

АДАПТАЦІЯ ДО СТРЕСУ: ПІДВИЩЕНА СТІЙКІСТЬ ДО Cd^{2+} ТА РАДІОМІМЕТИКІВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* З ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ ЗОНИ

В. БРИКОВ^{1, 2}, О. ТАЛАЛАЄВ³, Г. ШЕВЧЕНКО¹

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 01004, Київ, Україна

² Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

³ Auto Tissue Berlin GmbH, Berlin, Germany

E-mail: vbrykov@gmail.com, talalaiev@autotissue.de, galli.shevchenko@gmail.com

Автор для кореспонденції – Г. Шевченко, e-mail: galli.shevchenko@gmail.com

Дослідження екотипів *Arabidopsis thaliana* із зони Чорнобильської атомної електростанції виявило їхню підвищену стійкість до кадмію (Cd^{2+}) та радіоміметиків (блеоміцину/зеоцину). Так, проростки чорнобильського екотипу Che07 демонстрували знижене інгібування росту коренів за умов Cd -індукованого стресу. Вперше встановлено, що зеоцин переважно впливає на клітини кореневої меристеми, тоді як Cd^{2+} переважно чинить вплив на клітини зони розтягу. Така диференційована відповідь може бути наслідком варіацій у стадіях розвитку клітин, специфіки дії генотоксичних агентів та активності захисних механізмів у різних ростових зонах кореня. Аналіз руйнування ДНК та її здатності до відновлення після обробки радіоміметиком виявив швидку (впродовж 3 хв) активацію репараційних механізмів у чорнобильських екотипах Che5 і Che07. Підвищена експресія гена цикліну *SusB2;1* та зниження експресії гена кінази *CDKG1* після обробки блеоміцином свідчать про зміни у регуляції клітинного циклу, зокрема про його зупинку на фазі G2. Така адаптивна відповідь, ймовірно, спрямована на пригнічення переходу до мітозу, що запобігає передачі uszkodженої ДНК дочірнім клітинам. В екотипах *A. thaliana* з Чорнобильської зони відмічено активацію специфічних антиоксидантних ферментів, що протидіє окиснювальному стресу та пошкодженню геному. Припускається, що рослини *A. thaliana* із зони ЧАЕС використовують унікальні механізми адаптації до екологічного стресу та руйнування ДНК, набуті, ймовірно, внаслідок тривалого впливу іонізуючого випромінювання. Дослідження стійкості рослин до іонізуючого випромінювання та важких металів є важливим для розробки фіторе mediaційних стратегій, а також може сприяти розвитку біотехнологій підвищення стійкості рослин до інших абіотичних стресових факторів.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, руйнування ДНК, важкі метали, радіоміметики, стабільність геному, стійкість рослин.

Вступ. Забруднення навколишнього середовища генотоксичними агентами, такими як важкі

метали та іонізуюче випромінювання, становить значну загрозу для екосистем. Ці стресові фактори можуть негативно впливати на ріст рослин, пригнічувати фотосинтез та порушувати генетичну стабільність, що потенційно призводить до зниження врожайності сільськогосподарських культур і шкодить біорізноманіттю. Крім того, непередбачувані техногенні катастрофи та військові конфлікти ще більше підвищують ризик забруднення ґрунтів і атмосфери у багатьох регіонах світу. У зв'язку з вищезначеним, розуміння впливу генотоксичних агентів на рослини є необхідним для забезпечення продовольчої безпеки та розробки ефективних стратегій фіторе mediaції. Сьогодні Чорнобильська зона відчуження, місце вибуху ядерного реактора в 1986 році, може виступати у якості унікальної природної лабораторії для вивчення довгострокового впливу радіації на флору. Впродовж майже сорока років рослини цієї місцевості зазнають постійного впливу іонізуючого випромінювання та важких металів, що робить їх прийнятною моделлю для дослідження механізмів відповіді й адаптації до генотоксичного стресу у природних умовах.

Рослини із Чорнобильської зони відчуження постійно привертають увагу вчених і на сьогодні відомі результати багатьох досліджень різних аспектів їхнього росту та розвитку. Зокрема, повідомляли про підвищену стійкість *A. thaliana* до мутагенів та посилену нестабільність геному у відповідь на хронічне опромінення (Kovalchuk I., 2004), збільшення частоти хромосомних аберацій (Shkvarnikov, 1990) та появу ембріональних летальних мутацій (Abramov et al., 1992a). Зміни протеомного спектру у насінні сої та льону з Чорнобильської зони були описані Danchenko et al. (2009) та Klubicová et al. (2011). Kovalchuk O. et al. (2003a, b) повідомляли про гіперметилування

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2025

геному сосни та появу мікросателітних мутацій у пшениці. Водночас, варто зазначити, що більшість досліджень рослин у Чорнобильській зоні проводили впродовж перших десятиліть після катастрофи. Багато робіт переважно були присвячені стійкості та адаптації рослин до хронічного радіаційного впливу (Abramov et al., 1992b; Arkhipov et al., 1994; Kovalchuk O., 2003a; Kovalchuk et al., 2004). Дослідження останніх років, зокрема й наші, також виявляють підвищену стійкість *A. thaliana* із Чорнобильської зони до радіоміметиків (Shevchenko, 2017) та високої дози гострого гамма-опромінення (Podlutsii et al., 2024).

