Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАДИОЛОГИИ И АГРОЭКОЛОГИИ»
(ФГБНУ ВНИИРАЭ)

На правах рукописи

Битаришвили София Валерьяновна

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

Специальность 03.01.01 – радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

С.А. Гераськин

Обнинск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1. Особенности формирования радиобиологических эффектов у растений 13
1.2. Влияние облучения семян в низких дозах на рост и развитие растений на ранних фазах онтогенеза 22
1.3. Роль фитогормонов в регуляции роста и развития растений 26
1.4. Участие фитогормонов в процессе прорастания семян 45
1.5. Заключение 53
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56
2.1. Объект исследования 56
2.2. Условия облучения и проращивания семян 56
2.3. Анализ содержания фитогормонов методом ВЭЖХ 57
2.4. Анализ экспрессии генов метаболизма фитогормонов 62
2.5. Статистический анализ экспериментальных данных 66
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ 67
3.1. Влияние γ-облучения семян ячменя на фитогормональный статус проростков 67
3.2. Влияние γ-облучения семян на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма фитогормонов 88
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ 96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 114
ВЫВОДЫ 118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИИ – ионизирующие излучения

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИУК – индолилуксусная кислота

ИМК – индолилмасляная кислота

АБК – абсцизовая кислота

CYCD3 – циклины D класса

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ТФЭ – твердофазная экстракция

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Особенности строения и образа жизни растений обусловили развитие сложного регуляторного аппарата, 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 ответных 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 все биохимические и морфофизиологические процессы [Bahin et al., 2011; Peleg, Blumwald, 2011]. Сильное стрессовое воздействие приводит к угнетению метаболизма и патологическим процессам. 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, с целью управления процессами роста и развития культурных растений. Неспецифические реакции растений наблюдаются при действии стрессоров разной природы: химических, физических, в том числе и ионизирующее излучение (ИИ). γ-излучение является удобным инструментом для изучения адаптивных реакций, к преимуществам которого относят точность дозирования, изученность механизмов взаимодействия излучения с веществом, равномерное распределение в среде, отсутствие грубого механического воздействия на объект.

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 этого агроприема лежит явление радиационного гормезиса, которое заключается в стимуляции развития растений низкими дозами стрессора, в то время как большие дозы ведут к ингибированию ростовых процессов. Исследования действия низких доз облучения могут дать новый виток развития биотехнологий растений для создания стрессоустойчивых сортов. 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 многолетнее изучение метода предпосевного облучения семян, 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 уделено роли фитогормонов в формировании ответных 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 исследованием.

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. Огромный 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, применяемый в сельском хозяйстве, осложнялось слабой воспроизводимостью эффекта стимуляции в полевых и лабораторных 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 малых дозах, на семена, и выявление ведущих процессов, приводящих к формированию адаптивных реакций.

Ключевую роль в стимуляции ростовых процессов с помощью 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].

Стимуляция морфогенетических процессов может сопровождаться изменением течения 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 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 предопределяют последующий ход онтогенеза. Совершенствование методов молекулярной биологии дает возможность перейти на качественно новый уровень исследований, который поможет теоретически обосновать механизмы радиационной стимуляции роста и развития растений, а также выявлять новые аспекты адаптивных реакций на стресс.

Целью диссертационной работы являлась 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: ИУК, ИМК, цитокинина 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 ячменя.

Теоретическая и практическая значимость. Анализ вызванных γ-облучением семян изменений в гормональной системе ячменя и ее регуляции 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 (ТФЭ) 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. Достоверность результатов обеспечена корректным подбором современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам и большим объемом экспериментальных данных. Хроматографический анализ проводили в трех повторностях, каждую повторность анализировали дважды. Для апробации методики исследовано 152 хроматограммы. Для эксперимента было проанализировано 486 хроматограмм и обработано 1944 хроматографических пика. Анализ экспрессии генов проводили в трех биологических повторностях, каждую повторность анализировали трижды. Было проведено 3096 реакций. 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 радиоэкологии», в рамках XLVI международных радиоэкологических чтений, посвященных действительному члену ВАСХНИЛ В.М. Клечковскому (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 (№ 14-14-00666) и проекта РФФИ (№ 19-54-50003).

Личный вклад диссертанта в работу. Личный вклад автора 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 объем 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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности формирования радиобиологических эффектов у растений

Появление науки радиобиологии, изучающей действие ионизирующих излучений на живые объекты, стало возможным благодаря открытию рентгеновских лучей и явления естественной радиоактивности в конце XVIII века. Первые опыты по изучению действия ИИ на биологические объекты начались практически сразу после этих открытий, в результате чего было обнаружено их ингибирующее действие на микроорганизмы, растения и животных. Одновременно появились идеи использования ИИ в медицине, были предприняты первые попытки рентгенотерапии рака. Французскими учеными был сформулирован один из важнейших законов радиобиологии (закон Бергонье – Трибондо): клетки тем чувствительнее к облучению, чем быстрее они делятся, чем продолжительнее у них фаза митоза и чем более они дифференцированы [Ярмоненко, 2004]. В 1905 году М. Кернике обнаружил различные нарушения деления ядра при облучении растений. Благодаря его исследованиям была раскрыта важнейшая роль повреждений хроматина клеточного ядра при формировании радиобиологических эффектов [Ярмоненко, 2004].

Позднее были сформированы представления о прямом и косвенном действии радиации в рамках теории мишени и принципа попадания, согласно которой элементы, из которых состоят живые клетки, различны по своей радиочувствительности: попадание лишь в определенные участки (мишени) приводит к гибели клетки. Впервые сформулированная Ф. Дессауэром и развитая в работах Дж. Кроузера, К.Г. Циммера и Н.Ф. Тимофеева-Рессовского [Тимофеев-Ресовский и др., 1968] теория мишени объясняла главный радиобиологический парадокс: несоответствие между ничтожным количеством поглощенной энергии излучения и вызываемым им существенным биологическим эффектом.

В основу теории косвенного действия радиации лег эксперимент Г. Фрика (1934), который показал, что при воздействии рентгеновского излучения на воду происходит ее радиолиз с образованием короткоживущих активных радикалов, в результате чего происходит окисление органических веществ и инактивация ферментов [Васильев, 1962]. Позднее над развитием этой теории работал советский биофизик и радиобиолог А.М. Кузин. Он отводил ведущую роль в радиационном эффекте нарушениям в работе ядерного аппарата и биомембран клетки [Кузин, 1986]. ИИ, индуцируя каскад химических превращений в клетке с образованием перекисей, вызывают деполимеризацию клеточных молекул, в том числе и ДНК, что в свою очередь обусловливает синтез специфических белков и измененных полипептидов. Такие реакции приводят к нарушению окислительно–восстановительных реакций и обменных процессов в клетке и, как следствие, ее функционирования.

Проявления общих радиобиологических закономерностей характерны как для животных клеток, так и для растительных, однако в лучевых реакциях растений проявляются специфические особенности. Радиобиология растений изучает ответные реакции растений на облучение, охватывая эффекты в широком диапазоне уровней их проявления – от радиационно-химических реакций и клеточных эффектов до поведения растений в облученных фитоценозах [Гродзинский, 1989]. Разнообразие жизненных форм, различающихся морфологическим строением, размерами, темпами ростовых процессов, способами размножения, биохимическим составом, существенно усложняет описание с единых позиций радиобиологических реакций растений.

1.1.1. Первичные реакции взаимодействия ИИ с веществом

Процессы, разворачивающиеся в результате взаимодействия ИИ с веществом, поделены на несколько этапов: физический, физико-химический, химический и биологический [Ярмоненко, 2004]. На физической стадии в первые 10^{-16}-10^{-13} с в результате передачи энергии фотона или частицы веществу происходит возбуждение и ионизация молекул.

Физико-химический этап характеризуется изменениями молекул, в основе которых могут лежать 2 механизма:

1. Прямое действие. Молекула непосредственно взаимодействует с ИИ.
2. Косвенное действие. Молекула непосредственно не поглощает энергию ИИ, а получает ее от других молекул.

Поскольку живая материя на 70-90 % состоит из воды, то большая часть энергии излучения поглощается именно молекулами воды. Таким образом, большая часть радиационно-индуцированных повреждений возникает в результате косвенного действия [Esnault et al., 2010] в основе которого лежит радиолиз воды. Образовавшиеся ионы и радикалы, а впоследствии и вторичные продукты – активные формы кислорода (АФК) во время химической фазы на 10^{-6}-10^{-3} с взаимодействуют друг с другом и окружающими молекулами. В результате этих взаимодействий на физической стадии образуются биохимические и структурные повреждения макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды), которые определяют биологические эффекты на разных уровнях организации.

1.1.2. Макромолекулярный уровень

Как для животных, так и для растений одной из наиболее чувствительных молекул к повреждающему действию радиации является ДНК. В результате прямого или косвенного действия ИИ в молекуле ДНК образуются разного вида повреждения, к числу которых относят разрывы цепей ДНК, чаще всего это однонитевые разрывы, реже двунитевые [Han, Yu, 2010]. Двунитевые разрывы приводят к фрагментированию ДНК, в результате чего места разрывов нуждаются в специфичной обработке для подготовки к лигированию. Репарация таких повреждений часто протекает с ошибками, что может приводить к летальным или мутагенным эффектам [Han, Yu, 2010].

Однонитевые разрывы ДНК репарируются чаще всего эффективно, не вызывая последствий. Однако в результате действия ИИ могут образовываться несколько поврежденных сайтов, представляющих собой два или более тесно

локализованных повреждения на одной или противоположных нитях ДНК [Shikazono et al., 2009]. Такие кластерные повреждения могут образовывать двуцепочечные разрывы в результате эксцизионной репарации оснований [Cannan et al., 2014]. Вероятность этих событий зависит от состояния хроматина и взаимодействия с ядерными матричными белками.

1.1.3. Клеточный уровень

Лучевые повреждения клеток определяют проявление тканевых эффектов [Гродзинский, 1989], поскольку нет каких-либо поводов полагать, что имеются внеклеточные мишени, повреждения которых при облучении могут вести к лучевым реакциям ткани. Судьба облученной клетки критической ткани растения может быть разной: пролиферативная гибель, связанная с потерей способности делиться, интерфазная гибель, когда смерть клетки наступает вне связи с делением, трансформация, ведущая к новообразованиям и, наконец, восстановление клетки от лучевого поражения. Нарушаются свойственные норме процессы генерации новых клеток, численность клеток в популяции уже не поддерживается на обычном уровне, нарушается клеточный гомеостаз [Храмченкова, 2003]. Выраженность реакций зависит от фазы клеточного цикла в момент облучения. Еще в середине прошлого века было отмечено в эксперименте с бобами [Evans, Scott, 1964], что растения наиболее радиочувствительны во время фазы G2 клеточного цикла. И.Н. Гудков, исследуя меристемы корня, обнаружил, что наименьшая радиочувствительность наблюдается в конце G1 и начале S-фазы клеточного цикла [Гудков, 1991]. Он объясняет это невозможностью репарации в момент репликации, когда некоторые участки ДНК деспирализованы.

Для выживания клетки при повреждении ДНК необходимо соблюдение двух условий: активация репарации ДНК и замедление или остановка клеточного цикла. В 1989 г. Л. Хартвелл и Т. Вайнер предположили, что у клетки есть специальные системы контроля качества (checkpoints), которые обнаруживают

различные проблемы с ДНК и способствуют остановке клеточного цикла [Hartwell, Weinert, 1989]. Точки проверки целостности ДНК контролируются киназами ATM и ATR. Киназа ATM активируется в результате одноцепочечных разрывов ДНК, ATR в результате двуцепочечных разрывов в ответ на ИИ [Culligan et al., 2006].

В результате действия ИИ появляются аберрации хромосом. Они представлены нарушениями, затрагивающими одну хромосому (инверсии, делеции, дупликации, кольцевые хромосомы) и затрагивающими обе хромосомы (дупликации, транслокации, дицентрические хромосомы) [Цыб и др., 2005]. Также может наблюдаться образование микроядер, небольших тел ядерного материала, возникающих из фрагментов или целых хромосом [Fenech, 2000].

В клетках облученных большими дозами растений наблюдается снижение митотической активности, что было показано на многих видах [Hof, Sparrow, 1963; Eroglu et al., 2007].

Помимо ДНК, критической мишенью ИИ является клеточная мембрана. Перекисное окисление липидов, в частности полиненасыщенных жиров, приводит к увеличению проницаемости мембран, разрушению градиентов ионов и других трансмембранных процессов и изменению активности мембран-ассоциированных белков [Corre et al., 2010]. Несмотря на то, что прямое действие радиации непосредственно способно повреждать липиды, основной вклад в эти процессы вносит косвенное действие [Benderitter et al., 2003].

1.1.4. Организменный уровень

Действие больших доз радиации вызывает изменения на всех уровнях организации растений. Молекулярные и биохимические изменения обусловливают нарушения архитектоники растений и возникновение различных морфологических аномалий [Гродзинсий, 1989]. У листьев могут наблюдаться утрата тургора, увеличение или уменьшение их количества и размеров, изменение формы, скручиваемость, морщинистость, изменение жилкования,

асимметричность, утолщение листовой пластины, срастание листовых пластин, фасциации, опухоли, появление некротических пятен, утрата листовой пластины.

У стеблей возможно угнетение или ускорение роста, нарушение порядка расположения листьев, изменение цвета, снятие апикального доминирования и пролиферация аксилярных почек, дихотомия, изменение сечения, опухоли, появление аэральных корней [Гудков, 1991].

У корней тормозится рост осевой части, что приводит к усилению ветвления, нарушается образование корневых волосков, что впоследствии нарушает процесс всасывания воды. Может наблюдаться расщепление главного корня или образование вторичного главного корня, нарушение геотропизма, опухоли и гибель всей корневой системы [Гудков, 1991].

Нарушения в формировании репродуктивных органов приводят к образованию различных аномалий и стерильности [Wi et al., 2007; Jan et al., 2012]. В результате облучения происходит ускорение или задержка цветения, изменение количества, формы, цвета и размера цветков.

У семян отмечают изменения размера, цвета и количества, морщинистость, стерильность, аномальное опадение [Гудков, 1991].

В результате действия ИИ возможно образование радиационных химер. Подвергшиеся облучению клетки меристемы имеют различные генетические дефекты, что обусловлено случайным характером распределения поглощенной дозы. Если повреждения препятствуют делению клетки, то впоследствии она не даст клеточной линии и не образует соответственные секторы в ткани. Если же деление возможно, то образовавшиеся поколения клеток входят в состав формирующихся органов и тканей. В результате растение, выросшее из облученного семени, или побег, развившийся из облученной почки, состоит из генетически разных тканей, представляя собой химеру [Гродзинский, 1989].

У вегетирующих растений наблюдается значительная вариабельность обменных процессов, зависящих от дозы облучения и фазы развития в момент

воздействия излучений. У разных видов растений нарушения физиологических функций в ответ на облучение часто бывают качественно сходны, хотя и различаются количественно [Алексахин и др., 1992]. Облучение растений в больших дозах изменяет физиологические процессы, ускоряя или замедляя ход онтогенеза, что сказывается на темпах формообразования. Наблюдается ингибирование прорастания семян и развития проростков, нарушение морфогенеза, процессов дыхания, фотосинтеза, метаболизма многих соединений. Облучение может приводить к гибели растений, однако не сразу после облучения, а к моменту отмирания тканей меристемы [Кузин, Каушанский, 1981; Kim et al., 2005; Wi et al., 2007]. Радиочувствительность тканей меристемы в сотни раз выше, чем у дифференцированных и специализированных, именно поэтому они являются критическими тканями в процессах поддержания постоянства клеточного состава и нормального темпа клеточных делений в ответ на облучение [Гудков, 1991].

1.1.5. Физиологический уровень

ИИ, наряду с другими стрессовыми агентами, такими как засуха, пониженные или повышенные температуры, засоление, недостаток света, вызывают у растений повышенную индукцию АФК и, как следствие, окислительный стресс, который нарушает метаболические процессы и пагубно влияет на структурные и функциональные элементы клеток [Demidchik, 2015]. В ходе эволюции растения сформировали эффективную систему контроля уровня АФК. Защита растений от действия АФК обусловлена работой антиоксидантной системы, которая представлена неферментативными антиоксидантами: аскорбиновой кислотой, витамином Е, пролином, глутатионом, каротиноидами и ферментами: пероксидазой, каталазой и супероксиддисмутазой [Sharma et al., 2012]. Работа антиоксидантной системы направлена на утилизацию АФК, восстановление сигналинга и нормальной работы клеточного аппарата (рис. 1.1) [Sharma et al., 2012, Ahmad, 2014].

Фермент	Реакция
SOD	$O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
CAT	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½O_2$
POD	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½O_2$
APX	$H_2O_2 + Asc \rightarrow H_2O + MDA$
MDAR	$MDA + NAD(P)H \rightarrow Asc + NAD(P)^+$
DHAR	$DHA + GSH \rightarrow Asc + GSSG$
GR	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow GSH + NAD(P)^+$
GPX	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$

SOD: супероксиддисмутаза, CAT: каталаза, POD: пероксидаза, APX: аскорбатпероксидаза, MDA: монодегидроаскорбат, MDAR: монодегидроаскорбатредуктаза, DHAR: дегидроаскорбатредуктаза, DHA: дегидроаскорбат, GSH: восстановленный глутатион, GSSG: окисленный глутатион

Рисунок 1.1 – Утилизация АФК с помощью ферментов антиоксидантной системы [Ahmad, 2014]

Особенности жизни растений, связанные с их прикрепленным образом жизни, привели к формированию сложного регуляторного аппарата, в основе которого лежит гормональная система. Фитогормоны, основные эндогенные регуляторы роста и развития растений, играют ключевую роль в адаптивных реакциях [Титов, Таланова, 2009; Wani et al., 2016].

Уже в 30-х годах прошлого века проводили исследования гормональной системы растений в ответ на радиационное воздействие [Skoog, 1935]. Обнаружено, что ИИ оказывает существенное влияние на содержание фитогормонов в культурах тканей растений. Высказывались предположения, что снижение концентраций фитогормонов, наблюдаемое в результате воздействия ИИ, происходит в результате нарушения биосинтеза их предшественников [Gordon, Webber, 1955], что подтверждается в современных исследованиях [Кожокару, Ревин, 2010]. Основной вклад в изменения гормональной системы вносит косвенное действие ИИ, хотя нельзя полностью исключать влияние прямого действия [Esnault et al., 2010; Jan et al., 2012].

По мнению А.М. Кузина [Кузин, Каушанский 1977], гиббереллины играют ведущую роль в процессах радиостимуляции, выполняя функцию триггер-эффектора для синтеза α-амилазы в алейроновом слое семени. Большие дозы радиации способствуют снижению синтеза α-амилазы у семян за счет снижения содержания гиббереллинов [Гребинский и др., 1973; Jin-Baek Kim et al., 2012].

В основе явления радиационной стимуляции лежит увеличение доли пролиферирующих клеток. Не исключено, что механизмом стимуляции клеточного деления является синтез цитокининов, субстратом которого могут выступать продукты ферментативной деградации ДНК, образующиеся во время эксцизионной репарации [Михеев, 2015].

Индуцированные ИИ изменения тонких биохимических и молекулярных процессов ведут к нарушениям физиологии и морфологии растений. В середине прошлого века изучение закономерностей действия ИИ на растения дало толчок развитию радиобиологии растений в нашей стране. Неоценимый вклад в развитие радиобиологии растений внесли работы таких ученых как Л.П. Бреславец [Бреславец, 1946], А. Сперроу [Sparrow et al., 1961], И.М. Васильева [Васильев, 1962], Н.М. Березиной [Березина, 1964], Н.Ф. Батыгина [Батыгин, Савин, 1966], Е.И. Преображенской [Преображенская, 1971], А.М. Кузина [Кузин, Каушанский, 1981], К.Д. Коломиец [Коломиец, 1982], Д.М. Гродзинского [Гродзинский, 1989] и И.Н. Гудкова [Гудков, 1991].

1.2. Влияние облучения семян в низких дозах на рост и развитие растений на ранних фазах онтогенеза

Первые работы по облучению воздушно-сухих семян были выполнены еще на рубеже XIX–XX веков [Ярмоненко, 2004]. В экспериментах на разных видах показано, что существуют режимы облучения, повышающие всхожесть, энергию прорастания, ускоряющие развитие проростков. В основе этих наблюдений лежит явление радиационного гормезиса, согласно которому ИИ в низких дозах способно ускорять развитие растений, в то время как большие дозы являются

губительными для живых организмов [Luckey, 1991; Calabrese, Baldwin, 2000; Upton, 2001, Parsons, 2002; Baldwin, Grantham, 2015]. Это понятие взято из фармакологии, в которой еще со времен Парацельса было известно, что сильные яды в низких концентрациях могут быть ценными лекарствами [Петин, Пронкевич, 2012]. Н.В. Тимофеев-Ресовский в своей гипотезе о токсикологической природе процессов, разворачивающихся при радиационной стимуляции семян, развивает идеи о том, что, при действии малых и больших доз радиации в клетках происходят абсолютно разные процессы [Тимофеев-Ресовский, Порядкова, 1956]. По мнению С.А. Гераськина, с физической точки зрения различие между большими и малыми дозами носит не качественный, а количественный характер. Физические акты взаимодействия излучения с веществом не зависят от величины поглощенной дозы, различия в действии больших и малых доз заключаются не в энергии квантов, а в их количестве, пересекающем в единицу времени чувствительный объем [Гераськин, 1995].

Явление гормезиса было описано для многих групп организмов, включая растения [Calabrese, Baldwin, 2000]. Этот эффект наблюдается при действии множества стрессовых агентов, таких как засоление, тяжелые металлы, гипо- или гипертермия, давление и т.д. [Calabrese, Blain, 2009; Нефедьева, Лысак, 2009; Araújo et al., 2016]. Кривые «доза-эффект», описывающие эти закономерности для разных агентов, будут одинаковыми по форме [Calabrese, Baldwin, 2000]. Анализ множества работ по изучению гормезиса указывает на то, что величина эффекта относительно невелика, почти всегда находится в диапазоне 30-60% от контрольных значений (Рис 1.2) [Calabrese, Blain, 2005].

В работе [Calabrese, Blain, 2009] систематизированы тысячи примеров проявления гормезиса, база данных содержит информацию о широком круге биологических моделей, включая растения, а также информацию о методах исследования, дозовые зависимости и физико-химические свойства агентов.

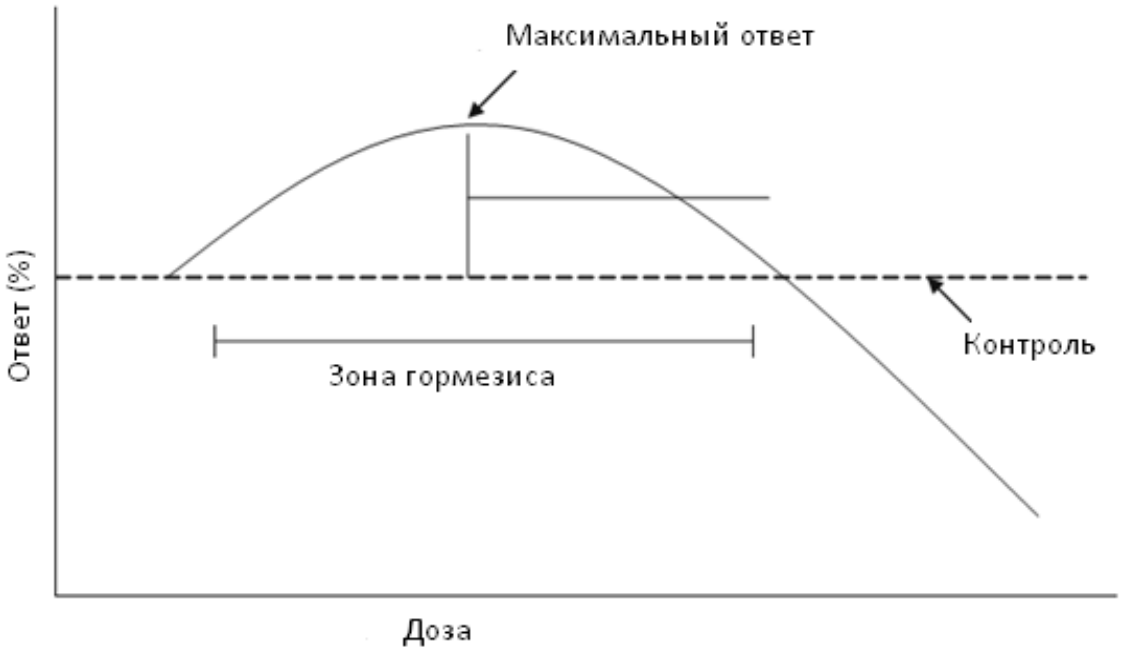

Рисунок 1.2 – Кривая «доза-эффект» в случае проявления эффекта гормезиса [Calabrese, 2015]

Критериями оценки действия ИИ при облучении семян в основном служили особенности развития зародыша, рост и развитие проростков. Радиационная стимуляция, обусловленная ускорением клеточных делений и растяжением клеток, может быть краткосрочной, когда после усиления ростовых процессов наступает период, в течение которого облученные растения не отличаются от контрольных [Гродзинский, 1989]. В некоторых случаях стимуляция отмечается весь период вегетации, если облученные растения получают конкурентное преимущество перед необлученными [Батыгин, Савин, 1966].

Вызывающая стимуляцию доза будет меняться в зависимости от радиочувствительности [Преображенская, 1971], то есть повышаться при переходе от радиочувствительных видов к радиоустойчивым. Снижение мощности дозы вызывает эффект стимуляции при меньших дозах [Кузин, 1972]. Радиочувствительность семян повышается с их влажностью, соответственно снижается доза, обусловливающая максимальный стимулирующий эффект. Согласно структурно-метаболической теории, при облучении семян возникает множество свободных радикальных центров, аккумулирующих в себе

поглощенную энергию, которая длительное время существует в семенах в отсутствие внешних воздействий [Кузин, 1986]. При замачивании семян свободные радикалы усиливают окислительные ферментативные процессы, приводящие к мобилизации питательных веществ, что приводит к улучшению прорастания семян и ускоренному развитию проростков [Березина, 1964]. При использовании больших доз ИИ наблюдается ингибирование прорастания семян, угнетение морфологических параметров проростков, разрушение клеточных ядер, нарушения метаболических процессов [Васильев, 1962; Гродзинский, 1989; Luckey, 1991; Baldwin, 2000; Upton, 2001; Calabrese, Parsons, 2002; Baldwin, Grantham, 2015; Calabrese, 2015].

Предполагается, что радиочувствительность семян относится к генетически детерминированным признакам, однако речь идет не о специальных генах, отвечающих за радиочувствительность, так как имеется много факторов, косвенно влияющих на данное свойство [Гродзинский, 1989]. К таким факторам можно отнести состояние зародыша, возраст и размер семян, условия хранения и проращивания семян, биохимический состав семян и т.д.

На сегодняшний день накоплен обширный материал по влиянию облучения семян на рост и развитие проростков, который подтверждает целесообразность применения данного приема в агротехнологиях. Во множестве работ по низкодозовому облучению семян разных видов растений продемонстрировано ускорение роста и развития проростков [Kumari, Singh, 1996; Youssef, Moussa, 1998; Chaudhri, 2002; Гераськин и др., 2015].

γ-облучение в низких дозах способно увеличивать содержание фотосинтетических пигментов у разных видов растений [Kim et al., 2005; Jan et al., 2012; Marcu et al., 2013]. Облучение в диапазоне малых доз, вызывающее стимуляцию роста и развития проростков, вызывало увеличение активности ферментов [Волкова и др. 2016; Vardhan, Shukla, 2017]. В ряде работ отмечали биохимические изменения в растениях, такие как повышенное содержание

белков, аминокислот, сахаров и минеральных веществ [Гудков, 1991, Jan et al., 2012].

Многие ученые отводят ключевую роль в формировании гормезиса гормональной системе растений [Кузин, 1977; Гродзинский, 1989; Гудков, 1993; Нефедьева, 2009]. В результате облучения семян в малых дозах происходит повышение уровней гормонов, способствующих прорастанию, и снижение концентраций гормонов, препятствующих прорастанию [Soliman, El-Hamid, 2003; Abou El-Yazied, 2011; Latif et al., 2011; Mounir et al., 2015; Битаришвили и др. 2018].

Важную роль в стимуляции роста и развития растений при облучении малыми дозами играет активация клеточных делений, в основе которой лежит ускорение деления ядра и синтеза ДНК [Михеев, 2015]. В классических радиобиологических работах было показано, что увеличение размера корней растений обусловлено увеличением числа митозов, а не размеров клеток [Бреславец, 1946; Тимофеев-Ресовский, Лучник, 1957]. Это подтверждают результаты современных исследований, свидетельствующие об увеличении значений митотического индекса в корнях облученных стимулирующими дозами растений [Гудков, 1993; Mohajer et al., 2014].

Несмотря на огромное количество работ, демонстрировавших радиостимуляцию, этот эффект отличается невоспроизводимостью в лабораторных и полевых исследованиях. Причины этого остаются до сих пор не раскрытыми. Эффект стимуляции может нивелироваться условиями культивирования и обеспечения питательными веществами, снижается с увеличением времени с момента облучения до проращивания, изменением температуры окружающей среды и т.д. [Кузин, 1977]. Раскрытие механизмов радиостимуляции является одной из важных задач радиобиологии.

1.3. Роль фитогормонов в регуляции роста и развития растений

Рост и развитие растений зависят от интеграции многочисленных сигналов внешней и внутренней среды. Вкупе с генетической программой они определяют форму и течение процессов в онтогенезе растений. Основную роль в этих процессах играют фитогормоны, которые являются органическими низкомолекулярными веществами эндогенного происхождения, регулирующими все процессы жизнедеятельности растений от ранних этапов эмбриогенеза до цветения и завязывания семян. Еще в тридцатых годах прошлого века стало ясно, что фитогормоны синтезируются в одних частях растения, транспортируются в другие, где оказывают специфическое влияние на биохимические процессы [Лутова и др., 2010]. Т.е. фитогормоны выступают в роли посредников, с помощью которых координируется деятельность разных органов.

Долгое время к основным классам фитогормонов принято было относить пять «классических» гормонов растений: ауксины, гиббереллины, цитокинины, этилен и абсцизовая кислота (АБК), с недавнего времени к ним стали относить брассиностероиды, жасмонаты, салициловую кислоту и стриголактоны. Так же различают так называемые регуляторы роста и развития растений, не относящиеся к основным классам гормонов, они могут быть как эндогенного происхождения, так и синтезированными искусственно. К ним относят брассинолиды, полипептидные гормоны, олигосахариды, лектины и т.д. Представители этих классов отличаются по своей химической структуре и физиологическому действию.

По химической структуре гормоны растений относятся к разным типам веществ: гиббереллины и АБК являются терпеноидами, цитокинины – производными аденина, ауксины – производными аминокислоты триптофана, этилен – газообразный углеводород [Лутова, 2010].

У гормонов животных и растений много общего. Подобно гормонам животных, фитогормоны вырабатываются и действуют в очень малых

концентрациях (10^{-6} – 10^{-12}), однако есть и существенные отличия: гормоны животных синтезируются в определенной ткани (гипофиз, щитовидная железа и т.д.), транспортируются гуморально и действуют на другую ткань. В отличие от них фитогормоны синтезируются любыми тканями растений в большей или меньшей степени, механизмы их транспорта разнообразны, действовать они могут как на ткани, в которых были синтезированы, так и на отдаленные клетки. Гормоны перемещаются по всему растению с помощью ксилемного и флоэмного потока, на короткие расстояния между клетками с помощью транспортных белков, в некоторых случаях путем свободной мембранной диффузии. Для ауксинов описан полярный транспорт, благодаря которому ИУК в побеге направлен базипетально, а в кончике корня происходит разворот, и дальше ИУК движется акропетально до зоны образования боковых корней [Muday, DeLong, 2001].

В отличие от ферментов, которые катализируют отдельные реакции и этапы метаболического пути, фитогормоны регулируют реализацию крупных физиологических программ, таких как созревание зародыша, тропизмы, цветение.

В процессах регуляции роста и развития растений, определяемых действием фитогормонов, прослеживается специфичность их действия, обусловленная различием химической природы и функциональной роли отдельных групп гормонов; зависимость действия от количества вещества, которая выражается не только в количественном эффекте, но и в направленности: при небольших концентрациях наблюдается стимуляция роста, при средних — торможение, при высоких — полная задержка ростовых процессов [Чайлахян, 1982].

Важным свойством фитогормонов является полифункциональность. Один гормон выполняет несколько функций в процессе роста и развития растения. Например, абсцизовая кислота контролирует процесс закрывания устьиц, тем самым поддерживает водный баланс в условиях засухи, стимулирует развитие семян, обеспечивает их покой, препятствуя преждевременному прорастанию, усиливает процессы старения и опадения цветков и плодов.

Синтез фитогормонов контролируется посредством прямой или обратной регуляции, в зависимости от условий взаимодействия с другими гормонами и факторами окружающей среды. После синтеза многие гормоны подвержены химическим превращениям, модифицирующим их деятельность. Например, неактивный гормон может храниться в растении долгое время и перейти в активную форму, претерпев химические превращения. Также уровни гормонов контролируются интенсивностью катаболизма. Ферменты анаболических и катаболических путей большинства гормонов кодируются семьями независимо регулируемых генов, позволяя растению точно регулировать метаболический контроль накопления гормонов. Например, фермент, который катализирует этап ограничения синтеза АБК, активно экспрессируется в период созревания семян и корней в условиях засухи [Sreenivasulu et al., 2008].

Гормоны оказывают влияние на клетки-мишени, связываясь с их рецепторными белками. В некоторых случаях гормоны связываются с трансмембранными рецепторами, расположенными на плазматической мембране или эндоплазматическом ретикулуме. Эти рецепторы связывают гормон-лиганд на одном сайте и передают информацию на другой сайт, вызывая активацию рецепторной киназы. Трансмембранные рецепторы могут рассматриваться как информационные реле; наличие гормона инициирует процессы на участке, удаленном от самого гормона, через аллостерические изменения белка. В других случаях гормоны взаимодействуют с внутриклеточными рецепторами, образуя домен гормон-белок. Связывание гормона с рецептором или ко-рецептором изменяет аффинность рецептора к другим белкам, с которыми гормон взаимодействует.

Эффекты гормональной сигнализации обычно включают изменения в экспрессии генов. В большинстве случаев многие факторы транскрипции, реагирующие на передачу гормонального сигнала, определены. Путь между связыванием гормонов с рецепторами и активацией транскрипционных факторов обычно включает передачу сигнала через протеинкиназы и фосфатазы или

регулируемый протеолиз таргетных белков через систему убиквитинирования [Davies, 2004].

1.3.1. Ауксины

Ауксины были открыты первыми из фитогормонов. Вещество, регулирующее рост растений, описал Ч. Дарвин в труде «Сила движения в растениях» [Лутова, 2010]. Однако выделить его удалось лишь в 1926 г. Ранние труды по изучению действия ауксинов вылились в гормональную теорию роста и тропизмов растений, основоположниками которой являлись Ф. Вент и Н.Г. Холодный [Davies, 2004]. В 1936 г. был выделен гетероауксин или индолилуксусная кислота (ИУК), основной ауксин в растениях. Его содержание составляет примерно 80–95% всех ауксинов растений. Остальные натуральные ауксины присутствуют в растениях в меньших количествах (рис. 1.3). Например, индолилмасляная кислота (ИМК) обладает большей активностью в процессах роста придаточных корней по сравнению с ИУК за счет большей стабильности в растворах и тканях [Nordström et al., 1991].

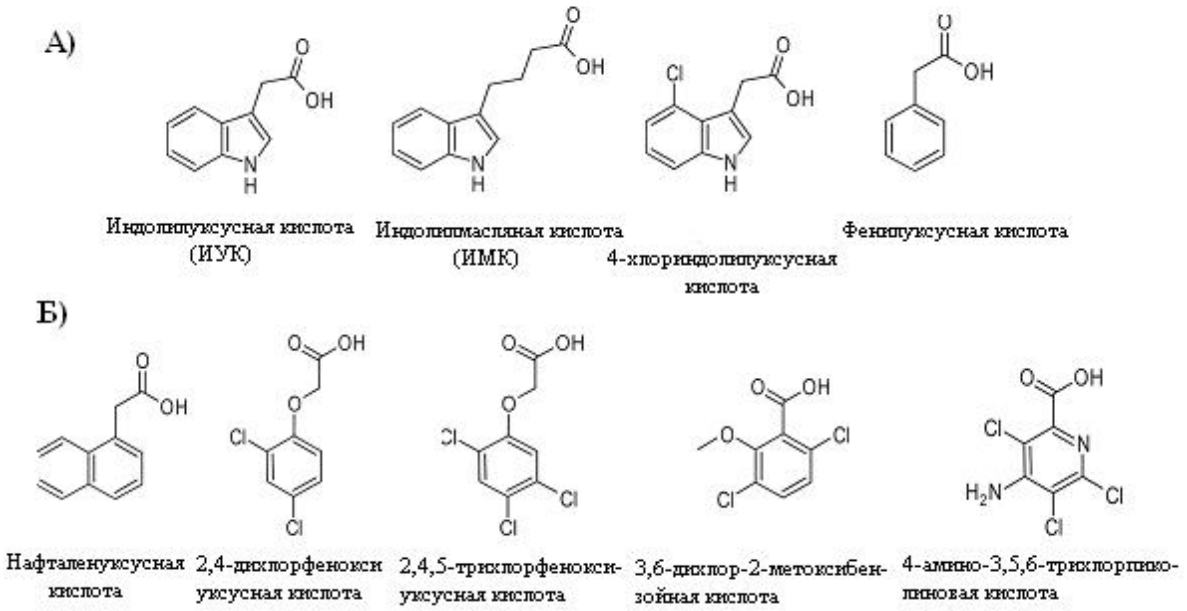

Рисунок 1.3 – Структурные формулы природных (А) и некоторых синтетических (Б) ауксинов [Sauer et al., 2013]

Показано, что ИМК играет важную роль в морфологических и физиологических механизмах адаптации к стрессу через взаимодействия с УДФ-гликозилтрансферазой [Tognetti et al., 2010].

