

На правах рукописи



Битаришвили София Валерьяновна

**ОЦЕНКА РОЛИ ФИТОГОРМОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ
АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ СЕМЯН
ЯЧМЕНЯ**

Специальность 03.01.01 - Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Обнинск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор
Гераськин Станислав Алексеевич

Официальные оппоненты: **Рубанович Александр Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, заведующий лабораторией экологической генетики

Сарапульцева Елена Игоревна – доктор биологических наук, доцент, Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет» МИФИ», профессор отделения биотехнологий

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет почвоведения

Защита состоится «17» декабря 2019 г. в ____ час. ____ мин. на заседании диссертационного совета Д 006.068.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» по адресу: 249032, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, ФГБНУ ВНИИРАЭ, здание 1, к. 510.

Факс: (484)396-80-66. Электронная почта: rirae70@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ВНИИРАЭ, <http://www.rirae.ru> (<http://www.ds.rirae.ru/>)

Автореферат разослан «____» _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Шубина Ольга Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Особенности строения и образа жизни обусловили развитие сложного регуляторного аппарата растений, контролирующего ростовые процессы и адаптивные реакции. Фитогормоны, являясь основными эндогенными сигналами растений, контролируют их рост и развитие на всех этапах онтогенеза как в нормальных, так и в стрессовых условиях [Davies, 2004; Лутова и др., 2010; Wani et al., 2016]. С учетом роста антропогенной нагрузки регуляция адаптивных реакций растений в ответ на стресс вызывает большой интерес и на данный момент является одним из приоритетных и стремительно развивающихся направлений биологии растений. Формирование адаптивных реакций растений на стресс является сложным комплексным процессом, вызывающим изменения на всех уровнях организации. Ключевая роль в этих процессах отводится гормональной системе. Изменяя баланс фитогормонов, растение регулирует биохимические и морфофизиологические процессы, изменение структуры и функции клеток [Bahin et al., 2011; Peleg, Blumwald, 2011]. Сильное стрессовое воздействие приводит к угнетению метаболизма и развитию патологических процессов. Слабый стресс запускает адаптивные реакции, в результате которых происходит усиление восстановительных процессов и сверхактивация метаболизма, что приводит к интенсификации роста и развития растений [Calabrese, Blain, 2009; Петин, Пронкевич, 2012]. Изучение реакций гормональной системы растений на действие слабых стрессоров важно для понимания природы адаптивных реакций и открывает пути управления процессами роста и развития культурных растений. Неспецифические реакции растений наблюдаются при действии стрессоров разной природы: химических, физических, биологических. γ -излучение является удобным инструментом для изучения адаптивных реакций, к преимуществам которого относят точность дозирования и изученность механизмов взаимодействия излучения с веществом.

Ионизирующее излучение (ИИ) успешно применяют в разных сферах человеческой деятельности, в том числе и в сельском хозяйстве. В растениеводстве распространение получила идея применения ИИ с целью интенсификации роста и развития растений при предпосевном облучении семян. В основе агроприема лежит явление радиационного гормезиса, которое заключается в стимуляции развития растений низкими дозами ИИ, в то время как большие дозы ведут к ингибированию ростовых процессов. Исследования действия низких доз ИИ могут создать базу для нового витка развития биотехнологий, направленных на создание высокопродуктивных и стрессоустойчивых сортов культурных растений. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью внедрения эффективных и безопасных технологий, направленных на увеличение производства продукции сельского хозяйства и улучшения ее качества, что является одной из важнейших задач обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации [Козьмин и др., 2015].

Несмотря на многолетние исследования, до сих пор не до конца понятны механизмы стимуляции физиологических процессов с помощью ИИ. В отечественной и зарубежной литературе накоплено много данных о действии низких доз радиации на семена [Кузин, 1972; Гродзинский, 1989; Гудков, 1991; Luckey, 1991; Calabrese, Baldwin, 2000; Baldwin, Grantham, 2015]. Однако недостаточно внимания было уделено роли фитогормонов в формировании адаптивных реакций, несмотря на то, что они играют ключевую роль в этих процессах. Таким образом, оценка роли гормональной системы в формировании адаптивных реакций после γ -облучения семян представляется важным и актуальным направлением исследований.

Степень разработанности проблемы. Первые исследования биологических эффектов ИИ на растения, в том числе на семена, были проведены сразу после открытия рентгеновских лучей. В ранних экспериментах было обнаружено, что ИИ в низких дозах ускоряет прорастание семян. В середине прошлого века значительные усилия были направлены на изучение стимулирующего действия ИИ, что было обусловлено задачей внедрения технологии предпосевного облучения в сельское хозяйство. Большой вклад в разработку данного вопроса и развитие радиобиологии растений в целом внесли такие ученые, как Л.П. Бреславец [Бреславец, 1946], Н.В. Тимофеев-Ресовский [Тимофеев-Ресовский, Порядкова, 1956], А. Сперроу [Sparrow et al., 1961], И.М. Васильев [Васильев, 1962], Н.М. Березина [Березина, 1964], Н.Ф. Батыгин [Батыгин, Савин, 1966], Е.И. Преображенская [Преображенская, 1971], А.М. Кузин [Кузин, Каушанский, 1981]. Было показано, что предпосевное облучение семян в низких дозах ускоряет прорастание, стимулирует рост и развитие проростков, увеличивает качественные и количественные характеристики урожая. Внедрение перспективного агроприема в перечень технологий, применяемых в сельском хозяйстве, осложнялось слабой воспроизводимостью эффекта стимуляции в полевых условиях [Гродзинский, 1989; Гудков, 1991].

Развитие физиологии растений, представлений о физиологических и биохимических процессах, протекающих в растениях, а также молекулярных методов исследования определили более глубокое изучение закономерностей действия ИИ, в том числе в низких дозах, на семена, и выявление ведущих процессов, приводящих к формированию адаптивных реакций.

Ключевую роль в стимуляции ростовых процессов ИИ многие ученые отводят фитогормонам [Кузин, 1977; Latif et al., 2011; Mounir et al., 2015; Михеев, 2015]. В первых работах по изучению гормональной системы растений в ответ на ИИ [Skoog, 1935; Gordon, Webber, 1955] было показано, что изменения содержания фитогормонов происходят за счет изменения биосинтеза их предшественников, что впоследствии было подтверждено в современных исследованиях [Кожокару, Ревин, 2010].

На начальных этапах прорастания семени особое внимание уделяют гиббереллинам, выполняющим роль триггера в процессах синтеза α -амилазы. Большие дозы ИИ снижают уровни гиббереллинов, в то время как низкие дозы способствуют их накоплению и, соответственно, стимулируют прорастание [Гребинский и др., 1973; Кузин, Каушанский 1977; Kim et al., 2012].

Изменение морфогенетических процессов является следствием изменения многих биохимических процессов и показателей функционального состояния растения, в том числе фитогормонального баланса. Показано, что γ -облучение в низких дозах приводит к увеличению содержания таких классов фитогормонов как ауксины, цитокинины, гиббереллины и снижает концентрации абсцизовой кислоты (АБК) [El-Hamid, 2003; Latif et al., 2011; Soliman, Abou El-Yazied, 2011; Mounir et al., 2015]. Работ по изучению роли гормональной системы растений в формировании ответных реакций к слабым внешним воздействиям крайне мало, к тому же недостаточное внимание уделено начальным этапам развития растений, которые определяют последующий ход онтогенеза. Совершенствование методов молекулярной биологии дает возможность перейти на качественно новый уровень исследований, который поможет выявить новые аспекты адаптивных реакций на стресс, а так же теоретически обосновать механизмы радиационной стимуляции роста и развития растений.

Цель диссертационной работы: оценка роли гормональной системы и ее регуляции в формировании адаптивных реакций при γ -облучении семян ячменя.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Оценить влияние γ -облучения семян ячменя в широком диапазоне доз на содержание основных классов фитогормонов и их соотношение в разных органах проростков.
2. Выявить взаимосвязь изменений в гормональной системе с морфофизиологическими параметрами облученных растений ячменя.
3. Проанализировать изменения транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты метаболизма гиббереллинов и АБК в зародышах в первые 30 часов прорастания после облучения в широком диапазоне доз.

