



УДК 577.152.9:577.346:577.24

А. М. Берестяна, академік НАН України Д. М. Гродзинський

**Зміни рибонуклеазної активності опромінених УФ-В та рентгенівською радіацією сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* у процесі старіння**

*Досліджено зміни рибонуклеазної активності в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, підданих дії різних доз гострого рентгенівського та УФ-В опромінення. Встановлено залежність підвищення рибонуклеазної активності від доз опромінення та стадій онтогенезу сім'ядольних листків. Розглянуто гіпотетичні механізми радіаційної індукції старіння рослин.*

РНКази являють собою ферменти фосфодіестерази, які гідролізують фосфодієфірний зв'язок у молекулі РНК, що необхідно на багатьох стадіях біохімічних перетворень генетичного матеріалу. РНКази чутливі до різних змін факторів зовнішнього середовища, в якому знаходиться рослина, і відіграють важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу та стресовій відповіді. Індукція експресії генів РНКаз у вегетативних частинах рослин виявлена при нестачі поживних речовин, при ураженні патогенами, у відповідь на ранові пошкодження тканин та під час старіння [1, 2].

Роль РНКаз у процесі старіння ще не з'ясована повністю. У контексті старіння ізольованих листків є достатньо даних, але дані щодо активності РНКази в старіючих інтактних листках часто суперечливі. Відомо, що індукція РНКаз як один з компонентів системної відповіді при старінні забезпечує рециркуляцію азотистих основ та неорганічного фосфату з відмираючих частин рослини. За допомогою гідролізу РНК відбувається вивільнення монофосфатів, які транспортуються у верхні частини рослини. Підвищення РНКазної активності протягом старіння не пов'язане зі зняттям інгібування ферменту або розривом гіпотетичних лізосом. Імовірно, дана реакція є частиною механізму старіння, обумовленого детерміністичними процесами в геномі [1, 3].

При старінні листя *Arabidopsis* спостерігається збільшення експресії гена *RNS1*. У нормі цей ген експресується в квітках рослини [3]. У *Lycopersicon esculentum* аналогічний ген *LE*, що кодує РНКази, не експресується в листках дорослих рослин у нормальних умовах, а активується на пізній стадії старіння. Причому максимальний рівень експресії гена

© А. М. Берестяна, Д. М. Гродзинський, 2014

*LE* відмічено у повністю пожовтілих листках. Передбачається, що продукт даного гена має вакуолярну та екстраклітинну локалізацію. Також у відповідь на різні пошкодження клітин відбувається індукція експресії РНКаз, що сприяє переробці РНК та вивільненню неорганічного фосфату, який може бути використаний іншими клітинами [4, 5]. Наприклад, експресія гена *RNS1* у *Arabidopsis* часто обумовлена пораненням. РНКазі, індуковані пораненням, можуть відігравати роль у захисті від патогенів, вірусів, грибів, нематод [6]. Особливо відмічається активність по відношенню до вірусної РНК. Так, інокуляція листків перцю вірусом тютюнової мозаїки в присутності РНКаз в інокулюмі спричиняє зниження ступеня розмноження вірусу. У рослин *Nicotiana* ген РНКазі *NK1* індукується в листках у відповідь на механічну інокуляцію вірусом огіркової мозаїки [7]. Особливості експресії РНКаз свідчать про їх участь в молекулярному механізмі вірусостійкості. Так, наприклад, трансгенні рослини *Nicotiana*, що експресують ген секреторної РНКазі бика, відрізняються високою стійкістю до вірусу тютюнової мозаїки. При цьому рівень РНКазної активності в листках та стеблах вище від контрольного [8]. РНКазі пошкоджують геномну РНК вірусів на стадіях інфекційного процесу, коли вона найбільш уразлива. Під час інокуляції при пошкодженні тканин відбувається транспорт РНКаз в місця пошкодження та подальша загибель інокульованих клітин з руйнуванням пулу клітинних мРНК, що не дає можливості вірусу розмножитися [3, 4].