Существует несколько способов образования ИУК в растениях *de novo*: триптофан-зависимый путь – ИУК синтезируется в растениях из триптофана, триптофан-независимый путь – в качестве предшественника выступает индол [Ludwig-Muller, 2000] (рис. 1.4).

Растения также могут получать ИУК из ИМК с помощью пероксисомального β-окисления [Strader at al., 2010] (рис. 1.5) или гидролиза конъюгатов, которые ИУК образует с сахарами, аминокислотами и пептидами [Woodward, Bartel, 2005].

Синтезируется ауксины преимущественно в молодых листьях и их примордиях [Лутова, 2010]. ИУК один из самых мультифункциональных регуляторов роста, но, как и любой другой фитогормон, в одних процессах он действует как стимулирующий агент, в других как ингибитор, в третьих как индуктор образования других фитогормонов.

В первых работах по исследованию ауксинов было обнаружено, что они стимулируют удлинение колеоптиля, способствуют росту стволовых клеток и корней [Davies, 2004]. С тех пор в многочисленных работах была показана важная роль ауксинов в процессах роста и развития растений.

Ауксины контролируют процессы увядания и старения растений, опадания листьев, формирования плодов, ответ на патогены и абиотический стресс [Davies, 2004]. Еще в 1934 г. было замечено [Thimann, Skoog, 1934], что апикальная часть растения подавляет развитие боковых побегов, однако после декапитации ближайшие к апексу боковые побеги начинают активно расти. Это явление получило название апикальное доминирование. Ауксин контролирует ветвление побегов, регулируя уровень, транспорт и действие других сигналов, необходимых

для подавления роста почек. Одним из таких ауксинрегулируемых сигналов является цитокинин.

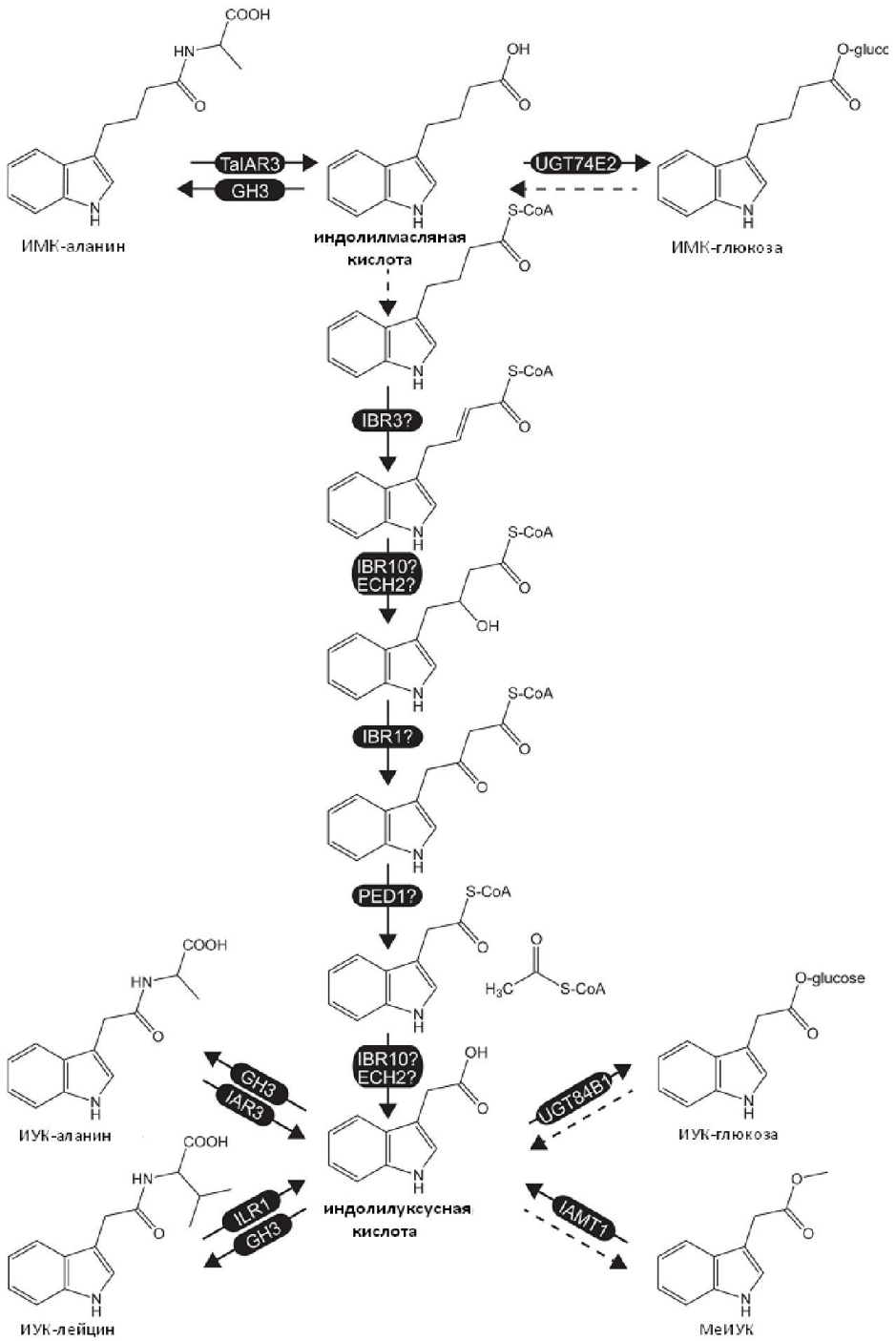

Рисунок 1.4 – Потенциальные пути биосинтеза ИУК. Сплошные стрелки – пути с идентифицированными ферментами, пунктирные стрелки – пути с неидентифицированными ферментами [Korasick et al., 2013]

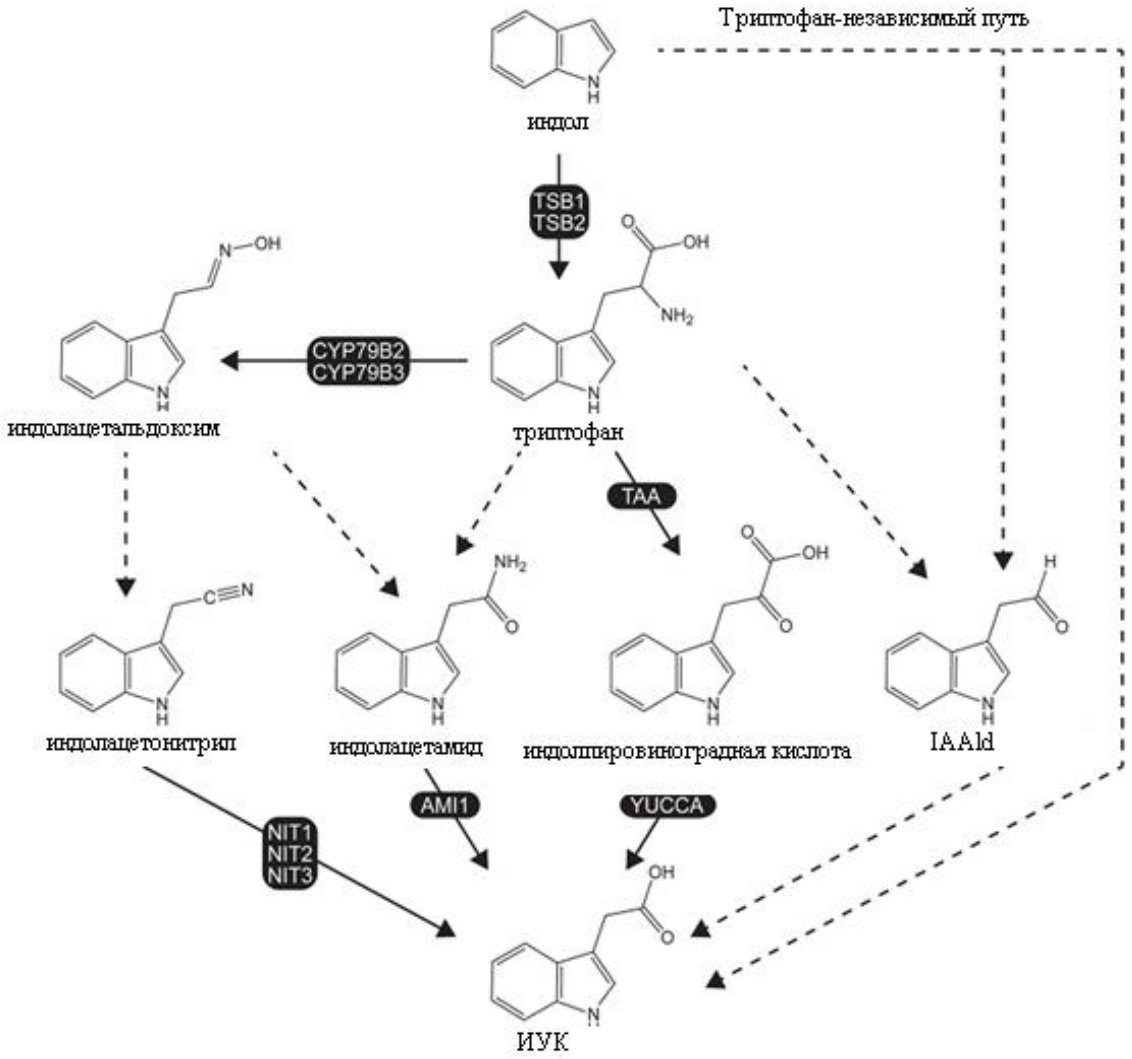

Рисунок 1.5 – Пути образования запасных форм ИУК. Сплошные стрелки – пути с идентифицированными ферментами, пунктирные стрелки – пути с неидентифицироваными ферментами [Korasick et al., 2013]

Цитокинин взаимодействует с ауксинами в потоке полярного транспорта [Li, Bangerth, 1999; Schaller, 2014]. Ауксины обеспечивают контроль полярности роста и развития растений [Woodward, Bartel, 2005], а также обусловливают направленные ростовые движения растений. Согласно теории Холодного-Вента [Trewavas, 1992], именно ауксины контролируют реакции фототропизма, геотропизма и хемотропизма. Ответ на сигналы внешней среды, такие как свет, сила притяжение Земли, питательные вещества в почве, приводящие к дифференциальному росту, обусловлены неравномерным распределением ауксина. Асимметричное накопление ауксина достигается транспортом ауксина в латеральном направлении, в который вовлечены PIN

белки [Friml et al., 2002]. Одна из важнейших функций ауксинов – стимуляция роста и развития корневой системы. Хорошо известно, что ауксины стимулируют рост главного и латеральных корней, а также увеличивают количество корешков [Davies, 2004]. Также они выступают в роли организационного центра для гормональных сигналов и сигналов внешней среды в процессах роста корневых волосков [Lee, Cho, 2013].

Морфогенетические и ростовые реакции растений в конечном счете определяются изменением числа, размеров, формы и дифференциации клеток. Наряду с цитокининами, ауксины относятся к гормонам, участвующим в контроле клеточного цикла у растений. Несмотря на то, что основными индукторами пролиферации клеток растений являются цитокинины, многие ауксины (в особенности синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) при добавлении в культуральную среду также способствуют усилению деления клеток [Лутова, 2010]. С этим связано усиление образования корней, стимуляция камбиальной активности и образования каллуса, стимуляция разрастания завязи.

Помимо количественных характеристик, ауксины отвечают за качественные изменения клеток. Одно из характерных свойств, присущих ауксинам – индукция быстрого роста клеток за счет растяжения. При добавлении ИУК в культуральную среду эффект наступает через 10 минут, приводит к 5–10 кратному увеличению темпа роста клеток и сохраняется в течение нескольких часов или дней [Evans, 1985]. В основе роста клеток растяжением лежит процесс так называемого кислого роста [Rayle, Cleland, 1992]. При кислом росте происходит растяжение клеточных стенок за счет стимуляции ауксинами работы мембранных H^+-АТФаз. H^+-АТФазы выбрасывают ионы H^+ из клетки, что приводит к закислению узкого пространства между плазмалеммой и клеточной стенкой. Под действием кислой среды происходит активация экспансинов — белков, ассоциированных с клеточной стенкой, которые разрушают водородные связи между целлюлозными микрофибриллами, что позволяет клетке расширяться под действием тургорного давления [Лутова, 2010]. Существуют и другие механизмы клеточного роста,

например, за счет увеличения плоидности клетки путем эндорепликаций. Эндорепликации образуются при нарушении клеточного цикла, когда в клетке не происходит митоз или цитокинез между циклами репликации ДНК. Эти процессы приводят к увеличению плоидности клетки и, как следствие, увеличению ее размеров [Jasinski et al., 2002]. Есть предположения [Perrot-Rechenmann, 2010], что ауксин может играть главную роль в процессах образования эндорепликаций путем модуляции регуляторов, вовлеченных в митотический и эндоциклы.

1.3.2. Цитокинины

Цитокинины – это группа фитогормонов, изначально открытая как индуктор пролиферативной активности в культурах тканей табака [Miller et al., 1955]. Первый выделенный цитокинин был назван кинетином, так как вызывал клеточное деление – cytokinesis. Эта способность дала название целому классу фитогормонов – цитокининам. По химической структуре цитокинины представляют собой N6-замещенные производные аденина [Лутова, 2010]. Они классифицируются по конфигурации их боковой цепи как изопреноидные или ароматические цитокинины (рис 1.6).

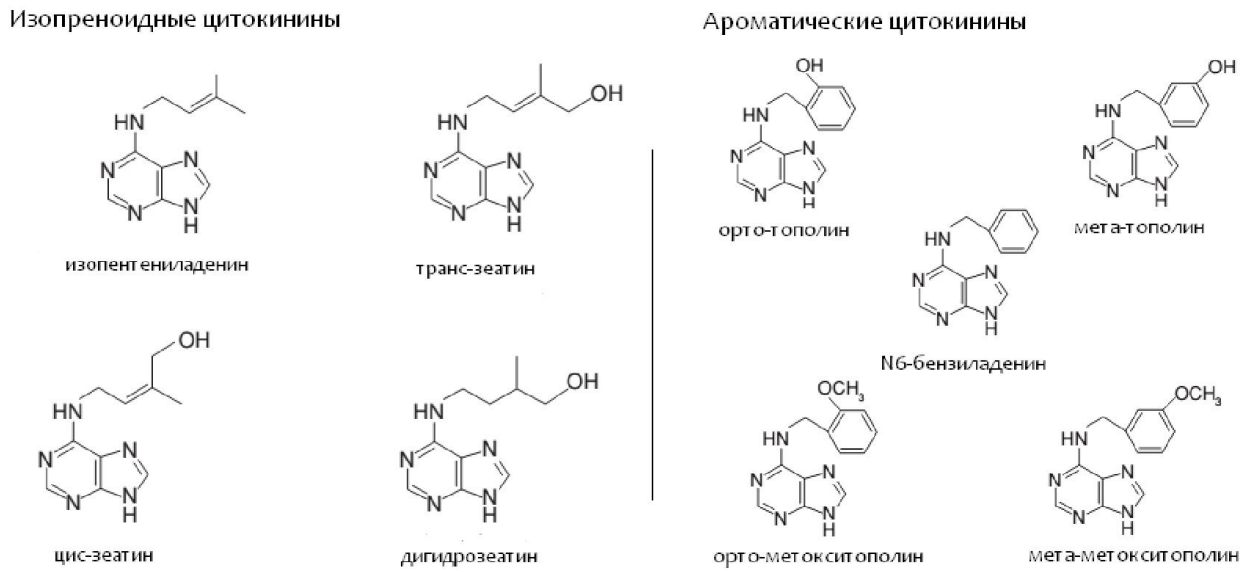

Рисунок 1.6 – Структурные формулы натуральных цитокининов [Sakakibara, 2006]

Цитокинины с ненасыщенной боковой цепью изопреноида являются наиболее распространенными, например транс-зеатин и его производные. Дегидрозеатин – аналог зеатина с насыщенной боковой цепью, был идентифицирован во многих растениях, тогда как цис-зеатин является второстепенным компонентом и содержится в растениях в небольших количествах. К синтетическим цитокининам можно отнести производное фенилмочевины тидиазурон, а также производные аденина кинетин и 6-бензилаламинопурин.

Метаболические пути цитокининов в растениях изучены достаточно подробно [Sakakibara, 2006, Kudo et al., 2010]. Известны 2 пути биосинтеза: получение цитокининов в результате деградации тРНК, а также из свободных адениновых нуклеотидов с помощью фермента изопентилтрансферазы [Hirose et al., 2008]. Основным местом биосинтеза цитокининов является апекс корня, однако они могут синтезироваться и в других органах растения, хотя и в меньших количествах [Sakakibara, 2006].

Транспорт цитокининов через плазматическую мембрану осуществляется через многофазные цитокининовые транспортные системы с помощью пуринпермеазы (PUP) и равновесных транспортеров нуклеозидов (ENT) [Cedzich et al., 2008]. Транспортировка цитокининов между органами происходит в основном с ксилемным потоком в акропетальном направлении, а также может осуществляться по флоэме по всему растению как акропетально, так и базипетально [Kudo et al., 2010].

С момента открытия цитокининов было показано, что они участвуют во многих процессах роста и развития растений. Основными их функциями являются контроль клеточного цикла и стимуляция деления клеток. Высокое содержание цитокинов обнаруживается в митотически активных областях растений, например, в апексе корня, в то время как в тканях с низкой митотической активностью содержание цитокининов крайне низкое [Mok, Mok, 1994]. Вовлеченность цитокининов в клеточный цикл отмечается на всех его стадиях,

однако наибольший вклад цитокининов отмечается на ключевом этапе клеточного цикла: переход от фазы G1 к S, который опосредован работой циклинов D класса (CYCD3) (рис. 1.7). Было показано, что применение цитокининов приводит к индукции CYCD3 в культурах клеток [Riou-Khamlichi al., 1999]. В *Arabidopsis thaliana* цитокинин регулирует экспрессию *CYCD3*, циклина, который играет ключевую роль в регуляции деления клеток растений как *in vitro*, так и *in vivo* [Soni et al., 1995].

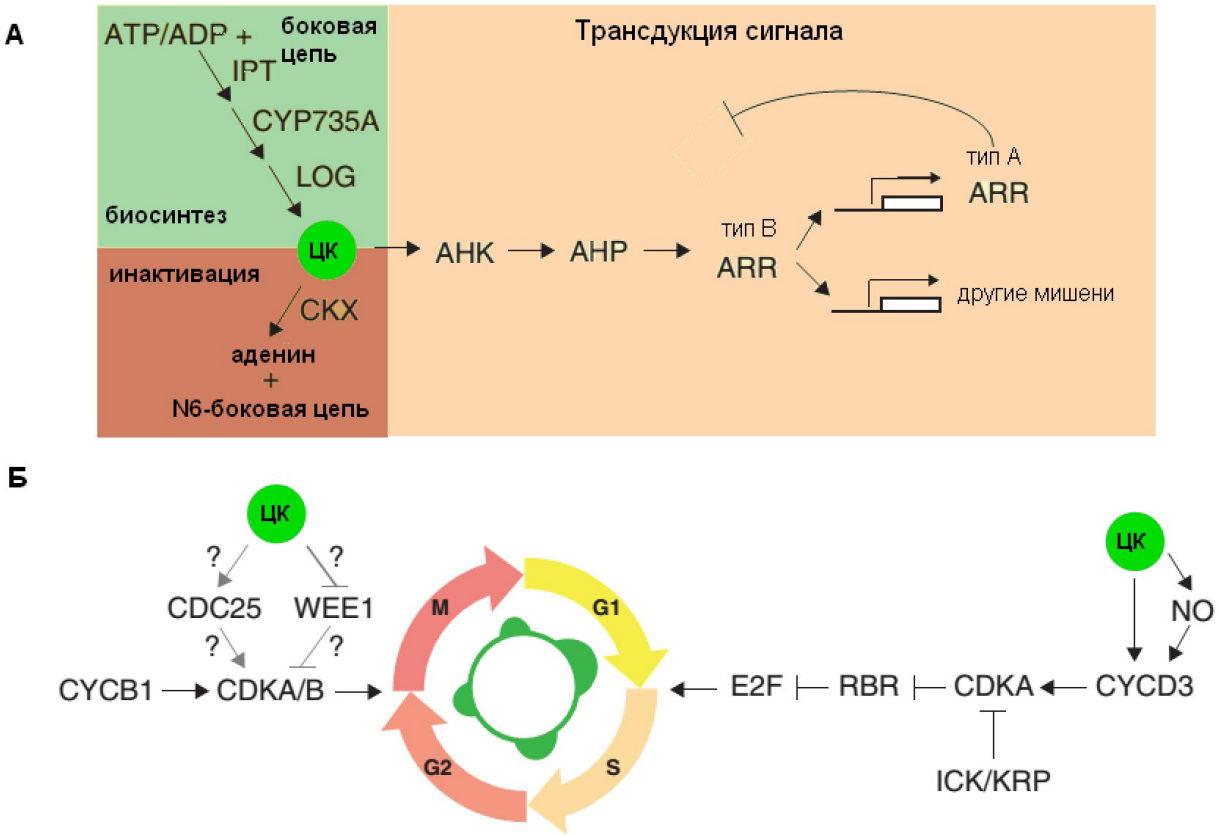

Рисунок 1.7 – Цитокинины и клеточный цикл: А) ключевые элементы биосинтеза, деградации и сигналинга цитокинина; Б) Участие цитокинина в активации клеточного цикла. ЦК – цитокинин [Schaller et al., 2014]

Важнейшей функцией цитокининов является стимуляция развития апикальной меристемы побега. Цитокинины способны инициировать рост побегов из недифференцированного каллуса [Shani et al., 2006], в мутантных растениях со сверхэкспрессией цитокининов наблюдается развитие эктопических меристем [Su et al., 2011]. Цитокинины регулируют деление клеток в апикальной

меристеме побега за счет позитивной регуляции экспрессии генов *CYCD3*, которые в основном экспрессируются в меристемах [Лутова, 2010].

Действие цитокининов в апикальной меристеме побега тесно связано с работой гомеобокс-содержащих транскрипционных факторов STM, WUS, KNAT, которые позитивно регулируют экспрессию гена биосинтеза цитокининов *IPT7* [Jackson, Hake, 1999].

Не менее известной функцией цитокининов является ингибирование развития корней. Экзогенное применение цитокинина приводит к уменьшению количества боковых корней [Li et al., 2006], мутанты с нарушенной функцией сигналинга цитокининов отличаются увеличенным количеством латеральных корней [Riefler et al., 2006], и наоборот, мутанты с повышенной чувствительностью к цитокинину характеризуются редуцированным корнеобразованием [To et al., 2004]. Цитокинины действуют непосредственно на клетки перицикла, нарушая инициацию образования латеральных корней. Ингибирование развития апикальной меристемы корня цитокининами обусловлено их способностью подавлять полярный транспорт ауксинов, которые действуют антагонистически с цитокининами в этом процессе. Цитокинины снижают экспрессию генов биосинтеза PIN белков, которые обеспечивают транспорт ауксинов, и ограничивают их распределение в корне [Dello Ioio et al., 2008].

Ингибирующая роль цитокининов на рост главного корня связана с их действием на деление и рост клеток в зоне роста корня [Schaller et al., 2014]. Подавление клеточного роста происходит из-за активации сигналинга этилена, который в свою очередь тормозит рост корня и удлинение гипокотиля [Cary et al., 1995].

Известно ингибирующее действие цитокинов в процессах старения листьев, однако до сих пор остаются не ясны детали этого явления. В работах с *A. thaliana* были идентифицированы некоторые компоненты сигнальных систем,

участвующие в регуляции ответа на старение [Zwack, Rashotte, 2013]. К ним относят рецептор цитокинина AHK3, регулятор ответа B-типа ARR2 и недавно идентифицированный фактор ответа цитокинина CRF6. Также установлено, что механизм влияния цитокининов на процесс старения листьев связан с предотвращением разрушения хлорофилла, который запускается при старении [Лутова, 2010].

Цитокинины способны регулировать ответные реакции растений на абиотический стресс [На et al., 2012], однако в литературе имеются противоречивые сведения на этот счет. Некоторые исследователи сообщали о снижении содержания цитокининов в ответ на стрессовое воздействие [Ghanem et al., 2008; Nishiyama et al., 2011], другие – о кратковременном и устойчивом повышении концентраций цитокининов при действии стрессоров [Alvarez et al., 2008; Dobra et al., 2010]. Такая противоречивость результатов предполагает сложные пути регуляции метаболизма и сигналинга цитокинина при стрессовом воздействии и требует дальнейших исследований.

Еще одной известной функцией цитокининов является регуляция поглощения растением питательных веществ из окружающей среды, включая азот, фосфор, серу и железо [Argueso et al., 2009]. Лучше всего изучено действие цитокининов на ассимиляцию азота [Sakakibara et al., 2006]. Нитраты стимулируют биосинтез цитокининов, увеличивая экспрессию гена IPT3, что в свою очередь запускает экспрессию цитокинин- и нитрат-регулируемых генов [Лутова, 2010]. Помимо этого, цитокинины способствуют развитию васкулярных систем растений [Dettmer, Helariutta, 2009], регулируют циркадные ритмы [Salomé et al., 2005], способствуют прорастанию семян [Riefler et al., 2006].

1.3.3.Абсцизовая кислота

АБК – один из пяти «классических» фитогормонов, обнаруженная в 60-х годах прошлого века двумя независимыми группами ученых, была названа абсцизин или дормин, по своей способности вызывать опадение листьев у

хлопчатника [Nambara, Marion-Poll, 2005]. Как и любой гормон растений, АБК выполняет множество функций в процессах роста и развития, однако наиболее хорошо изучена ее роль в процессах поддержания водного баланса, путем регуляции движения устьиц, стимуляция покоя семян и участие в адаптивных реакциях растений.

Наличие АБК характерно для всех видов растений, она также вырабатывается некоторыми фитопатогенными грибами, бактериями, а также животными [Nambara, Marion-Poll, 2005]. По химической структуре АБК является сесквитерпеноидом, который производится по мевалоновому пути в хлоропластах и других пластидах [Finkelstein, 2013]. В основном АБК синтезируется в растении в сосудистых пучках и замыкающих клетках устьиц [Лутова, 2010]. Биосинтез АБК может осуществляться двумя путями: прямой путь, когда грибы производят АБК из фарнезилпирофосфата, и косвенный путь, когда в растениях образуется АБК за счет деградации каротиноидов (рис. 1.8) [Nambara, Marion-Poll, 2005].

Биосинтез АБК преимущественно проходит в пластидах за исключением двух последних этапов в цитозоле, где ксантоксин превращается в АБК [Finkelstein, 2013]. Большинство ферментов биосинтеза АБК были выявлены благодаря изучению мутантных растений резуховидки Таля и кукурузы [Koornneef et al., 1998; Cheng et al., 2002; Qin, Zeevaart, 2002].

Уровень АБК в растении зависит не только от биосинтеза гормона, но и от его катаболизма. Катаболизм АБК осуществляется гидроксилированием АБК в положении 8’ с помощью ферментов АБК-8-гидроксилаз, которые кодируются семейством генов *CYP707A* [Kushiro, 2004]. Еще один способ инактивации АБК – это образование конъюгатов с глюкозой с помощью глюкозотрансферазы до образования неактивного АБК-глюкозильного эфира [Xu, 2002], однако эта реакция обратима [Lee et al., 2006].

Синтезированная в корнях АБК транспортируется по ксилеме, а синтезированная в листьях по флоэме [Davies, 2004]. Исследования функций АБК

в процессах, происходящих в плазматической мембране, показали ее важную роль в работе устьичного аппарата [Kim et al., 2010; Joshi-Saha et al., 2011; Munemasa et al., 2015]. В условиях засухи вследствие повышения pH происходит быстрое накопление АБК в листьях, что приводит к закрытию устьиц и, как следствие, уменьшению потери влаги. АБК регулирует скорость транспирации, воздействуя на устьичную апертуру как стимулируя закрытие устьичной щели, так и предотвращая ее открытие [Kim et al., 2010]. Несмотря на то, что оба эти процесса обеспечивают закрытие устьиц, достигается этот эффект разными путями, в которые вовлечены разные ионные каналы, регулируемые разными сигнальными механизмами.

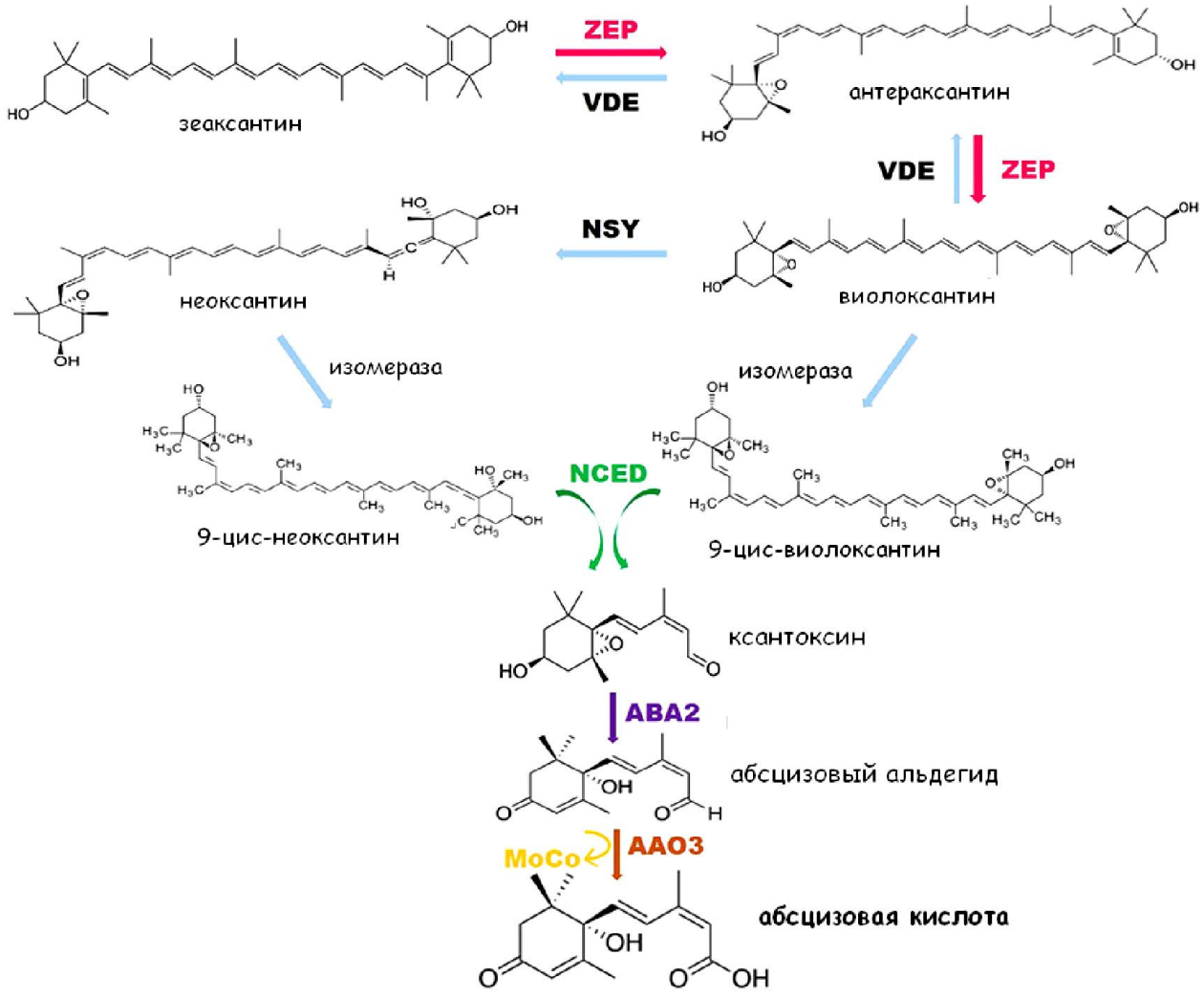

Рисунок 1.8 – Основные этапы биосинтеза АБК [Nambara, Marion-Poll, 2005]

АБК влияет на устьичную апертуру снижением гидравлической проводимости тканей сосудов листьев путем уменьшения уровней и активности аквапорина в клетках сосудистых пучков [Pantin et al., 2013]. АБК-индуцированное закрывание устьиц, опосредованное кратковременным повышением содержания ионов Ca^{2+}, влечет активацию медленных анионных каналов S-типа, которые обеспечивают выброс из клетки ионов Cl^- и NO_3^-, а также активацию быстрых анионных каналов R-типа, проницаемых для малата$^{2-}$ и SO_4^{2-} [Meyer et al., 2010]. Анионный поток деполяризует плазматическую мембрану, приводя к активации кальциевых каналов и обеспечивая отток K^+ из вакуолей тонопласта [Finkelstein, 2013]. Эти процессы влекут за собой изменения актинового цитоскелета замыкающих клеток устьиц, что приводит к их закрытию.

Основными активаторами Ca^{2+} каналов являются АФК, в частности O_2^- и H_2O_2. Уровень АФК в замыкающих клетках устьиц находится под контролем АБК за счет позитивной регуляции экспрессии генов НАДФН-оксидаз, ключевых ферментов в продукции АФК [Лутова, 2010].

АБК играет ключевую роль в процессах, происходящих на ранних этапах развития растений. Развивающиеся эмбрионы входят в стадию созревания во время перехода клеток к росту растяжением и накопления запасных веществ [Finkelstein et al., 2013]. Во время созревания семян наблюдается два пика накопления АБК: в более ранний период морфогенеза и поздний. Ранний пик предотвращает преждевременное прорастание в конце фазы деления в эмбриогенезе [Raz et al., 2001]. Более поздний пик обусловливает индукцию периода покоя семян [Rodríguez-Gacio et al., 2009]. Для покоя семян необходимо соблюдение трех основных условий: 1) прекращение влаго- и газообмена зародыша с окружающей средой, что достигается за счет образования семенной кожуры, 2) ингибирование метаболических процессов и экспрессии генов зародыша, 3) ингибирование прорастания [Лутова, 2010]. Два последних процесса находятся под контролем АБК, обусловленным активностью транскрипционного фактора ABI3 [Лутова, 2010; Khandelwal et al., 2010]. Синтезированная АБК в

поздний период созревания семян необходима для высушивания и поддержания покоя семян [Finkelstein et al., 2013]. В сухих семенах поддерживается ее высокий уровень за счет синтеза в семенной кожуре и перикарпе, и даже в семядолях у некоторых видов семян [Лутова, 2010], а во время набухания семени содержание АБК резко снижается. Несмотря на то, что АБК необходима для стимуляции периода покоя, ее высокие концентрации вовсе не обязательны для поддержания покоя [Kermode, 2005], что свидетельствует в пользу того, что АБК является не единственным сигналом в процессе поддержания покоя семян [Finkelstein et al., 2002]. АБК принадлежит ключевая роль в регуляции прерывания периода покоя семян и прорастания семени, которая рассмотрена в разделе 1.4.

Наряду с салициловой кислотой, жасмонатами и этиленом, АБК принимает участие в ответных реакциях на патогены [Grant, Lamb, 2006]. Хотя чувствительность к патогенам связывали с АБК и раньше, степень ее участия и взаимодействие с другими гормонами привлекают особое внимание. Известно, что салициловая кислота защищает растения от биотрофных и гемиобиотрофных патогенов, жасмонаты и этилен индуцируют устойчивость к некротропным патогенам [Grant, Lamb, 2006], тогда как АБК выступает в роли антагониста этих гормонов в процессах защиты от патогенов [Melotto et al., 2008]. АБК подавляет иммунитет к патогенам после их вторжения [de Torres-Zabala et al., 2007]. Уменьшение синтеза АБК или чувствительности растений к АБК за счет мутаций, либо за счет сверхэкспрессии соответствующих генов приводит к 20-80-ти кратному увеличению устойчивости к патогенам по сравнению с диким типом [Cao et al., 2011]. Однако на доинвазивном уровне АБК может защищать растения от патогенов. Дело в том, что регуляция устьичного закрытия – важный этап защиты растений от проникновения патогенов. АБК-опосредованное закрытие устьиц уменьшает проникновение патогена в апопластическое пространство; следовательно, АБК функционирует как положительный регулятор защитного ответа [Zeng et al., 2010]. Распознавание растениями ассоциированных с патогенами молекулярных структур с помощью специфических рецепторов

приводит к закрытию устьиц, тем самым ограничивая проникновение патогенов [Melotto et al., 2008].