Загалом вважається, що рослини у Чорнобилі здатні активувати ефективні захисні механізми, які дозволяють їм протидіяти хронічному радіаційному впливу та забрудненню важкими металами-чинникам, що залишаються постійними екологічними стресорами в цьому регіоні (Shevchenko, 2017; Klimenko et al., 2019). Важливо відзначити, що останні дослідження в цій галузі здебільшого стосуються деревних видів, зокрема *Pinus sylvestris*. Однак досі залишається обмеженою інформація про довготривалі адаптаційні механізми саме трав'янистих рослин в умовах забрудненого середовища Чорнобиля. Визначення фізіологічних, генетичних та епігенетичних відповідей трав'янистих видів на хронічне радіаційне опромінення та дію важких металів потребує подальших досліджень.

Для глибшого розуміння захисних механізмів, які лежать в основі адаптації рослин до генотоксичного стресу ми використали комплексний підхід, аналізуючи морфологічні, метаболічні та молекулярні зміни в екотипах *A. thaliana* з Чорнобильської зони після впливу генотоксичних агентів. Зокрема, ми досліджували реакції рослин на важкий метал кадмій (Cd), радіоміметик метилметансульфонат (MMS) та радіоміметики із родини блеоміцинів (блеоміцин і зеонин). Метою цього дослідження було виявити клітинні та молекулярні реакції, що активуються у рослин після впливу генотоксичних агентів, з особливою увагою до механізмів, які сприяють адаптації до екологічного стресу. Для цих експериментів ми використали генотипи *A. thaliana* із зони з різними рівнями стійкості до генотокси-

нів: Чорнобиль07 (Che07) (більш стійкий) та Чорнобиль5 (Che5) (менш стійкий).

У статті представлені результати експериментів щодо впливу Cd та блеоміцину/зеонину на ріст коренів та стан різних ростових корневих зон. Крім того, окрема частина експериментів стосувалася оцінки рівнів руйнування ДНК та транскрипційної регуляції клітинного циклу у відповідь на дію MMS/блеоміцину. Дослідження набутої природним шляхом адаптації рослин до радіації та важких металів є важливим не лише для доповнення фундаментального знання, а й для розробки фіторе mediaційних стратегій для забруднених територій. Крім того, такі дослідження можуть бути внеском у біотехнологію підвищення стійкості рослин до екологічних стресорів.

Матеріали та методи. Збір рослинного матеріалу та умови вирощування. Насіння *A. thaliana* збирали у місті Прип'ять, де рівень радіації у повітрі коливався від 1 до 9 мкЗв/год. Відповідні рівні радіаційного забруднення ґрунту в цьому регіоні були описані раніше Rashydov та Hajdych (2015). Із зібраного насіннєвого матеріалу пророщували кілька ліній, які пройшли скринінг на чутливість кореневого росту до середовища, що містить Cd, Zn та Al а також радіоміметика метилметансульфонату (MMS) (Kim et al., 2006). На основі цього аналізу для подальших експериментів була відібрана одна лінія, стійка до генотоксинів – Chernobyl07 (Che07), а також одна менш стійка лінія – Chernobyl5 (Che5). Насіння контрольної рослини Oasis (Oas) збирали поблизу Києва, де рівень природного радіаційного фону становив від 0,15 до 0,20 мкЗв/год. Додатково, у деяких експериментах використовували екотип Columbia-0 (Col-0) як лабораторний контроль.

Експерименти з інгібування росту. Для ростових тестів насіння *A. thaliana* попередньо пророщували впродовж 3 днів на половинному середовищі Murashige та Skoog (MS) із додаванням 0,5 % сахарози. Після цього проростки переносили на середовище, що містило або 100 мкм хлориду кадмію (CdCl_2) або 5 мкг/мл зеонину, і залишали для подальшого росту ще на 3 дні.

Вимірювання довжини коренів проводили за допомогою програмного забезпечення Ima-

geJ (www.imagej.net). Статистичну значущість аналізували шляхом порівняння контрольних і оброблених варіантів проростків *A. thaliana* у межах кожного екотипу.

Тести життєздатності клітин. Для візуалізації живих клітин проводили фарбування флуоресцеїндіацетатом (FDA) за методикою Saruyama et al. (2013), використовуючи робочий розчин концентрацією 2 мкг/мл у фосфатному буфері (PBS, pH 7,2). Загиблі клітини забарвлювали йодидом пропідію (PI) у робочому розчині 5 мкг/мл у деіонізованій воді (dH₂O) (Truernit and Haseloff, 2008). Обидва барвники (FDA і PI) були отримані від Thermo Fisher Scientific.

Флуоресцентну мікроскопію проводили за допомогою лазерного конфокального мікроскопа Leica DMi8. Флуоресцеїн збуджували при 488 нм, а випромінювання реєстрували за допомогою фільтра на 510 нм. Йодид пропідію збуджували при 543 нм, а випромінювання реєстрували за допомогою фільтра на 615 нм.

Аналіз пошкодження ДНК. Руйнування ДНК та динаміку її відновлення оцінювали після 1-годинної обробки проростків 30 мкг/мл блеоміцину за допомогою гель-електрофорезу окремих клітин (SCGE) або комет-аналізу (Angelis et al., 1999). Руйнування ДНК візуалізували методом епіфлуоресцентної мікроскопії за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 800 після забарвлення SYBR Gold (Molecular Probes, Invitrogen, USA).

