактори	№ п/п	Ідентифікаційний номер білку «UniProt»	Mr	pI	Білок	Вид рослин, у яких ідентифіковано білок	Концентрація білку (NaCl, % до контролю)	Концентрація білку (10 Gy, % до контролю)	Концентрація білку (10Gy+NaCl, % до контролю)
10 Gy	1	P42654	35	4,8	14-3-3-like protein B	Боб	89	312	0
	2	A0A1S2 YLD1	122	6,5	Transketolase, chloroplastic	Нут	94	69	130
	3	A0A072 TRS0	42	6,5	Malate dehydrogenase	Люцерна	17	27	107
NaCl	4	B7FJQ4	44	6,7	Malate dehydrogenase	Люцерна	7	169	51
10Gy+NaCl	5	A0A072 VT43	47	6,0	Translation elongation factor EF-2 subunit	Люцерна	268	194	480
	6	Q9T0N0	34	4,9	14-3-3-like protein	Горох	42	222	0
	7	A0A0B2 RH95	117	5,0	Heat shock cognate protein 80 kDa	Соя	128	151	0
	8	A0A072 TV12	89	5,2	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	Люцерна	113	129	0

Два з ідентифікованих білків (№ 7 та 8 у таблиці 3.1) належать до білків теплового шоку рослин. Їх молекулярна маса дещо вища за очікувану, що може вказувати на модифікацію білків, приєднання до них невеликих білків, функціональних груп, зміну структури.

Білки родини БТШ 70 запобігають нагромадженню денатурованих поліпептидів, що утворюються внаслідок різних типів стресу, вступають в короткочасні взаємодії з новосинтезованими цитоплазматичними білками, сприяють укладанню останніх у нативну конформацію (Козеко, 2017).

Білки теплового шоку присутні в усіх компартментах клітин, крім того, реагують підвищенням концентрації на різні стресові фактори (Косаківська & Голов'янка, 2006). Цитозольні БТШ 70 беруть участь у транспорті білків через мембрани органел, запобігають деградації білків. Це неспецифічні стресові білки, синтез яких є складовою загального адаптаційного синдрому (Веселов и др., 2002). Вважається, що механізм захисної дії БТШ 70 зумовлений деагрегацією аномальних білок-білкових взаємодій. Виходячи з отриманих даних, на їх концентрацію більший вплив має іонізуюче опромінення в порівнянні із засоленням. При цьому за умов поєднаної дії стресорів синтез обох ідентифікованих білків пригнічувався, що може вказувати на «перемикання» сигнальних шляхів під час реакції рослинного організму на комбінований стрес через дві доби після впливу.

Також супресії за впливу комбінації стресорів зазнали білки родини 14-3-3 (№ 6 та № 1 у таблиці 3.1). Представники родини 14-3-3 присутні у клітинах всіх еукаріот і виступають у ролі регуляторів апоптозу, клітинного циклу, поділу, транскрипції, реплікації, функціонування іонних каналів, організації цитоскелету (Obsilová et al., 2008). Перенесення залишку фосфорної кислоти супроводжується зміною заряду, що часто призводить до істотних конформаційних перебудов, які впливають на структуру, властивості та функціональну активність білків. 14-3-3-подібний білок відноситься до білків, які впізнають та специфічно

взаємодіють із певними ділянками фосфорильованих ферментів, причому таких мішеней у них понад 300. Ріст концентрації білків групи 14-3-3 у відповідь на абіотичні стреси досліджувався раніше. Було показано, що експресія генів білків 14-3-3 у коренях проростків ячменю за сольового стресу змінюється ізоформ-специфічно: найбільш контрастні зміни відбуваються в експресії гена ізоформи 14-3-3В в стійкому сорті Московський-121 (експресія зменшується в 2 рази), а в нестійкому Ельф – збільшується в 2 рази (Шанько и др., 2003). У нашому випадку ми спостерігаємо зменшення концентрації цього білка у відповідь на сольовий та комбінований стрес (для ізоформи 14-3-3В на 11 % та 100 % у порівнянні з контролем, для ізоформи 14-3-3 на 58 % і 100 % відповідно). При цьому у відповідь на дію радіації концентрація ізоформи 14-3-3В зростала у 3,1 раза, а ізоформи 14-3-3 у 2,2 раза.

Білки № 3 та № 4 у таблиці 3.1, які були ідентифіковані як малатдегідрогеназа (МДГ), дещо відрізнялися за pI (6,5 та 6,7 відповідно) і молекулярною масою (41,98 кДа та 43,52 кДа). МДГ є одним із найважливіших ферментів рослинного метаболізму та представлена чотирма дегідрогеназами, дві з яких мають оксидоредуктазну активність, а дві інші – декарбоксилюючу (Faleiro, 2003). Ідентифіковані ізоформи або посттрансляційні модифікації МДГ по різному реагували на дію стресових чинників. Так, концентрація МДГ № 3 у варіанті рослин, що піддавали впливу засолення або опромінення, в порівнянні з контролем значно знижувалася (до 17 % та 27 % контролю відповідно). Але за комбінованої дії стресорів концентрація МДГ № 3 становила 107 % від показника контрольних рослин, тобто майже не змінилася. Концентрація МДГ № 4 навпаки, за комбінованої дії факторів знизилася вдвічі (до 51 % від контролю). Але дія іонізуючої радіації призвела до зростання концентрації цього ферменту у 1,7 раза. При цьому реакція проростків на осмотичний стрес проявилася у зниженні вмісту МДГ № 4 до 7 % контрольної величини.

В експериментах по дії сольового стресу на рівень експресії гена однієї з МДГ показано її ріст разом із ростом активності самого ферменту у рослин амаранта (Хаба и др., 2013). МДГ відносять до ферментів окисних реакцій САМ-шляху. Цикл трикарбонових кислот – ключовий етап клітинного дихання, однією з ланок якого є перетворення малата за допомогою малатдегідрогеназного комплексу. Малатдегідрогеназа виконує важливу функцію в підтримці співвідношення NADH/NAD , зберігаючи NADH на низькому рівні (Igamberdiev & Eprintsev, 2016).

Білок № 2 з молекулярною масою 122,37 кДа ідентифікований як транскетолаза. Його вміст в умовах комбінованої дії опромінення та засолення зріс до 130 % порівняно з контролем. Транскетолаза є важливим ферментом циклу реакцій відновлення CO_2 до рівня вуглеводів (цикл Кальвіна). Збільшення кількості цього білка може вказувати на активацію темної фази фотосинтезу та підвищення синтезу вуглеводів. Водночас за умови окремого впливу досліджуваних пошкоджуючих чинників концентрація цього білка була меншою за контрольні значення, зокрема, для опромінених рослин вона складала 69 % від контролю.

Згідно даних літератури, у проростків кукурудзи в умовах водного дефіциту реакція стійкої та нестійкої ліній протягом першої доби за вмістом транскетолази відрізнялася: у стійкій лінії спостерігали підвищення активності транскетолази порівняно з контролем на 80–90 %, в той час як у нестійкій активність транскетолази падала вже з перших годин досліду, але згодом спостерігали значне зниження в обох лініях (Тихонова и др., 2007).

Єдиний ідентифікований білок, концентрація якого значно зростала як у відповідь на кожний із стресорів окремо, так і за їх комбінованої дії – це фактор елонгації трансляції EF-2 (далі ФЕТ), що є гомологом прокаріотичного фактора EF-G (№ 5 у таблиці 3.1). Його концентрація у клітинах рослин після осмотичного стресу перевищувала контрольне значення у 2,7 рази, а після опромінення – у 1,9 рази. При цьому

комбінований вплив стресових факторів викликав збільшення концентрації ФЕТ у 4,8 раза. ФЕТ відіграє значну роль у процесах росту, розвитку та регуляції життєдіяльності рослин, тобто у здійснюваному рибосомами синтезі білків. У зв'язку з цим ріст його кількості у проростках дослідних варіантів може вказувати як на активацію клітинної відповіді в процесі адаптації до несприятливих чинників, так і на відновлення розвитку рослинного організму через дві доби після стресового впливу.

Серед 54 білків зі зміненою концентрацією за особливістю впливу стресорів було ідентифіковано з достовірністю 99% наступні 39 білків. Для білків, кількість яких змінилася суттєво у відповідь саме на опромінення, було визначено такі (табл. 3.2-3.5).

Таблиця 3.2

Ідентифіковані білки, показники яких змінилися для групи опромінених ІВ рослин (підвищення концентрації - стрілка вгору - для 3 білків; зниження концентрації - стрілка вниз - для 7 білків).

ID точки	Зростання / зменшення кількості	Назва білка, скорочення або ген
p207	↑20,1	Short-chain alcohol dehydrogenase SAD-C
p36	↑3,1	14-3-3-like protein B
p166	↑2,5	Acyl-CoA N-acyltransferase (NAT) family protein
p163	↓1,5	transketolase, chloroplastic
p222	↓1,9	Vitamin B-12-independent methionine synthase
p199	↓2,1	Uncharacterized protein
p82	↓2,2	Actin-related protein 4A
p200	↓2,7	Sucrose synthase
p144	↓3,8	Malate dehydrogenase
p34	↓4,0	DREPP plasma membrane protein / DREPP, as salt stress root protein RS1

Як видно (табл. 3.2), у відповідь на ІВ двадцятикратне зростання кількості було характерним для білку групи алкогольдегідрогеназ (Short-chain alcohol dehydrogenase SAD-C), ферменту анаеробного метаболізму. Його зростання було показано для рослин і в умовах затоплення (Козеко Л. Є. 2017), що свідчить про активацію анаеробного метаболізму.