Растения испытывают различные абиотические стрессы – повышенные концентрации солей в почве, экстремальные температуры, дефицит или избыток воды, радиационное воздействие в дозах, превышающих естественный радиационный фон. АБК известна как «гормон стресса», так как является основным регулятором ответных реакций на стрессовое воздействие [Tuteja, 2007; Wani et al., 2016]. При стрессовом воздействии уровни АБК повышаются, что ведет к мобилизации адаптивных ресурсов растения [Tuteja, 2007; Титов, Таланова, 2009]. Экзогенное применение АБК повышает устойчивость к засухе [Du et al., 2013; Yadegari et al., 2014], холодоустойчивость [Shinkawa et al., 2013], облегчает солевой стресс [Khadri et al., 2006]. Роль АБК в адаптивных реакциях опосредована АБК-зависимой экспрессией генов, необходимых в защитных реакциях, например, ферментов синтеза осмопротекторов [Fujita et al., 2011]. Исследования транскриптома показали, что более 50% регулируемых АБК генов вовлечены в ответ на засуху или засоление. В работах на *A. thaliana* выявлены 245 АБК-индуцируемых генов, из них 155 генов вовлечены в ответ на засуху, 133 гена – на засоление, 25 генов – на пониженные температуры [Seki et al., 2002]. В другой работе [Rabbani et al., 2003] исследователи выделили 73 стресс-индуцированных гена в рисе, из которых 43 гена были под контролем АБК. Эти результаты демонстрируют насколько важна сигнализация АБК в ответе на абиотический стресс.

Реакцию на стресс можно изучать в масштабах одной клетки, однако лучше рассматривать растение как целостный организм. Изучая ответные реакции растений на действие различных стрессоров особое внимание уделяют взаимодействию АБК и АФК. В оптимальных условиях АФК производятся в небольших концентрациях в митохондриях, хлоропластах и пероксисомах, однако при стрессе происходит их резкое накопление [Tuteja, 2007; Noctor et al., 2014; Baxter et al., 2014; Choudhury et al., 2016]. Одновременное накопление АБК и АФК

регистрировали при действии различных стрессоров [Verslues, Zhu, 2004]. Выявлено, что индуцированные НАДФН-оксидазой АФК участвуют в АБК-зависимом закрытии устьиц при стрессе [Verslues, Zhu, 2004]. Показано, что в растениях, предварительно обработанных ингибитором биосинтеза АБК, или в растениях-мутантах по биосинтезу АБК не происходило накопления перекисей в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах листьев в условиях дефицита воды, что свидетельствует о важной роли фитогормона в образовании АФК в ответ на повышенную температуру и окислительный стресс [Zhou et al., 2014]. АФК опосредует взаимодействие АБК и брассиностероидов с помощью сигнального пути, через который брассиностероиды стимулируют образование АФК. В свою очередь это процесс увеличивает содержание АБК, что ведет к еще большему увеличению производства АФК и повышению стрессоустойчивости.

АБК-индуцированная стрессоустойчивость связана с активацией антиоксидантной системы, включая ферментативные и неферментативные компоненты, которые защищают клетки от окислительного стресса [Zhang et al., 2014]. Предполагается, что АФК вызывает накопление АБК за счет усиления синтеза и уменьшения катаболизма [Huang et al., 2012; Song et al., 2014]. Таким образом, повышенные уровни АФК могут привести к усилению накопления АБК, тогда как повышенные уровни АБК могут привести к усилению продукции АФК, создавая положительную обратную связь.

1.4. Участие фитогормонов в процессе прорастания семян

Покой семян и их прорастание являются решающими этапами в жизни растения. У дикорастущих растений покой семян играет ключевую роль в обеспечении выживания, блокируя прорастание до тех пор, пока условия окружающей среды не станут благоприятными [Bewley, 1997]. Существует несколько типов покоя семян, которые отличаются глубиной и способами выхода из него [Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006]. Например, свежесобранные семена ячменя, не могут прорасти при температурах выше 20 °C [Leymarie et al., 2007].

Физиологический покой в семенах ячменя обусловлен высоким содержанием АБК [Millar et al., 2006; Leymarie et al., 2007; Rodriguez-Gacio et al., 2009], а также ограничением подачи кислорода зародышу из-за фиксации кислорода в результате окисления фенольных соединений в семенной кожуре [Benech-Arnold et al., 2006].

Семена, находящиеся в состоянии вынужденного покоя, характеризуются структурной, метаболической и информационной готовностью начать прорастание [Обручева, 1997]. Они содержат программу «на прорастание», которая была сформирована к концу позднего эмбриогенеза и которую семена могут реализовать даже до начала своего созревания [Обручева, 2012].

Прорастание – это сложный процесс, при котором морфологические и физиологические изменения приводят к активации эмбриона. Семена считают проросшими, как только регистрируется проклевывание кончика корня [Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006]. Помимо эндогенных факторов, семена подвержены влиянию факторов окружающей среды, таких как свет, вода, питательные вещества, температура [Bewley, 1997]. Триггерным механизмом запуска прорастания является поглощение воды семенем, которое проходит в три фазы: быстрое впитывание воды (фаза 1), медленное, называемое фаза плато (фаза 2), дальнейшее поглощение воды по мере удлинения корня и проклевывания (3 фаза) [Manz et al., 2005]. В зависимости от влажности в набухших семенах происходит активация разных систем метаболизма (рис. 1.9) [Обручева, 1997; Обручева, 2012].

Экологические факторы, влияющие на прорастание семян, также обусловливают изменения в транскриптоме, регулируя биосинтез и сигналинг фитогормонов [Finch-Savage et al., 2007]. Была продемонстрирована способность внешних сигналов регулировать гормональный обмен в семенах, а также чувствительность к гормонам [Seo et al., 2009; Nambara et al., 2010; Kim et al., 2013].

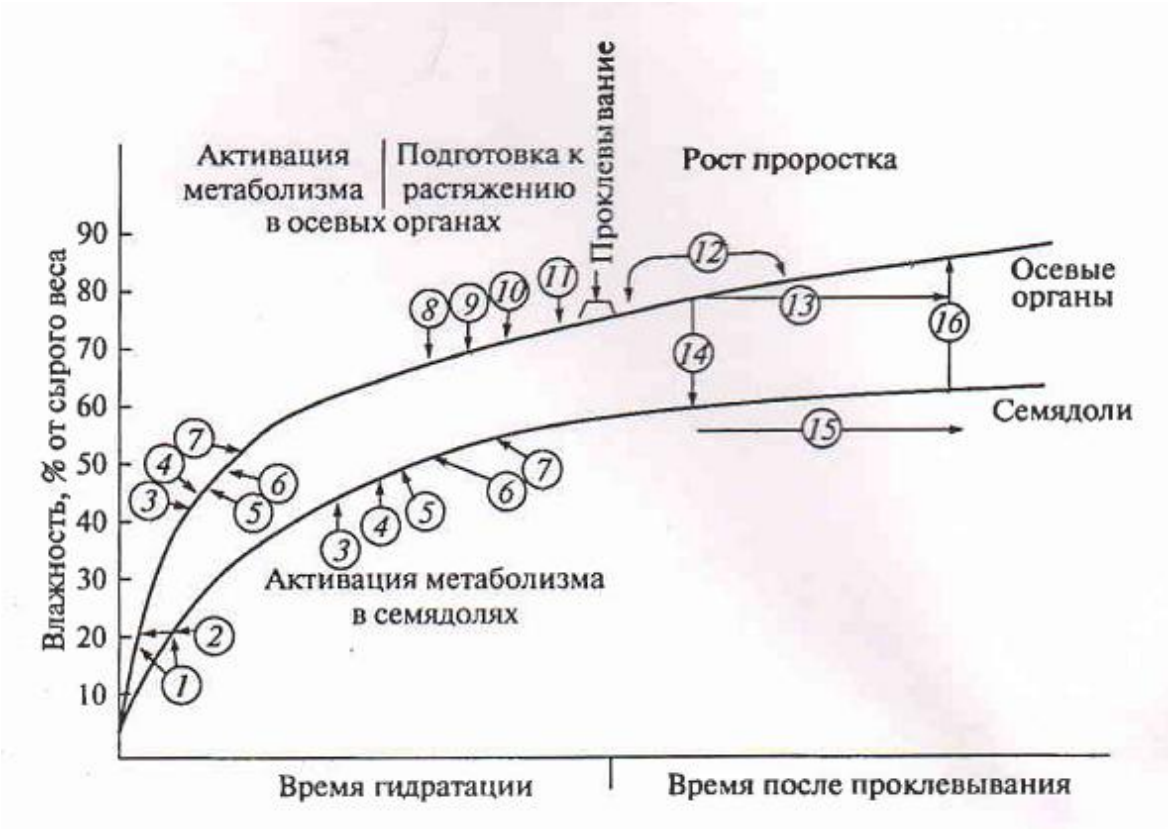

Рисунок 1.9 – Активация метаболизма и подготовка к прорастанию семян в зависимости от их влажности. Цифрами обозначены процессы, которые активируются при данных уровнях влажности; в скобках указаны виды семян. 1 – аминокислотный метаболизм (пшеница); 2 – дыхание (соя, салат); 3 – синтез мРНК (рапс, кукуруза); 4 – интенсификация дыхания (горох); 5 – гидролиз крахмала; 6 – синтез белка (пшеница); 7 – гидролиз запасных белков (горох); 8 – накопление осмотиков (бобы, каштан); 9 – вакуолизация (бобы); 10 - подкисление оболочек (бобы, каштан, пшеница); 11 – растяжение клеток; 12 – инициация делений; 13 – синтез фитогормонов; 14 – гормональный сигнал из осевых органов; 15 – мобилизация в запасных органах; 16 – приток из семядолей [Обручева, 2012]

Принято считать, что прорастание семян находится прежде всего под контролем АБК и гиббереллинов [Yamaguch et al., 2007; Seo et al., 2009], однако другие фитогормоны тоже задействованы (рис. 1.10) в этом процессе [Kucera et al., 2005; Finkelstein, 2013]. АБК рассматривается как ключевой фактор индукции и поддержания покоя семян [Nambara, Marion-Poll, 2005; Rodríguez et al., 2009; Finkelstein, 2013; Shu et al., 2016]. Во время созревания семян АБК необходима для наступления периода длительного покоя [Nambara, Marion-Poll, 2005], синтез АБК *de novo* обеспечивает поддержание покоя в спящих семенах [Kucera et al., 2005].

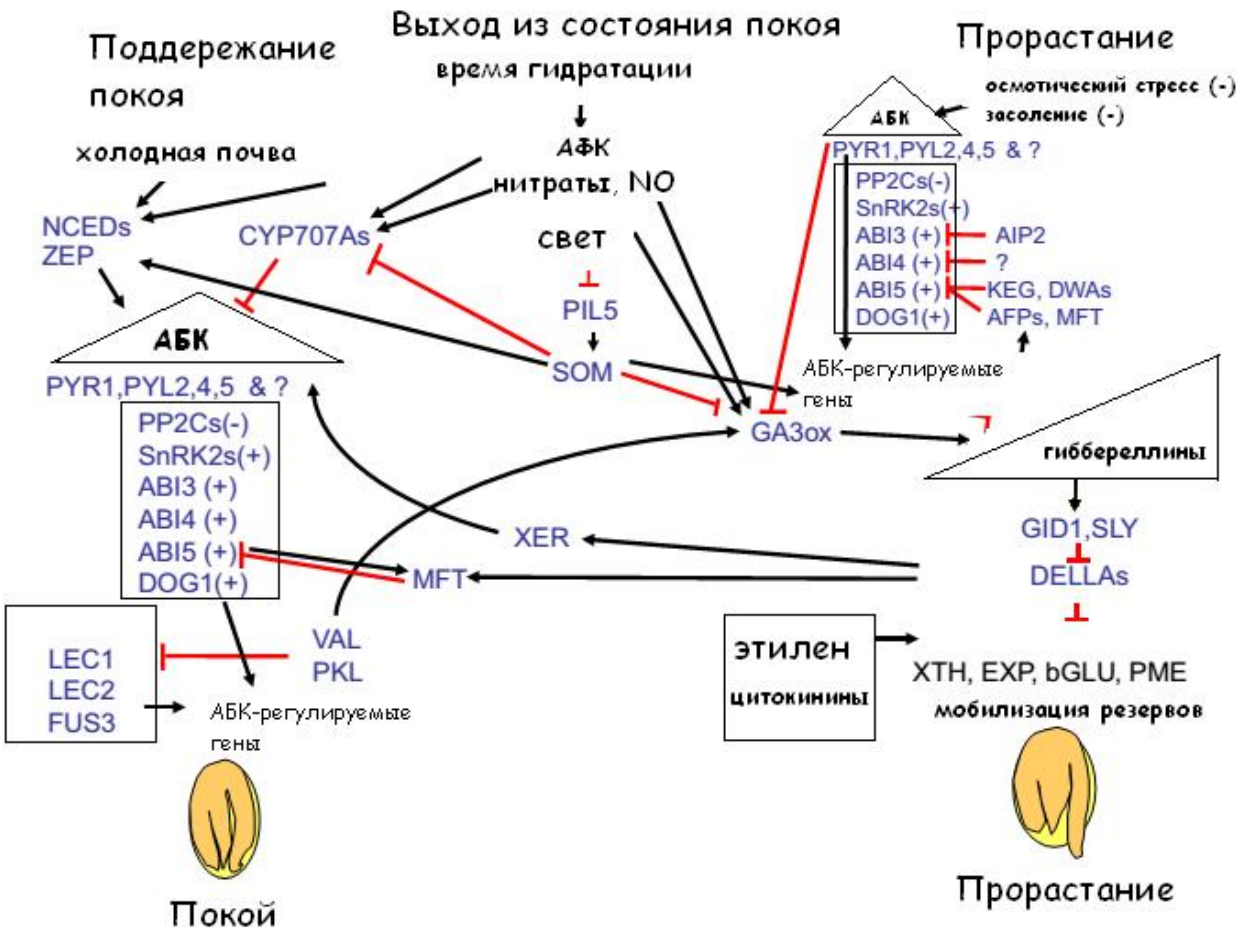

Рисунок 1.10 – Взаимодействие между гормональными и экологическими сигналами, контролирующими переход от состояния покоя семян к прорастанию [Finkelstein, 2013]

Выход из состояния покоя опосредован снижением содержания АБК в набухших семенах в результате активации катаболизма АБК и снижения активности ее синтеза [Millar et al., 2006; Jacobsen et al., 2013]. Гиббереллины способствуют выходу семян из состояния покоя и началу прорастания путем увеличения потенциала роста зародыша, активируя гидролитические ферменты алейронового слоя эндосперма [Ogawa et al., 2003; Kucera et al., 2005; Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006]. Гиббереллины синтезируются и хранятся в тканях зародыша, во время поступления воды в семя гиббереллины активно синтезируются *de novo* и переходят из связанных форм в активное состояние, вызывая размягчение структур, окружающих зародыш [Yamaduchi et al., 2000].

Исследование транскриптома ячменя во время созревания и прорастания семян показало [Sreenivasulu et al., 2008], что гены биосинтеза АБК и гиббереллинов экспрессируются как на этапе созревания семян, так и на этапе прорастания. Предположительно синтезированные гиббереллины на стадии созревания семян хранятся в алейроновом слое и действуют во время прорастания (рис. 1.11). При переходе к прорастанию транскрипционная активность растет в тканях зародыша, но не в эндосперме. Были обнаружены 1200 транскриптов, хранящихся в эмбрионах сухих семян ячменя, многие из которых активируются во время прорастания.

Роль сигналинга гиббереллинов в процессах высвобождения из состояния покоя у зерновых культур менее понятна и изучена по сравнению с АБК. Период после созревания семян характеризуется не накоплением активных гиббереллинов, а накоплением их предшественников, что обеспечивает увеличение потенциала синтеза гиббереллинов [Jacobsen et al., 2002]. В ячмене уровень активных гиббереллинов не увеличивается до тех пор, пока не произошло набухание.

В экспериментах с мутантными растениями было показано, что гиббереллин-дефицитные растения не могут прорасти без применения экзогенных гиббереллинов. Прорастание нормальных растений может быть прекращено с помощью ингибиторов синтеза гиббереллинов. С другой стороны АБК-дефицитные мутанты могут прорастать даже при отсутствии гиббереллинов [Bentsink, Koornneef, 2002].

Прорастание семян характеризуется активацией катаболизма АБК и подавлением ее синтеза. У многих видов растений эти механизмы контролируют гены 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (*NCED*) и АБК-8-гидроксилазы (*ABA8'OH*) [Nambara et al., 2010]. В ячмене *HvNCED1* контролирует первичный покой при воздействии голубого света [Gubler et al., 2008] и гипертермии [Leymarie et al., 2008], тогда как экспрессия *HvNCED2* индуцирует первичный покой [Chono et al., 2006] и поддерживает вторичный [Leymarie et al., 2008]. Ген

HvABA8'OH непосредственно контролирует катаболизм АБК, опосредуя прерывание покоя семян ячменя [Chono et al., 2006; Millar et al., 2006].

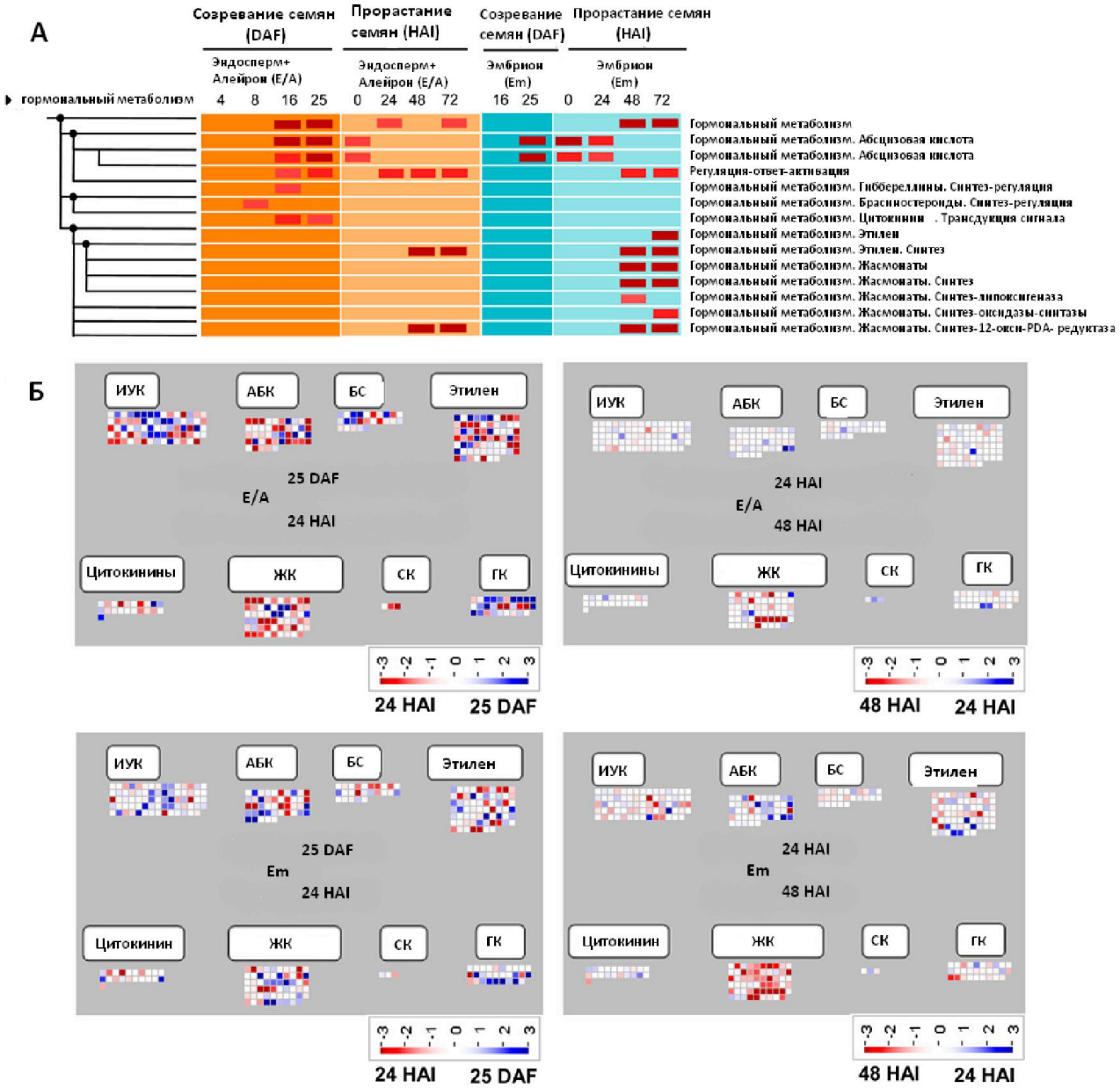

Рисунок 1.11 – А – изменения категорий генов биосинтеза фитогормонов в разных частях семени на этапах созревания и прорастания. В – транскрипционная активность генов метаболизма и сигналинга фитогормонов на этапах позднего созревания семени и прорастания. DAF – созревание семян, HAI – прорастание семян, E/A – эндосперм+алейрон, Em – эмбрион, БС – брассиностероид, ЖК – жасмоновая кислота, СК – салициловая кислота, ГК – гиббереллин [Sreenivasulu et al., 2008]

В прорастающих семенах усиливается экспрессия генов, кодирующих ферменты биосинтеза Ga-20-оксидаз и Ga-3-оксидаз (*GA20ox* и *GA3ox*), однако

это явление у ряда видов ограничивается только тканями зародыша [Kaneko et al., 2003]. Таким образом, зародыш является местом биосинтеза гиббереллинов и их действия, а алейроновый слой лишь местом ответа [Gupta, Chakrabarty, 2013]. Синтезированные в эмбриональной ткани активные гиббереллины транспортируются в алейроновый слой зародыша и индуцируют синтез гидролитических ферментов [Gubler et al., 1995], которые обеспечивают лизис запасных макромолекул эндосперма (рис. 1.12).

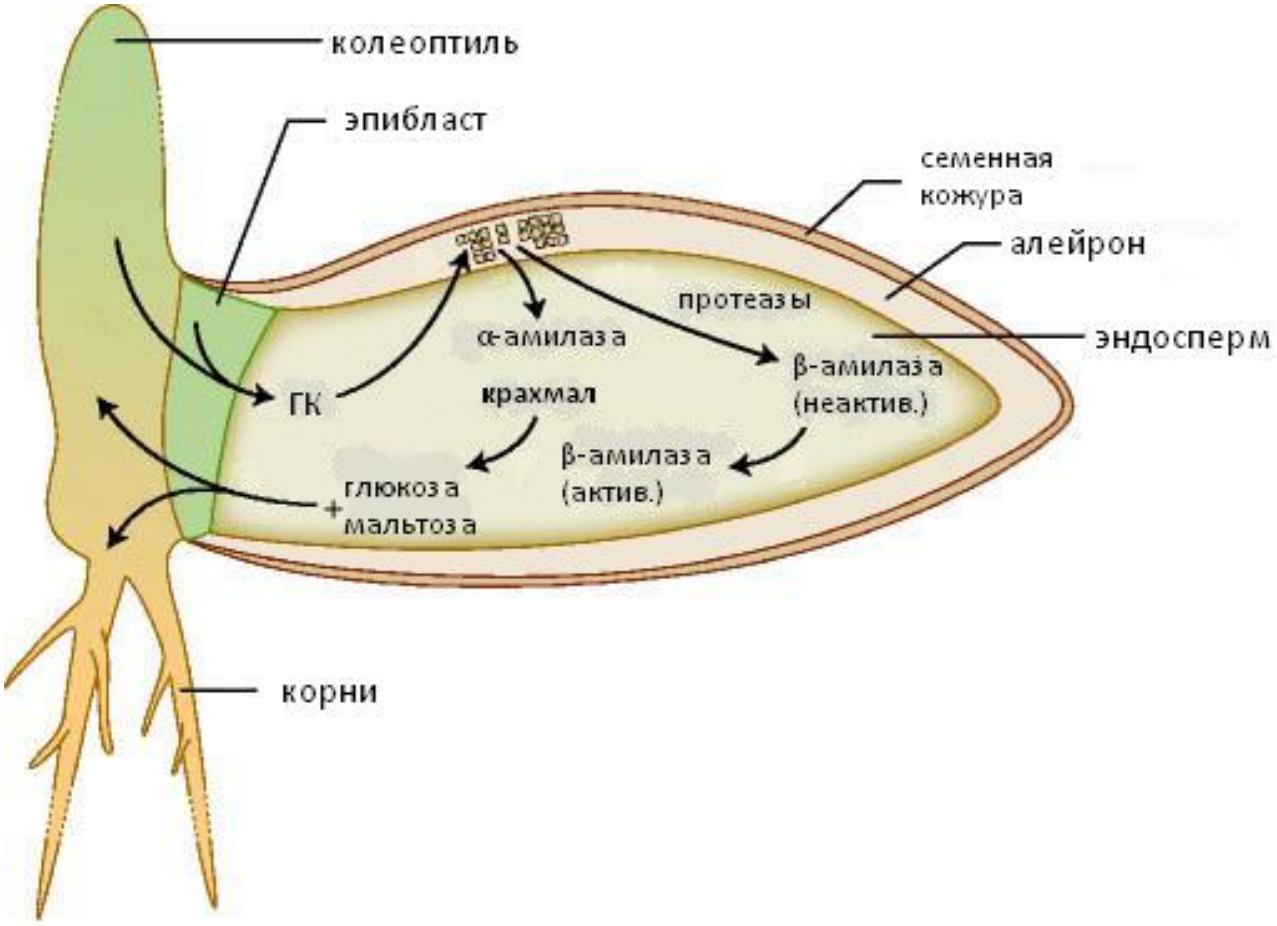

Рисунок 1.12 – Активация гидролитических ферментов в семени ячменя под действием гиббереллинов. ГК - гиббереллины [Bewley et al., 2013]

Основную гидролитическую функцию в эндосперме выполняют α- и β-амилазы: β-амилазы гидролизуют крахмал до олигосахаридов, которые затем превращаются в мальтозу с помощью α-амилаз [Лутова, 2010; Bewley et al., 2013]. Экспрессия генов, кодирующих α-амилазу, может быть активирована гиббереллинами с помощью транскрипционных факторов SLN1 и GAMYB [Gubler et al., 2002]. Существует предположение, что лизис запасных веществ

эндосперма может сам по себе явиться индуктором прекращения периода покоя у семян, так как получаемые при этом моно- и дисахариды используются как сигнальные молекулы в клетках растений [Лутова, 2010]. С другой стороны АБК подавляет синтез α-амилазы с помощью АБК-индуцированной протеинкиназы PKABA1, которая репрессирует транскрипцию генов *GAMYB* [Gómez-Cadenas et al., 2001].

В процессе прорастания семян критическую роль играет антагонистическое взаимодействие АБК и гиббереллинов [Jacobsen et al., 2002; Toh, 2008; Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006]. На данный момент не до конца изучен механизм этого взаимодействия, однако показана вовлеченность АФК в метаболизм и сигналинг обоих гормонов на ранних этапах онтогенеза [Oracz et al., 2007; Bailly et al., 2008; Liu et al., 2010; Oracz et al., 2016], что указывает на важнейшую роль АФК как посредника во взаимодействии АБК и гиббереллинов в процессе прорастания.

Ауксины являются ключевыми регуляторами процессов эмбриогенеза [Kucera et al., 2005], однако их роль в процессе прорастания семян не до конца ясна. Во время прорастания ИУК переходит из конъюгированного состояния в свободное, достигая пика во время набухания [Ljung et al., 2001]. Содержание свободной ИУК уменьшается в момент прорастания, синтез *de novo* активизируется в проростках [Kucera et al., 2005]. Возможно, сама ИУК непосредственно не участвует в процессе прорастания, но она взаимодействует с ключевыми регуляторами прорастания АБК и гиббереллинами [Miransari, Smith, 2014].

Цитокинины регулируют множество важных этапов в жизнедеятельности растений, в том числе и прорастание семян. Они активны на всех стадиях прорастания. Предполагается, что цитокинины накапливаются в эндосперме и обеспечивают деление клеток зародыша [Mok, Mok, 2001]. Во время прорастания цитокинины могут перераспределяться в районы, где происходит активный рост, например в меристему корешка. Именно в период разрыва корешком семенной

кожуры наблюдается пик цитокинина [Kucera et al., 2005]. Прорастание семян стимулируется красным светом с помощью фоторецепторов А и В [Bentsink, Koornneef, 2002]. Цитокинины способны заменить красный свет, стимулируя прорастание в темноте [Riefler et al., 2006]. Роль цитокининов в процессе прорастания семян может быть обусловлена их взаимодействием с другими фитогормонами. В работе [Chiwocha et al., 2005] на мутантах по этиленовым рецепторам было показано, что нечувствительные к этилену растения отличались пониженным содержанием активных цитокининов за счет их конъюгации. В условиях стресса цитокинины способствуют прорастанию путем усиления синтеза этилена [Matilla, 2008]. В работе [Wang et al., 2011] с мутантами, нечувствительными к АБК, показано, что в процессах прорастания цитокинины взаимодействуют с АБК антагонистически за счет того, что транскрипционные регуляторы цитокининов негативно регулируют трансдукцию сигнала АБК. Цитокинины контролируют процесс прорастания семян в стрессовых условиях (засоление почв, дефицит воды, тяжелые металлы) [Wang et al., 2011]. Контроль уровня цитокининов осуществляется благодаря ферментам цитокининоксидазе и дегидрогеназе, которые их дезактивируют, катализируя реакцию расщепления ненасыщенных связей [Galuszka et al., 2001].

1.5. Заключение

Анализ литературных источников демонстрирует накопленный обширный экспериментальный материал о радиобиологических эффектах, индуцированных у растений действием ИИ. Особый интерес представляют ответные реакции растений на низкодозовое облучение семян, в этом случае наблюдается стимуляция прорастания семян и развития проростков. Наблюдаемые изменения ростовых процессов относятся к адаптивным реакциям растений и имеют общебиологическое значение, т.е. являются отражением универсальных защитных механизмов. Выяснение этих механизмов, лежащих в основе адаптивных реакций растений к действию факторов абиотической природы, является актуальной задачей фундаментальной биологии.

На основании обобщения результатов радиобиологических исследований и анализа экспериментального материала можно сделать вывод о том, что в большинстве работ, посвященных исследованию ответных реакций растений на облучение, основные усилия направлены на изучение фенотипических признаков – морфометрических параметров и структуры урожая. При этом механизмы формирования наблюдаемых эффектов остаются нераскрытыми. В связи с этим особую актуальность имеет проведение биохимических и молекулярно-генетических исследований, направленных на выявление изменений в функциональных системах организма растений и их генетической регуляции в условиях действия низких доз излучения.

Ключевую роль в ответе растений на действие ИИ многие исследователи отводят гормональной системе. Фитогормоны регулируют все процессы жизнедеятельности растений, включая прорастание семян и адаптивные реакции. От метаболизма фитогормонов и соответственно их баланса зависит функциональное состояние растения, определяющее его рост и развитие. Таким образом, анализ литературы подтверждает целесообразность и актуальность задач исследования:

1. Оценить влияние γ-облучения семян ячменя на содержание основных классов фитогормонов и их соотношение в разных органах проростков, облученных в широком диапазоне доз.

2. Выявить взаимосвязь изменений в гормональной системе с морфофизиологическими параметрами облученных растений ячменя.

3. Проанализировать изменение транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты метаболизма гиббереллинов и АБК в зародышах воздушно-сухих семян в первые 30 часов прорастания после облучения в широком диапазоне доз.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования был выбран ячмень яровой (*Hordeum vulgare* L.), являющийся древнейшей сельскохозяйственной культурой. Посевы ячменя в мире занимают четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы и составляют около 60 миллионов гектаров [Репко и др., 2015]. Помимо того, что ячмень является важнейшей сельскохозяйственной культурой, он также является одним из наиболее изученных видов высших растений. Как объект генетических исследований, ячмень характеризуется рядом биологических преимуществ перед другими видами – диплоидной природой и небольшим числом относительно крупных хромосом (2 n = 14), почти клейстогамным типом опыления и легкостью гибридизации [Лоскутов, 2007]. У ячменя расшифрован геном, установлена локализация генов и составлены карты хромосом. В экспериментах использовали семена ячменя сорта Нур (первая репродукция, элита) урожая 2013-2017 гг.

2.2. Условия облучения и проращивания семян

Для экспериментов использовали воздушно-сухие семена ячменя влажностью 13-15 %. Для равномерности распределения поглощенной дозы семена помещали в полиэтиленовые пакеты по 150 штук в каждом. Облучение проводили на гамма-установке ГУР-120 с источником излучения ^{60}Co (ВНИИРАЭ, Обнинск). Дозу излучения оценивали с помощью дозиметра ДКС-101 (Россия) (Политехформ-М, паспортная относительная погрешность измерений 4 %). Мощность дозы регулировали расстоянием от источника излучения, во всех экспериментах она была одинакова – 60 Гр/час. Для анализа содержания основных классов фитогормонов использовали дозы 4, 8, 12, 16, 20 и 50 Гр. Для исследования транскрипционной активности генов метаболизма

фитогормонов использовали дозы 4, 10, 16, 20 и 50 Гр. В ранее проведенной работе [Гераськин и др., 2015] выявлен диапазон доз и параметры облучения, которые индуцируют устойчивые стимулирующие эффекты у растений ячменя сорта Нур, а именно: диапазон доз 8-20 Гр, мощность дозы облучения 60 Гр/ч. 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 °С ± 0.5 °С без освещения.

2.3. Анализ содержания фитогормонов методом ВЭЖХ

Качественное и количественное определение основных классов фитогормонов проводили в одной пробе методом ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования менее чем за один час. За основу была взята методика одновременного определения нескольких фитогормонов в кокосовой воде методом ВЭЖХ [Ma at al., 2008]. Для исследования в методику были внесены модификации на всех этапах пробоподготовки и хроматографического анализа, учитывающие особенности объекта исследования, условия эксперимента, а также характеристики оборудования.

Так как интенсивность биохимических реакций растения подвержена суточным и онтогенетическим колебаниям [Davies, 2004], определение фитогормонального статуса необходимо проводить в динамике прорастания семян и роста проростков. Анализ фитогормонов проводили с 3-х по 7-е сутки прорастания. На 3-и сутки для эксперимента использовали проростки целиком, начиная с 4-х суток проростки делили с помощью скальпеля на побеги и корни, которые анализировали отдельно. Было проанализировано 486 хроматограмм и обработано 1944 хроматографических пика. Для постановки и апробации методики исследовано 152 хроматограммы.

2.3.1. Пробоподготовка

Экстракцию фитогормонов проводили в одно и то же время суток для исключения влияния периодических колебаний концентраций фитогормонов на результаты эксперимента. Навеску растительного материала массой 1 г (15-80 проростков в зависимости от дня прорастания) гомогенизировали в фарфоровой ступке в 1 мл подкисленного до pH 3.5 80 % метанола (HPLC Gradient Grade, T. J. Baker, Нидерланды), охлажденного до 4 °С. К гомогенату добавляли 2 мл того же раствора. Для уменьшения окислительной деградации фитогормонов во время экстракции использовали антиокислители: 100 мкл 0.1 % раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты, 300 мкл 0.1 % раствора 2-меркаптоэтанола на 3 мл экстрагирующего раствора. После этого суспензию подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 минуты, используя ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls mini 20 (BANDELIN, Германия). Во избежание нагрева при соникации стаканчик с суспензией помещали в емкость со льдом. После обработки суспензию переносили в 3 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 14500 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.

2.3.2. ТФЭ

ТФЭ (неудерживающую) проводили на приборе VacMaster-20 (Biotage, Норвегия) с использованием SPE колонок Biotage – ISOLUTE C18 (1 мл). Для сольватации колонки через нее пропускали 1 мл метанола, для уравновешивания - 1 мл 0.1 % раствора уксусной кислоты. Использованная в эксперименте ультрачистая вода была приобретена у компании Panreac. Экстракцию проводили

при давлении 0.35 бар. Скорость прохождения жидкости через колонку регулировали запорным краном установки. На этапах активации скорость потока через колонку составляла 0.5 мл/мин. После этого в колонку порционно вводили весь объем супернатанта, уменьшив скорость потока до 0.2 мл/мин. Очищенную фракцию собирали в стаканчики, помещенные в стеклянную камеру установки. Стаканчики с очищенным экстрактом ставили на водяную баню и выпаривали 7 минут при температуре 80 ^{o}C.

2.3.3. 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 (A) – метанол; растворитель (B) - 0.1 % раствор уксусной кислоты (10:90). Температура термостата колонки составляла 35 ˚C, 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, представленные в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Режим градиентного элюирования для анализа фитогормонов

Время, (мин)	Метанол, (%)	0.1 % уксусная кислота, (%)
0.01	10.0	90.0
5	10.0	90.0
7	20.0	80.0
10	30.0	70.0
20	30.0	70.0
25	35.0	65.0
35	45.0	55.0
45	45.0	55.0
50	95.0	5.0
55	95.0	5.0
60	5.0	95.0

Анализ проводили в трех повторностях (3 навески растительного материала на 1 экспериментальную точку), каждый образец анализировали дважды для устранения инструментальных ошибок.

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu). Для идентификации и количественного анализа применяли метод внешних стандартов, основанный на соотнесении пиков проб и стандартов. Для построения калибровочных графиков использовали стандарты фитогормонов (рис. 2.1-2.4), полученные от Sigma-Aldrich (США). Стандарты разводили в метаноле в концентрациях 5-1000 мкМ.

