Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

> Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

БУЛАВІН ІЛЛЯ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 576.3:57.043:581.43

ДИСЕРТАЦІЯ

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ КОРЕНІВ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕҮNH. В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ЗА УМОВ КЛІНОСТАТУВАННЯ 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Булавін І.В.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України Кордюм Єлизавета Львівна

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ	4
SUMMARY	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
РОЗДІЛ 1	23
БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ УМОВ РЕАЛЬНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА	
КЛІНОСТАТУВАННЯ (МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ)	23
1.1. Вплив мікрогравітації та кліностатування на фототрофні організми	23
1.2. Корінь як об'єкт для вивчення впливу гравітації, умов реальної та	•
модельованої мікрогравітації	29
1.2.1. Гравітропічна реакція кореня	29
 1.2.2. Вплив умов реальної та модельованої мікрогравітації на клітини кореня 	31
1.3. Цитоскелет рослинних клітин	35
1.3.1. Мікрофіламенти та їхня роль у рослинній клітині	35
1.3.2. Тубіліновий цитоскелет рослинних клітин	37
1.3.3. Гравічутливість цитоскелету рослинних клітин	38
1.4. Ауксин та його роль у гравітропічній реакції кореня	41
1.4.1. Розподіл ауксину в тканинах рослин	41
1.4.2. Розподіл ауксину в умовах мікрогравітації	43
1.5. Морфогенетичний потенціал рослинних тканин <i>in vitro</i>	44
1.5.1. Морфогенез рослин <i>in vitro</i>	44
1.5.2. Ризогенез in vitro як різновид органогенезу.	45
1.5.3. Використання культури <i>in vitro</i> в дослідженнях з космічної біології	47
РОЗДІЛ 2	49
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	49
2.1. Об'єкт дослідження	49
2.2. Методи	49
РОЗДІЛ 3	54

3MICT

ЛОСЛІЛЖЕННЯ МОЛЕЛЕЙ РИЗОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i> В КОНТРОЛІ	
3.1. Утворення коренів <i>de novo</i> з калусної тканини	54
3.2. Модель ризогенезу з листкових експлантів	59
3.3. Анатомічна будова коренів <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	64
РОЗДІЛ 4	72
АНАТОМІЯ КОРЕНІВ ПРИ ДІЇ КЛІНОСТАТУВАННЯ	72
РОЗДІЛ 5	77
УЛЬТРАСТРУКТУРА ГРАВІРЕЦЕПТОРНОГО АПАРАТУ КОРЕНЕВОІ	` 0
ЧОХЛИКА ТА РОСТОВИХ ЗОН КОРЕНЯ	77
5.1. Ультраструктура клітин кореневого чохлика in vitro	77
5.2. Ультраструктура клітин ростових зон власне кореня	90
РОЗДІЛ 6	
ОРІЄНТАЦІЯ ЕЛЕМЕНТІВ АКТИНОВОГО ТА ТУБУЛІНОВОГО	
ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛІТИНАХ КОРЕНІВ, СФОРМОВАНИХ <i>DE NOVO</i> І	B
УМОВАХ КЛІНОСТАТУВАННЯ	
6.1. Цитоскелет в клітинах ростових зон власне кореня	111
6.2. Структура клітинних стінок при кліностатуванні	115
РОЗДІЛ 7	
РОЗПОДІЛ АУКСИНУ В КОРЕНЯХ, СФОРМОВАНИХ <i>DE NOVO</i> НА	
ЛИСТКОВИХ ЕКСПЛАНТАХ	
УЗАГАЛЬНЕННЯ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	
ДОДАТОК	

АНОТАЦІЯ

Булавін І.В. Особливості морфогенезу коренів *Arabidopsis. thaliana* (L.) Неупh. в культурі *in vitro* за умов кліностатування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія), Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України. – ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України, Київ, 2017.

Дані численних космічних і модельних наземних експерименів з рослинами щодо впливу мікрогравітації на клітини, спеціалізовані і не спеціалізовані сприйняття гравітаційного стимулу, ДО одержані на зародкових коренях, що сформувалися в насінні в гравітаційному полі при 1 g. Для уникнення дії гравітації на перші поділи клітин при утворенні зачатків коренів було запропоновано модель ризогенезу в культурі in vitro для досліджень впливу реальної та симульованої мікрогравітації на морфогенез та диференціювання клітин. Розширити та доповнити існуючі уявлення щодо гравічутливості/гравізалежності процесів органогенезу, за умов впливу реальної та модельованої мікрогравітації можна через використовування модельних рослин із стійкими мутаціями, зокрема scr, де організація (радіальний паттерн) кореня визначається дією ЛВОХ транскрипційних факторів SHR та SCR, що регулюють асиметричні поділи клітин при формуванні двох ініціальних рядів клітин – периблеми та ендодерми.

Дослідження моделей ризогенезу *in vitro* з калусної тканини та листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта в стаціонарних умовах показали, що при культивуванні калусів на середовищі 1/10 МС без

вітамінів і гормонів утворення коренів відбувалося по всій поверхні калусної тканини, при чому висока морфогенетична здатність корелювала з наявністю трихом. Утворення коренів з черешків листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта на середовищі 1/10 МС без вітамінів і гормонів найбільш частіше спостерігалося при розміщенні експлантів абаксіальною поверхнею на живильне середовище та розмірі експлантів від 0,9 до 1,2 см. Результати досліджень демонструють залежність реалізації морфогенетичного потенціалу від розміру експлантів та їхній орієнтації на живильному середовищі. Аналіз анатомічної будови коренів, утворених *in vitro* виявив зрощення коренів по всій дожині, зменшення довжини ростових зон та кількості їхніх клітин при ризогенезі з калусної тканини, в той час як корені, сформовані з черешків листкових експлантів за своєю будовою були подібні до зародкових. На підставі отриманих даних модель ризогенезу *in vitro* з листкових експлантів вважається найбільш придатна для дослідів.

На рівні анатомії та ультраструктури доведено диференціювання гравірецепторних клітин кореневого чохлика – статоцитів. Проте статоцити не функціонують в умовах кліностатування, оскільки амілопласти-статоліти позбавлені можливості сприйняття гравітаційного стимулу у разі постійної дезорієнтації проростків по відношенню до вектора гравітації. Амілопласти в таких умовах скупчуються в центрі клітини або знаходяться в різних її частинах так само, як і в зародкових коренях в умовах мікрогравітації у відсутності гравітаційного вектора. Гістогенез кореня відбувався подібно до стаціонарного контролю – кора коренів *А. thaliana* дикого типу складалася із двох шарів, у *scr* мутанта відзначено мозаїчну будову: наявність одного та двох шарів кори. Зміни ультраструктури клітин ростових зон коренів досліджених об'єктів, утворених *in vitro* в умовах кліностатування, торкалися в основному структури мітохондрій, ступеня вакуолізації клітин, будови клітинних стінок, наявності ЕР-тілець і мали характер, схожий з таким перебудов ультраструктури клітин зародкових коренів інтактних

проростків під впливом мікрогравітації або кліностатування. Отже, одержані результати свідчать про подібність ступеня гравічутливості клітин, не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу, та гравірепторних клітин чохликів коренів, утворених *de novo*, з такими зародкових коренів проростків.

Експериментами, проведеними в умовах реальної та модельованої мікрогравітації показано, що процеси зборки мікрофіламентів та мікротрубочок, а також їхня орієнтація в клітинах зародкових коренів в тій чи іншій мірі є гравізалежними. Для прижиттєвої візуалізації орієнтації актинового та тубулінового цитоскелету в коренях *in vitro* в наших експериментах нами вперше проведено регенерацію коренів з листкових експлантів трансгенних рослинах A. thaliana GFP-FABD2 та GFP-MAP4 in vitro в умовах кліностатування та показано, що в умовах модельованої мікрогравітації орієнтація актинового цитоскелету коренях A. thaliana GFP-FABD2 не змінювалася порівняно із контролем. В клітинах протодерми меристематичної зони та епідерми ДЗР і ЦЗР виявлено ендоплазматичні та кортикальні мікрофіламенти. В клітинах меристеми та ДЗР ендоплазматичні мікрофіламенти оточували ядро і разходилися від нього радіально до клітинної стінки; кортикальні – розташовувалися косо та перпендикулярно щодо поздовжньої осі кореня. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розміщувалися в цитозолі між вакуолями, кортикальні мали поздовжню орієнтацію.

На відміну від актинового цитоскелету, в клітинах коренів *A. thaliana* GFP-MAP4 *in vitro* знайдено зміни орієнтаціїї мікротрубочок за умов модельованої мікрогравітації. В меристемі та клітинах ЦЗР мікротрубочки розташовувалися поперечно та косо відносно до вектора гравітації як в контролі так і в експерименті. В клітинах ДЗР відбувалася дезорієнтація мікротрубочок порівняно з контролем, на підставі чого припускається підвищена гравічутливість тубулінового цитоскелету цієї зони, що

обумовлюється її специфічними фізіологічними властивостями. В літературі зазначається, що кортикальні мікротрубочки можуть спрямовувати синтез і орієнтацію мікрофібрил целюлози – головного компонента клітинних стінок рослин, при взаємодії з целюлозосинтазними комплексами, а актиновий цитоскелет забезпечує рухливість везикул Гольджі, що містять целюлозосинтазні комплекси первинної клітинної стінки.

Як показали наші дослідження структури та товщини клітинних стінок в протодермі та епідермі ДЗР коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo*, в контролі і при кліностатуванні, в поперечних і поздовжніх клітинних стінках розрізнялися тонка пектинова серединна пластинка і мікрофібрили целюлози, занурені в матрикс. За умов кліностатування виявлено тенденцію до потоншення клітинних стінок, що узгоджується з літературними даними. Встановлено хвилястість поперечних клітинних стінок в ДЗР в умовах кліностатування, що, ймовірно, пов'язано із змінами в орієнтації тубулінових мікротрубочок.

Використовуючи трансгенні рослини DR5rev::GFP, ми дослідили розподіл ауксин-залежного репортерного білка в зародкових коренях і коренях, утворених de novo з листкових експлантів. Показано, що в коренях, які росли вертикально, репортерний білок локалізувався в центральному циліндрі та кореневому чохлику. Після 2-х годин гравістимуляції флюоресценція DR5rev::GFP спостерігалася на фізично нижньому боці коренів. В умовах кліностатування репортерний білок виявлявся лише в центральному циліндрі та кореневому чохлику. Отже за нашими даними, в зародкових коренях та коренях, сформованих на листкових експлантах de novo in vitro, ауксин розподіляється подібним чином в контролі та експериментальних умовах, тобто корені *in vitro* відчувають та можуть сприймати гравітаційний стимул. Постійне обертання об'єкту при горизонтальному кліностатуванні, що моделює відсутність гравітаційного вектора в космічному польоті, гальмує гравітропічну реакцію кореня,

позбавляючи амілопласти-статоліти можливості сприймати гравітаційний стимул, і таким чином блокуючи наступний крок – полярний транспорт ауксину, що підтверджує придатність кліностатування для відтворення біологічних ефектів реальної мікрогравітації в космічносу польоті.

Загалом, результати проведених досліджень чітко демонструють подібність анатомічної структури та диференціювання клітин, спеціалізованих і не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу, коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених *in vitro*, до зародкових коренів. Отже, модель ризогенезу із листкових експлантів *in vitro* пропонується для використання в космічних експериментах та інших дослідженнях з космічної біології.

Отримані дані можуть застосовуватись для подальших дослідницьких робіт з метою виявлення структурних та функціональних закономірностей адаптації рослин до умов реальної та модельованої мікрогравітації. Результати дослідження можуть використовуватись в учбовому процесі при підготовці спеціалістів з клітинної біології та при розробці експериментів щодо впливу умов реальної мікрогравітації.

Ключові слова: Arabidopsis thaliana, ризогенез in vitro, анатомія, ультраструктура, цитоскелет, ауксин, кліностатування.

SUMMARY

Bulavin I.V. Peculiarities of Root Morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in *in vitro* Culture under Clinorotation. – Qualification scientific work as the manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D). on a speciality 03.00.11 – Cytology, Cell Biology, Histology, (091–Biology), M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. – Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The data on the influence of microgravity on plant morphogenesis and differentiation of cells, specialized and not specializes to gravity perception, have been obtained in numerous spaceflight and modeling ground experiments with plants which organs were originated in seeds formed on earth under 1 g. To avoid the action of gravity on the first cell divisions in root rudiments, a model of rhizogenesis in the *in vitro* culture was proposed to study the influence of real and simulayed microgravity on root morphogenesis and cell differentiation. Using the stable mutants, in particular scr mutant, in spaceflight and clinorotation experiments allows broaden the ideas to current on gravisensitivity/gravidependence of the processes of plant organogenesis. The SCARECROW gene is essential for generating the root radial organization as it regulates an asymmetric cell division.

The investigations of rhizogenesis in a callus tissue of the *A. thaliana* wild type and *scr* mutant in the stationary conditions and under clinorotation showed that roots formed over the callus entire surface on the 1/10 MS medium without vitamins and hormones, and a high morphogenetic ability correlated with with the presence of trichoms. Formation of roots from the petioles of leaf explants of the *A. thaliana* wild type and *scr* mutant on the 1/10 MS medium without vitamins

and hormones was mostly observed when explants of a size from 0.9 to 1.2 sm were placed with an abaxial surface on the nutrient medium. The obtained data demonstrate that realization of a morphogenetic potential depended on a size of explants and their orientation on the nutrient medium.

An analysis of the anatomical structure of roots formed in the callus tissue revealed accreted roots along the full length, a decrease in both the length of root growth zones and a cell number in them, while the structure of roots formed from the petioles of leaf explants was similar to that of embryonal roots. On the basis of these results, a conclusion has been done that a model of rhizogenesis from leaf explants was the most suitable for future experiments.

At the level of light and electron microscopy, it was established that graviperceptive cells of a root cap - statocytes were differentiated but do not function under clinorotation as amyloplasts-statoliths were deprived a possibility to perceive a gravitational stimulus under the permanent disorientation of seedlings towards a gravity vector. In such conditions, amyloplasts accumulated in the center of a statocyte or they were rarely observed in the different parts of a cell similarly to the locality of amyloplasts in statocytes of embryonal roots in ihe absence of gravity in space flight. Root histogenesis occurred under clinorotation similarly to that in the stationary control – a root cortex in A. thaliana wild type consisted of two layers, it consisted of one ground layer in a scr mutant. Changes in the ultrastructure of cells in root growth zones, formed *de novo* in the investigated objects under clinorotation, concerned mainly the structure of mitochondria, a degree of cell vacuolization, the cell wall texture, and a number of ER-bodies. A character of these changes was similar to that of cell ultrastructure rearrangements in embryonal roots of intact seedlings in real microgravity and under clinorotation. Thus, the obtained data indicate the affinity of a degree of gravisensitivity of cells, specialized and not specialized to gravity perception, in roots formed de novo in vitro culture and embryonal roots of seedlings.

Spaceflight and modeled ground-based experiments have shown that processes of the assembly of microfilaments and microtubules as well as their orientation in cells of embryonal roots are in one way or another gravidependent. For lifetime visualization of orientation of the actin and tubulin cytoskeleton in roots formed in vitro, we firstly obtained roots from leaf explants of A. thaliana transgenic plants GFP-FABD2 and GFP-MAP4 in vitro. It was shown that orientation of the cytoskeleton in roots of A. thaliana transgenic plants GFP-FABD2 did not change under clinorotation in comparison with control. Endoplasmic and cortical microfilaments have been revealed in protodermal cells in the meristem zone and in epidermal cells of the distal and central elongation zones. In cells of the meristem and distal elongation zone, microfilaments surrouded a nucleus and dispersed radially from it to the cell wall. Cortical microfilaments were situated obliquely and perpendicularly in relation to the root longitudinal axis. In the central elongation zone, endoplasmic microfilaments were situated in the cytosol between vacuoles, cortical microfilaments were oriented longitudinally.

Unlike the actin cytoskeleton, certain changes in the orientation of microtibules were found in root cells of *A. thaliana* GFP-MAP4 *in vitro* under clinorotation. In the meristem and cells of the distal elongation zone, microtubules were situated transversally and obliquely in relation to a gravity vector in control and under clinorotation. In cells of the distal elongation zone, the disorientation of microtubules under clinorotation may indicate the heightened gravisensitivity of the tubulin cytoskeleton in this zone, that is stipulated with its specific physiological properties. As it is known, cortical microtubules direct the orientation of cellulose microfibrils, which are the main component of plant cell walls, under the interaction with cellulose synthase complexes, while the actin cytoskeleton provides the delivery of Golgi vesicles.

Our investigations of the structure and thickness of cell walls in the protoderm and epidermis of the distal elongation zone in formed *de novo* roots of

A. thaliana wild type in the control and under clinorotation showed the precense of a thin pectin middle lamina and immersed in the matrix cellulose microfibrils in transversal and longitudinal cell walls. Under clinorotation, a tendency to thinning of cell walls was revealed that is conformed with the literature data. It was noted a waviness of transversal cell walls in the root distal elongation zone under clinorotation, that may be connected with the changes in the orientation of tubulin microtubules. Using transgenic plants DR5rev:: GFP, we studied the distribution of an auxin-dependent reporter protein in embryonal roots and roots formed *de novo* from leaf explants. A reporter protein was established to localize in the central cylinder and cap of roots which grow vertically. After 2 hours of gravistimulation, DR5rev::GFP fluorescence was observed in the physically low root side. Under clinorotation, a reporter protein was only revealed in the central cylinder and root cap. The obtained data demonstrate that auxin spreads similarly in embryonal roots and roots formed from leaf explants *in vitro* in the control and experimental conditions, i. e. roots in vitro sense a gravitational stimulus and can perceive it. Permanent rotation of an object under horizontal clinorotation, that simulates the absence of a gravitational vector in space flight, inhibits a root gravitropic reaction. Amyloplasts-statoliths can't perceive a gravitational stimulus that blocks the successive phase – auxin polar transport. These data confirmed the fitness of clinorotation to simulate the biological effects of real microgravity in space flight.

On the whole, the results of performed experiments clearly showed the similarity of the anatomical structure and differentiation of cells, specialized and not specialized to gravity perception, in roots of *A. thaliana* wild type and *scr* mutant formed *in vitro* to those of embryonal roots of two objects. Thus, a model of rhizogenesis from leaf explants *in vitro* is proposed for using in spaceflight experiments and other research in plant space biology.

The obtained data are useful for future research with the aim to reveal new structural and functional regularities of plant adaptation to microgravity. Results

of performed investigations may use also in the educational process under training of specialists in the field of cell biology and experiment development to study the influence of real and simulated microgravity on plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, rhizogenesis *in vitro*, anatomy, ultrastructure, cytoskeleton, auxin, clinorotation.

<u>Статті:</u>

1. Булавін І.В. Ризогенез в культурі *in vitro Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта / І.В. Булавін // Укр. ботан . журн. – 2014. – Т. 71, 1. – С. 79–82.

2. Булавін І.В. Анатомія та ультраструктура коренів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* під впливом кліностатування / І.В. Булавін // Укр. ботан. журн. – 2015. – 72, 2. – С. 180–185.

3. Булавін І.В. Гравічутливість коренів, утворених з листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* / І.В. Булавін // Вісник Харківського національного аграрного університету. – 2015. – Серія: Біологія 1. – С. 6–13.

4. Bulavin I.V. "Rhizogenesis *in vitro*" as a model for plant space biology / I. V. Bulavin // Annals of R. S. C. B. – 2015. – V. 19, 3. – P. 1–8.

5. Булавин И.В. Ориентациия цитоскелета в клетках эпидермы корней, образованных *de novo* на листовых эксплантах в условиях клиностатирования / И.В. Булавин // Цитология и генетика. – 2016. – Т. 50, 2. – С. 58–64.

<u>Тези:</u>

6. Булавін І.В. Культура рослинних тканин *in vitro* як модель для вивчення біологічних ефектів мікрогравітаціїї на клітинному рівні / І.В. Булавін // XIV міжнародна молодіжна науково-практична конференція «Людина і космос», Дніпропетровськ, 11–13 квітня, 2012. – С. 217.

7. Булавін І.В. Дослідження коренів Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре *in vitro* в умовах кліностатування / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Ужгород, 19–23 вересня, 2012. – С. 192–193.

8. Булавин И.В. Морфогенез корней Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре *in vitro* в условиях симулированной микрогравитации / И.В. Булавин / Материалы VII Международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы», Харьков, 20–23 ноября, 2012. – С. 11.

9. Bulavin I.V. Cortical microtubules orientation in epidermal root cells of distal elongation zone *in vitro* under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of International Conference of Young Scientists "Advances in botany and ecology", Scholkine, 18–22 June, 2013. – P. 214–215.

Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root growth and anatomy under stationary condition and clinorotation / I.V. Bulavin // ELGRA News, Vol. 28, Biennial Symposium and General Assembly 2013, Vatican City, 11–14 September, 2013. – P. 193.

11. Булавин И.В. Ультраструктура гравирецепторных клеток корневого чехлика растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупh. в культуре *in vitro* при клиностатировании / И.В. Булавин / Тези доп. 13-ї Української конференції з космічних досліджень, 2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим. – С. 82.

12. Булавін І.В. Регенераційна здатність листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупh. в залежності від їх орієнтації на живильному середовищі / І.В. Булавін // Збірник тез міжнародної конференції «Геноміка рослин та біотехнологія» та другої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23–24 грудня, 2013, Київ, Україна. – С. 43. 13. Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root cap structure under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of Plant Biology and Biotechnology International Conference, Almaty, Kazakhstan, May 28–30, 2014. – P. 158.

14. Булавін І.В. Диференціювання клітин коренів Arabidopsis thaliana в культурі in vitro в умовах модельованої мікрогравітаціїї / І.В. Булавін // Тези доп. 14-ї Української конференції з космічних досліджень, 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна. – С. 44.

15. Булавін І.В. Анатомічна будова та гравітропічна реакція коренів *Arabidopsis thaliana* L., сформованих *de novo* за умов симульованої мікрогравітації / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Умань, 9–12 вересня, 2014. – С. 113.

 Bulavin I.V. Auxin distribution in *Arabidopsis thaliana* roots formed *de novo* under simulated microgravity / I.V. Bulavin // Abstracts of 15th Ukrainian Conference on Space Research, 24–28 August, 2015, Odessa, Ukraine. – P. 36.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ДЗР- дистальна зона розтягу
- ЕПР ендоплазматичний ретикулюм
- ІОК індоліл-3-оцтова кислота
- М меристема
- МС живильне середовище Мурасиге та Скуга
- МТ мікротрубочки
- МФ мікрофіламенти
- ЦЗР центральна зона розтягу
- GFP- зелений флюоресцентний білок

ВСТУП

Актуальність теми. У зв'язку із сьогоденними планами людства космосу активізувалися освоєння значно дослідження впливу мікрогравітації на рослини з метою пізнання механізмів їхньої адаптації до гравічутливості/гравізалежності цього чинника, з'ясування базових клітинних процесів, що є необхідною теоретичною основою розробки технологій вирощування рослин в космосі, отже автотрофної ланки біорегенеративних систем життєзабезпечення та прогнозу надійності їхнього функціонування [104, 105, 160]. Багаторічними дослідженнями встановлено ряд закономірностей впливу мікрогравітації на морфогенез, просторову орієнтацію та полярність органогенезу, фізіологію, біохімію клітинного метаболізму, експресію генів, репродукцію та диференціювання клітин, тобто процесів, що лежать в основі росту та розвитку організмів [120, 130, 140, 141, 154, 156, 160, 176, 202, 203, 205, 244]. Проте не вирішено остаточно питання щодо впливу мікрогравітації на ріст і диференціювання клітин, в першу чергу гравірецепторних, хоча ці питання є ключовими для розуміння механізмів адаптації рослин до умов космічного польоту. Основними об'єктами досліджень в численних космічних і модельних експериментах слугували рослини in vivo, тобто ті, які виросли з насіння, що утворилося в наземних умовах. На прикладі рослин Lepidium sativum L. [246], Arabidopsis thaliana [46, 140], Beta vulgaris [28] показано, що в умовах мікрогравітації гравірецепторний апарат зародкових коренів інтактних проростків формується, але не функціонує у відсутності гравітаційного вектора. Результати досліджень *in vitro*, в яких використовувались культура протопластів [214] та калусні культури [37, 251], в основному стосуються структурних і метаболічних змін. Існує лише одне повідомлення про відсутність центральної статенхіми, тобто статоцитів, в коренях, які

утворилися *de novo* з калусу в культурі *in vitro* за умов мікрогравітації [198]. Залишаються відкритими питання щодо впливу мікрогравітації на органо –, та гістогенез, диференціювання гравірецепторних клітин кореневого чохлика та клітин ростових зон коренів *in vitro*.

Тому для досліджень була відібрана модельна система "Ризогенез іп vitro", в якій, на відміну від моделей *in vivo*, формування коренів, починаючи від першого поділу клітин до повного утворення органу відбувається в умовах модельованої мікрогравітації (кліностатування). Розширити лоповнити існуючі уявлення щодо та гравічутливості/гравізалежності процесів органогенезу, за умов впливу реальної та модельованої можна через використовування модельних рослин із стійкими мутаціями, зокрема scr, де організація (радіальний паттерн) кореня визначається дією двох транскрипційних факторів SHR та SCR, що регулюють асиметричні поділи клітин при формуванні двох ініціальних рядів клітин – периблеми та ендодерми [96, 172].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, тематиками. Дисертаційна робота виконувалась в рамках фундаментальних науководослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України: 00112U004176 "Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях ("Біолобораторія-М")" – 2012–2013 рр.; 00113U002583 "Дослідження впливу мікрогравітації на фізико-хімічні властивості цитоплазматичної мембрани рослинних клітин (МЕМБРАНА) – 2014 р.; 0115U002737 "Фізико-хімічні властивості біомембран рослинних клітин в умовах мікрогравітації: цитоплазматична та енергетичні мембрани" – 2015–2016 рр.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування впливу кліностатування на морфогенез та структурно-функціональну

організацію клітин коренів Arabidopsis thaliana дикого типу та scr мутанта, утворених de novo в культурі in vitro.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- відпрацювати методи індукції утворення коренів *in vitro* в калусній культурі та на листкових експлантах;
- порівняти анатомічну структуру коренів дикого типу та scr мутанта, утворених в калусній культурі та на листкових експлантах в контролі та в умовах кліностатування;
- дослідити ультраструктуру клітин кореневого чохлика та клітин ростових зон коренів, утворених *in vitro* в контролі та за умов кліностатування;
- вивчити організацію актинового і тубулінового цитоскелету в клітинах ростових зон коренів трансгенних рослин *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-FABD2 в контролі та умовах кліностатування;
- охарактеризувати розподіл ауксину в апексах коренів трансгенних рослин *A. thaliana* DR5rev::GFP в контролі, умовах кліностатування та при гравістимуляції.

Об'єкт дослідження: морфогенез і гравічутливість коренів, сформованих *de novo* в культурі *in vitro* за умов кліностатування.

Предмет дослідження: вплив кліностатування на анатомічну будову коренів, цитоскелет, ультраструктуру клітин та розподіл ауксину у кореневому апексі.

Методи дослідження: культура тканин *in vitro*, світлова, трансмісійна електронна та конфокальна мікроскопія, статистика.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено процеси морфогенезу коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта в культурі *in vitro* в умовах модельованої мікрогравітації (кліностатування). Показано, що формування коренів в культурі *in vitro* з листкових експлантів

відбувається шляхом поділу клітин пучкового камбію черешків, в калусній культурі – з морфогенних осередків калусної тканини. Встановлено, що диференціювання гравірецепторних клітин чохлика та клітин ростових зон коренів A. thaliana дикого типу та scr мутанта, які формуються in vitro з листкових експлантів в стаціонарному контролі відбуваються подібно до таких зародкових коренів. В коренях, утворених з калусу відмічено анатомічні зміни: зменшення довжини ростових зон, фасциація. При кліностатуванні формування кореневого чохлика та ростових зон коренів A. thaliana дикого типу та scr мутанта, утворених з листкових експлантів відбувається подібно до контролю. Виявлені зміни локалізації амілопластів ультраструктурні перебудови мітохондрій в клітинах в статоцитах, меристеми та ДЗР, прогресуюча вакуолізація, перебудови організації тубулінового цитоскелету в зоні розтягу підтверджують той факт, що місце сприйняття гравітаційного стимулу та власне ростові реакції (тропізми) у рослин є просторово роз'єднаними, і як наслідок найбільші зміни фіксуються в зонах активно метаболізуючих клітин (де відбувається дуже швидкий ріст клітин). Доведено, що корені, сформовані в культурі *in vitro* в умовах модельованої мікрогравітації, є фізіологічно активними. Одержані дані чітко доводять можливість реалізації генетично детермінованої програми морфогенезу та диференціювання клітин за умов модельованої мікрогравітації.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані можуть застосовуватись для подальших дослідницьких робіт з метою виявлення структурних та функціональних закономірностей адаптації рослин до умов реальної та модельованої мікрогравітації. Результати дослідження можуть використовуватись в учбовому процесі при підготовці спеціалістів з клітинної біології. Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було сформульовано проблему, обрано тему дисертаційної роботи, визначено об'єкт та напрямок експериментального вирішення проблеми. Дисертація є самостійною роботою здобувача.