Незважаючи на велику кількість досліджень РНКазної активності в умовах різних стресів, питання впливу іонізуючого та короткохвильового випромінювань на індукцію РНКазі монокарпиків ще мало досліджено. Зокрема, відповідь РНКаз на зовнішній радіаційний вплив у ході онтогенезу до теперішнього часу залишається багато в чому нез'ясованою. Фізіологічна роль та шляхи регулювання РНКаз в контексті радіаційної індукції старіння листя також досліджені недостатньо. Оскільки РНКазна активність є надійним критерієм раннього аналізу старіння листя, необхідні подальші дослідження ролі РНКаз у процесах радіаційно-індукованого старіння рослин.

**Матеріали та методи.** Досліджували РНКазну активність в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, яких піддавали впливу різних дозах гострого рентгенівського та УФ-В опромінення на стадії вегетації. 15-добові вегетативні рослини *Linum usitatissimum* опромінювали в першому варіанті в дозах 1, 3, 5, 15 Гр на рентгенівській установці РУМ-17, у другому — за допомогою джерела УФ-В випромінювання ("Philips Ultraviolet-B TL 20 W/12RS", Голландія) у дозах 4,5; 8,5 та 12 кДж/м<sup>2</sup>. Відбирали сім'ядольні листки на різних стадіях їх онтогенезу: С1, С2, С3, С4 — умовно позначених як стадії, на яких відбуваються морфологічно та біохімічно значущі зміни структури листка, зокрема пожовтіння 0, 5, 25–50, 50–70% відповідно. Біоматеріал використовували для підрахунку одиниць РНКазної активності.

Для визначення РНКазної активності в процесі старіння листків робили кілька підготовчих етапів. Готували субстратну РНК. Брالی наважку сумарної дріжджової РНК (НВО "Вектор" НІКТІ БАВ, серія № 1, Новосибірськ), розчиняли в буфері (10 мМ *трис*-HCl (рН 7,5), 10 мМ ЕДТА, 1% SDS, 1 М NaCl) в концентрації 5 мг/мл. До розчину РНК додавали рівний об'єм фенолу, центрифугували протягом 5 хв при 12 000 г. До супернатанту додавали рівний об'єм суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1) та центрифугували протягом 5 хв при 12 000 г. Супернатант, що містив РНК, осаджували абсолютним етанолом. Отриманий осад висушували, потім очищену РНК ресуспендували в бідистильованій воді в концентрації 2 мг/мл. Концентрацію РНК в розчині вимірювали на біофотометрі Eppendorf (Німеччина).

Ферментативну екстракцію рослинного матеріалу проводили за методикою Hellin (1980), розробленою для виділення РНКаз з листків. Брали 2 г рослинного матеріалу, гомогенізували в 20 мл 0,2 М цитратного буферу, рН 6,5. Потім пропускали через фільтрувальний папір та центрифугували при 13 000 об/хв протягом 20 хв на центрифугі Eppendorf (Німеччина). Супернатант переносили в чисті пробірки та використовували для подальшого визначення ферментативної активності [9].

Підраховували РНКазні одиниці активності (од. акт.). Брали 5 мл отриманого супернатанту, інкубували з 5 мл субстрату. Як субстрат використовували препарат очищеної нами дріжджової РНК (НВО "Вектор", Новосибірськ) в 0,025 М цитратному буфері, рН 6,8, протягом 60 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли заморожуванням, витримували суміш на льоду 10 хв та додавали осаджуючий реагент (5 мл охолодженої ортової кислоти, 15 мл абсолютного етанолу). Отриману суміш залишали на 150 хв при 4 °С, потім центрифугували 15 хв на швидкості 12 000 об/хв у центрифугі Eppendorf (Німеччина). Аліквоту екстракту розчиняли в бідистильованій воді та аналізували поглинання при 260 нм на спектрофотометрі за показниками збільшення продуктів деградації РНК [9]. Разом з тим ставили дві контрольні проби на поглинання субстрату (замість гомогенату додають 100 мкл дистильованої води) та поглинання ферменту (замість р-ну РНК додають 500 мкл дистильованої води). РНКазну активність виражали в умовних одиницях активності (од. акт.). За одиницю активності ( $E$ ) приймали ту кількість РНКаз, яка викликає збільшення оптичної густини при 260 нм у дослідних зразках порівняно з контрольними на 1 опт. од. за 1 год інкубації при 37 °С в перерахунку на 1 мл ферментативного розчину (опт. од./мл·год). Якщо величина  $\Delta A_{260}$  перевищує 0,200–0,250, то визначення активності повторюють з великим розведенням ферменту.