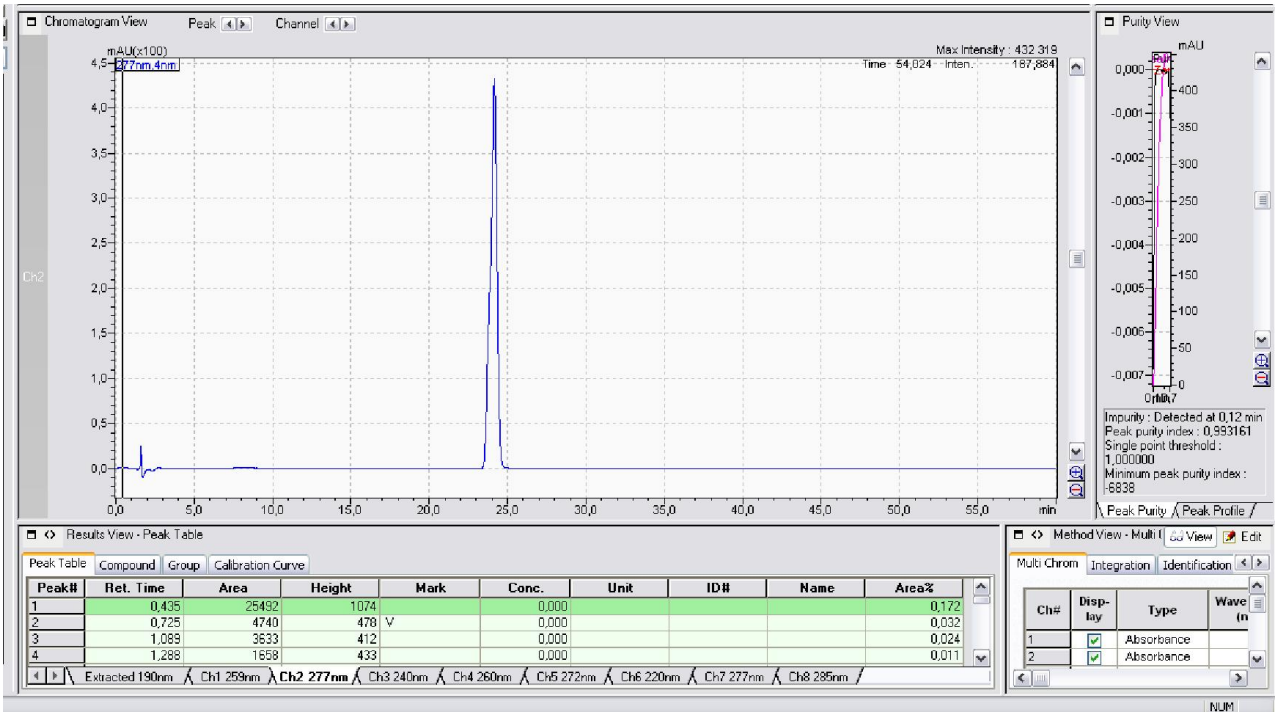

Рисунок 2.1 – Хроматограмма стандарта ИУК с концентрацией 1000 мкМ, длина волны 277 нм, время удержания (tR) – 24.1 мин

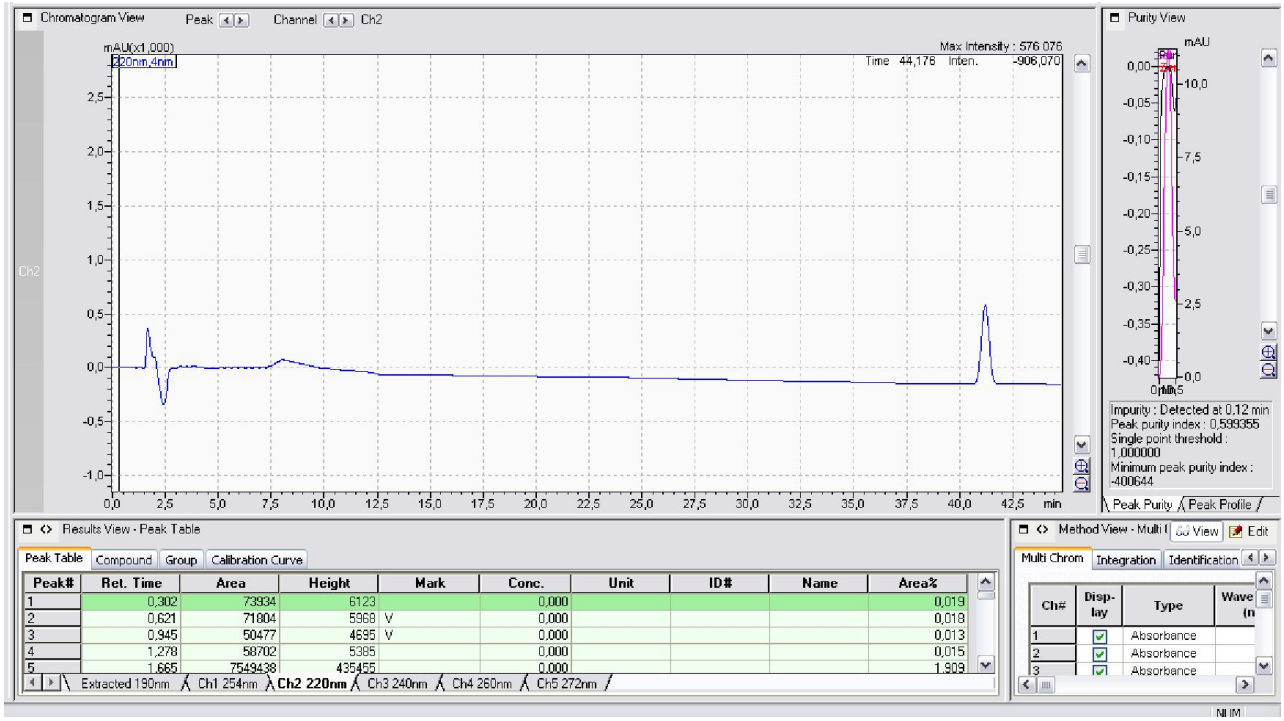

Рисунок 2.2 – Хроматограмма стандарта ИМК с концентрацией 1000 мкМ, длина волны 220 нм, время удержания (tR) – 41.1 мин

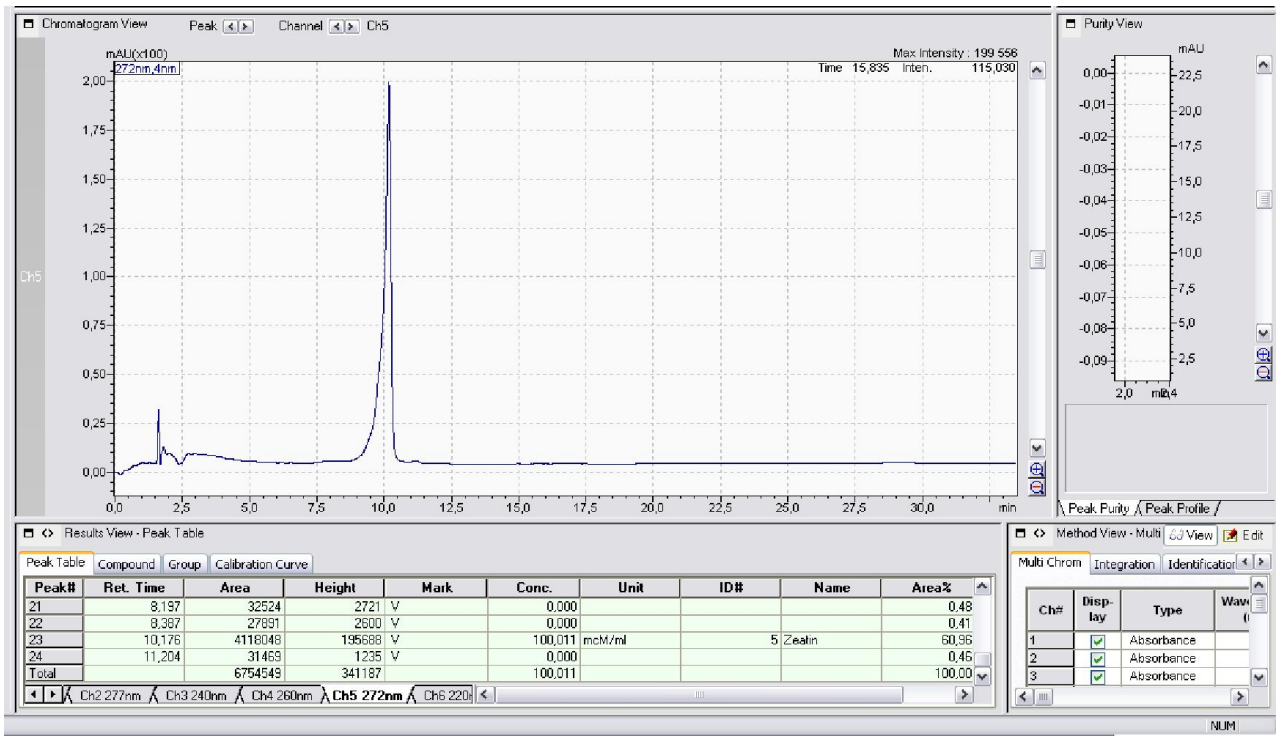

Рисунок 2.3 – Хроматограмма стандарта зеатина с концентрацией 100 мкМ, длина волны 272 нм, время удержания (tR) – 10.1 мин

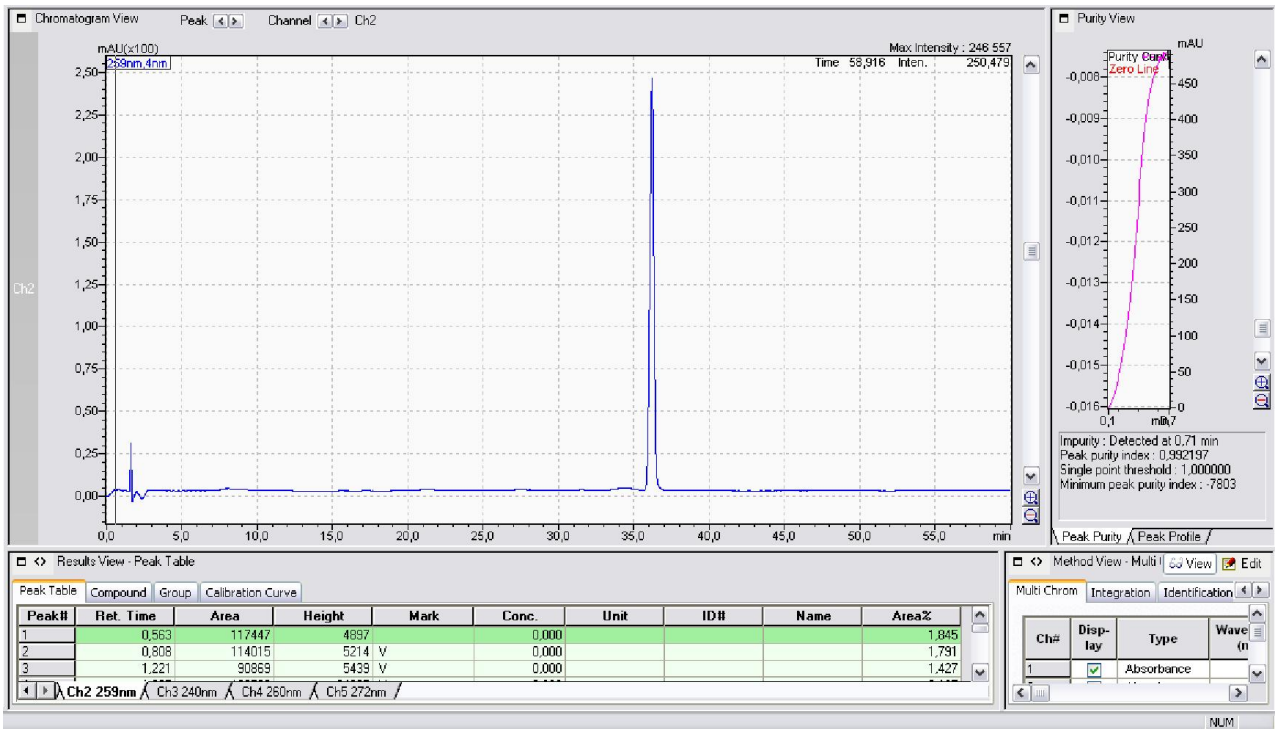

Рисунок 2.4 – Хроматограмма стандарта АБК с концентрацией 100 мкМ, длина волны 259 нм, время удержания (tR) – 36.1 мин

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

Для исследования транскрипционной активности генов метаболизма фитогормонов использовали воздушно-сухие семена и после проращивания в рулонах с дистиллированной водой. Время экспозиции во влажной среде при температуре 20 °С составляло 6, 12, 18, 24 и 30 ч. Для эксперимента было поставлено и проанализировано 3096 реакций.

2.4.1. Экстракция РНК

Для каждой экспериментальной точки из 20 семян в трех биологических повторностях (60 семян на точку) извлекали зародыши, используя скальпель и препаровальную иглу, и фиксировали в жидком азоте до экстракции. Зародыши гомогенизировали до порошкообразного состояния в жидком азоте. Выделение РНК осуществляли при помощи набора для одновременного выделения ДНК, РНК и белка NucleoSpin TriPrep фирмы Macherey-Nagel согласно протоколу

производителя. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли при помощи набора реактивов MMLV RT Kit фирмы Евроген. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop и флуориметра Qubit 2.0 с использованием наборов реактивов для флуориметрического измерения концентрации ДНК и РНК фирмы Invitrogen согласно протоколу производителя.

2.4.2. ОТ-ПЦР в реальном времени

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. У ячменя данный ген входит в число наиболее стабильных генов домашнего хозяйства в условиях биотических и абиотических стрессов и рекомендуется к использованию в качестве референтного при исследовании транскрипционной активности [Jarošova, Kundu, 2010]. В качестве праймеров использовали последовательности, приведенные в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Олигонуклеотидные последовательности, используемые для анализа экспрессии генов.

Ген	Праймер F	Праймер R	Источник
18SrRNA	GTGACGGGTGACGGAGAATT	GACACTAATGCGCCCGGTAT	Jarosova and Kundu, 2010
HvGa3ox2	TGGTAGCTTAGCTGAGGTAGCTAGGA	TTGGCTAGCTGCAGATGTAGAAC	Gubler et al., 2008
HvGa2ox3	GAGAGCAGAGCCTGTACAAG	TGGCTACCTGTGGAAGTGAG	Gubler et al., 2008
HvNCED1	CCAGCACTAATCGATTCC	GAGAGTGGTGATGAGTAA	Millar et al., 2006
HvABA8'OH-1	AGCACGGACCGTCAAAGTC	TGAGAATGCCTACGTAGT	Millar et al., 2006

Реакции проводили в объеме 20 мкл с первичной денатурацией в течении 10 мин. при 95 °С, затем 50 циклов с тремя температурными полками: 94 °С 20 сек., 60 °С 20 сек., 72 °С 20 сек. Детекция накопления продуктов амплификации проводилась автоматически, на стадии отжига праймеров (60 °С) каждого цикла (рис. 2.5).

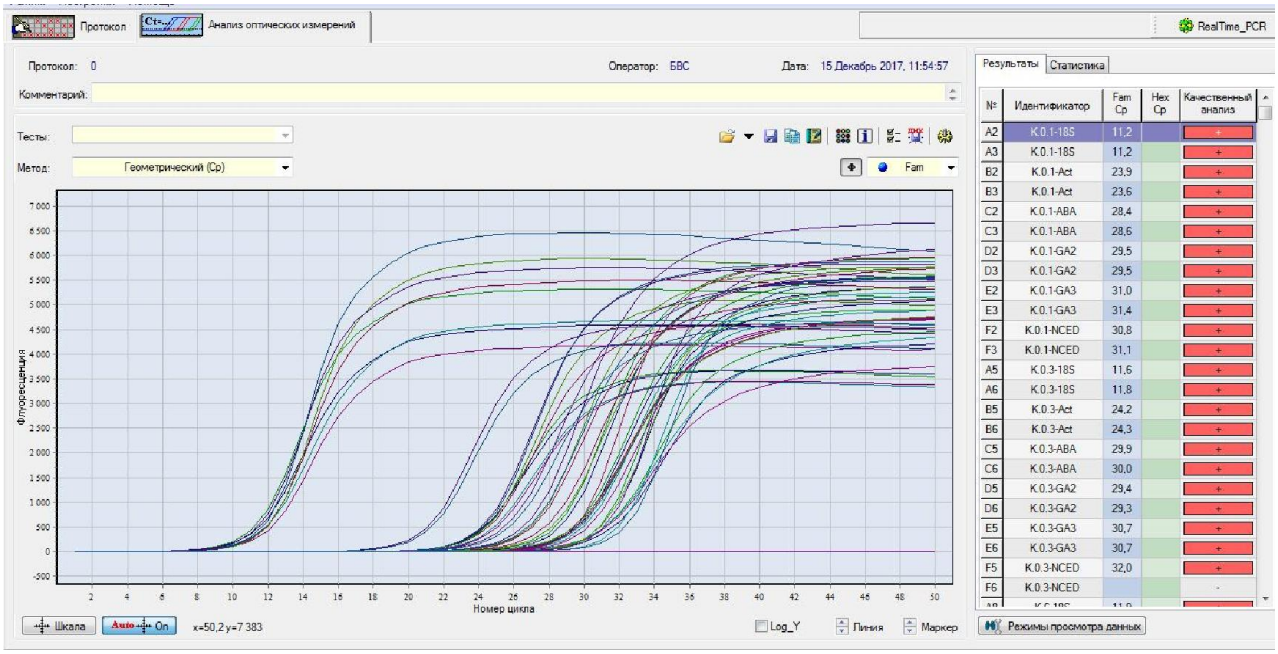

Рисунок 2.5 – Кинетические кривые накопления продуктов ПЦР

Все реакции проводили в трех повторах (триплетах) для каждой матрицы кДНК. В случае, если значения порогового цикла реакции (Ct) в триплете различались на 0.5 и более, результаты по данному триплету признавали недействительными, и реакцию для данной матрицы проводили повторно. Пороговую линию выставляли автоматически в среде специализированного программного обеспечения фирмы ДНК-Технология. После получения для каждой матрицы значений Ct по референтному гену и Ct по исследуемому гену вычисляли значение ΔCt по формуле:

$$Ct_{реф} - Ct_{ген} = \Delta Ct \qquad (1)$$

где:

$Ct_{реф}$ – значение Ct референтного гена (в данном случае *18SrRNA*),

$Ct_{ген}$ – значение Ct исследуемого гена.

Перевод полученных значений в условные единицы транскрипционной активности проводили по методике [Livak, Schmittgen, 2001].

Уровень транскрипционной активности был равен: $2^{-\Delta Ct}$

2.5. Статистический анализ экспериментальных данных

Анализ экспериментальных данных проводили, используя непараметрическую статистику 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 III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Влияние γ-облучения семян ячменя на фитогормональный статус проростков

3.1.1. Влияние γ-облучения семян ячменя на эндогенное содержание ИУК в разных органах проростков

В 3-х дневных проростках, выросших из облученных семян, эндогенное содержание ИУК было статистически значимо увеличено при всех дозах облучения (рис. 3.1). Максимальные концентрации, превышающие контрольные значения в 10 раз, были зафиксированы при дозах 8 и 16 Гр.

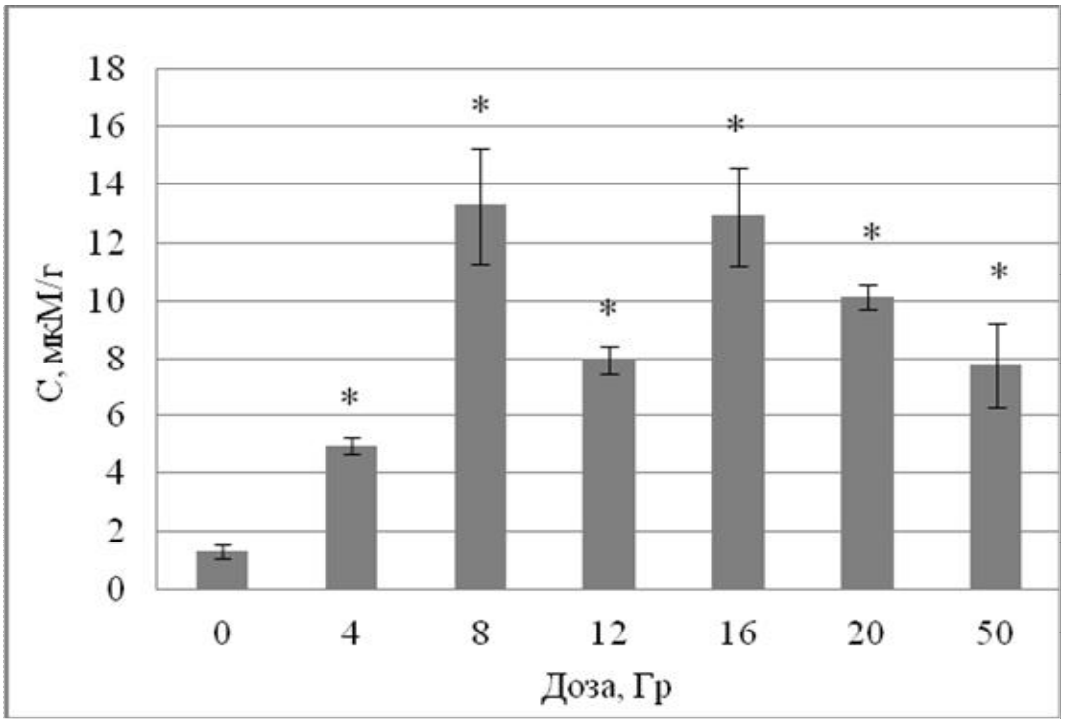

Рисунок 3.1 – Влияние γ-облучения на содержание ИУК в 3-х дневных проростках ячменя

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

Как в интактных, так и в облученных стимулирующими дозами (4-20 Гр) проростках содержание ИУК выше в корнях, чем в побегах. Причем в побегах (рис. 3.2) контрольных растений концентрации ИУК с течением времени

статистически значимо увеличивались, а в корнях (рис. 3.3) преимущественно уменьшались. Благодаря этому значения концентраций ИУК в побегах и корнях контрольных растений с течением времени сближались. В проростках, облученных дозой 50 Гр семян, такой закономерности не наблюдалось, к тому же содержание фитогормона на 4-е и 6-е сутки прорастания было выше в корнях, нежели в побегах (табл. 3.1). Максимальная концентрация ИУК была зафиксирована на 3-и сутки прорастания. Начиная с 4-х, концентрация ИУК как в корнях, так и в побегах, облученных дозой 50 Гр семян, резко упала, а соотношение концентраций ИУК в побегах и проростках менялось на противоположное день ото дня.

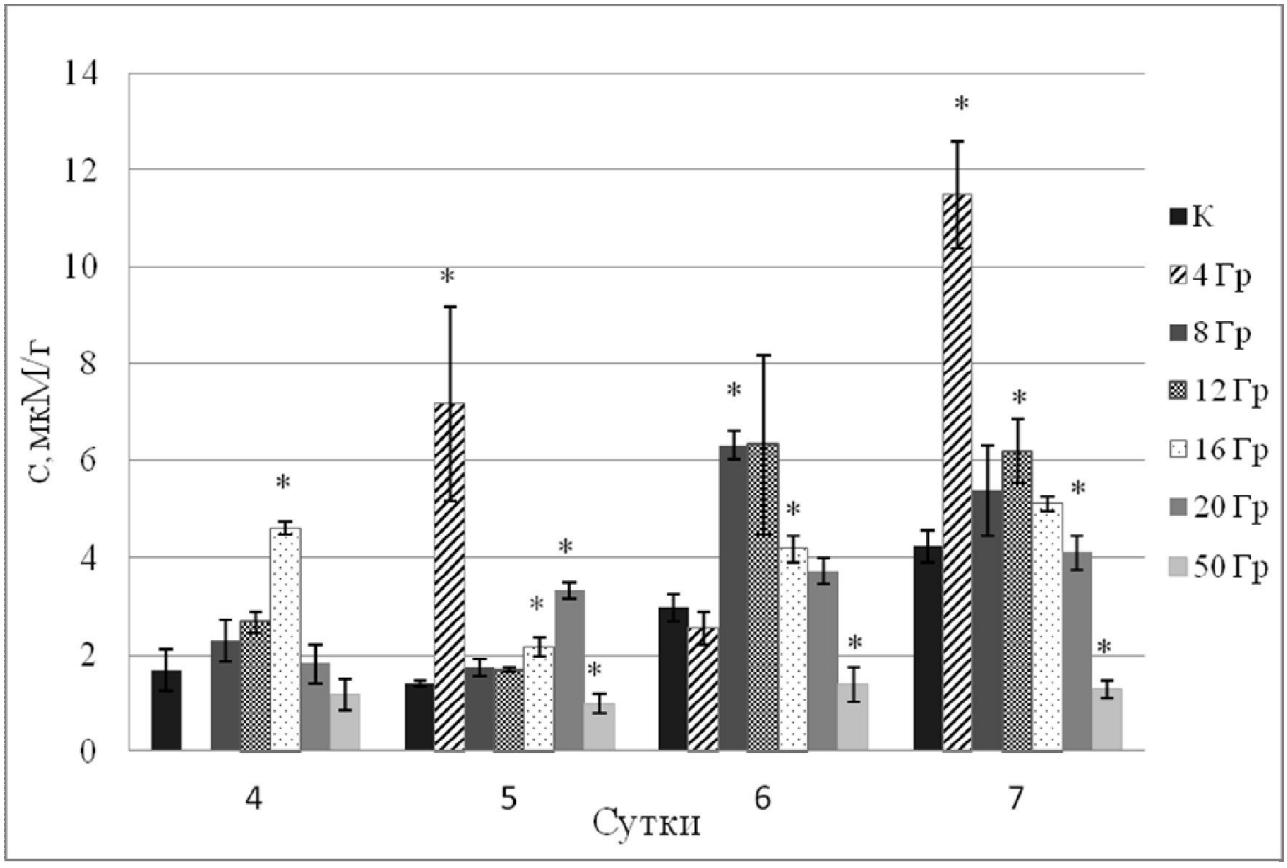

Рисунок 3.2 – Влияние γ-облучения на содержание ИУК в побегах проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

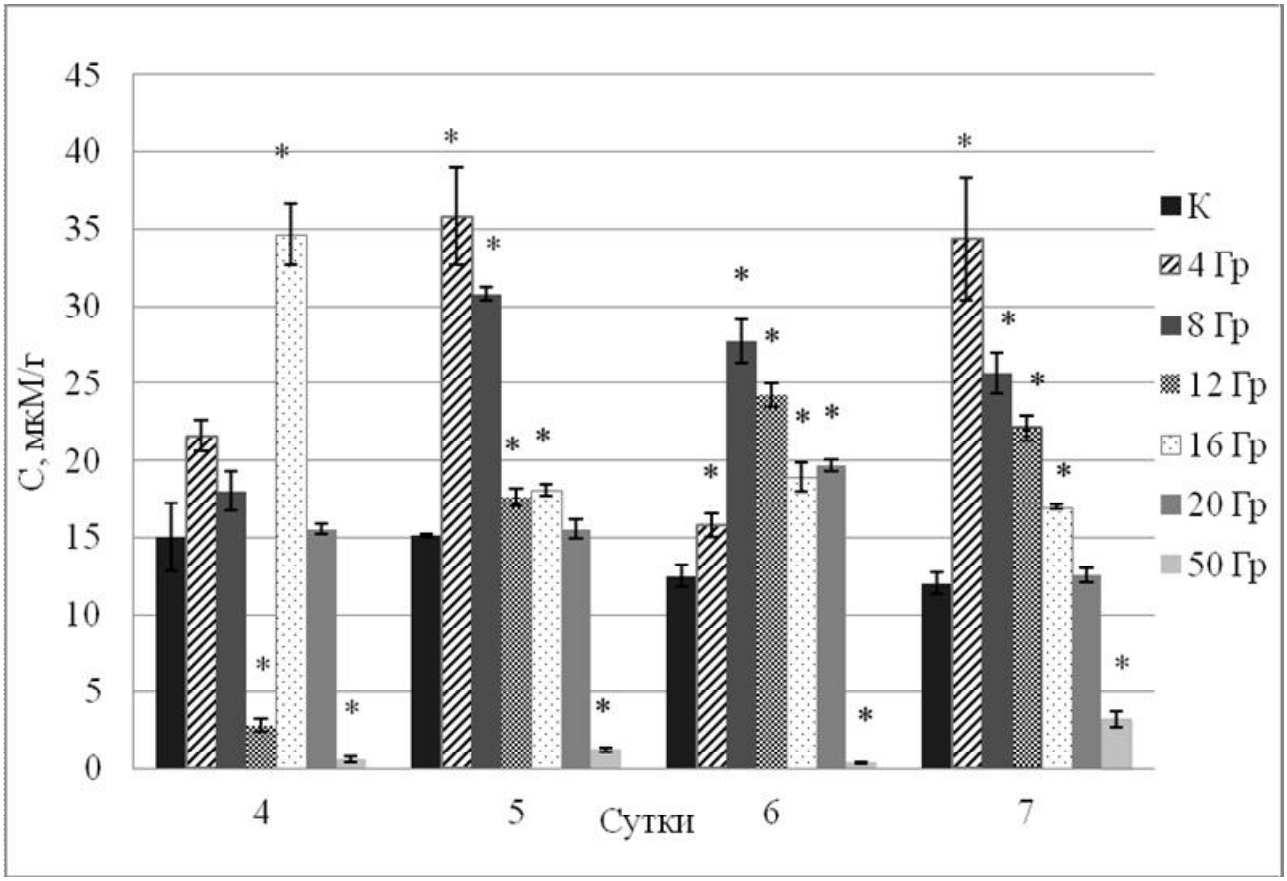

Рисунок 3.3 – Влияние γ-облучения на содержание ИУК в корнях проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

На 4-е сутки прорастания максимальное содержание ИУК было обнаружено в корнях проростков при дозе 16 Гр, причем после облучения в дозах 12 и 50 Гр концентрация ИУК в корнях была статистически значимо ниже контроля. На 5-е сутки прорастания дозы 4-16 Гр увеличивали концентрации фитогормона в корнях по отношению к контрольному значению. На этом же этапе развития проростков в побегах повышенное содержание ИУК наблюдали при дозах 4, 16 и 20 Гр. Максимальные концентрации ИУК как в корнях, так и в побегах на 5-е и 7-е сутки проращивания были зафиксированы при дозе 4 Гр (табл. 3.1). На 6-е сутки повышенное содержание ИУК в побегах было зафиксировано при дозах 8 и 16 Гр, а в корнях при дозах 4-20 Гр. На 7-е сутки повышенные концентрации ИУК в побегах наблюдали при дозах 4 и 12 Гр, а в корнях – при дозах 8-16 Гр. Также в корнях на 7-е сутки наблюдалась отрицательная линейная зависимость концентрации от дозы ($r = -0.913$, $p < 0.05$). Доза 50 Гр вела к существенному

снижению концентраций ИУК как в побегах, так и корнях начиная с 4-х суток прорастания.

Таблица 3.1 – Влияние γ-облучения на содержание ИУК (мкмоль/г) 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	1.311±0.242	*4.964±0.308	*13.283±1.988	*7.958±0.478	*12.902±1.668	*10.133±0.409	*7.769±1.462
4	поб	1.690±0.426	н/д	2.297±0.439	2.672±0.226	*4.608±0.135	1.822±0.396	1.186±0.335
	к	15.046±2.139	21.644±0.998	18.015±1.269	*2.792±0.405	*34.613±1.975	15.542±0.333	*0.573±0.158
5	поб	1.420±0.061	*7.162±2.005	1.742±0.173	1.689±0.045	*2.169±0.188	*3.332±0.152	*1.000±0.209
	к	15.170±0.108	*35.807±3.186	*30.800±0.419	*17.607±0.539	*18.093±0.364	15.557±0.611	*1.189±0.162
6	поб	2.976±0.284	2.551±0.338	*6.308±0.291	6.314±1.855	*4.176±0.276	3.727±0.262	*1.391±0.361
	к	12.539±0.705	*15.837±0.762	*27.727±1.381	*24.238±0.761	*18.931±0.959	*19.706±0.391	*0.339±0.079
7	поб	4.231±0.321	*11.486±1.095	5.384±0.932	*6.185±0.640	5.094±0.160	4.102±0.352	*1.309±0.176
	к	12.053±0.711	*34.360±3.942	*25.655±1.368	*22.121±0.786	*16.980±0.123	12.573±0.468	*3.140±0.519

* – Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями

$p < 0.05$, U-тест Манна-Уитни, н/д – нет данных. Верно для всех последующих таблиц

3.1.2. Влияние γ-облучения семян ячменя на эндогенное содержание ИМК в разных органах проростков

В 3-х дневных проростках значимое снижение концентраций ИМК зафиксировано при дозах 16 и 50 Гр (рис. 3.4). При облучении в дозы 4-12 Гр проростки демонстрировали тенденцию к увеличению концентрации ИМК.

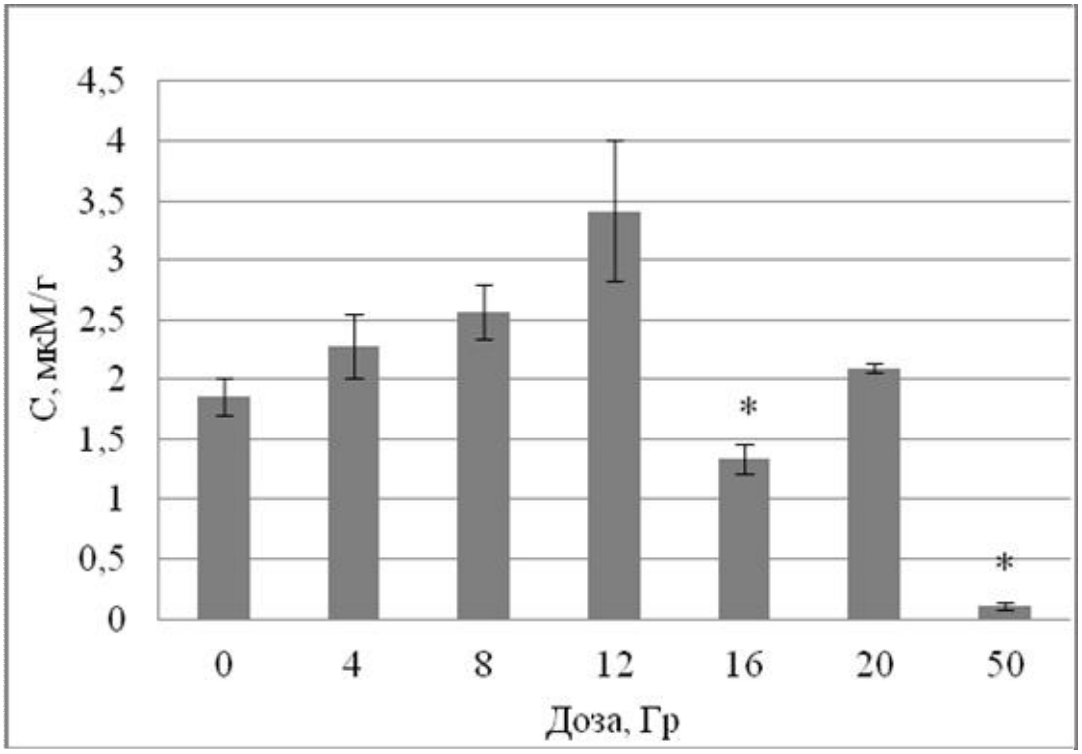

Рисунок 3.4 – Влияние γ-облучения на содержание ИМК в 3-х дневных проростках ячменя

В побегах концентрации фитогормона при облучении дозами 4-20 Гр статистически значимо превышали контрольный уровень с 4-х по 7-е сутки прорастания, кроме 5-х при 12 Гр (рис. 3.5). Максимальные значения концентраций ИМК в побегах 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 ($r = -0.917$, $p = 0.01$).