Апробація результатів. Основні положення дисертації доповідались на XIV міжнародній молодіжній науково-практичній конференції "Людина і космос" (11–13 квітня, 2012, Дніпропетровськ, Україна); міжнародних конференціях молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології" (19–23 вересня, 2012, Ужгород, Україна; 18–22 червня 2013, Щолкіне, Крим; 9–12 вересня, 2014, Умань, Україна); VII міжнародній конференції молодих науковців (20–23 листопада, 2012, Харків, Україна); 13-й, 14-й та 15-й Українських конференціях з космічних досліджень (2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим; 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна; 24–28 серпня, Одеса, Україна, 2015); Biennial International Symposium on ELGRA (11–14 September, 2013, Vatican City, Rome); Міжнародній конференції "Геноміка рослин та біотехнологія" та другій конференції молодих учених "Біологія рослин та біотехнологія", (23–24 грудня, 2013, Київ, Україна); Plant Biology and Biotechnology International Conference (28–30 May, 2014, Almaty, Kazakhstan).

Публікації. Отримані в ході дослідницької роботи результати були опубліковані в 16 наукових працях, з яких 4 статті у провідних фахових виданнях, 1 стаття в зарубіжному науковому виданні та 11 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 159 сторінках друкованого тексту, містить 9 таблиць, 36 рисунків і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної

частини з обговоренням результатів роботи, узагальнення, висновків, списку використаних джерел, який містить 254 посилань, та додатка.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ УМОВ РЕАЛЬНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА КЛІНОСТАТУВАННЯ (МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ)

1.1. Вплив мікрогравітації та кліностатування на фототрофні організми

Відомо, що гравітація є постійно діючим геофізичним фактором на Землі, що контролює ріст та розвиток живих істот. Орбітальні польоти космічних апаратів дозволили проводити унікальні експерименти щодо досліджень впливу гравітації на функціонування біосфери Землі, в тому числі її автотрофної ланки – рослин. На борту космічного апарату, який знаходиться в орбітальному польоті, створюється динамічна невагомість (мікрогравітація), ЩО дозволяє за допомогою бортової центрифуги отримувати ступінчасті величини гравітації до 1 д та більше та вивчати вплив мікрогравітації і таким чином гравітації, на просторову орієнтацію, фізіологію та біохімію організмів, морфогенез, репродукцію, диференціювання клітин – процеси, які лежать в основі росту та розвитку індивідуумів [30, 120,121, 128, 141,154, 176, 221].

Мікрогравітацію на декілька секунд дозволяють відтворити параболічні польоти та «вежа невагомості» [34]. Частково моделюють вплив мікрогравітації на живі системи в наземних умовах гіпокінезія [30], водяна імерсія [215], 2-D та 3-D кліностатування [245]. Останній метод заснований на дезорієнтації об'єктів відносно дії вектора гравітації. Так, при 2-D горизонтальному кліностатуванні об'єкт обертається навколо осі з певною частотою. Розрізняють швидкі кліностати – (50-120 об/хв.) та повільні – 1-5 об/хв. Вибір типу кліностата залежить від об'єктів: для організмів, які мають

невеликі розміри, використовують перший тип кліностатів, для інших – другий. Хоча фізичний принцип дії кліностатів, а також біологічна сутність кліностатування обговорюються в літературі з різних позицій, ці прилади широко застосовуються лабораторіях світу, оскільки відтворюють принципово важливу особливість мікрогравітації в космічному польоті – відсутність гравітаційного вектора [128, 137, 154].

В багаторічних експериментах з рослинами в умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті та модельованої мікрогравітації, було встановлено збереження та реалізацію генетичної інформації в процесі морфогенезу вегетативних і генеративних органів [141, 160, 176]. Вищі рослини, які є необхідними компонентами біорегенеративних систем життєзабезпечення, ростуть і розвиваються в умовах мікрогравітації, що є незвичним чинником для земних організмів. Доведено, що для успішного росту рослин на орбіті необхідно створення більш або менш оптимальних умов в космічних оранжереях щодо температури, вологості, вмісту в повітрі СО₂, інтенсивності та спрямованості світла, аерації субстрату тощо. Слід зазначити, що схожість високоякісного насіння на орбіті є стовідсотковою. В той же час виявлено істотні перебудови структурно-функціональної організації клітинних органел і метаболізму, зміни перекисного окислення ліпідів і антиоксидантної системи, генної експресії та синтезу білків, в тому числі білків теплового шоку [31, 120, 154, 181, 205, 214, 243]. Так, в умовах мікрогравітації злебільшого змінювалася та кліностатування ультраструктура мітохондрій, амілопластів, вакуолізація клітин, структура клітинних стінок [120, 136, 156, 214]. Вважається, що діапазон змін в ультраструктурі мітохондрій в умовах мікрогравітації залежить від їхнього фізіологічного статусу, який може варіювати в різних тканинах [9, 71, 229]. Показано, що в листках A. thaliana за умов мікрогравітації ультраструктура мітохондрій залишалася типовою [191]. набухання мітохондрій спостерігалося в коренях V. radiata [229]. Конденсація мітохондрій:

зменшення їхнього розміру та підвищення електронної щільності матриксу в дистальній зоні розтягу (ДЗР) коренів описано для проростків *Pisum sativum* при кліностатуванні [71].

Показано, що структура пластид в листках A. thaliana майже не відрізнялася від такої в контролі при дії мікрогравітації протягом 6 діб, за винятком зерен крохмалю, що мали менші розміри, ніж в наземних зразках [180, 191]. У довготривалих експериментах протягом 15-29 днів з рослинами Brassica rapa та гороху встановлено збільшення об'єму тилакоїдів у хлоропластах, крохмальних зерен та пластоглобул і зменшення кількості гран [144], а також деструкцію гран і утворення електронно-прозорих ділянок у стромі [51]. Встановлено зменшення світлозбираючих антен фотосистеми II та фотосистеми I, пошкодження фотосистеми I та зменшення стекінга тилакоїдів гран, що свідчить про більшу чутливість фотосистеми І до впливу мікрогравітації. Припускається, що деякі з цих відхилень можуть бути викликані порушенням відтоку метаболітів фотосинтезу з клітин в умовах мікрогравітації [144]. При кліностатуванні у рослин A. thaliana виявлено зменшення тилакоїдів у гранах [52]. Ступінь вакуолізації клітин в умовах мікргогравітації був неоднаковим у різних експериментах. Так в клітинах меристеми коренів рослин Avena sativa та V. radiata, які перебували 8 днів в умовах мікрогравітації, а також проростків Beta vulgaris після 3-х діб кліностатування змін не відмічалося [28, 229]. Збільшення об'єму вакуолей в клітинах меристеми, зрілих статоцитах колумели та секреторних клітинах чохлика спостерігалося в коренях проростків *Glycine max*, які знаходилися 6 днів в умовах мікрогравтації [143], а також в клітинах меристеми коренів В. гара при 6-ти добовому кліностатуванні [24]. Зазначено, що ступінь вакуолазації клітин зростає у більш тривалих експериментах [154].

Характерною зміною клітинних стінок під впливом мікрогравітації та кліностатування є потоншення, порушення організації мікрофібрил

целюлози, зниження вмісту целюлози та лігніну тощо [93, 137]. Так, достовірне зменшення вмісту лігніну визначено в проростках V. radiata, A. sativa та Pinus sylvestris на 25%, 24% та 15% після 4-х діб космічного польоту порівняно з наземним контролем [87]. Зниження рівня геміцелюлози та пектину відбувалося в кореневих апексах Oryza sativa після 68,5-136 год впливу мікрогравітації [129]. Відмічено певну хвилястість клітинних стінок в умовах кліностатування [227]. Цікаво відмітити, що раніш одержані дані за допомогою біохімічних методів щодо змін у ліпідному та вуглеводному метаболізмі та активності ферментів клітинної стінки узгоджується із спрямованістю змін експресії генів, які кодують білки клітинної стінки та ліпідного сигналінгу [201, 253].

Показано, що рослинні клітини реагують на дію симульованої мікрогравітації певним підвищенням вмісту білків теплового шоку Hsp70 і Hsp90, охарактеризовано закономірності їх синтезу в часі [26, 146, 149, 254]. Рівень Hsp70 і Hsp90 в проростках гороху підвищувався в перші години кліностатування, після чого зменшувався до такого в контролі [148]. При пророщуванні насіння в умовах кліностатування виявлений більш повільний гідроліз цих білків теплового шоку, також як й інших білків, що містяться у великій кількості в зрілому насінні [146]. Досліджено вклад в ці зміни двох складових кліностатування – ефекту обертання об'єкту і ефекту положення [26]. За рівнем молекулярних шаперонів, мембранною проникністю та ростовою активністю проростків встановлено, що тривале кліностатування впливає на реакцію рослинних клітин на тепловий стрес та послаблює їх здатність до надбання стійкості шляхом попередньої обробки. Виявлена індукція синтезу Hsp70 і Hsp90 в рослинах у відповідь на дію гіпергравітації, вперше показана залежність рівня і тривалості їх синтезу під час реадаптації від дози гравітаційної дії [147].

Досліджено експресію різних класів низькомолекулярних білків теплового шоку (нмБТШ) за умов температурного стресу, симульованої мікрогравітації та гіпергравітації [45, 240, 241]. Встановлено вплив зміненої гравітації на експресію генів нмБТШ. За допомогою методів ЗТ-ПЛР та імуноблотингу визначено вплив повільного кліностатування (2 об/хв) на експресію білків теплового шоку. На прикладі цитозольних класів нмБТШ показано що в процесі проростання етиольованих проростків гороху спостерігається уповільненні процесу деградації мРНК відповідних білків у порівнянні з контролем. Також показано відсутність змін в експресії представників різних класів низькомолекулярних білків теплового шоку за умов центрифугування з прискоренням 3, 7, 10 та 14g протягом 15 хвилин та 1 години.

Встановлено уповільнення накопичення запасних речовин – білків та ліпидів – в клітинах зародків *В. гара* в умовах реальної та симульованої мікрогравітації [163, 199].

Виявлено підвищення чутливості проростків сої до патогенного гриба *Phytophtora sojae* в умовах мікрогравітації, що може пояснюватись зниженням імунітету рослини, зокрема, потоншенням клітинних оболонок та/або зростанням агресивності патогену [166, 216].

Дослідження впливу реальної та модельованої мікрогравітації на ріст і розвиток рослин і можливостей їхньої адаптації до цих умов в останні роки піднялися на новий щабель завдяки удосконаленню техніки мікрочипів і двомірного електрофорезу, що дозволило виявляти вплив мікрогравітації на експресію генів, склад та вміст білків. Встановлено значне число генів, на експресію яких впливає реальна та модельована мікрогравітація, зміни в кількості індивідуальних білкових плям. Під впливом цих чинників змінювалася експресія генів, задіяних у широкому колі клітинних процесів, зокрема у відповідях на стрес, передачі сигналів, в тому числі за участю іонів кальцію, синтезі білків, загальному метаболізмі, білків, зв'язаних з хлорофілом а/b тощо. Доведено органоспецифічність відповідей рослин на молекулярному рівні. Істотні варіації в експресії індивідуальних генів в різниих органах вказують не лише на відсутність простої відповіді на умови космічного польоту, а скоріш за все на специфічність відповіді кожного органа у загальній стратегії [104, 105, 164, 202].

Оскільки вищі рослини проходять повний цикл онтогенезу, від насіння до насіння, в умовах мікрогравітації, виявлнеі істотні зміни у структурно-функціональній організації рослин у більшості розглядаються як такі, що сприяють адаптації рослин до дії цього чинника. До встановлених закономірностей дії мікрогравітації на організменному, основних клітинному та субклітинному рівнях: можна віднести наступні: 1) процеси морфогенезу, цитокінезу та диференціювання клітин відбуваються в умовах мікрогравітації без істотних відхилень від норми; 2) мають місце істотні зміни клітинного метаболізму порівняно з наземним контролем, які відображаються в перебудовах ультраструктурної організації клітин, на основі чого був зроблений висновок, що клітини, не спеціалізовані до сприйняття гравітаційного стимулу, чутливі до гравітації; 3) змінюється внутрішньоклітинний баланс кальцію; 4) процеси транскрипції та трансляції є чутливими до впливу мікрогравітації; 5) мікрогравітація належить до таких зовнішніх чинників, які не перешкоджають адаптації клітин до їхньої дії в межах генетично детермінованої норми реакції. На підставі концепції щодо істотного впливу мікрогравітації на метаболізм клітин незалежно від їхньої тканинної та видової належності обгрунтовано фундаментальне положення, що клітини, які діляться та мають активний метаболізм, є найбільш чутливими до дії мікрогравітації. Показано, що зміни метаболізму мікрогравітації призводять до прискорення 1) росту та В умовах диференціювання меристематичних клітин i клітин, ЩО ростуть розтяганням, і 2) старіння диференційованих клітин і, отже, скороченню періоду діяльності меристем і в ряді випадків – онтогенезу організмів [154, 160].

Загалом взяті результати цитологічних, біохімічних і модекулярнобіологічних досліджень яскраво демонструють суттєвий вплив мікрогравітації на ключові процеси розвитку рослин. Розкриваючи в певній мірі механізми, які лежать в основі реакцій рослин на дію мікрогравітації та забезпечують пристосування рослин до дії цього чинника, сьогоденні надбання спрямовують в той же час на подальші дослідження адаптивних стратегій рослин до мікрогравітації та гравічутливості/гравізалежності основних процесів функціонування рослин на клітинному та молекулярному рівнях.

1.2. Корінь як об'єкт для вивчення впливу гравітації, умов реальної та модельованої мікрогравітації

1.2.1. Гравітропічна реакція кореня

В уявленнях про гравічутливість рослинних клітин пропонується розрізняти два аспекти: 1) здатність клітин сприймати та активно гравітаційний стимул використовувати (клітини, спеціалізовані ЛО сприйняття гравітаційного стимулу – статоцити кореневого чохлика та клітини з верхівковим ростом – ризоїди, кореневі ендодерми стебла, волоски, апікальна клітина протонеми мохів), що характеризується загальним поняттям гравірецепції та 2) здатність клітин відчувати гравітацію (клітини, не спеціалізовані до сприйняття гравітації), тобто підтримувати стабільність структури і метаболізму в гравітаційному полі і змінювати її в умовах мікрогравітації (гравічутливість) [27, 29, 94].

Встановлено, що в коренях місце сприйняття гравітації та місце відповіді розділені між собою у просторі та часі, що робить корені рослин зручним об'єктом для вивчення впливу, як гравітації, так і мікрогравітації. Гравітропічну реакцію кореня поділено на три фази: 1) сприйняття

гравітації клітинами кореневого чохлика; 2) передачі сигналу; 3) ростової відповіді у формі вигину [116]. Для пояснення механізму сприйняття гравітації загальноприйнятою є крохмаль-статолітна теорія Немєца-Габерляндта, яка була запропонована у 1900 р. У коренях, що ростуть вертикально, амілопласти, які виконують роль статолітів, розташовуються у дистальній частині гравірецепторних клітин – статоцитів, ядро займає проксимальне положення. Перпендикулярна орієнтація коренів відносно вектора гравітації – гравістимуляція, викликає переміщення амілопластів на фізично нижній бік клітин. Вважається, що після сприйняття гравітаційного стимулу у клітинах колумели генерується біохімічний сигнал, що передається у зону розтягу [116, 186]. Процес трансдукції ще до кінця не з'ясовано, тому існують різні припущення щодо трансдукторів сигналу, одним з яких розглядаються іони Ca²⁺ [179, 231]. Так, наприклад показано, що взаємодія хелаторів Ca²⁺ з кінчиком кореня кукурудзи призводила до гравітропічної реакції кореня, яка знов поновлювалася при втрати додаванні іонів [167, 209]. Іони Ca²⁺ акумулювалися в нижній частині зоні розтягу кореня при гравістимуляції.

Згідно теорії Холодного-Вента збільшення концентрації фітогормону ауксину у нижній частині кореня призводить до його вигину, оскільки ауксин гальмує розтягання клітин. Особлива роль у перерозподілі ауксину належить білкам-переносникам, в першу чергу PIN3, які рівномірно розташовуються на цитоплазматичній мембрані статоцитів. У коренях, що ростуть вертикально, ауксин рухається через центральний циліндр до кореневого чохлика. При гравістимуляції відбувається релокалізація білківасиметричний переносників, спричиняє його ЩО рух ауксину та накопичення на фізично нижньому боці кореня. Накопичення іонів кальцію та ауксину пригнічує розтягання клітин на нижньому боці [116, 187].

1.2.2. Вплив умов реальної та модельованої мікрогравітації на клітини кореня

У відсутності вектора гравітації гравітропічна реакція кореня не відбувається. Припускається, що це явище пов'язано із змінами у функціонуванні гравірецепторних клітин кореневого чохлика – статоциттів. Як ми вже відмічали, статоцити кореневого чохлика характеризуються певною полярністю, яка проявляється у розтошуванні ядра у проксимальній частині клітини, ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) та амілопластів – у дистальній [5, 29, 183, 218, 223].

Численними експериментами в умовах реальної та модельованої мікрогравітації світлової мікроскопії y статоцитах на рівні продемонстровано, що амілопласти-статоліти диференціюються в цих умовах, але не функціонують [117, 143, 154, 161]. На рівні світлової та електронної мікроскопії було чітко доведено формування чохлика та диференціювання клітин колумели в ембріональних коренях в умовах космічного польоту та кліностатування. В кореневому чохлику, як в контролі, так і за умов реальної та модельованої мікрогравітації розрізнялися клітини меристеми, статоцити на стадіїї диференціювання, диференційовані статоцити та секреторні клітини. Кількість клітин кореневого чохлика варіювала в залежності від виду рослин. Показано полярності статоцитів (локалізація збереження структурної ядра y ЕПР проксимальній частині, v дистальній). Цистерни ЕПР розташовуються більш-меньш паралельно відносно дистальної клітинної стінки. Амілопласти здебільшого знаходилися у центрі статоцитів або в різних їхніх частинах [185, 186].

Таку реакцію амілопластів кореневого чохлика на відсутність гравітаційного стимулу або неможливість його сприйняття продемонстровано в експериментах з проростками гороху [153, 233, 234], арабідопсиса [46], крес-салату [246], хріниці [100, 168, 207], вівса [229], кукурудзи [183, 184] та бальзаміну [38]. Так, наприклад, в статоцитах кореневого чохлика проростків гороху після 7-добового перебування в космічному польоті ядро знаходилося в проксимальній частині клітин, амілопласти розташовувалися біля ядра або в кутах клітин. Спостерігалося зменшення об'єму ліпідних крапель та електронної щільності цистерн ЕПР. Після 18 діб впливу мікрогравітації істотно зменшувався відносний об'єм пластидома в статоцитах, амілопласти набували овальної або округлої форми, зменшувався також об'єм крохмальних зерен. Амілопласти містили одне крохмальне зерно в центрі або декілька дрібних крохмальних зерен, спостерігалися амілопласти без крохмальних зерен на зрізах [153, 233, 234].

В клітинах чохлика коренів проростків кукурудзи після 7 діб космічного польоту відмічено збільшення кількості ліпідних крапель та плазмалемосом [7, 44]. Істотні зміни об'єму органел, за винятком ядра, виявлено в меристематичних клітинах та статоцитах 4,8-добових коренів проростків кукурудзи в умовах мікрогравітації порівняно з контролем [184]. Зменшувався відносний об'єм мітохондрій округлої або овальної форми та диктіосом в клітинах меристеми, об'єм пластид і ліпідних крапель – в статоцитах, об'єм диктіосом та кількість слизу в секреторних клітинах.

Під впливом кліностатування у статоцитах кореневого чохлика проростків хріниці відбувалися дезінтеграція комплексів ЕПР і гідроліз крохмалю, активізувалися автолітичні процеси [154]. У статоцитах *A. thaliana* відзначалося зменшення об'єму крохмальних зерен на 23% порівняно з контролем [46]. Збільшення об'єму вакуолей описано в клітинах центральної статенхіми кореневих чохликів проростків хріниці [126] та *A. thaliana* [46] в умовах кліностатування. Таким чином дослідження гістогенезу та диференціювання клітин кореневих чохликів в умовах мікрогравітаціїї чітко показали, що гравірецепторний апарат ембріональних коренів формується, проте не функціонує у відсутності вектора гравітації або неможливості його сприйняття, але зберігає здатність для гравірецепції протягом тривалого часу.

Встановлено, що в умовах реальної та модельованої мікрогравітації, як і в контролі, в коренях чітко розрізняються зони меристеми, розтягу та диференціювання, тобто гістогенез відбувається без відхилень від норми, але кількісні показники можуть змінюватися. Зміни у швидкості росту та довжині кореня та окремих його ростових зон описано в ряді експериментів, проведених в космічному польоті та в умовах кліностатування. Так, наприклад, зменшувалася довжина коренів проростків Lens culinaris [206] та Zea mays [7] в космічному польоті та коренів проростків гороху при кліностатуванні [4], хоча площа клітин та значення мітотичного індексу не змінювались [7]. Зменшення довжини меристематичної зони виявлено в коренях Z. mays, L. culinaris, P. sativum та Lepidium sativum [7, 37, 90, 156]. Збільшення довжини зони меристеми, посилення клітинного поділу та зменшення розмірів клітин показано для коренів проростків A. thaliana в космічному польоті [170]. В той же час встановлено відсутність статистично достовірної різниці по цих показниках для коренів L. culinaris і L. sativum [207, 243]. Наголошується, що вагомим чинником деяких розбіжностей результатів космічних експериментів може бути відсутність тотожності в умовах вирощування [85]. Так, довжина епікотилів розрізнялася у рослин Vigna vulgaris, які знаходилися у різних частинах ростової камери в космічному польоті [230]. На думку авторів, такий ефект спричинено різницею у газовому складі частин ростової камери.

Дослідження ультраструктури клітин апікальної меристеми коренів виявили подібність більшості їхніх характеристик в умовах мікрогравітації та контролю у різних видів покритонасінних. Формування типового веретена поділу та кінетохорних мікротрубочок описано в клітинах апікальної меристеми коренів проростуів вівса, що перебували в умовах мікрогравітації протягом 8 діб. Цитокінез відбувався, як і звичайно, з формуванням фрагмопласту при участі апарату Гольджі та ендоплазматичного ретикулуму [229].

Певні відмінності відмічено в ультраструктурі клітин апікальної меристеми коренів проростків гороху, що перебували 7 та 18 діб в умовах мікрогравітації [37, 153]. У 7-добових проростків гороху в клітинах периблеми на рівні двох-трьох-шарового кореневого чохлика збільшувалися щільність матриксу та кількість крист мітохондрій, а також відмічено зміни дистального полюсу диктіосом [37]. Вакуолізація клітин меристеми у 7-добових рослин була подібна до такої контрольних зразків, але значно прогресувала у 18 добових рослин в умовах мікрогравітації. Набряклі мітохондрії описані в клітинах меристеми коренів *V. radiata* після 8 діб космічного польоту [229]. У *Ітраtiens balsamina* продемонстровано наявність в клітинах меристеми коренів великих мітохондрій незвичайної форми, в яких ступінь щільності матриксу та кількість крист значно варіювали, після 13 діб космічного польоту. В електрон-прозорих ділянках мітохондрій виявлялися фібрили ДНК [38, 156].

Структура зони диференціювання коренів 28-добових рослин гороху та 14-добових рослин цибулі після космічного польоту, а також повітряних коренів орхідей, що перебували 110 та 171 діб в умовах мікрогравітації на орбіті, була подібна до такої у синхронному наземному контролю [2, 49]. Відмічено певне інгібування лінійного та радіального росту повітряних коренів орхідей. Зменшення діаметру відбувалося за рахунок редукції розмірів клітин паренхіми. В умовах мікрогравітаціїї також зменшувалася довжина зони розтягу у проростків хріниці порівняно з наземним контролем та зразками в центрифузі при 1-g в космічному польоті [181]. Тому формування ризодерми, тобто утворення кореневих волосків, в умовах мікрогравітації починалося на меншій відстані від центру спокою [181]. При тривалішому впливі мікрогравітації, діяльність меристеми зупинялася раніше, ніж в контролі, та апекси коренів того ж віку, що в контролі, містили тільки диференційовані клітини з великою центральною вакуоллю [37, 46]. Зняття апікального домінування приводило до формування численних бічних коренів у багатьох досліджуваних видів рослин [120, 181].

1.3. Цитоскелет рослинних клітин

Цитоскелет – сітка філаментних білків, що утворена мікротрубочками, філаментами, проміжними філаментами, акти новими а також асоційованими з нею білками [64]. Основна роль цитоскелету у рослинній клітині – організація цитоплазми і забезпечення клітинного поділу [219, 232]. Цитоскелет рослин складається з двох основних видів філаментних структур: мікротрубочок (MT), які побудовані i3 субодиниць гетеродимерного білка тубуліну і мікрофіламентів (МФ), утворених субодиницями білка актину [3, 107]. Асаційовані з мікрофіламентами та мікротрубочками білки регулюють їхні функції і з'єднують елементи цитоскелету як між собою, так і з іншими клітинними структурами.

Динамічність цитоскелету є важливою рисою для рослинних клітин, які через наявність жорсткої клітинної стінки позбавлені рухливості та реагують на дію зовнішніх стимулів швидкими перебудовами елементів цитоскелету. Припускається, що елементи цитоскелету можуть виступати у ролі сенсорів сигналів різного типу [33].

1.3.1. Мікрофіламенти та їхня роль у рослинній клітині

Актиновий цитоскелет представляє собою високодинамічну сітку, утворену мікрофіламентами і асоційованими з ниии білками. МФ формуються при полімеризації мономерного глобулярного білка актину (Gактин, 42 кДа [95]. Орієнтація актинового цитоскелету в певний мірі корелює із формою клітин: в прозенхімних клітинах (провідна тканина, кореневі волоски, пилкові трубки, гіфи грибів) мікрофіламенти групуються в субкортикальні пучки, з'єднані із периферійною сіткою тонших пучків груп МФ; обидва ці елементи орієнтовані вздовж осі клітин. В паренхімних клітинах (клітини ендосперму) елементи актину, здебільного розташовані без певної орієнтації [178].

Одна з характерних рис актинового цитоскелету – його надзвичайна чутливість до впливу зовнішніх чинників. Як вважають, зміни форми і функцій актинового цитоскелету регулюються сигнальними шляхами [139, 220]. Таким чином, актиновий цитоскелет може виступати у ролі важливої ланки в механізмі передачі сигналів. Про сигнальні механізми за допомогою актинового цитоскелету свідчить зв'язок МФ з рецепторами інтегринового типу. Так, відомо, що в клітинах тварин нуклеація МФ відбувається в місцях фокальних адгезивних контактів. Це мембрано-асоційовані комплекси, які зв'язують між собою зовнішню поверхню клітин, плазматичну мембрану та актиновий цитоскелет. Фокальні адгезивні контакти опосередковують адгезію клітини до субстрату і складаються із рецепторів інтегринового типу, які вмонтовані в плазматичну мембрану. Гомологи інтегрину знайдені і в рослинах [138, 169]. Вважається, що інтегрини зі зовнішньої сторони мембрани мають зв'язок з клітинною стінкою, а зі внутрішньої сторони мембрани асоційовані з комплексами, які містять талін, вінкулін, актинін та інші білки (або їх аналоги у рослинах). Ці білки зв'язані з актиновим цитоскелетом [78] і можуть брати участь у передачі механічного сигналу [132, 242]. Доказом цього є той факт, що багато із зв'язаних з актином білків мають сайти з'єднання з фосфоінозитидами, і, скоріше за все, є мішенями сигнальних шляхів [220]. Слід зауважити, що деталі участі МФ у передачі сигналів все ще невідомі.
1.3.2. Тубіліновий цитоскелет рослинних клітин

Мікротрубочки (МТ) – складаються з гетеродимерного білка тубуліну, який має α і β субодиниці, вагою 55 кДа кожна. Об'єднуючись, тубулін створює лінійні ланцюги – протофіламентами; 13 профіламентів утворюють циклічний комплекс – МТ. Цей комплекс є полярною динамічною структурою з (+) та (-)-кінцями. Збір тубуліну в МТ відбувається в цитозолі в присутності ГТФ та іонів Mg²⁺. До (+)-кінця постійно приєднується нові молекули тубуліну (полімеризація), в той час як на (-)- кінці спостерігається їх від'єднання (деполімеризація) [61]. У більшості тваринних клітин центросома, яка складається з пари центріолей слугує маркером для приєднання аморфного періцентріолярного матеріалу, який є місцем нуклеації мікротрубочок на стадії інтерфази та мітозу. Оскільки в клітинах вищих рослин центріолі відсутні, сайти нуклеації мікротрубочок, що містять у-тубулін, отримали назву "центр організації мікротрубочок" (ЦОМт) [84]. МТ виконують свої специфічні функції у клітинах через різний рівень організації. Виявляються п'ять типів пучків: кортикальні, препрофазна мітотичне поділу, стрічка, веретено фрагмопласт та радіальні (ендоплазматичні) пучки. Кожен з цих типів утворюється та змінює один одного на певній стадії клітинного циклу. Існують дані про те, що різні форми МТ не однаково реагують на дію певних чинників. Так, високий рівень зовнішньо клітинного кальцію і низькі температури викликають вибіркову і швидку дезінтеграцію ендоплазматичних МТ [57], а висока концентрація іонів кальцію та ураження грибковою інфекцією, навпаки, спричинює деполімеризацію кортикальних МТ [195]. На динаміку МТ (процеси полімеризації/деполімеризації) впливають білки, асоційовані з мікротрубочками (БАМ) [111]. БАМ ділять на три групи: структурні – регулюють організацію, динаміку росту тубулінового цитоскелету та при виділенні МТ завжди спостерігаються в їх фракції; моторні – контролюють

напрям росту; та ті що взаємодіють з МТ (MT-interactingproteins). Роль останніх БАМ до кінця не встановлено [213]. Детальні механізми зміни розміщення МТ ще не визначені, проте показано, що, як правило, зміна орієнтації позначається на ростових показниках, а саме на зміні темпів і напряму росту клітин [228].