Ріст концентрації білку був притаманний також для 14-3-3-like protein В та Acyl-CoA N-acyltransferase (NAT) family protein білків. В той же час, кількість транскетолази (transketolase, chloroplastic, група ферментів пентозофосфатного шляху та циклу Кальвіна), метіонін синтази (Vitamin B-12-independent methionine synthase, метіонін-синтаза (MTR) - один з ключових ферментів, які беруть участь у метаболізмі гомоцистеїну, що метаболізує реметилування гомоцистеїну в метіонін, з якого, власне, починається синтез етилену - гормону, характерного для рослин на стадії старіння (дозрівання) та стресу), цукрозо синтази (Sucrose synthase, ферментіутворення крохмалю), малатдегідрогенази (Malate dehydrogenase, про яку йшлося вище) та білків Actin-related protein 4A та DREPP plasma membrane protein (що є однаи зі стресових білків коренів рослин під час сольового стресу) суттєво знизилася - від 1,5 до 4 разів. Дане сімейство - DREPP - містить кілька білків плазматичної мембрани рослин що є регуляторними поліпептидами мембрани (Logan et al., 1997), включаючи кореневий білок RS1. DREPPs, вважаються сигнальними білками (Vosolsobě et al., 2017). Варто зупинитися на білках родини 14-3-3, що налічує близько 15 ізоформ.

Однією з широко поширених пост трансляційних модифікацій білків, що впливають на їх структуру та властивості, є фосфорилування амінокислотних залишків. Вони присутні практично скрізь і виступають в ролі регуляторів апоптозу, клітинного циклу, поділу, транскрипції, реплікації, функціонування іонних каналів і переносників, а також організації цитоскелету і, що найважливіше, відповідати за трансдукцію сигналу (Случанко & Гусев, 2010).

14-3-3 фізично взаємодіють з багатьма білковими клієнтами, які беруть участь у біосинтезі або сигнальних шляхах основних рослинних гормонів, відіграють ключову роль у регулюванні. Припускають, що білки 14-3-3 діють як вузли, що охоплюють різні сигнальні шляхи, трансдукцію та інтеграцію різноманітних гормональних сигналів у регуляції фізіологічних процесів (Camoni et al., 2018).

Таблиця 3.3

Ідентифіковані білки, показники яких змінилися для групи рослин після засолення (підвищення концентрації трьох білків - стрілка вгору та induction; зниження концентрації - стрілка вниз - для 6 білків).

ID точки	Зростання / зменшення кількості	Назва білка, скорочення або ген
p39	induction	Isoflavone reductase
p106	↑2,2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
p74	↑1,3	Pathogenesis-related protein 10a
p110	↓1,3	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
p101	↓1,3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
p95	↓2,0	Peroxiredoxin
p104	↓2,0	Aldo/keto reductase
p103	↓4,1	Monodehydroascorbate reductase
p208	↓14,9	Malate dehydrogenase

Після впливу засоленням (табл. 3.3) ми спостерігали індукцію виникнення білка, не характерного для ІВ чи контрольної групи - ізофлавіон редуктази (Isoflavone reductase, що каталізує реакції синтезу

антипатогенних фітоалексинів і лігніну). Крім неї, зрослі кількість білків 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase та Pathogenesis-related protein 10a у відповідно 2,2 та 1,3 рази.

Біфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат мутаза, але така, що мала інші показники молекулярної маси та pI, разом з тим зменшилася у 1,3 рази. Кратно 1,3-4,1 впали показники кількості і для дегідрогеназ (pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta мітохондріальної та malate dehydrogenase (ензим, що працює у цитозолі та бере участь у циклі трикарбонових кислот), редуктаз (aldo/keto reductase, monodehydroascorbate reductase) та пероксіредоксину (peroxiredoxin).

При комбінованому впливі білків найбільша кількість білків суттєво змінила свою кількість (табл. 3.4). Індукції зазнали Л-аскорбат пероксидаза (L-ascorbate peroxidase, cytosolic, фотосинтез, дихання та андиоксидантна система) та бета-Д-глюкозид глюкогідролаза (beta-D-glucoside glucosidase / Glycoside hydrolase, family 3).

Зросли також білок схожий на ізофлавіон редуктазу (isoflavone reductase-like protein) у 5,1 рази, субодиниця фактора елонгації трансляції у 4,7 рази (translation elongation factor EF-2 subunit), білок домену CCCH цинкових пальців (zinc finger CCCH domain protein / Znf_CCCH_sf) у три з половиною рази та фосфогліцерат кіназа (phosphoglycerate kinase) у два.

В той же час ми спостерігали зникнення деяких білків, зокрема білок пізнього ембріогенезу (late embryogenesis abundant (LEA) protein / response to desiccation), фактор елонгації 1-бета (elongation factor 1-beta), близьких або схожих до білків теплового шоку 70 та 80 кДа (heat shock cognate protein 80 та heat shock cognate 70 kDa-like protein), процесинг пептидаза (Processing peptidase) та схожий на пателін білок (patellin-like protein). Білки родини БТШ70, як відомо, приєднується до інших білків, викликаючи їх розгортання і перешкоджаючи їх агрегації. Це необхідно для їх проникнення через мембрану хлоропластів, мітохондрій, ЕПР.

Таблиця 3.4

Ідентифіковані білки, показники яких змінилися для групи рослин після комбінованої дії опромінення та засолення (підвищення концентрації білків - стрілка вгору та induction - для 7 білків; зниження концентрації - стрілка вниз та suppression - для 11 білків).

ID точки	Зростання / зменшення кількості	Назва білка, скорочення або ген
p98	induction	L-ascorbate peroxidase, cytosolic
p164	induction	Beta-D-glucoside glucosylhydrolase / Glycoside hydrolase, family 3
p190	↑5,1	isoflavone reductase-like protein
p149	↑4,7	Translation elongation factor EF-2 subunit
p18	↑3,5	Zinc finger CCCH domain protein / Znf_CCCH_sf
p173	↑2	Phosphoglycerate kinase
p216	↑1,6	Lipoxygenase
p202	↓3,4	Vitamin B-12-independent methionine synthase
p70	↓5,5	Uncharacterized protein
p87	↓9,2	V-type proton ATPase catalytic subunit A
p48	↓31,9	26S protease regulatory subunit 6A like A
p3	suppression	14-3-3-like protein
p12	suppression	Late embryogenesis ab prot.(resp.to desiccation)
p16	suppression	Elongation factor 1-beta
p23	suppression	Heat shock cognate protein 80
p25	suppression	Patellin-like protein
p58	suppression	Heat shock cognate 70 kDa-like protein
p175	suppression	Processing peptidase

LEA білки, представниками яких є дегідрини, знатні до накопичення у відповідь на маможоження на осмотичний стрес (Kosová et al., 2007). Вважається, що вони здатні впливати та стабілізувати мембрани за умов

недостатнього зволоження (Kosova et al., 2010). Крім того, їх концентрація здатна змінюватися у відповідь на посуху та висихання насінин (Finkelstein et al., 2002; Hasegawa et al., 2000; Bray, 2002). Синтезу цих білків передують накопичення абсцизової кислоти, а зміна їх кількості, відповідно, регулюється проходженням сигнальних шляхів (Войтенко & Косаківська, 2016).

Бета-субодиниця фактора елонгації трансляції бере участь у функціонуванні рибосоми разом з чинниками ініціації та припинення трансляції, здійснюючи синтез білка на матричних РНК. Збільшення його вмісту може відображати тенденцію до посилення синтезу білків, пов'язаних з саліциловою кислотою, що, у свою чергу, може провокувати підвищення вмісту таких білків, як малатдегідрогеназа, гліказидгадролаза, 14-3-3 білок та інші (Яковлева и др., 2009), що беруть участь у захисних реакціях, енергетичних процесах, репарації та дуплікації ДНК, синтезі та деградації білків, у процесах клітинної сигналізації

Було знижено у відповідь на засолення після опромінення гороха кількість таких білків: Vitamin B-12-independent methionine synthase (вітамін В-12 незалежна метіонін синтаза), Uncharacterized protein, V-type proton ATPase catalytic subunit A, 26S protease regulatory subunit 6A like A у 3,4-31,9 рази.

Два білки серед ідентифікованих зреагували зміною концентрації на стресори та їх поєднання протилежним чином (табл. 3.5). НАДФ дегідрогеназа (probable NAD(P)H dehydrogenase (Quinone) FQR1-like 2) на опромінення відреагувала зменшенням кількості, а на засолення - збільшенням у 2,8 рази. Протилежна ситуація з альдо/кето редуктазою, що відноситься до НАДФ-залежного суперсімейства оксидоредуктаз (Aldo/keto reductase / NADP-dependent oxidoreductase domain superfamily) та повністю зникла у відповідь на комбінований вплив.

Таблиця 3.5

Ідентифіковані білки, показники яких найбільше змінилися як для групи опромінених ІВ рослин, так і для рослин після засолення і після взаємодії стресорів. (підвищення концентрації білків - стрілка вгору; зниження концентрації - стрілка вниз та suppression)

ID точки	Зростання / зменшення кількості після ІВ	Зростання / зменшення кількості після NaCl	Зростання / зменшення кількості після ІВ+ NaCl	Назва білка, скорочення або ген
p35	↓1,6	↑2,8	-	probable NAD(P)H dehydrogenase (Quinone) FQR1-like 2
p38	↑2,7	↓1,8	suppression	Aldo/keto reductase / NADP-dependent oxidoreductase domain superfamily

Альдо-/кеторедуктаза, як вважається, пов'язана з детоксикацією клітин, а саме щодо реактивних альдегідів, що походять з перекисного окислення ліпідів, тому зростання її кількості у відповідь на ІВ пояснюється, адже ІВ здатне безпосередньо або опосередковано, через утворення активних форм кисню, ініціювати перекисне окислення ліпідів (ПОЛ).