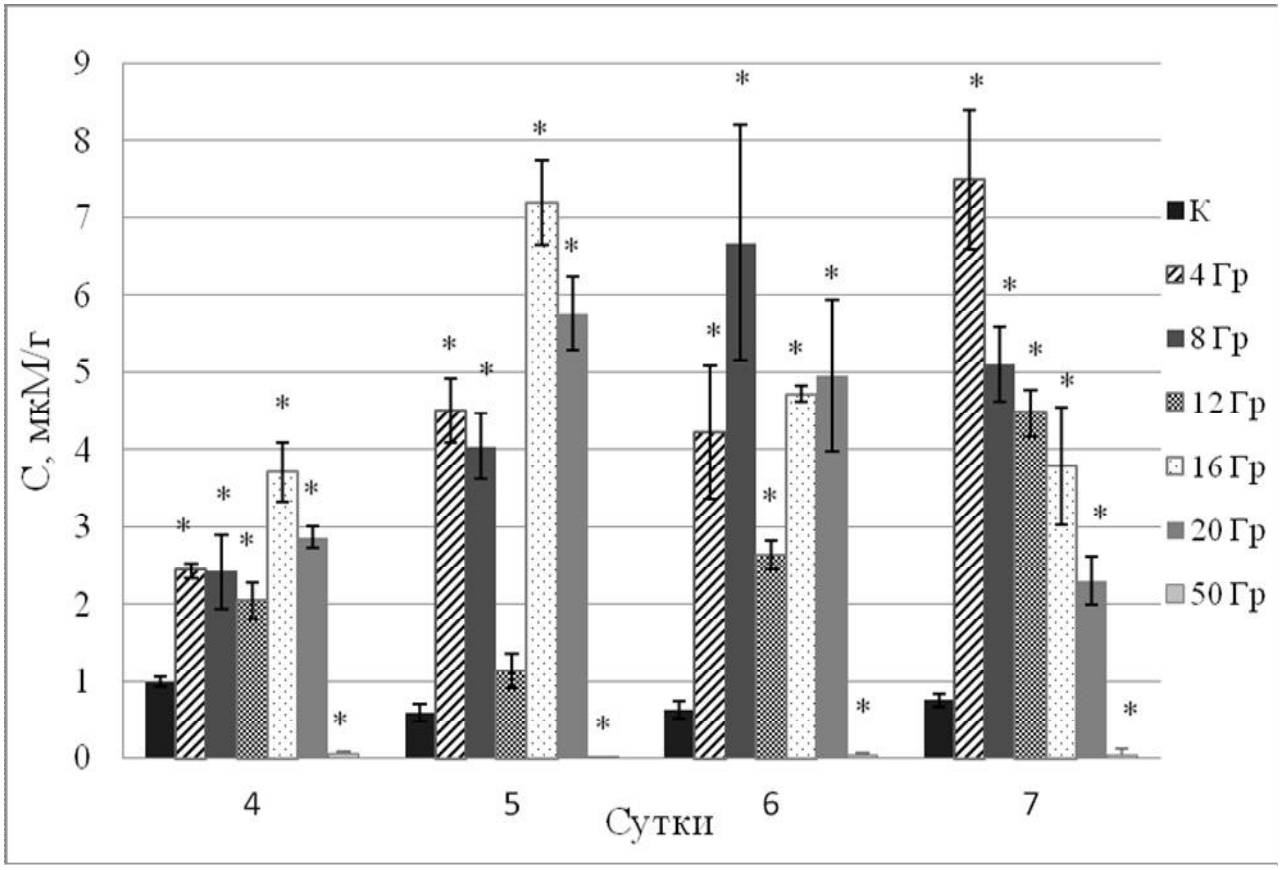

Рисунок 3.5 – Влияние γ-облучения на содержание ИМК в побегах проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

Содержание ИМК в корнях проростков (рис. 3.6), выросших из контрольных семян, существенно превышало содержание в побегах (рис. 3.5), в то время как в облученных растениях эта зависимость менялась на противоположную. Единственное исключение из этого правила наблюдали на 4-е сутки при дозе 8 Гр. Однако, в отличие от ИУК, концентрации ИМК в корнях и побегах с течением времени не сближались. Это связано с тем, что концентрации ИМК как в корнях, так и в побегах в контроле и при облучении во всех дозах, кроме 50 Гр, демонстрировали тенденцию к росту, иногда статистически значимую (табл. 3.2).

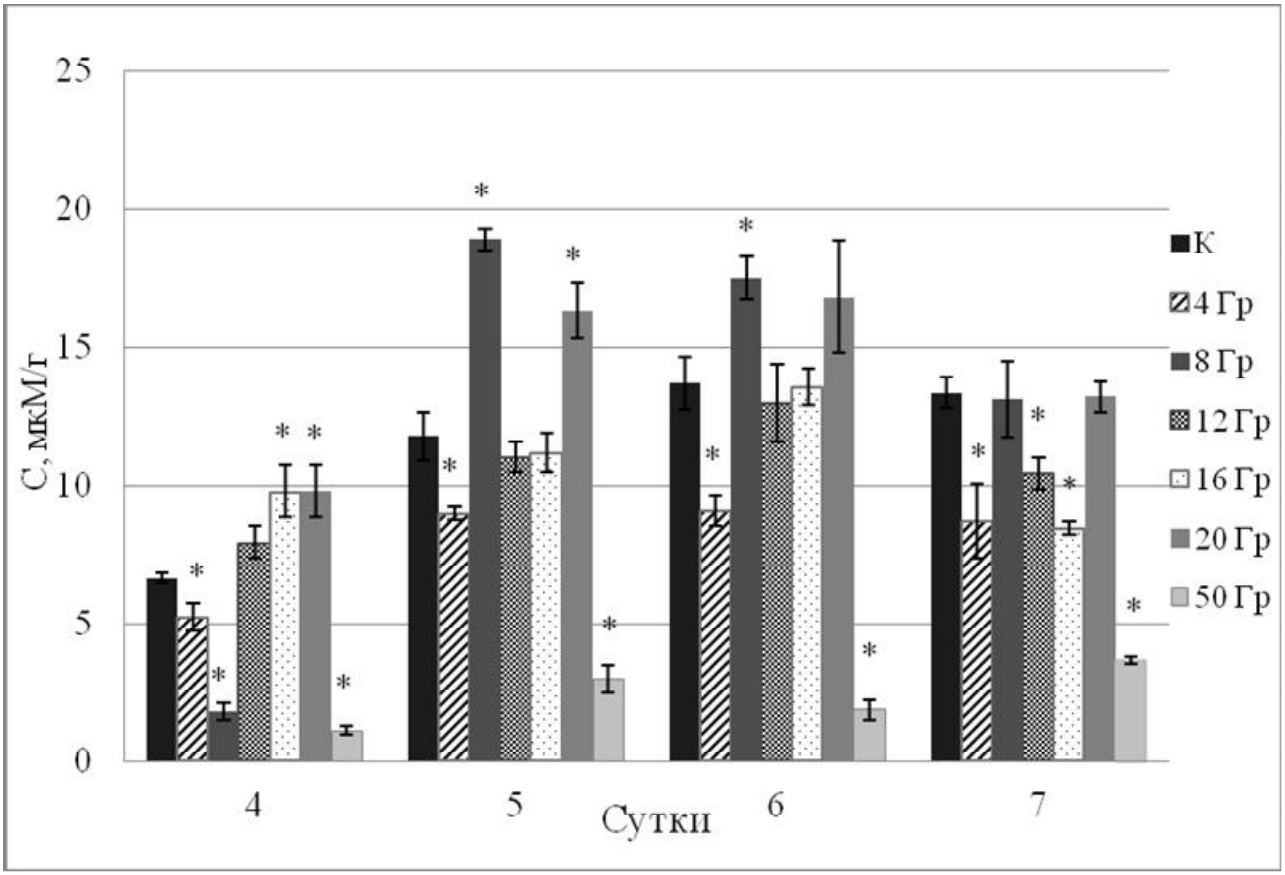

Рисунок 3.6 – Влияние γ-облучения на содержание ИМК в корнях проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

Устойчивая зависимость содержания ИМК в корнях от дозы отсутствовала (рис. 3.6), у проростков, облученных в дозе 4 Гр, концентрации фитогормона были ниже контрольного уровня в течение всего эксперимента. Более того, в процессе прорастания разница между содержанием ИМК в корнях облученных и контрольных семян возрастала. Наибольшая вариабельность концентраций фитогормона наблюдалась в корнях проростков, облученных в дозе 8 Гр: на 4-е сутки была зафиксирована наименьшая концентрация ИМК в корнях, однако к 5-м суткам наблюдался резкий (в 10 раз) рост концентрации фитогормона и было зафиксировано самое высокое его содержание в корнях, на 6-е сутки содержание ИМК оставалось существенно выше, чем в контроле. Облучение дозой 12 Гр вело к снижению содержания фитогормона в корнях, хотя значимое отличие от контроля наблюдалось лишь на 7-е сутки. Доза 16 Гр увеличивала накопление ИМК на 4-е сутки проращивания и снижала на 7-е. Эффект от облучения в дозе 20 Гр в корнях фиксировали на 4-е и 5-е сутки проращивания в виде повышения

концентраций фитогормона. При облучении семян в ингибирующей дозе 50 Гр в корнях и побегах проростков наблюдали снижение уровня ИМК (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Влияние γ-облучения на содержание ИМК (мкмоль/г) 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	1.864±0.152	2.277±0.268	2.561±0.232	3.415±0.586	*1.334±0.123	2.094±0.042	*0.106±0.033
4	поб	0.991±0.062	*2.427±0.095	*2.418±0.473	*2.044±0.232	*3.705±0.387	*2.855±0.139	*0.049±0.032
	к	6.656±0.180	*5.244±0.518	*1.814±0.315	7.936±0.584	*9.791±0.945	*9.818±0.957	*1.097±0.146
5	поб	0.595±0.108	*4.497±0.416	*4.038±0.419	1.131±0.231	*7.188±0.539	*5.753±0.476	*0.012±0.005
	к	11.781±0.852	*8.981±0.225	*18.91±0.397	11.022±0.547	11.203±0.700	*16.345±1.008	*2.980±0.495
6	поб	0.622±0.112	*4.214±0.8617	*6.675±1.521	*2.624±0.182	*4.707±0.104	*4.956±0.981	*0.042±0.024
	к	13.704±0.945	*9.086±0.563	*17.501±0.760	12.999±1.402	13.562±0.660	16.829±2.044	*1.851±0.364
7	поб	0.7523±0.089	*7.493±0.893	*5.097±0.487	*4.467±0.298	*3.779±0.755	*2.294±0.307	*0.034±0.085
	к	13.3445±0.564	*8.725±1.336	13.103±1.362	*10.434±0.555	*8.448±0.229	13.201±0.554	*3.651±0.120

3.1.3. Влияние γ-облучения семян ячменя на эндогенное содержание зеатина в разных органах проростков

Уровни цитокинина в 3-х дневных проростках, выросших из облученных в дозах 4-20 Гр семян, статистически значимо превышали контрольный уровень (рис. 3.7). Максимальная концентрация, превышающая контрольное значение в 12 раз, наблюдалась при облучении семян дозой 8 Гр.

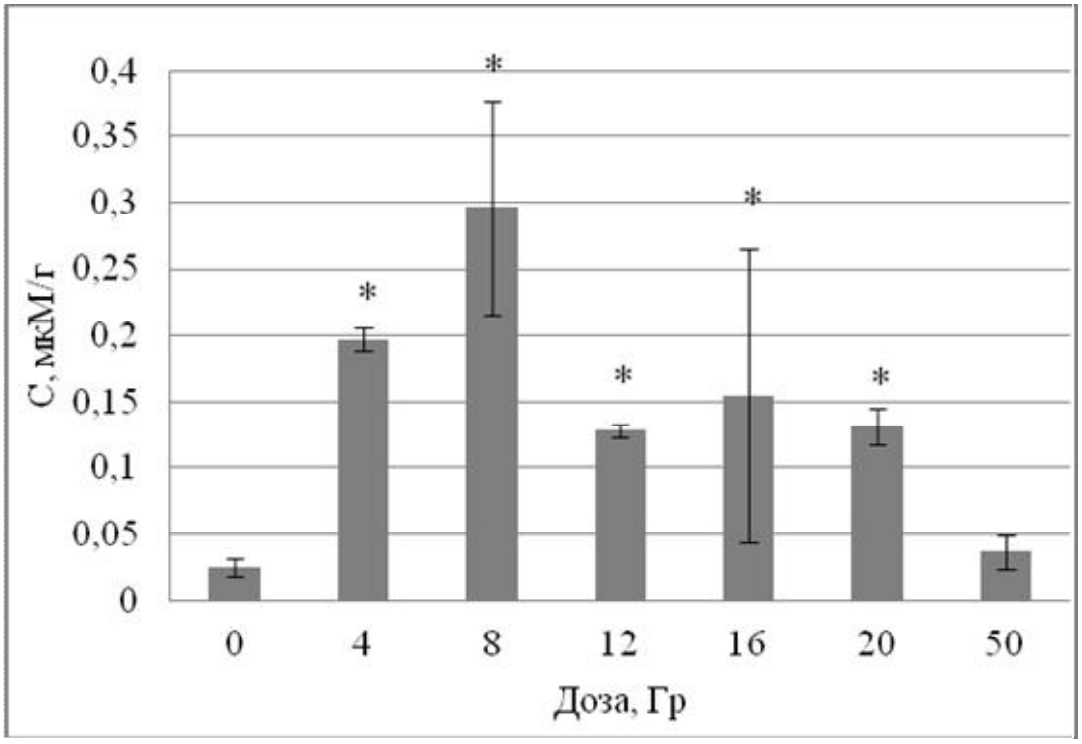

Рисунок 3.7 – Влияние γ-облучения на содержание зеатина в 3-х дневных проростках ячменя

В интактных проростках зеатин преимущественно накапливался в корнях (рис. 3.9), при этом в побегах (рис. 3.8) на 4-е и 5-е сутки проращивания концентрации данного фитогормона были ниже уровня детектирования. При дозах 4 и 8 Гр содержание зеатина росло с течением времени как в побегах, так и в корнях (табл. 3.3). Однако если при дозе 4 Гр содержание зеатина в корнях было выше, чем в побегах в течение всего времени исследования, то при дозе 8 Гр, начиная с 5-х суток, концентрация фитогормона в побегах превышала концентрацию в корнях. При дозе 12 Гр в течение всего времени эксперимента концентрации зеатина в побегах существенно превышали концентрации в корнях

за исключением 6-х суток, когда концентрации этого фитогормона в корнях и побегах были сопоставимы (табл. 3.3). При дозе 16 Гр содержание зеатина в побегах удалось обнаружить только на 7-е сутки исследования, в корнях же содержание фитогормона уверенно детектировалось и росло с течением времени. При дозе 50 Гр в побегах концентрация зеатина росла, в корнях достигала максимума на 5-е сутки, а потом снижалась, хотя и оставалась выше, чем в побегах.

В корнях 4-х дневных проростков повышенное содержание зеатина наблюдали при 4, 16, 20 и 50 Гр, доза 12 Гр вызывала снижение концентрации данного фитогормона, а доза 8 Гр не меняла концентрацию зеатина по сравнению с контролем (рис. 3.9).

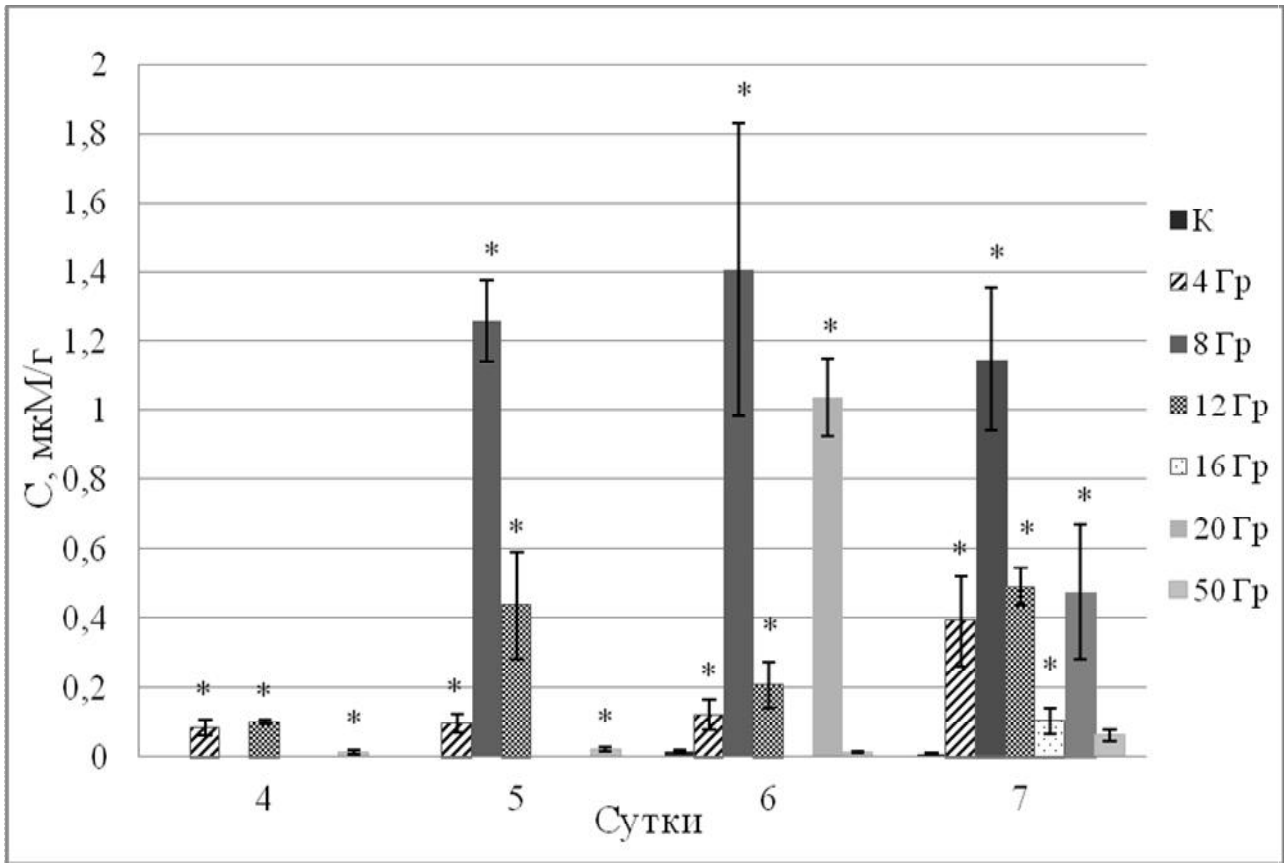

Рисунок 3.8 – Влияние γ-облучения на содержание зеатина в побегах проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

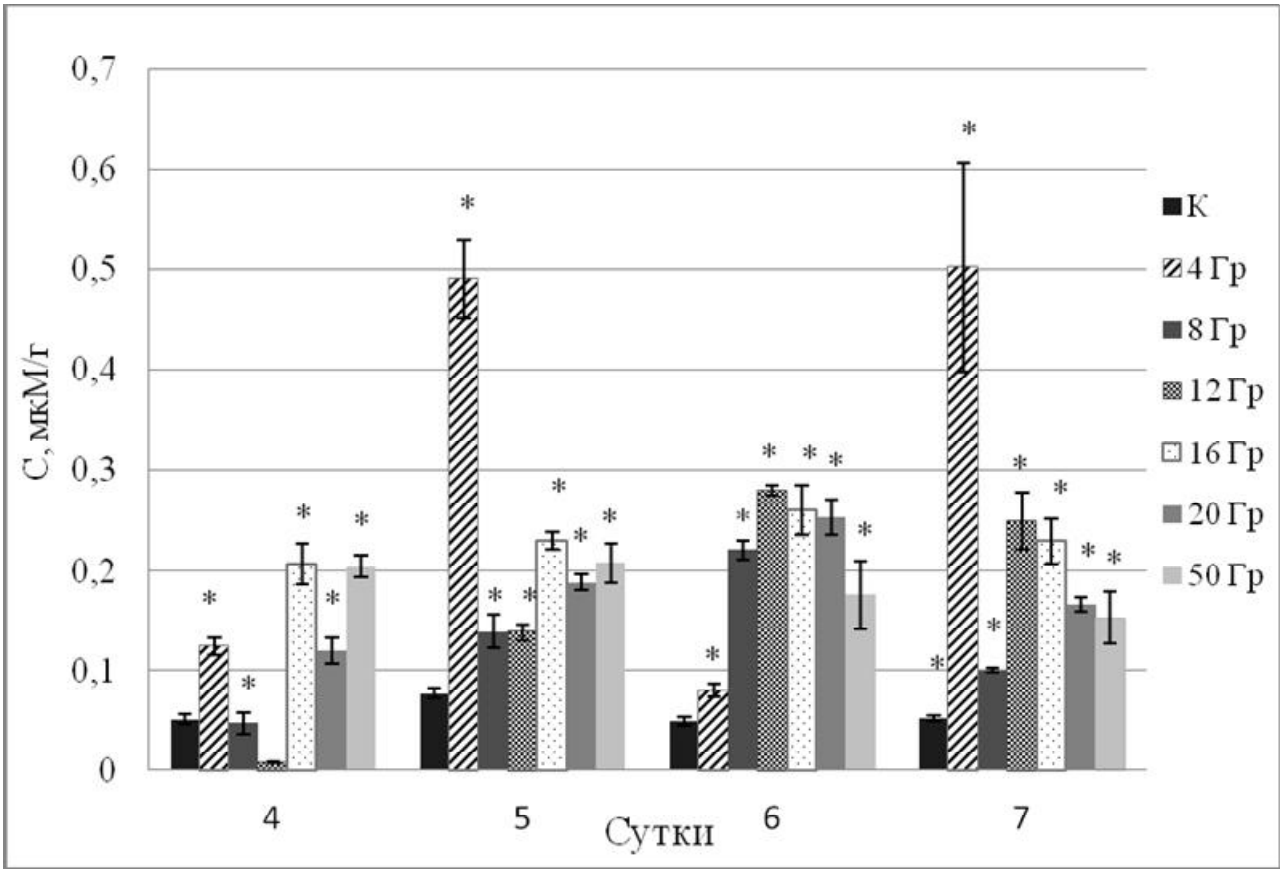

Рисунок 3.9 – Влияние γ-облучения на содержание зеатина в корнях проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

С 5-х по 7-е сутки проращивания наблюдали статистически значимое увеличение концентраций фитогормона в корнях и побегах при всех дозах облучения, за исключением трех случаев, когда концентрации зеатина в побегах не удалось определить (табл. 3.3). 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, 16, 20 и 50 Гр изменение содержания фитогормона было плавным, с небольшими колебаниями концентраций.

Некоторые дозы облучения вызвали существенное увеличение концентраций зеатина в побегах, что было особенно заметно на фоне очень низких недетектируемых концентраций фитогормона в интактных проростках

(рис. 3.8). Максимальное увеличение содержания зеатина в побегах было зафиксировано при 8 Гр: на 6-е сутки концентрация фитогормона превышала контрольное значение более чем в 100 раз.

Таблица 3.3 – Влияние γ-облучения на содержание зеатина (мкмоль/г) 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	0.024±0.007	*0.197±0.009	*0.296±0.080	*0.128±0.005	*0.155±0.110	*0.110±0.014	0.037±0.013
4	поб	н/д	*0.083±0.023	н/д	*0.100±0.005	н/д	н/д	*0.013±0.005
	к	0.051±0.005	*0.124±0.009	0.047±0.011	*0.007±0.001	*0.207±0.020	*0.120±0.013	*0.204±0.011
5	поб	н/д	*0.097±0.026	*1.259±0.117	*0.436±0.154	н/д	н/д	*0.022±0.006
	к	0.077±0.005	*0.491±0.038	*0.139±0.016	*0.138±0.008	*0.230±0.008	*0.188±0.008	*0.208±0.020
6	поб	0.014±0.004	*0.121±0.043	*1.406±0.425	*0.206±0.068	н/д	*1.036±0.113	0.014±0.003
	к	0.049±0.004	*0.080±0.006	*0.221±0.009	*0.280±0.006	*0.261±0.025	*0.253±0.018	*0.176±0.034
7	поб	0.008±0.005	*0.391±0.130	*1.148±0.207	*0.489±0.054	*0.104±0.037	*0.476±0.194	0.061±0.019
	к	0.052±0.003	*0.502±0.105	*0.100±0.003	*0.249±0.028	*0.229±0.023	*0.166±0.007	*0.153±0.026

3.1.4. Влияние γ-облучения семян ячменя на эндогенное содержание АБК в разных органах проростков

Облучение дозами 4, 12, 16 и 20 Гр вело к статистически значимому снижению содержания АБК в 3-х дневных проростках, при дозе 50 Гр снижение не было статистически значимым. Доза 8 Гр, наоборот, вела к существенному увеличению концентрации фитогормона (рис. 3.10).

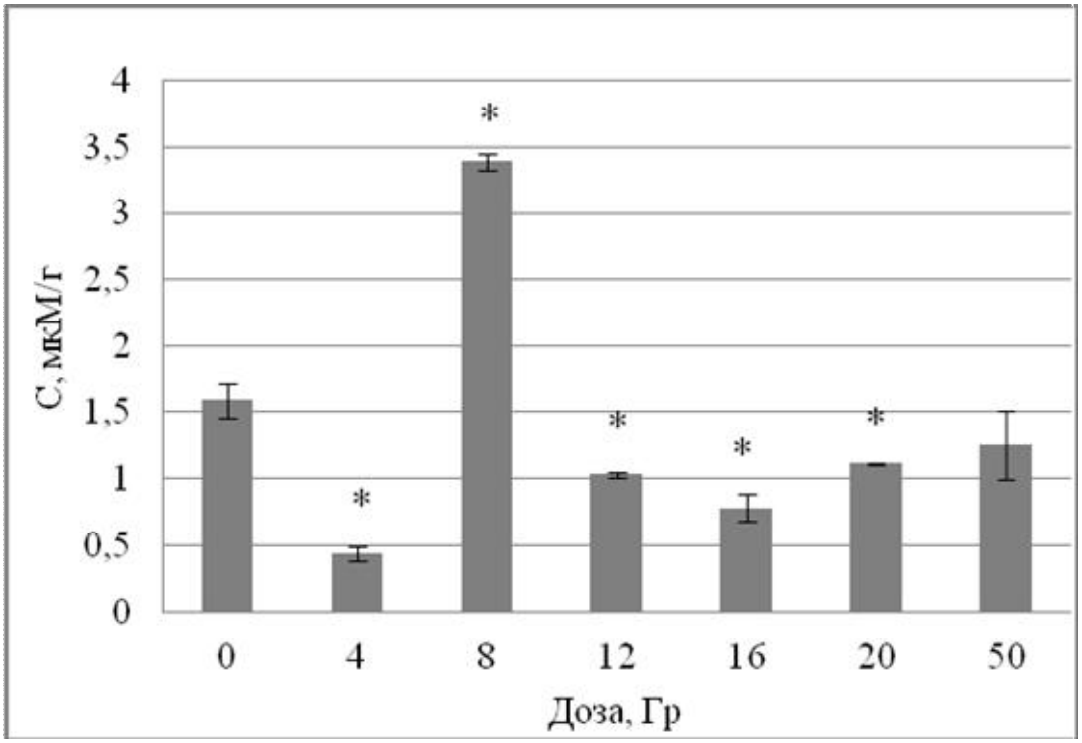

Рисунок 3.10 – Влияние γ-облучения на содержание АБК в 3-х дневных проростках ячменя

В отличие от ауксинов и цитокинина, АБК преимущественно накапливалась в побегах (рис. 3.11), а не в корнях (рис. 3.12). В контрольных растениях по мере прорастания содержание фитогормона в побегах увеличивалось, а в корнях уменьшалось, что вело к увеличению различий в концентрациях АБК в этих органах (табл. 3.4). Только облучение высокой дозой 50 Гр меняло эту закономерность на противоположную.

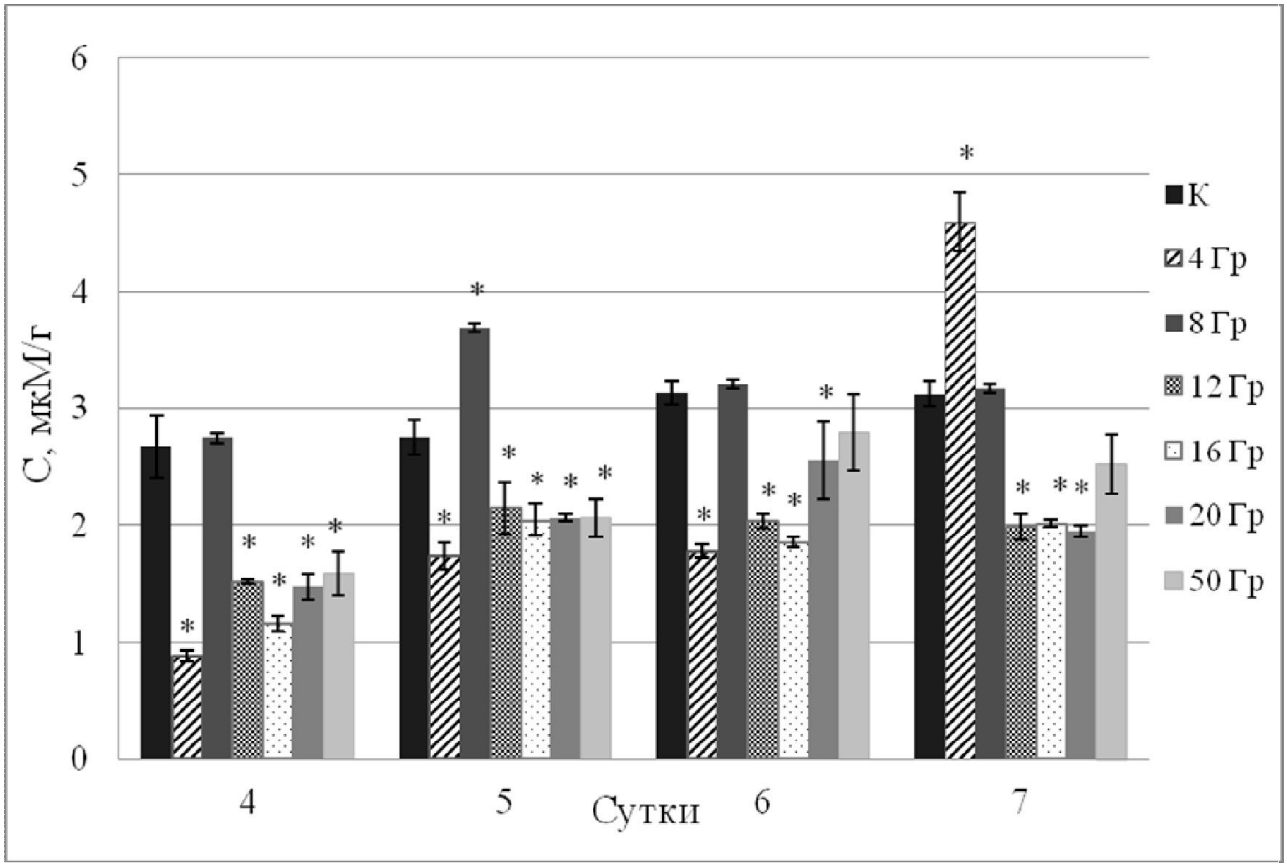

Рисунок 3.11 – Влияние γ-облучения на содержание АБК в побегах проростков ячменя с 4-х по 7-е сутки прорастания

Облучение дозами 12, 16 и 20 Гр статистически значимо снижало концентрации АБК в побегах в течение всего времени исследования, а дозой 50 Гр лишь на 4-е и 5-е сутки (рис. 3.11). Облучение дозой 8 Гр вело к статистически значимому увеличению количества АБК в побегах на 5-е сутки, в остальные дни при этой дозе концентрации АБК в побегах не отличались от контроля. При облучении дозой 4 Гр концентрации гормона в побегах с 4-х по 6-е сутки прорастания были значимо ниже контрольного уровня, однако на 7-е сутки количество АБК резко увеличивалось, статистически значимо превышая контрольное значение.

В корнях облучение дозой 20 Гр вело к статистически значимому снижению концентраций АБК в течение всего времени наблюдений (рис. 3.12). При дозах 12 и 16 Гр значимое снижение концентраций по сравнению с контролем наблюдалось на 4-е и 5-е сутки прорастания. Обратный эффект регистрировали при дозах 8 и 50 Гр: во все дни прорастания содержание фитогормона в корнях

превосходило контрольный уровень. Наибольшая вариабельность концентраций АБК в корнях наблюдалась при дозе 4 Гр: с 4-х по 6-е сутки концентрации фитогормона были значимо ниже контрольного уровня, причем на 4-е сутки концентрация была наименьшей из всех наблюдавшихся в нашем эксперименте. На 7-е сутки произошло резкое увеличение (в 6 раз выше контроля) концентрации АБК.

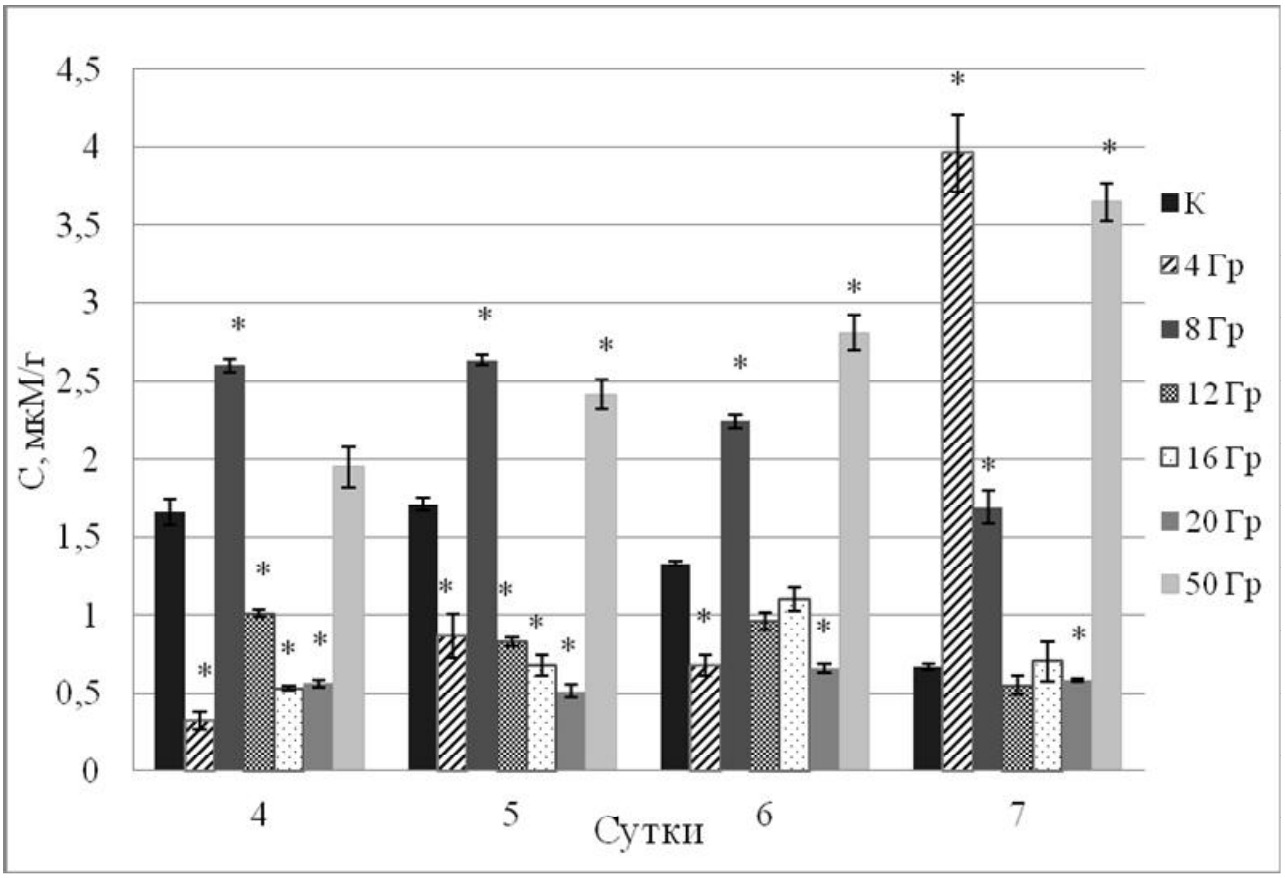

Рисунок 3.12 – Влияние γ-облучения на содержание зеатина в корнях проростков ячменя с 4-х по 7-й сутки прорастания

Таблица 3.4 – Влияние γ-облучения на содержание АБК (мкмоль/г) 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	1.589±0.125	*0.441±0.053	*3.39±0.063	*1.032±0.021	*0.785±0.097	*1.114±0.010	1.254±0.261
4	поб	2.669±0.265	*0.888±0.051	2.745±0.043	*1.522±0.016	*1.168±0.066	*1.478±0.109	*1.594±0.186
	к	1.659±0.084	*0.327±0.059	*2.600±0.040	*1.012±0.021	*0.536±0.050	*0.567±0.024	1.951±0.131
5	поб	2.749±0.151	*1.738±0.112	*3.692±0.033	*2.143±0.227	*2.040±0.135	*2.059±0.029	*2.059±0.156
	к	1.708±0.042	*0.869±0.136	*2.635±0.034	*0.831±0.028	*0.681±0.068	*0.517±0.044	*2.413±0.093
6	поб	3.130±0.095	*1.779±0.052	3.201±0.035	*2.032±0.060	*1.858±0.043	*2.545±0.333	2.792±0.326
	к	1.327±0.013	*0.680±0.065	*2.248±0.042	0.963±0.0566	1.101±0.075	*0.662±0.030	*2.808±0.116
7	поб	3.118±0.104	*4.597±0.251	3.165±0.034	*1.982±0.106	*2.013±0.031	*1.947±0.054	2.515±0.254
	к	0.674±0.018	*3.964±0.249	*1.690±0.108	0.553±0.062	0.707±0.127	*0.59±0.012	*3.651±0.120

3.1.5 Влияние γ-облучения семян ячменя на соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК в органах проростков

Ростовые процессы и, в целом, функциональное состояние растений определяется балансом фитогормонов, который можно выразить соотношением гормонов-антагонистов в контроле физиологических процессов. В нашем эксперименте мы оценивали соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК. У 3-х дневных проростков соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК было выше контрольного уровня при всех дозах, максимумы фиксировали при 4 и 16 Гр (табл. 3.5). При этих же дозах данное соотношение было максимальным в корнях на 4-е сутки прорастания и превышало контрольное значение примерно в 6 раз, однако в последующие дни эксперимента оно снижалось. Обратная динамика наблюдалась при 12 Гр: на 4-е сутки прорастания соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК было ниже контроля, но к 7-м суткам оно стало максимальным по сравнению с остальными дозами. На 5-е и 6-е сутки прорастания максимумы соотношения наблюдались при дозе 20 Гр.