Научная новизна. Научную новизну работы определяет использование современных подходов и точных методов исследования, а также постановка задач, направленная на выявление молекулярных механизмов формирования адаптивных реакций растений на облучение. Впервые исследовано содержание основных классов фитогормонов и их соотношение в разных органах проростков ячменя в динамике прорастания с 3-х по 7-е сутки после γ -облучения семян. Использование метода ВЭЖХ позволило проводить анализ всех фитогормонов в одной пробе, что увеличило точность оценки их соотношения. Показано, что облучение семян в низких дозах приводит к сдвигам в фитогормональном балансе проростков ячменя: накоплению фитогормонов, стимулирующих рост: индолилуксусной кислоты (ИУК), индолилмасляной кислоты (ИМК), зеатина и снижению содержания АБК, которая выступает в качестве их антагониста. Применение ингибирующей развитие семян дозы приводит к противоположному эффекту. Впервые выявлены различия в накоплении фитогормонов в разных органах проростков ячменя после γ -облучения.

Впервые исследована транскрипционная активность генов ферментов метаболизма гиббереллинов и АБК в зародышах γ -облученных семян ячменя в

первые 30 часов прорастания. Показано, что выявленные изменения экспрессии генов метаболизма фитогормонов в диапазоне стимулирующих доз могут привести к увеличению содержания гиббереллинов и снижению содержания АБК, тем самым обусловив увеличение потенциала для роста и развития проростков.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты анализа изменений в гормональной системе ячменя и ее регуляции, вызванных γ -облучением семян, дополняют систему фундаментальных представлений о природе адаптивных реакций растений и вносят вклад в развитие биологии растений. Полученные результаты имеют важное значение для развития теоретических основ радиобиологии растений и понимания механизмов формирования адаптивных реакций при облучении в низких дозах. Практическая значимость связана с разработкой научных основ экологически безопасной и экономически выгодной технологии предпосевной обработки семян, обеспечивающей улучшение качественных и количественных характеристик урожая.

Методология и методы исследования. Экспериментальная работа проводилась с 2014 по 2018 годы в лаборатории радиобиологии и экотоксикологии растений ФГБНУ ВНИИРАЭ.

В качестве объекта исследования использовали ячмень яровой, повсеместно возделываемую сельскохозяйственную культуру и хорошо изученный биологический объект. Облучение проводили на γ -установке ГУР-120 с источником излучения ^{60}Co (ФГБНУ ВНИИРАЭ, Обнинск). Для исследования была модифицирована и апробирована методика анализа основных классов фитогормонов в одной пробе методом ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования. Качественное и количественное определение фитогормонов в проростках ячменя проводили с 3-х по 7-е сутки прорастания на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-30 Nexera (Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu). Многоэтапная пробоподготовка включала твердофазную экстракцию на приборе VacMaster-20 ("Biotage", Норвегия). Для определения уровня транскрипционной активности генов в зародышах семян в первые 30 ч прорастания использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-Технология).

Положения, выносимые на защиту.

1. Установлены новые закономерности влияния γ -облучения семян ячменя на гормональную систему растений. γ -облучение семян ячменя приводит к сдвигам в фитогормональном балансе в разных органах проростков.
2. Стимуляция роста и развития растений ячменя, выросших из облученных низкими дозами семян, сопряжена с изменениями содержания основных классов фитогормонов.
3. На начальных этапах прорастания облученных семян ячменя (0-30 ч) изменяется транскрипционная активность генов биосинтеза и катаболизма гиббереллинов и абсцизовой кислоты.

4. Гормональная система и ее регуляция играют важную роль в формировании адаптивных реакций растений ячменя на радиационное воздействие на ранних этапах онтогенеза.

Достоверность результатов обеспечена корректным подбором современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам и большим объемом экспериментальных данных. Анализ экспериментальных данных проводили, используя непараметрическую статистику с помощью средств MS Excel и STATISTICA. Экспериментальные данные были проверены с помощью критерия Диксона на наличие выбросов, которые исключали из дальнейшего анализа. Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Влияние облучения на изменения транскрипционной активности генов оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные результаты, научная новизна, цели и задачи диссертации соответствуют формуле специальности 03.01.01 «Радиобиология», в рамках которой исследуется взаимодействие радиации с веществом, первичные и последующие механизмы лучевых нарушений, прямые и непрямые эффекты (п.2); молекулярно-клеточные и биохимические механизмы лучевого поражения (п.3); основы действия излучений на ДНК, механизмы гормезиса (п.4); особенности биологического действия низких доз облучения (п.11).

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на: 18-ой и 20-ой Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых (Пущино, 2014, 2016); международной научной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015» (Москва, 2015); 4th Young Environmental Scientific Meeting (Serbia, 2015); 8-м съезде общества физиологов растений России (Петрозаводск, 2015); молодежной конференции, посвященной 45-летию образования ФГБНУ ВНИИРАЭ «Взгляд молодых ученых на современные проблемы развития радиобиологии и радиационных технологий» (Обнинск, 2016); международной научной конференции «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (С.-Петербург, 2016); молодежном круглом столе «Современные проблемы радиобиологии и радиозологии», в рамках XLVI международных радиозологических чтений, посвященных действительному члену ВАСХНИЛ В.М. Ключковскому (Обнинск, 2017); международной научно-практической конференции «Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: состояние и перспективы» (Обнинск, 2018); XIV международной молодежной научно-практической конференции «БУДУЩЕЕ АТОМНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ – AtomFuture 2018» (Обнинск, 2018); FAO/IAEA International symposium on Plant mutation breeding and biotechnology (Vienna, 2018), российской конференции с международным участием «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019).

Результаты исследования были использованы при выполнении проекта,

поддержанного Российским научным фондом «Анализ механизмов адаптации популяций растений к техногенному воздействию» (№ 14-14-00666).

Личный вклад диссертанта в работу заключается в участии в постановке целей и задач исследования, разработке теоретических и экспериментальных методов достижения поставленных целей, выполнении исследований на всех этапах. Автор выполнила самостоятельно экспериментальную работу по определению основных классов фитогормонов и по исследованию транскрипционной активности генов метаболизма фитогормонов. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка данных и интерпретация результатов. Автор принимала активное участие в написании статей, в формулировке положений и выводов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертационной работы. Работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 245 источников, из которых 202 на иностранном языке. Диссертация изложена на 139 страницах, содержит 11 таблиц и 36 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы основные цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Глава 1. Обзор литературы

На основе анализа отечественной и зарубежной литературы рассмотрены закономерности формирования радиобиологических эффектов у растений на разных уровнях организации. Освещены особенности действия облучения семян в низких дозах на рост и развитие растений на ранних фазах онтогенеза. Обсуждается роль фитогормонов в процессах прорастания семян, роста и развития растений. Показаны пробелы в современных знаниях о биохимических и молекулярно-генетических процессах, ответственных за изменение функциональных систем растений и их генетической регуляции в условиях действия низких доз излучения.

Глава 2. Материалы и методы

В качестве **объекта исследования** был выбран ячмень яровой (*Hordeum vulgare* L.), являющийся важной сельскохозяйственной культурой и хорошо изученным биологическим объектом. В экспериментах использовали семена ячменя сорта Нур урожая 2013-2017 гг.

Облучение семян воздушно-сухих проводили на гамма-установке ГУР-120 с источником излучения ^{60}Co (ВНИИРАЭ, Обнинск). Дозу излучения оценивали с помощью дозиметра ДКС-101 (Россия). Мощность дозы регулировали расстоянием от источника излучения, во всех экспериментах она была одинакова – 60 Гр/час. Диапазон доз 4-50 Гр. Сразу после облучения семена замачивали в рулонах из фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки по 100 семян в каждом рулоне

согласно [ГОСТ 12038-84] и рекомендациям Р.С. Бабаян [Бабаян, 2002]. Рулоны сворачивали, ставили в стаканы с дистиллированной водой и помещали в термостат MIR-254 (Sanyo, Япония) при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ без освещения.

Анализ содержания основных классов фитогормонов проводили в одной пробе методом ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования менее чем за один час (методика Ma at al., 2008, с модификациями). Определение фитогормонов проводили с 3-х по 7-е сутки прорастания. На 3-и сутки использовали проростки целиком, начиная с 4-х суток, проростки делили на побеги и корни и анализировали отдельно.