Кожен з ідентифікованих білків, концентрація якого змінювалася внаслідок дії стресових факторів чи їх комбінацій, впливає на реакції організму на пошкоджуючі чинники та може відігравати важливу роль у передачі сигналів і, як результат, у взаємодії сигнальних систем рослин. Усім білкам притаманна певна внутрішньоклітинна локалізація, належість до певних внутрішньоклітинних структур та процесів. Серед виділених

нами, відповідно до інформації з міжнародних баз даних, були білки, що мали відношення до цитозолу (L-аскорбат пероксидаза), рибосом (ЕПР) (фактор елонгації 1-бета субодиниця), мітохондрій (піруватдегідрогеназа), ядра (СННН домен цинкових пальців), мембран (DREPP білки), цитоскелету (4А актин-пов'язаний білок), або до різних компартментів чи органел клітин одночасно (14-3-3 подібний білок).

Щодо функціональних особливостей та участі у сигнальних процесах, то було виявлено такі, що відповідали за: 144-3-3-подібний білок - трансдукцію сигналу, DREPP білки плазматичної мембрани - рецепція та трансдукція сигналу, пероксиредоксин - контролює рівень цитокін-індукованих пероксидів, що беруть участь у передачі клітинних сигналів, фосфогліцераткіназа - фотосинтез, транскетолаза - енергетичний обмін, малатдегідрогеназа - цикл Кребса, білки пізнього ембріогенезу - ріст, розвиток на відповідь на стресори, фосфогліцерат мутаза - гліколіз, білки теплового шоку - стабілізація протеїнів, L-аскорбат пероксидаза - захист від реактивних форм кисню та інші.

Загалом, 223 виявлені білки можна розділити на групи за принципом впливу на зміни їх концентрації в залежності від характеру взаємодії стресорів (табл. 3.6).

Визначення типу взаємодії стресових факторів є феноменологічним та ґрунтується на аналізі змін концентрації білків після дії опромінення, засолення та їх комбінації. Відгук організму неможливо передбачити, виходячи лише з інформації про ефекти роздільного впливу кожного з факторів (Гераськин и др., 2002). Тому ефекти зміни експресії певного білка (Е), залежно від впливу кожного зі стресорів (А - засолення, В - іонізуюче випромінювання) та характеру взаємодії стресорів із погляду величини ефекту зміни концентрації білка, поділили на чотири типи: некооперативний адитивний, некооперативний мультиплікативний, кооперативний синергічний та кооперативний антагоністичний (табл. 3.6).

Як зазначалося вище, нами було виявлено узгоджену варіацію концентрацій білків, що може свідчити про функціональний взаємозв'язок між ними або про те, що вони беруть участь в одних біохімічних процесах чи сигнальних шляхах під час відповіді на той чи інший стресовий вплив та їх комбіновану дію. Для всіх білків отримані статистично достовірні показники, виходячи з яких нами визначено підгрупи (кластери) протеїнів, концентрація яких змінюється синхронно.

Таблиця 3.6

Характеристика взаємодії стресових факторів.

Схема взаємодії факторів	Тип взаємодії стресорів	Кількість білків, концентрація яких змінювалася через відповідний тип взаємодії стресорів
$E=A+B$	Не кооперативний адитивний	28 (13 %)
$E=A \times B$	Не кооперативний мультиплікативний	34 (15 %)
$E \gg A+B, E \gg A \times B$	Кооперативний синергічний	20 (9 %)
$E \ll A+B, E \ll A \times B$	Кооперативний антагоністичний	141 (63 %)

*А- NaCl, В- Іонізуюче опромінення, Е-ефект

Виходячи з отриманих даних щодо концентрації білків, було визначено, що найбільш вираженим є кооперативний антагоністичний ефект. Це явище притаманне для 63 % білків. Для них величина ефекту впливу комбінації факторів виявилася значно нижчою за очікувану в разі адитивної та мультиплікативної взаємодії факторів. Протилежна ситуація з 20 точками від загальної кількості виділених білків, для яких ефект комбінованої дії значно перевищував теоретично очікуваний.

Також були визначені білки, на експресію яких опромінення та засолення впливали адитивно або мультиплікативно (28 та 34 білків відповідно). Такі результати можуть вказувати на складні механізми регуляції експресії генів і синтезу білків у відповідь на комбіновані стреси, а також на комплексну систему адаптації організмів до дії пошкоджуючих чинників та на взаємодію сигнальних систем під час формування реакції рослин на стрес на молекулярному рівні.

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

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Сучасний світ характеризується стрімким розвитком промисловості та енергетики, розширенням обсягів сільськогосподарського виробництва та споживання. Це призводить до того, що за останні десятиліття кількість стресових факторів та інтенсивність їх впливу на живі організми, зокрема, рослинні, суттєво зросли: збільшуються площі засолених ґрунтів, солончаків, відбуваються істотні зміни у глобальній кліматичній системі тощо. Це очікувано зумовлює посилення техногенного забруднення навколишнього середовища складним комплексом шкідливих чинників різної природи.

Згідно з даними FAO у світі близько 1 млрд га земель засолені, при цьому переважаючим є натрій хлоридне засолення ґрунту. Вивчення механізмів солестійкості рослин вже проводиться, адже воно безпосередньо пов'язане з вирішенням проблеми забезпечення людства продуктами харчування. За деякими розрахунками, зростання кількості людей на 2,3 мільярди призведе до зростання потреби у продовольстві на 70 відсотків.

Існує первинне (природне) і вторинне (антропогенне) засолення. Одними з причин останнього є нераціональне зрошування, використання хімічних добрив, висушування річок (що стосується особливо південних регіонів України). Ступінь засоленості ґрунту, зокрема, визначає рівень зниження врожайності: втрата до 30-50% врожаю і вище при сильному засоленні. Це впливає на ріст пагонів і розвиток кореневої системи, має вплив на цвітіння, на стадії насіння, наприклад, високі концентрації солі пригнічують проростання, а низькі – індукують стан спокою насіння. Екологічна ситуація, що невпинно штовхає до глобальних змін клімату, провокує й підвищення температури. Це також являється критичним фактором для рослин, їх вегетації та цвітіння, площі ареалу існування.

Окрім фактору засолення серед основних деградаційних процесів ґрунтів України виділяють радіонуклідне забруднення. ІВ є одним з найнебезпечніших абіотичних чинників навколишнього середовища. Це стосується не лише мість з природнім підвищеним радіаційним фоном. Аварії на японських АЕС Оганава і Фукусіма, на Чорнобильській АЕС підтвердили, що навіть новітні технології не в змозі гарантувати безпечну роботу станцій, особливо в умовах стихійних лих. Природні процеси розпаду радіонуклідів чорнобильської зони поступово корегують структуру розподілу радіонуклідів та їх концентрації, рівень забруднення ізотопами, наприклад, плутонію, змінюються не суттєво, а активність ^{241}Am навпаки, поступово зростає за рахунок процесів розпаду ^{241}Pu . Крім того, Міністерством екології та природних ресурсів України прогнозується зростання обсягу радіоактивних відходів у нашій державі. Це, зокрема, стосується поводження з відпрацьованим ядерним паливом, що тимчасово зберігається на українських АЕС, повернення в Україну високоактивних радіоактивних відходів після переробки відпрацьованого ядерного палива українських атомних електростанцій за кордоном тощо. Зонами ризику також продовжують бути полігони з випробовування ядерної зброї.

Тому антропогенне забруднення навколишнього середовища радіонуклідами в результаті експериментальних ядерних вибухів, інтенсивний розвиток ядерної енергетики, використання джерел іонізуючого випромінювання в промисловості, транспорті, сільському господарстві, науці, а також розширення обсягу використання рентгенологічних і радіоізотопних методів досліджень в медицині привели до підвищення зовнішнього і внутрішнього опромінення живих організмів. Дози опромінення від цих джерел в розвинених країнах вже в кілька разів перевищують рівні природного фонового опромінення. І хоча еволюція рослин відбувалася за дії радіації, неодмінною складовою якої було і гамма-випромінювання (вважається, що ІВ навіть за малих доз викликає

підвищення рівня пошкоджень у ДНК у декілька разів), гостре опромінення здатне впливати на низку процесів, змінюючи відповідь рослин на вплив інших стресорів.

Отже, збільшення радіаційного навантаження на біоценози, збільшення кількості, інтенсивності та різноманіття шкідливих чинників абіотичного стресу створює небезпеку одночасної дії на організм декількох з них. Це обумовлює необхідність експериментального дослідження закономірностей взаємодії фізичних і хімічних факторів навколишнього середовища з живими організмами, прогнозування та оптимізації ефектів, індукованих комбінованим впливом.

Фізична, хімічна та біологічна дія кожного з цих факторів на організм викликає комплекс глибоких метаболічних порушень, які проявляються на всіх рівнях організації - молекулярному, клітинному, тканинному, рівні органів та їх систем, всього організму.

Молекулярно-біологічні методи, що дозволяють оцінити комбіновану (поєднану) дію несприятливих факторів, мають перевагу над широко поширеними методами фізико-хімічного контролю, які не дозволяють оцінити сумарну дію стресорів безпосередньо на організм. На перший план виступає задача розробки методологічних основ та методичних підходів для кількісної оцінки поєданого впливу різних типів забруднювачів, вияву змін у метаболічних та сигнальних шляхах тощо.

Для оцінки стійкості рослин до певного стресору зазвичай використовують прямі (облік змін, наприклад, ростової активності) та непрямі (біохімічні, біофізичні) методи, що дають врахувати зміни окремих процесів чи ланок метаболізму, модифікацію сигнальних шляхів та їхнє співвідношення із показниками прямих методів). Як ефективний та простий критерій для вивчення стійкості до солі сортів різних культур використовують оцінку ростових показників та визначають відносний вміст води; дослідження ІВ передбачає облік кількості хромосомних аберацій, швидкості росту, тощо. Сучасні молекулярні підходи для

вивчення механізмів як стійкості рослин до стресових чинників, так і специфіки формування їх реакції як на поодинокі впливи, так і комбіновану дію стресорів передбачають використання більш інформативних методів, які дозволяють накопичити великі бази даних та інтегрувати їх між собою, системно аналізуючи певні питання.