В побегах значения соотношения (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК превышали контрольный уровень при всех стимулирующих дозах облучения (табл. 3.5). На 4-е сутки прорастания максимальное значение было выявлено при 16 Гр: превышало контрольное в 7 раз. На 5-е сутки соотношение (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК было максимальным при дозе 4 Гр, его значение было больше контрольного в 9.2 раз, при дозах облучения 16 и 20 Гр – примерно в 5.5 раз, тогда как при 8 и 12 Гр – не больше, чем в 2 раза. К 6-м суткам прорастания значения соотношения (ИУК+ИМК+зеатин)/АБК для облученных растений превышало контроль в 3.5-4.4 раза, при этом максимум снова был зафиксирован при 16 Гр. На 7-е сутки максимальная концентрация наблюдалась после облучения дозой 12 Гр. При облучении семян ингибирующей дозой 50 Гр значение соотношения фитогормонов в корнях было существенно ниже контрольного уровня.

Таблица 3.5. 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

3.2. Влияние γ-облучения семян на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма фитогормонов

3.2.1 Влияние γ-облучения семян на экспрессию гена фермента биосинтеза гиббереллинов *HvGA3ox2*

Уровни экспрессии гена фермента биосинтеза гиббереллинов *HvGA3ox2* в зародышах сухих семян и в зародышах семян после 6 часов прорастания в рулонах находились на очень низких уровнях как в контроле, так и в облученных семенах, однако наибольшая доза (50 Гр) вела к значимому увеличению этого показателя в сухом семени, а доза 16 Гр к снижению после 6 часов (рис. 3.13). На 12 часах прорастания на фоне резкого увеличения экспрессии в контроле наблюдалось снижение показателей во всех облученных группах. По мере прорастания наблюдалось увеличение транскрипционной активности гена *HvGA3ox2:* наибольшее значение, превышающее контрольное в 7 раз, зафиксировано на 18-й час прорастания при дозе 20 Гр, на 24-й час при 50 Гр и на 30-й час при дозах 4, 16 и 50 Гр (табл. 3.6). В зародышах на 24-й и 30-й час прорастания наблюдали положительную корреляцию значений транскрипционной активности с дозой облучения (r = 0.81, p < 0.05; r = 0.75, p < 0.05, соответственно). Интересно, что на 12-й час прорастания транскрипционная активность гена *HvGa3ox2* в зародышах семян, облученных в дозах 4, 10 и 16 Гр, статистически значимо снижалась относительно контрольного показателя. Такой же паттерн экспрессии гена наблюдали на 18-й час при облучении в дозе 10 Гр.

С целью оценки вклада облучения во всем диапазоне исследованных доз в изменение транскрипционной активности гена *HvGa3ox2* на каждом этапе прорастания был использован критерий Краскела-Уоллеса. По его результатам межгрупповые различия статистически значимы при $p < 0.05$. Анализ показал, что облучение непосредственно вносит вклад в изменение транскрипционной активности гена в сухом семени ($p = 0.0068$), после 6 ($p = 0.0391$), 12 ($p = 0.0504$),

18 (p = 0.0003) и 30 (p = 0.0002) часов проращивания, в отличие от 24 часов (p = 0.2466).

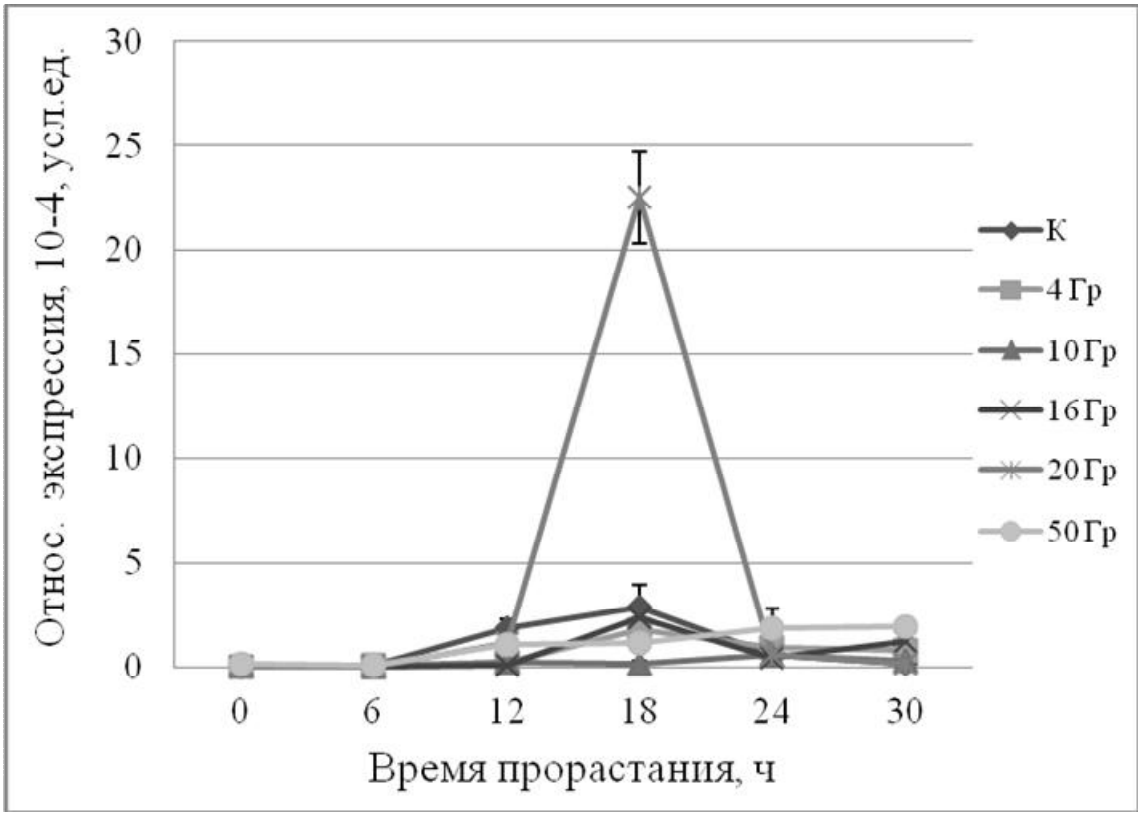

Рисунок 3.13 – Транскрипционная активность гена фермента биосинтеза гиббереллинов HvGa3ox2 (2-ΔCt) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания

Таблица 3.6 – Транскрипционная активность гена *HvGa3ox2* ($2^{-\Delta Ct}$) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания, 10^{-4}, условные единицы

Доза, Гр	Время прорастания, ч					
	0	6	12	18	24	30
К	0.053	0.116	1.850	2.903	0.579	0.149
4 Гр	0.053	0.124	*0.260	1.808	0.969	*0.824
10 Гр	0.125	0.046	*0.251	*0.190	0.596	0.312
16 Гр	0.040	0.000	*0.127	2.358	0.479	*1.221
20 Гр	*0.028	0.042	1.152	*22.522	0.583	0.162
50 Гр	*0.167	0.101	*1.063	*1.139	*1.915	*1.949

3.2.2 Влияние γ-облучения семян на экспрессию гена фермента катаболизма гиббереллинов *HvGA2ox3*

Экспрессия гена фермента катаболизма гиббереллинов *HvGA2ox3* отличалась более низкими уровнями по сравнению с геном фермента его биосинтеза. На протяжении всего эксперимента экспрессия гена *HvGA2ox3* была выше в импактных зародышах, чем в контрольных, за исключением 12-ти часов, где не было обнаружено статистически значимых различий с контролем (рис. 3.14). Как и в случае с геном *HvGA3ox2,* с увеличением времени проращивания семени возрастали значения транскрипционной активности гена *HvGA2ox3* в облученной группе, причем в контроле колебания уровней экспрессии в зависимости от времени прорастания были не так велики (табл. 3.7). В извлеченном из сухого семени зародыше наблюдали положительную корреляцию между транскрипционной активностью исследуемого гена и дозой облучения (r = 0.85; $p < 0.05$); статистически значимое усиление экспрессии гена происходило при 10, 20 и 50 Гр, в то время как после 6 часов прорастания усиление экспрессии наблюдали лишь при 16 и 20 Гр. Так же, как и в случае с геном *HvGA3ox2,* наибольшая концентрация транскриптов в облученной группе была отмечена при 20 Гр после 18 часов. Интересно, что после 24 ч и 30 ч прорастания значения транскрипционной активности при 20 Гр не отличались от контроля. С увеличением времени прорастания и, как следствие, влажности семян, усиление экспрессии гена наблюдалось при меньших дозах облучения (рис. 3.14): если в зародышах воздушно-сухих семян максимальное повышение транскрипционной активности гена *HvGA2ox3* фиксировалось при использовании наибольшей дозы 50 Гр, на 6-й час при 20 Гр, то на 24-й и 30-й час – при облучении в наименьших исследованных дозах 4 и 10 Гр. Облучение в дозе 4 Гр вело к увеличению транскрипционной активности гена, причем начиная с 18-го часа прорастания это увеличение было статистически значимым. На 30-й час прорастания увеличение концентрации транскриптов наблюдалось при всех исследованных дозах за исключением 20 Гр. Облучение в дозе 20 Гр вело к увеличению исследуемого

параметра в зародышах воздушно-сухих семян, как и на 6-й и 18-й час прорастания.

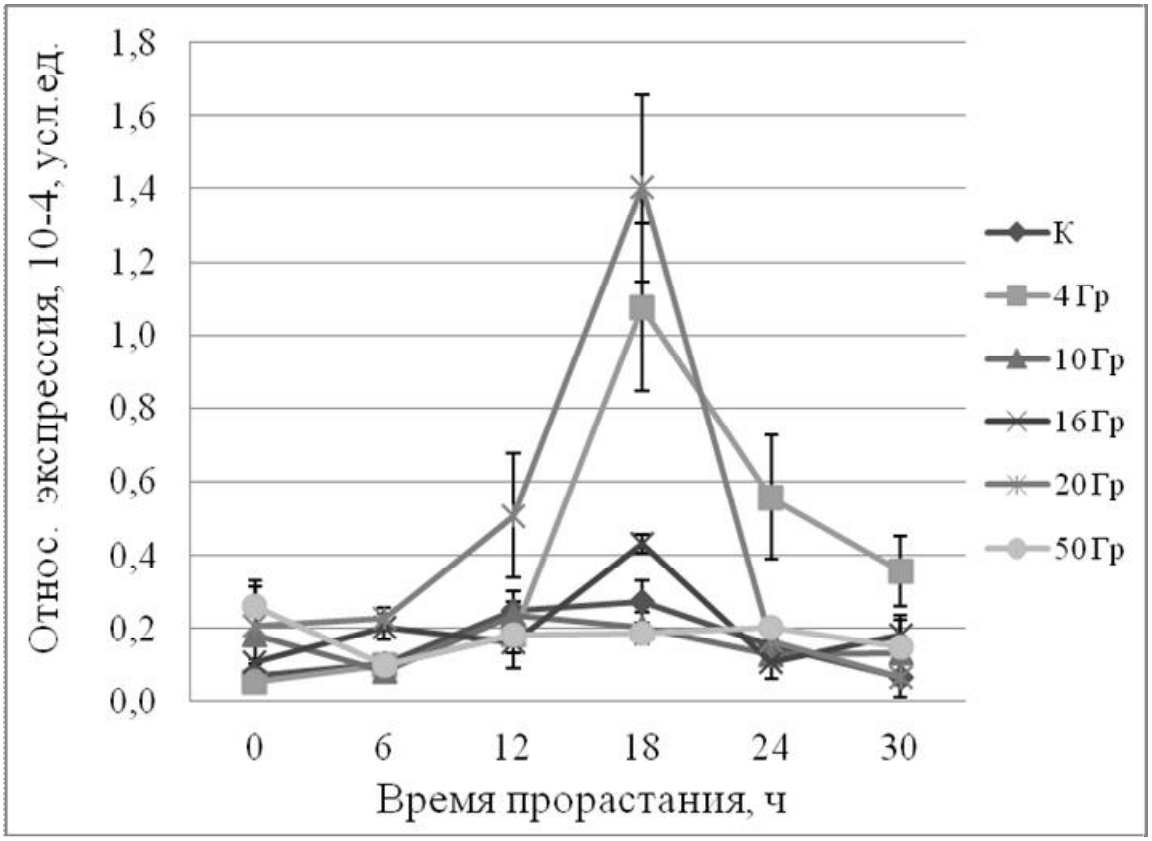

Рисунок 3.14 – Транскрипционная активность гена фермента катаболизма гиббереллинов HvGa2ox3 (2-ΔCt) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания

Таблица 3.7 – Транскрипционная активность гена *HvGa2ox3* ($2^{-\Delta Ct}$) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания, 10^{-4}, условные единицы

Доза, Гр	Время прорастания, ч					
	0	6	12	18	24	30
К	0.070	0.104	0.248	0.275	0.153	0.066
4 Гр	*0.053	0.101	0.184	1.075	0.556	*0.359
10 Гр	0.181	0.081	0.237	0.201	0.128	*0.134
16 Гр	*0.109	*0.204	0.164	0.432	0.108	*0.184
20 Гр	*0.208	*0.226	0.507	*1.402	0.165	0.068
50 Гр	*0.260	0.098	0.181	0.188	0.201	*0.150

В соответствии с критерием Краскела-Уоллеса облучение статистически значимо меняло транскрипционную активность гена *HvGa2ox3* в зародышах сухих семян (p = 0.0013) и семян после 6 (p = 0.0093), 18 (p = 0.0001) и 30 (p = 0.0119) часов проращивания, в отличие от семян после 12 (p = 0.0965) и 24 (p = 0.1269) часов проращивания.

3.2.3 Влияние γ-облучения семян на экспрессию гена фермента биосинтеза АБК *HvNCED1*

При облучении в стимулирующих дозах (4-20 Гр) транскрипционная активность гена фермента биосинтеза АБК *HvNCED1* в зародышах воздушно-сухих семян не отличалась от контроля, зато статистически значимо уменьшалась в зародышах после 6, 12 и 18 часов прорастания (за исключением 4 Гр после 6 часов) (рис. 3.15). В некоторых случаях накопление транскриптов не детектировалось: при облучении в дозе 16 Гр после 6 и 12 часов. На более поздних этапах прорастания (24 и 30 часов) контрольные значения транскрипционной активности гена *HvNCED1* были сильно снижены. На этом фоне в облученной группе фиксировали увеличение исследуемого параметра при всех используемых дозах (табл. 3.8). Использование ингибирующей рост дозы вело преимущественно к увеличению экспрессии исследуемого гена (за исключением 12 и 18 часов), максимальные значения были зафиксированы после 24 часов прорастания и в воздушно-сухих зародышах. В сухом семени, а также после 24 и 30 часов наблюдали положительную корреляцию значений транскрипционной активности с дозой излучения ($r = 0.88$, $p < 0.05$; $r = 0.88$, $p < 0.05$; $r = 0.91$ $p < 0.05$, соответственно).

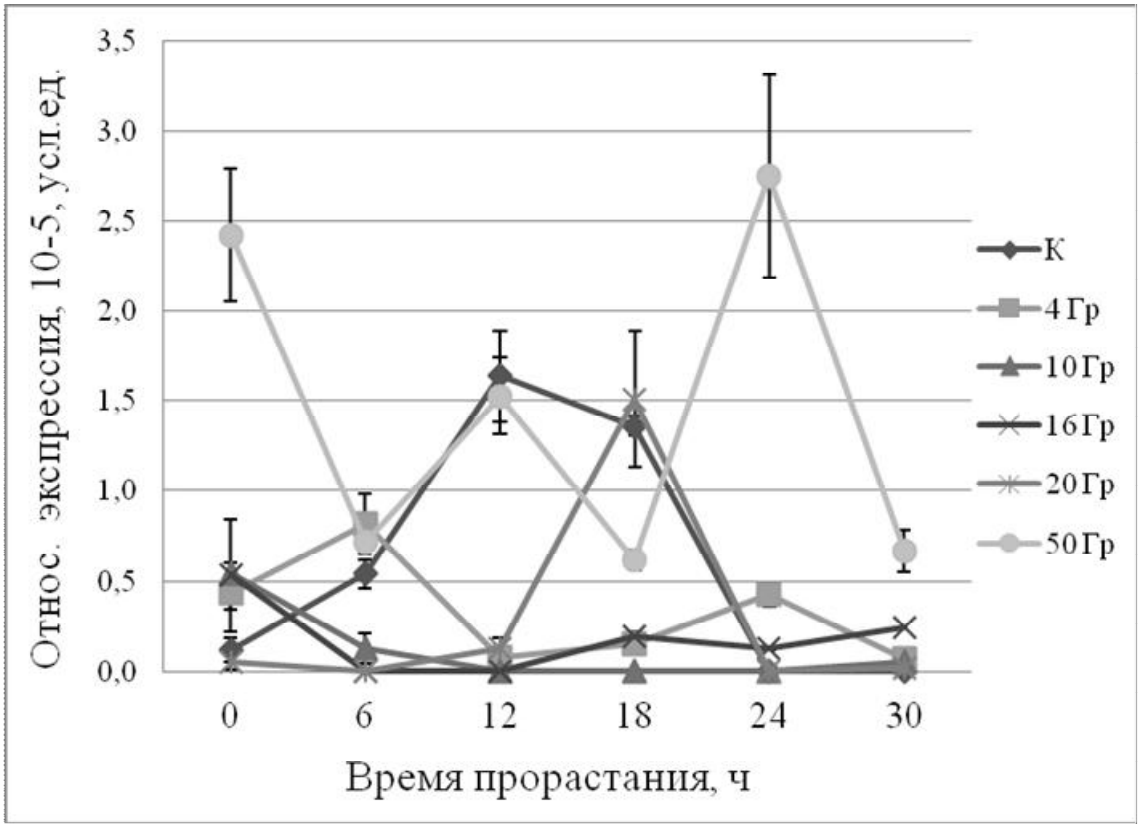

Рисунок 3.15 – Транскрипционная активность гена фермента биосинтеза АБК HvNCED1 в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания

Таблица 3.8 – Транскрипционная активность гена *HvNCED1* ($2^{-\Delta Ct}$) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания, 10^{-5}, условные единицы

Доза, Гр	Время прорастания, ч					
	0	6	12	18	24	30
К	0.117	0.539	1.635	1.359	0.000	0.001
4 Гр	0.438	*0.818	*0.077	*0.155	*0.423	*0.072
10 Гр	0.546	0.129	*0.003	*0.0001	0.00001	*0.051
16 Гр	0.533	н/д	н/д	*0.197	*0.124	*0.246
20 Гр	0.051	*0.001	*0.126	1.508	*0.008	*0.017
50 Гр	*2.422	*0.720	1.526	*0.620	*2.750	*0.664

Значения критерия Краскела-Уоллеса свидетельствуют о статистически значимом влиянии облучения на изменение транскрипционной активности гена фермента биосинтеза АБК *HvNCED1* на всех этапах проращивания: в сухих

семенах (p = 0.0504), после 6 (p = 0.0174), 12 (p = 0.0003), 18 (p = 0.0004), 24 (p = 0.0001) и 30 (p = 0.0068) часов.

3.2.4 Влияние γ-облучения семян на экспрессию гена фермента катаболизма АБК *HvABA8'OH*

Транскрипционная активность гена *HvABA8'OH-1* увеличивалась по сравнению с контролем на каждом этапе прорастания, однако статистически значимо только в зародышах воздушно-сухих семян, после 18 и 30 часов (рис. 3.16). После 18 часов прорастания значимое увеличение исследуемого параметра фиксировали при облучении в дозах 16 и 20 Гр, причем при 20 Гр отмечали самое высокое значение экспрессии гена в эксперименте. Следует отметить, что использование некоторых стимулирующих доз приводило к снижению транскрипционной активности гена *HvABA8'OH-1*: 10 Гр на 12 и 18 часах и 16 Гр на 6 и 12 часах проращивания. При облучении семян ингибирующей рост дозой наблюдали статистически значимое снижение экспрессии гена фермента катаболизма АБК на 12 и 18 часах прорастания, в то время как в зародышах воздушно-сухих семян и на 30-й час значения исследуемого параметра увеличивались (табл. 3.9).

Согласно критерию Краскела-Уоллеса изменения транскрипционной активности гена катаболизма АБК *HvABA8'OH-1* были обусловлены облучением семян на всех этапах прорастания (в сухом семени (p = 0.0204), после 6 (p = 0.0504), 12 (p = 0.0068), 18 (p = 0.0005) и 30 (p = 0.0068) часов прорастания), кроме 24 часов (p=0.1562).

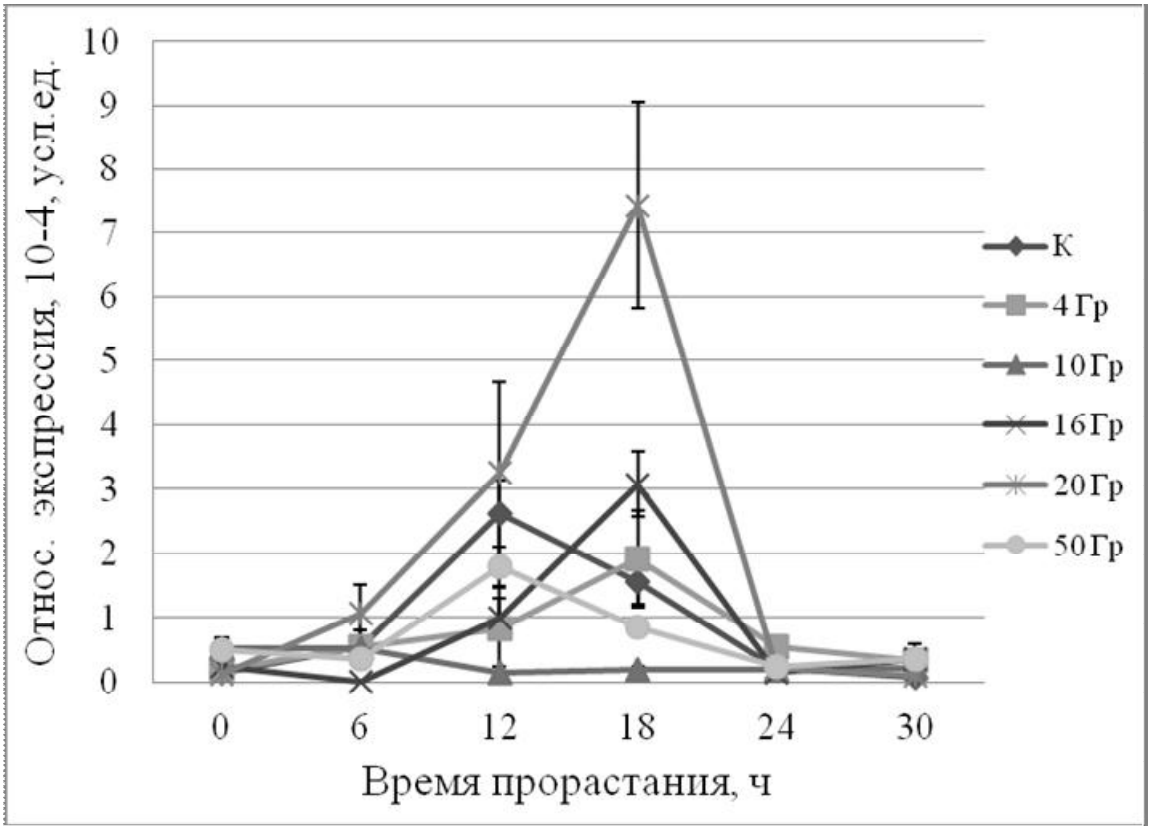

Рисунок 3.16 – Транскрипционная активность гена фермента катаболизма АБК HvABA8′OH-1 в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания

Таблица 3.9 – Транскрипционная активность гена *HvABA8'OH-1* ($2^{-\Delta Ct}$) в зародышах в зависимости от дозы облучения семян и времени прорастания, 10^{-4}, условные единицы

Доза, Гр	Время прорастания, ч					
	0	6	12	18	24	30
К	0.145	0.550	2.617	1.556	0.223	0.083
4 Гр	0.197	0.556	0.834	1.915	0.556	*0.347
10 Гр	*0.525	0.531	*0.149	*0.190	0.206	0.216
16 Гр	0.242	*0.008	*1.000	*3.071	0.147	0.351
20 Гр	0.131	1.075	3.259	*7.430	0.229	0.095
50 Гр	*0.502	0.363	*1.787	*0.863	0.231	*0.357

ГЛАВА IV. 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 запуска адаптивных реакций. В процессе адаптации растение запускает комплекс биохимических и физиологических программ, направленных на противодействие влиянию стрессора и повышение устойчивости. Вследствие этих реакций может наблюдаться сверхадаптация, проявляющаяся в стимуляции роста и развития растения [Wiegant et al., 2013]. Расшифровка механизмов адаптивных реакций растений невозможна без комплексного детального изучения последовательности разворачивающихся событий на разных уровнях организации.

Анализ литературы показал, что практически все работы, посвященные этой теме, носят описательный характер и регистрируют эффект на морфологическом уровне, не исследуя молекулярных аспектов формирования адаптивных реакций. Актуальность решения поставленной задачи определяет возросший интерес в мире и в России к радиационным технологиям. Их активное внедрение в сельское хозяйство и пищевую промышленность может решить многие проблемы агропромышленного комплекса, в том числе повысить урожайность и улучшить качественные и количественные характеристики урожая [Козьмин и др., 2015]. В основе агроприема предпосевного облучения семян лежит явление радиационного гормезиса, которое заключается в усилении процессов роста и развития растений. Несмотря на предпринимавшиеся в течение долгого времени исследования действия низкодозового ИИ на растения, механизмы радиационного гормезиса до конца не выяснены.

В работе на ячмене сорта Нур [Гераськин и др., 2015] изучали действие γ-облучения семян в дозах 4-50 Гр на морфометрические показатели проростков. Применение стимулирующих доз приводило к увеличению размеров корня и побегов за счет увеличения темпов развития проростков. 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.

Все процессы жизнедеятельности растений, включая адаптивные реакции, находятся под контролем гормональной системы. Баланс фитогормонов динамичен и может изменяться в результате внешних воздействий [Peleg, Blumwald, 2011]. Контролируя 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 в разделе 3.1 изменения в содержании фитогормонов и их соотношении могут определять наблюдавшиеся в работе [Гераськин и др., 2015] морфологические эффекты. Для обоснования этого утверждения был проведен корреляционный анализ 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.

Чтобы понять каковы механизмы, связывающие гормональную регуляцию и фенотипический эффект радиационного гормезиса, необходимо обратиться к физико-химическим аспектам действия ИИ на живые клетки. В разделе 1.1 литературного обзора рассматривалось косвенное действие ИИ на молекулы клетки, в результате которого образуются АФК, избыток которых приводит к окислительному стрессу. АФК нарушают сигнальные пути растений, изменяя биохимические и структурные свойства биологических молекул. В диапазоне

малых доз воздействие ИИ ведет к образованию АФК в количествах, недостаточных для развития окислительного стресса [Smith at al., 2012]. АФК в клетке выступают не только в качестве повреждающего агента, они играют ключевую роль в процессах прорастания семян [Oracz et al., 2007; Bailly et al., 2008; Oracz et al., 2009; Oracz et al., 2016]. В семенах АФК присутствуют от этапа эмбриогенеза до прорастания, даже в состоянии покоя [Basbouss-Serhal et al., 2016]. Роль АФК как сигнальной молекулы в настоящее время активно исследуется. Предполагается, что клетки имеют рецепторы АФК, которые воспринимают и передают информацию на соответствующие программные структуры [Mittler et al., 2011]. В набухших семенах АФК способствуют растяжению клеток за счет прямого влияния на полисахариды апопласта и с помощью белковых структур CWRP, обеспечивающих размягчение клеточной стенки и, как следствие, ее растяжение [Scheler et al., 2015].

В процессах контроля покоя и прорастания семян роль АФК тесно связана с фитогормонами через сложные сигнальные пути (рис. 4.1) [Oracz et al., 2009; Bahin et al., 2011; Garcia, 2013; Oracz et al., 2016; Gomes, Garcia, 2013].

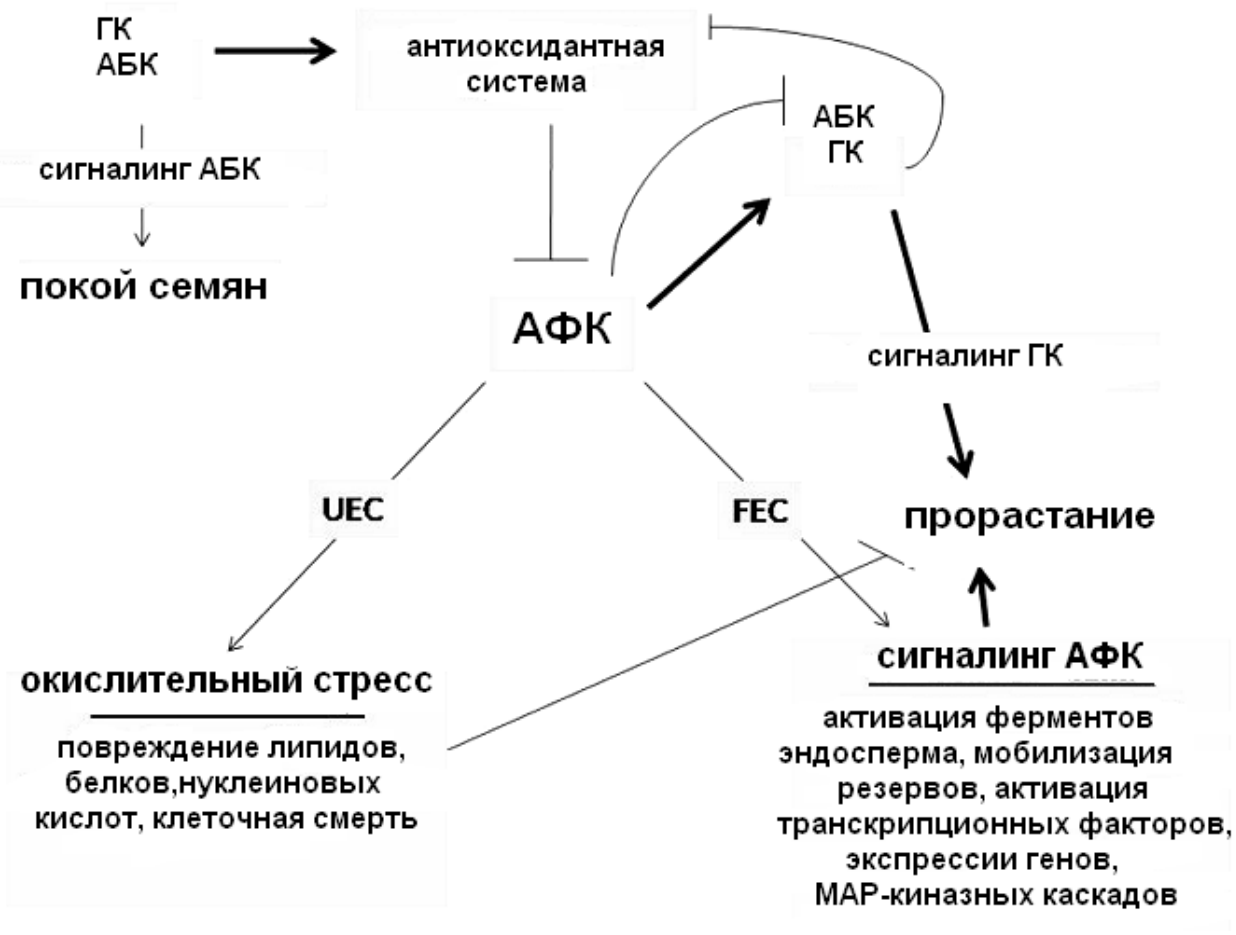

Рисунок 4.1 – Роль АФК в процессах снятия покоя и прорастания семян. Низкое значение соотношения гиббереллины/АБК связано с низкими уровнями АФК. Высокие значения соотношения гиббереллины/АБК ведут к повышению содержания АФК. Оксидативные повреждения в результате неблагоприятных условий (UEC), ингибирование прорастания семян. Сигналинг АФК при благоприятных условиях (FEC), прорастание семян [Gomes, Garcia, 2013]

АФК могут существенно влиять на метаболизм, транспорт и сигналинг ауксинов [Tognetti et al., 2010]. Они непосредственно участвуют в ауксин-регулируемых физиологических процессах, например, в росте клеток растяжением [Schopfer et al., 2001], который лежит в основе процесса прорастания. Экзогенные уровни ауксина способны уменьшать содержание АФК в корнях за счет изменения активности ферментов антиоксидантной системы [Ja et al., 2009]. Новые данные о взаимодействии АФК и ауксинов предполагают активное участие последних в реакциях растений на стресс, однако

экспериментальных данных, проливающих свет на подробности этих реакций пока недостаточно.

Изменения в содержании ауксинов в результате γ-облучения могут происходить за счет изменения скорости их образования. В исследовании, проведенном на нескольких видах растений, показано, что γ-облучение в малых дозах увеличивает концентрации триптофана, который является предшественником ауксинов в их биосинтезе, и усиливает активность соответствующего фермента триптофансинтазы [Кожокару, Ревин, 2010]. Также была выявлена активация синтеза ИУК из β-индолилпировиноградной кислоты и триптамина на стадии образования β-индолилпировиноградной кислоты из β-индолил-3-пропионовой. Экспериментально показано, что, помимо биосинтеза, ионизирующее излучение изменяет экспрессию генов первичного ответа на ауксин [Fortunati et al., 2010].

ИУК – основной ауксин растений, который составляет 80-95% всех ауксинов в тканях растений, ИМК содержится в значительно меньших концентрациях. Но в растениеводстве в качестве индуктора корнеобразования преимущественно применяют ИМК, так как она более стабильна в растворах по сравнению с ИУК и не так подвержена деградации на свету. К тому же ИМК более эффективно активирует рост придаточных корней [Nordström et al., 1991]. Было показано, что ИУК может превращаться в ИМК в естественных условиях при выращивании проростков в темноте [Ludwig-Müller, Epstein, 1991]. Этот факт может служить объяснением большим концентрациям ИМК в нашем эксперименте, в котором использовались этиолированные проростки. Возможен и обратный процесс, при котором ИМК превращается в ИУК под действием пероксисомального β-окисления [Strader at al., 2010].

Наблюдавшееся в нашем эксперименте уменьшение содержания ауксинов при облучении дозой 50 Гр (рис. 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6) может быть связано с подавлением их биосинтеза 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 (табл. 3.2), концентрации ИУК снижались в корнях (4-7-е сутки) и побегах (5-7-е сутки), в то время как в 3-х дневных проростках значимо превышали контроль (табл. 3.1). Это может свидетельствовать о том, что в ранний период в результате облучения активируется образование ИУК из ИМК.

При облучении семян стимулирующими дозами в проростках наблюдалось увеличение содержания ауксинов, однако характер их накопления был различен. Содержание ИУК увеличивалось преимущественно в трехдневных проростках (рис. 3.1) и в корнях с 4-х по 7-е сутки проращивания (рис. 3.3), в то время как ИМК в основном накапливалась в побегах (рис. 3.5). Такой характер распределения ауксинов может быть обусловлен 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 (табл. 3.2), что, возможно, свидетельствует об ослаблении базипетального транспорта. Облучение в стимулирующих дозах увеличивало содержание ИМК в побегах, причем с возрастанием дозы максимальная концентрация фитогормона наблюдалась в более ранние сроки.

Цитокинины выполняют множество важнейших функций в растениях, в том числе участвуют в ответе на стрессовое воздействие, который отчасти основывается на взаимодействии фитогормона и АФК. Особенности взаимодействия цитокинина, АФК и антиоксидантной системы исследованы на *A. thaliana*. В цитокинин-дефицитных мутантах нарушена работа генов, ответственных за утилизацию АФК [Nishiyama et al., 2011]. В работе с культурой клеток табака показано, что добавление в среду N6-бензиладенозина приводит к потере жизнеспособности клеток и апоптозу в зависимости от концентрации через сверхпродукцию АФК [Mlejnek et al., 2003]. Применение экзогенного цитокинина приводило к увеличению активности аскорбатпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы, антиоксидантных ферментов, которые катализируют

разрушение АФК [Liu, Huang, 2002; Zavaleta-Mancera et al., 2007]. В работе на растениях *A. thaliana* со сверхэкспрессией гена биосинтеза цитокининов было показано, что нарушения метаболизма фитогормона в клетках приводит к модификации ответа на стрессовое воздействие, опосредованного АФК-регуляцией [Wang et al., 2015]. Полученные в данной работе результаты демонстрируют значительное увеличение содержания фитогормона в разных органах проростков ячменя после γ-облучения семян и подтверждают литературные данные об участии цитокининов в адаптивных реакциях растений.

На рис. 3.8 показано, что в побегах интактных проростков в ранний период зеатин не был обнаружен, а в более поздний период его концентрации были крайне малы. Это объясняется тем, что его источником в листьях являются цитокинины, которые синтезируются в корнях и транспортируются акропетально [Sakakibara, 2006]. Увеличение содержания зеатина в побегах в результате действия низкодозового облучения свидетельствует об усилении акропетального транспорта к месту его действия, т.е. в листья. В трехдневных проростках и в 4-7-ми дневных корнях ячменя (рис. 3.7, 3.9) высокие концентрации фитогормона свидетельствуют об усилении его синтеза в результате действия ионизирующего излучения в стимулирующих дозах. Результаты облучения дозой 50 Гр не демонстрируют снижения содержания гормона, даже наоборот, в корешках и побегах проростков наблюдались повышенные концентрации зеатина, что может быть связано с его протекторным действием в ответе на стресс (табл. 3.3). 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]. К тому же 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].