РНКазну активність у пробах визначають за формулою

$$A_{260} = (A_{260\text{зр}} - \Sigma A_{260\text{к}}) \cdot 4 \cdot 10 \cdot 1,2 \cdot 20, \quad (1)$$

де  $A_{260}$  — активність РНКаз, виражена в умовних одиницях, що означає приріст оптичної густини в дослідних зразках за 1 год інкубації на 1 мл гомогенату (опт. од./мл·год);  $A_{260\text{зр}}$  — оптичне поглинання дослідної проби;  $\Sigma A_{260\text{к}}$  — сума значень оптичної густини контрольних проб; 4 — коефіцієнт перерахунку на 1 год інкубації; 10 — коефіцієнт перерахунку на 1 мл гомогенату; 1,2 — коефіцієнт розведення при осадженні проб осаджувачем; 20 — коефіцієнт розведення для вимірювання на спектрофотометрі.

Статистичну достовірність результатів розраховували методом Стьюдента для ймовірності  $p \geq 0,95$  [10].

**Результати та обговорення.** Рибонуклеазна активність в зразках, опроміненних рентгенівською радіацією. Порівняння активності РНКаз на різних стадіях онтогенезу сім'ядольних листків виявило, що рентгенівське опромінення призводить до значного підвищення активності ферменту. Найвищу активність РНКаз в листках опромінених рослин спостерігали при дозі 15 Гр на всіх стадіях онтогенезу (рис. 1). На стадії С1 активність підвищувалася на 39,5 од. акт., на стадії С2 — на 35,3 од. акт., на стадії С3 — на 54,6 од. акт., на стадії С4 — на 113,9 од. акт. порівняно з неопроміненим контролем.

Даний ефект обумовлений тим, що клітина активно реагує на вплив іонізуючої радіації. Одна з таких реакцій полягає в зміні активності ферментів, зокрема РНКаз як ключового ферменту обміну РНК. РНКазі належить відповідна роль в захисних реакціях клітини за умов шкідливого впливу. Так, наприклад, підвищення РНКазної активності у зв'язку з реакцією рослин на ураження патогенами відмічено рядом дослідників [2, 7, 8]. Зокрема,

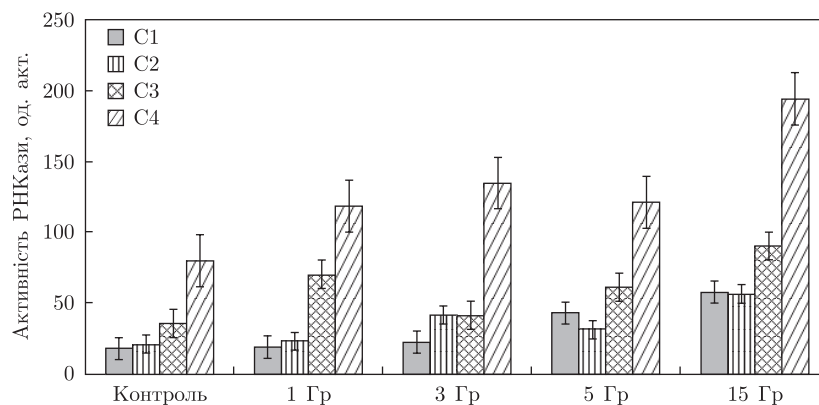


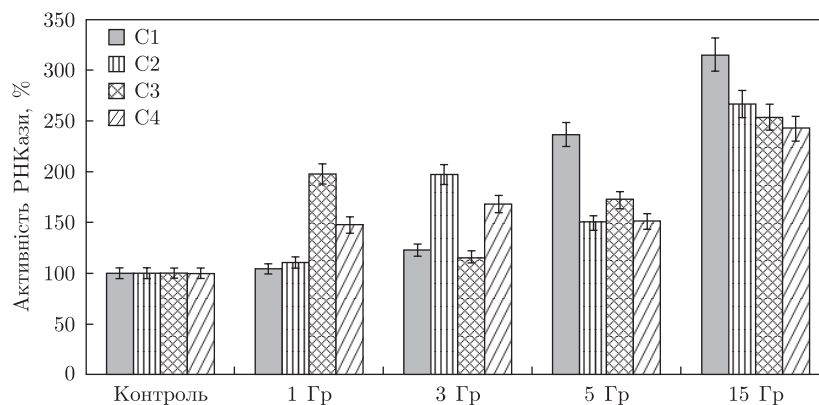
Рис. 1. Рибонуклеазна активність (од. акт.) в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, опроміненого різними дозами рентгенівської радіації

томат, уражений вірусом тютюнової мозаїки, має підвищений рівень активності РНКаз. Причому чим вище патогенність штаму вірусу, тим вище активність РНКаз [4].