Таким чином, необхідними є дослідження, спрямовані на детальне вивчення молекулярних механізмів комбінованого впливу ІВ та засолення на живі організми з метою не лише оцінку ризиків від їх сумісної дії, а й для розуміння ролі взаємодії сигнальних шляхів у формування відповіді рослин.

На сьогодні в модельних експериментах достатньо добре вивчені особливості реакції рослин за окремої дії абіотичних стресорів доквілля. Зокрема, проаналізовано основні аспекти відповіді на ІВ на генетичному та протеомічному рівнях, що здатні впливати на врожайність рослин і швидкість їх старіння.

Однак питання реакції рослин на комбінації факторів, що зустрічаються в природних обставинах та сучасних умовах кліматичної нестабільності залишається відкритим. На стресові впливи рослина реагує включенням різних сигнальних систем та шляхів для активної реакції всього організму. Відповідно, поєднання різних стресорів «змушує» сигнальні системи, діючи спільно, виробити єдину стратегію відповіді рослинного організму. У зв'язку з чим актуальним завданням є отримання нової інформації щодо реакцій рослин на різних рівнях формування та розвитку за поєднаної дії ІВ та інших абіотичних стресорів.

На особливу увагу заслуговують дослідження таких маркерів індукції захисних/адаптаційних реакцій у рослин в стресових умовах як вміст вільного проліну та динаміка його коливань, аналіз індукції транспозиції та зміна мобільності генетичних елементів, зокрема, LTR-ретротранспозонів, отримання інформації щодо протеому рослинного

організму, змін у складі та кількості білків та їх властивостей за поєднаної дії попереднього впливу ІВ та абіотичних стресорів довкілля.

Такий цілісний підхід дозволив визначити особливості формування сукупної відповіді рослин та проаналізувати внесок змін на кожному з етапів у забезпечення стресостійкості рослинного організму.

Горох було обрано як зручний, достатньо вивчений та важливий у харчовому аспекті модельний об'єкт. Це найбільш скоростигла зернобобова культура, що широко використовується в Україні та є однією з основних зернобобових культур в Європі. Горох має відносно дрібну кореневу систему, що спрощує проведення лабораторних досліджень; він глікофіт, не переносить солоні ґрунти; морозостійкий, але нежаростійкий вид. Однак, будучи важливою культурою, горох, недостатньо вивчений в радіоекологічному відношенні, зокрема щодо комбінованого впливу на нього ІВ та абіотичних стресорів. Тому дослідження наслідків таких впливів гороху є безсумнівно актуальними і науково необхідними, зокрема, для можливої екстраполяції даних на інші рослинні об'єкти.

У дослідженні проаналізовано біохімічні, генетичні, протеомні і морфологічні реакції *Pisum sativum* L. на гостре радіаційний вплив в поєднанні з солоністю або гіпертермією. В дисертаційній роботі ми використали комплексний комбінований підхід до вивчення реакцій розсади гороху на стресори після попереднього опромінення. Відомо, що кожен зі стресорів може послаблювати або, що буває частіше, посилювати сумарний пошкоджуючий ефект. Для аналізу цього явища нами оцінювалися різні ростові показники протягом періоду з 2 по 13 добу після дії стресорів та різні дози (інтенсивності, концентрації) самих чинників.

Отримані результати показують, що деякі порівняно низькі дози іонізуючого випромінювання допомагають рослинам бути стійкими до засолення і температурних стресів, проте ця стійкість короткострокова. Ці дані можуть в повній мірі характеризувати молекулярні, генетичні, структурні і метаболічні зміни в саджанцях гороху на початковій стадії

його зростання. Для цього порівняли середні темпи росту коренів з теоретично очікуваними (як в разі адитивної взаємодії стресорів). Кресток сигнальних шляхів означає зростання стійкості організму до одного стресового фактору в результаті адаптації до іншого стресу або за їх спільної дії. Пригнічення росту коренів у відповідь на дію засолення може бути пов'язаним зі сповільненням росту розтягуванням або пригнічення клітинних поділів, тобто через пошкодження мембран, втрату тургору, пошкодження генетичного матеріалу тощо. Адже відомо, що за дії високих концентрацій солі в апексі кореня спостерігають інтенсивну вакуолізацію клітин та відсутність типової організації тканин. Водночас, на пізніших фазах розвитку ми спростерігали активізацію меристеми бічних коренів та відновлення росту пагона. Слід зазначити про існування безперервного інформаційного зв'язку корінь-пагін, який реалізується за участі сигнальних молекул, і забезпечує адекватні реакції-відповіді рослин на дію стресу. Це результат взаємодії і "діалогу" різних сигнальних систем. Значне відхилення від адитивності до синергізму або антагонізму було продемонстровано щодо параметрів росту рослин, що може вказувати на появу перехресної взаємодії в сигнальних шляхах. Іонізуюче опромінення змінює подальшу стійкість саджанців до осмотическому або термічного стресу, але це явище носить здебільшого тимчасовий характер.

Такі стресори як засолення чи ІВ призводить, зокрема, до посиленого утворення АФК, для запобігання або відновлення ушкоджень після яких рослинні клітини використовують складну систему захисту. Знешкодження АФК для відновлення окисно-відновного статусу, збереження осмотичної рівноваги, захисту та стабілізації білків і клітинних структур входять до численних захисних функцій під час засолення. Однією з таких захисних реакцій є амінокислота пролін, відома за накопиченням у рослинних клітинах у відповідь на температурний стрес. Кількісний аналіз її корисна для оцінки фізіологічного стану перехресних

перешкод в сигнальних системах і, в більш загальному плані, для розуміння стійкості рослин до стресу.

Вміст вільного проліну в коренях проростків *Pisum sativum* L. для всіх груп (опромінених, після засолення, після гіпертермії та після поєднаної дії факторів) дослідили. Було показано, що його концентрація у відповідь на опромінення не змінилася так сильно, як під впливом засолення або комбінації обох стресових факторів. На 13-й день після впливу стресових факторів спостерігався високий рівень втрат води коренями. Коефіцієнт кореляції між кількістю води та вмістом проліну був негативним ($r = -0,87$), але з часом рівень води в рослинах відновився і стабілізувався приблизно на 34 день експерименту, коли цей коефіцієнт кореляції став позитивним ($r = 0,32$). Це може бути пов'язано з осмотичним шоком, викликаним впливом солі, і наступним зниженням швидкості росту, коли потреба організму у воді дещо знизилася. З часом, схоже, метаболізм переходить в стабільний стан, а енергетичні процеси переключаються на підтримку функцій цілісності рослин і процесів репарації, після чого як ростові показники, так і рівень води та проліну отримують тенденцію наближення до контрольних значень.

Стресові фактори, окрім вище зазначеного, викликають зміни стану геному рослин, що зумовлює вплив як на загальний стан рослинних організмів, так і на їх цвітіння, врожайність, швидкість старіння тощо. Такі зміни на генетичному та епігенетичному рівнях можуть передаватися спадково та відображатися у наступних поколіннях. Це може бути пов'язано і з функціонуванням мобільних генетичних елементів (МГЕ) рослин, зокрема, LTR-ретротранспозонів. Вони відіграють велику роль у зміні структури генома та експресії генів. Існує вірогідність утворення адресних адаптивних мутацій, що генеруються інсерціями мобільних елементів у відповідь на специфічні та неспецифічні стресові впливи. Активність ретротранспозонів є одним з маркерів реакції рослин на стресові фактори, особливо іонізуючу радіацію, осмотичний стрес та

підвищення температур. Активація ретротранспозонів у відповідь на стресовий вплив визначається здатністю їх промоторів реагувати на фактори сигнальних шляхів, які регулюють адаптацію рослин до абіотичних стресів.

Вперше отримані дані про вплив різних видів стресу і його комбінацій на активність мобільних генетичних елементів рослин показали, що поява нових амплікон LTR-ретроспозонів у відповідь на спільну дію стресорами, свідчить про можливе руйнування епігенетичного сайленсингу і зростання мобільності ретротранспозонів. Найбільш характерним це явище виявилось для ретротранспозонів CYCLOP та 2074.

Як відомо, будь-які впливи можуть мати величезний вплив і на протеом організму, особливо, коли це стосується комбінованих стресових чинників. Токсичні концентрації АФК, наприклад, як вказувалося вище, призводять до серйозного пошкодження білків, інгібування активності ферментів і до окислення макромолекул, в т. ч. ліпідів мембран і ДНК.

Аналіз протеомічних даних підтвердив, що досліджувані стресові фактори суттєво впливають на зміну як якісних, так і кількісних показників складу білків гороху. В результаті 2-ВЕ-аналізу було виділено 223 білкових плями, 54 з яких статистично значимо відрізнялися в порівнянні, принаймні, з однією з експериментальних груп. Ми відзначили модифікації деяких білків, серед яких є такі, що відіграють неабияку роль у функціонуванні сигнальних шляхів, зокрема: транскетолаза, малатная дегідрогеназа, трансляційний фактор подовження EF-2, 14-3-3-подібний білок, білок теплового шоку 80, тепловий шок 70 кДа-подібний, 14-3-3-подібний білок В та інші. Їх значна роль в трансдукції стресових сигналів і в процесах формування активної відповіді на несприятливі фактори підтверджується коливаннями концентрації білків між групами.

Найбільша кількість білків змінилося у відповідь на комбіновану дію іонізуючого випромінювання і засолення, кожен фактор сам по собі викликав зміни в меншій кількості білків. Найбільш поширеним типом

взаємодії стресорів - 63% - була кооперативна антагоністична взаємодія, що вказує на складні механізми формування реакції рослин на вплив стресових факторів.

Отже, адаптивні фізіологічні та біохімічні реакції рослин на досліджені фактори та їх комбінації, що включають сприйняття і трансдукцію сигналу; захист від оксидативного стресу; поглинання, транспортування та компартментацію певний йонів; модифікування структурних компонентів мембран і таке інше, контролюються взаємодією величезної кількості генів. Гени, у свою чергу, можуть як зазнавати змін самі під впливом стресорів, так і перехресно реагувати з іншими компонентами трансдукції сигналів, завдяки чому якісно змінюється ефективність відповіді організму та вірогідність його виживання взагалі.