1.3.3. Гравічутливість цитоскелету рослинних клітин

Значна увага приділяється цитоскелету в пошуках механізмів гравічутливості клітин, як припускається, цитоскелет виконує роль індикатора клітинних функцій, що визначають гравічутливість організмів [27, 150, 151, 152, 155, 157, 159, 161]. Згідно концепції гравітаційного гомеостазу, яка була запропоновала Нейсом у 1983 році, стабільне положення і оптимальна орієнтація клітин в гравітаційному полі визначається станом механічної напруги внутріклітинних елементів (мікротрубочок і мікрофіламентів) і цілісністю клітинних мембран, на підтримку яких йде витрата енергії [192]. Цитоскелет, його механічні характеристики, функціональна активність, біохімічні властивості і ультраструктурная організація розглядаються в якості інтегрального неспеціалізованого гравісенсора клітини [42]. Припускається, що полярна організація статоцитів, яка проявляється в скупченні ендоплазматичного ретикулуму в дистальному, а ядра – в проксимальному полюсі клітини підтримується елементами цитоскелету [125, 222, 248]. Елементи залучені підтримці структурної полярності цитоскелету також V гравічутливих клітин з верхівковим ростом [68]. Незалежно від виду рослин статоліти в статоцітах завжди седиментують в напрямі дії гравітаційного вектора на фізично нижню стінку клітини. Встановлено, що в процесі седиментації ключову роль відіграє взаємодія статолітів з актиновими філаментами. Так, наприклад, при обробці клітин цитохалазіном в наземних умовах відмічено порушення руху статолітів до дистальної клітинної стінки статоцитів [124]. Крім того, застосування цитохалазинів збільшувало в три рази швидкість осідання амілопластів при інверсії коренів і перешкоджало утворенню вигину при гравістимуляції [222].

Вважається, що МФ закріплюють статоліти на цітоплазматичній мембрані, що забезпечує "підвішений" стан цих органел [247]. Динамічний стан в сітці F-актину дозволяє статолітам при седиментації не контактувати безпосередньо з мембранами ЕР, розташованими нижче, і завдяки цьому посилювати гравічутливість клітини. Переміщення статолітів змінює рівень напруги в МФ і сприяє передачі сигналу про седиментацію на рецептори цитоплазматичної мембрани або ЕР [208]. На поверхні статолітів в клітинах колумели і різоїдах харових водоростей знайдено білок міозин [69, 252]. Цей факт дозволяє вважати, що взаємодія актину та міозину забезпечує рухливість статолітів [208]. На підставі експериментів в умовах реальної мікрогравітації висунуто припущення, що сила, яка виробляється актинміозиновою взаємодією, протидіє процесу седиментації, викликаному гравітаційною силою, і клітини, що сприймають гравітацію, переробляють гравітаційний стимул через зміну натягу в межах сітки актин-міозин [72, 133]. Вважається, що цій силі натягу протидіють міцніші структури, наприклад МТ і цитоплазматична мембрана. Зміна орієнтації рослини щодо напряму вектора гравітації призводить до зміни розташування статолітів, внаслідок чого виникає нове положення рівноваги, тобто змінюється баланс між силою гравітації та силою філаментів, що їй протидіє. Сигнал про зміну натягу філаментів передається на ЕР і цитоплазматичну мембрану, викликаючи події, що ведуть до активації механочутливих Ca²⁺ каналів. Активація цих каналів веде до збільшення концентрації іонів Ca²⁺ в цитоплазмі, що і запускає сигнальні процеси [42].

Роль іншого структурного компонента цитоскелету – тубулінових микротрубочок – в реакціях гравірецепції до кінця не з'ясовано. Відомо, що

статоцити вищих рослин взагалі позбавлені популяції ендоплазматичних мікротрубочок, характерної для решти клітин кореня, у зв'язку з чим не передбачається безпосереднє залучення тубулінового цитоскелету в процес гравірецепції [42].

Для клітин ростових зон кореня при вертикальному рості характерне певне розміщення елементів цитоскелету. В клітинах меристеми актинові мікрофіламенти не мають певного розташування [65, 200], на відміну від зони розтягу, де вони набувають орієнтацію більш-менш паралельну по відношенню до поздовжньої вісі кореня [65, 200, 227]. При гравістимуляції коренів в клітинах меристеми орієнтація мікрофіламентів не змінюється, в той час як в зоні розтягу відбуваються її певні зміни, ступінь яких залежить від терміну впливу гравітації [65, 200].

Мікротрубочки в клітинах інтактних рослин також характеризуються певним розміщенням. При вертикальному рості тубуліновий цитоскелет в клітинах меристеми кореня має перпендикулярну орієнтацію по відношенню до поздовжньої осі кореня, яка змінюється на поздовжню в кінці зони розтягу. При гравістимуляції кореня перебудови в цитоскелеті відбувається в основному в зоні розтягу, що пов'язано із змінами росту клітин [23, 64, 227]. За даними літератури в умовах реальної та модельованої мікрогравітації, зміни орієнтації цитоскелету стосуються, в основному, мікротрубочок.

Дослідження організації ендоплазматичних та кортикальних мікротрубочок допомогою конфокальної мікроскопії в за клітинах епідермісу і кори різних ростових зон коренів проростків В. гара та A. thaliana в стаціонарних умовах та при кліностатуванні виявило зміни в організації кортикальних мікротрубочок в дистальній зоні розтягання коренів [23, 226, 227]. На відміну від контролю, де кортикальні мікротрубочки розташовані паралельними рядами поперечно до довгої вісі кореня, кліностатуванні спостерігалася коротки при поява та

дезорієнтованих кортикальних мікротрубочок. Одночасно відбувалося збільшення кортикальних актинових мікрофіламентів, що може відбуватися внаслідок трансформації G-актину в F-актин [145]. Ці дані узгоджуються із збільшенням відносного вмісту іонів кальцію в цих клітинах у порівнянні з контролем, оскільки добре відома роль іонів Ca²⁺ у полімеризації актину. Припускається, ЩО В умовах кліностатування взаємна залежність функціонування актинових та тубулінових елементів цитоскелету більш чітко виявляється та забезпечує стабільність клітинного росту В несприятливих умовах [23, 50, 227].

1.4. Ауксин та його роль у гравітропічній реакції кореня

1.4.1. Розподіл ауксину в тканинах рослин

Ріст та розвиток багатоклітинних організмів контролюється сигнальними молекулами, які передаються від однієї клітини до іншої. У тварин такими сигнальними молекулами є білки, пептиди або ж гормони. Розвиток рослин, переважно, регулюється фітогормонами [83], які за хімічною структурою поділено на п'ять основних груп: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизини та етилен. До фітогормонів приєднують ще речовини, що за своєю дією подібні фітогормонам. Це – брасиностероїди, жасмонова кислота, саліцилова кислота, олігосахарини, пептиди, поліаміни. фузикокциноподібні сполуки [97]. Природний ауксин – індоліл-3-оцтова кислота (IOK) – є похідним індолу та бере участь в регуляції різних процесів життєдіяльності рослин, в тому числі морфогенезі [1]. Відомо, що ІОК впливає на поділ клітин [68], їхній ріст розтягом, диференціювання [79], а також відповідає за тропізми рослин, що є ростовими реакціями [116]. Синтез ЮК відбувається в листкових примордіях, молодих листках та апікальній меристемі пагона [91]. ЮК рухається від місця синтезу у базипетальному напрямі, створюючи певний градієнт, який спостерігається у всіх вегетативних органах рослин [136]. Перенос ІОК через клітини здійснюється спеціальними білками-переносниками, які розташовуються на цитоплазматичній мембрані та належать до родин AUX/LAX – відповідають за вхід ІОК у клітину [176]; PIN, ABC/MDR/PGP – забезпечують вихід ІОК⁻ з клітин [113].

Геном рослин *A. thaliana* кодує один AUX1 білок та три AUX1подібних – LAX1, LAX2, LAX3, ідентичність яких з AUX1 складає 80% [55, 197]. Білки родини AUX, що вперше були ідентифіковані завдяки стійкості до дії синтетичного ауксину 2,4-Д [174], є трансмембранними, як і LAX [235]. Показано, що у *A. thaliana* AUX1 має 11 сегментів, N-кінець яких розташовується всередині клітини, а C-кінець – зовні [237].

PIN гени кодують 10 білків [190]. Білки родини PIN асиметрично розташовуються на цитоплазматичній мембрані (PIN1, PIN2, PIN3, PIN7) і також виявляються у мембранах ЕР (PIN5, PIN6, PIN 8) [108, 188]. Припускається, що білки мембран ЕР регулюють транспорт ауксину між ЕПР та цитозолем, беруть участь у регуляції внутріклітинного руху ауксину [188, 204, 250].

У мікросомальних фракціях разом з білками, які відповідають за клітинний транспорт та ендоцитоз PIN1 та PIN2, також виявлено фосфоглікопротеїни (PGP), які належать до транспортних білків. Тому припускається їхня участь у стабілізації комплексів білків-переносників та транспорті ауксину [62].

Функціонування білків-переносників у рослинах є органо-, та тканинозалежним. Так білки родини PIN синтезуються і функціонують вже від моменту перших поділів зиготи (PIN7). PIN1 виявляється у зародку, коли він складається із 16 та 32 клітин; PIN4 спостерігається у клітинах гіпофізу, а PIN3 – у майбутніх клітинах колумели [182]. У коренях транспорт ауксину підтримується AUX1, локалізацію якого виявлено в епідермісі, клітинах центрального циліндру, периферичних клітинах кореневого чохлика та колумелі [210, 236, 238]. Із використанням *IAA2:GUS* у мутантів *aux1* продемонстровано зміни у розподілі ауксину, який рухався від апексу кореня до дистальної зони розтягу [210], що вказує на важливість білків AUX1 у транспортуванні ауксину від місця гравірецепції до зони відповіді [238]. PIN3 симетрично локалізований на цитоплазматичній мембрані. Під час гравістимуляції кореня зазначається його переміщення в цитоплазматичній мембрані на фізично нижній бік кореня [109].

Отже, полярний транспорт ауксину в рослинах підтримується та забезпечується білками-переносниками, що належать до різних родин. Їхнє сумісне функціонування у різних тканинах та органах забезпечує нормальне проходження процесів морфогенезу.

1.4.2. Розподіл ауксину в умовах мікрогравітації

Як вже зазначалося, умови мікрогравітації кординально відрізняються від тих, які існують на Землі, та викликають зміни ультраструктури клітин і метаболізму [154]. Використання зміни рослин методів газової хроматографії та радіоізотопного мічення не виявило статистично достовірної різниці у вмісті вільної та зв'язаної ІОК в проростках Z. mays, які перебували п'ять діб в умовах космічного польоту, порівняно з наземним контролем [221]. Показано, що короткотривалий термін дії мікрогравітації не викликав істотні розбіжності у вмісті ауксину в проростках у контролі та експерименті [58]. Зменшення вмісту ауксину виявлено у вегетативних органах видів родини Orchidaceae після 2-х місячного кліностатування [49, 82].

На теперешній час у дослідженнях ауксину використовуються трансгенні рослини, що дає можливість проаналізувати накопичення ЮК не тільки в органі, але й в окремих його частинах. На прикладі трансгенних рослин *A. thaliana* DR5rev::GFP показано, що в умовах симульованої мікрогравітації осідання амілопластів і перерозподіл ауксину (полярний транспорт) не відбувалися [251]. Відмічено накопичення ауксину в центрі спокою, клітинах колумели та периферичних клітинах кореневого чохлика. Кількісний аналіз ауксину у центрі спокою коренів трансгенних рослин *A. thaliana* TAA::TAA1-GFP, які перебували 5 та 8 днів на орбіті, показав розподіл GFP, який не ввідрізнявся від розподілу в коренях, що росли вертикакльно у наземному контролі [106].

1.5. Морфогенетичний потенціал рослинних тканин in vitro

1.5.1. Морфогенез рослин in vitro

Культура рослинних тканин *in vitro* дозволяє отримувати інтактні рослини із окремих клітин, тканин і органів на живильних середовищах. Основою цього метода є унікальна властивість рослинних клітин – тотипотентність, тобто здатність клітини реалізувати наявну генетичну інформацію та дати початок новому організму. Рослинним клітинам притаманна властивість за певних умов вдруге диференціюватися і під впливом зовнішніх чинників вибирати той чи інший шлях морфогенезу. Морфогенез є складним процесом, регуляція якого здійснюється на клітинному, тканинному і організмовому рівнях. В культурі *in vitro* зовнішні чинники: освітлення, температура, газове середовище, яке утворюється під час культивування тканин та органів [131], склад живильного середовища, тип експланта, його орієнтація на середовищі [60, 177] та внутрішній гормональний баланс експланта [112] визначають процеси ділення, розтягу,

диференціювання, старіння і загибелі клітин [6]. Таким чином відбувається формування нових тканин і органів; відповідні процеси носять назви, що відображають суть морфогенезу – гістогенез, гемогенез (утворення листків або пагонів), ризогенез, флоральний гемогенез (утворення квітки та/або її окремих частин), соматичний ембріогенез [32].

1.5.2. Ризогенез in vitro як різновид органогенезу

Ризогенез (утворення коренів) *in vitro* є сукупністю складних, різних за біологічною природою процесів, які включають біохімічні, гістологічні та фізіологічні перебудови [48]. Утворення коренів *in vitro* може відбуватися як на вегетативних органах рослин, їхніх окремих частинах (експлантах) [22], так і на поверхні калусу [39, 217] – гетерогенної інтегрованої системи, яка утворюється під час проліферації клітин на поверхні окремих структур рослинного організму [8]. За G.-J. De Klerk (1997) формування коренів іп vitro, так само як ембріодів та пагонів, складається з декількох фаз: придбання компетенції, індукції та реалізації. Перша фаза відповідає дедиференціюванню клітин; друга є чутливою до дії органогенних чинників, таких як регулятори росту, що обумовлюють формування окремих органів і є критичними у цей період; третя – розгортання програми диференціювання [92]. Відомо, що для ризогенезу визначальним є співвідношення ауксинів та цитокінінів [41]. При більших концентраціях цитокінінів по відношенню до пагонів або ауксинів відбувається утворення бруньок. Додавання екзогенного природного ауксину або його синтетичних аналогів – індоліл-3масляної кислоти (ІМК) та α-нафтилоцтової кислоти (НОК), які вносять окремо або у різних комбінаціях індукує утворення коренів [21]. Так корені утворювалися при культивуванні фрагментів осі суцвіття *I. sibirica* на живильному середовищі МС з 4 мкМ НОК, 4 мкМ БАП та 4 мкМ НОК і 5 мкМ БАП [47]. Відмічається, що не всі ауксини можуть однаково

стимулювати розвиток коренів *in vitro* певної рослини. У міни троянд найбільшу кількість коренів на один мікропагон спостерігалося на живильному середовищі МС з додаванням НОК та ІОК у концентраціях 1.0 г/л. При збільшенні НОК до 1,5 г/л виникали хлороз і деформація листків [35]. На листкових експлантів Withania somnifera утворення коренів відбувалося лише на середовищі МС повного складу з додаванням ІМК у концентрації 4 мг/л, в той час як ІМК, ІОК та НОК у різних концентраціях на серадовищах 1/4 та 1/2 МС не давали позитивного результату [212]. Культивування калусної тканини з листків троянди сорту "Baby Katie" на середовищі МС із НОК різної концентрації забезпечувало найбільше утворення коренів лише при 11 та 27 µМ цього регулятора росту [89]. В літературі зазначено, що специфічна реакція рослинних тканин на дію ауксинів різної хімічної будови визначається здатністю поглинати та метаболізувати ці сполуки [22]. Є дані, що утворення коренів можна індукувати на безгормональних середовищах, що містять макро-, та мікроелементи у кількості від 1/10 до 1/2 частин від їхнього стандартного пропису [32]. Позитивні результати демонструються на живильних середовищах 1/10 та 1/2 МС на прикладі листкових експлантів A. thaliana та видів Populus: P. alba, P. davidiana, P. simonii та P. tomentosa [88, 99]. Зазначається, що морфогенез коренів на листкових експлантах пов'язаний із накопиченням ендогенного ауксину у базальній частині черешка [88, 99]. Культивування калусу на середовищах без ауксинів [217] та середовищі МС без регуляторів росту з низькою концентрацією макро, - та мікроелементів [158] також демонструвало позитивний результат щодо утворення коренів.

Слід зазначити, що при додаванні екзогенних регуляторів та за їхньої відсутності на листкових експлантах утворення коренів відбувається подібним чином. Встановлено, що при культивуванні середнього сегмента листка *Beta vulgaris* на середовищі МС з НОК (30 мг/л) виявлялися клітини з помітним ядром та ядерцем біля провідних пучків та камбію вже через 48

год. На 4-у добу відзначено наявність кореневих зачатків. Показано, що на безгормональному середовищі 1/2 МС в тканинах черешків листків різних сортів тополів на 3-ій день культивування відбувалася активація клітин камбію провідних пучків і на 5-ий день – формування кореневого зачатка [99].

На відміну від листкових експлантів формування коренів у калусі відбувається по всій його поверхні [217]. Зазначено, що органогенез в калусі починається після формування меристематичних центрів росту, коли в паренхіматичних клітинах відбуваються біохімічні зміни, які створюють умови для проходження мітозів [119]. Показано, що культивування калусу *Fagopyrum esculentum* на середовищі без регуляторів росту індукувало ембріоїдогенез, гемогенез та ризогенез [217].

1.5.3. Використання культури *in vitro* в дослідженнях з космічної біології

Використання культури клітин і тканин *in vitro* дає змогу вивчати вплив реальної та модельованої мікрогравтації на живі об'єкти, позбавлені організменних кореляцій. Перші космічні експерименти з культурою клітин *Daucus carrota* показали можливість прояву тотипотентності клітин в умовах мікрогравітації, про що свідчило утворення ембріоїдів, які суттєво не відрізнялися від таких в синхронних наземних експериментах [162]. Наступні експерименти із культурами протопластів *B. napus* і *D. carota* мали на меті з'ясувати вплив мікрогравітації протягом 14 діб на регенерацію клітинної стінки протопластами, ділення клітин і утворення мікрокалусів [43, 142, 214]. В умовах космічного польоту уповільнювався процес регенерації клітинної стінки і таким чином утворення мікрокалусів, в клітинах яких було описано певні зміни від наземного контролю в ультраструктурі пластид і мітохондрій, біохімічному складі клітинної стінки, а також збільшення інвагінацій цитоплазматичної мембрани. Відмічено зменшення вмісту полісахаридів в клітинних стінках калусних культур *Nicotiana tabacum*. і *N. rustica*. Останнім часом калусна культура *A. thaliana* використовується в космічних і кліностатних експериментах для досліджень впливу зміненої гравітації на транскриптом і протеом рослинних клітин [122, 253]. Є лише одне повідомлення щодо ризогенезу в калусній культурі *A. thaliana* в умовах кліностатування та космічному польоті [198], хоча дослідження в цьому напрямі заслуговують на увагу для вирішення питань гравічутливості та гравізалежності процесів морфогенезу, ділення та диференціювання рослинних клітин. Як добре відомо, встановлені закономірності базуються на даних вивчення у ембріональних коренях проростків із насіння, що утворилося в умовах гравітаційного поля. Постає питання щодо проходження цих процесів в коренях, які формуватимуться *de поvo* в умовах космічного польоту або кліностатування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт дослідження

Для досліджень обрані рослини Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0), scr мутант, у якого одночасно формується як один так і два шара кори, тобто проявляється мозаїчна структура [96, 172]; та трансгенні рослини: GFP-FABD2 (конструкція дозволяє прижиттєве дослідження актинового цитоскелету) [249], GFP-MAP4 (прижиттєве тубулінового цитоскелету) [171], DR5::revGFP (прижиттєве дослідження дослідження розподілу ауксин-залежного репортерного білка) [114]. Стерилізацію насіння здійснювали 70 %-вим розчином спирту та 12 %-вим гіпохлориту натрію («Білизна», Україна) з п'ятиразовим розчином промиванням стерильною дистильованою водою. Перед культивуванням насіння стратифікували при температурі +4 °С протягом 3 діб. Матеріал вирощували в скляній посудині об'ємом 250 мл на середовищі Мурасіге та Скуга (MC) при температурі 22–24 °С із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 93 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ протягом 21-ї доби.

2.2. Методи

Культура тканин *in vitro*. На 22-гу добу культивування від рослин відділяли сім'ядольні та справжні листки розетки разом із черешками, завдовжки 0,3–0,5 см. Потім відрізали верхівки листків завдовжки 0,1–0,2 см і переносили листки на поживне середовище MC, що містило 1/10 частину мінеральних солей, без вітамінів і гормонів. Для отримання калусної тканини на сім'ядольних листках і листках розетки 22-добових рослин дикого типу та *scr* мутанта, робили насічки. Матеріал переносили на модифіковане середовище MC: гліцин – 3 мг/л, 2,4-Д – 1 мг/л, 0,05 %-вий кінетин, 2 %-ва глюкоза та 0,7 %-вий агар [158]. Тривалість культивування – 30 діб. На 31 добу отриману калусну тканину переносили на середовище 1/10 MC для індукції ризогенезу. Культивування листкових експлантів і калусної тканини здійснювали при температурі 22– 24°C із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 7,4–9,3 мкмоль·м⁻²·c⁻¹ протягом 12–14 і 20 діб.

Моделювання мікрогравітації. Чашки Петрі з експлантами, по одній, поміщали в металеві контейнери циліндричної форми (d = 10, l = 10), одна з основ яких була відкритою. Спосіб розміщення чашок показаний на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Схематичне розміщення чашок Петрі з експлантами в металевих контейнерах: а – пінополіуретан, б – шар чорного картону, в – чашка Петрі, г – парафілм.

Частину контейнерів встановлювали горизонтально (контроль), інші закріплювали на повільному горизонтальному кліностаті (2 об / хв). Кліностат – пристрій, який застосовується для обертання об'єктів головним чином навколо їх поздовжньої осі. У більшості випадків вісь обертання горизонтального кліностату встановлюється під кутом 90^{0} до вертикалі, у зв'язку з чим вектор сили тяжіння під час всього часу обертання діє впоперек головної осі рослини. Обертання біологічного об'єкту на горизонтальному кліностаті при певному ритмі забезпечує постійну реорієнтацію об'єкту по відношенню до вектора гравітації, що тим самим запобігає сприйняттю гравітаційного стимулу і реалізації відповіді на нього [154].

Оскільки кліностат обертається в гравітаційному полі, то кліностатування повністю не усуває вплив гравітації, абсолютна величина гравітаційного вектора і параметри зовнішнього середовища зберігаються.

У нашій експериментальній роботі застосовувся режим два оберти на хвилину, оскільки доведено, що саме повільне кліностатування дає найбільшу подібність структурно-функціональних і біохімічних змін в об'єктах, пророщених в умовах реальної мікрогравітації і кліностатування [37]. Повільне кліностатування має стабільну репутацію надійного засобу для відтворення такої важливої характеристики мікрогравітації, ЯК відсутність постійної орієнтації гравітаційного Однак вектора. кліностатування не в змозі зняти скалярні ефекти гравітації, такі як гідростатичний тиск і поверхневий натяг, тому на сьогоднішній час вважається, що даний метод лише частково відтворює біологічні ефекти мікрогравітації, які викликані відсутністю гравітаційного вектора [154]. Незважаючи на такі розбіжності, кліностати широко використовуються для дослідження впливу зміненої сили тяжіння, тому що вони дають можливість проводити експерименти в межах необхідних часових параметрів і

51

випробовувати велику кількість аналітичних підходів, які необхідні для здійснення космічних експериментів.

Світлова мікроскопія. Черешки листків та отримані в культурі іп vitro корені фіксували у 2,5 %-вому глютаровому альдегіді на 0,1 М кокодилатному буфері (pH=7,2) при кімнатній температурі протягом 3 год, двічі промивали тим самим буфером, дофіксовували 1 %-вим OsO₄ протягом 3 год, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації та ацетоні, заливали в суміш епоксидних смол. Калусну тканину фіксували розчином 2,5 %-вого глютарового альдегіду на 0,1 М кокодилатному буфері (pH=7,2) при кімнатній температурі протягом 3 год, промивали тим самим буфером, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації та толуолі, просочували парафіном [40]. Напівтонкі поперечні та поздовжні зрізи коренів і черешків (0,5-1,0 мкм) отримували на ультрамікротомі MT-XL ("RMR Instruments", США), зрізи калусної тканини (8, 10 мкм) – на санному мікротомі МС-2. Забарвлювали 0,12 %-вим толуїдиновим синім, дослідження проводили на мікроскопі Axioscope ("Carl Zeiss", Німеччина) з цифровою фотокамерою Canon PowerShot A 480. Частоту ризогенезу в культурі *in vitro* визначали як співвідношення кількості калусів або листкових експлантів, що утворили корені, до їх загального числа у відсотках.

Електронна мікроскопія. Корені дикого типу та мутанта, отримані *de novo*, відокремлювали від листового експланта за допомогою пінцета і їхні сегменти, довжиною ~ 1,5 см фіксували в розчині 2,5% глютарового альдегіду на 0,1 М кокоділатном буфері (рН 7,2). Постфіксацію виконували 1% OsO4 на тому ж буфері. Матеріал зневоднювали за загальноприйнятою методикою в спиртах висхідної концентрації та ацетоні, заливали в суміш епон-аралдіт [67]. Зрізи (50-60 нм) виготовляли на ультрамікротомі MT-XL ("RMR Instruments", США), поміщали на бленди з підкладкою з формвара, контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю і досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEM 1230 ("Jeol", Японія). Отримані негативи сканували в програмі НР Precisionscan Pro 3.1. На цифрових фотографіях вимірювали парціальні об'єми органел, площу клітин епідерми і товщину клітинних стінок в програмі UTHSCSA ImageTool v. 3.00.

Конфокальна мікроскопія. Візуалізацію мікротрубочок, мікрофіламентів та ауксину в коренях трансгенних рослин здійснювали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM5 Pascal ("Zeiss", Німеччина) з лінзами Plan Neofluar (вихід флюоресценції в області 488 нм, збір флюоресценції в 500-600 нм). Для цього на предметне скло намотували дві стрічки парафілму шириною 3-5 мм, які виконували роль спейсерів. Між стрічками наносили краплю дистильованої води, в яку поміщали корені. Матеріал накривали покривним склом та вивчали під мікроскопом.

Методи статистики. Обробку даних було проведено за допомогою пакетів програм Microsoft office 2007 (Excel 7). Всі отримані числові значення тестували на нормальність розподілу значень у вибірці. Визначення достовірності різниці отриманих даних здійснювали за критерієм Стьюдента (T-test) ($p \le 5\%$) для незалежних вибірок з нормальним розподілом та критерієм Манна-Уітні (U-test) ($p \le 5\%$) для незалежних вибірок з розподілом, що відрізнявся від нормального [59].

РОЗДІЛ З

дослідження моделей ризогенезу *ін vitro* в контролі

3.1. Утворення коренів de novo з калусної тканини

Морфогенетичний потенціал рослин обумовлений специфічною властивістю рослинних клітин – тотипотентністю – здатністю соматичних клітин зберігати повну генетичну інформацію, характерну для зрілого організму та реалізувати її в сприятливих умовах, що забезпечує диференціювання клітин, утворення тканин і органів і розвиток організму в цілому, тобто здатність клітин диференціюватися в інші типи клітин. Ризогенез *in vitro* може йти прямим шляхом, тобто формування органів відбувається безпосередньо з тканин експланту, або непрямим – через калусну тканину.