Доза 1 Гр не викликала достовірного порівняно з контролем підвищення РНКазної активності на стадіях С1 та С2, але на стадіях С3 та С4 спричиняла достовірне підвищення активності ферменту (див. рис. 1). Дана доза справляла віддалені ефекти підвищення РНКазної активності. Динаміка зростання по стадіях, як і в контролі, мала лінійний характер. Це свідчить про незначний вплив дози 1 Гр на процеси радіаційно-індукованого старіння.

Доза 3 Гр сприяла нелінійному підвищенню активності ферменту по стадіях. На стадії С1 РНКазна активність достовірно не відрізнялася від показників на стадії С1 контролю та при дозі 1 Гр (див. рис. 1). На наступних двох стадіях С2 та С3 показники РНКазної активності достовірно не розрізнялися між собою — 41,8 та 41,3 од. акт. відповідно. Конкретно на стадії С3 РНКазна активність не відрізнялася достовірно від контролю. Тут ми спостерігаємо реакцію РНКазного плато, тобто доза 3 Гр загальмувала підвищення активності ферменту на етапі початку старіння. Однак на стадії С4 все ж бачимо різкий стрибок показника (134,6 од. акт.), який хоча достовірно не відрізняється від показника для стадії С4 при дозі 1 Гр (118,5 од. акт.), але свідчить про різкий підйом активності ферменту, що пов'язано, швидше за все, з процесами природного зростання гідролітичної активності при старінні (див. рис. 1). На фоні зростання активності РНКаз при дії пошкоджуючого фактору можуть активуватися механізми передчасного старіння та апоптозу.

Доза 5 Гр справляла нелінійний вплив на параметри РНКазної активності по стадіях онтогенезу. Так, показники на стадіях С1 (43,2 од. акт.) та С2 (31,7 од. акт.) достовірно не відрізнялися один від одного, на стадії С2 рівень РНКазної активності був навіть нижчий, ніж на стадії С1, що відмічено тільки при дозі 5 Гр. Активність РНКаз на стадії С2 (31,7 од. акт.) достовірно не відрізнялася від аналогічного показника стадії С2 при дозі опромінення 3 Гр (41,8 од. акт.), навіть була нижчою. Цей ефект може свідчити про певне



Стадія онтогенезу	Контроль	1 Гр	3 Гр	5 Гр	15 Гр
C1	100	104,3	122,9	236	315
C2	100	110,8	197,1	149,5	266,5
C3	100	197,7	116	172,1	253,3
C4	100	147,7	167,8	150,9	242

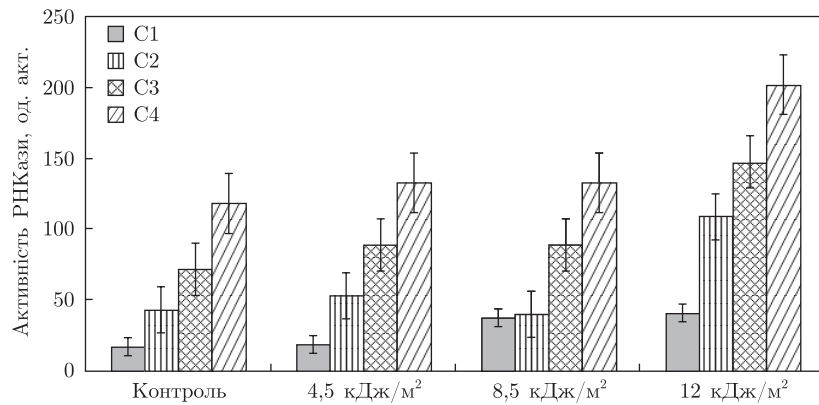
Рис. 2. Рибонуклеазна активність (%) в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, опроміненого різними дозами рентгенівської радіації, відносно контролю