Навеску растительного материала массой 1 г гомогенизировали в охлажденном ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) подкисленном до pH 3.5 80 % метаноле (HPLC Gradient Grade, T.J. Baker, Нидерланды). Для уменьшения окислительной деградации фитогормонов во время экстракции добавляли антиокислители этилендиаминтетрауксусную кислоту и 2-меркаптоэтанол. После этого суспензию подвергали ультразвуковой обработке (Sonopuls mini20 (BANDELIN, Германия)). Во избежание нагрева при соникации стаканчик с суспензией помещали в емкость со льдом. После обработки суспензию переносили в три пробирки объемом 1.5 мл с помощью пипетки и помещали в холодильник на мини-шейкер 3D типа «Sunflower» (Biosan, Латвия) на 30 минут. Через 30 минут суспензию центрифугировали 5 минут при 14 500 об/мин на мини-центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия), надосадочную жидкость отделяли и помещали в холодильник. Осадок ресуспендировали в 1 мл подкисленного до pH 3.5 80 % холодного метанола и проводили повторную экстракцию в тех же условиях. Полученный осадок отбрасывали, супернатанты объединяли.

Твердофазную экстракцию (неудерживающую) проводили на приборе VacMaster-20 (Biotage, Норвегия) с использованием SPE колонок Biotage – ISOLUTE C18 (1 мл). Очищенный экстракт выпаривали на водяной бане 7 минут при температуре $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Условия ВЭЖХ. Идентификацию и количественный анализ фитогормонов в экстрактах проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-30 Nexera (Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu). 10 мкл экстракта вводили в аналитическую колонку с обращенной фазой C18 (Shim-pack XR-ODSII, 2 мкм, диаметр 3.0 мм, длина 100 мм, Shimadzu). Начальные условия: растворитель (А) – метанол; растворитель (В) - 0.1 % раствор уксусной кислоты (10:90). Скорость потока – 0.3 мл/мин в течение всего времени разделения. Для разделения четырех фитогормонов менее чем за один час были подобраны оптимальные условия градиентного элюирования. Анализ проводили в трех повторностях, каждый образец анализировали дважды. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu). Для идентификации и количественного анализа применяли метод внешних стандартов, основанный на соотношении пиков проб и стандартов. Для построения калибровочных графиков использовали стандарты фитогормонов (Sigma-Aldrich, США).

Всего было проанализировано 486 хроматограмм и обработано 1944 хроматографических пика. Для постановки и апробации методики исследовано 152 хроматограммы.

Анализ экспрессии генов фитогормонов методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для исследования использовали воздушно-сухие семена и после проращивания в рулонах с дистиллированной водой (время проращивания 6, 12, 18, 24 и 30 ч). Из 20 семян извлекали зародыши и гомогенизировали в жидком азоте. Выделяли РНК при помощи набора NucleoSpin TriPrep фирмы Macherey-Nagel. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли при помощи набора реактивов MMLV RT Kit фирмы Евроген. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли спектрофотометрическим (NanoDrop) и флуориметрическим (Qubit 2.0) методом.

Генами интереса в данной работе выступали гены, кодирующие ферменты биосинтеза АБК 9-цис-эпоксидкаратиноид-диоксигеназа (*HvNCED1*), катаболизма АБК-8'-гидроксилаза (*HvABA8'OH-1*), биосинтеза гиббереллинов GA3-оксидаза (*HvGA3ox2*) и катаболизма гиббереллинов GA2-оксидаза (*HvGA2ox3*). В качестве референтного гена был выбран ген *18SrRNA*, кодирующий 18S-субъединицу рРНК.

Определение уровня транскрипционной активности генов проводили на амплификаторе ДТ-96 фирмы ДНК-Технология. Реакционные смеси готовили на основе набора реактивов HS TaqDNA Polymerase dNTP mix фирмы Евроген. Для детекции накопления продуктов ПЦР использовали флюоресцирующий краситель SYBR Green I фирмы Lumiprobe.

Все реакции проводили в трех повторах (триплетах) для каждой матрицы кДНК, каждую повторность анализировали трижды. Для исследования было проведено 3096 реакций.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с помощью программ Microsoft Office Excel 2003 и STATISTICA 6.0. Экспериментальные данные были проверены с помощью критерия Диксона на наличие выбросов, которые исключали из дальнейшего анализа. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Влияние облучения на изменения транскрипционной активности генов оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Для выявления зависимости исследованных параметров от дозы или от морфологических параметров использовали коэффициент корреляции Спирмена.

Глава 3. Результаты

Влияние γ -облучения семян ячменя на эндогенное содержание ИУК. В 3-х дневных проростках, выросших из облученных семян, эндогенное содержание ИУК было статистически значимо увеличено при всех дозах облучения (рис. 1). Максимальные концентрации, превышающие контрольные значения в 10 раз, были

зафиксированы при дозах 8 и 16 Гр. В побегах с 4-х по 7-е сутки прорастания увеличение концентраций фитогормонов отмечалось лишь при некоторых дозах (рис. 2). В корнях экспериментальных проростков с 5 дня прорастания уровни гормона были повышены при всех использованных стимулирующих дозах (4-20) (рис. 3).

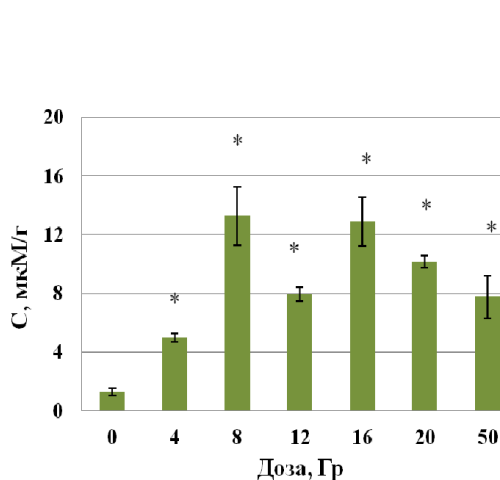


Рисунок 1 – Содержание ИУК в 3-х дневных проростках

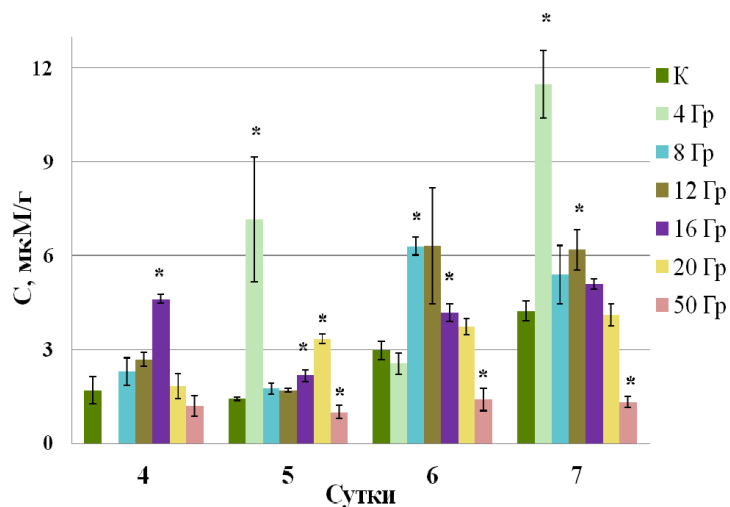


Рисунок 2 – Содержание ИУК в побегах

* - Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями, $p < 0.05$, U-тест Манна-Уитни. Верно для всех последующих рисунков.