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

При цьому, однак, значення багатьох складових адаптаційного синдрому та процесів перенаправлення метаболічних біохімічних шляхів залишається не до кінця зрозумілим, адже припущення щодо сигнальної ролі окремих сполук, їх вплив на рівні організму рослини, вміст і внутрішньоклітинна локалізація яких змінюються в умовах стресу, вимагають додаткового дослідження та синтезу протеомічних, генетичних даних та їх системного аналізу. Ситуація з пошуком рецепторів сигналів абіотичних стресорів значно складніша за такі у випадку з біотичними, тому має важливіше значення. Незважаючи на те, що механізми, що призводять до зміни рівня експресії генів у відповідь на дію осмотичного, сольового, радіаційного чи температурного стресорів, очевидно, відповідають загальній схемі передачі сигналу (сприйняття його сенсором, передача сигналу від сенсора до первинної мішені, експресія генів та

епігенетична регуляція), деталі процесу, особливо на початкових етапах сприйняття стресового сигналу не з'ясовані повністю досі.

Наразі встановлено функціонування в рослинних клітинах принаймні семи сигнальних систем, що включають у себе сотні каскадів та біохімічних шляхів. Особливо часто труднощі виникають під час пошуку причинно-наслідкових зв'язків між явищами, що тісно пов'язані з процесами трансдукції стресового сигналу в геном і формування фізіологічної відповіді організму. Існування методичних труднощів під час дослідження ефектів, що стосуються як початкових етапів відповіді, так і подальшого формування реакції, пов'язані з тим, що методи безперервного контролю зараз розроблені лише для оцінки дуже обмеженого набору показників функціонування рослинного організму.

При інтерпретації таких розрізнених результатів важко уникнути помилок в побудові зв'язків між окремими явищами, особливо такими динамічними, як передача стресових сигналів в геном і його відповідь на певний стресор. Тому важливим та необхідним є подальше всебічне дослідження сприйняття та формування стресових сигналів рослинними організмами на генетичному, епігенетичному та протеомічному рівнях; аналіз цих процесів у різновіддалений час від впливу стресових чинників; створення міжнародних баз даних та спроби знайти точки взаємодії сигнальних систем та біохімічних шляхів під час реакції рослин на абіотичні чинники.

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

засоленням та без нього, а також за окремої дії нагрівання та осмотичного шоку.

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

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

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alzohairy A. M. «Environmental stress activation of plant LTR-retrotransposons». *Funct. Plant Biol.* 41 (2014): 557–567.
2. Arruda S.C. et al. «Two-dimensional difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: Fundamentals and applications to the study of plant proteomics». *The Analyst* 136. 20 (2011):4119-26. 2011
3. Athar H.R. et al. «Strategies for Crop Improvement Against Salinity and Drought Stress: Salinity and Water Stress». Springer (2009): 1-18. doi: 10.1007/978-1-4020-9065-3_1.
4. Azimzadeh O. et al. «Proteomics in radiation research: Present status and future perspectives». *Radiat Environ Biophys.* 53.1 (2014):31–8.
5. Bayat H. et al. «Impact of exogenous salicylic acid on growth and ornamental characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress. *J. of Stress Physiol. & Biochem.* 8.1 (2012): 258—267.
6. Bennetzen J. L. «The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution». *Trends in Microbiology.* 4. 9 (1993): 347–353.
7. Bennetzen J. L. «Transposable element contributions to plant gene and genome evolution» *Plant Molecular Biology.* 42 (2004): 251– 269
8. Borges A.A. et al. «Effect of menadione sodium bisulfite, an inducer of plant defenses, on the dynamic of banana phytoalexin accumulation during pathogenesis». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51.18 (2003): 5326-5328.
9. Boyer, J. S. «Plant Productivity and Environment» *Science.* 218 (1982): 443–448.
10. Bray E.A. «Absciscic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome». *Plant Cell Environ.* 25 (2002): 153-161.
11. Bray E.A. et al. «Responses to abiotic stresses». *Biochemistry and molecular biology of plants.*Amer. Soc. Rockville (2000): 1158–1249.

12. Burt A. et al. Trivers R. *Genes in Conflict. The Biology of Selfish Genetic Elements* // London, «The Belknap Press of Harvard University Press», 2006. 602 p.
13. Camoni L. et al. «14-3-3 Proteins in Plant Hormone Signaling: Doing Several Things at Once». *Front Plant Sci.* 3 (2018): 297.
14. Campbell B.C. et al. «IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley» *Mol Breeding.* 27 (2011): 193–206.
15. Capy P. et al. «Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?» *Heredity.* 85 (2000): 101–106.
16. Carillo P. et al. «Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine». *Functional Plant Biology.* 35. 5 (2008) 412-426 <https://doi.org/10.1071/FP08108> 2008.
17. Carillo P., Gibon Y. «Protocol: Extraction and determination of proline» (2011) online, available from: https://www.researchgate.net/publication/211353600_PROTOCOL_Extraction_and_determination_of_proline – [accessed 10 December 2017].
18. Carvalho K. et al. «The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo» *Mol. Biol. Rep.* 40 (2013): 3269–3279.
19. Casacuberta J., Santiago N. «Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes». *Gene.* 311 (2003): 1-11.
20. Chandler V. L., Walbot V. «DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (1986): 1767–1771.
21. Chavanne F. et al. «Structure and evolution of Cyclops: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family highly amplified in pea and other legume species». *Plant Mol. Biol.* 37. 2 (1998): 363-375.

22. Chaves M.M. et al. «Recent Advances in Photosynthesis under Drought and Salinity». *Adv. Bot. Res.* 57 (2011): 50–83.
23. Chaves M.M. et al. «Understanding Plant Responses to Drought – from Genes to the Whole Plant». *Functional Plant Biol.* 30 (2003): 239–264.
24. Chen C., Dickman M.B. «Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102. (2005): 3459-3464.
25. Cramer G.R. et al. «Effects of Abiotic Stress on Plants: a Systems Biology Perspective». *BMC Plant Biol.* 11 (2011): online, available from URL: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-11-163>).
26. Danchenko M. et al. «Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment.». *J Proteome Res.* 8. 6 (2009): 2915-22. doi: 10.1021/pr900034u.
27. Dasgan H. et al. «Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses». *Plant Sci.* 163 (2002): 695—703.
28. de la Fuente van Bentem S. et al. «Phosphoproteomics reveals extensive in vivo phosphorylation of Arabidopsis proteins involved in RNA metabolism». *Nucleic Acids Res.* 34. 11 (2006):3267-78.
29. Deinlein, U. et al.. «Plant salttolerance mechanisms». *Trends Plant Sci.* 19. 6 (2014): 371-379.
30. El-Esawi M. «Introductory Chapter: Hormonal Regulation in Plant Development and Stress Tolerance, Phytohormones – Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses», InTech, 2017. [DOI: 10.5772/intechopen.69806].
31. Evers D. et al. «Towards a Synthetic View of Potato Cold and Salt Stress Response by Transcriptomic and Proteomic Analysis». *Plant Mol. Biol.* 78 (2012): 503-514.

32. Faleiro A.C. «Malate dehydrogenase isozyme patterns in cladophylls of a *Opuntia ficus-indica* Mill. (*Cactaceae*) clonal population». *Acta sci. Biol. Sci.* 25. 1 (2003): 207-211.
33. Falleh, H. et al. «Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances». *Plant Physiol. Biochem.* 52 (2012): 1-8.
34. Farkash E., Prak E. «DNA damage and L1 retrotransposition». *J. of Biomedicine and Biotechnology.* 26 (2006): 1-8.
35. Faure E. et al. «X-irradiation activates the *Drosophila* 1731 retrotransposon LTR and stimulates secretion of an extra-cellular factor that induces the 1731-LTR transcription in nonirradiated cells». *J. Biochem.* 120. 2 (1996): 313-319.
36. Feschotte C., Pritham E. J. «DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes». *Annual Review Genetics.* 14. (2007): 331–368.
37. Finkelstein R.R. et al. «Absciscic acid signaling in seeds and seedlings». *Plant Cell.* 14 (2002): 15-45.
38. Flowers T. «Improving crop salt tolerance». *Journal of Experimental Botany.* 55 (2004): 307-319
39. Friedman D.B. et al. «Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis». *Methods Enzymol.* 463 (2009): 515-40. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63030-5.
40. Fujita M et al. «Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks». *Curr Opin Plant Biol.* 9. 4 (2006): 436-442.
41. Funck, D. et al. «Re-quirement of proline synthesis during *Arabidopsis* reproductive development». *BMC Plant Biology,* 12 (2012): 1-12.
42. Gábrišová D. et al. «Do Cupins Have a Function Beyond Being Seed Storage Proteins?» *Front Plant Sci.* 6 (2015) online, available from <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01215> 173:86-95 PMC4711306.

43. Gamalero E. et al. «The use of Microorganisms to Facilitate the Growth of Plants in Saline». Springer. (2009):1-22.
44. Grandbastien M. «Activation of plant retrotransposons under stress conditions». Trends Plant Sci. 3. (1998): 181–187. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01232-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01232-1).
45. Hasegawa P.M. et al.»Plant cellular and molecular responses to high salinity». Annu Rev. Plant. Mol. Plant Physiol.51. (2000): 463-499.
46. Hayat S. et al. «Role of proline under changing environments: a review». Plant Signal Behav. 7. 11 (2012): 1456–1466.
47. Hong Z. et al. «Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress». Plant Physiol. 122. 4 (2000): 1129—1136.
48. Hora A., Malik C.P. «Evaluation of genetic relationship between *Trigonella Melilotus* complex using CCMP markers». Plant Tissue Culture and Biotechnology. 23. 1 (2013): P. 59-66.
49. Hunter T. «Tyrosine Phosphorylation: Thirty Years and Counting». Curr. Opin. Cell Biol. 21 (2009): 140–146.
50. Hurst A. et al. «Effects of Salinity, High Irradiance, Ozone, and Ethylene on Mode of Photosynthesis, Oxidative Stress and Oxidative Damage in the C3/CAM Intermediate Plant *Mesembryanthemum Crystallinum L.*». Plant Cell. 27(2002): 187-197.
51. Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T. «Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants». Front. in Plant Sci. 7 (2016): 1–15.
52. Jianxin M. et al. «Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice». Genome Research. 14 (2004): 860–869.