уповільнення процесів радіаційно-індукованої деградації під впливом даної дози. Також РНКазна активність на стадії С3 була нижчою (61,3 од. акт.), ніж при дозі 1 Гр даної стадії (70,4 од. акт.). Доза 15 Гр, як вже відмічалось, викликала достовірне підвищення активності ферменту на всіх стадіях онтогенезу сім'ядольних листків (див. рис. 1). Особливо високий рівень активності ферменту спостерігався на стадії С4 (194,1 од. акт.), що більше ніж у два рази порівняно з контролем. Можемо говорити про зниження гідролітичної активності при дозі 5 Гр та про прискорення її при дозі 15 Гр.

Дані рис. 1 обробили, прийнявши вихідні величини РНКазної активності в контролі на всіх стадіях за 100%, а показники змін по дозах у ході онтогенезу — за X. Згідно з одержаними результатами (рис. 2), РНКазна активність на стадії С1 при дозі 1 Гр підвищилася на 4,3%, при дозі 3 Гр — на 22,9%, при дозі 5 Гр — на 136%, при дозі 15 Гр — на 215%. На стадії С2 при дозі 1 Гр підвищення активності РНКаз становило 10,8%, при дозі 3 Гр — 97,1%, при дозі 5 Гр — 49,5%, при дозі 15 Гр — 166,5%. На стадії С3 доза 1 Гр викликала підвищення активності на 97,7%, доза 3 Гр — на 16%, доза 5 Гр — на 72,1%, доза 15 Гр — на 153,3%. На стадії С4 доза 1 Гр спричинила зростання активності ферменту на 47,7%, доза 3 Гр — на 67,8%, доза 5 Гр — на 50,9%, доза 15 Гр — на 142%.

Найбільше підвищення РНКазної активності відбувалося при дозі 15 Гр (див. рис. 2). На стадії С1 доза 15 Гр викликала дворазове підвищення РНКазної активності, яка на всіх наступних стадіях також була достовірно вищою порівняно з контролем та показниками при інших дозах. Можна припустити, що дана доза справляла найбільший стресовий вплив, ефект пошкодження від якого зберігався на всіх наступних стадіях онтогенезу. Якщо оцінювати радіаційно-індуковане старіння за даними показниками, можна зробити висновок, що доза 15 Гр прискорила процеси вікової деградації.

За даними літератури відносно ряду рослин, різного роду пошкодження викликають індукцію гідролітичної активності [11, 12]. У процесі листового старіння також спостерігається підвищення активності РНКаз. Так, наприклад, у молодих ізольованих листках



Стадія онтогенезу	Контроль	4,5 кДж/м <sup>2</sup>	8,5 кДж/м <sup>2</sup>	12 кДж/м <sup>2</sup>
C1	16,2 ± 1,5	18,0 ± 1,9	36,8 ± 3,8	40,2 ± 4,4
C2	42,1 ± 4,1	52,5 ± 5,3	39,5 ± 4,1	108,1 ± 11,3
C3	71,3 ± 7,3	88,3 ± 9,1	65,4 ± 6,8	147,0 ± 14,4
C4	117,5 ± 11,6	132,2 ± 13,4	111,2 ± 11,3	201,9 ± 20,2

Рис. 3. Рибонуклеазна активність (од. акт.) в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, опроміненого різними дозами УФ-В радіації

томату активність РНКазид підвищувалася протягом 2 діб після ізолювання, потім наступало "РНКазне плато" та наступний пік підвищення відбувався на етапі пожовтіння листка. На прикладі огірка зростання РНКазної активності пов'язане з пожовтінням сім'ядольних листків. Інтактне старе листя тютюну має значно більшу активність РНКазид, ніж молоде інтактне листя. У колеоптилях ячменю, що розвиваються, також відбувається підвищення РНКазної активності. РНКазид бувають двох типів: синтетичні мікосомальні РНКазид та деструктивні розчинні. Вікове підвищення РНКазної активності в старих листках приписувалося дії розчинних деструктивних РНКаз [2]. Ефект, який ми спостерігали, свідчить про радіаційну індукцію процесів старіння листка. З цього можна зробити висновок, що опромінення в дозі 15 Гр рентгенівської радіації виявляє нерепаровану шкідливу дію та прискорює старіння.