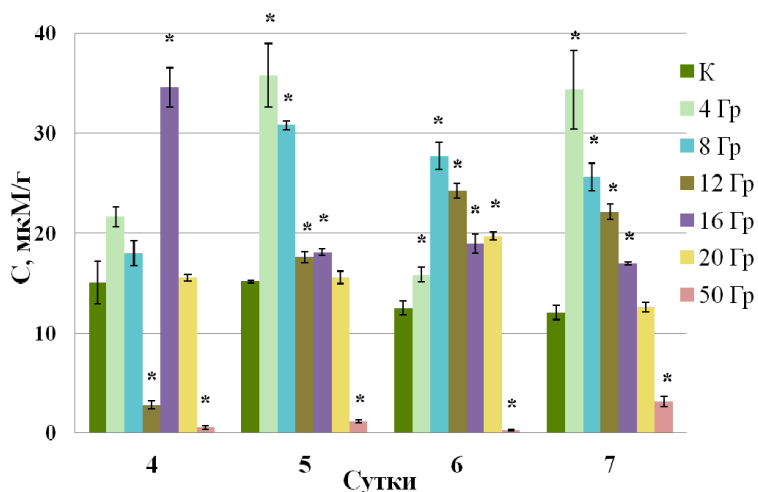


Рисунок 3 – Содержание ИУК в корнях

На 7-е сутки в корнях наблюдалась отрицательная линейная зависимость концентрации от дозы ($r = -0.913$, $p < 0.05$). Ингибирующая рост доза 50 Гр вела к существенному снижению концентраций ИУК как в побегах, так и корнях начиная с 4-х суток прорастания.

Влияние γ -облучения семян ячменя на эндогенное содержание ИМК.

На 3 день содержание ИМК снизилось при дозах 16 и 50 Гр (рис. 4). В побегах концентрации фитогормона при облучении семян дозами 4-20 Гр статистически значимо превышали контрольный уровень с 4-х по 7-е сутки прорастания, кроме 5-х и 6-х при 12 Гр (рис. 5). Максимальные значения концентраций зафиксированы на 4-е и 5-е сутки при дозе 16 Гр, на 6-е при 8 Гр, на 7-е при 4 Гр. На 7-е сутки прорастания наблюдалась отрицательная линейная зависимость концентрации ИМК в побегах от дозы ($r = -0.917$, $p = 0.01$).

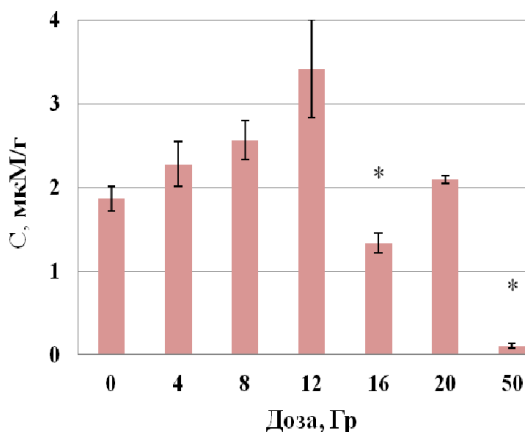


Рисунок 4 –Содержание ИМК в 3-х дневных проростках

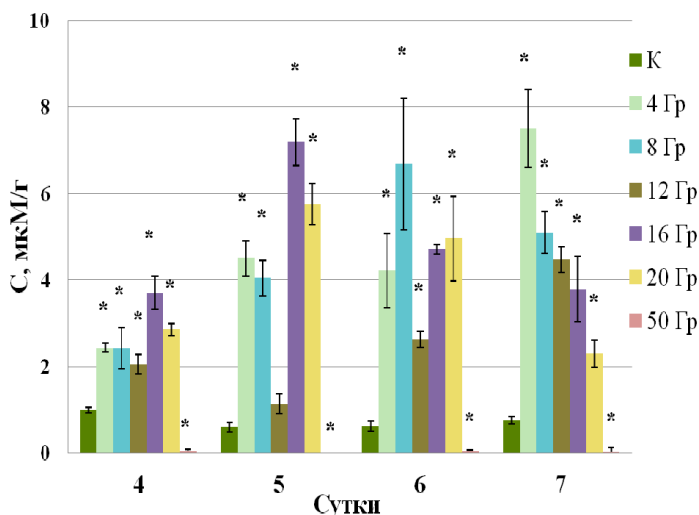


Рисунок 5 – Содержание ИМК в побегах

Содержание ИМК в корнях проростков (рис. 6), выросших из контрольных семян, превышало содержание гормона в побегах (рис. 5), в то время как в облученных растениях эта зависимость менялась на противоположную.

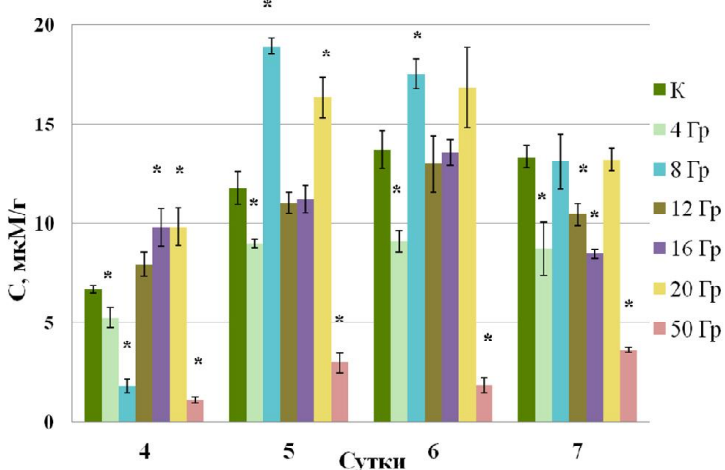


Рисунок 6 – Содержание ИМК в корнях

В корнях наблюдалась большая вариабельность концентраций фитогормона, в том числе и снижение, устойчивая зависимость от дозы отсутствовала.

При облучении семян в ингибирующей дозе 50 Гр в корнях и побегах проростков наблюдали снижение уровня ИМК (рис. 5, 6).

Влияние γ -облучения семян ячменя на эндогенное содержание зеатина.

Облучение семян в стимулирующих дозах приводило к статистически значимому увеличению уровней зеатина в 3-х дневных проростках (рис. 7), а так же в побегах (рис. 8) и корнях (рис. 9) с 4-х по 7-е сутки прорастания.

В интактных проростках зеатин преимущественно накапливался в корнях (рис. 9), при этом в побегах (рис. 8) на 4-е и 5-е сутки проращивания концентрации фитогормона были ниже уровня детектирования. В результате облучения наблюдалось существенное увеличение уровней гормона. Максимальное значение, превышающее контроль более чем в 100 раз, зафиксировано при 8 Гр на 6-е сутки.