53. Jurka J. et al. «Families of transposable elements, population structure and the origin of species». Biol. Direct. (2011): 6-44. online, available from DOI 10.1186/1745-6150-6-44.
54. Kalendar R. et al. «iPBS: a universal method for DNA Fingerprinting and retrotransposon isolation». Theor. Appl. Genet. 121 (2010): 1419–1430 (Published online) DOI 10.1007/s00122-010-1398-2 123.
55. Kang H.-M., Saltveit M.E. «Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedlings radicles». Physiol Plant. 113 (2001): 548–556.
56. Kashkush K., Khasdan V. «Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes». Genetics. 177 (2007): 1975–1985.
57. Kavi Kishor P.B. et al. «Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance». Current Science. 88. 3 (2005): 424–436
58. Klubicová K. et al. «Seeds in Chernobyl: the database on proteome response on radioactive environment». Frontiers in Plant Science. (2012);3:231. doi:10.3389/fpls.2012.00231.
59. Kosova K. et al. «The development of frost tolerance and DHN5 protein accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) doubled haploid lines derived from Atlas 68 x Igri cross during cold acclimation». Journal of Plant Physiology. 167 (2010): 343–350.
60. Kosová K. et al. «The role of dehydrins in plant response to cold». Biologia Plantarum. 51. 4 (2007): 601–617.
61. Krishnan N. et al. «Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress». Free Radical Biology Medicine. 44T (2008): 671-681.
62. Kryvokhyzha M. et al. «Differential expression of flowering genes in *Arabidopsis thaliana* under chronic and acute ionizing radiation».

- International journal of radiation biology (2018): 1-9
<https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1562251>.
63. Liang X. et al. «Proline mechanisms of stress survival». *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013): 998-1011.
 64. Litvinov S., Rashydov N.M. «The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays». *Journal of Agricultural Science and Technology A* 7. 1 (2017): 52-60.
 65. Liu, J., Zhu, J. K. «Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*». *Plant Physiol.* 114. 2 (1997): 591-596.
 66. Llorens C. et al. «The Gypsy Database (GyDB) of Mobile Genetic Elements: Release 2.0». *Nucl. Acids Res. (NARESE)*. 39. 1 (2011): 70-74.
 67. Logan D.C. et al. «A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development». *Biochemistry and Molecular Biology International* 43. 5 (1997): 1051-1062.
 68. Maksimovic I. et al. «Effects of Salinity on Vegetable Growth and Nutrients Uptake». *Irrigation Systems and Practices in Challenging Environments*. 9 (2012): 169—190.
 69. Mani S. et al. «Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*». *Plant Physiol.* 128 (2002):73—83.
 70. Martins A.C. et al. «Change and Aging Senescence as an Adaptation». *PLoS ONE*. 6. 9 (2011): 1–12.
 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024328>.
 71. McClintock B. «The significance of responses of the genome to challenge». *Science*. 226 (1984): 792–801.
 72. Miranda D. « Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.)». *J. Appl. Bot. Food Quality*. 87 (2014): 67-73.

73. Mittler R. et al. «How do plants feel the heat?» *Trends Biochem Sci.* 37. 3 (2012): 118-25. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.007.
74. Mochida K., Shinozaki K. «Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analysis of Plant Functions». *Plant Cell Physiol.* 52 (2011): 2017–2038.
75. Morgan, M.J. et al. «Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis». *Plant Physiology* 147 (2008): 101-114.
76. Mundy J., et al. «Crosstalk». *Trends in Plant Science.* 11. 2 (2006): 63-64.
77. Nakashima K. et al. «A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs in *Arabidopsis*». *Plant Physiol.* 18. 4 (1998): 1233—1241.
78. Nesterenko O., Rashydov N. «Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation». *International Journal of Secondary Metabolite.* 5. 2 (2018): 94-108. DOI: 10.21448/ijsm.407285.
79. Nguyen D. et al. «How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory». *Plant Mol. Biol.* 91 (2016): 727–740. DOI: 10.1007/s11103-016-0481-8.
80. Nie L. et al. «Integrative Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data: Challenges, Solutions and Applications». *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27 (2007): 63-75.
81. Obsilová V. et al. «14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators». *Physiol Res.* 57 (2008): 11-21.
82. Porcel R. et al. «Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-

- photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress» J Plant Physiol. 158 (2015): 75-83. doi: 10.1016/j.jplph.2015.07.006.
83. Qados A.M.S. Abdul "Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.)». J. of the Saudi Soc. of Agricult. Sci. 10. (2011): 7—15.
 84. Qi W. et al. «Physiological and molecular characterization of the enhanced salt tolerance induced by low-dose gamma irradiation in Arabidopsis seedlings». Biochem. Biophys. Res. Commun. 25. 2 (2014): 1010–1015. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.06.086
 85. Rashydov N. et al. «Radiobiological Characterization Environment Around Object "Shelter"». In book: Nuclear Power Plant. 7 (2012): 231-279.
 86. Rashydov N., Nesterenko O. «The Problems Sustainable Remediation Of The Chernobyl Alienation Areas». Journal of Radiation Researches. 5. 2 (2018): 13-25.
 87. Raymond M.J., Smirnoff N. «Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential». Ann. Bot. 89. 7 (2002): 813—823.
 88. Rogers S.O., Bendich A. J. «Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi». Plant Molecular Biology Manual (1994): 183-190.
 89. SanMiguel P. et al. «Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome». Science. 274 (1996): 765–780.
 90. Sharma R. et al. «Recent Advances in Dissecting Stress Regulatory Crosstalk in Rice». Molecular Plant. 6. 2 (2013): 250–260. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/sss147>.
 91. Singh, A. et al. «Osmolytes: Proline metabolism in plants as sensors of abiotic stress». Journal of Applied and Natural Science. 9. 4 (2017): 2079-2092. <https://doi.org/10.31018/jans.v9i4.1492>.

92. Smykal P. «Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification». *Journal of applied genetics*. 47. 3 (2006): 221-30. DOI: 10.1007/BF03194627.
93. Sneha S. et al. «Effect of short term salt stress on chlorophyll content, protein and activities of catalase and ascorbate peroxidase enzymes in Pearl Millet. Am». *J. Plant Physiol*. 9. 1 (2013): 32-37.
94. Stork P., Schmitt J. «Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation». *Trends in Cell Biology*. 12. 6 (2002): 258–266. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02294-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02294-8).
95. Strand D.J., McDonald J.F. «Copia is transcriptionally responsive to environmental stress». *Nucl. Acid Res*. 13 (1985): 4401-4410.
96. Szabados L., Savoure A. «Proline: a multifunctional amino acid». *Trends Plant Sci*. 15.2 (2009): 89–97.
97. Thuiller W. et al. «Climate change threats to plant diversity in Europe» *PNAS*. 102. 23 (2005): 8245-8250. doi.org/10.1073/pnas.0409902102
98. Trindade L. et al. «A novel classification system for evolutionary aging theories». *Front Genet*. 4. 25 (2013): 1–8. DOI: 10.3389/fgene.2013.00025.
99. Turkan I et al. «Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance». In book: *Plant Responses to Drought and Salinity Stress Developments in a Post-Genomic Era. Advances in Botanical Research*, 2011– 150 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-387692-8.00004-7.
100. Ungerer M.C., T. «Transcriptional Dynamics of LTR Retrotransposons in Early Generation and Ancient Sunflower Hybrids». *Genome Biol. Evol*. 5. 2 (2013): 329–337.
101. Vieira C. et al. «Evolution of genome size in *Drosophila*. Is the invader's genome being invaded by transposable elements?» *Mol. Biol. Evol*. 19. 7 (2002): 1154-1161. DOI [mbev_19_705.1154_1161](https://doi.org/10.1093/mbev/19.7.1154).

102. Vosolsobě S. et al. «Evolutionary plasticity of plasma membrane interaction in DREPP family proteins». *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 1859.5 (2017): 686-697.
103. Wei J. et al. «Reciprocal crosstalk between jasmonate and salicylate defence-signalling pathways modulates plant volatile emission and herbivore host-selection behavior». *J. Exp Bot.* 65. 12 (2014): 3289–3298. DOI: 10.1093/jxb/eru181, PMCID: PMC4071845.
104. Wessler S. R. et al. «LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes». *Current Opinion in Genetics and Development*. 5. 6 (1995): 814–821.
105. Woodrow P. et al. «Polymorphism of a new Ty-1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses». *Theor. Appl. Genet.* (2010): 311–322.
106. Woodrow P. et al. «Ttd1a promoter is involved in DNA-protein binding by salt and light stress». *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011): 3787–3794.
107. Yoder J.A. et al. «Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites». *Trends Genet.* 13.8 (1997): 335-340.
108. Zhang C.Y. et al. «DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*)». *Genet Mol Res.* 12. 2(2013): 1269-77. doi: 10.4238/2013.April.17.5.
109. Zuker Ch. et al. «Biochemistry Dictyostelium transposable element DIRS-1 has 350-base-pair inverted terminal repeats that contain a heat shock promoter (transposon/developmental regulation/DNA sequence)». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81 (1984): 2660-2664.
110. Авгонова Х.Х., Дарвозиев М. «Влияние экологических условий на аттаргирующую способность клубней картофеля» *Олимони чавон ва илми муосир, Душанбе* (2002): 58-59.
111. Ахмад П. и др. «Влияние солевого стресса на систему антиоксидантной защиты, перекисное окисление липидов, ферменты