В наших дослідженнях ми отримували калусну тканину з листків рослин *А. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта. Листки розетки відрізали, робили насічки по переферії і переносили абаксіальною стороною на живильне середовище МС з додаванням 2,4-Д у концентрації 1 мг/л. Листкові експланти культивували при температурі $22-24^{\circ}$ С із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 7,4–9,3 мкмоль·м⁻²·c⁻¹ протягом 30 діб. Видимий калусогенез у *А. thaliana* дикого типу відмічено на 8 добу культивування: відзначено набряк тканин, розрив епідермісу як результат початку неорганізованого росту клітин. Відмічено різні місця утворення калусної тканини: по середині, на верхівках, у базальній частині та по всій поверхні листкових експлантів. У *scr* мутанта видимий калусогенез також відзначали на 8-му добу культивування з різними місцями утворення калусу. Отримані дані засвідчили, що на листкових експлантах дикого типу та мутанта калусогенез відбувається з найбільшою частотою у базальній

частині (табл. 3.1). На 30 добу культивування у двох варіантах калусна тканина була жовто-біло-зеленого кольору, пухкою та легко розпадалася на окремі клітинні агрегати. Отриманий первинний калус переносили у чашки Петрі з живильним середовищем 1/10 MS для індуції ризогенезу. Культивування калусу проводили у темряві при 26°C та 24°C при освітленні 7,4–9,3 мкмоль·м⁻²·c⁻¹ із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) [16].

Таблиця 3.1.

	Частота калусогенезу					
Зона листкового еспланту	Дикий тип (Col–0)	Мутант (<i>scr</i>)				
Верхівка	2,17% (2)	4,31% (5)				
Центральна жилка	35,87% (33)	23,28% (27)				
Базальна частина	45,65% (42)	37,07% (43)				
Вся поверхня	16,31 % (15)	35,34% (41)				
Загальна частота	100% (92)	100% (116)				

Частота утворення калусу на листкових експлантах A. thaliana (у відносних (%) та абсолютних значеннях.

На світлі у дикого типу поява коренів спостерігалася на 8 добу культивування. Колір калусу жовто-зелений, відзначено наявність трихом. У темряві індукувати ризогенез не вдалося навіть при довготривалому культивуванні (більше 30 діб), колір калусу від світло- до темнокоричневого, трихоми на його поверхні не спостерігалися. У мутанта процес ризогенезу відбувався подібним чином. Появу коренів відзначали на 8-му добу культивування на калусах жовто-зеленого коліру з трихомами. Калус, який культивувався в темряві мав світло,- або темно коричневий колір, видимий ризогенез не спостерігався. Тому подальші експерименти з індукції ризогенезу проводили на світлі.

За нашими даними успішна індукція ризогенезу залежала не тільки від умов культивування (світ або темрява) але й від розміров самої калусної тканини. У *А. thaliana* дикого типу з 34 калусів ризогенез відмічався лише у 13, а у мутанта з 37 тільки у 11. Встановлено, що корені у дикого типу та мутанта утворювалися на калусах, середний об'єм яких був 0,72 см³, тобто довжина, ширина та висота дорівнювали 1,2; 1 та 0,5 см відповідно. Корені утворювалися по всій поверхні калусів, а їхня кількість варіювала від 2–7 до 69. Частота ризогенезу була вищою у мутанта і складала 41,2 %, тоді як у дикого типу – 32,4 %. На калусах, об'єм та розміри яких були меншими або більшими ризогенез не спостерігався [16].

При цитоморфологічному дослідженні отриманих калусних культур дикого типу та мутанта нами були виявлені наступні типи клітин: 1) паренхімні, різні за формою і розмірами; 2) меристематичні, порівняно дрібні, ізодіаметрічної форми. При проведенні досліджень також були виявлені осередки гистогенеза – трахеєподібні елементи (рис. 3.1). Морфогенні осередки виникали на периферії калусної тканини на великій відстані або дуже близько один до одного і мали виражену зональність: центральну та периферичну зони (рис. 3.2, а). Зачаток кореня формувався саме з клітин центральної зони (рис. 3.2, б) [16].

В літературі зазначено, що для індукції калусу на первинних експлантах найчастіше використовують синтетичний ауксин 2,4-Д. Для широколистних рослин загальна концентрація 2,4-Д варює від 1,0 до 3,0 мг/л, в той час як для однодольних вона значно вища – 2,0-10 мг/л. [32]. Для індукції калусогенезу з листків *А. thaliana* кількість 1,0 мг/л2,4-Д є достатньою [158]. В нашій роботі продемонстровано найбільшу частоту калусогенезу у базальній частині листкового експланту. Вірогідно, що такий

ефект спричиняють 2,4-Д живильного середовища та ендогенний ауксин експлантів.



Рис. 3.1. Фрагмент поздовжнього зрізу калусної тканини *scr* мутанта. 1 – трахеєподібні елементи, 2 – паренхімні клітини, 3 – меристематичні клітини, 4 – морфогенний осередок (світлова мікроскопія х200).



Рис. 3.2. Морфогенний осередок (а) та кореневий зачаток (б) у калусній тканині *А. thaliana* дикого типу: 1 – центральна зона, 2 – периферична зона, 3 – зачаток кореня (світлова мікроскопія, х 980)

За даними імунохімічного аналізу, проведеного Dong із співавторами [99], після перенесення листків на середовище 1/2 МС відмічено накопичення ендогенної ІОК у середній та базальній частині листків. Є відомості, що найбільш успішний процесс утворення калусу досягався шляхом одночасного застосовування ІОК та 2,4-Д [32]. Морфогенез є складним процесом, регуляція якого здійснюється на клітинному, тканинному і організмовому рівнях. Під час морфогенезу взаємозалежні чинники: освітлення, температура, газове середовище, яке утворюється під час культивування тканин та органів [131], склад живильного середовища [60, 177] та внутріщній гормональний баланс [112] визначають процеси ділення, розтягу, диференціації, старіння і загибелі клітин [6]. Так середовище МС є універсальним для рослин, а зменшення рівня концентрації мікроелементів 1/10 не заважає ризогенезу, і може сприяти зниженню рівня ЛО гіпергідратації [32]. Саме В такій модифікаціі продемонстровано застосування МС 1/10 для ініціації коренеутворення в калусній тканині [158]. Нами показано залежність морфогенетичного процесу в калусі A. thaliana дикого типу та scr мутанта від освітлення. Його незначна інтенсивність сприяє формування коренів, в той час як темрява блокує органогенез. Така закономірність показана для багатьох рослин при культивуванні in vitro [32]. Також продемонстровано кореляційний зв'язк морфогенезу з появою трихом на поверхні калусної тканини. Наші дані узгоджуються з даними Н. І. Румянцевої та співавторів [217] щодо високої морфогенної активності калусів Fagopyrum esculentum Moench., яка чітко пов'язана трихом була формуванням їхній поверхні 3 на при субкультивуванні на поживному середовищі без додавання 2,4-Д або за низкої концентрації цього регулятора росту. Припускається, що трихоми всмоктують воду та поживні речовини. Також можливо, що вони секретують різні речовини: жири, полісахариди, білки, флаваноїди і т. п. Цитоморфологічні дослідження засвідчили наявність морфогенних

осередків на переферії калусної тканини *А. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта.

В нашій роботі показано подібність процесів ризогенезу в калусах *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта. Встановлено, що калуси *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта об'ємом 0,72 см³, тобто довжина, ширина та висота якого дорівнювали 1,2; 1 та 0,5 см були морфогенним при культивуванні на світлі. Характерною ознакою здатності до ризогенезу була наявність трихом на його поверхні. Корені формувалися на периферії калусу з морфогенних осередків, які мали різний ступінь щільності у розміщенні. Загальний термін формування коренів від 8 діб.

3.2. Модель ризогенезу з листкових експлантів

Ендогенні ростові речовини, або фітогормони, регулюють процеси росту і розвитку рослин. Культури тканин і органів *in vitro* потребують введення у середовище екзогенних регуляторів росту. В той же час, вважається, що ризогенез потребує наявності лише ауксину, або ауксину в концентраціїї набагато вищій, ніж цитокініну [32].

В наших дослідженнях ми індукували ризогенез з листкових експлантів рослин *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта. Листки розетки та сім'ядолі відрізали разом із черешками завдовжки ~ 0,2 см. Потім відрізали верхівки листків завдовжки ~ 0,1–0,2 см і переносили експланти на живильне середовище МС, що містило 1/10 частину мінеральних солей, без вітамінів і гормонів. Листкові експланти культивували при температурі 22–24°C із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) та освітленні 7,4–9,3 мкмоль·м⁻²·c⁻¹.

Було проаналізовано 318 листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу. Появу коренів на черешках листкових експлантів відзначено на 5–6 добу культивування. Частота ризогенезу складала 61,3 %. Кількість коренів на листковому експланті варіювала від 1–2 до 5–6. При культивуванні сім'ядольних листків ризогенез індукувати не вдалось.

У *scr* мутанта проаналізовано 326 експлантів. У мутанта, так само як у дикого типу, появу коренів на черешках листкових експлантів відзначено на 5–6 добу культивування. Проте частота ризогенезу була меншою і складала 42,9 %. При культивуванні сім'ядольних листків ризогенез індукувати не вдалось.

Найбільша частота утворення коренів у дикого типу та мутанта спостерігалась на експлантах із справжніх листків довжиною 0,9–1,2 см. У експлантів більшої або меншої довжини здатність до ризогенезу зменшувалась (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Порудина	Частота ризогенезу				
довжина листкового експланта (см)	Дикий тип (Col–0)	Мутант (scr)			
0,5–0,69	30,4 % (7/23)	0 % (0/8)			
0,7–0,89	54,3 % (57/105)	35,7 % (41/115)			
0,9–1,09	69,5 % (89/128)	58 % (69/119)			
1,1–1,29	71,2 % (37/52)	46,4 % (26/56)			
1,3–1,5	60 % (6/10)	14,3 % (4/28)			
Загальна частота ризогенезу	61,6 % (196/318)	42,9% (140/326)			

Частота утворення коренів на листкових експлантах *A. thaliana* (у відносних (%) та абсолютних значеннях – листкові експланти, що утворили корені, до загальної кількості експлантів).

У *А. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта відзначено різницю в утворенні коренів у випадках розташування експлантів верхньою (адаксіальною) або нижньою (абаксіальною) стороною. При орієнтації експлантів верхньою стороною по відношенню до живильнгого середовища утворення коренів не відбувалось і на черешках спостерігалось формування лише невеликої кількості калусу. Нижнє розташування сприяло формуванню коренів [16, 19].

Утворення коренів у дикого типу починалось з формування морфогенного осередка за рахунок поділу клітин камбію у провідному пучку. Далі з новоутворених клітин відбувалось формування зачатка кореня (рис. 3.3, б). Процеси формування морфогенного осередка та кореневого зачатка займали 3 дні. На четвертий день культивування кореневий зачаток з'являвся на поверхні черешка експланта (рис. 3.3, в), на 5–6 день формувався корінь (рис. 3.3, г) [16, 19].

У мутанта процес ризогенезу на черешках листкових експлантах відбувався подібно до такого дикого типу. Після початку поділів клітин пучкового камбія відбувалося формування морфогенного осередка, з кого формувався кореневий зачаток. Процес його утворення становив 3 дні, на 4 день кореневий зачаток спостерігався на поверхні листкового експланта, на 5-6 день відзначено появу сформованого кореня.

За даними літератури культивування листкових експлантів *A. thaliana* можна здійснювати як в темряві, так і на світлі. Для індукції ризогенезу в темряві один з головних факторів це наявність цукрів. Показано, що використання середовища B5 без цукрози призводило до блокування процесу утворення коренів на листкових експлантах. В той же час авторами зазначено, що на світлі фотосинтезуючі листкові експланти забезпечують достатню енергію для ризогенезу, який відбувається у іхній базальній частині [88]. Крім того показано, що вуглеводи разом з ауксином є індукторами утворення коренів [53]. На безгормональних середовищах регенераційна здатність листкових експлантів значною мірою залежить від концентрації ендогенного ауксину. За даними імуногістохімічного аналізу,

проведеного Н. Донгом та співавторами, в листкових експлантах видів роду *Populus (P. alba, P. davidiana* Dode, *P. simonii* Carriere, *P. tomentosa* Carriere) достатньо висока концентрація ауксину перед введенням культуру



Рис. 3.3. Послідовні етапи ризогенезу на черешках листкових эксплантів *A. thaliana* дикого типу *in vitro*: а – поперечний зріз черешка; б – клітини пучкового камбію з наступним утворенням кореневого зачатка; в – зачаток кореня на поверхні черешка; Γ – корінь, сформований *de novo*; 1 – епідерма, 2 – провідні пучки, 3 – хлоренхіма, 4 – зачаток кореня, 5 – клітини камбію (світлова мікроскопія, а, б – х 200; в, Γ – х 31,5).

спостерігалась в середній частині листкової пластинки, в той час як в середній та базальній частині черешка забарвлення було слабким.

Після переносу листків на середовище 1/2 МС та подальшому культивуванні ступінь забарвлення зменшувався в середній частині листкового експланта і збільшувався в середній та базальній частині черешка [99]. Більш того, місцева обробка ТЙБК (2,3,5,-трийодбензойна кислота – інгібітор полярного транспорту ауксина) до листкової пластинки запобігала акумуляції ІОК в середній та базальній частині провідного пучка черешка, але не у мезофілі листкової пластинки. Автори прийшли до висновку, що накопичення ІОК у базальній частині черешка пов'язано з початком ризогенезу. Роль ендогенного ауксину у формуванні коренів на листкових експлантах повністю підтвердилася при використанні методики GUS-залежного забарвлення на листкових експлантах *А. thaliana* (Col-0) [88].

Проведені нами досліди показали залежність морфогенетичного потенціалу листкових експлантів A. thaliana дикого типу та scr мутанта від розміру отже й від віку. В літературі зазначено, що чим меньший розмір культивованих тканин, тим нижча їх регенераційна здатність. Великі експланти з ділянками паренхіми, провідної тканини і камбієм можуть спонтанно індукувати морфогенез незалежно від концентрації регуляторів росту у поживному середовищі. Разом із тим помічено, що невеликі гомогенні ділянки епідермальних та субепідермальних тканин, вільні від корелятивного впливу інших тканин, можуть утворювати складні структури - бруньки, пагони, корені [32]. Слід зазначити, що на безгормональному середовищі 1/10 МС, яке використовувалося в наших дослідженнях, до коренеутворення були здатні лише експланти із справжніх листків. Сім'ядольні листки коренів не формували. В подібному експерименті, проведеному Д. Матсон та співавторами [173] показано, що тільки після додавання 3-індолілмасляної кислоти у концентрації 0,3 мг/л-1 вдалося індукувати ризогенез. Цей факт може бути підтвердженням того, що сім'ядолі містять ендогенний ауксин в незначній кількості.

Крім того, нами показана залежність морфогенетичного потенціалу листкових експлантів A. thaliana дикого типу та scr мутанта від орієнтації на середовищі. Г. П. Кушнір та В. В. Сарнацька живильному (2005)відмічають, ШО морфогенна здатність поверхні листка генетично детермінована. Так, у рослин родини Liliaceae більшу регенеративну активність має адаксіальна поверхня лусок, у Amaryllidaceae – абаксіальна. Для наших об'єктів більша регенеративна активність продемонстрована для абаксіальної сторони листкового експланта [32].

Нами показано, що у *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта найбільшу здатність формувати корені мають експланти із справжніх листків довжиною 0,9–1,2 см при орієнтації фізіологічно нижньою стороною по відношенню до живильного середовища. Корені утворювалися з клітин камбію провідного пучка. Загальний термін формування коренів займав 6 днів.

3.3. Анатомічна будова коренів *in vivo* та *in vitro*

В коренях *А. thaliana* дикого типу, утворених з насіння (*in vivo*), морфологічно виділялися кореневий чохлик, зона меристеми, ДЗР, ЦЗР, зона кореневих волосків. На поздовжніх зрізах коренів дикого типу в кореневому чохлику розрізнялися колумела та периферичні клітини. Колумела складалася з меристематичних клітин, статоцитів на стадіїї диференціювання, зрілих статоцитів та секреторних клітин. Периферичні клітини оточували колумелу та спостерігалися в меристемі та ДЗР на поверхні клітин епідерми. В ростових зонах кореня виявлено одношарову епідерму, двошарову кору, в якій розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми. Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини (рис. 3.4, а). В коренях *scr* мутанта, утворених з насіння, так само як і в коренях *A. thaliana* дикого типу, виділялися кореневий чохлик, зона меристеми, ДЗР, ЦЗР, зона кореневих волосків. На поздовжніх зрізах в кореневому чохлику



Рис. 3.4. Поздовжні зрізи апексу коренів *A. thaliana* дикого типу (а, в) та *scr* мутанта (б, г) *in vivo* (а, б) та *in vitro* (в, г): 1 – периферичні клітини, 2 – епідерма, 3 – паренхіма, 4 – ендодерма, 5 – шар кори мутанта, 6 – центральний циліндр (світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

розрізнялися колумела та периферичні клітини. Колумела складалася з меристематичних клітин, статоцитів на стадіїї диференціювання, зрілих статоцитів та секреторних клітин. Периферичні клітини оточували колумелу та спостерігалися в меристемі та ДЗР. Анатомія ростових зона кореня мала певні відмінності порівняно з диким типом. Під одношаровою епідермою містилася кора, яка мала мозаїчну структуру. На поздовжніх зрізах спостерігалося формування двошарової кори, тобто клітин паренхіми та ендодерми, які чергувалася з одношаровою корою (шаром кори мутанта) (рис. 3.4, б). В центральному циліндрі змін анатомічної будови виявлено не було, спостерігався перицикл та провідна тканина [11, 16, 19, 76].

Встановлено, що корені дикого типу та *scr* мутанта, які формувалися з тканин черешка листкових експлантів *in vitro* мали структуру, подібну до такої зародкових коренів *in vivo*. Морфологічно виділялися кореневий чохлик, меристема, ДЗР, ЦЗР та зона кореневих волосків. У дикого типу на поздовжніх зрізах виявлено одношарову епідерму, у двошаровій корі розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми (рис. 3.4, в). Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини. В коренях *scr* мутанта *in vitro* на поздовжніх зрізах спостерігалося формування епідерми, та двошарової кори, яка чергувалася з одношаровою корою (шаром кори мутанта) (рис. 3.4, г). Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини.

Кореневий чохлик, що є гравірецепторним апаратом, у дикого типу та мутанта містив меристематичні клітини, статоцити на стадії диференціюваннята зрілі статоцити, в яких амілопласти знаходились у дистальній частині клітини, а ядро – у проксимальній. За статоцитами розташовувались два шари секреторних клітин. Візуально, порівнюючи корені дикого типу та мутанта, сформовані *in vivo* та *in vitro* відмічено більші розміри останніх у радіальному напрямі. На прикладі дикого типу показано певні статистично достовірні відмінності анатомічних кількісних ознак між коренями *in vivo* та *in vitro*. У останніх відзначено збільшення довжини та ширини кореневого чохлика, меристеми та дистальної зони розтягу власне кореня (табл. 3.3). Збільшується також кількість клітин меристеми та розмір клітин епідерми та кори (табл. 3.4) [12].

Таблиця 3.3.

Параметри	Кореневий		Меристема		Дистальна зона		
	чохлик				розтягу		
	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	
Довжина	66,21±	92,94±	144,78±	$223,95\pm$	$104,34 \pm$	101,89±	
(мкм)	4,23	3,47*	17,21	18,42*	3,37	2,38	
Ширина	$76,25 \pm$	118,92±	107,06±	158,11±	110,68±	167,38±	
(мкм)	2,18	3,48*	2,17	9,45*	3,61	$9,77^{*}$	
Кількість	5,67±	5,67±	20,5±	27,67±	8,67±	7,67±	
клітин	0,21	0,21	1,96	2,26*	0,42	0,8	
M±m; n=6; P=0,05; t-критерій							

Кількісні анатомічні ознаки ростових зон A. thaliana дикого типу.

Таблиця 3.4.

Клітина	Меристема				Дистальна зона розтягу			
	Епідерма		Паренхіма кори		Епідерма		Паренхіма кори	
	in	in	in	in	in	in	in	in
	vivo	vitro	VIVO	vitro	vivo	vitro	vivo	vitro
Довжина	7,41±	7,98±	6,59±	7,61±	11,97±	$15,45\pm$	$10,6\pm$	$10,04\pm$
(мкм)	0,43	0,56	0,27	0,31*	0,43	0,67*	0,61	0,28
Ширина	9,08±	$13,78\pm$	7,34±	8,81±	13,81±	$19,85\pm$	9,53±	14,3±
(мкм)	0,31	$0,5^{*}$	0,25	0,35*	0,4	0,47*	0,32	0,67*
M±m; n=30; P=0,05; t-критерій								
Примітка: * – статистично достовірні відмінності між значеннями								

Розміри клітин ростових зон коренів A. thaliana.

однакових параметрів *in vivo* та *in vitro*.

Корені дикого типу та мутанта, отримані з калусів морфологічно були різні і виділялися декілька типів: 2) відносно тонкі корені до 1 см, 2) товсті до 0,5 см. Так, наприклад, для *А. thaliana* дикого типу з 10 коренів: 4 – відносилися до першого типу, 6 – до другого.

У відносно тонких до 1см коренів дикого типу та *scr* мутанта, утворених *in vitro* з калусу морфологічно виділялися кореневий чохлик, меристема, ДЗР, ЦЗР та зона кореневих волосків. У дикого типу на поздовжніх зрізах виявлено одношарову епідерму, у двошаровій корі розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми. Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини. В коренях *scr* мутанта *in vitro* на поздовжніх зрізах спостерігалося формування двошарової кори, яка чергувалася з одношаровою корою (шаром кори мутанта). Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини.

На прикладі коренів дикого типу першого варіанта показано певні статистично достовірні відмінності анатомічних кількісних, порівняно з зародковими коренями *in vivo* (табл. 3.5). Встановлено скорочення меристеми та ДЗР через зменшення кількості клітин.

Таблиця 3.5.

Параметри	Кореневий		Меристема		Дистальна зона		
	чохлик				розтягу		
	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	
Довжина	66,21±	69,32±	$144,78\pm$	56,44±	$104,34\pm$	23,3±	
(мкм)	4,23	4,9	17,21	2,54*	3,37	1,72*	
	5,67±	$5\pm$	20,5±	6,83±	8,67±	2,5±	
Кількість	0,21	0,18	1,96	1,32*	0,42	0,24*	
клітин							
M±m; n=6; P=0,05; t-критерій							

Ростові показники зародкових коренів та отриманих з калусу.

Примітка: * – статистично достовірні відмінності між значеннями однакових параметрів *in vivo* та *in vitro*.

У товстих до 0,5 см коренів дикого типу та *scr* мутанта, утворених *in vitro* з калусу морфологічно виділялися кореневий чохлик, меристема, ДЗР, ЦЗР та зона кореневих волосків. Анатомічні досліди показали, що такі корені зрощені (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Апекси зрощених коренів, утворених з калусної культури *A. thaliana* дикого типу (а) та *scr* мутанта (б): 1 – епідерма, 2 – паренхіма, 3 – центральний циліндр, 4 – кореневий чохлик (світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

У дикого типу на поздовжніх зрізах виявлено одношарову епідерму, у двошаровій корі розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми. Центральних циліндри було два і вони складалися з перициклу та провідної тканини. В коренях *scr* мутанта *in vitro* на поздовжніх зрізах спостерігалося формування двошарової кори, яка чергувалася з одношаровою корою (шаром кори мутанта). Так само, як і у дикого типу спостерігалося два центральних циліндра.

Хоча в кореневому чохлику й виділялася колумела з меристематичними клітинами, статоцитами на стадіїї диференціювання,

зрілими статоцитами та секреторними клітин, теж відзначено її зрощення [16].

Під час росту кореня, кожна його тканина формується із специфічної групи ініціалей. Згідно теорії гістогенів Ганштейна кожна група меристематичних ініціалей запрограмована утворювати клітини, які надалі формують один тип клітин [158]. Для *A. thaliana* показано, що радіальна структура кореня підтримується активністю двох генів: *scr* та *shr*. Експрессія *scr* важлива, оскільки відповідає за поділ клітин, які у подальшому формують клітини паренхіми кори та ендодерми, в той час як *shr* відповідає за диференціювання ендодерми. У мутантів по гену *scr* формується шар кори, який має характеристики як клітин паренхіми, так і клітин ендодерми [96].

В наших дослідах показано, що корені, утворені з листкових експлантів дикого типу та *scr* мутанта, за своєю анатомічною будовою були подібні до зародкових коренів. В той же час на прикладі дикого типу виявили відмінності в кількісних показниках. Відомо, що довжина кореневого чохлика визначається кількістю та розміром клітин колумели [28]. Оскільки кількість її шарів в коренях, утворених *in vivo* та *in vitro* з листкових експлантів, статистично не відрізнялася, припускається, що виявлене нами збільшення довжини та ширини кореневого чохлика обумовлено особливостями росту його клітин. Збільшення діаметра меристематичної зони та ДЗР відбувається через зміни у довжині та ширині клітин епідерми та паренхіми. Передбачається, що в культурі *in vitro* під час ризогенезу підвищується проліферативна активність клітин меристеми. Відомо, що ауксин регулює поділ клітин та їх розтяг [81], за низької його концентрації втрачається регенераційна здатність [88]. Експериментально показано, що морфогенез коренів на листкових експлантах пов'язаний з накопиченням ауксину у базальній частині черешка [99]. Ймовірно, що певна концентрація ендогенного ауксину в експлантах, яка є необхідною для

органогенезу, модифікує активність поділу клітин та призводить до збільшення їхніх розмірів.

На відміну від коренів, утворених з листкових експлантів дикого типу та *scr* мутанта, в коренях з калусу виявлено не лише достовірні кількісні, але й якісні ознаки. Показано, що органогенез *in vitro* може відбуватися з певними морфологічними та анатомічними відхиленнями. Наприклад, сильно гідратовані та роздвоєні пагони, відмічалися в культурі *in vitro* у *Helianthus annuus* [103] та *D. carota* [118], набряклі та зрощені пагони у *Celosia cristata* [239] та *P. sativum* [67] відповідно. В наших дослідах виявлено фасціацію коренів *in vitro*. В літературі фасціація *in vitro* описана як девіація від нормальної діяльності меристеми, або ж як трансформація однієї точки росту в цілу їхню лінію [56].

Анатомічні досліди показали, що на відміну від коренів, сформованих з калусу, які характеризуються значними якісними та кількісними змінами в анатомічній будові, корені, утворені з листкових експлантів *in vitro*, за анатомією подібні до зарадкових коренів, а виявлені відмінності кількісних ознак значно не відображаються на загальній будові кореня. Тому в подальших дослідженнях щодо впливу модельованої мікрогравітації ми використовували корені *in vitro*, утворені з листкових експлантів.

РОЗДІЛ 4

АНАТОМІЯ КОРЕНІВ ПРИ ДІЇ КЛІНОСТАТУВАННЯ

Апекси коренів містять меристематичні ініціалі епідерми, кори і центрального циліндра, а також ініціалі колумели і периферійної зони кореневого чохлика. Останні локалізовані на дистальній поверхні центру спокою кореня, перші – на його проксимальній поверхні. Таким чином диференціювання меристематичних клітин відбувається в двох протилежних напрямах: до базальної частини власне кореня – зони розтягу і диференціювання, і до його апікальної частини – статоціти і секреторні клітини (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Схема будови апексу кореня: ДЗР – дистальна зона розтягу, ЦЗР – центральна зона розтягу. Стрілками вказано напрями диференціювання клітин.

У коренях *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, сформованих на листкових експлантах в умовах кліностатування, як і контрольних,


Рис. 4.2. Апекси коренів дикого типу (а, б) та *scr* мутанта (в, г), утворених *de novo* на листкових експлантах в контролі (а, в) та при кліностатуванні (б, г): 1 –периферичні клітини, 2 – епідерма, 3 – паренхіма, 4 – шар кори мутанта, 5 – ендодерма, 6 – центральний циліндр, 7 – статоцити, 8 – секреторні клітини (світлова мікроскопія; ×400).

виділялися кореневий чохлик та ростові зони власне кореня: меристема, ДЗР, ЦЗР, зона диференціювання. На поздовжніх зрізах у дикого типу виявлено одношарову епідерму, в двошаровій корі розрізнялися клітини паренхіми та ендодерми. Центральний циліндр складався з перициклу та елементів провідної тканини (ксилема, флоема). В кореневому чохлику виділялися периферійні клітини та колумела, яка містила меристематичні клітини, зрілі статоцити (гравірецепторні клітини) та секреторні клітини (рис. 4.2).