Оцінювання включало чотири незалежні репліки гелю по 25 клітин у кожній. Час відновлення (t_x) визначали як % залишкового рівня руйнувань за формулою: (t_x) = середній % хвіст комети DNA (t_x) – середній % хвіст комети ДНК (контроль)/середній % хвіст комети ДНК (t_0) – середній % хвіст комети ДНК * 100. Максимальний рівень ушкоджень нормалізували до 100 % при $t = 0$ для всіх

досліджуваних ліній рослин. Дозозалежну відповідь визначали як відсоток вільної (фрагментованої) ДНК, що переміщувалася електрофорезом у «хвіст комети» (% Tail DNA). Швидкість репарації дволанцюгових розривів ДНК (DSB repair) оцінювали шляхом вимірювання частки фрагментованої ДНК на різних часових інтервалах упродовж періоду відновлення.

Експресія генів клітинного циклу. Для експериментів з аналізу експресії генів, окрім блеоміцину та Cd, рослини вирощували на середовищі із MMS у концентрації 7,5 мкл MMS на 100 мл 1/2 MS середовища впродовж 1 дня. Транскрипційну активність генів *CycB2;1* та *CDKG1* аналізували методом кількісної ПЛР у реальному часі (термоциклер BioRad), використовуючи такі параметри ампліфікації: 2 хв при 95 °C, 40 циклів: 15 с при 95 °C і 60 с при 60 °C, подальше створення кривої дисоціації для перевірки специфічності ампліфікації. Реакційна суміш містила SYBR Green Master Mix (Roche), 300 нМ специфічних прямого і зворотного праймерів та 2,5 мкл розведеної кДНА у кожній реакції об'ємом 10 мкл. Для нормалізації експресії використовували гени родини SAND як референтні (housekeeping гени) (таблиця).

Контрольні реакції без зразка (no template controls, NTC) містили 2,5 мкл RNase-free води замість матричної ДНК. Стандартні криві та ефективність праймерів розраховували за допомогою програмного забезпечення Light Cycler.

Рівень експресії генів для кожного зразка визначали на основі двох-трьох технічних реплік, використовуючи стандартну криву, яка враховує ефективність праймерів, і виражали відносно контрольного зразка. Для кожного гена проводили щонайменше три біологічні репліки.

Використані праймери для реакції ПЛР у реальному часі

Протеїн	Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер
AT5G63370.1	CDKG1	GCTGAACAGTCTACTAACTTTGG	GTCGGCATGAAATCTTTGGA
AT2G17620.1	CycB2;1	TCAGTTCCAAGTGCTAACGA	TCCTCCATCTCAACTTCTTCC
AT2G28390	SAND	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC

Усі дані ПЛР обробляли та аналізували за допомогою програмного забезпечення GenEx (<http://www.multid.se>). Vox-плоти будували за допомогою програми VoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr>).

Результати та обговорення. *Ріст коренів A. thaliana при кадмієвому стресі.* Скринінг на чутливість кореневого росту до радіоміметиків і важких металів серед двадцяти екотипів *A. thaliana* із зони Чорнобиля дозволив ідентифікувати найбільш та найменш стійкі лінії: Che07 і Che5, відповідно (Shevchenko et al., 2017). Ці лінії були обрані для подальших досліджень. На основі аналізу кількох мікросателітних локусів, що показали подібність між усіма досліджуваними лініями, *A. thaliana* із Чорнобиля класифікували як екотип Landsberg (Kovalchuk et al., 2004).

Було проведено кілька серій експериментів із використанням важкого металу кадмію (Cd), який є двовалентним іоном, подібним до цезію (Cs) та стронцію (Sr), а також радіоміметиків, таких як метилметансульфонат (MMS), блеоміцин і зеоцин. Ці сполуки імітують вплив іонізуючого випромінювання, спричиняючи одноланцюгові (SSBs) і дволанцюгові (DSBs) розриви ДНК (Manova et al., 2006; Vladijeć et al., 2024).

Стрес, індукований кадмієм та радіацією, може порушувати ключові фізіологічні та генетичні процеси, що часто призводить до генетичної нестабільності та зниження темпів росту рослин (Szurman-Zubrzycka et al., 2023). Вплив згаданих генотоксичних факторів на рослини дозволяє отримати цінну інформацію про механізми відповіді а також адаптацію.

Наші експерименти з обробкою Cd показали, що найменша різниця в довжині кореня між контрольними та обробленими рослинами (приблизно 37 % проти 24 %) була зафіксована у екотипу Che07 (рис. 1). Це свідчить про те, що коренева система *A. thaliana* з Чорнобиля є менш чутливою до забруднення важкими металами порівняно з контрольним екотипом Oas. Затримка росту кореня вказує на можливий вплив на клітини в окремих зонах росту і у зв'язку з цим ми оцінювали як клітини на різних етапах свого розвитку реагують на генотоксичні агенти. Візуалізація кореневої меристеми та зони розтягу у всіх екотипах