- метаболизма пролина и биохимическую активность у двух генотипов шелковицы» Физиология растений. 57. 4 (2010): 547-555.
112. Бакулина Е.А. «Исследование антиоксидантной роли пролина у галофитов и участия АФК в регуляции его биосинтеза» Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2010.
 113. Бондар О.І. та ін. «Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2014 році». Київ, «Міністерство екології та природних ресурсів України, ФОП Грінь Д.С.», 2016. 350 с.
 114. Вайнер, А. А., и др. «Участие пероксида водорода в индуцировании накопления пролина в растениях проса при действии NaCl». Вісник Харківського національного аграрного університету (біологія). 2. 29 (2013): 32-38.
 115. Васильева Л.А. и др. «Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции» Генетика. 33. 8 (1997): 1083-1093.
 116. Веселов Д.С. и др. «Роль гормонов в быстром ростовом ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок». Физиол. раст. 49. 4 (2002): 572–576.
 117. Войтенко Л. В., Косаківська І. В. «Поліфункціональний фітогормон абсцизова кислота». Вісник Харківського національного аграрного університету серія біологія. 1. 37 (2016): 27-41.
 118. Гаджиева, И.Х. и др. «Кросс-адаптация растений к почвенному засолению и тяжелым металлам». Экология растений. Юг России: экология, развитие. 1 (2010): 26-32.
 119. Гайченко В. А. та ін. «Мікроеволюційні зрушення в популяціях комах зони відчуження чаєс та їхні потенційні наслідки для

- агроценозів прилеглих територій». Nuclear Physics And Atomic Energy. 17. 2 (2016): 180-188.
120. Гераськин С.А. и др. «Влияние сочетанного радиоактивного и химического (тяжелые металлы, гербицид) загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя». Радиационная биология. Радиоэкология. 4 (2002):369-383.
 121. Гогоуэ Д.О. и др. «Влияние солевого стресса на рост и некоторые физиологические показатели растений рода *Nigella*». Вестник РУДН. 2 (2013): 12–19.
 122. Гродзинский Д.М. «Радиобиология растений: монография» Киев, «Наук. Думка», 1989. 384 с.
 123. Гродзинський, Д.М. та ін. «Радіобіологічні та радіоекологічні дослідження Чорнобильської катастрофи вченими НАН України». Вісн. НАН України. 6 (2012): 30-40.
 124. Гудков І. М. Сільськогосподарська радіобіологія : Навч. посіб. Житомир: ДАУ, 2003. 470 с.
 125. Давыдов М. Г. «Биологическое действие ионизирующих излучений: метод. пособие к курсу «Радиоэкология». Ростов-на-Дону, 2007. 187 с.
 126. Данилина Л.И., Фролов Д.И. «Оценка уровня загрязненности земель сельскохозяйственного назначения». Инновационная техника и технология. 3. 4 (2015): 58- 65.
 127. Деркач В., Романюк Н. Д. «Вплив засолення ґрунту на рослинні організми». Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 3-4. 67 (2016): 91-106.
 128. Діденко, Н. О. та ін. «Вплив сольового стресу на вміст у та поліфенольних сполук у *Arabidopsis thaliana*». Біологічні системи. 8. 1 (2016): 35- 39.
 129. Дмитрієв О.П. та ін. «Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія». Київ, «Паливода А.В.», 2018. 284с.

130. Иванов А. А. «Совместное действие водного и солевого стрессов на фотосинтетическую активность листьев пшеницы разного возраста». Физиология и биохимия культурных растений. 45. 2 (2013): 155-163. http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2013_45_2_9.
131. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. «Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты». Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 1. 16. (2009): 19–38.
132. Карташов, А.В. и др. «Активация некоторых защитных систем в растениях *Thellungiella halophila* при действии NaCl». Известия ПГПУ. Естественные науки. 1. 5 (2006): 57-61.
133. Кацман, Е. А. «Развитие высшей водной растительности в водоемах-охладителях АЭС» автореферат дисс. на соискание зв. кандидата биологических наук. Мсква, 2004.
134. Кириллов А.Ф., Козьмик Р.А. «Оценка содержания пролина в растениях сои при воздействии засухи и засоления». Доклады по экологическому почвоведению. 1. 18 (2013): 194-201.
135. Кнорре Д. Г. и др. «Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков». Acta naturae. 3 (2009): 32-56.
136. Козеко Л. Є. «Синтез білка теплового шоку HSP70 і алкогольдегідрогенази у листках *Arabidopsis thaliana* і *Sium sisaroides* у відповідь на затоплення ґрунту». Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія : Біологія. 3 (2017): 46-51.
137. Колодяжная Я.С. и др. «Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам. Цитология и генетика, 2, (2009). 72-93.
138. Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. «Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов». Физиология и биохимия культурных растений. 45. 2 (2013): 113-126.

139. Косаківська І.В., Голов'янюк І.В. «Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків». Український фітоценологічний збірник. 24 (2006): 3-17.
140. Косаковская И.В. «Стрессовые белки растений». Київ. «Фитосоциоцентр», 2008. 152 с.
141. Костюк А.Н., Михеев А.Н. «Проблема фенотипического стресса и адаптации у растений». Физиология и биохимия культурных растений. 2 (1997): 81-92.
142. Кравец Е.А. и др. «Структурная архитектура апикальной меристемы корня в связи с количественной оценкой степени ее радиационного поражения». Цитология и генетик. 2 (2012): 12-23.
143. Кравець О.П. та ін. «Взаємозв'язок екологічної пластичності елітних сортів озимої пшениці і поліморфізму профілів метилування ДНК у межах сорту». Наука та інновації. 12. 2 (2016): 57—67.
144. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. «Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция». Физиол. раст. 46. 2 (1999): 305–320
145. Кунах В. А. та ін. «Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин». Київ. «Логос», 2013. 299 с.
146. Ліханов А.Ф. «Аномальна мінливість рослин в умовах техногенних екосистем Донбасу» Автореферат дис. канд. біол. Наук. Дніпропетровськ, 2004.
147. Михальская С.И. и др. «Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных in-planta с использованием LBA4404, несущего pVi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы». Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 13. 3 (2013): 1662-1665.
148. Моисеева Е.М. и др. «Повышение содержания пролина в растениях кукурузы, экспрессирующих фрагмент гена пролиндегидрогеназы в

- антисмысловой ориентации». Физиология растений. 59. 3 (2012): 457—460.
149. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. «Реакція рослин гороху на дію сольового і термічного стресових факторів залежно від попереднього іонізуючого опромінення». Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 12. 1 (2018): 65–72.
 150. Нестеренко О.Г. та ін. «Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин гороху під впливом абіотичних стресових факторів». Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 74 (2018): 75-81.
 151. Нестеренко О.Г. та ін. «Зміна експресії білків під час взаємодії сигнальних систем у проростків гороху під впливом стресових факторів». Фактори експериментальної еволюції організмів. 22 (2018): 154-162.
 152. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М. «Визначення кореляції між вмістом проліну та води у коренях *Pisum sativum* L. під впливом абіотичних стресових факторів». *Biological systems*. 9. 2 (2017): 192-196.
 153. Нилова И.А. и др. «Основные этапы формирования клеточного ответа растений на высокотемпературный стресс». Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 12 (2017): 3-27.
 154. Новикова А.В., Тихоненко Д.Г. «Засоленные почвы мира, их распространение в мире, окультуривание и вопросы экологии». Харьков ХНАУ. 2004, с. 120.
 155. Пахомова, В.М., «Некоторые особенности индуктивной фазы специфического адаптационного синдрома растений». Известия РАН. Серия биологическая. 6 (1996): 705-715.
 156. Ратнер В.А. и др. «Пролонгация индукции транспозиций МГЭ после γ -облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster*». Генетика. 37. 4 (2001): 485–493.

157. Романов Г.А. «Рецепторы фитогормонов». Физиол.раст. 49. 4 (2002): 615–625.
158. Романчук Л.Д. «Радіоекологічна оцінка формування дозового навантаження у мешканців сільських територій Полісся України: монографія». Житомир, «Полісся», 2015. с. 300.
159. Сакарийаво О.С. и др. «Изменение содержания воды и пролина у разных по засухоустойчивости сортов пшеницы в ходе адаптации к водному дефициту и на этапе восстановления». Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. (2001): 89– 94.
160. Сергеева Л. Е. «Содержание свободного пролина как показатель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum* L. при стрессе». Biotechnologia Acta. 4. 4 (2011): 87-94.
161. Сергеева Л. Є. та ін. «Вміст вільного проліну в проростках кукурудзи як показник швидких реакцій на дію летальних осмотичних стресів *in vitro*» Физ. Раст и ген. 47. 6 (2015): 491-496.
162. Сергеева Л., Броннікова Л. «Пролін-опосередковані реакції тютюну на дію засолення». Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки (Ботаніка). 12 (2016): 15-19.
163. Случанко Н.Н., Гусев Н.Б. «Белки семейства 14-3-3 и регуляция цитоскелета». Успехи биологической химии. 50 (2010): 69–116.
164. Соколова Д.А., Кравец А.П. «Роль эпигенетического полиморфизма проростков кукурузы в реакциях на УФ-С облучение». Физиология растений и генетика. 46. 3 (2014): 221-229.
165. Сошинкова Т.Н. и др. «Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислитель-ном стрессе». Физиология растений. 60. 1 (2013): 47-60.
166. Стеблюк М.І «Цивільна оборона та цивільний захист : підручник Київ, 2013. 487 с.