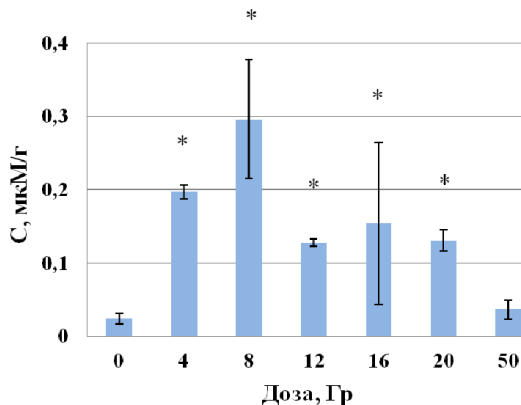


Рисунок 7 – Содержание зеатина в 3-х дневных проростках

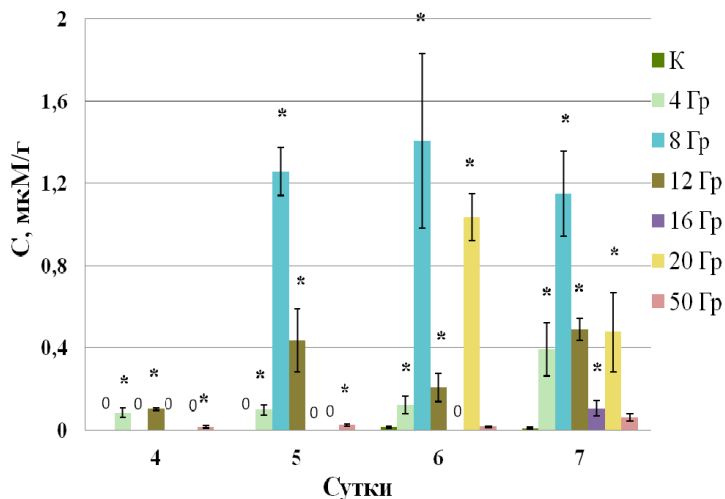


Рисунок 8 – Содержание зеатина в побегах

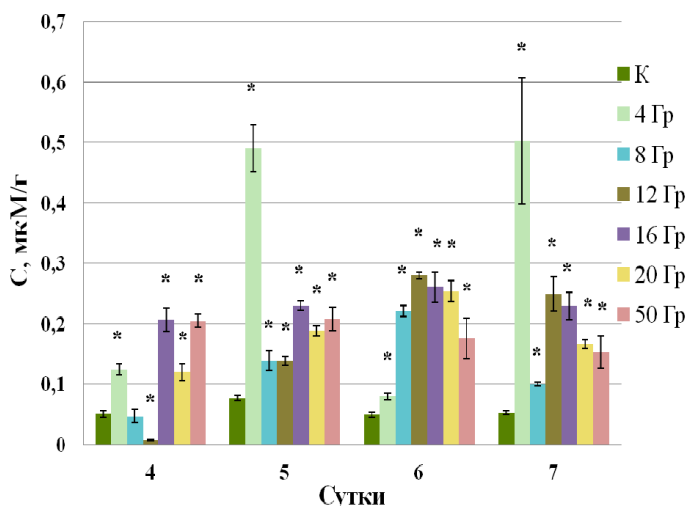


Рисунок 9 – Содержание зеатина в корнях

Следует отметить, что динамика содержания зеатина после облучения наименьшей дозой существенно отличалась от динамики накопления фитогормона при больших дозах. При 4 Гр наблюдали резкие изменения концентраций в процессе прорастания с максимумами на 5-е и 7-е сутки эксперимента, в то время как при дозах 8, 12, 16, 20 и 50 Гр изменение содержания фитогормона было плавным, с небольшими колебаниями концентраций.

Влияние γ -облучения семян ячменя на эндогенное содержание АБК. Содержание АБК после облучения семян в стимулирующих дозах в 3-х дневных проростках (рис. 10), в побегах (рис. 11) и корнях (рис. 12) с 4-х по 7-е сутки прорастания было преимущественно сниженным.

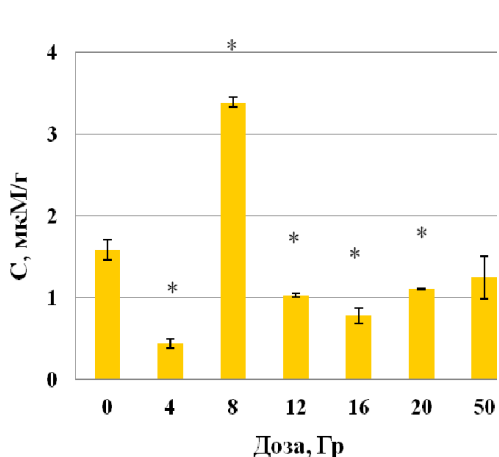


Рисунок 10 – Содержание АБК в 3-х дневных проростках

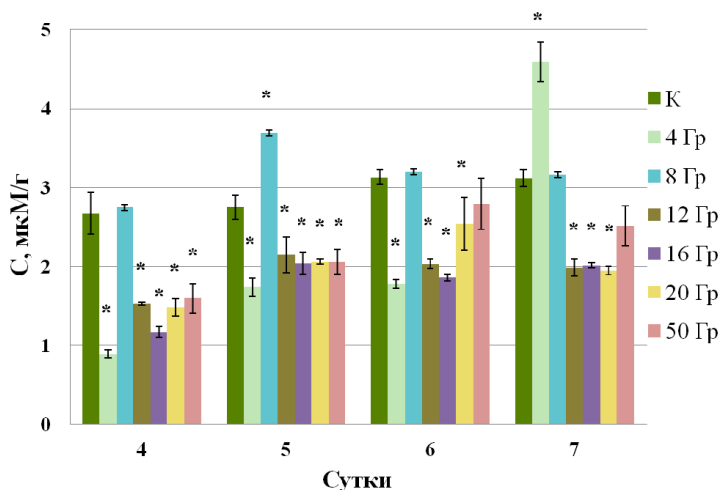


Рисунок 11 – Содержание АБК в побегах

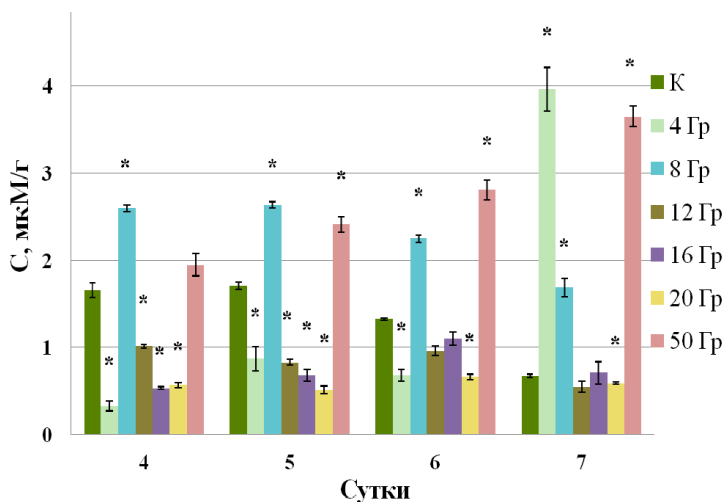


Рисунок 12 – Содержание АБК в корнях

Исключение составляли доза 4 Гр на 7-е сутки и 8 Гр на всех этапах эксперимента, где отмечалось значимое повышение концентраций фитогормона или отсутствие отличий относительно контроля. Облучение семян в ингибирующей рост дозе 50 Гр приводило к увеличению содержания АБК в корнях проростков. Причем с увеличением времени прорастания уровни фитогормона росли.

Влияние γ -облучения семян ячменя на соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК. В проростках ячменя на 3-и сутки значения соотношения (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК были выше контрольного уровня при всех использованных дозах, максимумы фиксировали при 4 и 16 Гр (табл. 1). При этих же дозах значения были максимальными в корнях на 4-е сутки прорастания и превышали контроль примерно в 6 раз, однако в последующие дни эксперимента наблюдалось снижение исследуемого параметра. В побегах значения соотношения превышали контрольный уровень при всех стимулирующих дозах облучения. На 4-е сутки прорастания максимальное значение, превышающее контроль в 7 раз было выявлено при 16 Гр, на 5-е сутки при дозе 4 Гр в 9 раз. Применение ингибирующей рост дозы приводило к противоположному эффекту – снижению значений соотношения относительно контроля в побегах и корнях проростков.

Таблица 1. Влияние γ -облучения на соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК в проростках (пр), побегах (поб) и корнях (к) с 3-х по 7-е сутки проращивания

Сутки	Локализация	Доза, Гр						
		Контроль	4 Гр	8 Гр	12 Гр	16 Гр	20 Гр	50 Гр
3	пр	2.013	16.887	4.762	11.150	18.340	11.094	6.307
4	поб	1.005	2.827	1.718	3.164	7.118	3.165	0.783
	к	13.116	82.689	7.646	10.605	83.308	44.924	0.960
5	поб	0.733	6.764	1.906	1.518	4.587	4.412	0.502
	к	15.821	52.134	18.919	34.625	43.345	62.090	1.814
6	поб	1.154	3.871	4.495	4.501	4.780	3.818	0.518
	к	19.810	36.759	20.221	38.965	29.758	55.585	0.842
7	поб	1.601	4.214	3.675	5.620	4.460	3.530	0.558
	к	37.750	10.996	22.996	59.337	36.315	44.003	1.902

Влияние γ -облучения семян на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма фитогормонов. Результаты анализа транскрипционной активности каждого исследуемого гена в отдельности представлены подробно в тексте диссертационной работы. Изменения генной экспрессии наблюдались на всех этапах,

даже в зародышах сухих семян. Для улучшения интерпретации результатов были проанализированы соотношения транскрипционных активностей генов катаболизма и синтеза гиббереллинов *HvGa3ox2/HvGa2ox3* (рис. 13) и АБК *HvABA8'OH-1/HvNCED1* (рис. 14).