A. thaliana виявила різні реакції цих ростових зон на обробку радіоміметиками та важким металом. Зокрема, зеоцин в основному впливав на область меристеми (рис. 2, б), тоді як Cd здебільшого впливав на зону розтягу (рис. 2, в). Наскільки нам відомо, цей феномен раніше не був описаний. Пояснення може полягати у різниці між зонами меристеми та розтягу з точки зору стадій диференціації клітин, механізму дії генотоксинів, а також активності захисних систем, таких як антиоксиданти та системи репарації ДНК. Як зеоцин, так і кадмій спричиняють утворення активних форм кисню (АФК), окрім того, зеоцин також здатний безпосередньо пошкоджувати ДНК, викликаючи одно- та дволанцюгові розриви. У меристемі, яка є активно проліферуючою тканиною, ядерна ДНК захищена від пошкодження завдяки антиоксидантній активності та системам репарації (Caplin and Wiley, 2018). Слід відзначити, що окремі автори вважають рослину меристему біологічно відмінною структурою, яка виникла в результаті незалежної еволюції мультиклітинності (Ludovici et al., 2020). Саме тому вплив іонізуючого випромінювання та інших генотоксинів на кореневу меристему рослин на сьогоднішній день є недостатньо дослідженим (Della Rovere et al., 2016; Yu et al., 2016). Зона розтягу кореня містить менше ДНК, оскільки у цій зоні в основному знаходяться клітини, які перестали ділитися і змінили свій тип росту з ізотропного (ріст усієї поверхні) на анізотропний (активне видовження) (Baluška et al., 2010). Можна припустити, що супутні захисні механізми, ймовірно, менш активні у цій зоні. Різний вплив кадмію та зеоцину на клітини різних зон росту може бути пов'язаним із взаємодією вищезгаданих факторів, включаючи стадію розвитку клітин, механізми дії генотоксинів та активність захисних систем.

Антиоксидантна активність у проростках A. thaliana. Наші дослідження протеому виявили підвищення рівня білків, пов'язаних з антиоксидантною системою, у генотипі Che07 після стресу від кадмію. Зокрема, глутатіон-редуктаза (glutathione reductase (GR), антиоксидантний фермент, відіграє критичну роль у відновленні окисненого глутатіону дисульфід до глутатіону (GSH) (γ -glutamyl-cysteinyl-gly-

cine) (Klimenko et al., 2019). GSH вважають потужним неферментативним антиоксидантом, важливим для забезпечення стійкості до абіотичних стресів (Hasanuzzaman et al., 2017). GDP-манноза 3,5-епімереза (GDP-mannose 3,5-epimerase), фермент, що бере участь у біосинтезі антиоксиданту L-аскорбінової кислоти (L-ascorbic acid), відіграє ключову роль у нейтралізації АФК (Wolucka and Montagu, 2003; Giovannoni, 2007). Цей фермент також активувався у рису після стресу від кадмію (Chao et al., 2010).

У стійкого генотипу Che07 підвищувався рівень декількох білків, пов'язаних з енергетичними процесами, що вказує на те, що енергія потрібна не тільки для антиоксидантної активності, але й для інших захисних механізмів, включаючи відновлення ДНК а також інші різноманітні стресові відповіді. Зокрема, бета-2 субодиниця АТФ-синтази (ATP synthase subunit beta-2) з мітохондрій бере участь у синтезі АТФ і виступає як ключовий негативний регулятор клітинної загибелі рослини (Chivasa et al., 2011). Крім того, бета-субодиниця мітохондріальної АТФ-синтази може взаємодіяти з пластидами при ретроградному сигналіngu (Liu et al., 2024). NADP-залежна малатдегідрогеназа 2 (NADP-dependent malic enzyme 2 (NADP-ME2), яка була виявлена тільки у генотипу *A. thaliana* Che07, відіграє важливу роль у відповідях на окиснювальний стрес, спричинений різними внутрішньоклітинними та зовнішньоклітинними сигналами (Li et al., 2013). Дослідження показали, що NADP-ME2 також сприяє стійкості до осмотичного та сольового стресу у рослин (Liu et al., 2007; Badia et al., 2015). Таким чином, експерименти підтвердили активацію специфічних антиоксидантних ферментів у рослин *A. thaliana* з Чорнобиля, що може свідчити про адаптивні реакції до забрудненого середовища.

Цілісність геному під час генотоксичного стресу. Для чіткішого розуміння геномної відповіді на генотоксичний стрес усіх випробуваних екотипів *Arabidopsis*, ми досліджували їхню здатність до відновлення ДНК після усунення дії стресу (видалення блеоміцину із середовища росту). Застосування ДНК електро-

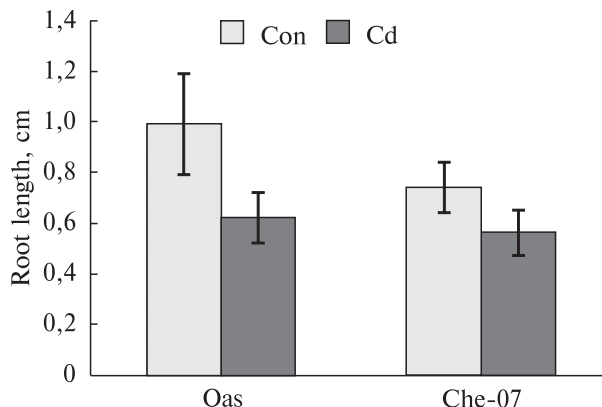


Рис. 1. Довжина коренів екотипів *Arabidopsis thaliana* Oas та Che07 після 3 днів росту на середовищі із кадмієм ($p < 0,05$)