АБК выполняет в растении множество важных функций, одной из которых является индукция защитных механизмов в ответ на действие неблагоприятных факторов. В подразделе 1.3.3 подробно рассмотрена роль АБК в адаптивных реакциях растений и аспекты взаимодействия АФК и АБК, которые лежат в основе молекулярных механизмов ответа растений на стрессовое воздействие. Поскольку стрессовое воздействие вызывает быстрое накопление АБК [El‑Maarouf‑Bouteau, Bailly, 2008], увеличение ее количества можно рассматривать как индикатор стрессового состояния растения и, наоборот, пониженные концентрации АБК свидетельствуют о возникновении благоприятных условий для роста растений. Установленные в настоящей работе пониженные концентрации АБК в проростках при дозах 4, 12, 16 и 20 Гр и высокие при дозе 8 Гр (табл. 3.4) 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 [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. Однако в побегах такой эффект обнаружен не был (рис. 3.11). Показанное в нашей работе снижение уровня свободной АБК может быть связано с усилением катаболических процессов и с ее инактивацией путем гидроксилирования [Лутова и др., 2010]. Гидроксилированные формы АБК обладают слабой биологической активностью, образуя конъюгаты с глюкозой.

Основой регуляции физиологических процессов в растении является баланс фитогормонов, при этом особое значение имеет соотношение гормонов-антагонистов в контроле многих физиологических процессов, в том числе прорастания семян. Использование малых доз, стимулировавших развитие проростков ячменя [Гераськин и др., 2015], значительно увеличивало отношение (ИУК, ИМК, зеатин) к АБК (табл. 3.4), что создает благоприятные условия для

прорастания. На более ранних этапах развития проростков (3-5-е сутки) эффект был более выражен и характеризовался наличием двух пиков анализируемого соотношения на 4 и 16 Гр. При дозе 8 Гр значение соотношения существенно снижалось за счет больших концентраций АБК. К 6-му и 7-му дню проращивания значения соотношения не отличались такой вариабельностью, но все же были существенно больше контрольных. Интересно отметить, что паттерн двухфазности на гормональном уровне также прослеживался и на морфологическом уровне. Кривая зависимости длины побега от дозы облучения характеризовалась наличием двух пиков, один из которых 16 Гр, снижение параметра между пиками было отмечено при облучении в дозе 10 Гр [Гераськин и др., 2015].

При воздействии ингибирующей дозой 50 Гр значения соотношения были крайне низкими в побегах и корнях, но в трехдневных проростках превышали уровень контроля, что, очевидно, связано с высокими концентрациями ИУК, зарегистрированными при этой дозе.

Рост и развитие растений определяются гормональной системой, соотношение гормонов-антагонистов в тех или иных процессах указывает на функциональное состояние растения, определяющее его рост и развитие. Таким образом, обнаруженное нами увеличение соотношения (ИУК + ИМК + зеатин)/АБК у проростков ячменя (табл. 3.4), выросших из облученных в стимулирующих дозах семян, обеспечивает благоприятные условия для ростовых процессов и, вероятно, обусловливает 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.

Полученные результаты выявили существенные изменения в содержании основных классов фитогормонов в проростках, вызванные γ-облучением семян ячменя. Следующий этап работы был посвящен выяснению механизмов, за счет

которых происходят наблюдавшиеся в нашем исследовании изменения фитогормонального статуса проростков.

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 гиббереллинам и АБК, которые действуют антагонистически в данном случае. 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. На сегодняшний день известно, что АБК ингибирует прорастание семян путем супрессии синтеза гиббереллинов, например, в мутантных семенах с дефицитом АБК обнаружено усиление экспрессии генов биосинтеза гиббереллинов [Seo et al., 2006]. Таким образом, усиление прорастания в этих мутантных семенах происходит за счет снятия репрессии биосинтеза гиббереллинов. Преждевременное прорастание семян кукурузы, опосредованное дефицитом АБК, может быть устранено ингибированием синтеза гиббереллинов [White et al., 2000]. АБК может негативно регулировать прорастание семян через ингибирование синтеза гиббереллинов напрямую в условиях стресса [Toh et al., 2008]. В разделе 1.3 была отмечена вовлеченность АФК в метаболизм и сигналинг обоих фитогормонов, что не могло не отразиться на регуляции их антагонистического взаимодействия. АБК может ингибировать прорастание семян риса через снижение уровней АФК, которое опосредует подавление экспрессии генов биосинтеза гиббереллинов и, как следствие, снижение их содержания [Ye et al., 2012]. К тому же прорастание семян ячменя сопровождается повышением уровня АФК, что приводит к активации экспрессии генов катаболизма АБК и снижает содержание данного фитогормона [Ishibashi et al., 2017]. Снижение уровней АФК и нарушение

процессов прорастания ведут к уменьшению транскрипционной активности генов биосинтеза гиббереллинов и их содержания, а также повышают уровни АБК через снижение транскрипционной активности гена ее катаболизма [Ishibashi et al., 2017]. Таким образом, баланс между гиббереллинами и АБК, определяющий условия прорастания семян, может меняться с помощью взаимной регуляции, когда один фитогормон через сложные сигнальные механизмы влияет на метаболизм другого фитогормона. Нередко в этих процессах в качестве вторичного посредника выступают АФК, которые индуцируются при внешнем воздействии, включая ИИ. Изменение содержания фитогормонов, и, соответственно, их баланса, регулируется их метаболизмом: синтезом и катаболизмом, за которые отвечают определенные гены. Нами была исследована транскрипционная активность генов факторов метаболизма фитогормонов, контролирующих прорастание семян, гиббереллинов и АБК.

Гиббереллины контролируют переход семян из состояния покоя к началу прорастания, увеличивая потенциал роста зародыша и активируя гидролитические ферменты алейронового слоя эндосперма [Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006]. Гиббереллины синтезируются и хранятся в зародышевых тканях, при поступлении воды в семя гиббереллины активно синтезируются *de novo* и переходят из связанных форм в активное состояние, вызывая размягчение структур, окружающих зародыш [Yamaduchi et al., 2000]. В процессе прорастания гиббереллины активно взаимодействуют с АФК. Например, они могут увеличивать содержание АФК в алейроновом слое зародыша ячменя [Ishibashi et al., 2012]. Экзогенные АФК стимулируют биосинтез гиббереллинов путем усиления экспрессии генов их биосинтеза *GA3ox, GA20ox* [Liu et al., 2010]. Есть данные, что увеличенные концентрации АФК влияют на прорастание семян ячменя не столько через репрессию сигнализации АБК, сколько через активацию синтеза и сигналинга гиббереллинов [Bazin et al., 2011].

Наши эксперименты показали (табл. 3.6), что в контрольных семенах ген фермента биосинтеза гиббереллинов *HvGa3ox2* экспрессируется активнее в первые 30 часов прорастания, нежели ген фермента катаболизма *HvGa2ox3*, что

находит подтверждение в других исследованиях [Yamaduchi et al., 2000; Sreenivasulu et al., 2008; Bahin et al., 2011]. Наибольшая транскрипционная активность у *HvGa3ox2* и *HvGa2ox3* наблюдалась на 18-й час после замачивания семян (рис. 3.13, 3.14). Это соотносится с данными, представленными в работе [Ishibashi et al., 2015], где в ходе изучения влияния АФК на зародыш и клетки алейронового слоя самые высокие значения экспрессии генов синтеза *HvGa20ox1*, *HvGa3ox*1 и катаболизма гиббереллинов *HvGa2ox4* наблюдали именно на 18-й час после замачивания. Согласно шкале микрофенологических фаз прорастания ячменя именно на 18-й час прорастания происходит проклевывание колеоптиля, т.е. первая стадия активного роста после набухания [Казакова, Козяева, 2009]. Таким образом, обнаруженный пик транскрипционной активности генов метаболизма гиббереллинов на 18-й час после замачивания отражает запуск генных сетей, ответственных за развитие проростков, а соответствующий временной промежуток является критическим для прорастания семян ячменя [Битаришвили и др., 2019].

Экспрессия гена биосинтеза гиббереллинов *HvGa3ox2* в зародышах экспериментальных семян показала отличную от контроля динамику (табл. 3.6). Более того, при облучении в дозе 50 Гр, повышение транскрипционной активности гена *HvGa3ox2* наблюдалось после 24, 30 часов прорастания и даже в сухом семени. Очевидно, ингибирующая рост доза не подавляет синтез гиббереллинов на начальных этапах прорастания, и даже наоборот может увеличить потенциал синтеза гиббереллинов. Результаты анализа экспрессии гена *HvGa3ox2* противоречат представлениям о том, что в ячмене уровень гиббереллинов не увеличивается до тех пор, пока не произошло набухание (Jacobsen et al., 2002). Увеличение транскрипционной активности в зародышах семян на поздних этапах прорастания (18-30 ч) говорит в пользу повышения уровней гиббереллинов, что в свою очередь приводит к стимуляции прорастания семян. Наибольшее значение было зафиксировано после 18 ч прорастания при 20 Гр (рис. 3.13). Именно при этой дозе в проростках ячменя было обнаружено увеличение содержания основных классов фитогормонов, стимулирующих рост и

развитие растений [Битаришвили и др., 2018], увеличение активности антиоксидантных ферментов [Волкова и др. 2016] и морфологических параметров [Гераськин и др. 2015].

Транскрипционная активность *HvGa2ox3* была повышена на протяжении всего эксперимента, кроме 12 часов прорастания (табл. 3.7), что косвенно указывает на снижение содержания гиббереллинов за счет их инактивации и, как следствие, ингибирование прорастания. Это не соотносится с представлениями о том, что гиббереллины играют ведущую роль в процессах стимуляции, выполняя функцию триггер-эффектора для синтеза α-амилазы в алейроновом слое семени [Кузин, 1977] и результатами, демонстрирующими увеличение содержания данного фитогормона в проростках в ответ на низкодозовое облучение [Machaiah et al., 1976]. Возможно, здесь имеет место ситуация, при которой паралогические гены способны по-разному изменять экспрессию в ответ на одно и то же воздействие. Можно предположить, что транскрипционная активность других генов-паралогов семейства *HvGA2ox*, не исследованная в данной работе, имела иную динамику в ответ на действие γ-облучения. Аналогично, при исследовании биосинтеза и сигналинга гиббереллинов в проростках *A. thaliana*, гены из одного семейства *AtGA3ox1* и *AtGA3ox2* демонстрировали разную динамику транскрипционной активности в ответ на гипотермию: активность гена *AtGA3ox1* увеличивалась, в то время как активность гена *AtGA3ox2* снижалась [Yamauchi et al., 2004]. При исследовании транскриптома ячменя в динамике прорастания [Sreenivasulu et al., 2008] гены *HvGA2ox1* и *HvGA2ox2* показывали диаметрально противоположную динамику экспрессии на 24-й час после замачивания семян. Похожая картина наблюдалась в работе [Ishibashi et al., 2015], где ингибитор НАДФН способствовал снижению активности гена *HvGA3ox1*, в то время как активность *HvGA3ox2* продолжала расти. Столь различные паттерны экспрессии генов одного семейства, возможно, связаны с работой дифференциальных регуляторных элементов и каскадов в каждом конкретном случае. Ясного объяснения, почему так происходит, на сегодняшний момент нет. Возможно, что при одном и том же воздействии набор гомологичных генов, в которых будут

наблюдаться изменения экспрессии, будет зависеть не только от вида растения, но и от сорта. Из этого следует, что для оценки экспрессии генов метаболизма гиббереллинов в полной мере, необходимо анализировать транскрипционную активность всех представителей таргетных семейств генов.

Синтезированная на этапе созревания АБК индуцирует покой семян, образованная *de novo* обеспечивает его поддержание [Nambara, Marion-Poll, 2005]. Процесс прорастания семян сопровождается резким снижением содержания свободной АБК за счет активации катаболических реакций и супрессии синтеза. Семейство генов *NCED* кодирует важнейший фермент биосинтеза 9-цис-эпоксидкаратиноид-диоксигеназу. Катаболизм АБК в ячмене регулируется генами *HvABA8'OH* из семейства *CYP707A*, продуктом которого является фермент АБК 8’-гидроксилаза [Nambara, Marion-Poll, 2005]. Экспрессия генов *NCED* и *ABA8'OH* является ключевым фактором, контролирующим уровень АБК и, соответственно, процессы покоя и прорастания [Tuan et al., 2018].

Результаты настоящей работы показывают, что γ-облучение семян изменяет экспрессию генов биосинтеза и катаболизма АБК в зародышах ячменя. Изменения фиксировали на всех этапах прорастания, даже в зародышах воздушно-сухих семян. Использование стимулирующих доз преимущественно приводило к снижению транскрипционной активности гена биосинтеза АБК *HvNCED1* с 6-го по 18-й час (рис. 3.15) и различной динамике накопления транскриптов гена катаболизма АБК *HvABA8’OH-1,* в том числе резкому увеличению их содержания на 18 часах при дозе 20 Гр (рис. 3.16), что может вести к снижению уровней АБК в исследуемой ткани. Интересно отметить, что именно при дозе 20 Гр на 18-й час прорастания было отмечено максимальное значение транскрипционной активности гена фермента биосинтеза гиббереллинов *HvGA3ox2* (рис. 3.13), превышающее контрольное в 7 раз, что свидетельствует об общих элементах сигнальных каскадов, приводящих к изменениям в экспрессии генов, контролирующих метаболизм обоих фитогормонов. Применение ингибирующей дозы 50 Гр приводило к увеличению транскрипционной активности гена

HvNCED1 и снижению данного параметра у гена *HvABA8'OH-1* с 6 по 18 ч прорастания, что могло вести к накоплению АБК.

Анализируя изменения генов метаболизма АБК, наблюдаемые в данной работе, необходимо учитывать роль АФК как в процессе прорастания, так и при ответе на стресс. В условиях стресса в растениях индуцируются большие количества АФК, что ведет к увеличению содержания АБК за счет усиления синтеза и уменьшения катаболизма [Huang et al., 2012; Song et al., 2014]. Однако увеличенные концентрации АФК во время прорастания семян увеличивают экспрессию генов катаболизма АБК, и, таким образом, снижают уровни АБК [Ishibashi et al., 2017]. Отсюда следует, что АФК могут как положительно, так и отрицательно регулировать содержание АБК, что, вероятно, зависит от локализации АФК и их концентраций, индуцированных в том или ином случае. В работе [Choudhury et al., 2016] высказано предположение, что при стрессовом воздействии на растения в клетках существуют два источника образования АФК. Первый тип – АФК, образующиеся в результате нарушений метаболического равновесия клетки, и участвующие в трансдукции сигнала в ответ на стрессовое воздействие, или «метаболические» АФК. Они могут напрямую изменять окислительно-восстановительное состояние ферментов, контролирующих метаболические потоки в клетке, для повышения стрессоустойчивости. Второй тип – АФК, генерирующиеся при восприятии стресса специальными сенсорами и опосредованные активацией НАДФН-оксидаз, или сигнальные. Они также способствуют повышению стрессоустойчивости за счет изменения окислительно-восстановительного состояния регуляторных белков и их биосинтеза. В случае с ИИ есть еще и третий тип – первичные АФК, индуцируемые в клетке радиолизом воды. Возможно, разнонаправленные эффекты в результате воздействия большими и малыми дозами ИИ, в том числе объясняются изменением соотношения АФК разного генезиса, которые имеют различную локализацию, активируют разные системы трансдукции сигнала и, соответственно, генные пути. Также существует мнение [Гераськин, 1995], что различие между большими и малыми дозами с физической точки зрения носит не качественный, а

количественный характер. В таком случае можно предположить, что концентраций АФК, образовавшихся в результате действия малых доз (4-20 Гр) было недостаточно для развития окислительного стресса, но достаточно для усиления их сигнальных функций, повлекших за собой изменения экспрессии генов метаболизма АБК, что могло обусловить снижение уровня АБК [Битаришвили и др., 2018]. Изменения в транскрипционной активности исследуемых генов после облучения семян дозой 50 Гр, наоборот, свидетельствуют в пользу проявления окислительного стресса и увеличения потенциала синтеза АБК.

Результаты анализа транскрипционной активности генов метаболизма фитогормонов представлены в достаточно подробной динамике с широким диапазоном доз, эффекты в генах синтеза и катаболизма имели разную направленность, к тому же значения могли отличаться на порядок, что затрудняет восприятие результатов. Для улучшения интерпретации результатов были проанализированы соотношения транскрипционных активностей генов катаболизма и синтеза гиббереллинов *HvGa3ox2*/*HvGa2ox3* (рис. 4.2) и АБК *HvABA8'OH-1*/ *HvNCED1* (рис. 4.3).

Из рисунка 4.2 видно, что облучение в дозе 20 Гр после 18 часов прорастания резко сдвигает соотношение в сторону гена *HvGa3ox2*, что подразумевает преобладание синтеза гиббереллинов над катаболизмом, и, как следствие, стимуляцию прорастания. 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.

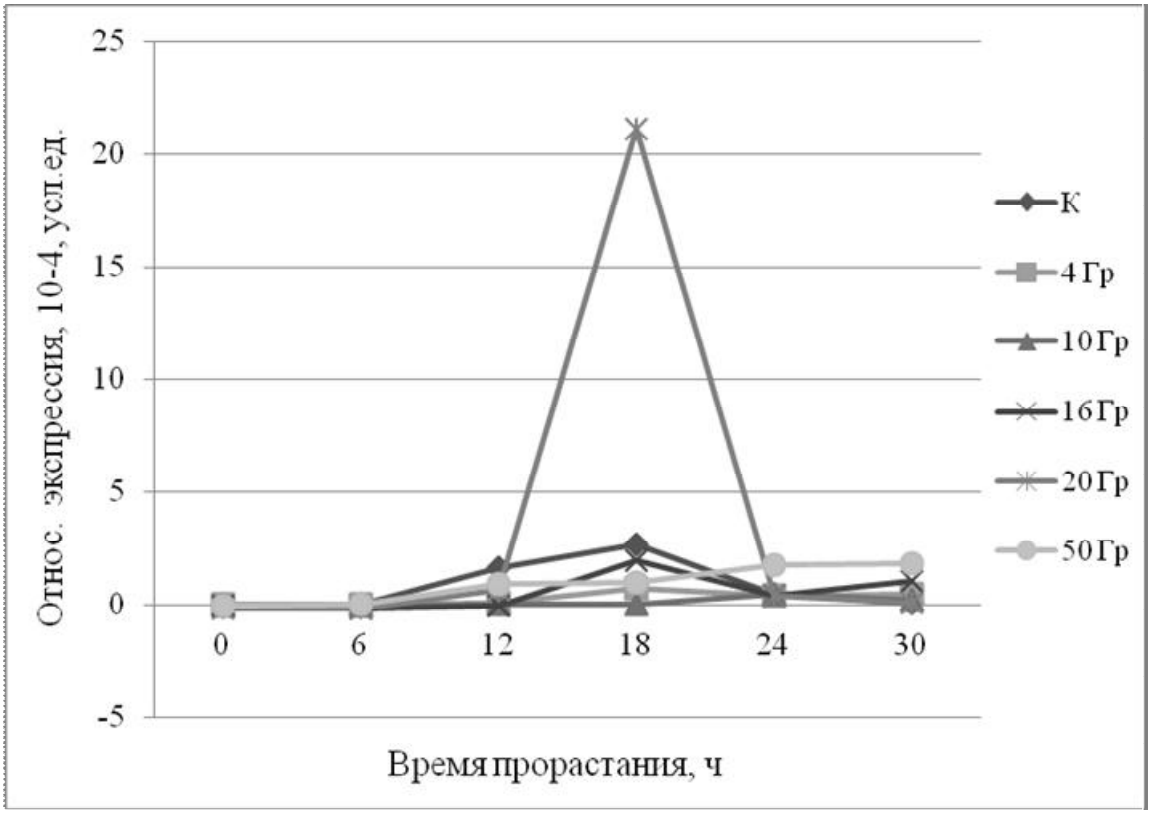

Рисунок 4.2 – Соотношение транскрипционной активности генов HvGa3ox2/HvGa2ox3 в зависимости от дозы облучения и времени прорастания

Соотношение транскрипционной активности генов метаболизма АБК *HvABA8'OH-1*/*HvNCED1* (рис. 4.3) 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.

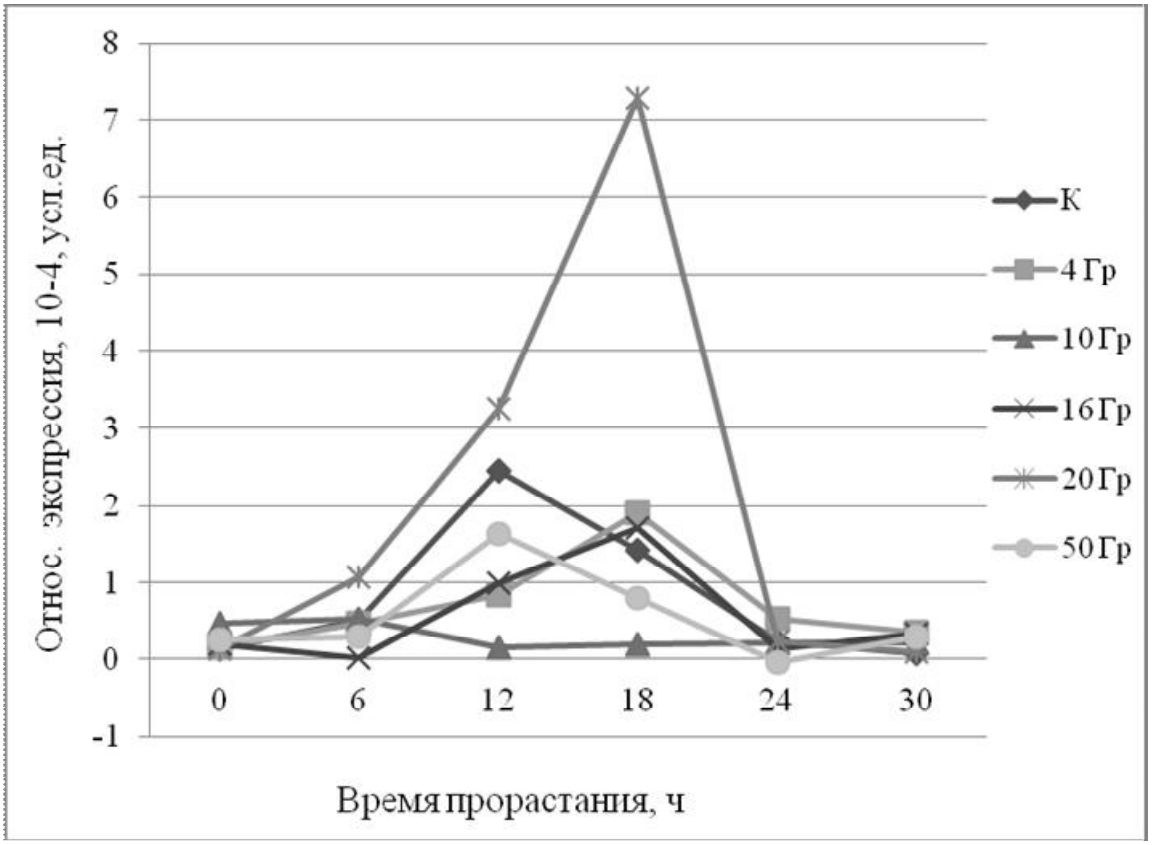

Рисунок 4.3 – Соотношение транскрипционной активности генов *HvABA8'OH-1*/*HvNCED1* в зависимости от дозы облучения и времени прорастания

Выявленные изменения генной экспрессии на 18-й час прорастания при облучении в дозе 20 Гр 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 растения ячменя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение закономерностей действия ИИ на растения берет начало со времен открытия рентгеновских лучей и явления радиоактивности. Несмотря на более чем вековую историю исследований, в радиобиологии остаются невыясненные вопросы. Одним из таких вопросов является выявление механизмов формирования адаптивных реакций растений в результате действия ИИ в малых дозах. Кроме фундаментального значения, исследования в этом направлении являются предпосылкой для решения практических задач, связанных с применением радиационных технологий в сельском хозяйстве.

Анализ литературных источников выявил недостаток научных исследований в области изучения 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 (табл. 3.5). 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 приводили 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 (табл. 3.1), тогда как концентрация ИМК, которая в норме также накапливается в корнях, в облученных проростках увеличивалась в основном в побегах (табл. 3.2). 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 (табл. 3.3), что свидетельствует о протекторном ответе цитокининов на стресс.

Процесс прорастания находится под контролем антагонистического взаимодействия АБК и гиббереллинов, содержание которых определяется их метаболизмом. Нами было показано, что γ-облучение семян ячменя изменяет экспрессию генов метаболизма АБК и гиббереллинов на всех этапах прорастания, даже в зародышах воздушно-сухих семян. В ответ на облучение экспрессия генов факторов синтеза и катаболизма гиббереллинов была преимущественно увеличена на всех этапах прорастания, кроме 12 часов (табл. 3.6, 3.7). Экспрессия гена биосинтеза гиббереллинов *HvGa3ox2* демонстрировала разнонаправленную динамику (табл. 3.6) в том числе и на уровне статистически значимых различий: была снижена на ранних этапах прорастания (6 и 12 часов) и увеличена на более поздних (24 и 30 часов). С увеличением времени прорастания наблюдалась тенденция к увеличению разницы транскрипционной активности изученных генов между зародышами контрольных и облученных семян. Стимулирующие дозы γ-

облучения семян снижали транскрипционную активность гена биосинтеза АБК *HvNCED1* с 6-го по 18-й час (рис. 3.15) и приводили к различной динамике накопления транскриптов гена катаболизма АБК *HvABA8'OH-1* (рис. 3.16), в том числе к резкому увеличению их содержания на 18-ти часах при дозе 20 Гр, что может вести к снижению уровней АБК в исследуемой ткани. Применение ингибирующей дозы 50 Гр приводило к увеличению транскрипционной активности гена *HvNCED1* и снижению активности гена *HvABA8'OH-1* с 6 по 18 ч прорастания, что может опосредовать накопление АБК.

Наиболее существенные изменения исследуемых параметров происходили при облучении в дозе 20 Гр после 18 часов прорастания. Этот временной промежуток является критическим и соответствует началу проклевывания семян ячменя. Соотношение транскрипционных активностей генов метаболизма гиббереллинов демонстрировало преобладание синтеза гиббереллинов над катаболизмом (рис. 4.2). В случае с транскрипционной активностью генов метаболизма АБК выявлена противоположная закономерность – преобладание катаболизма над биосинтезом (рис. 4.3). Именно при дозе 20 Гр на семенах сорта Нур ранее было обнаружено увеличение активности ферментов антиоксидантной системы (Волкова и др. 2016) и размеров проростков [Гераськин и др., 2015].

Исследованная в данной работе экспрессия генов метаболизма гиббереллинов и АБК не является концом сигнального пути и не определяет полностью концентрации фитогормонов, но может указывать на увеличение потенциала их синтеза или катаболизма. Есть множество других аспектов, включая транскрипционную, посттранскрипционную и посттрансляционную регуляцию, генную избыточность, альтернативный сплайсинг, некодирующие РНК и эпигенетические эффекты, которые регулируют пути передачи сигналов. Эти направления, несомненно, требуют дальнейшего изучения для раскрытия механизмов радиационной стимуляции.

Подводя итог, можно заключить, что фитогормоны и гены, контролирующие их биосинтез и катаболизм, активно участвуют в адаптивных

реакциях растений и играют важную роль в формировании эффекта радиационной стимуляции морфологических параметров 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 обусловливают 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 обусловливает увеличение потенциала роста и развития проростков ячменя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексахин, Р.М. Сельскохозяйственная радиоэкология: монография / Р.М. Алексахин, А.В. Васильев, В.Г. Дикарев. – М.: Экология, 1992. – 400 с.
2. Бабаян, Р.С. Проращивание семян в рулонах из фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки / Р.С. Бабаян // Сельскохозяйственная биология. – 1981. – № 3. – С. 473–475.
3. Батыгин, Н.Ф. Использование ионизирующих излучений в растениеводстве / Н.Ф. Батыгин, В.Н. Савин. – Ленинград: Колос, 1966. – 124 с.
4. Березина, Н.М. Предпосевное облучение семян сельскохозяйственных растений / Н.М. Березина. – М.:Атомиздат, 1964. – 211 с.
5. Битаришвили, С.В. Влияние γ-облучения семян на фитогормональный статус проростков ячменя / С.В. Битаришвили, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Физиология растений. – 2018. – Т 65. – № 3. – С. 223–231.
6. Битаришвили, С.В. Влияние γ-облучения на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма абсцизовой кислоты в зародышах семян ячменя / С.В. Битаришвили, В.С.Бондаренко, С.А. Гераськин // Экологическая генетика. – 2018. – Т 16. – № 4. – С. 85–89.
7. Битаришвили, С.В. Экспрессия генов биосинтеза и катаболизма гиббереллинов в зародышах γ-облученных семян ячменя / С.В. Битаришвили, В.С.Бондаренко, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т.59. № 3. С. 286–292.
8. Бреславец, Л.П. Растение и лучи Рентгена / Л.П. Бреславец. – М.: Изд-во АН СССР, 1946. – 194 с.
9. Васильев И.М. Действие ионизирующих излучений на растения / И.М. Васильев. – М.: Изд. АН СССР, 1962. – 224 с.
10. Волкова П.Ю., Чурюкин Р.С., Гераськин С.А. Влияние γ-облучения семян на активность ферментов в проростках ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 2. С. 1–7.

11. Гераськин, С.А. Концепция биологического действия малых доз ионизирующего излучения на клетки / С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35. – №. 5. – С. 571–580.
12. Гераськин, С.А. Модификация γ-облучением семян развития растений ячменя на ранних этапах онтогенеза / С.А. Гераськин, Р.С. Чурюкин, Е.А. Казакова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55. – № 5. – С. 607–615.
13. ГОСТ 12038–84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Межгосударственный стандарт. Стандарты на методы контроля. – М.:Стандартинформ, 2002. – 28 с.
14. Гребинский, С.О. Последействие у-облучения семян ячменя и гороха на способность гиббереллина индуцировать биосинтез α-амилазы / С.О. Гребинский, Е.Н. Заярнюк, М.С. Гарголя // Физиология и биохимия культурных растений. – 1973. – Т. 5. – С. 260–262.
15. Гродзинский, Д.М. Радиобиология растений / Д.М. Гродзинский. – Киев: Наук. думка, 1989. – 384 с.
16. Гудков, И.Н. Основы общей и сельскохозяйственной радиобиологии / И.Н. Гудков. – Киев: Изд–во УСХА, 1991. – 328 с.
17. Гудков, И.Н. Сокращение продолжительности клеточного цикла растений при радиационном гормезисе / И.Н. Гудков // Физиология и биохимия культурных растений. – 1993. – Т 25. – № 3. – С. 267–273.
18. Казакова, А.С. Шкала микрофенологических фаз прорастания семян ярового ячменя / А.С. Казакова, С.Ю. Козяева // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 3. – С. 88–92.
19. Кожокару, А.Ф. Изучение механизма действия γ-облучения на биосинтез индольных производных и их роли в образовании энергии в проростках растений / А.Ф. Кожокару, А.Ф. Ревин // Современные проблемы науки и образования.
20. Козьмин, Г.В. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности / Г.В. Козьмин, С.А. Гераськин, Н.И. Санжарова. – Обнинск: ВНИИРАЭ, 2015. – 400 с.

21. Коломиец, К.Д. Биосинтез белков и радиационные эффекты в клетке / К.Д. Коломиец. – Киев:Наукова думка, 1982. – 182 с.
22. Кузин, А.М. Молекулярные механизмы стимулирующего действия ионизирующего излучения на семена растений / А.М. Кузин // Радиобиология. – 1972. – № 12. – С. 635–643.
23. Кузин, А.М. Прикладная радиобиология / А.М. Кузин, Д.А. Каушанский. – М.: Энергоиздат, 1981. – 222 с.
24. Кузин, А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы (к проблеме биологического действия малых доз) / А.М. Кузин. – М.: Атомиздат, 1977. – 136 с.
25. Кузин, А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии / А.М. Кузин. – М.: Наука, 1986. – 284 с.
26. Курсанов, А.Л. Взаимодействие фитогормонов и их влияние на рост изолированных семядолей / А.Л. Курсанов, О.Н. Кулаева, Т.П. Микулович // Физиология растений. – 1969. – Т. 16. – № 4. – С. 680–686.
27. Лоскутов, И.Г. Итоги и перспективы исследований мировой коллекции овса, ржи и ячменя / А.А. Лоскутов, В.Д. Кобылянский, О.Н. Ковалева // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т 164. – С. 80–101.
28. Лутова, Л.А. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, М.А. Осипова. – Спб.:Наука, 2010. – 539 с.
29. Михеев А.Н. Гиперадаптация. Стимулированная онтогенетическая адаптация растений /А.Н. Михев. – К.: Фотосоциоцентр, 2015. – 423 с.
30. Нефедьева, Е.Э. Давление как фактор регуляции у растений: монография / Е.Э. Нефедьева, В.И. Лысак. – ВолгГТУ. – Волгоград, 2009. – 188 с.
31. Обручева Н.В. Физиология инициации прорастания семян / Н.В. Обручева, О.В. Антипова //Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 2. – С. 287-302.
32. Обручева, Н.В. Переход от гормональной к негормональной регуляции на примере выхода семян из покоя и запуска прорастания / Н. В. Обручева // Физиология растений. – 2012. – С. 591–600.

33. Петин, В.Г. Радиационный гормезис при действии малых доз ионизирующего излучения: учебное пособие по курсу «Экологическая биофизика» / В.Г. Петин, М.Д. Пронкевич. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2012. – 73 с.
34. Преображенская, Е.И. Радиоустойчивость семян растений / Е.И. Преображенская. – М.: Атомиздат, 1971. – 231 с.
35. Репко, Н. В. Статистические исследования мирового производства зерна ячменя / Н.В. Репко, К.В. Подоляк, Е.В. Смирнова, Ю.В. Острожная // Политематич. сетевой электр. науч. журнал КубГАУ. – Краснодар: КубГАУ. – 2015. – № 106.
36. Тимофеев-Ресовский Н.В. Применение принципа попадания в радиобиологии / Н.В. Тимофеев-Ресовский, В.И. Иванов, В.И. Корогодин. – М.: Атомиздат, 1968. – 226 с.
37. Тимофеев-Ресовский Н.В., Лучник Н.В. Радиостимуляция растений и ее возможная теоретическая интерпретация // Всесоюз. науч.-техн. конф. по применению излучений: Тез. докл. М., 1957. С. 53.
38. Тимофеев-Ресовский, Н.В. О радиостимуляции растений / Н.В. Тимофеев-Ресовский, Н.А. Порядкова // Ботан. журн. – 1956. – Т. 41. – С. 1620–1623.
39. Титов, А.Ф. Устойчивость растений и фитогормоны / А.Ф. Титов, В.В. Таланова // – Петрозаводск: Карел. НЦ РАН, 2009. – 206 с.
40. Храмченкова, О.М. Основы радиобиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей высших учебных заведений / О.М. Храмченкова – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2003. – 238 с.
41. Цыб, А.Ф. Радиация и патология: учеб.пособие / А.Ф. Цыб, Р.С. Будагов, И.А. Замулаева и др. – Москва, 2005. – 341 с.
42. Чайлахян, М.Х. Гормональная регуляция роста и развития высших растений / М.Х. Чайлахян // Успехи современ. биологии. – 1982. – Т 1. – С. 23–34.
43. Ярмоненко, С.П. Радиобиология человека и животных: учебное пособие / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон. – М.:Высшая школа, 2004. – 552 с.
44. Abou El-Yazied, A. Growth, Biochemical Constituents and Yield of Snap Bean as Influenced by Low Gamma Irradiation Doses under Different Sowing Dates / A. Abou El-Yazied // Australian J. Basic Appl. Sci. – 2011. – V. 5. – PP. 30–42.

45. Ahmad, P. Oxidative damage to plants / P. Ahmad. – Academic Press, Elsevier Science, 2014. – 672 p.
46. Alvarez, S. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought / S. Alvarez, E. L. Marsh, S. G. Schroeder, D. P. Schachtman // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – PP. 325–340.
47. Araújo, S.S. Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology / S.S. Araújo, S. Paparella, D. Dondi, A. Bentivoglio, D. Carbonera, A. Balestrazzi // Frontiers in Plant Science. – 2016. – V. 7: 646.
48. Argueso, C.T. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways / C.T. Argueso, F.J. Ferreira, J.J. Kieber // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – PP. 1147–1160.
49. Bahin, E. Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley / E. Bahin, C. Bailly, B. Sotta et al. // Plant Cell Environ. – 2011. – V. 34. PP. 980–993.
50. Bailly, C. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology / C. Bailly, H. El-M. Bouteau, F. Corbineau // Comptes Rendus Biologies. – 2008. – V. 331. PP. 806–814.
51. Baldwin, J. Radiation Hormesis: Historical and Current Perspectives / J. Baldwin, V. Grantham // Journal of Nuclear Medicine Technology. – 2016. – V. 43. – PP. 242–247.
52. Baldwin, J. Radiation Hormesis: Historical and Current Perspectives / J. Baldwin, V. Grantham // Journal of Nuclear Medicine Technology. – 2015. – V. 43. – № 4. – PP. 242–247.
53. Basbouss-Serhal, I. Fluctuation of Arabidopsis seed dormancy with relative humidity and temperature during dry storage / I. Basbouss-Serhal, J. Leymarie, C. Bailly // J. Exp. Bot. – 2016. – V. 67. PP. 119–130.
54. Baxter, A. ROS as key players in plant stress signaling / A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki // J. Exp. Bot. – 2014. – V. 65. – PP. 1229–1240.