В коренях *scr* мутанта, сформованих на листкових експлантах в умовах кліностатування, як і контрольних, на поздовжніх зрізах в кореневому чохлику розрізнялися колумела та периферичні клітини. Колумела складалася з меристематичних клітин, статоцитів на стадіїї диференціювання, зрілих статоцитів та секреторних клітин. Периферичні клітини оточували колумелу та спостерігалися в меристемі та ДЗР. Під одношаровою епідермою містилася кора, яка мала мозаїчну структуру: спостерігалося чергування двошарової кори одношаровою (шаром кори мутанта) (рис. 4.2, в, г). В центральному циліндрі спостерігався перицикл та провідна тканина [10, 12, 13, 14, 77].

Достовірної різниці щодо довжини ростових зон, кількості клітин епідерми та їхніх площ у коренях, які утворилися в контролі та в умовах кліностатування, не виявлено (табл. 4.1). В контролі у *A. thaliana* дикого типу довжина кореневого чохлика, меристеми і ДЗР дорівнювали 99,5± 2,01; 223,4 ± 10,87; і 95,51 ± 6,06 мкм, у *scr* мутанта 97,97±2,84; 219,07±13,65; 96,3±7,33 мкм, відповідно. За умов кліностатування довжина кореневого чохлика та ростових зон дорівнювали: у дикого типу – 98,93±2,84; 237,07±10,98; 94,37±5,95 мкм; у *scr* мутанта –96,09±3,98;222,87±13,29; 97±6,24 мкм, відповідно [77].

В космічних та кліностатних експериментах дослідження рослин, які розвивалися з насіння, утвореного в наземних умовах, показано, що процеси морфогенезу вегетативних і генеративних органів відбуваються подібно до таких в умовах 1 g [154]. Проте експерименти, проведені на культурі *in vitro*, поставили питання щодо органогенезу, інтенсивності проліферації та диференціювання клітин в умовах мікрогравітації [162, 214], в першу чергу, це стосувалося гравірецепторних клітин кореня - статоцитів [198].

Таблиця 4.1.

Параметри ростових зон коренів, утворених *in vitro* з листкових

Варіант	Рослини	Кореневий чохлик		Меристема		ДЗР	
		Довжина (мкм)	Ширина (мкм)	Довжина (мкм)	Кількість клітин	Довжина (мкм)	Кількість клітин
Контроль	Дикий	99,5	101,52	223,4	22,67	95,51	6,13
	ТИП	±	±	±	±	±	±
		2,01	1,16	10,87	1,2	6,06	0,41
	Мутант	97,97	93,05	219,07	22,13	96,3	6,47
		±	±	±	±	±	±
		2,84	3,62	13,65	1,18	7,33	0,48
Кліностат	Дикий	98,93	103,64	237,07	25,13	94,37	6,6
	ТИП	±	±	±	土	±	±
		2,84	1,71	10,98	0,99	5,95	0,4
	Мутант	96,09	91,93	222,87	25,2	97	6,53
		±	±	±	±	±	±
		3,98	2,54	13,29	1,61	6,24	0,45
	Критерій Манна-Уітні, p>0,05						

експлантів.

Так показано лише можливість процесу регенерації коренів в культурі *in vitro Mentha piperita* L. при кліностатуванні [211]. В нашій роботі на прикладі *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта вперше продемонстровано чітку можливість диференціювання як гравірецепторних клітин кореневого чохлика, так і клітин ростових зон власне кореня в культурі *in vitro* в умовах кліностатування (модельованої мікрогравітації). Оскільки даних літератури щодо структури ростових зон власне кореня *in vitro* існує обмежена кількість, ми порівняли наші результатами з тими, що отримані на зародкових коренях. У космічних експериментах, тобто за реальної мікрогравітації, описано зміни розмірів органів рослин [180] і клітин [120]. Так, наприклад, відбувалося зменшення довжини коренів *Lens culinaris* L. в інтервалі 25–35 год [206], у 7-добових проростків *Zea sp.* – меристематичної зони, хоча площа клітин не відрізнялася [7]. Водночас повідомлялося про збільшення довжини зони меристеми, посилення клітинного поділу та зменшення розмірів клітин у 4-добових проростків *A. thaliana* [170]. У *L. culinaris* L. і *Lepidium sativum* L. за 25 та 32 годин, відповідно, показано відсутність статистично достовірної різниці цих показників [207, 230]. У разі кліностатування також зафіксовано меншу довжину кореніву *P. sativum* L. за 44 год, хоча значення мітотичного індексу не змінювалось [4]. Зазначається, що зменшення довжини ростових зон кореня за умов кліностатування відбувається за рахунок редукції кількості клітин у зоні меристеми й уповільнення росту клітин розтяганням [24].

За нашими даними, для коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* в умовах кліностатування повністтю підтверджено діференціювання клітин коренів в двох напрямах: кореневого чохлика та ростових зон власне кореня. Аналіз кількісних показників коренів не виявив статистично достовірної різниці між коренями, утвореними *in vitro* в контролі та за умов кліностатування.

РОЗДІЛ 5

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГРАВІРЕЦЕПТОРНОГО АПАРАТУ КОРЕНЕВОГО ЧОХЛИКА ТА РОСТОВИХ ЗОН КОРЕНЯ

5.1. Ультраструктура клітин кореневого чохлика in vitro

Кореневий чохлик інтактних рослин *А. thaliana*, як і інших дводольних, походить із спільного з епідермою зародкового шару – дерматокаліптрогену і, таким чином, пов'язаний у своєму формуванні з апікальноюю меристемою власне кореня. В коренях *in vitro* формування чохликів выдбувається подібним чином. Відзначено, що у *А. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених *in vitro* з листкових експлантів в контролі, колумела складалася з 5 шарів клітин. Перший шар – меристематичні клітини, другий – статоцити на стадії диференціювання, третій шар – зрілі (диференційовані) статоцити, четвертий та пятий – секреторні клітини.

В контролі меристематичні клітини чохлика *А. thaliana* дикого типу (рис. 5.1) в центрі містили округле або лопатеве ядро з ядерцем. Пластидний апарат представлений лейкопластами більшою частиною овальної або неправильної форми. Строма пластид середньої електронної щільності. У стромі спостерігаються поодинокі ламели до двох-трьох на зрізах, іноді доволі довгих. В пластидах трапляються дрібні крохмальні зерна. Мітохондрії овальної, округлої або видовженої форми з матриксом середньої електронної щільності. Особливою рисою клітин цього типу є наявність значної кількості вільних рибосом та слабко розвинений ЕПР. У *scr* мутанта ультраструктура меристематичних клітин чохлика в контролі була подібна до такої дикого типу. В центрі клітин спостерігалося округле або лопатеве ядро з ядерцем, мітохондрії та пластиди різні за своєю



Рис. 5.1. Ультраструктура клітин меристеми чохлика *A. thaliana* дикого типу в контролі: Яд – ядерце, Я – ядро, М – мітохондрія, Пл – пластида, В – вакуоль. Масштаб – 1 мкм.

формою з електрон щільним матриксом та стромою відповідно, були розповсюджені в гіалоплазмі клітин без певної закономірності. Клітини характеризувалися наявністтю значної кількості вільних рибосом та слабко розвиненим ЕПР.

В статоцитах дикого типу на стадії диференціювання ядро поступово змінює центральне положення на проксимальне (рис. 5.2). Мітохондрії овальної, округлої або видовженої форми з електрон щільним матриксом розповсюджуються по всьому об'єму клітин з переважним розміщенням в дистальній частині. Короткі цистерни ЕПР стають більш розвиненими і клітинних стінок. спостерігаються уздовж В пластидах поступово накопичується крохмаль і крохмальні зерна збільшуються в об'ємі, отже відбувається формування амілопластів, які поступово займають дистальне положення в клітині. Спостерігається незначна кількість дрібних вакуолей, які переважно локалізовані біля ядра.



Рис. 5.2. Ульстраструктура статоцитів на стадії диференціювання в кореневому чохлику *A. thaliana* дикого типу: Яд – ядерце, Я – ядро, М – мітохондрія, А – амілопласт, Крх – крохмальне зерно, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм. Масштаб – 1 мкм.

В статоцитах мутанта стадії диференціювання зміни scr ультраструктури відбувалися подібно до дикого типу (рис. 5.3). Ядро поступово змінювало центральне положення на проксимальне. Кількість мітохондрій овальної, округлої або видовженої форми з електрон щільним матриксом збільшувалось, порівняно з клітинами меристеми, і вони розповсюджувалися по всьому об'єму клітин з переважним розміщенням в центральній та дистальній частинах. Довжина цистерн ЕПР збільшувалась и вони ставали більш помітними уздовж клітинних стінок. В пластидах відзначалося утворення значної кількості дрібних або декількох великих крохмальних зерен. Гіалоплазма ставала більш електрон прозорою.



Рис. 5.3. Ульстраструктура статоцитів на стадії диференціювання в кореневому чохлику *scr* мутанта: Яд – ядерце, Я – ядро, М – мітохондрія, А – амілопласт, Крх – крохмальне зерно, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм. Масштаб – 2 мкм.

В гіалоплазмі диференційованих статоцитів A. thaliana дикого типу в контролі спостерігалися ядро, вакуолі, мітохондрії, амілопласти, ендоплазматичний ретикулюм та диктіосоми (рис. 5.4). Ядро за формою округле або овальне, знаходилося в проксимальній частині клітини. Вакуолі мали округлу форму і характеризувалися електрон-прозорим вмістом або гранулярним середньої електронної щільності. Здебільшого вони в проксимальній частині статоциту, під ядром, розміщалися іноді траплялися всередині клітини. Мітохондрії, овальної або видовженої форми

містили розвинену системою крист, у матриксі наявні електрон-прозорі ділянки. Популяція мітохондрій спостерігалася у всьому об'ємі статоцитів. Амілопласти овальної або неправильної форми, містили електрон-щільну строму, в якій розрізнялися крохмальні зерна різного розміру, форми та електронної щільності. Крохмальні зерна були округлі, овальні та неправильної форми, електрон-прозорі та електрон-щільні. Кількість та щільність крохмальних зерен в амілопластах варіювала в залежності від їхнього розміру. Амілопласти локалізувалися в дистальній частині статоцитів, над цистернами ЕПР. Окремі цистерни мали видовжену форму та розташовувалися біля поздовжніх клітинних стінок, в той час як їхні



Рис. 5.4. Статоцити чохликів коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo in vitro* в стаціонарних умовах: Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

скупчення спостерігалися в дистальній частині статоциту, а також в кутах проксимальної. Поодинокі диктіосоми складалися з 4-5 цистерн і характеризувалися полярністю. Диктіосоми зустрічалися як в дистальній так і в проксимальній частині статоциту.

В контролі ультраструктура статоцитів *scr* мутанта в чохликах коренів, утворених *in vitro* була подібна до такої дикого типу (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Статоцити коренів *scr* мутанта, утворених *de novo in vitro* в стаціонарних умовах: Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

В гіалоплазмі розрізнялися ядро, вакуолі, мітохондрії, амілопласти, ендоплазматичний ретикулюм та диктіосоми. Округле або овальне ядро в клітині займало проксимальне положення. Здебільшого округлі вакуолі з електрон-прозорим або гранулярним середньої електронної щільності вмістом, розміщалися в проксимальній частині статоциту, під ядром. Численні мітохондрії, овальної або видовженої форми мали розвинену систему крист та електрон-прозору ділянку. Овальної або неправильної форми амілопласти характеризувалися електрон-щільною стромою, в якій розрізнялися електрон-прозорі та електрон-щільні, округлі, овальні або неправильної форми крохмальні зерна, кількість яких варіювала в залежності від розміру амілопластів, що розміщувалися в дистальній частині статоцитів. Цистерни ЕПР, різні за довжиною, розташовувалися біля поздовжніх клітинних стінок, а їхні скупчення спостерігалися в дистальній частині статоциту та в кутах проксимальної. Диктіосоми складалися з 4-5 цистерн і характеризувалися полярністю та спостерігалися ЯК В проксимальній частині статоцита, так і в дистальній.

У дикого типу та мутанта при переході статоцитів до фази секреції поступово змінюється структурна організація клітин. Ядро може зберігати своє проксимальне положення і поступово ще більше відтіснятися до периферії клітин або займати центральне в клітині. положення Відзначається збільшення ступеня вакуолізації і перехід до процесів лізису. електрон-прозорі фібрілярним електрон-щільним Вакуолі 3 вмістом зосереджуються всередині клітин або на периферії. В амілопластах відбувається зменшення розмірів крохмальних зерен через лізис крохмалю. В цей період амілопласти вже розташовуються у всьому об'єму секреторних клітин. Збільшуються розміри цистерн диктіосом. Внутрі цистерн спостерігається накопичення електрон-прозорої речовини – слизу. Цистерни ЕПР збільшуються в розмірах, внутрі цистерн відзначається накопичення електрон-щільного компоненту, отжк відбувається утворення ЕР-тілець, які характерні лише для родини Капустяних [36].

За умов кліностатування процеси утворення клітин колумели в чохликах *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта не відрізнялася від контролю, кількість шарів дорівнювала 5. В колумелі чітко розрізнялися меристематичні клітини, статоцити на стадії диференціювання, зрілі статоцити та секреторні клітини.

За умов кліностатування у *A. thaliana* дикого типу (рис. 5.6) та *scr* мутанта в меристематичних клітинах чохлика в центрі розташовувалося округле або лопатеве ядро з ядерцем.



Рис. 5.6. Ультраструктура клітин меристеми чохлика *A. thaliana* дикого типу за умов кліностатування: Яд – ядерце, Я – ядро, М – мітохондрія, Пл – пластида, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм. Масштаб – 1 мкм.

Пластиди за формою овальні або неправильні, характеризуються стромою середньої електронної щільності. У стромі спостерігаються поодинокі

ламели. В пластидах трапляються дрібні крохмальні зерна. Мітохондрії овальної, округлої або видовженої форми з матриксом середньої електронної щільності. Поодинокі диктіосоми складалися з 3-4-5 цистерн. В гіалоплазмі клітин відзначено наявність значної кількості вільних рибосом та слабко розвиненого ЕПР.

В статоцитах дикого типу (рис. 5.7, а) та мутанта (рис. 5.7, б) на стадії диференціювання ядро поступово змінювало центральне положення на проксимальне, порівняно з клітинами меристеми. Мітохондрії овальної,



Рис. 5.7. Ульстраструктура статоцитів дикого типу (а) та мутанта (б) на стадії диференціювання в кореневому чохлику за умов кліностатування: Яд – ядерце, Я – ядро, М – мітохондрія, Пл – пластида, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм. Масштаб – 1мкм.

округлої або видовженої форми з електрон щільним матриксом розповсюджувалися по всьому об'єму клітин з переважним розміщенням в

центральній та дистальній частинах клітин. Кількість і розміри цистерн ЕПР збільшувалися та чітко спостерігалися уздовж клітинних стінок. В пластидах поступово накопичувався крохмаль і формувалися крохмальні зерна різні за об'ємом. Візуально кількість крохмальних зерен та іхні розміри менші, ніж в контролі. Амілопласти за умов кліностатування вже більше спостерігалися в центральній частині клітин, порівняно з контролем. Відзначено наявність дрібних з електрон-щільним фібрілярним вмістом вакуолей, які розповсюджувалися в об'ємі клітин. Гіалоплазма ставала більш електрон-прозорою через збільшення об'єму клітин, порівняно з клітинами меристеми.

В статоцитах A. thaliana дикого типу (рис. 5.8, a) та scr мутанта (рис. 5.8, б) за умов кліностатування спостерігалися ядро, вакуолі, мітохондрії, амілопласти, ендоплазматичний ретикулюм та диктіосоми. Ядро за формою округле або овальне, знаходилося в проксимальній частині клітини або іноді дещо зміщувалось у напрямі центральної частини клітини. Вакуолі мали округлу форму і характеризувалися електрон-прозорим вмістом або гранулярним середньої електронної щільності. Розміри органел та їхня кількість дещо більші, порівняно з такими в контролі. Відзначено наявність вакуолей в дистальній частині клітин. В мітохондріях, овальної або видовженої форми відзначено розвинену систему крист, у матриксі овальної спостерігали електрон-прозорі ділянки. Амілопласти або неправильної форми, містили електрон-щільну строму, в якій розрізнялися крохмальні зерна різного розміру, форми та електронної щільності. Кількість та щільність крохмальних зерен в амілопластах варіювала в залежності від їхнього розміру. Візуально їхній розмір та кількість були меншими, порівняно з контролем. На відміну від контролю, амілопласти зосереджувалися в центральній частині клітин або розповсюджувалися в об'ємі статоцитів без певної закомірності. Окремі цистерни ЕПР мали видовжену форму та розташовувалися біля поздовжніх клітинних стінок, в

той час як їхні скупчення спостерігалися в дистальній частині статоциту, а також в кутах проксимальної. Поодинокі диктіосоми складалися з 4-5 цистерн і характеризувалися полярністю. Диктіосоми зустрічалися як в дистальній так і в проксимальній частині статоциту [17, 20, 75].



Рис. 5.8. Статоцити в апексах коренів дикого типу (а) та *scr* мутанта (б), утворених *de novo in vitro* за умов кліностатування: Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

У дикого типу (рис. 5.9, а) та *scr* мутанта (рис. 5.9, б) при переході статоцитів до фази секреції зміни ультраструктурної організації були



Рис. 5.9. Секреторні клітини в апексах коренів дикого типу (а, в) та *scr* мутанта (б, г), утворених *de novo in vitro* за умов кліностатування: Я – ядро, В – вакуоль, М – мітохондрія, А – амілопласт, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, ЕР – ЕР-тільце (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

подібні до контролю. Ядро відтіснялося до периферії клітини або займало центральне положення. Ступінь вакуолізації збільшувався, відзначалися

процеси лізису. Амілопласти розташовувалися у всьому об'ємі клітин. В амілопластах відбувався лізис крохмалю, крохмальні зерна зменшувалися у розмірі. Збільшувалися розміри цистерн диктіосом. Окремі цистерни ЕПР також збільшувалися в розмірах та перетворювалися на ЕР-тільця. Поступово більшість органел лізувалися, залишки цитоплазми відтіснялися до периферії клітин через утворення центральної вакуолі (рис. 5.9, в, г).

На підставі аналізу ультраструктури, проведеного нами на апексах коренів A. thaliana, утворених in vitro з листкових експлантів в контрольних умовах можна зробити висновок, що диференціювання клітин колумели у дикого типу та scr мутанта відбувається подібно до інтактних рослин. Статоцити коренів, утворених *de novo* характеризуються векторіальною полярністю, оскільки органели мають специфічне розташування по відношенню до поздовжньої вісі кореня [206, 207, 218]. Ядро локалізується в проксимальній частині статоцита, амілопласти в дистальній. В умовах кліностатування статоцити не фукнціонують через блокування сприйняття сигналу вектора гравітації, що неоднаразово відмічено багатьма авторами на ембріональних коренях [154, 168, 208]. Повідомлялося про прогресуючу вакуолізацію статоцитів в зародкових коренях проростків сої в умовах мікрогравітації [143]. В наших дослідах такого феномену ми не спостерігали, але відзначили незначне збільшення розмірів вакуолей та юхню кількість, а також зміни їхньої локалізації порівняно з контролем.

Таким чином вперше, на рівні ультраструктури достовірно продемонстровано повне диференціювання гравірецепторних клітин в коренях *A. thaliana,* сформованих *in vitro*. На підставі даних літератури і наших результатів щодо ультраструктури статоцитів, можна зробити висновок про подібність реакції статоцитів на дію кліностатування між коренями, утвореними *in vitro* та *in vivo*. Розповсюдження амілопластів по всьому об'єму статоцитів є свідченням блокування гравірецепції в умовах кліностатування.

5.2. Ультраструктура клітин ростових зон власне кореня

Досліджено ультраструктурну організацію клітин ростових зон коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених *in vitro* в контролі та за умов кліностатування.

В протодермі коренів дикого типу в контролі (рис. 5.10) в центрі клітин спостерігалося округле ядро, що містило дифузний хроматин



Рис. 5.10. Ультраструктурна організація клітин протодерми коренів дикого типу в контролі: 1 – периферичні клітини, 2 – клітини протодерми, 3 – клітини периблеми, Яд – ядерце, Я – ядро, В – вакуоль, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, Кс – клітинна стінка (трансмісійна електронна мікроскопія).

і ядерце, діаметр якого становив більше половини такого ядра. В деяких ядерцях виявлено ядерцеву вакуоль. Вільні рибосоми були найбільшим

компонентом гіалоплазми і зумовлювали її високу електронну щільність. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди були округлої або видовженої форми зі щільною стромою і слаборозвиненою внутрішньою мембранною системою. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися дрібні вакуолі. У *A. thaliana* дикого типу в клітинах протодерми парціальний об'єм ядра, вакуолей, мітохондрій та пластид становив 27,14 \pm 1,27%; 5,57 \pm 0,82%; 6,65 \pm 0,54%; 2,36 \pm 0,27% відповідно. Середня площа ядра на зрізі становила 15,466 \pm 0,895 мкм², вакуолей – 0,431 \pm 0,041 мкм², мітохондрій – 0,23 \pm 0,007 мкм², пластид – 0,414 \pm 0,033 мкм².

В клітинах периблеми коренів дикого типу в контролі (рис. 5.11) в центрі клітини спостерігалося округле ядро, що містило дифузний хроматин і ядерце, діаметр якого становив більше половини такого ядра. Вільні рибосоми були найбільшим компонентом гіалоплазми і зумовлювали її високу електронну щільність. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди округлої або видовженої форми зі щільною стромою і слаборозвиненою внутрішньою мембранною системою. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися контурами мембран слабковираженою полярністю. тонкими та Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися вакуолі різні за розміром, які містили електрон-щільні фібрилярні та гранулярні включення.



Рис. 5.11. Ультраструктурна організація клітин периблеми коренів дикого типу в контролі: 1 – периферичні клітини, 2 – клітини протодерми, 3 – клітини периблеми, Яд – ядерце, Я – ядро, В – вакуоль, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, Кс – клітинна стінка (трансмісійна електронна мікроскопія).

В епідермальних клітинах ДЗР (рис. 5.12) дрібні вакуолі збільшувалися в об'ємі та поступово зливалися. Гіалоплазма в процесі росту клітин втрачала електронну щільність унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Ядро овальної або лопатевої форми зазвичай займало



Рис. 5.12. Ультраструктура клітин епідерми ДЗР коренів дикого типу в контролі: 1 – периферичні клітини, 2 – епідерма, 3 – паренхіма, 4 – ендодерма, Яд – ядерце, Я – ядро, В – вакуоль, Д – диктіосома, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, ЕР – ЕР-тільце, Кс – клітинна стінка (трансмісійна електронна мікроскопія).

центральне положення або дещо міщувалось. Ендоплазматичний ретикулум представлений довгими цистернами, на яких щільно розміщувалися рибосоми. Форма та розміри пластид варіювали на зрізах, хоча здебільшого спостерігалися органели овальної або видовженої форми. Деякі пластиди містили крохмальні зерна. Диктіосоми набували характерної для зрілих органел полярності та продукували численні везикули різного розміру [75]. В клітинах епідерми *А. thaliana* дикого типу чітко виявлені овальні або видовжені ЕР-тільця (рис. 5.12), що являють собою локальні розширення

цистерн гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, містять фермент β глюкозидазу та характерні для *Brassicaceae* [36]. У *А. thaliana* дикого типу в клітинах епідерми парціальний об'єм ядра, вакуолей, мітохондрій, пластид та ЕР-тілець становив 17,31±0,99%; 7,0±1,48%; 4,7±0,12%; 2,3±0,1% та 0,95±0,2% відповідно. Середня площа ядра на зрізі дорівнювала 32,28±3,79, вакуолей – 2,11±0,75 мкм², мітохондрій – 0,21±0,004, пластид – 0,52±0,04 мкм², ЕР-тілець – 0,09±0,004 мкм².

В клітинах паренхіми ДЗР (рис. 5.13) також спостерігалася прогресуюча вакуолізації. Ядро овальної або лопатевої форми, здебільшого, зміщувалося вбік клітини. Гіалоплазма втрачала електронну щільність



Рис. 5.13. Ультраструктура клітин паренхіми ДЗР коренів дикого типу в контролі: 1 – периферичні клітини, 2 – епідерма, 3 – паренхіма, 4 – ендодерма, Яд – ядерце, Я – ядро, В – вакуоль, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Ендоплазматичний ретикулум був розвинений слабкіше, порівняно з клітинами епідерми, на його цистернах спостерігалися рибосоми. Форма пластид варіювала. Деякі пластиди містили крохмальні зерна. Диктіосоми набували полярності. На відміну від клітин епідерми, в паренхімі ЕР-тільця не спостерігалися.

Основний об'єм клітин епідерми та паренхіми ЦЗР займала центральна вакуоля, що відтісняла до периферії ядро і цитоплазму з усіма органелами. Внаслідок різкого зменшення кількості вільних рибосом електронна щільність цитоплазми значно знижувалася.

Дослідження ультраструктури клітин протодерми в коренях мутанта в контролі показали, що вона була подібною до такої дикого типу (рис. 5.14).



Рис. 5.14. Ультраструктурна організація клітин протодерми коренів дикого типу в контролі: 1 – периферичні клітини, 2 – клітини протодерми, 3 – шар кори мутанта, 4 – клітини периблеми, 5 – ендодерма, Яд – ядерце, Я – ядро, В – вакуоль, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, Кс – клітинна стінка (трансмісійна електронна мікроскопія).

В центрі клітин розміщувалося ядро з ядерцем. В цитозолі знаходилися вільні рибосоми, що зумовлювало його електронну щільність. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди округлої або видовженої форми мали щільну строму і слаборозвинену внутрішньою мембранну систему. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися дрібні вакуолі.

У мутанта в периблемі коренів в контролі (рис. 5.15) в центрі клітин спостерігалося округле ядро, що містило дифузний хроматин і ядерце.



Рис. 5.15. Ультраструктурна організація клітин периблеми мутанта в контролі: 1 – клітини протодерми, 2 – клітини периблеми, 3 – шар кори мутанта, Яд – ядерце, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

Вільні рибосоми були найбільшим компонентом гіалоплазми і зумовлювали її високу електронну щільність. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди округлої або видовженої форми зі щільною стромою і слаборозвиненою внутрішньою мембранною системою. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися вакуолі різні за розміром, які містили електрон-щільні фібрилярні та гранулярні включення.

Дослідження клітин шару кори мутанта в зоні меристеми показали, що за своєю ультраструктурою вони не відрізнялися від клітин цієї зони (рис. 5.16).



Рис. 5.16. Ультраструктурна організація клітин шару кори мутанта в контролі: 1 – клітини протодерми, 2 – клітини периблеми, 3 – шар кори мутанта, Яд – ядерце, Яд. в – ядерцева вакуоль, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

В клітинах спостерігалося округле ядро, що містило дифузний хроматин і ядерце. Іноді, як і в інших клітинах меристеми, в ядерці відзначено Клітини наявність ядерцевої вакуолі. характеризувалися високою електронною щільністю через наявність вільних рибосом в гіалоплазмі. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди округлої або видовженої форми зі щільною стромою і слаборозвиненою внутрішньою мембранною системою. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим. Вакуолі різні за розміром містили електрон-щільні фібрилярні та гранулярні включення.

У мутанта при переході клітин до ДЗР ультраструктурні перебудови в епідермі відбувалися подібно до клітин дикого типу. Спостерігалася прогресуюча вакуолізація, зменшення щільності гіалоплазми, диктіосоми набували полярності та продукували численні везикули різного розміру. Форма та розміри пластид варіювали на зрізах, хоча здебільшого спостерігалися органели овальної або видовженої форми. Деякі пластиди містили крохмальні зерна. Слід відмітити в клітинах епідерми *scr* мутанта, як і клітинах дикого типу, наявність ЕР-тілець (Рис. 5.17) [77].

В клітинах паренхіми ДЗР також спостерігалася значна вакуолізації клітин, порівняно з меристемою. Ядро овальної або лопатевої форми, здебільшого, зміщувалося вбік клітини. Гіалоплазма втрачала електронну щільність унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Ендоплазматичний ретикулум був розвинений слабкіше ніж в епідермі, на його цистернах спостерігалися рибосоми. Форма пластид варіювала. Пластиди рідко містили крохмальні зерна. Диктіосоми набували полярності та продукували везикули різного розміру. На відміну від клітин епідерми, в паренхімі ЕР-тільця не спостерігалися.



Рис. 5.17. Фрагмент поздовжнього зрізу клітини епідерми мутанта в ДЗР за умов контролю: Яд – ядерце, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, Кс – клітинна стінка, ЕР – ЕР-тільця (трансмісійна електронна мікроскопія).