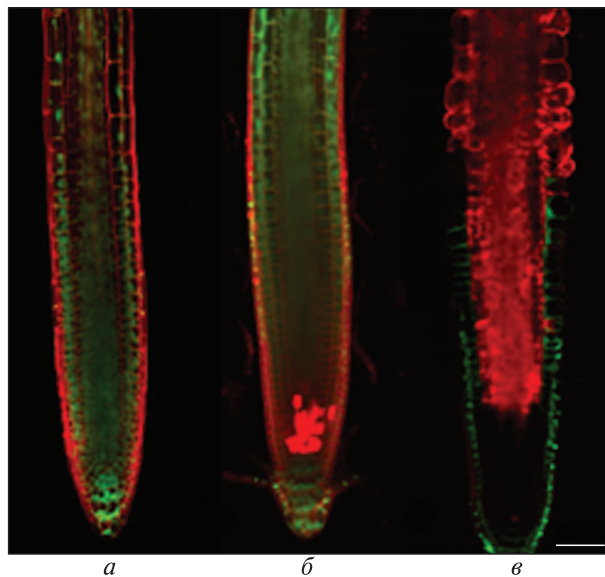


Рис. 2. Апикальні частини коренів проростків *Arabidopsis thaliana* у контролі (а) та після обробки зеотином (б) і кадмієм (Cd) (в). Подвійне забарвлення за допомогою флуоресцеїну діацетату (FDA) та йодиду пропідія (PI). Масштаб – 100 мкм

форезу однієї клітини (кометний аналіз) (Angelis et al., 1999) дозволило оцінити ступінь пошкодження ДНК, індукованого блеоміцином, зокрема утворення подвійних розривів ДНК ланцюгів (Manova and Gruszka, 2015). Згідно наших експериментів, обробка радіоміметиком призвела до збільшення пошкодження ДНК в 4–5 разів у всіх екотипах *A. thaliana* (рис. 3).

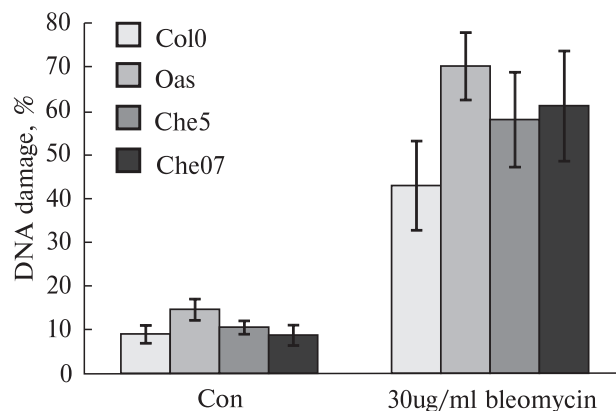


Рис. 3. Руйнування ДНК за допомогою блеоміцину (30 мкг/мл) в екотипах *Arabidopsis thaliana* Col0, Oas, Che5 та Che07

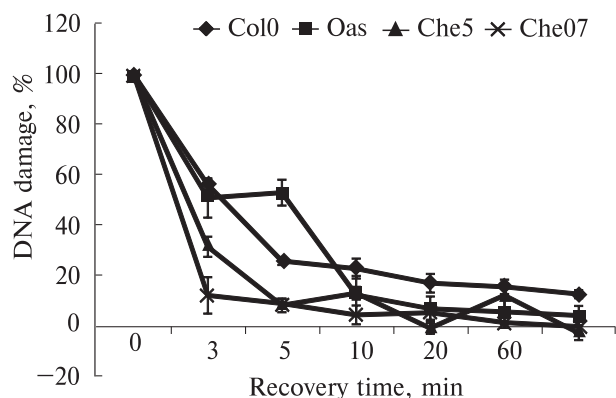


Рис. 4. Динаміка відновлення ДНК в екотипах *Arabidopsis thaliana* Col0, Oas, Che5 та Che07 після обробки блеоміцином

Динаміка відновлення ДНК показала, що вже через 3 хв після видалення блеоміцину руйнування ДНК зменшувалося до 20–30 % у чорнобильських екотипах (Che5 та Che07), тоді як у контрольних екотипах (Col та Oas) пошкодження ДНК залишалося на рівні 50–60 % (рис. 4). Прогресуюче зменшення руйнування ДНК спостерігали в усіх екотипах *Arabidopsis* впродовж періоду відновлення. Крім того, у чорнобильських Che5 та Che07 рівень пошкодження ДНК знижувався нижче базового рівня після 180 хв відновлення, що вказує на активний процес репарації (рис. 4).

Оскільки рослини не можуть уникнути несприятливих умов навколишнього середовища, у них еволюційно сформувалися ефективні

та швидкі механізми захисту та репарації ДНК, що зберігає цілісність геному та забезпечує передачу генетичної інформації майбутнім поколінням. Репарація геномної ДНК здійснюється за допомогою різноманітного набору ферментів, що утворюють складну та ефективну систему відновлення, яка дозволяє позбавленим рухливості організмам захищати свої геноми від широкого спектру екологічних стресів, зокрема генотоксичного пошкодження. Ми досліджували рівні експресії гена мітотичного цикліна В (*CycB2;1*), який сприяє входу в мітоз після фази G2 (Ito, 2014), а також специфічної рослинної циклінозалежної кінрази G1 (*CDKG1*), ключового регулятора РНК-сплайсингу, соматичної гомологічної рекомбінації та стресових реакцій (Lin et al., 2018; Nibau et al., 2020). Наші результати показують, що в генотипу Che5 після експозиції генотоксичним агентам експресія *CycB2;1* підвищувалася, а експресія *CDKG1* – знижувалася (рис. 5), що свідчить про дерегуляцію клітинного циклу, зокрема на межі переходу між фазами G2/M.