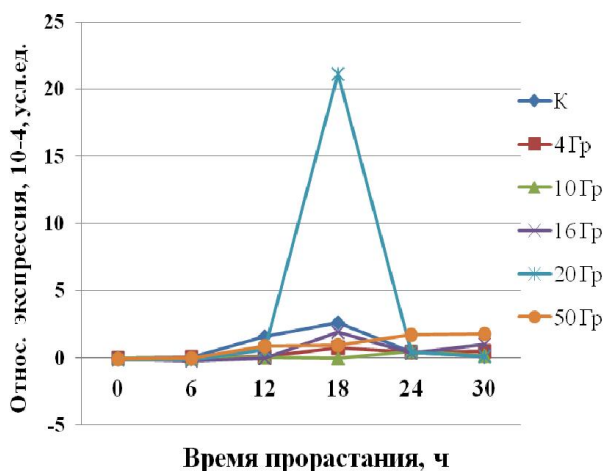


Рисунок 13 – Соотношение транскрипционной активности генов *HvGa3ox2/HvGa2ox3*

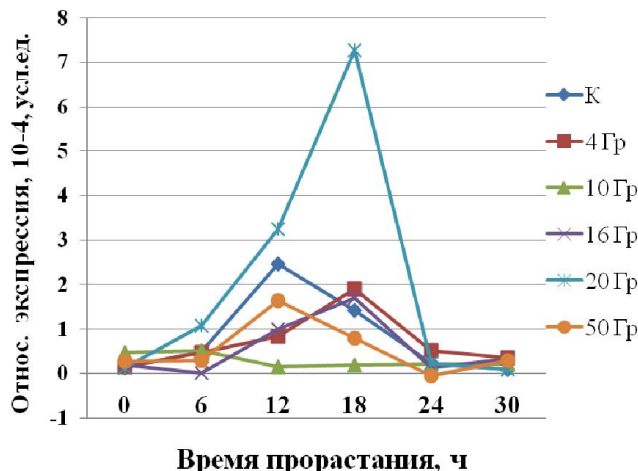


Рисунок 14 – Соотношение транскрипционной активности генов *HvABA8'OH-1/HvNCED1*

Облучение в дозе 20 Гр после 18 часов прорастания резко сдвигает соотношение в сторону гена *HvGa3ox2*, что подразумевает преобладание синтеза гиббереллинов над катаболизмом (рис. 13). Также можно отметить, что облучение в ингибирующей рост дозе 50 Гр не приводит к активации катаболических процессов, даже наоборот, после 24 и 30 часов транскрипционная активность гена синтеза была выше, чем транскрипционная активность гена катаболизма.

Соотношение транскрипционной активности генов метаболизма АБК *HvABA8'OH-1/HvNCED1* (рис. 14) указывает на преобладание процесса катаболизма АБК над биосинтезом, и, соответственно, на снижение концентраций АБК при облучении в дозе 20 Гр в период 6-18-й час прорастания, особенно ярко это выражено на 18-й час прорастания, где отмечается пиковое значение, превышающее контрольное в 3 раза.

С целью определения вклада облучения в изменение транскрипционной активности генов на каждом этапе прорастания был использован критерий Краскела-Уоллеса (межгрупповые различия статистически значимы при $p < 0.05$) (табл. 2).

Результаты показали, что облучение вносит существенный вклад в изменение транскрипционной активности генов на всех этапах прорастания, за исключением 24 часов и 12 часов для гена *HvGa2ox3*.

Результаты показали, что облучение вносит существенный вклад в изменение транскрипционной активности генов на всех этапах прорастания, за исключением 24 часов и 12 часов для гена *HvGa2ox3*.

Таблица 2. Оценка вклада облучения в изменение транскрипционной активности генов в пределах одного этапа прорастания семян.

Ген	Критерий Краскела-Уоллиса, <i>p</i> -value					
	0	6	12	18	24	30
<i>HvGa3ox2</i>	0.007	0.039	0.054	0.0003	<u>0.247</u>	0.0002
<i>HvGa2ox3</i>	0.001	0.009	<u>0.097</u>	0.0001	<u>0.127</u>	0.012
<i>HvNCED1</i>	0.054	0.017	0.0003	0.0004	0.0001	0.007
<i>HvABA8'OH-1</i>	0.020	0.054	0.007	0.001	<u>0.156</u>	0.007

Подчеркнуты статистические незначимые отличия ($p > 0.05$).

Глава 4. Обсуждение

Важной задачей радиобиологии является расшифровка механизмов ответных реакций растений на действие ИИ. Особый интерес представляют эффекты низкодозового облучения, недостаточного для гибели растения или серьезных нарушений развития, но достаточного для формирования адаптивных реакций. В процессе адаптации растение запускает комплекс биохимических и физиологических программ, направленных на противодействие влиянию стрессора и повышение устойчивости. Вследствие этого может наблюдаться сверхадаптация, проявляющаяся в стимуляции роста и развития растения [Wiegant et al., 2013].

γ -Облучение семян ячменя сорта Нур стимулирующими дозами (4-50 Гр) приводило к увеличению размеров корня и побегов за счет увеличения темпов развития проростков [Гераськин и др., 2015]. Возникает вопрос, за счет каких механизмов происходят наблюдаемые в эксперименте изменения? Наиболее вероятно данное явление может быть связано с действием излучения именно на гормональную систему растений.

Анализ содержания фитогормонов. Все процессы жизнедеятельности растений, включая адаптивные реакции, находятся под контролем гормональной системы. Изменяя метаболизм фитогормонов, растение приспосабливается к условиям окружающей среды. Соотношение гормонов-антагонистов в тех или иных процессах указывает на функциональное состояние растения, определяющее его рост и развитие. Описанные результаты изменения в содержании фитогормонов и их соотношении могут определять наблюдавшиеся в работе [Гераськин и др., 2015] морфологические эффекты. Этот вывод подтверждают результаты корреляционного анализа содержания основных классов фитогормонов и показателей длины корешков и побегов. Обнаружена положительная корреляция между концентрациями зеатина в побегах на 7-е сутки прорастания и длиной побегов ($r = 0.86$, $p > 0.05$), содержанием зеатина в побегах на 6-е сутки с тем же показателем ($r = 0.70$, $p > 0.05$). Длина побегов на 7-е сутки прорастания положительно коррелировала с содержанием ИМК на 6-е сутки ($r = 0.82$, $p > 0.05$) и на 7-е сутки ($r = 0.94$, $p < 0.05$). Коэффициент корреляции между содержанием ИУК в 6-ти дневных побегах и длиной побегов на 7-е сутки был равен 0.69 ($p > 0.05$). Выявленные связи указывают на важную роль изменений

фитогормонального баланса в формировании стимулирующего эффекта облучения семян ячменя малыми дозами ИИ.

Анализ ауксинов. Увеличение содержания ауксинов в ответ на облучение указывает на активацию роста и развития проростков ячменя за счет роста растяжением («кислый рост»), стимуляции закладки боковых и придаточных корней, а также латеральных органов в апикальной меристеме побега. Характер накопления ауксинов в проростках ячменя был различен: ИУК увеличивалась преимущественно в трехдневных проростках (рис. 1) и в корнях с 4-х по 7-е сутки проращивания (рис. 3), в то время как ИМК в основном накапливалась в побегах (рис. 5). Такое распределение ауксинов может быть обусловлено активацией синтеза этих фитогормонов в разных органах растения, в результате чего формируются условия, стимулирующие его рост. Наряду с увеличением содержания ИМК в побегах при облучении семян стимулирующими дозами, в корнях наблюдали пониженные концентрации этого фитогормона, что, возможно, свидетельствует об ослаблении базипетального транспорта.

Наблюдавшееся в эксперименте уменьшение содержания ауксинов, особенно в корнях, при облучении дозой 50 Гр указывает на ингибирование корневой системы и нарушение гравитропизма и может быть связано как с подавлением их биосинтеза, так и с усилением их метаболической деградации. Интересно отметить, что облучение в дозе 50 Гр по-разному влияло на содержание ауксинов – содержание ИМК было сильно снижено на всем протяжении эксперимента во всех органах проростков (рис. 4-6), концентрации ИУК снижались в побегах и корнях (рис. 2, 3), в то время как в 3-х дневных проростках значимо превышали контроль (рис. 1). Это может свидетельствовать о том, что в ранний период в результате облучения активируется образование ИУК из ИМК. Известно, что ИМК может служить запасной формой ИУК [Ludwig-Müller, Epstein, 1991].