Ультраструктурна організація клітин шара кори мутанта в ДЗР в контролі була подібна до такої клітин паренхіми цієї зони (рис. 5.18) Відзначалася прогресуюча вакуолізація клітин, ядро овальної або лопатевої форми, здебільшого, зміщувалося вбік клітини або займало центральне положення. Гіалоплазма втрачала електронну щільність унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Окремі цистерни ендоплазматичного ретикулуму різної довжини спостерігалися в цитоплазмі. Форма пластид варіювала. Диктіосоми набували полярності. ЕР-тільця не спостерігалися.

Основний об'єм клітин епідерми, паренхіми та шару кори мутанта в ЦЗР займала центральна вакуоля, що відтісняла до периферії ядро і цитоплазму. Внаслідок різкого зменшення кількості вільних рибосом електронна щільність цитоплазми значно знижувалася.



Рис. 5.18. Ультраструктурна організація шару кори мутанта в ДЗР в контролі: 1 – епідерма, 2 – паренхіма, 3 – ендодерма, 4 – шар кори мутанта, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

За умов кліностатування ультраструктурна організація клітин ростових зон коренів у дикого типу та мутанта була подібна до контролю.

У A. thaliana дикого типу в клітинах протодерми (рис. 5.19, а) та периблеми (рис. 5.19, б) за умов кліностатування в центрі спостерігалося округле ядро, що містило дифузний хроматин і ядерце, в деяких ядерцях виявлено ядерцеву вакуоль. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно рибосом. Пластиди або забарвлених округлої видовженої форми хараетеризувалися щільною стромою і слаборозвиненою внутрішньою мембранною системою. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали розвинені кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та

слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися дрібні вакуолі.



Рис. 5.19. Фрагменти поздовжніх зрізів клітин протодерми (а) та периблеми (б) зони меристеми коренів дикого типу за умов кліностатування: Яд – ядерце, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

В епідермальних клітинах ДЗР (рис. 5.20, а) та паренхіми (рис. 5.20, б) дрібні вакуолі збільшувалися в об'ємі та поступово зливалися. Гіалоплазма в процесі росту клітини втрачала електронну щільність унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Ядро овальної або лопатевої форми зазвичай займало центральне положення. Ендоплазматичний ретикулум представлений цистернами різної довжини, на яких щільно розміщувалися рибосоми. Форма та розміри пластид варіювали на зрізах, хоча здебільшого спостерігалися органели овальної або видовженої форми. Деякі пластиди містили крохмальні зерна. Диктіосоми набували характерної для зрілих органел полярності та продукували численні везикули різного розміру. На відміну від клітин паренхіми, в епідермі дикого типу чітко виявлені овальні або видовжені ЕР-тільця.



Рис. 5.20. Фрагменти поздовжніх зрізів клітин епідерми (а) та паренхіми (б) ДЗР коренів дикого типу за умов кліностатування: Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, ЕР – ЕР-тільця (трансмісійна електронна мікроскопія).

В клітинах ЦЗР більшу частину клітин займала центральна вакуоля, яка відтісняла до периферії ядро і цитоплазму з усіма органелами.

У мутанта за умов кліностатування ультраструктурна організація клітин протодерми та периблеми була подібна до такої в контролі. Ультраструктура клітин шара кори мутанта в цій зоні була типовою для клітин меристеми (рис. 5.21).



Рис. 5.21. Ультраструктура клітин шара кори мутанта в зоні меристеми за умов кліностатування: 1 – протодерма, 2 – периблема, 3 – ендодерма, 4 – шар кори мутанта: Яд – ядерце, Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм (трансмісійна електронна мікроскопія).

В центрі клітин розміщувалося ядро з ядерцем. В цитозолі знаходилися вільні рибосоми, які зумовлювали його електронну щільність. Контури органел невиразні на тлі інтенсивно забарвлених рибосом. Пластиди округлої або видовженої форми мали щільну стромою і слаборозвинену внутрішньою мембранну систему. Округлої або видовженої форми мітохондрії мали кристи та матрикс середньої електронної щільності. Нечисленні диктіосоми характеризувалися тонкими контурами мембран та слабковираженою полярністю. Ендоплазматичний ретикулум був слабкорозвиненим, спостерігалися дрібні вакуолі.

У мутанта при переході до ДЗР ультраструктурні перебудови в клітинах епідерми та паренхіми відбувалися подібно до контролю. Спостерігалася прогресуюча вакуолізація, зменшувалась щільності гіалоплазми, диктіосоми набували полярності. В клітинах епідерми відзначено наявність ЕР-тілець, які візуально за розмірами були більшими порівняно з контролем (рис 5.22).



Рис. 5.22. Фрагмент поздовжнього зрізу клітини епідерми мутанта в ДЗР за умов кліностатування: Я – ядро, Пл – пластида, М – мітохондрія, В – вакуоль, ЕПР – ендоплазматичний ретикулюм, Кс – клітинна стінка, ЕР – ЕР-тільця (трансмісійна електронна мікроскопія).

Ультраструктурна організація клітин шара кори мутанта в ДЗР за умов кліностатування була подібна до контролю. Відзначалася збільшена вакуолізація клітин, порівняно з меристемо, ядро овальної або лопатевої форми, здебільшого, зміщувалося вбік клітини. Гіалоплазма втрачала електронну щільність унаслідок зменшення кількості вільних рибосом. Окремі цистерни ендоплазматичного ретикулум різної довжини спостерігалися у цитоплазмі. Форма пластид варіювала. Диктіосоми набували полярності. ЕР-тільця не спостерігалися.

В клітинах ЦЗР основний об'єм займала центральна вакуоля, яка відтісняла до периферії ядро і цитоплазму з усіма органелами.

Аналіз парціальних об'ємів органел в клітинах протодерми зони меристеми *A. thaliana* дикого типу не виявив відмінностей між контролем та експериментом (рис. 5.23). В клітинах епідерми ДЗР (рис. 5.24) встановлено збільшення об'єму вакуолей та ЕР-тілець.



Рис. 5.23. Парціальний об'єм органел (%) у клітинах протодерми коренів *A. thaliana*, утворених *in vitro*. Зовнішній шар – контроль, внутрішній – кліностат.



Рис. 5.24. Парціальний об'єм органел (%) у клітинах епідерми ДЗР коренів *A. thaliana*, утворених *in vitro*. Зовнішній шар – контроль, внутрішній – кліностат.

Дослідження середньої площі зрізів органел виявили статистично достовірне зменшення розмірів мітохондрій у протодермі коренів *A. thaliana* дикого типу за умов кліностатуання (табл. 5.1), їхня кількість у клітинах не змінювалася (табл. 5. 2). В клітинах ДЗР встановлено достовірне зменшення розмірів вакуолей та збільшення їхньої кількості, зменшення розмірів мітохондрій, а також збільшення розмірів ЕР-тілець.

Таблиця 5.1.

Середня площа зрізів органел (мкм²) у клітинах протодерми та епідерми ДЗР (М±m).

Варіант	Протодерма						
досліду							
	Ядро	Вакуолі	Мітохондрії	Пластиди	ЕР-тільця		
Контроль	15,46±	0,43±	$0,23\pm$	$0,414\pm$			
	0,895	0,041	0,007*	0,033	-		
	(n=20)	(n=175)	(n=335)	(n=67)			
Кліностат	$14,70\pm$	0,36±	0,19±	$0,44\pm$			
	0,75	0,044	0,004*	0,037	-		
	(n=20)	(n=185)	(n=322)	(n=62)			
	Епідерма						
Контроль	32,28±	2,11±	0,21±	0,52±	0,09±		
	3,79	0,75*	0,004*	0,04	0,004*		
	(n=20)	(n=110)	(n=267)	(n=40)	(n=190)		
Кліностат	$28,97\pm$	0,93±	0,19±	0,54±	0,13±		
	3,02	0,17*	0,004*	0,06	0,007*		
	(n=10)	(n=208)	(n=284)	(n=50)	(n=224)		

Примітка: * – позначено статистично достовірну різницю між контролем та кліностатом.

Дані ультраструктурного аналізу засвідчили, що в коренях *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo in vitro* з листкових експлантів в контролі, диференціювання клітин ростових зон відбувалося подібно до зародкових коренів *in vivo*. Клітини зони меристеми мали типову організацію, яка змінювалася при переході до ДЗР та ЦЗР. В коренях *scr* мутанта клітини протодерми та периблеми, епідерми та паренхіми мали ультраструктуру подібну до таких дикого типу. Шар кори мутанта в зоні меристеми, ДЗР та ЦЗР за своєю ультраструктурою був подібний до клітин периблеми та

паренхіми. За даними літератури, шар кори мутанта має характеристики як клітин паренхіми, так і ендодерми [96].

Таблиця 5.2.

Середня кількість органел у клітинах протодерми та епідермі ДЗР (M±m).

Варіант	n	Протодерма						
досліду				-				
	20	Вакуолі	Мітохондрії	Пластиди	ЕР-тільця			
Контроль		17,3±1,78	13,9±0,86	3,35±0,39	-			
Кліностат		15,3±1,07	15±1,18	3,1±0,38	-			
Контроль	10	18,33±2,92*	44,67±6,29	6,83±0,83	31,5±8,08			
Кліностат		29,71±3,92*	44,43±5,08	7,14±1,22	33,28±6,18			
Примітка	різницю між							

контролем та кліностатом.

Відмінність шара кори scr мутанта проявляється у структурі клітинної стінки за рахунок нерівномірного утворення поясків Каспарі в місцях контакту з клітинами перециклу [172]. В досліджених зонах коренів ми не відзначили змін у структурі клітинних стінок. Отже добре відомо, що пояски Каспарі починають утворюватися лише наприкінці зони розтягу. Утворенню поясків передують ультраструктурні зміни мітохондрій, диктіосом та ендоплазматичного ретикулюму. 3a даними ультраструктурного аналізу, проведеного Martinka (2012) на коренях А. thaliana екотипу Ler та мутанта scr-3, пояски каспарі утворювалися на відстані 1600 мкм від кореневого чохлика. В цитоплазмі біля пояска спостерігалося скупчення мітохондрій, везикул апарата Гольджі та ендоплазматичного ретикулюму [172].
Отримані дані за умов кліностатування засвідчили, що загалом ультраструктурна організація клітин є подібною до контролю. Зміни спостерігалися лише в кількісних показниках. Нами на коренях *in vitro* вперше показано чутливість мітохондрій клітин протодерми до умов кліностатування. Результати щодо змін мітохондріому в меристемі отримані на зародкових коренів *Vigna radiata* L. [229]. В умовах реальної мікрогравітації відмічено незначне набрякання мітоходрій. У *Pisum sativum* при кліностатуванні дослідниками зазначено, що зміна ультраструктури мітохондрій майже не відбуваються. Відмічено, що ступінь чутливості мітохондрій залежить від тканини [9, 71]. Отже реакція мітохондрій на дію кліностатування може свідчити про найвищу чутливість цих органел до дії цього чинника.

Як в контрольних, так і дослідних коренях, утворених *in vitro* при переході клітин до ДЗР відбувається збільшення іхньої плоші, в той час як парціальні об'єми органел зменшуються. За нашими даними в клітинах ДЗР при кліностатуванні найбільш чутливими органелами були мітохондріїї та ЕР- тільця. Відмічено прогресуючу вакуолізацію, за рахунок збільшення кількості органел. З літератури відомо, що клітини ДЗР є чутливими до дії баготьох внутрішніх та зовнішніх чинників [102, 134, 135], в тому числі й до Показано, що в клітинах ДЗР коренів *P. sativum* кліностатування. зменшувався розмір мітохондрій, підвищувалася електронна щільність їхнього матриксу [9, 71]. На зародкових коренях A. thaliana доведено збільшення кількості та розмірів ЕР-тілець [36]. За нашими даними в коренях A. thaliana дикого типу in vitro при кліностатуванні відбувається лише збільшення ЕР-тілець. Дані літератури свідчать про те, що ЕР-тільця характеризуються високою лабільністю і чутливістю до поранення органів, механічного тиску, впливу токсичних речовин, ураження патогенами та поїдання комахами [54, 123, 193, 194]. Повідомляється, що збільшення середньої площі ЕР-тілець, а також варіабельність їхньої форми можна

розглядати як прояв адаптивної реакції клітин на дію кліностатування [36]. Збільшення ступеня вакуолізації неоднаразово зазначено у роботах інших дослідників [144, 154]. Можливо, що прогресуюча вакуолізація є наслідком збільшення/зменшення синтетичної активності клітин, або посилення гідролазної функції [37].

Уперше проведено порівняльний аналіз структури коренів A. thaliana дикого типу та scr мутанта, сформованих de novo in vitro у стаціонарних умовах і за кліностатування. Він виявив подібність досліджених ознак і клітин гравічутливості ростових власне ступеня 30H кореня, не спеціалізованих до сприйняття гравітації, і гравірецепторних клітин чохлика з такими зародкових коренів проростків. Статистично достовірні зміни розмірів мітохондрій у клітинах протодерми, а також розмірів мітохондрій, ЕР-тілець та ступеня вакуолізації в клітинах епідерми ДЗР є показниками чутливісті до дії кліностатування.

РОЗДІЛ 6

ОРІЄНТАЦІЯ ЕЛЕМЕНТІВ АКТИНОВОГО ТА ТУБУЛІНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛІТИНАХ КОРЕНІВ, СФОРМОВАНИХ *DE NOVO* В УМОВАХ КЛІНОСТАТУВАННЯ

6.1. Цитоскелет в клітинах ростових зон власне кореня

Більшість досліджень, щодо впливу умов реальної та модельованої мікрогравітації на орієнтацію елементів цитоскелету проводилися на зародкових коренях [23, 25, 27, 223, 226, 227]. Нами вперше проведено регенерацію коренів *in vitro* з листкових експлантів трансгенних рослин *A. thaliana* FABD2-GFP та *A. thaliana* GFP-MAP4 і досліджено орієнтацію цитоскелету в клітинах коренів, сформованих *de novo* в контролі та за кліностатування.

В контролі у кореневих апексах трансгенної лінії A. thaliana FABD2-GFP ендоплазматичні і кортикальні актинові мікрофіламенти виявлялися в клітинах протодерми зони меристеми і епідермісу подальших ростових зон (рис. 6.1). В клітинах протодерми зони меристеми ендоплазматичні мікрофіламенти оточували ядро і розходилися від нього радіально до цитоплазматичної мембрани. В ДЗР орієнтація ендоплазматичних мікрофіламентів була подібна до клітин меристеми. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розташовувалися в цитоплазмі між вакуолями. Кортикальні мікрофіламенти в клітинах протодерми (рис. 6.1, а) та епідермі ДЗР (рис. 6.1, б) розташовувалися перпендикулярно і косо щодо поздовжньої осі кореня. У ЦЗР кортикальні мікрофіламенти мали поздовжню орієнтацію (рис. 6.1, в).

При кліностатуванні в протодермі та епідермі ДЗР ендоплазматичні



Рис. 6.1. Актинові мікрофіламенти в клітинах ростових зон кореня *A. thaliana* FABD2-GFP в контролі (а, б, в) і при кліностатуванні (г, д, е): а, г – меристема; б, д – ДЗР; в, е – ЦЗР.

мікрофіламенти оточували ядро і розходилися від нього радіально до цитоплазматичної мембрани. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розташовувалися в цитоплазмі між вакуолями. Кортикальні мікрофіламенти в клітинах протодерми (рис. 6.1, г) та епідермі ДЗР (рис. 6.1, д) орієнтувалися перпендикулярно і косо щодо поздовжньої осі кореня. У ЦЗР кортикальні мікрофіламенти мали поздовжню орієнтацію (рис. 6.1, е) [18, 77]. У кореневих апексах трансгенної лінії *А. thaliana* GFP-MAP4 в контролі орієнтація кортикальних мікротрубочок в протодермі (рис. 6.2, а) та епідермі ДЗР коренів (рис. 6.2, б), утворених *de novo*, представлена



Рис. 6.2. Кортикальні мікротрубочки в клітинах коренів *A. thaliana* GFP-MAP4, утворених *de novo*: a, б, в – контроль; г, д, е – кліностатування; a, г – меристема; б, д – ДЗР; в, г – ЦЗР.

паралельними рядами, розташованими безпосередньо під цитоплазматичною мембраною, перпендикулярно до поздовжньої осі кореня. У ЦЗР мікротрубочки в основному орієнтуються косо щодо поздовжньої осі кореня (рис. 6.2, в). У клітинах ДЗР орієнтація кортикальних мікротрубочок в контролі подібна до клітин меристеми (рис. 6.2, б).

При кліностатуванні кортикальні мікротрубочки В клітинах протодерми розтошовувалися перпендикулярно до поздовжньої осі кореня В клітинах епідерми ДЗР поряд з перпендикулярно (рис. 6.2, г). мікротрубочками, спостерігалися орієнтованими вкорочені та дезорієнтовані кортикальні мікротрубочки (рис. 6.2, д). В клітинах ЦЗР кортикальні мікротрубочки мали косу орієнтацію (рис. 6.2, е) [12, 16, 77].

Нами вперше показано, що орієнтація актинових мікрофіламентів в клітинах ростових зон коренів, утворених *in vitro* подібна до таких ембріональних коренів В контролі. Встановлено, клітинах ЩО В ембріональних коренів актинові мікрофіламенти представлені у вигляді тяжів двох типів: ендоплазматичних, що оточують ядро і розходяться до периферії клітини. Кортикальні розташовуються переважно поперечно до поздовжньої осі кореня в меристемі [65], але в тій чи іншій мірі змінюють орієнтацію на поздовжню в зоні розтягу [200]. За нашими даними ендоплазматичні та кортикальні мікрофіламенти в клітинах протодерми, епідермі ДЗР та ЦЗР коренів, утворених *in vitro*, як в контролі так і при кліностатуванні мали подібне розташування. В літературі є відомості про збільшення кортикальних мікрофіламентів під впливом кліностатування у зародкових коренях, що, на думку авторів, може відбуватися внаслідок трансформації G-актину в F-актин [145]. Таке припущення авторів базується на даних про зростання відносного вмісту іонів кальцію в цих клітинах порівняно з контролем, оскільки роль іонів кальцію в полімеризації актину добре відома.

Результати проведених нами досліджень тубулінового цитоскелету в різних ростових зонах коренів, утворених *de novo*, в контролі і при кліностатуванні показали зміну орієнтації кортикальних мікротрубочок в клітинах ДЗР. Отримані дані узгоджуються з дослідженнями ембріональних коренів у Brassica rapa і A. thaliana [23, 24, 226, 227]. Таким чином, тубуліновий цитоскелет клітин ДЗР є найбільш чутливим до дії модельованої мікрогравітації. У літературі неодноразово привертається увага до можливих причин чітко вираженої гравічутливості тубулінового цитоскелету ДЗР і в першу чергу обговорюється її зв'язок з фізіологічними особливостями цієї ростової зони кореня. Клітини ДЗР відрізняються від інших ростових зон кореня чутливостю до ауксину та іншим ендогенним сигналам і екзогенним факторам таким, як етилен, позаклітинний кальцій, механічний тиск, водний або сольовий стрес, гравітація [102, 134, 135]. Передбачається, що в умовах модельованої мікрогравітації чіткіше виявляється взаємозалежність функціонування актінових і тубулінових елементів цитоскелету, що забезпечує стабільність росту клітин в несприятливих умовах [50]. Цікаво відзначити, що найбільші зміни в орієнтації мікротрубочок в клітинах епідермісу та кори кореня зони розтягу відбуваються під час останньої стадії гравітропічної реакції, тобто при вигині кореня [54]. У зв'язку з цим передбачається тісна взаємодія між орієнтацією мікротрубочок і концентрацією ауксина в клітинах [66]. У той час припускається, що реоріентація микротрубочок викликається же автоматично при рості епідермальних клітин під час розтягу. Ця гіпотеза пояснює, чому не тільки ауксин, але й інші ростові фактори впливають на розташування мікротрубочок. При цьому береться до уваги, що поперечна орієнтація мікротрубочек сприяє клітинному росту, а поздовжня пригнічує його.

6.2. Структура клітинних стінок при кліностатуванні

Оскільки в літературі зазначається, що кортикальні мікротрубочки можуть спрямовувати синтез і орієнтацію микрофібрил целюлози – головного компонента клітинних стінок рослин, за допомогою їхньої

взаємодії з целюлозосинтазними комплексами [70], а актиновий цитоскелет забезпечує рухливість везикул Гольджі, що містять целюлозосинтазні комплекси первинної клітинної стінки [101], ми досліджували структуру клітинних стінок та вимірювали їхню товщину в протодерми і епідермі ДЗР коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo* в контролі і при кліностатуванні. В поперечних і поздовжніх клітинних стінках протодерми і ДЗР в контролі розрізнялися тонка пектинова серединна пластинка і мікрофібрили целюлози, занурені в матрикс. Периплазмовий простір варіював по ширині. При кліностатуванні структура поперечних і поздовжніх клітинних стінок була подібна до контролю. Хоча статистично достовірної різниці в товщині клітинних стінок в контролі і експерименті виявлено не було, відзначено тенденцію до потоншення клітинних стінок (табл. 6.1). Одночасно в умовах модельованої мікрогравітації спостерігали певну хвилястість поперечних клітинних стінок в ДЗР (рис. 6.3) [18].

Таблиця 6.1.

Клітинна стінка	Протодерма	ДЗР	Протодерма	Д 3 Р
	Контроль		Кліностат	
Поперечна	0,106±	0,153±	0,103±	$0,155\pm$
	0,006	0,009	0,004	0,07
Поздовжня	0,152±	0,203±	0,143±	0,189±
	0,007	0,007	0,005	0,005
	M±m; n=20;p<0,05			

Ширина клітинних стінок протодерми і ДЗР коренів *in vitro*, (мкм).

Відомо, що в умовах мікрогравітації та кліностатування певним чином змінюється біохімічний склад, а також структура клітинної стінки. Дані, отримані нами на коренях дикого типу *in vitro*, про потоншення та хвилястість клітинних стінок в умовах модельованої мікрогравітації узгоджуються з літературними даними щодо потоншення зовнішніх стінок клітин гіпокотиля та листків у *Impatiens balsamina* L. і *Triticum durum* Desf., описаних після 13 і 16 днів вирощування рослин в умовах космічного польоту [136]. При кліностатуванні (24-240 год) відзначено уповільнення регенерації клітинної стінки у протопластів *Brassica oleracea* L. [137],



Рис. 6.3. Зрізи поперечних (а, в) і поздовжніх (б, г) клітинних стінок ДЗР коренів, утворених *de novo*: а, б – контроль, в, г – кліностатування. Масштаб – 200 нм.

хвилястість клітинних стінок в ДЗР ембріональних коренів Beta vulgaris L. після 7 днів вирощування [227]. Зазначено, що як в умовах мікрогравітації, так і при кліностатуванні, ефект впливу на клітинні стінки і клітину в цілому, залежить від терміну впливу, чим він більший, тип сильніше ефект [136, 225, 227]. Дані про розпушення і потоншення клітинних стінок рослин модельованої мікрогравітації підтверджено В умовах реальної 1 результатами біохімічного аналізу, який виявив зміни в співвідношенні їх компонентів, зокрема зменшення кількості целюлози і збільшення вмісту геміцелюлози [136, 165]. Сучасні дослідженння виявили також зміни експресії генів, що кодують білки, відповідальні за метеболізм компонентів клітинної стінки [86], формування цитоскелету і метаболізм фітогормонів,

що, на думку авторів, може викликати зміни у властивостях клітинної стінки [130].

Результати вперше проведених нами досліджень засвідчили, що при кліностатуванні в коренях *A. thaliana*, сформованих *de novo in vitro* найбільш чутливою зоною є ДЗР. Припускається, що зміни в орієнтаціїї кортикальних мікротрубочок в епідермі ДЗР впливають на структуру поздовжніх клітинних стінок цієї зони.

РОЗДІЛ 7

РОЗПОДІЛ АУКСИНУ В КОРЕНЯХ, СФОРМОВАНИХ *DE NOVO* НА ЛИСТКОВИХ ЕКСПЛАНТАХ

Вважається, що ауксин контролює процеси елонгації, галуження та розвитку органів рослин, а також асиметричного росту – тропізму [189]. Використовуючи трансгенні рослини DR5rev::GFP, нами регенеровано корені in vitro з листкових експлантів і досліджено розподіл ауксинзалежного репортерного білка в зародкових коренях і коренях, утворених de novo, з метою встановлення фізілогічної активності коренів. Показано, що в при вертикальному рості коренів сигнал спостерігався контролі В центральному циліндрі та кореневому чохлику (рис. 7.1, а, б). Після 2-х годин гравістимуляції флюоресценція DR5rev::GFP спостерігалася на фізично нижньому боці коренів. (рис. 7.1, в, г). В умовах кліностатування репортерний білок виявлявся лише в центральному циліндрі та кореневому чохлику (рис. 7.1, д, е) [12, 74]. У коренях, що ростуть вертикально, ауксин транспортується акропетально по центральному циліндру до клітин кореневого чохлика, в яких відбувається його поділ на два потоки, що йдуть базипетально по зовнішніх шарах клітин кори. При гравістимуляції відбувається полярний транспорт ауксину. Згідно теорії Холодного-Вента накопичення фітогормону на фізично нижньому боці коренів у більшій концентрації інгібує розтяг клітин, через що відбувається вигин кореня донизу [98, 115]. Інгібування перерозподілу ауксину при кліностатуванні можна пояснити нездатністю амілопластів виконувати статолітну функцію, тобто сприймати гравітаційний сигнал при постійному обертанні. В умовах симульованої мікрогравітації на прикладі зародкових коренів трансгенних рослин A. thaliana DR5rev::GFP продемостровано відсутність осідання амілопластів та перерозподілу ауксину [251]. В роботі Herranz (2014) із співавторами отримано подібні результати. Накопичення ауксина відмічено



Рис. 7.1. Локалізація (вказано стрілочкам) ауксин-залежного репортерного DR5rev::GFP в коренях *A. thaliana*, утворених з насіння (а, в, д) та в культурі *in vitro* (б, г, е): а, б – контроль, в, г – дві години гравістимуляції; д, е – кліностатування. Масштаб – 50 мкм.

в центрі спокою, клітинах колумели та переферичних клітинах кореневого чохлика [110, 127]. Використання кількісного методу оцінки ауксину у центрі спокою коренів трансгенних рослин *A. thaliana* TAA::TAA1-GFP, які перебували 5 та 8 днів на орбіті, показало відсутність різниці розподілу GFP між коренями що росли вертикакльно у наземному контролі та тими, що перебували в умовах мікрогравітації [106].

Отже за нашими даними, розподіл DR5rev::GFP в зародкових коренях та коренях, сформованих на листкових експлантах в *de novo in vitro* відбувається подібним чином. Гравістимуляція коренів *in vitro* виявила їхню гравічутливість. При кліностатуванні, на відміну від гравістимуляції, відбувається дезорієнтація органів, що гальмує гравірецепцію та перерозподіл ауксин-залежного репортерного білку.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Дані численних космічних і модельних наземних експериментів з рослинами щодо впливу мікрогравітації на клітини, спеціалізовані [28, 46, 140, 246] і не спеціалізовані [9, 15, 23, 24, 25, 71, 120, 154] до сприйняття гравітаційного стимулу, одержані на зародкових коренях, що сформувалися в насінні в гравітаційному полі при 1 g. Для уникнення дії гравітації на перші поділи клітин при утворенні зачатків коренів було запропоновано модель ризогенезу в культурі *in vitro* для досліджень впливу реальної та симульованої мікрогравітації на морфогенез та диференціювання клітин [30]. Слід зазначити відсутність на той час достатніх даних щодо ризогенезу *in vitro* на модельних об'єктах.

Проведені нами дослідження моделей ризогенезу *in vitro* з калусної тканини та листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта в стаціонарних умовах показали, що при культивуванні калусів на середовищі 1/10 МС без вітамінів і гормонів утворення коренів відбувалося по всій поверхні калусної тканини, при чому висока морфогенетична здатність корелювала з наявністю трихом. Відомо, що органогенез в калусі починається після формування меристематичних центрів росту, коли в паренхіматичних клітинах відбуваються біохімічні зміни, які створюють умови для проходження мітозів [119]. Нами показано, що в калусній тканині корені формувалися з морфогенних осередків, які виникали на периферії калуса.

Під час культивування тканин та органів тип експланта, його орієнтація на середовищі [60, 177] визначають процеси ділення, розтягу та диференціювання клітин [6]. Нами показано, що утворення коренів з черешків листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта на середовищі 1/10 МС без вітамінів і гормонів найбільш частіше спостерігалося при розміщенні експлантів абаксіальною стороною на

живильне середовище та розмірі експлантів від 0,9 до 1,2 см. Результати досліджень демонструють залежність реалізації морфогенетичного потенціалу від розміру експлантів та їхній орієнтації на живильному середовищі.

Відомо, що регенерація *in vitro* може відбуватися з певними відхиленнями від норми [67, 103, 118]. Аналіз анатомічної будови коренів, утворених *in vitro* виявив зрощення коренів по всій дожині, зменшення довжини ростових зон та кількості їхніх клітин при ризогенезі з калусної тканини, в той час як корені, сформовані з черешків листкових експлантів за своєю будовою були подібні до зародкових. На підставі отриманих даних модель ризогенезу *in vitro* з листкових експлантів вважається найбільш придатною для дослідів.