Зниження експресії *CDKG1* свідчить про зменшення активності кінрази, що призводить до уповільнення клітинного циклу та накопичення клітин у фазі G2. Оскільки таке затримання клітинного циклу є визнаною відповіддю на генотоксичний стрес, це спостереження, ймовірно, відображає адаптивний механізм, при якому рослини тимчасово пригнічують перехід до мітозу, щоб запобігти поширенню пошкодженої ДНК. Крім того, попередні дослідження на *A. thaliana* та рисі показали, що за умов пошкодження ДНК та окиснювального стресу експресія В циклінів, зокрема *CYC2;1*, може збільшуватися, і це вважається важливим для регулювання контрольних точок клітинного циклу, що сприяє підвищенню здатності рослин долати геномний стрес (Schnittger та De Veylder, 2018).

Підсумовуючи, можна стверджувати, що, згідно отриманих результатів, екотипи *A. thaliana* з Чорнобильської зони демонструють унікальні механізми адаптації до екологічного стресу та руйнування ДНК, набуті, ймовірно, внаслідок тривалого впливу іонізуючого випромінювання. Ефективна антиоксидантна відповідь, швидка активація системи репарації

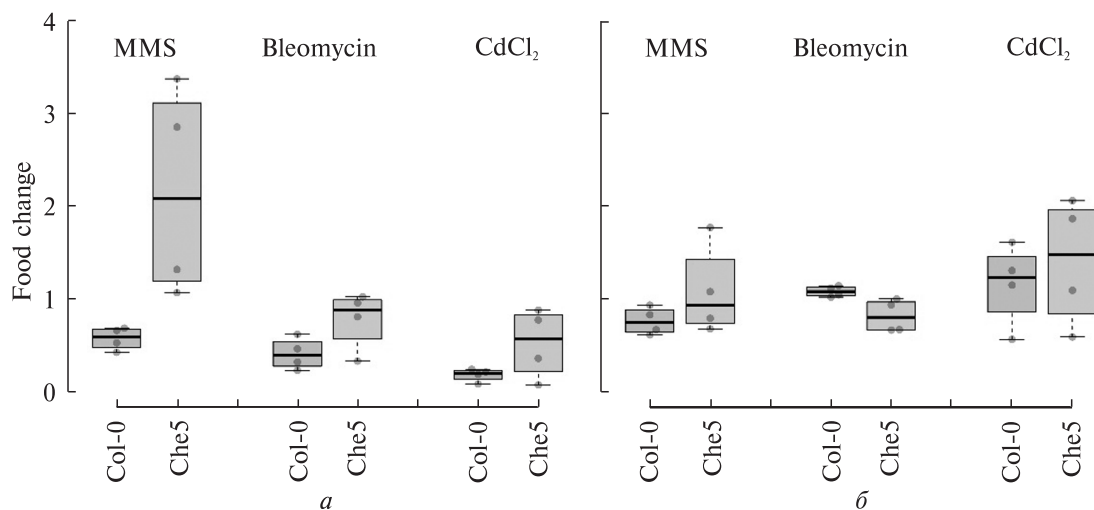


Рис. 5. Рівень експресії *СусВ2;1* (а) та *CDKG1* (б) в екотипах Col0 та Che5 після обробки метилметансульфонатом, блеоміцином та кадмієм ($p < 0,05$ для а – обробки MMS та блеоміцином, б – $p < 0,05$ для обробки блеоміцином)

ДНК та затримка клітинного циклу є ключовими компонентами їхніх захисних механізмів. Така адаптація вказує на те, що рослини з Чорнобиля використовують ефективні стратегії для зменшення генотоксичних ефектів, що надає їм підвищеної стійкості до окиснювального стресу та пошкодження геному.

Широ дякуємо професору John Doonan (IBERS, Aberystwyth University, Велика Британія) за надання доступу до лабораторного обладнання, зокрема мікроскопа та установок для ПЛР, що було необхідним для проведення наших експериментів. Висловлюємо подяку професору Karel Angelis (Institute of Experimental Botany, Прага, Чехія) за цінні поради та підтримку під час виконання експериментів із кометним аналізом. Їхня експертиза та внесок значно збагатили це дослідження. Також дякуємо Сергію Кіреєву (Державне спеціалізоване підприємство «Екоцентр») та Денису Вишневському (Чорнобильський радіаційно-екологічний біосферний заповідник, м. Чорнобиль) за логістичну допомогу, пошук та збір насіння.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і хребетних тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження частково фінан-

сувалося за рахунок гранту ЄС, 7-ма Рамкова програма, Обмін науковими кадрами, Дії Марії Кюрі 2014–2018.