Анализ зеатина. Полученные результаты, демонстрирующие значительное увеличение содержания фитогормона в проростках ячменя после γ -облучения семян, подтверждают литературные данные об участии цитокининов в адаптивных реакциях растений. Распределение зеатина в проростках говорит об активации его биосинтеза и усилении акропетального транспорта к месту его действия, т.е. в листья (рис. 8).

Результаты облучения дозой 50 Гр не демонстрируют снижения содержания гормона, даже наоборот, в корешках и побегах проростков (рис. 8, 9) наблюдали повышенные концентрации зеатина, что связано с его протекторным действием в ответе на стресс. Цитокинины могут захватывать свободные радикалы или включаться в механизм защиты пуринов от повреждения [Chakrabarti, Mukherji, 2003]. В литературе имеются подтверждения кратковременного и устойчивого повышения концентраций цитокининов при действии стрессоров [Alvarez et al., 2008; Dobra et al., 2010]. В работе с горохом, выращенном из облученных семян (80 и 100 Гр), было показано, что цитокинины способны модифицировать негативные эффекты облучения, затрагивающие ростовые процессы и газообмен в листьях [Stoeva, 2002].

Анализ АБК. Поскольку стрессовое воздействие вызывает быстрое накопление АБК [El-Maarouf-Bouteau, Baily, 2008], увеличение ее количества можно рассматривать как индикатор стрессового состояния растения и, наоборот, пониженные концентрации АБК свидетельствуют о возникновении благоприятных условий для роста растений. Установленное в настоящей работе снижение концентраций АБК в проростках при дозах 4, 12, 16 и 20 Гр и увеличение при дозе 8 Гр объясняют полученный в работе [Гераськин и др., 2015] двухвершинный характер зависимостей длины побега и корней от дозы γ -облучения семян ячменя. Таким образом, наблюдавшееся в работе [Гераськин и др., 2015] уменьшение выраженности стимулирующего эффекта при промежуточных дозах облучения может являться результатом индукции облучением в этих дозах повышенных концентраций АБК. Высокие концентрации фитогормона в корнях проростков, выросших из семян, облученных в дозе 50 Гр, указывают на ингибирующий характер действия этой дозы.

Анализ соотношения (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК. Соотношение гормонов-антагонистов указывает на функциональное состояние растения, определяющее его рост и развитие. Обнаруженное нами увеличение соотношения (ИУК + ИМК + зеатин)/АБК у проростков ячменя (табл. 1), выросших из облученных в стимулирующих дозах семян, обеспечивает благоприятные условия для ростовых процессов и, вероятно, обуславливает стимуляцию роста и развития растений, продемонстрированную в работе [Гераськин и др., 2015]. И наоборот, уменьшение значений исследуемого соотношения фитогормонов в проростках, выросших из облученных ингибирующей дозой (50 Гр) семян, могло стать причиной ингибирования роста и развития проростков.

Анализ экспрессии генов. Переход семян от состояния покоя к прорастанию является критическим этапом в жизни растения, который сопровождается изменением физиологического и биохимического состояния семени, экспрессии генов, а также эпигенетическими модификациями [Gao et al., 2013]. Прорастание семян, как и многие процессы в растениях, находится под контролем гормональной регуляции. Ключевая роль в процессе прорастания отводится соотношению гиббереллинов и АБК, которые в данном случае действуют антагонистически. АБК индуцирует и поддерживает покой семян, в то время как гиббереллины инициируют их прорастание. Антагонизм гиббереллинов и АБК является предметом активного изучения физиологов растений, однако сложная организация сигнальных путей фитогормонов и их взаимодействие осложняют расшифровку их регуляции.

Выявленные изменения генной экспрессии свидетельствуют об усилении синтеза гиббереллинов, положительно регулирующих прорастание семян, и увеличении катаболизма АБК, ингибитора прорастания, что, в свою очередь, может обусловить стимуляцию роста и развития растений.

Интересно отметить, что максимальные значения разницы генной экспрессии были зафиксированы на одном этапе после 18 часов прорастания, что свидетельствует об общих элементах сигнальных каскадов, приводящих к изменениям в экспрессии генов, контролирующим метаболизм обоих фитогормонов. Согласно шкале

микробиологических фаз прорастания ячменя именно на 18-й час прорастания происходит проклевание coleoptily, т.е. первая стадия активного роста после набухания [Казакова, Козяева, 2009]. Таким образом, обнаруженные паттерны транскрипционной активности генов метаболизма фитогормонов на 18-й час после замачивания отражает запуск генных сетей, ответственных за развитие проростков, а соответствующий временной промежуток является критическим для прорастания семян ячменя. Это соотносится с данными работы [Ishibashi et al., 2015], где в ходе изучения влияния окислительного стресса на зародыш и клетки алейронового слоя самые высокие значения экспрессии генов синтеза *HvGa20ox1*, *HvGa3ox1* и катаболизма гиббереллинов *HvGa2ox4* наблюдали именно на 18-й час после проращивания.

Значения исследуемых параметров были максимальны при облучении семян в дозе 20 Гр. Именно при этой дозе в проростках ячменя было обнаружено увеличение содержания основных классов фитогормонов, стимулирующих рост и развитие растений [Битаршвили и др., 2018], увеличение активности антиоксидантных ферментов [Волкова и др. 2016] и морфологических параметров [Гераськин и др. 2015].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на более чем вековую историю исследований закономерностей действия ИИ на растения, в радиобиологии остаются невыясненными важные вопросы. Одним из таких вопросов является выявление механизмов формирования адаптивных реакций растений в результате действия ИИ в малых дозах.

Анализ литературных источников выявил недостаток исследований ответа растений на облучение на молекулярном уровне, что, по нашему мнению, затрудняет расшифровку механизмов адаптивных реакций, так как морфологические показатели регистрируют конечный эффект и не дают ясного представления о механизмах его формирования. Именно поэтому исследования на молекулярном уровне представляются наиболее перспективными для решения данной проблемы.

Результаты наших экспериментов показали, что γ -облучение приводит к сдвигам в фитогормональном балансе проростков ячменя. При облучении стимулирующими дозами увеличивалось содержание ИУК, ИМК и зеатина и уменьшались концентрации АБК. При облучении в ингибирующей дозе 50 Гр баланс смещался в сторону АБК в результате увеличения ее концентрации и уменьшения содержания суммы концентраций ИУК, ИМК и цитокинина (4-7-е сутки прорастания). Следует отметить, что облучение семян в дозе 50 Гр на самом раннем этапе эксперимента – 3-е сутки прорастания приводило к смещению баланса в сторону стимулирующих рост гормонов по отношению к контролю, что говорит о благоприятных условиях для прорастания, которые сменяются на ингибирование по мере развития проростков.

Результаты корреляционного анализа выявили взаимосвязь между морфометрическими показателями проростков ячменя и концентрациями

фитогормонов, которая указывает на важную роль фитогормонального баланса в формировании стимулирующего эффекта в результате облучения семян ячменя малыми дозами ИИ.

Изменение концентраций фитогормонов в процессе прорастания нелинейно зависело от величины дозы. Накопление фитогормонов в побегах и корешках интактных и облученных проростков существенно отличалось. Например, в интактных проростках ИУК накапливалась в корнях, и при облучении семян стимулирующими дозами именно в корнях было обнаружено увеличение ее концентрации, тогда как концентрация ИМК, которая в норме также накапливается в корнях, в облученных проростках увеличивалась в основном в побегах. Можно предположить, что различия в содержании фитогормонов, вероятно, связаны с изменениями их синтеза и транспортировки, а также с переходом из связанного состояния в свободное.

Облучение в ингибирующей рост дозе 50 Гр снижало содержание не всех стимулирующих рост гормонов: содержание зеатина было увеличено в побегах и корнях проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания, что свидетельствует о протекторном ответе цитокининов на стресс.

В работе было показано, что γ -облучение семян ячменя изменяет экспрессию генов метаболизма АБК и гиббереллинов на всех этапах прорастания, даже в зародышах воздушно-сухих семян. Выявленные изменения генной экспрессии свидетельствуют об усилении синтеза гиббереллинов, гормонов, положительно регулирующих прорастание семян, и увеличении катаболизма АБК, ингибитора прорастания, что в свою очередь может обусловить стимуляцию роста и развития растений.