Багаторічними дослідженнями встановлено ряд закономірностей впливу мікрогравітації на структурно-функціональну організацію рослин на клітинному та молекулярному рівнях [120, 130, 140, 141, 154, 156, 160, 176, 202, 203, 205, 244]. Проте залишаються дискусійними питання щодо впливу мікрогравітації на проліферацію, ріст і диференціювання клітин, в першу гравірецепторних. Дослідженнями процесів гістогенезу чергу та диференціювання клітин в умовах модельованої мікрогравітації **i**3 використанням моделі ризогенезу in vitro з листкових експлантів A. thaliana дикого типу та scr мутанта нами вперше показано, що диференціювання клітин кореневого чохлика та ростових зон власне коренів *in vitro* за умов модельованої мікрогравітаці відбувається без відхилень від норми.

На рівні ультраструктури доведено диференціювання гравірецепторних клітин кореневого чохлика – статоцитів. Проте статоцити не функціонують в умовах кліностатування, оскільки амілопласти-статоліти позбавлені можливості сприйняття гравітаційного стимулу у разі постійної дезорієнтації проростків по відношенню до вектора гравітації. Амілопласти в таких умовах скупчуються в центрі клітини або знаходяться в різних її частинах так само, як і в зародкових коренях в умовах мікрогравітації. Гістогенез власне кореня відбувався подібно до стаціонарного контролю – кора коренів А. thaliana дикого типу складалася із двох шарів, scr мутант мав мозаїчну структуру: одночасно виявлялися одно,- та двошарова кора. Зміни ультраструктури клітин ростових зон коренів досліджених об'єктів, утворених *in vitro* в умовах кліностатування, стосувалися в основному структури мітохондрій, ступеня вакуолізації клітин, будови клітинних стінок, наявності ЕР-тілець і мали характер, схожий з таким перебудов ультраструктури клітин зародкових коренів інтактних проростків під впливом мікрогравітації або кліностатування [28, 120]. Отже, одержані результати свідчать про подібність ступеня гравічутливості клітин, не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу, та гравірепторних клітин чохликів коренів, утворених *de novo*, з такими зародкових коренів проростків.

Експериментами, проведеними в умовах реальної та модельованої зборки мікрогравітації процеси мікрофіламентів показано, ЩО та мікротрубочок, а також їхня орієнтація в клітинах зародкових коренів в тій чи іншій мірі є гравізалежними [24, 200, 224]. Для прижиттєвої візуалізації орієнтації актинового та тубулінового цитоскелету в коренях in vitro в наших експериментах вперше проведено регенерацію коренів з листкових експлантів трансгенних рослинах A. thaliana GFP-FABD2 та GFP-MAP4 in vitro в умовах кліностатування та показано, що орієнтація актинового цитоскелету в коренях A. thaliana GFP-FABD2 не змінювалася порівняно із контролем. В клітинах протодерми меристематичної зони та епідерми ДЗР і ЦЗР виявлено ендоплазматичні та кортикальні мікрофіламенти. В клітинах меристеми та ДЗР ендоплазматичні мікрофіламенти оточували ядро і разходилися від нього радіально до клітинної стінки; кортикальні – розташовувалися косо та перпендикулярно щодо поздовжньої осі кореня. В ЦЗР ендоплазматичні мікрофіламенти розміщувалися в цитозолі між вакуолями, кортикальні мали поздовжню орієнтацію.

На відміну від актинового цитоскелету, в клітинах коренів A. thaliana GFP-MAP4 in vitro знайдено зміни орієнтації мікротрубочок за умов модельованої мікрогравітації. В меристемі та клітинах ЦЗР мікротрубочки розташовувалися поперечно та косо відносно вектора гравітації як в контролі, так і в експерименті. При кліностатуванні в клітинах ДЗР відбувалася дезорієнтація мікротрубочок порівняно з контролем, на підставі чого припускається підвищена гравічутливість тубулінового цитоскелету цієї зони, обумовлюється 11 специфічними фізіологічними ЩО властивостями. В літературі зазначається, що кортикальні мікротрубочки можуть спрямовувати синтез і орієнтацію мікрофібрил целюлози клітинних стінок головного компонента рослин, при взаємодії 3 целюлозосинтазними комплексами [70], а актиновий цитоскелет забезпечує рухливість везикул Гольджі, що містять целюлозосинтазні комплекси первинної клітинної стінки [101].

Дослідження структури та товщини клітинних стінок в протодермі та епідермі ДЗР коренів *A. thaliana* дикого типу, утворених *de novo*, в контролі і при кліностатуванні, виявили в поперечних і поздовжніх клітинних стінках цих зон пектинову серединю пластинку і мікрофібрили целюлози, занурені в матрикс. За умов кліностатування виявлено тенденцію до потоншення клітинних стінок, що узгоджується з літературними даними щодо їхнього потоншення та активації целюлази та пектинази в зародкових коренях в умовах мікрогравітації [136, 137, 154]. Хвилястість поперечних клітинних стінок в ДЗР в умовах кліностатування, на відміну від контролю, ймовірно, пов'язана із змінами в орієнтації тубулінових мікротрубочок.

Використовуючи трансгенні рослини DR5rev::GFP, ми дослідили розподіл ауксин-залежного репортерного білка в зародкових коренях і коренях, утворених *de novo* з листкових експлантів. Показано, що в коренях,

які росли вертикально, репортерний білок локалізувався в центральному циліндрі та кореневому чохлику. Після 2-х годин гравістимуляції флюоресценція DR5rev::GFP спостерігалася на фізично нижньому боці коренів. В умовах кліностатування репортерний білок виявлявся лише в центральному циліндрі та кореневому чохлику. Отже за нашими даними, в зародкових коренях та коренях, сформованих на листкових експлантах de novo in vitro, ауксин розподіляється подібним чином в контролі та експериментальних умовах, тобто корені *in vitro* відчувають та можуть гравітаційний стимул. Постійне сприймати обертання об'єкту при горизонтальному кліностатуванні, що моделює відсутність гравітаційного вектора в космічному польоті, гальмує гравітропічну реакцію кореня, позбавляючи амілопласти-статоліти можливості сприймати гравітаційний стимул, і таким чином блокуючи наступний крок – полярний транспорт ауксину, що підтверджує придатність кліностатування для відтворення біологічних ефектів реальної мікрогравітації в космічносу польоті.

Загалом, результати проведених досліджень чітко демонструють подібність анатомічної структури та диференціювання клітин коренів А. thaliana дикого типу та scr мутанта, утворених in vitro до зародкових коренів. Експериментами i3 застосуванням кліностатування та гравістимуляції показано, що гравічутливість коренів, утворених **i**3 листкових експлантів *in vitro*, не відрізняється від такої коренів *in vivo*. Отже, на дискусійне питання, чи впливає мікрогравітація на гістогенез і диференціювання рослинних клітин, одержані дані дають однозначну відповідь: в умовах модельованої мікрогравітації рослинні клітини in vitro зберігають здатність до повної реаізації генетичної інформації в індукції ризогенезу та подальшого росту коренів. Модель ризогенезу із листкових експлантів in vitro пропонується використання космічних для в експериментах та інших дослідженнях з космічної біології.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження процесу ризогенезу в калусній культурі та на листкових експлантах *A. thaliana* дикого типу, *scr* мутанта та трансгенних ліній GFP-FABD2, GFP-MAP4 і DR5rev::GFP в стаціонарному контролі та під впливом горизонтального повільного кліностатування, дозволили отримати нові дані щодо індукції ризогенезу *in vitro*, структурнофункціональної організації та гравічутливості коренів, утворених *de novo* в умовах модельованої мікрогравітації.

1. Підібрано умови індукції ризогенезу в калусній культурі та на черешках листкових експлантів. Встановлено, що формування коренів у калусній культурі відбувається шляхом утворення морфогенних осередків на периферії калуса, на черешках листкових експлантів – за рахунок поділу клітин камбію, частіше у базальній частині черешка при орієнтації листкового експланту нижньою стороною по відношенню до живильного середовища.

2. За анатомічною будовою корені на листкових експлантах дикого типу та *scr* мутанта подібні до зародкових коренів, певні відмінності виявлено за кількісними показниками. Ризогенез в калусній культурі відбувається з морфологічними та анатомічними відхиленнями.

3. Формування двох шарів клітин кори у *A. thaliana* дикого типу і мозаїчної структури у *scr* мутанта *in vivo* та *in vitro* за стаціонарних умов і при кліностатуванні свідчить про генетичну детермінованість і стабільність диференціювання клітин кореня не залежно від функціонального навантаження.

4. Формування гравірецепторного апарату кореневого чохлика в коренях, утворених *in vitro* за умов кліностатування, коли амілопласти

позбавлені можливості сприймати гравітаційний стимул, вказує на генетичну детермінованість диференціювання клітин кореневого чохлика.

5. Культивування коренів *in vitro* при кліностатуванні призводить до зміни розмірів мітохондрій у клітинах протодерми та епідерми ДЗР, збільшення розмірів ЕР-тілець та посилення вакуолізації в клітинах епідерми ДЗР, при сталості інших основних ознак ультраструктурної організації клітин ростових зон коренів.

6. Орієнтація елементів актинового і тубулінового цитоскелету в коренях, утворених *in vitro* на листкових експлантатах в стаціонарних умовах, не відрізняється від такої зародкових коренів; при кліностатуванні змінюється орієнтація кортикальних мікротрубочок в клітинах ДЗР.

7. Формування коренів *in vitro* на листкових експлантах за умов кліностатування призводить до певних структурних змін клітинних стінок: тенденції до потоншення поздовжніх та поперечних клітинних стінок в меристемі та ДЗР та хвилястості поперечних клітинних стінок в ДЗР.

8. Локалізація ауксин-залежного репортерного білка в трансгенних рослинах *A. thaliana* DR5rev::GFP при гравістимуляції та кліностатуванні доводить гравічутливість коренів, утворених *in vitro*.

9. За високою частотою ризогенезу, коротким терміном культивування, сталістю анатомічних ознак і збереженням здатності до нормального функціонування коренів, модель ризогенезу *in vitro* на листкових експлантах має переваги для використання в наземних і космічних експериментах, спрямованих на з'ясування значення скалярної величини гравітації у диференціюванні клітин і морфогенезі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Акбердин И.Р. Математическое моделирование метаболизма ауксина в клетке меристемы побега растения / И.Р. Акбердин, Ф.В. Казанцев, Н.А. Омельянчук [и др.] // Вестник ВОГис. – 2009. – Т. 13, 1. – С. 170– 175.
- Алиев А.А. Исследования ультраструктуры растений, культивируемых в условиях космического полета / А.А. Алиев, А.Л. Машинский, У.К. Алекперов [и др] // Изв. Акад. Наук АзербССР. – 1986. – Сер. Биол. Наук, 4. – С. 3–7.
- Альбертс Б. Молекулярная биология клетки / Д. Брей, Дж. Левис, М. Рафф [и др.]. – М.: Мир, 1994. – 539 с.
- Артеменко О.А. Мітотична активність клітин кореневої меристеми паростків гороху в умовах кліностатування / О.А. Артеменко // Вісн. Львів. ун-ту. Серія Біологія. – 2002. – 28. – С. 80–83.
- Атлас ультраструктуры растительных тканей / Под ред. М.Ф. Даниловой и Г.М. Козубова. – Петрозаводок: Карелия, 1980. – 455 с.
- Бабикова А.В. Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабикова, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев // Комаровские чтения. – 2007. – 55. – С. 184–212.
- Бармичева Е.М. Рост и структура клеток кончика корня кукурузы в условиях космического полета / Е.М. Бармичева, В.Г. Гриф, М.Г. Таирбеков // Цитология. – 1989. – 41, 11. – С. 1324–1328.
- Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас / Т.Б. Батыгина Л.: Наука, 1987. 103 с.
- Бриков В.О. Ультраструктура мітохондрій у клітинах різних ростових зон кореня *Pisum sativum* L. при кліностатуванні / В.О. Бриков // Укр. бот. журн. – 2009. – 66, 5. – С. 722–729.

- 10.Булавін І.В. Анатомічна будова та гравітропічна реакція коренів Arabidopsis thaliana L., сформованих de novo за умов симульованої мікрогравітації / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Умань, 9–12 вересня, 2014. – С. 113.
- Булавін І.В. Анатомія та ультраструктура коренів Arabidopsis thaliana в культурі in vitro під впливом кліностатування / І.В. Булавін // Укр. ботан. журн. – 2015. – 72, 2. – С. 180–185.
- 12.Булавін І.В. Гравічутливість коренів, утворених з листкових експлантів Arabidopsis thaliana в культурі in vitro / І.В. Булавін // Вісник Харківського національного аграрного університету. – 2015. – Серія: Біологія 1. – С. 6–1.
- 13.Булавін І.В. Диференціювання клітин коренів Arabidopsis thaliana в культурі in vitro в умовах модельованої мікрогравітаціїї / Булавін І.В. // Тези доп. 14-ї Української конференції з космічних досліджень, 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна. – С. 44.
- 14. Булавін І.В. Дослідження коренів Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре *in vitro* в умовах кліностатування / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Ужгород, 19–23 вересня, 2012. С. 192–193.
- 15. Булавін І.В. Культура рослинних тканин *in vitro* як модель для вивчення біологічних ефектів мікрогравітаціїї на клітинному рівні / І.В. Булавін // XIV міжнародна молодіжна науково-практична конференція «Людина і космос», Дніпропетровськ, 11–13 квітня, 2012. – С. 217.
- 16. Булавін І.В. Ризогенез в культурі *in vitro Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта / І.В. Булавін // Укр. ботан . журн. 2014. Т. 71, 1. С. 79–82.
- 17.Булавин И.В. Морфогенез корней Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре in vitro в условиях симулированной микрогравитации / И.В.

Булавин / Материалы VII Международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы», Харьков, 20–23 ноября, 2012. – С. 11.

- 18.Булавин И.В. Ориентациия цитоскелета в клетках эпидермы корней, образованных *de novo* на листовых эксплантах в условиях клиностатирования / И.В. Булавин // Цитология и генетика. – 2016. – Т. 50, 2. – С. 58–64.
- 19.Булавін І.В. Регенераційна здатність листкових експлантів Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в залежності від їх орієнтації на живильному середовищі / І.В. Булавін // Збірник тез міжнародної конференції «Геноміка рослин та біотехнологія» та другої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23–24 грудня, 2013, Київ, Україна. С. 43.
- 20. Булавин И.В. Ультраструктура гравирецепторных клеток корневого чехлика растений Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре in vitro при клиностатировании / И.В. Булавин / Тези доп. 13-ї Української конференції з космічних досліджень, 2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим. – С. 82.
- Гусева К.Ю. Укоренение *in vitro* сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) / К.Ю. Гусева, И.Д. Бородулина, Е.П. Мякишева [и др.] // Известия АлтГУ. 2013. 3, 79. С. 56–60.
- Емельянова Е.П. Влияние ауксинов на укоренение *in vitro* сортов *Vaccinium uliginosum* L / Е.П. Емельянова // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. 2010. 3-2. С. 67.
- 23. Калініна Я.М. Мікротрубочки в клітинах епідермісу та кори коренів Brassica rapa за умов кліностатування / Я.М. Калініна // Цитология и генетика. – 2006. – 40, 5. – С.21–27.

- 24. Калініна Я.М. Ріст та диференціація клітин кореня *Brassica rapa* L. в умовах мікрогравітації та кліностатування: автореф. дис. отрим. наук. ступеня канд. біол. наук.: спец. / Я.М. Калініна К., 2007. 19 с.
- Калініна Я.М. Ультраструктура кортикальних клітин різних ростових зон кореня *Brassica rapa* за умов кліностатування / Я.М. Калініна // Вісн. Львівськ. ун-ту: Серія Біологія. – 2007. – 43. –С. 221–227.
- 26. Козеко Л.Е. Влияние реальной и моделированной микрогравитации на генную экспрессию белков теплового шока / Л.Е. Козеко // Космічна наука і технологія. – 2007. – 13, 2. – С. 57–61.
- Кордюм Е.Л. Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы / Е.Л. Кордюм, Г.В. Шевченко // Цитология и генетика. 2003. 37, 2. С. 56–68.
- 28. Кордюм Е. Л. Рост и дифференцировка клеток колумеллы корневого чехлика и собственно корня в стационарных условиях и при клиностатировании / Е.Л. Кордюм, Г.И. Мартын, Ю.В. Овчаренко // Цитология и генетика. – 2008. –42, 1. – С. 3–12.
- 29. Кордюм Е.Л. К вопросу о роли амилопластов и ядра статоцитов корневого чехлика в гравирецепции / Е.Л. Кордюм, Дж.А. Гайкема // Докл. НАНУ.- 2001. - 5. - С. 157–161.
- Кордюм Є.Л. Космічна фітобіологія: актуальні напрямки та нові моделі /
 Є.Л. Кордюм, О.С. Талалаєв, В.В. Сарнацька // Екологія та ноосферологія. 2009. 20, 3-4. С. 7–14.
- Кордюм Є.Л. Рослини в космосі / Є.Л. Кордюм, Д.К. Чепмен. К.: Академперіодика, 2007. – 215 с.
- Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. К.: Наук. думка, 2005. 242 с.
- 33. Медведев С.С. Физиологические основы полярности растений / С.С. Медведев – СПб: "Кольна", 1996. – 159 с.

- 34. Панченков Д.Н. Моделирование как подход к изучению хирургической патологии в условиях невесомости / Д.Н. Панченков, Д.А. Астахов, Р. Б. Алиханов [и др.] // Клиническая практика. – 3.– 2011. – С. 78–84.
- 35. Пилипчук Т.И. Регуляторы роста и их влияние на ризогенез микропобегов некоторых сортов садовой группы миниатюрных роз в условиях *in vitro* / Т.И. Пилипчук, И.В. Митрофанова // Актуальные вопросы плодоводства и декоративного садоводства в начале XXI века – Сочи. – 2014. – С. 259–264.
- 36. Романчук С.М. Ультраструктура статоцитів та клітин дистальної зони розтягу в Arabidopsis thaliana за умов кліностатування / С.М. Романчук // Цитология и генетика. 2010. 44, 6. С. 3–8.
- 37. Растительная клетка при изменении геофизических факторов /
 К.М. Сытник, Е.Л. Кордюм, Е.М. Недуха [и др.]. К: Наук. думка, 1984.
 164 с.
- 38. Результаты исследований на биоспутниках / О. Г. Газенко (отв. ред.) [и др.]. М.: Наука, 1992. 430 с.
- 39. Сельдимирова О.А. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы / О.А. Сельдимирова, А.А. Катасонова, Н.Н. Круглова // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2011. – 43, 4. – С. 297–306.
- 40. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятов [и др.]. М.: МГУ, 2004. 312 с.
- 41. Таварткиладзе О. К. Размножение ежевики в культуре *in vitro* / О.К. Таварткиладзе, Н.А. Вечерина // Биологические науки: электронный журнал. 3, 55. С. 28–30. Режим доступа к журн.: http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf

- 42. Таирбеков М.Г. Позиционный гомеостаз клетки и проблема морфогенеза в гравитационном поле / М. Г. Таирбеков // Усп. совр. Биологии. 1990. 109, 1. С. 47– 64.
- 43. Таирбеков М.Г. Развитие изолированных растительных клеток в условиях космического полета (Эксперимент «Протопласт») / М.Г. Таирбеков, Д.А. Климчук, Е.Л. Кордюм [и др.]. // Изв. РАН, сер. Биол. 1992. 1. С. 5–17.
- 44. Таирбеков М.Г. Цитоморфология и ультраструктура корневой меристемы кукурузы в невесомости / М.Г. Таирбеков, В.Г. Гриф, Е.М. Бармичева // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1986. 5. С. 680–687.
- 45. Талалаєв О.С. Низькомолекулярні білки теплового шоку рослин / О.С. Талалаєв // Біополімери і клітина. 2005. 21. С. 392 399.
- 46. Тарасенко В.А. Ультраструктура клеток колумеллы в корневом чехлике арабидопсиса в условиях клиностатирования и микрогравитации: Автореф. дис. канд. биол. наук. / В.А. Тарасенко. – Л., 1985. – 35 с.
- 47. Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* / Л.И. Тихомирова // Turczaninowia 2010. 13, 3. С. 147–151
- Филиппова Д.П. Зависимость процесса ризогенеза у микропобегов розы сорта Ideal от концентрации природного ауксина / Д.П. Филиппова // Біологічні дослідження. Збірник наукових праць. – 2015. – С. 460–463.
- Черевченко Т.М. Перспективы использования тропических орхидей для космических исследований / Т.М. Черевченко, Т.К. Майко, В.Б. Богатырь [и др.] // Космическая биология и биотехнология. К: Наук. думка, 1984. С. 41–45.
- 50. Шевченко Г.В. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корня Arabidopsis thaliana / Г.В. Шевченко // Цитология и генетика. – 2009. – 43, 4. – С. 3 – 11.

- 51. Abilov Z.K. The morphological and functional state of the photosynthetic system of plant cells grown for varying periods under space flight conditions / Z.K. Abilov [et al.] // USSR Space Life Sci. Digest. 1986. 8. P. 15–18.
- 52. Adamchuk N.I. Ultrastructural and functional changes of photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. induced by clinorotation / N.I. Adamchuk // Adv. Space Res. 1998. 21. №. 8. P. 1131–1134.
- 53. Ahkami A.H. Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia* hybrida cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. / A.H. Ahkami, S. Lischewski, K.T. Haensch [et al.] // New Phytol. 2009. 181. P. 613–625.
- 54. Atsushi J. Quantitative analysis of ER body morphology in an Arabidopsis mutant / J. Atsushi [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2009. – 50, 12. – P. 2015– 2022.
- 55. Bainbridge K. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning / K. Bainbridge, S. Guyomarc'h, E. Bayer [et al.] // Genes Dev. 2008. 22. P. 810–823.
- 56. Bairu M.W. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants / M.W. Bairu, M.E. Kane // Plant Growth. Regul. 2011. 63. P. 101 103.
- Balushka F. Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity / F. Balushka, K.H. Hasenstein // Planta. – 1997. – 203. – P. 69–78.
- 58. Bandurski R.S. Results of mid-deck shuttle experiment growth hormone concentration and distribution / R.S. Bandurski, A. Schulze, P. Jensen [et al.] // ASGSB Bulletin. 1991. 5, 1. P. 28.
- 59. Baran E. Simple data analysis forbiologists / E. Baran, F. Warry // Phnom Penh: World Fish Center and the Fisheries Administration. – 2008. – 67 p.
- 60. Bhatia P. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato / P. Bhatia, N. Ashwath, D. J. Midmore [et al.] // In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2005. 41. P. 457–464.

- 61. Binarova P. Gamma-tubulins and their functions in plant cells / P. Binarova,
 V. Cenklova, Z. Pochylova [et al.] // The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for
 Agro-Biotechnology / Eds.: Ya Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets,
 D. Breviario. Dordrech: Spinger, 2008. P. 23–43.
- Blakeslee J.J. Auxin transport / J.J. Blakeslee, W.A. Peer, A.S. Murphy // Curr. Opin. Plant Biol. – 2005. – 8. – P. 494–500.
- Blancaflor E.B. Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots / E.B. Blancaflor, K.H. Hasenstein // Planta. – 1993. – 191, 2. – P. 231–237.
- 64. Blancaflor E.B. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants /
 E.B. Blancaflor // J. Plant Growth Regul. 2002. 21, 2. P. 120–136.
- 65. Blancaflor E.B. The organization of the actin cytoskeleton in vertical and graviresponding primary roots of maize / E.B. Blancaflor, K.H. Hasenstein // Plant Physiol.– 1997. – 113, 4. – P. 1447–1455.
- 66. Blancaflor E.B. Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots / E.B. Blancaflor, K.H. Hasenstein // Protoplasma. - 1995. - 185. - P. 72-82.
- 67. Bobkov S. Obtaining callus and regenerated plants in anther cultures of pea / S. Bobkov // Czech J. Genet. Plant Breed. 2014. 50. P. 123–129.
- Braun M. Centrifugation causes adaptation of microfilaments: studies on the transport of statoliths in gravity sensing *Chara rhizoids* / M. Braun, A. Sievers // Protoplasma. 1993. 174, 1-2. P. 50–61.
- 69. Braun M. Immunocytolocalization of myosin in rhizoids of *Chara globularis* Thuill / M. Braun // Protoplasma – 1996. – 191. – P. 1–8.
- Bringmann M. Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule cellulose synthase nexus unraveled / M. Bringmann, B. Landrein, C. Schudoma // Trends Plant Sci. 2012. 17, 11. P. 666–674.

- Brykov V.O. Ultrastructure and metabolic activity of pea mitochondria under clinorotation / V.O. Brykov, A.G. Shugaev, I.P. Generozova // Cytology and Genetics. – 2012. – 46, 3. – P. 144–149.
- 72. Buchen B. Statoliths pull on microfilaments. Experiments under microgravity
 / B. Buchen, M. Braun, A. Sievers // Protoplasma. 1993. 172. P. 38–42.
- 73. Bulavin I.V. Cortical microtubules orientation in epidermal root cells of distal elongation zone *in vitro* under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of International Conference of Young Scientists "Advances in botany and ecology", Scholkine, 18–22 June, 2013. – P. 214–215.
- 74. Bulavin I.V. Auxin distribution in *Arabidopsis thaliana* roots formed *de novo* under simulated microgravity / I.V. Bulavin // Abstracts of 15th Ukrainian Conference on Space Research, 24–28 August, 2015, Odessa, Ukraine. P. 36.
- 75.Bulavin I.V. In vitro Arabidopsis thaliana root cap structure under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of Plant Biology and Biotechnology International Conference, Almaty, Kazakhstan, May 28–30, 2014. – P. 158.
- 76.Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root growth and anatomy under stationary condition and clinorotation / I.V. Bulavin // ELGRA News, Vol. 28, Biennial Symposium and General Assembly 2013, Vatican City, 11–14 September, 2013. – P. 193.
- 77.Bulavin I.V. "Rhizogenesis *in vitro*" as a model for plant space biology / I. V. Bulavin // Annals of R. S. C. B. 2015. V. 19, 3. P. 1–8.
- Burridge K. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton / K. Burridge, K. Fath // BioEssays. 1989. 10. P. 104 –108.
- Campanoni P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1 naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways / P. Campanoni, P. Nick // Plant Physiol. – 2005. – 37. – P. 939– 994.

- 80. Carde J. P. Electron microscopy of plant cell membranes / J. P. Carde // Meth. Enzymol. – 1987. – 148. – P. 599–622.
- Chapman E. Cytokinin and auxin intersection in root meristem / E. Chapman, M. Estelle // Genome Biology. – 2009. – 10, 2. – P. 210.
- Cherevchenko T. Effect of simulated microgravity on phytohormones and cell ultrastructure of tropical orchids / T. Cherevchenko, N. Zaimenko, T. Majko [et al.] // Adv. Space Res. – 1996. – 17, 6/7. – P. 107-110.
- 83. Chow B. Plant hormone receptors: perception is everything / B. Chow,
 P. McCourt // Genes Dev. 2006. 20. P. 1998–2008.
- 84. Clayton L. Microtubule nucleating sites in higher plant cells identified by an auto-antibody against pericentriolar material / L. Clayton, C. M. Black, C.W. Lloyd // Cell Biol. 1985. 101. P. 319 324.
- 85. Colla G. Growth, yield and reproduction of dwarf tomato grown under simulated microgravity conditions / G. Colla, Y. Rouphael, M. Cardarelli [et al.] // Plant Biosystems. – 2007. – 141, 1. – P. 75–81.
- Correll M.J. Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes / M.J. Correll, T.P. Pyle, K.D. Millar [et al.] // Planta. – 2013. – 238, 3. – P. 519–535.
- 87. Cowles J. Seedling growth and development on space shuttle / J. Cowles,
 R. LeMay, G. Jahns // Adv. Space Res. 1994. 14, 11. P. 3–12.
- 88. Chen X. A simple method suitable to study de novo root organogenesis / X. Chen, Y. Qu, L. Sheng [et al.] // Front. Plant. Sci. 2014. 5. P. 1–6.
- Chi-ni H. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* minima / H. Chi-ni, S. K. Schuyler // Plant cell, tissue and organ culture. 1996. 44. P. 1–6.
- 90. Darbelley N. Elongation and mitotic activity of cortical cells in lentil roots grown in microgravity / N. Darbelley, D. Driss-Ecole, G. Perbal // Plant Physiol. Biochem. – 1989 – 27. – P. 341–347.