STRESS ADAPTATION: ENHANCED RESISTANCE TO Cd^{2+} AND RADIOMIMETICS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* FROM THE CHORNOBYL AREA

V. Brykov¹, O. Talalaiev, H. Shevchenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, the NAS of Ukraine, 01004, Kyiv, Ukraine

Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic
Auto Tissue Berlin GmbH, Berlin, Germany

E-mail: vbrykov@gmail.com, talalaiev@autotissue.de, galli.shevchenko@gmail.com

The study of *Arabidopsis* ecotypes from the Chornobyl area demonstrated their enhanced resistance to cadmium (Cd^{2+}) and radiomimetics (bleomycin/zeocin). For instance, the seedlings of the Chornobyl ecotype Che07 demonstrated lower inhibition of root growth under Cd-induced stress. It was first determined that zeocin mainly affected the cells of the root meristem, whereas Cd^{2+} predominantly impacted the cells of the elongation zone. This differentiated response may result from variations in the stages of plant development, the specific action of genotoxic agents, and the activity of protective mechanisms in different growth zones of the roots. The analysis of DNA destruction and its ability to recover after processing with radiomimetics demonstrated the rapid (within three minutes) activation

of repair mechanisms in the Chernobyl ecotypes Che5 and Che07. The enhanced expression of the cyclin gene *CycB2;1* and poorer expression of the kinase gene *CDKG1* after processing with bleomycin indicated the presence of changes in the regulation of the cellular cycle, specifically its arrest in the G2 phase. This adaptive response might be directed at inhibiting the transition to mitosis, which prevents the transfer of the damaged DNA to daughter cells. In *Arabidopsis* ecotypes from the Chernobyl area, there was activation of the specific antioxidant enzymes, which counteracts the oxidative stress and genome damage. It is assumed that *Arabidopsis* plants from the area of the Chernobyl nuclear power station employ unique mechanisms of adaptation to ecological stress and DNA damage, which may have been acquired due to the long-term impact of ionizing radiation. The investigation of plant resistance to ionizing radiation and heavy metals is relevant for the elaboration of phytoremediation strategies and may promote the development of biotechnologies to enhance plant resistance to other abiotic stress factors.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abramov, V.I., Fedorenko, O., and Shevchenko, V., Genetic consequences of radioactive contaminations for populations of *Arabidopsis*, *Science of the Total Environment*, 1992 a, vol. 112, pp. 19–28
- Abramov, V.I., Sergeyeva, S.A., Ptitsyna, S.N., Semov, A.B., and Shevchenko, V.A., Genetic-effects and repair of single-stranded-DNA breaks in populations of *Arabidopsis thaliana* growing in the region of the Chernobyl-nuclear-power-station, *Genetika*, 1992b, vol. 28, pp. 69–73
- Angelis, K.J., Dušinská, M., and Collins, A.R., Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity, *Electrophoresis*, 1999, vol. 20, pp. 2133–2138
- Arkhipov, N.P., Kuchma, N.D., Askbrant, S., Pasternak, P.S., and Musica, V.V., Acute and long-term effects of irradiation on pine (*Pinus silvestris*) stands post-Chernobyl, *Sci. Total Environ.*, 1994, vol. 157, pp. 383–386
- Badia, M.B., Arias, C.L., Tronconi, M.A., Maurino, V.G., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., and Wheeler M.C., Enhanced cytosolic NADP-ME2 activity in *A. thaliana* affects plant development, stress tolerance and specific diurnal and nocturnal cellular processes, *Plant Science*, 2015, vol. 240, pp. 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.015>
- Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D., and Barlow, P.W., Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root, *Trends in Plant Science*, 2010, vol. 15, no. 7, pp. 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.007>
- Caplin, N., and Willey, N., Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses, *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, article 847. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00847>
- Chao, Yu.Ya., Hong, Ch-Ya., and Kao, Ch. H., The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, vol. 48, no. 5, pp. 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.009>
- Chivasa, S., Tomé, D.F., Hamilton, J.M., and Slabas, A.R., Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase beta-subunit as a novel plant cell death regulator, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2011, vol. 10, no. 3, M110.003905. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.003905>
- Danchenko, M., Skultety, L., Rashydov, N.M., Berezhna, V.V., Mátel, L., Salaj, T., Pretova, A., and Haiduch, M., Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment, *J. Proteome Research*, 2009, vol. 8, pp. 2915–2922
- Della Rovere, F., Fattorini, L., Ronzan, M., Falasca, G., and Altamura, M.M., The quiescent center and the stem cell niche in the adventitious roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signaling and Behavior*, 2016, vol. 11, article e1176660. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1176660>
- Giovannoni, J., Completing a pathway to plant vitamin C synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 22, pp. 9109–9110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703222104>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T.I., and Fu-jita, M., Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2017, vol. 23, no. 2, pp. 249–268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
- Ito, M., Expression of mitotic cyclins in higher plants: transcriptional and proteolytic regulation, *Plant Biotechnology Reports*, 2014, vol. 8, p. 9. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0297-9>
- Kim, Y.S., Analysis of gene expression upon DNA damage in *Arabidopsis*, *J. Plant Biol.*, 2006, vol. 49, pp. 298–302. <https://doi.org/10.1007/BF03031159>
- Klimenko, O., Pernis, M., Danchenko, M., Skultety, L., Klubíková, K., and Shevchenko, G., Natural ecotype of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Chernobyl-07) respond to cadmium stress more intensively than the sensitive ecotypes Oasis and Columbia, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, vol. 173, pp. 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.012>
- Klubíková, K., Danchenko, M., Skultety, L., Berezhna, V.V., Hricová, A., Rashydov, N. M., and Haiduch M., Agricultural recovery of a formerly radioactive area: II. Systematic proteomic characterization of flax seed development in the remediated Chernobyl area, *Journal of Proteomics*, 2011b, vol. 74, pp. 1378–1384
- Kovalchuk, I., Abramov, V., Pogribny, I., and Kovalchuk,