Подводя итог, можно заключить, что фитогормоны и гены, контролируемые их биосинтез и катаболизм, активно участвуют в адаптивных реакциях растений и играют важную роль в формировании эффекта радиационной стимуляции развития проростков при облучении семян ячменя низкими дозами ИИ. Глубокие изменения фитогормонального баланса и транскрипционной активности генов метаболизма АБК и гиббереллинов создают необходимые условия для интенсификации роста и развития растений, которые наблюдаются в ответ на низкодозовое облучение.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что гормональная система и ее регуляция играют важную роль в формировании адаптивных реакций растений ячменя на радиационное воздействие на ранних этапах онтогенеза. Стимуляция роста и развития растений ячменя, выросших из облученных низкими дозами семян, сопряжена с изменениями содержания основных классов фитогормонов.
2. Установлено, что γ -облучение семян в стимулирующих рост дозах (4-20 Гр) приводит к накоплению фитогормонов, ускоряющих ростовые процессы – ИУК, ИМК, зеатина и снижению содержания АБК, ингибитора прорастания в

проростках с 3-х по 7-е сутки прорастания. Применение дозы 50 Гр приводит преимущественно к обратным эффектам – уменьшению суммы концентраций ИУК, ИМК, зеатина и накоплению АБК.

3. Выявлена корреляционная зависимость между концентрациями фитогормонов и размером облученных проростков. Изменения содержания фитогормонов обуславливают проявление эффекта стимуляции на морфологическом уровне.
4. Обнаружены изменения в накоплении фитогормонов в разных органах проростков облученных семян по сравнению с контрольными, свидетельствующие об изменениях в системах транспорта фитогормонов даже в пределах одного класса. В контроле оба ауксина накапливались в корнях, а в проростках облученных семян ИУК накапливалась в корнях, тогда как ИМК в побегах. В побегах контрольных проростков зеатин был представлен в очень маленьких концентрациях или не определялся, облучение приводило к увеличению содержания зеатина в побегах (максимально более чем в 100 раз) за счет транспорта из корневой системы, где он синтезируется. Содержание ауксинов в 3-х дневных проростках указывает на активацию образования ИУК из ИМК в результате облучения.
5. Показано, что облучение семян ячменя вызывает в зародышах изменение транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты метаболизма фитогормонов. Изменения экспрессии генов указывают на усиление метаболизма гиббереллинов и катаболизма АБК при облучении семян в стимулирующих дозах на некоторых этапах прорастания. Облучение в дозе 50 Гр приводит к усилению синтеза АБК.
6. Наиболее значительные изменения транскрипционной активности генов метаболизма фитогормонов выявлены на 18-й час прорастания при облучении семян в стимулирующей рост дозе 20 Гр. Увеличение транскрипционной активности генов синтеза гиббереллинов и катаболизма АБК обуславливает увеличение потенциала роста и развития проростков ячменя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Bitarishvili, S. V.** γ -irradiation of barley seeds and its effect on the phytohormonal status of seedlings / S. V. Bitarishvili, P. Yu. Volkova, S. A. Geras'kin. // Russian Journal of Plant Physiology. – 2018. – V. 65. – № 3. – P. 223-231.
2. **Битарिशвили, С.В.** Влияние γ -облучения на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма абсцизовой кислоты в зародышах семян ячменя / С.В. Битарिशвили, В.С.Бондаренко, С.А. Гераськин // Экологическая генетика. – 2018. – Т 16. – № 4. – С. 85–89.
3. **Битарिशвили, С.В.** Экспрессия генов биосинтеза и катаболизма гиббереллинов в зародышах γ -облученных семян ячменя / С.В. Битарिशвили, В.С.Бондаренко, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т.59. – № 3. – С. 286–292.

В сборниках статей и материалах конференций:

4. **Битаршвили С.В.** Изучение изменений фитогормонального статуса в динамике прорастания семян ячменя, облученных в стимулирующих дозах / С.В. Битаршвили // Сборник тезисов 18-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пушино, 2014. – С. 82.
5. **Bitarishvili, S.V.** Study of the phytohormone status in the germination dynamics of barley seeds after γ -irradiation in stimulate doses / S.V. Bitarishvili // Materials of 4th Young Environmental Scientists YES Meeting SETAC. – Petnica, 2015. – P. 101.
6. **Битаршвили, С.В.** Исследование динамики изменения фитогормонального статуса проростков ячменя после гамма-облучения семян в стимулирующих дозах / С.В. Битаршвили // Тезисы докладов XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2015»: секция «Биология». – М.: МАКС Пресс, 2015. – С. 333-334.
7. **Битаршвили, С.В.** Анализ содержания фитогормонов в проростках ячменя после гамма-облучения семян стимулирующими дозами / С.В. Битаршвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы докладов Всероссийская научная конференция с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, – 2015. – С. 69.
8. **Битаршвили, С.В.** Изучение содержания абсцизовой кислоты в проростках ячменя после гамма-облучения семян стимулирующими дозами / С.В. Битаршвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Сборник тезисов 20-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». – Пушино, 2016. – С. 344.
9. **Битаршвили, С.В.** Изучение содержания ауксинов, цитокинина и абсцизовой кислоты в динамике прорастания семян ячменя после гамма-облучения малыми дозами / С.В. Битаршвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Сборник докладов: Годичное собрание общества физиологов растений России. Научная конференция с международным участием «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. – Спб.: Изд-во СПбГУ, 2016. – С. 98-99.
10. **Битаршвили, С.В.** Изменение фитогормонального баланса проростков ячменя после гамма-облучения семян стимулирующими дозами / С.В. Битаршвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Сборник докладов молодёжной конференции с международным участием, посвященной 45-летию образования ФГБНУ ВНИИРАЭ «Взгляд молодых учёных на современные проблемы развития радиобиологии, радиозэкологии и радиационных технологий» – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2016. – С. 8-12.
11. **Битаршвили, С.В.** Влияние гамма-облучения семян ячменя на содержание фитогормонов в динамике прорастания / С.В. Битаршвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Материалы Молодёжного круглого стола «Современные проблемы радиобиологии и радиозэкологии» в рамках XLVI международных чтений, посвящённых действительному члену ВАСХНИЛ В.М. Ключковскому. Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2017. – С.13-19.
12. **Битаршвили, С.В.** Анализ транскрипционной активности генов метаболизма гиббереллинов после γ -облучение семян ячменя / С.В. Битаршвили, В.С. Бондаренко // Сборник докладов Международной научно-практической конференции «Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: состояние и перспективы» – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2018. – С. 46-48.
13. Гераськин, С.А. Механизмы формирования адаптивных реакций при облучении семян сельскохозяйственных культур низкими дозами ионизирующего излучения / С.А. Гераськин, П.Ю. Волкова, Р.С. Чурюкин, **С.В. Битаршвили**, В.С. Бондаренко, Е.А.

- Казакова // Сборник докладов Международной научно-практической конференции «Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: состояние и перспективы» – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2018. – С. 69-72.
14. Чурюкин, Р.С. Анализ митотической активности в корневой меристеме проростков γ -облученных семян ячменя / Р.С. Чурюкин, П.Ю. Волкова, Е.А. Казакова, **С.В. Битаршвили**, Е.С. Макаренко, М.А. Лыченкова, А.В. Перькова // Сборник докладов Международной научно-практической конференции «Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: состояние и перспективы» – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2018. – С. 120-124.
 15. **Битаршвили С.В.** Влияние γ -облучения семян на экспрессию генов ферментов метаболизма фитогормонов / С.В. Битаршвили, В.С. Бондаренко // Тезисы докладов XIV Международной научно-практической конференции «Будущее атомной энергетики – AtomFuture 2018». – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2018. – С. 49-53.
 16. Geras'kin, S. Using the ionizing radiation for improving the development and yield of agricultural crops / S. Geras'kin, P. Volkova, R. Churyukin, **S. Bitarishvili** // FAO/IAEA International symposium on Plant mutation breeding and biotechnology. Book of abstracts, 2018. – P. 42.
 17. **Битаршвили С.В.** Экспрессия генов метаболизма фитогормонов в семенах ячменя после γ -облучения / С.В. Битаршвили, В. С. Бондаренко // Сборник докладов Российской конференции с международным участием «Современные вопросы радиационной генетики» – Дубна, 2019. – С. 25-27.