55. Bazin, J. Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening / J. Bazin, N. Langlade, P. Vincourt, S. Arribat, et al. // Plant Cell. – 2011. – V. 23. – PP. 2196–2208.

56. Benderitter, M The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation / L. Vincent-Genod, J.P. Pouget, P. Voisin // Radiat Res. – 2003. V. 159. – PP. 471–483.

57. Benech-Arnold, R.L. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains / R.L. Benech-Arnold, N. Gualano, J. Leymarie, D. Come et al. // J Exp Bot. – 2006. – V. 57. – PP. 1423–1430.

58. Bentsink, L. Seed dormancy and germination / L. Bentsink, M. Kooenneef // The Arabidopsis book. – 2002. – 6: e0119.

59. Bewley, D. Seed germination and dormancy / D. Bewley // Plant Cell. – 1997. – V. 9. – PP. 1055–1066.

60. Bewley, J. D. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy / J. D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M. Hilhorst, H. Nonogaki. – New York, NY: Springer, 2013. – 392 p.

61. Calabrese, E.J. Hormesis and plant biology / E.J. Calabrese, R.B. Blain // Environ Poll. – 2009. – V. 157. – P. 42–48.

62. Calabrese, E.J. Hormesis within a mechanistic context / E.J. Calabrese // Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy. – 2015. – V. 104. – P. 90–96.

63. Calabrese, E.J. Radiation hormesis: origins, history, scientific foundations / E.J. Calabrese, L.A. Baldwin // Human Experimental Toxicology. – 2000. – V. 19. – P. 41–75.

64. Calabrese, E.J. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview / E.J. Calabrese, R. Blain // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2005. – V. 202. – P. 289–301.

65. Cannan, W.J. Nucleosomes suppress the formation of double-strand dna breaks during attempted base excision repair of clustered oxidative damages / W.J. Cannan,

B.P. Tsang, S.S. Wallace, D.S. Pederson // J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289. – PP. 1988–1993.

66. Cao, F.Y. The roles of ABA in plant– pathogen interactions / F.Y. Cao, K. Yoshioka, D. Desveaux // J. Plant Res. – 2011. – V. 124. – PP. 489–499.
67. Cary, A.J. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedlings / A.J. Cary, W. Liu, S.H. Howell // Plant Physiol. – 1995. – V. 107. – PP. 1075–1082.
68. Cedzich, A. Characterization of cytokinin and adenine transport in Arabidopsiscell cultures / A. Cedzich, H. Stransky, B. Schulz, W.B. Frommer // Plant Physiol. – 2008. – V. 148. – PP. 1857–1867.
69. Chakrabarti, N. Alleviation of NaCl stress by pretreatment with phytohormones in Vigna radiate / N. Chakrabarti, S. Mukherji // Biol. Plantarum. – 2003. – V. 46. – PP. 589–594.
70. Chaudhri, S.K. A simple and reliable method to detect gamma irradiated lentil (*Lens culinaris* Medik) seeds by germination efficiency and seedling growth test / S.K. Chaudhri // Radiation Physics and Chemistry. – 2002. – V. 64. – PP. 131–136.
71. Cheng, W.H. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions / W.H. Cheng, A. Endo, L. Zhou, J. Penney et al. // The Plant Cell Online. – 2002. – V. 14. – PP. 2723–2743.
72. Chiwocha, S.D.S. The ert1-2 mutation in Arabidopsis thaliana affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination / S.D.S. Chiwocha, A.J. Cutler, S.R. Abrams et al. // Plant J. – 2005. – V. 42. PP. 35–48.
73. Chono, M. Field studies on the regulation of abscisic acid content and germinability during grain development of barley: molecular and chemical analysis of preharvest sprouting / M. Chono, I. Honda, S. Shinoda, T. Kushiro et al. // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57. – PP. 2421–2434.
74. Choudhury, F.K. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination / F.K. Choudhury, R.M. Rivero, E. Blumwald, R. Mittler // Plant J. – 2016. – V. 90. – PP. 856–867.

75. Corre, I. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation / I. Corre, C. Niaudet, F. Paris // Mutat Res. – 2010. V. 704. – PP. 61–67.

76. Culligan, K.M. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation / C.E. Robertson, J. Foreman, P. Doerner, A.B. Britt // Plant J. – 2006. – V. 148. – PP. 947–961.

77. Davies, P.J. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! / P.J. Davies. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2004. – 750 p.

78. de Torres-Zabala, M. Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease / M. de Torres-Zabala, W. Truman, M.H. Bennett, G. Lafforgue et al. // EMBO J. – 2007. – V. 26. – PP. 1434–1443.

79. Dello Ioio, R. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem / R. Dello Ioio, K. Nakamura, L. Moubayidin, S. Perilli et al. // Science. – 2008. – V. 322. – PP. 1380–1384.

80. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology / V. Demidchik // Environ Exp Bot. – 2015. – V. 109. – PP. 212–228.

81. Dettmer, J. Hormone interactions during vascular development / J. Dettmer, A. Elo, Y. Helariutta // Plant Mol. Biol. – 2009. – V. 69. – PP. 347–360.

82. Dobra, J. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content / J. Dobra, V. Motyka, P. Dobrev, J. Malbeck et al. // J. Plant Physiol. – 2010. – V. 167. – PP. 1360–1370.

83. Du, Y. L. Exogenous abscisic acid reduces water loss and improves antioxidant defence, desiccation tolerance and transpiration efficiency in two spring wheat cultivars subjected to a soil water deficit / Y. L. Du, Z. Y. Wang, J. W. Fan, N. C. Turner // Funct. Plant Biol. – 2013. – V. 40. – PP. 494–506.

84. El‐Maarouf‐Bouteau, H. Oxidative signaling in seed germination and dormancy / H. El‐Maarouf‐Bouteau, C. Bailly // Plant Signaling & Behavior. – 2008. – V. 3. – PP. 175–182.

85. Eroglu, Y. Gamma ray reduces mitotic index in embryonic roots of Hordeum vulgare L. / H.E. Eroglu, A.I. Ilbas // Advanced Biological Research. – 2007. – V. 1. – PP. 26–28.

86. Esnault, M.A. Ionizing radiation: Advances in plant response / M.A. Esnault, F. Legue, C. Chenal // Environmental and Experimental Botany. – 2010. – V. 68. – PP. 231–237.

87. Evans, H.J. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide inVicia Faba / H.J. Evans, D. Scott // Genetics. – 1964. – V. 49. – PP. 17–38.

88. Evans, M.L. The action of auxin on plant cell elongation / M.L. Evans // Critical Rev. Plant. Sci. – 1985. – V. 2. – PP. 317–365.

89. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique / M. Fenech // Mutat Res. – 2000. – V. 455. – PP. 81–95.

90. Finch-Savage, W.E. Seed dormancy and the control of germination / W.E. Finch-Savage, G. Leubner-Metzger // New Phytol. – 2006. – V. 171. – PP. 501–523.

91. Finch-Savage, W.E. Seed dormancy release in Arabidopsis Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing / W.E. Finch-Savage, C.S.C. Cadman, P.E. Toorop, J.R. Lynn et al. // Plant J. – 2007. – V. 51. – PP. 60–78.

92. Finkelstein, R. Abscisic Acid synthesis and response / R. Finkelstein // The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists. – 2013. – 11: e0166.

93. Finkelstein, R.R. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings / R.R. Finkelstein, S.S.L. Gampala, C.D. Rock // Plant Cell (suppl.). – 2002. – V. 14. – PP. S15–S45.

94. Fortunati, A. Neutron irradiation affects the expression of genes involved in the response to auxin, senescence and oxidative stress in Arabidopsis / A. Fortunati, P. Tassone, M. Damasso, F. Migliaccio // Plant Signal Behav. – 2010. – V. 5. – PP. 959–967.

95. Friml, J. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis / J. Friml, J. Wiśniewska, E. Benková, K. Mendgen, K. Palme // Nature. – 2002. – V. 415. – PP. 806–809.

96. Fujita, Y. ABA mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants / Y. Fujita, M. Fujita, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // J. Plant Res. – 2011. – V. 124. – PP. 509–525.

97. Galuszka, P. Cytokinin oxidase or dehydrogenase. Mechanism of cytokinin degradation in cereals / P. Galuszka, I. Frebort, M. Sebela et al. // Europ J Biochem. – 2001. – V. 268. – PP. 450–461.

98. Gao, F. Integrated analysis of seed proteome and mRNA oxidation reveals distinct post-transcriptional features regulating dormancy in wheat (Triticum aestivum L.) / F. Gao, C. Rampitsch, V. R. Chitnis, G. D. Humphreys et al. // Plant Biotechnol. J. – 2013. – V. 11. – PP. 921–932.

99. Ghanem, M. E., Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (Solanum lycopersicum L.) / M. E. Ghanem, A. Albacete, C. Martínez-Andújar, M. Acosta et al. // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59. – PP. 3039–3050.

100. Gomes, M.P. Reactive oxygen species and seed germination / M.P. Gomes, Q.S. Garcia // Biologia. – 2013. – V. 68. PP. 351–357.

101. Gómez-Cadenas, A. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules / A. Gómez-Cadenas, R. Zentella, M.K. Walker-Simmons, T.H.D. Ho // Plant Cell. – 2001. – V. 13. – PP. 667–179.

102. Gordon, S.A. Studies on the mechanism of phytohormone damage by ionizing radiation / S.A. Gordon, R.P. Webber // Pl. Physiol. – 1955. – V. 30. – PP. 200–210.

103. Grant, M. Systemic immunity / M. Grant, C. Lamb // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – V. 9. – PP. 414–420.

104. Gubler, F. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression / F. Gubler, P.M. Chandler, R.G. White, D.J. Llewellyn // Plant Physiol. – 2002. – V. 129. – PP. 191–200.

105. Gubler, F. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter / F. Gubler, R. Kalla, J.K. Roberts, J.V. Jacobsen // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – PP. 1879–1891.

106. Gubler, F. Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism / F. Gubler, T. Hughes, P. Waterhouse, J. Jacobsen // Plant Physiol. – 2008. – V. 147. – PP. 886–896.

107. Gupta, R. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved / R. Gupta, S.K. Chakrabarty // Plant Signal Behav. – 2013. – 8: e25504.

108. Ha, S. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses / S. Ha, R. Vankova, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki et al. // Trends Plant Sci. – 2012. – V. 17. – PP. 172–179.

109. Han, W. Ionizing Radiation, DNA double strand break and mutation / W. Han, K. Yu // Adv Genet Res. – 2010. – V. 4.

110. Hartwell, L.H. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events / L.H. Hartwell, T.A. Weinert // Science. – 1989. – V. 246. – PP. 629–634.

111. Hirose, N. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation / N. Hirose, K. Takei, T. Kuroha, T. Kamada-Nobusada et al. // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59. – PP. 75–83.

112. Hof, J.V. Growth inhibition mitotic cycle time and cell number in chronically irradiated root meristems of pisum / J.V. Hof, A.H. Sparrow // Radiation Botany. – 1963. – V. 3. – PP. 239–247.

113. Huang, G.T. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants / G.T. Huang, S.L. Ma, L.P. Bai, L. Zhang et al. // Mol. Biol. Rep. – 2012. – V. 39. – PP. 969–987.

114. Ishibashi, Y. A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination / Y. Ishibashi, S. Kasa, M. Sakamoto, N. Aoki, et al. // PLoS One. – 2015. – 10(11): e0143173. doi:10.1371/journal.pone.0143173

115. Ishibashi, Y. Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells / Y. Ishibashi, T. Tawaratsumida, K. Kondo, S. Kasa, et al. // Plant Physiol. – 2012. – V. 158. – PP. 1705–1714.

116. Ishibashi, Y. The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination / Y. Ishibashi, N. Aoki, S. Kasa, M. Sakamoto et al. // Front. Plant Sci. – 2017. – 8: 275.

117. Ja, T. Exogenous auxin regulates H_2O_2 metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide

dismutase, catalase, and peroxidase / T. Ja, K. Dunajska, P. Mazurek, B. Piotrowska et al. // Acta Physiol Plant. – 2009. – V. 31. – PP. 249–260.

118. Jackson, D. Control of phyllotaxy in maize by the abphyl1 gene / D. Jackson, S. Hake // Development. – 1999. – V. 126. – PP. 315–323.
119. Jacobsen, J. V. Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (Triticum aestivum L) / J.V. Jacobsen, J.M. Barrero, T. Hughes, M. Julkowska // Planta. – 2013. – V. 238. – PP. 121–138.
120. Jacobsen, J.V. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley / J.V. Jacobsen, D.W. Pearce, A.T. Poole, R.P. Pharis // Physiologia Plantarum. – 2002. – V. 115. – PP. 428–441.
121. Jan S. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products / S. Jan, T. Parween, T.O. Siddiqi, Mohmooduzzafar // Environmental Reviews. – 2012. – V. 20. – PP. 17–39.
122. Jarošova, J. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR / J. Jarošova, J.K. Kundu // BMC Plant Biology. – 2010. – 10:146
123. Jasinski, S. The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3;1-overexpressing plants / S. Jasinski, C. Riou-Khamlichi, O. Roche, C. Perennes et al. // Journal of Cell Science. – 2002. – V. 115. – PP. 973–982.
124. Joshi-Saha, A. Molecular mechanisms of abscisic acid action in plants and its potential applications to human health / A. Joshi-Saha, C. Valon, J. Leung // Advances in Botanical Research. – 2011. – V. 57. – PP. 249–292.
125. Kaneko, M. Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? / M. Kaneko, H. Itoh, Y. Inukai, T. Sakamoto et al. // Plant J. – 2003. – V. 35. – PP. 104–115.
126. Kermode, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy / A.R. Kermode // J Plant Growth Regul. – 2005. – V. 24. – PP. 319–344.

127. Khadri, M. Alleviation of salt stress in common bean (Phaseolus vulgaris) by exogenous abscisic acid supply / M. Khadri, N. A. Tejera, C. Lluch // J. Plant Growth Regul. – 2006. – V. 25. – PP. 110–119.

128. Khandelwal, A. Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance / A. Khandelwal, S.H. Cho, H. Marella, Y. Sakata et al. // Science. – 2010. – 327: 546

129. Kim, J.H. Effects of in Planta Gamma-Irradiation on Growth, Photosynthesis, and Antioxidative Capacity of Red Pepper (*Capsicum annuum L.*) Plants / J.H. Kim, B. Y. Chung, J.S. Kim, S.G. Wi // Journal of Plant Biology. – 2005. – V. 48. – № 1. – PP. 47–56.

130. Kim, J-B. Gamma Irradiation Induced Transcriptional Repression of the Gibberellin Acid Regulating Genes in Arabidopsis Plants / J-B. Kim, E.J. Goh, B-K. Ha, S.H. Kim, S-Y. Kang, Jang, C.S., D.S. Kim // Journal of Radiation Industry. – 2012. – V. 6. – PP. 281–287.

131. Kim, T-H. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO2, and Ca2+signaling / T-H. Kim, M. Bohmer, H. Hu, N. Nishimura, J.I. Schroeder // Ann. Rev. Plant Biology. – 2010. – V. 61. – PP. 561–591.

132. Kim, W. HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in Arabidopsis / W. Kim, Y. Lee, J. Park, N. Lee et al. // Plant Cell Physiol. – 2013. – V. 54. – PP. 555–572.

133. Koornneef, M. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis / M. Koornneef, K.M. Léon-Kloosterziel, S.H. Schwartz, J.A.D. Zeevaart // Plant Physiology and Biochemistry. – 1998. – V. 36. – PP. 83–89.

134. Korasick, D.A. Auxin biosynthesis and storage forms / D.A. Korasick, T.A. Enders, L.C. Strader // J. Exp. Bot. – 2013. – V. 64. – PP. 2541–2555.

135. Kucera, B. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination / B. Kucera, M.A. Cohn, G. Leubner-Metzger // Seed Sci Res. – 2005. – V. 15. – PP. 281–307.

136. Kudo, T., Metabolism and long-distance translocation of cytokinins / T. Kudo, T. Kiba, H. Sakakibara // J Integr Plant Biol. – 2010. – V. 52. – PP. 53–60.

137. Kumari, R. Effect of gamma rays and EMS on seed germination and plant survival of *Pisum sativum L*., and *Lens culinaris* / R. Kumari, Y. Singh // Medic. Neo Botanica. – 1996. – V. 4. – № 1. – PP. 25–29.

138. Kushiro, T. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism / T. Kushiro, M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi et al. // EMBO Journal. – 2004. – V. 23. – PP. 1647–1656.

139. Latif, H.H. Radio-Stimulation of Phytohormons and Bioactive Components of Coriander Seedlings / H.H. Latif, M.A. Abdalla, S.A. Farag // Turkish J.Biochem. – 2011. – V. 36. – № 3. – PP. 230–236.

140. Lee, K.H. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid / K.H. Lee, H.L. Piao, H.Y. Kim, S.M. Choi et al. // Cell. – 2006. – V. 129. – PP. 1109–1120.

141. Lee, R. D. Auxin, the organizer of the hormonal/environmental signals for root hair growth / R. D. Lee, H. T. Cho // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4: 448.

142. Leymarie, J. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP / J. Leymarie, E. Bruneaux, S. Gibot-Leclerc, F. Corbineau // J Exp Bot. – 2007. – V. 58. – PP. 425–437.

143. Leymarie, J. Involvement of ABA in induction of secondary dormancy in barley (Hordeum vulgare L.) seeds / J. Leymarie, M.E. Robayo-Romero, E. Gendreau, R.L. Benech-Arnold // Plant Cell Physiol. – 2008. – V. 49. – PP. 1830–1838.

144. Li, C.J. Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (Pisum sativum) plants and its relationship to correlative dominance / C.J. Li, F. Bangerth // Physiol Plant. – 1999. – V. 106. – PP. 415–420.

145. Li, X. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis / X. Li, X. Mo, H. Shou, P. Wu // Plant Cell Physiol. – 2006. – V. 47. – PP. 1112–1123.

146. Liu, X.Z. Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress / X.Z. Liu, B. Huang // Crop Sci. – 2002. – V. 42. – PP. 466–472.

147. Liu, Y. H2O2 mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination / Y. Liu, N. Ye, R. Liu, M. Chen et al. // J Exp Bot. – 2010. – V. 61. – PP. 2979–2990.

148. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – V. 25. PP. 402–408.

149. Ljung, K. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth / K. Ljung, R.P. Bhalerao, G. Sandberg // Plant J. – 2001. – V. 28. – PP. 465–474.

150. Luckey, T.D. Radiation Hormesis / T.D. Luckey. – Tokyo: Boca Raton Publisher, CRC Press, 1991. – 239 p.

151. Ludwig-Muller, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development / J. Ludwig-Muller // J Plant Growth Regul. – 2000. – V. 32. – PP. 219–230.

152. Ludwig-Müller, J. Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (Zea mays L.) / J. Ludwig-Müller, E. Epstein // Plant Physiol. – 1991. – V. 97. – PP. 765–770.

153. Ma, Z. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (Cocos nucifera L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction / Z. Ma, L. Ge, A.S.Y. Lee, J.W.H. Yong et al. // Anal. Chim. Acta. – 2008. – V. 610. – PP. 274–281.

154. Machaiah, J.P. The effects of gamma irradiation on biosynthesis of gibberellins in germinating wheat / U.K. Vakie, A. Sreenivasan // Environ J Exp Bot. – 1976. – V. 16. – PP. 131–140.

155. Mahajan, S. Cold, salinity and drought stresses: An overview / S. Mahajan, N. Tuteja // Arch Biochem Biophys. – 2005. – V. 444. – PP. 139–158.

156. Manz, B. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging / B. Manz, K. Müller, B. Kucera, F. Volke et al. // Plant Physiology. – 2005. – V. 138. – PP. 1538 –1551.

157. Marcu, D. Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*) / D. Marcu, G. Damian, C. Cosma, V. Cristea // J. Biol. Phys. – 2013. – V. 39. – PP. 625–634.

158. Matilla, A.J. Involvement of ethylene in seed physiology / A.J. Matilla, M.A. Matilla-Vazquez // Plant Sci. – 2008. – V. 175. – PP. 87–97.

159. Melotto, M. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases / M. Melotto, W. Underwood, S.Y. He // Annu. Rev. Phytopathol. – 2008. – V. 46. – PP. 101–122.

160. Meyer, S. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells / S. Meyer, P. Mumm, A. Endler, B. Weder et al. // Plant J. – 2010. – V. 63. – PP. 1054–1062.

161. Millar, A.A. Seed Dormancy and ABA Metabolism in Arabidopsis and Barley: Role of ABA 8'-Hydroxylase / A.A. Millar, J.V. Jacobson, J.J. Ross, C.A. Helliwell et al. // Plant J. – 2006. – V. 45. – PP. 942–954.

162. Miller, C.O. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid / C.O. Miller, F. Skoog, M.H. Von Saltza, F.M. Strong J Am Chem Soc. – 1955. – V. 77. – PP. 1329–1334.

163. Miransari, M. Plant hormones and seed germination / M. Miransari, D.L. Smith // Environ. Exp. Bot. – 2014. – V. 99. – PP. 110–121.

164. Mittler, R. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki et al. // Trends Plant Sci. – 2011. – V. 16. – PP. 300–309.

165. Mlejnek, P. Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells / P. Mlejnek, P. Doležel, S. Procházka // Plant Cell Environ. – 2003. – V. 26. – PP. 1723–1735.

166. Mohajer, S. Stimulatory effects of gamma irradiation on phytochemical properties, mitotic behaviour, and nutritional composition of sainfoin (Onobrychis viciifolia

Scop.) / S. Mohajer, R.M. Taha, M.M. Lay, A.K. Esmaeili, M. Khalili // The Scientific World Journal. – 2014. – PP. 1–9.

167. Mok, D.W.S. Cytokinin metabolism and action / D.W.S. Mok, M.C. Mok // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2001. – V. 52. PP. 89–118.
168. Mok, D.W.S. Cytokinins: Chemistry, Activity and Function / D.W.S. Mok, M.C. Mok. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. – 352 p.
169. Mounir, A. M. Effect of sowing date, gamma irradiation and intercultivar differences on growth, pod characteristics and some endogenous plant growth regulators in snap beans / A. M. Mounir, A. Abo El-Yazid, O.A. Orabi, A.A. Zahran, I.I. El-Oksh // World Journal of Agricultural Sciences. – 2015. – V. 11. – № 6. – PP. 380–390.
170. Muday, G.K. Polar auxin transport: controlling where and how much / G.K. Muday, A. DeLong // Trends in Plant Science. – 2001. – V. 6. – № 11. – PP. 535–542.
171. Munemasa, S. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture / S. Munemasa, F. Hauser, J. Park, R. Waadt, B. Brandt et al. // Curr. Opin. Plant Biol. – 2015. – V. 28. – PP. 154–162.
172. Nambara, E. ABA biosynthesis and catabolism / E. Nambara, A. Marion-Poll // Ann. Rev. Plant Biol. – 2005. – V. 56. – PP. 165–185.
173. Nambara, E. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination / E. Nambara, M. Okamoto, K. Tatematsu, R. Yano // Seed Sci. Res. – 2010. – V. 20. – PP. 55–67.
174. Nishiyama, R. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis / R. Nishiyama, Y. Watanabe, Y. Fujita, D. T. Le et al. // Plant Cell. – 2011. – V. 23. – PP. 2169–2183.
175. Noctor, G. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried / G. Noctor, A. Mhamdi, C. H. Foyer // Plant Physiol. – 2014. – V. 164. – PP. 1636–1648.
176. Nordström, A.C. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid

during adventitious root formation in pea cuttings / A.C. Nordström, F.A. Jacobs, L. Eliasson // Plant Physiology. – 1991. – V. 96. – PP. 856–861.

177. Ogawa, M. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination / M. Ogawa, A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara et al. // Plant Cell. – 2003. – V. 15. – PP. 1591–1604.
178. Oracz, K. Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination / K. Oracz, S. Karpiński // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7:864.
179. Oracz, K. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation / K. Oracz, H. El-M. Bouteau, J. M. Farrant et al. // The Plant Journal. – 2007. – V. 50. – PP. 452–465.
180. Oracz, K. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key actors of cellular signalling during germination / K. Oracz, H. El-Maarouf-Bouteau, I. Kranner, R. Bogatek et al. // Plant Physiol. – 2009. – V. 150. PP. 494–505.
181. Pantin, F. The dual effect of abscisic acid on stomata / F. Pantin, F. Monnet, D. Jannaud, J.M. Costa et al. // New Phytol. – 2013. – V. 197. – PP. 65–72.
182. Parsons, P.A. Radiation hormesis: challenging LNT theory via ecological and evolutionary considerations / P.A. Parsons // Health Phys. – 2002. – V. 82. – P. 513–516.
183. Peleg, Z. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants / Z. Peleg, E. Blumwald // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – V. 14. – PP. 290–295.
184. Perrot-Rechenmann, C. Cellular responses to auxin: division versus expansion / C. Perrot-Rechenmann // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2010. – 2: a001446.
185. Qin, X. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotianaplumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance / X. Qin, J.A.D. Zeevaart // Plant physiology. – 2002. – V. 128. – PP. 544–551.
186. Rabbani, M.A. Monitoring expression profiles of rice genes under cold,drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA

gel-blot analyses / M.A. Rabbani, K. Maruyama, H. Abe, M. A. Khan, K. Katsura // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – PP. 1755–1767.

187. Rayle, D.L. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well / D.L. Rayle, R.E. Cleland // Plant Physiol. – 1992. – V. 99. – PP. 1271–1274.
188. Raz, V. Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds / V. Raz, J. Bergervoet, M. Koornneef // Development. – 2001. – V. 128. – PP. 243–252.
189. Riefler, M. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism / M. Riefler, O. Novak, M. Strnad, T. Schmülling // Plant Cell. – 2006. – V. 18. – PP. 40–54.
190. Riou-Khamlichi, C. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin / C. Riou-Khamlichi, R. Huntley, A. Jacqmard, J.A. Murray // Science. – 1999. – V. 283. – PP. 1541–1544.
191. Rodríguez-Gacio, M. C. Seed dormancy and ABA signaling. The breakthrough goes on / M. C. Rodríguez-Gacio, M. A. Matilla-Vázquez, A. J. Matilla // Plant Signaling & Behavior. – 2009. – V. 4. – PP. 1035–1048.
192. Rodriguez-Gacio, M.C. Seed Dormancy and ABA Signalling. The Breakthrough Goes On / M.C. Rodriguez-Gacio, M.A. Matilla-Vazquez, A.J. Matilla // Plant Signal Behav. – 2009. – V. 4. – PP. 1035–1048.
193. Sakakibara, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation / H. Sakakibara // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – V. 57. – PP. 431–449.
194. Salomé, P.A. Arabidopsis Response Regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-Independent roles in the control of circadian period / P.A. Salomé, J.P.C. To, J.J. Kieber, C.R. McClung // Plant Cell. – 2005. – V. 18. – PP. 55–69.
195. Sauer, M. Auxin: simply complicated / M. Sauer, S. Robert, J. Kleine-Vehn // J. Exp. Bot. – 2013. – V. 64. – PP. 2565–2577.
196. Schaller, G.E. Cytokinin and the cell cycle / G.E. Schaller, I.H. Street, J.J. Kieber // Curr. Opin. Plant Biol. – 2014. – V. 21. – PP. 7–15.

197. Scheler, C. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases / C. Scheler, K. Weitbrecht, S. P. Pearce et al. // Plant Physiol. – 2015. – V. 167. – PP. 200–215.

198. Schopfer, P. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid / P. Schopfer, C. Plachy, G. Frahry // Plant Physiol. – 2001. – V. 125. PP. 1591–1602.

199. Seki, M. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray / M. Seki, J. Ishida, M. Narusaka, M. Fujita et al. Funct. Integr. Genomics. – 2002. – V. 2. – PP. 282–291.

200. Seo, M. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds / M. Seo, E. Nambara, G. Choi, S. Yamaguchi // Plant Mol. Biol. – 2009. – V. 69. – PP. 463–472.

201. Seo, M. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism / M. Seo, A. Hanada, A. Kuwahara, A. Endo et al. // Plant J. – 2006. – V. 48. – PP. 354–366.

202. Shani, E. The role of hormones in shoot apical meristem function / E. Shani, O. Yanai, N. Ori // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – V. 9. – PP. 484–489.

203. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions / P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessarakli // J. Bot. – 2012:217037.

204. Shikazono, N. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation / N. Shikazono, M. Noguchi, K. Fujii, A. Urushibara, A. Yokoya // J. Radiat. Res. – 2009. – V. 50. – PP. 27–36.

205. Shinkawa, R. Abscisic acid induced freezing tolerance in chilling-sensitive suspension cultures and seedlings of rice / R. Shinkawa, A. Morishita, K. Amikura et al. // BMC Res. Notes. – 2013. – V. 6. – P. 351.

206. Shu, K. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination / K. Shu, X.D. Liu, Q. Xie, Z.H. He // Mol. Plant. – 2016. – V. 9. – PP. 34–45.

207. Skoog, F. The effect of gamma irradiation on auxin and plant growth / F. Skoog // Physiology. – 1935. – V. 7(2). – PP. 227–270.

208. Smith, J.T. Low dose ionizing radiation produces too few reactive oxygen species to directly affect antioxidant concentrations in cells / J.T. Smith, N.J. Willey, J.T. Hancock // Biol. Lett. – 2012. – V. 8. PP. 594–597.

209. Soliman, M.S.A. Certain physiological, biological and molecular aspects of kidney bean plants originating from gamma-irradiated seeds during seed germination and plant development / M.S.A. Soliman, M. El-Hamid // Egypt. J. Rad. Sci. Applic. – 2003. – V. 16. PP. 189–211.

210. Song, Y. Behind the scenes: the roles of reactive oxygen species in guard cells / Y. Song, Y. Miao, C.P. Song // New Phytol. – 2014. – V. 201. – PP. 1121–1140.

211. Soni, R. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif / R. Soni, J.P. Carmichael, Z.H. Shah, J.A.H. Murray // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – PP. 85–103.

212. Sparrow, A.H. Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation / R.L. Cunay, J.P. Miksche, L.A. Schairer // Radiation Botany. – 1961. – V. 1. – PP. 10–3.

213. Sreenivasulu, N. Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools / N. Sreenivasulu, B. Usadel, A. Winter, V. Radchuk et al. // Plant Physiology. – 2008. – V. 146. – PP. 1738–1758.

214. Stoeva, N. Physiological effects of the synthetic growth regulator Thidiazurol (drop) on gammairradiated stress in peas plants (Pissum sativum) / N. Stoeva // Journal of Central European Agriculture. – 2002. – V. 6(2). – PP. 349–358.

215. Strader, L.C. Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in Arabidopsis seedlings / L.C. Strader, A.H. Culler, J.D. Cohen, B. Bartel // Plant Physiology. – 2000. – V. 153. – PP. 1577–1586.

216. Su, Y.-H. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development / Y.-H. Su, Y.-B. Liu, X.-S. Zhang // Mol. Plant. – 2011. – V. 4. – PP. 616–625.

217. Thimann, K.V. On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in Vicia faba / K.V. Thimann, F. Skoog // Proceedings of the Royal Society B. – 1934. – V. 114. – PP. 317–339.

218. To, J.P.C. Type-A ARRs are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling in Arabidopsis / J.P.C. To, G. Haberer, F.J. Ferreira, J. Deruère et al. // Plant Cell. – 2004. – V. 18. – PP. 658–671.

219. Tognetti, V.B. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance / V.B. Tognetti, O.V.Aken, K. Morreel, K. Vandenbroucke et al. // Plant Cell. – 2010. – V. 22. – PP. 2660–2679.

220. Toh, S. High temperatureinduced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition ofgibberellin action in Arabidopsis seeds / S. Toh, A. Imamura, A. Watanabe, K. Nakabayashi // Plant Physiol. – 2008. – V. 146. – PP. 1368–1385.

221. Trewavas, A.J. What remains of the Cholodny-Went theory? Introduction / A.J. Trewavas // Plant Cell Environ. – 1992. – V. 15. – PP. 759–794.

222. Tuan, P.A. Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals / P.A. Tuan, R. Kumar, P.K. Rehal, P.K. Toora, et al. // Front. Plant Sci. – 2018. – 9: 668.

223. Tuteja, N. Abscisic acid and abiotic stress signaling / N. Tuteja // Plant Signal. Behav. – 2007. – V. 2. – PP. 135–138.

224. Upton, A.C. Radiation hormesis: data and interpretations / A.C. Upton // Crit. Rev. Toxicol. – 2001. – V. 31. – P. 681–695.

225. Vardhan, V.P. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production / V.P. Vardhan, L.I. Shukla // International Journal of Radiation Biology. – 2017. – V. 93. – PP. 967–979.

226. Verslues, P. E. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress / P. E. Verslues, J. Zhu // Biochem. Soc. Trans. – 2004. – V. 33. – PP. 375–379.

227. Wang, Y. Cytokine antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by downregulating ABI5 expression / Y. Wang, L. Li, T. Ye et al. // Plant J. – 2011. – V. 68. – PP. 249–261.

228. Wang, Y. Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis Thaliana* / Y. Wang, W. Shen, Z. Chan, Y. Wu // Front. Plant Sci. – 2015. – 6: 1004. doi: 10.3389/fpls.2015.01004

229. Wani, S.H. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants / S.H. Wani, V. Kumar, V. Shriram, S.K. Sah // Crop J. – 2016. – V. 4. – PP. 162–176.

230. White, C.N. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways / C.N. White, W.M. Proebsting, P. Hedden, C.J. Rivin // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – PP. 1081–1088.

231. Wi, S.G. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants / S.G. Wi, B. Y. Chung, J.S. Kim, J.H. Kim et al. // Micron. – 2007. – V. 38. – PP. 553–564.

232. Wiegant, F.A.C. Hormesis and cellular quality control: a possible explanation for the molecular mechanisms that underlie the benefits of mild stress / Dose Response. – 2013. – V. 11. – PP. 413–430.

233. Woodward, A.W. Auxin: Regulation, action and interaction / A.W. Woodward, B. Bartel // Annals Bot. – 2005. – V. 95. – PP. 707–735.

234. Xu, Z.J. Cloningand: characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings / Z.J. Xu, M. Y. Suzuki, I. Yamaguchi // Plant Physiology. – 2002. – V. 129. – PP. 1285–1295.

235. Yadegari, L. Z. Drought tolerance induced by foliar application of abscisic acid and sulfonamide compounds in tomato / L. Z. Yadegari, R. Heidari, F. Rahmani, J. Khara // J. Stress Physiol. Biochem. – 2014. – V. 10. – PP. 327–334.

236. Yamaduchi, S. Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals / S. Yamaduchi, Yu. Kamiya // Plant Cell Physiol. – 2000. – V.43.– P.251–257.

237. Yamaguchi, S. Regulation of ABA and GA levels during seed development and germination in Arabidopsis / S. Yamaguchi, Y. Kamiya, E. Nambara // Annual Plant Reviews. – 2007. – V. 27. – PP. 224–247.

238. Yamauchi, Y. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds / Y. Yamauchi, M. Ogawa, A. Kuwahara, A. Hanada, et al. // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – PP. 367–378.

239. Ye, N. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds / N. Ye, G. Zhu, Y. Liu, A. Zhang et al. // J. Exp. Bot. – 2012. – V. 63. – PP. 1809–1822.

240. Youssef, A.A. Effect of gamma rays on growth and essential oil composition of chamomile (*Chamomilla recutita* L.) / A.A. Youssef, Z.A. Moussa // Arab Univ. J. Agric. Sci. Ain Shams Univ., Cairo. – 1998. – V. 6. – № 2. – PP. 301–311.

241. Zavaleta-Mancera, H.A. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence / H.A. Zavaleta-Mancera, H. Lopez-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera et al. // J. Plant Physiol. – 2007. – V. 164. – PP. 1572–1582.

242. Zeng, W. Plant stomata: A checkpoint of host immunity and pathogen virulence / W. Zeng, M. Melotto, S.Y. He // Curr. Opin. Biotechnol. – 2010. – V. 21. – PP. 599–603.

243. Zhang, H. The C2H2-type zinc finger protein ZFP182 is involved in abscisic acidinduced antioxidant defense in rice / H. Zhang, L. Ni, Y. Liu, Y. Wang et al. // J. Integr. Plant Biol. – 2012. – V. 54. – PP. 500–510.

244. Zhou, J. H2O2 mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses / J. Zhou, J. Wang, X. Li, X.J. Xia, Y.H. Zhou // J. Exp. Bot. – 2014. – V. 65. – PP. 4371–4383.

245. Zwack, P.J. Cytokinin inhibition of leaf senescence / P.J. Zwack, A.M. Rashotte // Plant Signal Behav. – 2013. – 8: e24737.