- O., Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone, *Plant Physiol.*, 2004, vol. 35, pp. 357–363
- Kovalchuk, O., Burke, P., Arkhipov, A., Kuchma, N., James, S.J., Kovalchuk, I., and Pogribny, I., Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation?, *Mutation Research*, 2003a, vol. 529, pp. 13–20
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Hohn, B., and Dubrova Yu.E., Extremely complex pattern of microsatellite mutation in the germline of wheat exposed to the post-Chernobyl radioactive contamination, *Mutation Research*, 2003b, vol. 525, pp. 93–101
- Li, S., Mhamdi, A., Clement, C., Jolivet, Y., and Noctor, G., Analysis of knockout mutants suggests that *Arabidopsis* NADP-malic enzyme 2 does not play an essential role in responses to oxidative stress of intracellular or extracellular origin, *J. Experiment. Bot.*, 2013, vol. 64, pp. 3605–3614
- Lin, J., Yang, K., Zheng, B., and Deng, X., Phosphorylation of *Arabidopsis* SINA2 by CDKG1 affects its ubiquitin ligase activity and degradation under abiotic stress, *BMC Plant Biology*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 1–14
- Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S., Hase, K., and Takano, T., Expression of an NADPmalic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance, *Plant Mol. Biol.*, 2007, vol. 64, pp. 49–58
- Liu, H., Liu, Z., Qin, A., Zhou, Y., Sun, S., Liu, Y., Hu, M., Yang, J., and Sun, X., Mitochondrial ATP synthase beta-subunit affects plastid retrograde signaling in *Arabidopsis*, *Inter. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, no. 14, pp. 7829. <https://doi.org/10.3390/ijms25147829>
- Ludovici, G.M., de Souza, S.O., Chierici, A., Cascone, M.G., d'Errico, F., and Malizia, A., Adaptation to ionizing radiation of higher plants: From environmental radioactivity to Chernobyl disaster, *J. Environ. Radioactiv.*, 2020, vol. 222, article 106375. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106375>
- Manova, V., Gecheff, G., and Stoilov, L., Efficient repair of bleomycin-induced double-strand breaks in barley ribosomal genes, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2006, vol. 601, no. 1–2, pp. 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.07.004>
- Manova, V., and Gruszka, D., DNA damage and re-pair in plants – from models to crops, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00885>
- Nibau, C., Dadarou, D., Kargios, N., Mallioura, A., Fernandez-Fuentes, N., Cavallari, N., and Doonan, J.H., CDKG1 is required for meiotic and somatic recombination intermediate processing in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 2020, vol. 32, no. 4, pp. 1308–1322
- Podlutski, M., Babina, D., Podobed, M., Bondarenko, E., Bitarishvili, S., Blinova, Y., Shesterikova, E., Prazyan, A., Turchin, L., Garbaruk, D., Kudin, M., Duarte, G.T., and Volkova, P., *Arabidopsis thaliana* accessions from the Chernobyl exclusion zone show decreased sensitivity to additional acute irradiation, *Plants*, 2024, vol. 13, no. 7, pp. 947. <https://doi.org/10.3390/plants13070947>
- Rashydov, N., and Hajduch, M., Chernobyl seed project. Advances in the identification of differentially abundant proteins in a radio-contaminated environment, *Frontiers in Plant Science*, 2015, vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00493>
- Schnittger, A., and De Veylder L. The dual face of cyclin B1, *Trends in Plant Science*, 2018, vol 23, no. 6, pp. 475–478
- Shevchenko, G.V., and Talalaiev, O.S., Efficient mechanism of DNA repair stabilizes genome of *Arabidopsis thaliana* from the Chernobyl zone, *Dopov. Nac. Akad. Nauk (Ukr)*, 2017, pp. 84–90. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.04.084>
- Shkvarnikov, P.K., A cytological study of plants growing under exposure to different radiation levels, *Tsitologia i Genetika*, 1990, vol. 24, pp. 33–37
- Saruyama, N., Sakakura, Y., Asano, T., Nishiuchi, T., Sasamoto, H., and Kodama, H., Quantification of metabolic activity of cultured plant cells by vital staining with fluorescein diacetate, *Analytical Biochemistry*, 2013, vol. 441, no. 1, pp. 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.06.005>
- Szurman-Zubrzycka, M., Jędrzejek, P., and Szarejko, I., How do plants cope with DNA damage? A concise review on the DDR pathway in plants, *Inter. J. Mol.Sci.*, 2023, vol. 24, no. 3, pp. 2404. <https://doi.org/10.3390/ijms24032404>
- Truernit, E. and Haseloff, J. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy, *Plant Methods*, 2008, vol. 4, p. 15
- Vladejić, J., Kovacic, M., Zwyrtková, J., et al., Zeocin-induced DNA damage response in barley and its dependence on ATR, *Scientific Reports*, 2024, vol. 14, pp. 3119. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53264-0>
- Wolucka, B.A., and van Montagu M., GDP-mannose 3,5-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo diosynthesis of vitamin C in plants, *J. Biolog. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 48, pp. 47483–47490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309135200>
- Yu, Q., Tian, H., Yue, K., Liu, J., Zhang, B., Li, X., and Ding, Z., A P-loop NTPase regulates quiescent center cell division and distal stem cell identity through the regulation of ROS homeostasis in *Arabidopsis* root, *PLoS Genetics*, 2016, vol. 12, article e1006175. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006175>

Надійшла в редакцію 10.06.2025
Після доопрацювання 15.07.2025
Прийнята до друку 18.09.2025