*Рибонуклеазна активність у зразках, опроміненних УФ-В радіацією.* Під впливом УФ-В опромінення активність РНКазид у зразках підвищувалася в процесі старіння. Аналіз отриманих даних (див. рис. 3) показує, що збільшення РНКазної активності по стадіях онтогенезу сім'ядольних листків має лінійний характер у контролі. Однак відмінності показників активності ферменту на стадіях С2 та С3 не є достовірними (42,1 та 71,3 од. акт.).

Доза 4,5 кДж/м<sup>2</sup> також викликала лінійне збільшення активності РНКазид по стадіях. Ефект від даної дози мало відрізнявся від контролю. Хоча відмінності між стадіями достовірні, але не достовірні порівняно з показниками тих же стадій у контролі. Можна сказати, що дія УФ-В опромінення в дозі 4,5 кДж/м<sup>2</sup> не справляла значного впливу на процеси радіаційно-індукованого старіння.

Доза 8,5 кДж/м<sup>2</sup> обумовила нелінійне зростання РНКазної активності. Відмінності між показниками активності РНКазид на стадіях С1 та С2 (36,8 та 39,5 од. акт.), С2 та С3 (39,5 та 65,4 од. акт.) не є достовірними, що свідчить про наявність стану певного плато ферменту, викликаного даною дозою опромінення (див. рис. 3). Порівняно з контролем достовірною

відмінність є тільки на стадії С1. На інших стадіях достовірних відмінностей порівняно зі стадіями контролю не виявлено. Це може свідчити про те, що опромінення в дозі 8,5 кДж/м<sup>2</sup> справляло різкий вплив тільки на початковій стадії, але надалі ефект не спостерігався. Мабуть, дана доза опромінення не мала достатньої пошкоджуючої сили та не вплинула на темпи листового старіння.

При опроміненні в дозі 12 кДж/м<sup>2</sup> спостерігалось значне лінійне підвищення активності ферменту по стадіях онтогенезу (див. рис. 3). Відмінності між стадіями в зразках мали достовірний характер. Показники на стадіях С1, С2, С3, С4 достовірно відрізнялися від показників цих же стадій у контролі. Це свідчить про наявність стресового пошкодження, яке викликало прискорення гідролітичних процесів у ході старіння листків. Тут ми бачимо феномен радіаційно-індукованого старіння, аналогічний тому, який ми спостерігали для зразків, опромінених рентгенівською радіацією.

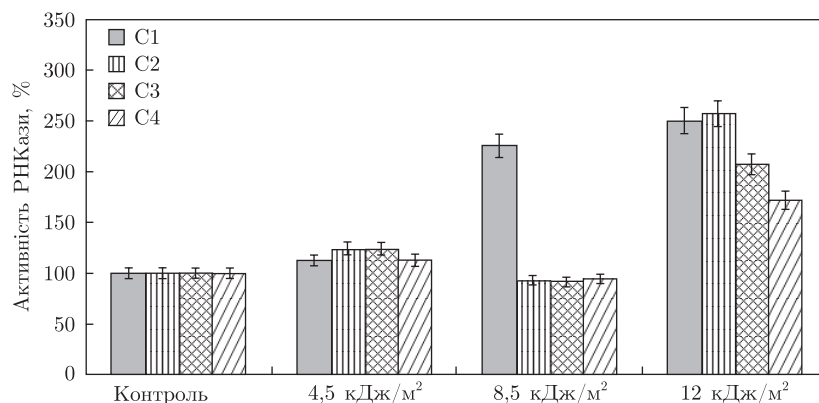
Як відомо з літературних даних, зміна зовнішніх умов призводить до активації транскрипції генів РНКаз. Ступінь пошкодження рослини корелює з РНКазною активністю. Підвищений фон нуклеолітичної активності спричиняє зниження рівня трансляції та клітинного метаболізму в цілому за рахунок високої швидкості розпаду рРНК та тРНК. Це сприяє швидкій зміні набору трансльованих мРНК та заміні нормального набору клітинних білків на характерний для стресових умов. Основні складові комплексу стресових реакцій виражаються в збільшенні активності гідролітичних ферментів, накопиченні вільних амінокислот, уповільненні білкового синтезу з одночасною активацією синтезу стресових білків. Так, через кілька годин після початку впливу на рослину стресового чинника виявляється, що велика частина молекул РНК в клітині синтезована знову. Описані процеси сприяють подоланню несприятливих умов [13].