167. Степаненко С.М. та ін. «Кліматичні зміни та їх вплив на сфери економіки України: монографія». Одеса, «ТЕС», 2015. 520с.
168. Стеценко Л. А. та ін. «Пролін захищає рослини *Atropa belladonna* від токсичного дії солей нікелю» Физиология астений. 58. 2 (2011): 275-282.
169. Тажибаева Т.Л., Масимгазиева А.С. «Свободный пролин как индикатор металлоустойчивости пшеницы». KazNu Bulletin. Ecology series. 2/2.38 (2013): 351-355.
170. Тарчевский И.А. «Сигнальные системы клеток растений» М., «Наука», 2002. 294 с.
171. Тихонова О.В. и др. «Активность гексокиназы и транскетолазы в зерне кукурузы при его прорастании в условиях водного дефицита». Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 788. 6 (2007): 182-186.
172. Трунова Т.И. «Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимиряз. Чт». М., «Наука», 2007. 54 с.
173. Франко О.Л., Мело Ф.Р. «Осмопротекторы: ответ растений на осмотический стресс». Физиология растений. 47. 1 (2000): 152-159.
174. Французова В.П. и др. «Изменения водного режима проростков пшеницы при кратковременном гипертермическом воздействии». Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. 1. 1 (2013): 136-139.
175. Хаба А. М. и др. «Экспрессионная регуляция генов малатдегидрогеназы в амаранте сорта «харьковский» при засолении». Вестник ВГУ, серия: химия. биология. Фармация. 2 (2013): 88-90.
176. Чересиз С.В. и др. «Мобильные элементы и стресс». Информ. вестник ВОГиС. 12. 1-2 (2008): 217-242.
177. Чудинова Л.А. и др. «Влияние раздельного и комбинированного действия засоления и гипертермии на полиаминсинтезирующую

- систему проростков кукурузы». Вестник Перм. ун-та. Сер. Биология. 6 (2005): 71-73.
178. Чудинова Л.А., Суворов В.И. «Роль некоторых низкомолекулярных соединений в механизме перекрестной адаптации растений». Вестник пермского университета (Биология). 1 (2011): 17-20.
179. Шанько А.В. и др. «Активность протонной помпы в растущей части корня кукурузы: корреляция с 14-3-3 белками и изменениями при осмотическом стрессе». Биохимия. 68. 12 (2003): 1639-1647.
180. Шпаков А.О. «Хемосигнальные системы растений». Цитология. 51. 9 (2009): 721-734.
181. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. «Мобільні генетичні елементи рослин». Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 8. 1 (2010): 154-164.
182. Юрченко Н.Н. и др. «Мобильные генетические элементы : нестабильность генов и геномов». Вавиловский журнал генетики и селекции. 15. 2 (2011): 261-270.
183. Яковлева В.Г и др. «Протеомный анализ салицилат-индуцированных белков из корней проростков гороха». РИО НЦРВХ СО РАМН. (2009): 538-541.

ДОДАТОК 1.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО
АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті

1. Дмитрієв О.П., Кравець О.П., Рашидов Н.М., Бубряк І.І., Гуща М.І., Данченко М.М., Соколова Д.О., Шиліна Ю.В., Бережна В.В., Бубряк О.І., Дяченко А.І., Кривохижа М.В., Літвінов С.В., Нестеренко О.Г., Сакада В.І. Епігенетичні фактори адаптації рослин. Монографія – К.: Паливода А.В. 2018. 284с.
2. Nesterenko, O. , Rashydov, N. Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation. International Journal of Secondary Metabolite. 2018.;5(2):94-108.
3. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Реакція рослин гороху на дію сольового і термічного стресових факторів залежно від попереднього іонізуючого опромінення ISSN 1996-4536 Біологічні Студії / Studia Biologica. 2018;12(1):65–72.
4. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М., Літвінов С.В.. Аналіз активності LTR-ретротранспозонів рослин гороху під впливом абіотичних стресових факторів. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2018;74:75-81.
5. Нестеренко О.Г., Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зміна експресії білків під час взаємодії сигнальних систем у проростків гороху під впливом стресових факторів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2018;22:154-162.
6. Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. Визначення кореляції між вмістом проліну та води у коренях *Pisum sativum* L. під впливом абіотичних стресових факторів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2017;2(9):192-196.

7. Rashydov N., Nesterenko O. The Problems Sustainable Remediation Of The Chernobyl Alienation Areas. Journal of Radiation Researches. Baku. 2018;5(2):13-25

Тези доповідей:

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

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

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

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

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

6. Нестеренко Е.Г., Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Сравнительный протеомный анализ реакции проростков *P. sativum* L. на действие

стрессовых факторов. У: Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України. Київ, 10 - 13 квітня 2017 р. с. 207-208.

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

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

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

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

ДОДАТОК 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ДОСЛІДЖУВАНИХ ІДЕНТИФІКОВАНИХ БІЛКІВ.

Таблиця 9.

Відомості щодо 54 білків, концентрація яких змінювалася у рослинах під дією ІВ, засолення та їх спільного впливу (достовірна відмінність однієї експериментальної групи від принаймні однієї з інших).

ID білка	Data	Accession (Ідентифікаційний номер)	Теоретичні Mr/pI	Mr/pI Експериментальні	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
p3	esi	Q9T0N0	29 / 4,5	34 / 4,9	2486	8	17,3
p4		Unknown	/	36 / 4,4			
p6		Unknow	/	36 / 4,4			
p12	malDI	reftransV2_0027314	109 / 7,0	46 / 5,0	48	2	0,9
p13		Unknow	/	39 / 4,5			
p15		Unknow	/	44 / 4,6			
p16	esi	A0A072UHR3	29 / 4,3	39 / 4,6	282	4	7,1
p18	esi	0048129_ORF4_2_434- 853	16 / 6,2	60 / 5,0	485	2	5,7
p23	esi	A0A0B2RH95	80 / 4,8	118 / 5,0	401	5	7,3
p25	esi	A0A072UTX7	66 / 4,5	125 / 4,8	617	7	7,9
p34	esi	0040373_ORF1_- 3_949-542	15 / 9,5	36 / 5,5	1831	8	31,6
p35	malDI	A0A1S3TGF1	28 / 5,7	35 / 5,6	49	2	10,5
p36	malDI	P42654	30 / 4,6	35 / 4,9	188	4	24,9
p38	esi	0059102_ORF3_1_241- 846	22 / 5,2	48 / 5,6	650	3	9,4

Таблиця 9. Продовження

ID білка	Data	Accession (Ідентифікаційний номер)	Теоретичні Mr/pI	Mr/pI Експериментальні	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
p39	esi	P52576	35 / 5,2	40 / 5,6	2273	18	44,0
p44		Unknow	/	46 / 5,2			
p48	esi	A0A0B2Q7T0	47 / 4,8	56 / 5,2	201	3	7,1
p49		Unknow	/	61 / 5,1			
p57		Unknow	/	88 / 5,2			
p58	esi	A0A072TV12	74/4,8	89 / 5,2	988	4	5,8
p64		Unknow	/	28 / 5,8			
p67		Unknow	/	35 / 5,8			
p70	esi	A0A0S3SLN1	24 / 9,5	35 / 5,5	608	2	3,4
p74	esi	K4LBQ3	18 / 5,2	46 / 5,7	380	2	9,6
p82	esi	G7IL85	42 / 5,2	51 / 5,6	4402	32	31,6
p86		Unknow	/	63 / 5,7			
p87	maldi	A0A1S2YNS0	69 / 5,1	78 / 5,6	96	5	10,1
p95	esi	B3GV28	17 / 5,5	17 / 6,1	774	2	4,9
p98	esi	P48534	27 / 5,4	20 / 6,1	3239	13	29,6
p101	maldi	P52904	39 / 5,9	30 / 6,1	106	2	9,2
p103	esi	Q40977	47 / 5,7	41 / 5,8	1306	13	38,6
p104	esi	A2Q5A8	37 / 5,7	51 / 6,1	3537	7	18,0

Таблиця 9. Продовження

ID білка	Data	Accession (Ідентифікаційний номер)	Теоретичні Mr/pI	Mr/pI Експериментальні	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
p106	esi	B7FLD9	61 / 5,3	46 / 5,6	724	3	4,3
p110	esi	B7FLD9	61 / 5,3	69 / 5,9	282	2	3,1
p118		Unknow	/	71 / 6,1			
p120		Unknow	/	29 / 5,7			
p123		Unknow	/	35 / 6,4			
p144	malDI	A0A072TRS0	27 / 10,0	42 / 6,5	134	2	10,8
p149	esi	A0A072VT43	94/5,8	47/6,0	131	4	2,6
p163	esi	A0A1S2YLD1	80 / 6,5	122 / 6,5	950	9	9,8
p164	esi	0062814_ORF1_- 3_1312-1115	7/12,0	26/6,2	625	6	12,1
p166	esi	B7FGG9	27 / 5,9	32 / 6,3	174	3	8,6
p173	esi	G7IT87	43 / 5,5	47 / 6,2	8363	24	29,4
p175	esi	A0A072TYG3	60 / 6,5	61 / 6,7	1322	12	12,6
p190	esi	A0A1S2YYS5	34 / 6,4	39 / 6,5	180	2	6,5
p197		Unknow	/	64 / 6,5			
p199	esi	A0A1J7FT66	81 / 6,3	86 / 6,6	172	2	2,7
p200	esi	A0A0K0PTC2	92 / 5,8	103 / 6,5	238	2	2,1
p202	malDI	A0A068LJH6	84 / 6,0	97 / 6,5	170	6	12,6

Таблиця 9. Продовження

ID білка	Data	Accession (Ідентифікаційний номер)	Теоретичні Mr/pI	Mr/pI Експериментальні	PLGS Score	Peptides	Coverage (%)
<i>p207</i>	esi	Q9SQF9	28 / 5,2	33 / 6,8	448	3	11,6
<i>p208</i>	esi	B7FJQ4	36 / 6,1	44 / 6,7	3138	11	21,1
<i>p215</i>		Unknow	/	85 / 6,7			
<i>p216</i>	maldi	O24470	97 / 6,1	110 / 6,7	121	4	5,3
<i>p222</i>	esi	A0A068LJH6	84 / 6,0	95 / 6,8	4884	43	25,8