Дані рис. 3 обробили, прийнявши вихідні показники РНКазної активності в контролі на всіх стадіях онтогенезу за 100%, а величини змін по дозах для кожної стадії — за X. Згідно з результатами розрахунків (рис. 4), на стадії С1 РНКазна активність під впливом УФ-В радіації в дозах 4,5; 8,5 та 12 кДж/м<sup>2</sup> підвищилася на 12,5; 125 та 150% відносно контролю відповідно. На стадії С2 гідролітична активність під впливом дози 4,5 кДж/м<sup>2</sup> підвищилася на 23,8%, при дозі 8,5 кДж/м<sup>2</sup> знизилася на 7,2%, при дозі 12 кДж/м<sup>2</sup> підвищилася на 157,1%. На стадії С3 даний показник при дозі 4,5 кДж/м<sup>2</sup> підвищився на 23,9%, при дозі 8,5 кДж/м<sup>2</sup> знизився на 8,5%, при дозі 12 кДж/м<sup>2</sup> підвищився на 107%. На стадії С4 активність ферменту при дозі 4,5 кДж/м<sup>2</sup> підвищилася на 12,8%, при дозі 8,5 кДж/м<sup>2</sup> знизилася на 5,2%, при дозі 12 кДж/м<sup>2</sup> підвищилася на 71,7%.

Як видно з рис. 4, найбільше підвищення РНКазної активності спостерігалось при дозі УФ-В опромінення 12 кДж/м<sup>2</sup>. Підвищення мало лінійний характер, високий рівень активності РНКаз зберігався на всіх стадіях онтогенезу листка. Як ми вже відзначали, це може свідчити про значний ступінь пошкодження, що сприяє прискоренню старіння листків.

Доза 8,5 кДж/м<sup>2</sup>, навпаки, сприяла уповільненню індукції РНКаз на стадіях С2, С3, С4, хоча на стадії С1 викликала значний порівняно з контролем сплеск активності. Даний ефект можна пояснити адаптаційними процесами. Так, під впливом дози 8,5 кДж/м<sup>2</sup> спостерігалось вповільнення гідролітичної активності в процесі старіння опромінених УФ-В радіацією сім'ядольних листків.

Як вже зазначалося, з літературних даних відомо, що зміни в стресових умовах активності РНКаз рослин відбуваються при охолодженні, засоленні, вірусному пошкодженні, посузі, пораненні. Так, наприклад, в ячменю у відповідь на зараження збудником іржі



Стадія онтогенезу	Контроль	4,5 кДж/м <sup>2</sup>	8,5 кДж/м <sup>2</sup>	12 кДж/м <sup>2</sup>
C1	100	112,5	225	250
C2	100	123,8	92,8	257,1
C3	100	123,9	91,5	207
C4	100	112,8	94,8	171,7

Рис. 4. Рибонуклеазна активність (%) в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, опроміненого різними дозами УФ-В радіації, відносно контролю

відмічено підвищення загальної нуклеолітичної активності та появу нових ізоферментів РНКаз. Ці ефекти пов'язують з інгібуючою дією РНКаз на патогенні організми і з участю РНКаз у процесах формування адаптаційного синдрому, комплексу адаптивних процесів, що не залежать від типу стресу, спрямованих на мінімізацію несприятливих впливів [14].

У міру природного в'янення листків знижується рівень ДНК та білка, спостерігається прогресивне зменшення вмісту РНК, особливо рРНК. У процесі розпаду нуклеїнових кислот старіючі клітини зберігають здатність до синтезу певних білків, зокрема РНКаз, що синтезується *de novo*, тоді як рівень протеїназ практично не змінюється під час старіння. Підйом активності ферменту до кінця вегетації в листках свідчить про збільшення до моменту старіння листків розпаду нуклеїнових кислот, що не компенсується їх синтезом [2, 15].

Таким чином, параметр РНКазної активності, поряд з показниками деградації хлорофілу, служить відмінним маркером темпів старіння, індукованого стресом. Було досліджено вплив різних доз іонізуючої та короткохвильової радіації на динаміку РНКазної активності протягом онтогенезу сім'ядольних листків *L. usitatissimum*. Показано підвищення активності РНКаз в листках, опроміненних короткохвильовою УФ-В та іонізуючою рентгенівською радіацією, у процесі старіння як відповідь на дію стресу. Індукована стресом активація РНКаз обумовлена тим, що сигнал, який активує синтез даного ферменту, включає спільні шляхи захисних реакцій як на дію патогенів, так і на радіаційні стреси. Отримані дані свідчать про доцільність використання методу визначення РНКазної активності для масового аналізу ступеня радіаційно-індукованого старіння.

1. Трифонова Е. А., Кочетов А. В., Шумный В. К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Успехи соврем. биологии. – 2000. – 120. – С. 395–405.

2. Green P. J. The ribonucleases of higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1994. – **45**. – P. 421–445.
3. Hillwig M. S., Liu X., Liu G. et al. Petunia nectar proteins have ribonuclease activity // J. Exp. Bot. – 2010. – **61**, No 11. – P. 2951–2965.
4. Lers A., Sonego L., Green P. J. et al. Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission // Plant Physiol. – 2006. – **142**, No 2. – P. 710–721.
5. Reymond P., Weber H., Damond M. et al. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2000. – **12**. – P. 707–719.
6. Galiana E., Bonnet P., Conrod S. et al. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor // Plant Physiol. – 1997. – **115**. – P. 1557–1567.
7. Ohno H., Ehara Y. Expression of ribonuclease gene in mechanically injured or virus-inoculated *Nicotiana tabacum* leaves // Tohoku J. Agric. Res. – 2005. – **55**. – P. 99–109.
8. Trifonova E. A., Sapotsky M. V., Komarova M. L. et al. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // Plant Cell Rep. – 2007. – **26**. – P. 1121–1126.
9. Hellin E., Torrecillas A., Sevilla F. et al. Determination of ribonuclease activity in coloured extracts of citrus leaves // Biol. plant. – 1986. – **28**, No 6. – P. 424–428.
10. Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Капранова М. Н. Методы определения активности нуклеаз и родственных ферментов // Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. – Казань: КГУ, 1980. – С. 53–60.
11. Sutton B. C., Shaw M. Changes in two ribonuclease isozymes during rust infection of flax cotyledons // Plant Physiol. – 1982. – **69**, No 1. – P. 205–209.
12. Храменкова О. М. Основы радиобиологии: учеб. пособие. – Гомель: УО “ГГУ им. Ф. Скорины”, 2003. – 238 с.
13. Vanyushin B. F., Bakeeva L. E., Zamyatnina V. A. et al. Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents // Int. Rev. Cytol. – 2004. – **233**. – P. 135–179.
14. Blank A., McKeon T. A. Single-strand-preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – **86**. – P. 3169–3173.
15. Blank A., McKeon T. A. Three RNases in senescent and nonsenescent wheat leaves // Plant Physiol. – 1991. – **97**. – P. 1402–1408.

Інститут клітинної біології  
та генетичної інженерії НАН України, Київ

Надійшло до редакції 08.08.2014

**А. Н. Берестяная, академик НАН Украины Д. М. Гродзинский**

**Изменения рибонуклеазной активности облученных УФ-В  
и рентгеновской радиацией семядольных листьев *Linum  
usitatissimum* в процессе старения**

*Исследовали изменения рибонуклеазной активности в онтогенезе семядольных листьев *Linum usitatissimum*, подвергнутых действию разных доз острого рентгеновского и УФ-В облучения. Установлена зависимость повышения рибонуклеазной активности от доз облучения и стадий онтогенеза семядольных листьев. Рассмотрены гипотетические механизмы радиационной индукции старения растений.*

A. M. Berestyana, Academician of the NAS of Ukraine D. M. Grodzinsky

**Changes of the ribonuclease activity of cotyledon leaves of *Linum usitatissimum* irradiated by UV-B radiation and X-rays in aging**

*We investigated changes of the ribonuclease activity in ontogenesis of cotyledon leaves *Linum usitatissimum* irradiated by different doses of acute X-ray and UV-B radiation. The dependence of the ribonuclease activity increase on the doses and the stages of ontogeny of cotyledon leaves is found. Some hypothetical mechanisms of radiation induction of senescence are considered.*