- 91. Davies P. J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions / P.J. Davies [eds.] // In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995. P. 1–12.
- 92. De Klerk G.J. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects / G.J. De Klerk, B. Renhoidt-Schmitt, R. Lieberei [et al.] // Biologia Plantarum. 1997. 39, 1. P. 53–66.
- 93. De Micco V. Xylem development and cell wall changes of soybean seedlings grown in space / V. De Micco, G. Aronne, J.P. Joseleau [et al.] // Ann Bot. – 2008. – 101, 5. – P. 661–669.
- 94. Demkiv O.T. Gravireaction of *Ceratodon protonemata* treated with gibberelic acid / O.T. Demkiv, E.L. Kordyum, O.R. Kardash // Adv. Space Res. 1999. 24, 6. P. 717–721.
- 95. De Ruijter N. A. Actin-binding proteins in plant cells / N.A. De Ruijter, A.M Emons // Plant. Biol. – 1999. – 1. – P. 26–35.
- 96.Di Laurenzio L. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root / L. Di Laurenzio [et al.] // Cell. – 1996. – 86. – P. 423–433.
- 97. Diopan V. Phytohormones as important biologically active molecules their simple simultaneous detection / V. Diopan, V. Adam, L. Havel [et al.] // Molecules. 2009. 14. P. 1825–1839.
- 98. Dolan L. Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity / L. Dolan // Genes Dev. – 1998. – 12, 14. – P. 2091– 2095.
- 99. Dong N. Tissue-specific localization and dynamic changes of endogenous IAA during poplar leaf rhizogenesis revealed by *in situ* immunohistochemistry / N. Dong, D. Pei, W. Yin // Plant Biotechnol. Rep. – 2012. – 6, 2. – P. 165–174.

- 100. Driss-Ecole D. Importance of the l g controls in interpreting the results of an experiment on plant gravitropism / D. Driss-Ecole, G. Perbal // Malaga. 1989. P. 334. (Preprint of the 40th Congress of IAF, Malaga).
- 101. Endler A. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis* / A. Endler,
 S. Persson // Mol. Plant. 2011. 4, 2. P. 199–211.
- 102. Fasano J. M. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch / J.M. Fasano, G.D. Massa, S. Gilroy // J. Plant Growth Regul. 2002. 21, 2. P. 71–88.
- 103. Fauguel C.M. Anatomy of normal and hyperhydric sunflower shoots regenerated *in vitro* / C.M. Fauguel, T.A. Vega, G. Nestares [et al.] // Helia. – 2008. – 31, 48. – P. 17–26.
- 104. Ferl R. J. Plants in space / R.J. Ferl, R. Wheeler, H.G. Levine [et al.] // Curr. Opin. Plant Biol. – 2002. – 5. – P. 258–263.
- 105. Ferl R.J. Spaceflight induces specific alterations in the proteomes of *Arabidopsis* / R.J. Ferl, J. Koh, F. Denison // Astrobiology. – 2015. – 15, 1. – P. 32–56.
- 106. Ferl R.J. The effect of spaceflight on the gravity-sensing auxin gradient of roots: GFP reporter gene microscopy on orbit / R.J. Ferl, A.L. Paul // Microgravity. – 2016. – 2. – P. 15023. Doi:10.1038/npjmgrav.2015.23
- 107. Fosket D.E. Plant Growth and Development / D.E Fosket. San Diego: Academic Press, 1992. – 340 p.
- 108. Friml J. Endoplasmic reticulum: the rising compartment in auxin biology /
 J. Friml, A.R. Jones // Plant Physiol. 2010. 154. P. 458–462.
- 109. Friml J. Lateral relocation of auxin efflux regulator AtPIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* / J. Friml, J. Wisniewska, E. Benkova [et al.] // Nature. - 2002. - 415. - P. 806-809.
- 110. Fortunati A. Root growth pattern is altered by simulated space environment (SSE): effect of microgravity and radiations / A. Fortunati // CAREX

(Coordination Action for Research Activities on life in Extreme Environments). – 2010.

- 111. Gardiner J. The evolution and diversification of plant microtubuleassociated proteins / J. Gardiner // Plant J. – 2013. – 75, 2. – P. 219–229.
- 112. Garsia-Luis A. Explant orientation and polarity determine the the morphogenic response of epicotyl segments of troyer citrange / A. Garsia-Luis, Y. Bordon, J.M. Moreira-Dias [et al.] // Ann. Bot. – 1999. – 84, 6. – P. 715–723.
- 113. Galweiler L. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue / L. Gälweiler, C. Guan, A. Muller [et al.] // Science. 1998. 282. P. 2226–2230.
- 114. Geisler M. Auxin transport during root gravitropism: transporters and techniques / Geisler M, Wang B, Zhu // J.Plant Biol. – 2014. – Suppl. 1. – P. 50–7.
- 115. Geisler M. TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistancelike transporters AtPGP1 and AtPGP19 / M. Geisler, H.U. Kolukisaoglu, R. Bouchard [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2003. – 14. – P. 4238–4249.
- Gilroy S. Plant tropisms / S. Gilroy, P.H. Masson. Oxford: UK Blackwell Publishing, 2008. – P. 197.
- 117. Gray S.W. Cellular changes in wheat seedlings during orbital flight / S.W.
 Gray, B.F. Edwards // Life Sci. Space Res. 1971. 9. P. 113–118.
- Halperin W. Adventive embryo in tissue cultures of the wild carrot *Daucus* carota / W. Halperin, D. F. Wetherell // Amer. J. Bot. – 1964. – 51, 3. – P. 274–283.
- 119. Halperin W. Morphogenesis in cell cultures / W. Halperin // Annu. Rev.
 Plant. Physiol. 1969. 20. P. 395–418.
- Halstead T.W. Plants in space / T.W. Halstead, F.R. Dutcher // Annu. Rev.
 Plant. Physiol. 1987. 38, 1. P. 317–345.

- 121. Hasenstein K.H. Plant responses to gravity-insights and extrapolations from ground studies / K.H. Hasenstein // Gravit. and Space Res. 2011. 22, 2. P. 21–32.
- 122. Hausmann N. Cytosolic calcium, hydrogen peroxide and related gene expression and protein modulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures respond immediately to altered gravitation: parabolic flight data / N. Hausmann, S. Fengler, A. Henning [et al.] // Plant Biol. – 2014. – 16. – P. 120–128.
- 123. Hayashi Y. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis* / Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada [et al.] // Plant Cell Physiol. 2001. 42. P. 894–899.
- 124. Hensel W. Cytodifferentiation of polar plant cells: formation and turnover of endoplasmic reticulum in root statocytes / W. Hensel // Exp. Cell Res. – 1987. – 172, 2. – P. 377–384.
- 125. Hensel W. Demonstration of microfibrils in statoytes of cress roots / W. Hensel // Die Naturwissenchaften. – 1986. – 73. – P. 510–511.
- 126. Hensel W. Effects of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and on the graviresponse of roots / W. Hensel, A. Sievers // Planta. 1980. 150. P. 338– 346.
- 127. Herranz R. Mechanisms of disruption of meristematic competence by microgravity in *Arabidopsis* seedlings / R. Herranz, A.V. Miguel , Y. Khaled [et al.] // Plant signal. behav. – 2014. – 9, 4. – P. 124.
- Hoson T. Comparison of the outer and inner epidermis: inhibition of auxininduced elongation of maize coleoptiles by glucan antibodies / T. Hoson, Y. Masuda, D. J. Nevins // Plant Physiol. – 1992. – 98, 4. – P. 1298–1303.
- 129. Hoson T. Growth and cell wall changes in rice roots during spaceflight / T. Hoson, K. Soga, K. Wakabayashi [et al.] // In: Roots: The dynamic interface between plants and the earth. Springer Netherlands, 2003. P. 19–26.

- 130. Hoson T. Plant growth and morphogenesis under different gravity conditions: relevance to plant life in space / T. Hoson // Life. 2014. 4, 2. P. 205–216.
- 131. Hughes K.W. In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems / K.W. Hughes // Env. Exp. Bot. – 1981. – 21, 3–4. – P. 281–288.
- 132. Ingber D. How cells (might) sense microgravity / D. Ingber // FASEB J. –
 1999. 13. P. 3–15.
- 133. Ingber D.E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction / D.E. Ingber // Ann. Rev. Physiol. – 1997. – 59. – P. 575–559.
- 134. Ishikawa H. Specialized zones of development in roots / H. Ishikawa,
 M.L. Evans // Plant Physiol. 1995. 109, 3. P. 725–727.
- 135. Ishikawa H. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity / H. Ishikawa, M. L. Evans // Plant Physiol. 1993. 102, 4. P. 1203–1210.
- 136. Nedukha E.M. Effects of clinorotation on polysaccharide content in regenerated walls of *Brassica oleracea* L. protoplasts / E.M. Nedukha, E.L. Kordyum, I.I. Ovruts'ka // Dopov. Nats. Akad. Nauk Ukraine. – 1996. – 4. – P. 129–132.
- 137. Nedukha E.M. Effects of microgravity on the structure and function of plant cell walls / E.M. Nedukha // Int. Rev. Cyt. – 1997. – 170. – P. 39–77.
- Kaminskyj S.G.W. Integrin and spectrin homologues and cytoplasm-wall adhesion in tip growth / S.G.W. Kaminskyj, I.B. Heath // J. Cell Sci. – 1995. – 108. – P. 849–856.
- 139. Katoda A. Reorganisation of the cortical cytoskeleton in tip-growing fern protonemal cells during phytochrome-mediated phytotropism and blue lightinduced apical swelling / A. Katoda, M. Wada // Protoplasma. – 1992. – 166, 1–2. – P. 35–41.

- 140. Kiss J.Z. Spaceflight experiments with *Arabidopsis* starch-deficient mutants support a statolith-based model for graviperception / J.Z. Kiss, R.E. Edelmann // Adv. Space Res. 1999. 24, 6. P. 755–762.
- 141. Kittang J. A-I. The utilization of plant facilities on the international space station – the composition, growth, and development of plant cell walls under microgravity conditions / J.A-I. Kittang, T. Hoson, T.-H. Iversen // Plants. – 2015. – 4. – P. 44–62.
- 142. Klimchuk D. Structural and functional organization of regenerated plant protoplasts exposed to microgravity on Biokosmos -9/ D. Klimchuk, E. Kordyum, O. Rasmussen [et al.] // Adv. Space Res. 1992. 12, 1. P. 133–140.
- 143. Klymchuk D.O. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity / D.O. Klymchuk, E.L. Kordyum, T.V. Vorobyova [et al.] // Adv. Space Res. – 2003. – 31, 10. – P. 2283–2288.
- 144. Kochubey S.M. Microgravity affects the photosynthetic apparatus of *Brassica rapa* L. / S.M. Kochubey, N.I. Adamchuk, E.I. Kordyum [et al.] // Plant Biosystems. 2004. 138, 1. P. 1–9.
- 145. Kozeko L.Y. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation / L.Y Kozeko. [et al.] // J. Gravit. Physiol. – 2005. – 12, 1. – P. 187–188.
- 146. Kozeko L.Ye. Altered gravity effect on the heat shock protein level in plant
 / L.Ye. Kozeko, E.L. Kordyum // J. Gravit. Physiol. 2006. 13. P. 117– 118.
- 147. Kozeko L.Ye. Effect of hypergravity on the level of heat shock proteins 70 and 90 in pea seedlings / L.Ye. Kozeko, E.L. Kordyum // Microgravity Sci. Techn. – 2009. – 21, 1. – P. 175–178.
- 148. Kozeko L.Ye. Heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings under clinorotation of different duration / L.Ye. Kozeko, E.L. Kordyum // J. Gravit. Physiol. – 2007. – 14. – P. 115–116.
- 149. Kozeko L.Ye. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response / L.Ye. Kozeko, E.L. Kordyum // Microgravity Sci. Techn. – 2006. – 18. – P. 254–256.
- 150. Kordyum E.L. Application of GFP-technology for cytoskeleton visualization on board the International Space Station / E.L. Kordyum, G.V.Shevchenko, A.Yemets [et al.] // Acta Astronautica. – 2005. – 56. – P. 613–621.
- 151. Kordyum E.L. A role of cytoskeleton in gravisensitivity of a plant cell: experimental data and hypotheses / E.L. Kordyum, G.V. Shevchenko // Tsitol. Genet. - 2003. - 37, 2. - P. 56–68.
- 152. Kordyum E.L. A role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity and Ca2+-signaling in microgravity // Cell. Biol. Intern. 2003. 27. P. 219–221.
- Kordyum E.L. Biological effects of weightlessness at cellular and subcellular levels / E.L. Kordyum, K.M. Sytnik // Physiologist. – 1983. – 26, 6. – P. 141–142.
- 154. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating
 / E.L. Kordyum // Int. Rev. Cyt. 1997. 171. P. 1–78.
- 155. Kordyum E.L. Calcium signaling in plant cells in altered gravity /
 E.L. Kordyum // Adv. Space Res. 2003. 32, 8. P. 1621–1630.
- 156. Kordyum E.L. Effects of altered gravity on plant cell processes: Results of recent space and clinostatic experiments / E.L. Kordyum // Adv. Space Res. – 1994. – 14, 8. – P. 77–85.
- 157. Kordyum E.L. Gravisensitivity of plant cells: Experimental data and hypotheses / E.L. Kordyum // J. Gravit. Physiol. 2002. 9. P. 219–220.
- 158. Kordyum E. L. *In vitro* root development in *Arabidopsis thaliana* wild type and *scr* mutants under clinorotation / E.L. Kordyum, V.V. Sarnatska, A.S. Talalaiev [et al.] // J. Gravit. Physiol. – 2008. – 15. – P. 165–166.

- 159. Kordyum E. L. Plant cell gravisensitivity: results and prospects / E.L. Kordyum, G.V. Shevchenko // Botany and mycology: modern horizons. 2007, Kyiv. P. 123–135.
- 160. Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity / E.L. Kordyum // Plant. Biol. (Stuttg). 2014. Suppl. 1. P. 79–90. Doi: 10.1111/plb.12047.
- 161. Kordyum E.L. The role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity / E.L. Kordyum, G. V. Shevchenko, Y. I. Kalinina [et al.] // The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology / Blume Ya., Baird W. V., Yemets A. I. [et al.] [eds.]. – Dordrech: Spinger, 2008. – P. 173–198.
- Krikorian A. D. Morphoganic response of cultured totipotent cells of carrot to zero gravity / A. D. Krikorian, F. C. Steward // Science. – 1978. – 200. – P. 67–68.
- 163. Kuang A. Dynamics of storage reserve deposition during *Brassica rapa* L. pollen and seed development in microgravity / A. Kuang, A. Popova, M. Musgrave // Intern. J. Plant Sci. 2005. 16. P. 85–96.
- 164. Kwon T.J. Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development / T. J. Kwon, A. Sparks, J. Nakashima // Am. J. Bot. – 2015. – 102. – P. 21–35.
- 165. Laurinavichius R.S. Metabolism of pea plants grown under space flight conditions / R.S. Laurinavichius, A.V. Yaroschus, A. Marchukajtis // Biologicheskii issledovaniya na orbitalnikh stanziyakh Salyut / Dubinin N. P. [eds.]. – M.: Nauka, 1984. – P. 96–102.
- 166. Leach J.A. Plants, plant pathogen, and microgravity deadly trio / J.A. Leach, M. Ryba-White, Q. Sun // Gravit. Space Biol. Bull. 2001. 14. P. 15–23.

- 167. Lee J.S. Reversible loss of gravitropic sensitivity in maize roots after tip application of calcium chelators / J.S. Lee, T.J. Mulkey, M.L. Evans // Science. – 1983. – 220. – P. 1375–1376.
- 168. Lorenzi G. Root growth and statocyte polarity in lentil seedling roots grown in microgravity or on slowly rotating clinostat / G. Lorenzi, G. Perbal // Physiol. Plant. – 1990. – 78. – P. 532–537.
- MacCleery S.A. Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis* / S.A. MacCleery, J.Z. Kiss // Plant Physiol. – 1999. – 120. – P. 183–192.
- 170. Matia I. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight / I. Matia, F. Gonzalez-Camacho, R. Herranz [et al.] // J. Plant. Physiol. 2010. 167. P. 184–193.
- 171. Marc J.A GFP-MAP4 reporter gene for visualization cortical microtubule rearmaments in living epidermal cells / J.A. Marc, C. Grander, C. Brincat et al // Plant Cell. – 1998. – 10. – P. 1927–1939.
- 172. Martinka M. Endodermal cell-cell contact is required for the spatial control of casparian band development in *Arabidopsis thaliana* / Martinka M, Dolan L, Pernas M. [et al.] // Ann Bot. – 2012. – 110, 2. – P. 361–371.
- 173. Matson J. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development /
 J. Matson, W. Ckurshumova, T. Berleth // Plant Physiol. 2003. 131, 3. P. 1327–1339.
- 174. Maher E. P. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered response to auxins and gravity / E.P. Maher, S.J. Martindale // Biochem. Genet. 1980. 18. P. 1041–1053.
- 175. Marchant A. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues / A. Marchant, J. Kargul, S.T. May [et al.] // The EMBO J. 1999. 18. P. 2066–2073.
- 176. Mazars C. Microsome-associated proteome modifications of *Arabidopsis* seedlings grown on board the international space station reveal the possible

effect on plants of space stresses other than microgravity / C. Mazars, C. Brière, S. Grat [et al.] // Plant Signal Behav. – 2014. – 9, 9. – P. 29637.

- 177. Mazumdar P. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Jatropha curcas* L. / P. Mazumdar, A. Basu, A. Paul [et al.] // South Afr. J. Bot. 2010. 76. P. 337–344.
- 178. Meagher R. B. Diversity of plant actins / R.B. Meagher, B.G. McLean // Cell Motil. Cytoskelet. – 1990. – 16. – P. 164–166.
- Medvedev S. S. Calcium signaling system in plants / S.S. Medvedev // Russ. J. Plant Physiol. – 2005. – 52. – P. 249.
- 180. Merkys A.J. Growth, development, anatomy and morphological structure of *Arabidopsis thaliana* / A.J. Merkys, R.S. Laurinavičius, A.V. Jarosius [et al.].
 // Heynh. under spaceflight conditions. Institute of Botany, Academy of Science of the Lithuanian SSR, Vilnius, 1987. P. 105–116.
- 181. Merkys A.J. The state of gravity sensors and peculiarities of plant growth during different gravitational loads / A.J. Merkys, R.S. Laurinavichius, OJ. Rupainene [et al.] // Adv. Space Res. – 1983. – 3, 9. – P. 211–219.
- 182. Moller B. Auxin control of embryo patterning / B. Moller, D. Weijers // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2009. – 1, 5. – P. 1–13.
- 183. Moore R. How roots perceive and respond to gravity / R. Moore, M.L. Evans // Am J Bot. – 1986.– 73, 4. – P. 574-587.
- 184. Moore R. Influence of microgravity on cellular differentiationin root caps of *Zea mays* / R. Moore, W.M. Fondren, C.E. McClelen [et al.] // Am. J. Eor. – 1987. – 74. – P. 1006–1012.
- 185. Moore R. Influence of microgravity on root cap regeneration and the structure of columella cells in *Zea mays* / R. Moore, W.M. Fondren, C.E. McClelen [et al.] // Am. J. Eor. – 1987. – 74. – P. 218–223.

- 186. Moore R. The influence of microgravity on the formation of amyloplasts in columella cells of *Zea mays* L. / R. Moore, W.M. Fondren, E. C. Koon // Plant Physiol. – 1986. – 82. – P. 867–868.
- 187. Morita M. T. Gravity sensing and signaling / M.T. Morita, M. Tasaka // Current opinion in plant biology. – 2004. – 7, 6. – P. 712–718.
- 188. Mravec J. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter / J. Mravec, P. Skůpa, A. Bailly [et al.] // Nature. – 2009. – 459. – P. 1136–1140.
- 189. Muday G.K. Auxin transport and the integration of gravitropic growth / G.K. Muday, A. Rahman // Plant tropisms / Gilroy S., Masson P. [eds.]. Blackwell Publishing, 2007. P. 47–78.
- 190. Muday G. Interaction between the actin cytoskeleton and an auxin transport protein / G. Muday // Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions / C. J. Staiger, F. Baluška, D. Volkmann [et al.] [eds.]. – Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 2000. – P. 541–556.
- 191. Musgrave M.E. Changes in *Arabidopsis* leaf ultrastructure, chlorophyll and carbohydrate content during spaceflight depend on ventilation / M.E. Musgrave, A. Kuang, C.S. Brown [et al.] // Ann. Bot. 1998. 81, 4. P. 503–512.
- 192. Nace G.W. Gravity and positional homeostasis of the cell / G.W. Nace // Adv. Space Res. – 1983. – 3, 9. – P. 159–168.
- 193. Nagano A. J. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana* / A.J. Nagano, Y. Fukao, M. Fujiwara [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2008. – 49. – P. 969– 980.
- 194. Nagano A.J. Quantitative analysis of ER body morphology in an *Arabidopsis* mutant / A.J. Nagano, A. Maekava, R.T. Nakano [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2009. – 50, 12. – P. 2015–2022.

- 195. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants / P. Nick // Int.
 Rev. Cyt. 1998. 184. P. 33-80.
- 196. Ortuno A. Changes in the concentration of indole-3-acetic acid during the growth of etiolated lupin hypocotyls / A. Ortuño, J. Sanchez-Bravo, J.R. Moral [et al.]. Physiol Plant. 1990. 78. P. 211–217.
- 197. Parry G. Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carriermutation aux1 / G. Parry, A. Delbarre, A. Marchant [et al.] // Plant J. – 2001. – 25. – P. 399–406.
- 198. Podlutsky A.G. Ultrastructural analysis of organization of roots obtained from cell cultures at clinostating and under microgravity / A.G. Podlutsky // Adv. Space Res. – 1992. – 12, 1. – P. 93–98.
- 199. Popova A. Peculiarities of lipid accumulation in *Brassica rapa* L. embryos on different stages of development under altered gravity / A. Popova, A. Konopko // J. Gravit. Physiol. 2004. 11. P. 219–220.
- 200. Pozhvanov G.A. Actin cytoskeleton rearrangements during the gravitropic response of *Arabidopsis* roots / G.A. Pozhvanov, D.V. Suslov, S.S. Medvedev // Cell Tissue Biol. 2013. 7, 2. P. 185–191.
- 201. Paul A.L. Arabidopsis gene expression patterns are altered during spaceflight / A.L. Paul, M. P. Popp, W.B. Gurley [et al.] // Adv. Space Res. – 2005. – 36, 7. – P. 1175–1181.
- 202. Paul A.L. Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight BMC / A. L. Paul, A. K. Zupanska, E. Schultz [et al.]
 // Plant Biol. 2013. 13. P. 112–122.
- 203. Paul A.L. Spaceflight transcriptomes: unique responses to a novel environment / A.L. Paul, A.K. Zupanska, D.T. Ostrow [et al.] // Astrobiology. - 2012. - 12, 1. - P. 40-56.
- 204. Petrásek J. PIN proteins perform a ratelimiting function in cellular auxin efflux / J. Petrásek, J. Mravec, R. Bouchard [et al.] // Science. 2006. 312. P. 914-918.

- 205. Perbal G. Transduction of the gravity stimulus in the root statocyte / G. Perbal, D. Driss-Ecole // Adv. Space Res. 1994. 14, 8. P. 11 19.
- 206. Perbal G. Perception of gravity in the lentil root / G. Perbal, D. Driss-Ecole,
 G. Salle // Naturwissenschaften. 1986. 73. P. 444-446.
- 207. Perbal G. Graviperception of lentil seedlings roots grown in space (Spacelab D1Mission) / G. Perbal, D. Driss-Ecole, G. Rutin [et al.] // Physiol. Plant. – 1987. – 70. – P. 119–126.
- 208. Perbal G. Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity / G. Perbal, D. Driss-Ecole, M. Tewinkel [et al.] // Planta. – 1997. – 203, 1. – P. 57–62.
- 209. Perdue D.O. Calcium in the regulation of gravitropism by light / D.O. Perdue, A.K. La Farve, A.C. Leopold // Plant Physiol. 1988. 86. P. 1276–1280.
- 210. Peret B. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development / B. Peret, K. Swarup, A. Ferguson [et al.] // The Plant cell. 2012. 24. P. 2874–2885.
- 211. Paolicchi F. Effect of clinorotation on in vitro cultured explants of *Mentha piperita* L. / F. Paolicchi , A. Mensuali-Sodi, F. Tognoni // Sci. Hortic. 2002. 92, 3–4. P. 305–315.
- 212. Rani G. Direct rhizogenesis from in vitro leaves of Withania somnifera (L.) Dunal / G. Rani, S. Arora, A. Nagpal // J. of herbs, spices and medicinal plants. – 2003. – 10, 3. – P. 47–54.
- 213. Quilichini T.D. The Microtubule proteome: a role in regulating protein synthesis and import into organelles? / T.D. Quilichini, D.G. Muench // The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology / Ya. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets [et al.] [eds.]. Dordrech: Spinger, 2008. P. 267–281.

- 214. Rasmussen O. The effect of exposure to microgravity on the developmerat and structural organisation of plant protoplasts flown on Biokosmos 9 / O. Rasmussen, D. A. Klimchuk, E. L. Kordyum [et al.] // Physiol. plantarum. 1992. 84. P. 162–170.
- 215. Regnard J. Validity of microgravity simulation models on earth / J. Regnard, M. Heer, C. Drummer [et al.] // Amer. J. Kidney Dis. 2001. 38, 3. P. 668–674.
- 216. Ryba-White M. Growth in microgravity increases susceptibility of soybean to fungal pathogen / M. Ryba-White, O. Nedukha, E. Kordyum // Plant Cell Physiol. – 2001. – 42. – P. 657–664.
- 217. Rumyantseva N.I. Structural changes of cell surface in callus of *Fagopyrum* esculentum Moench. during induction of morphogenesis / N.I. Rumyantseva, V.V. Sal'nikov, V.V. Lebedeva // Rus. J. Plant Physiol. 2005. 52, 3. P. 381–387.
- 218. Sack F.D. Root cap structure in wild type and in a starchless mutant of *Arabidopsis* / F.D. Sack, J.Z. Kiss // Amer. J. Bot. – 1989. – 76. – P. 454–464.
- 219. Sampathkumar A. Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in *Arabidopsis* / A. Sampathkumar, J.J. Lindeboom, S. Debolt [et al.] // Plant Cell. 2011. 23, 6. P. 2302–2313.
- 220. Schmidt A. Signaling to the actin cytoskeleton / A. Schmidt, M. Hall // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1998. 14. P. 305–338.
- 221. Schulze A. Studies on the growth and indole-3-acetic acid and abscisic acid content of *Zea mays* seedlings grown in microgravity / A. Schulze, P.J. Jensen, M. Desrosier [et al.] // Plant Physiol. 1992. 100, 2. P. 692–698.
- 222. Sievers A. Gravity sensing mechanism in plant cell / A. Sievers // ASGSB
 Bulletin. 1991. 4, 2. P. 43–49.

- 223. Sievers A. Role of the cytoskeleton in gravity perception // A. Sievers,
 B. Buchen, D. Volkmann // The cytoskeletal basis in plant growth and form /
 Lloyd C. W. [eds.]. London: Acad. Press, 1991. P. 169–182.
- 224. Skagen E.B. Cortical microtubule reorganization in protoplasts isolated from *Brassica napus* hypocotyl is affected by gravity / E.B. Skagen // J. Gravit. Physiol. – 1998. – 5, 1. – P. 117–120.
- 225. Skagen E.B. Effect of simulated and real weightlessness on early regeneration stages of *Brassica napus* protoplasts / E.B. Skagen, T-H. Iversen // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 2000. 36, 5. P. 312–318.
- 226. Shevchenko G.V. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation / G.V. Shevchenko, Ya. Kalinina, E.L. Kordyum // Adv. Space Res. 2007. 39. P. 1171–1175.
- 227. Shevchenko G.V. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation / G.V. Shevchenko, E.L. Kordyum // Adv. Space Res. 2005. 35, 2. P. 289–295.
- 228. Shibaoka H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules / H. Shibaoka // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. 45. P. 527–544.
- 229. Slocum R.D. Cytological and ultrastructural studies on root tissues / R.D. Slocum, J.J. Gaynor, A.W. Galston // Ann. bot. 1984. 54, 3. P. 65–76.
- 230. Soga K. Growth and morphogenesis of Azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program / K. Soga, A, Kurita, S. Yano [et al.] // Biol. Sci. Space. – 2014. – 28. – P. 6–11.
- 231. Strohm A.K. Molecular mechanisms of root gravity sensing and signal transduction / A.K. Strohm, K.L. Baldwin, P.H. Masson // Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. – 2012. – 1, 2. – P. 276–285.

- 232. Sun T. Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells / T. Sun, S. Li, H. Ren // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 512.
- 233. Sytnik K.M. Ultrastructure of the root meristem and cap in pea seedlings under space flight conditions / K.M. Sytnik, E.L. Kordyum, N.A. Belyavskaya [et al.] // Dokl. Akad. Nauk USSR. – 1982. – Ser. Biol., 6. – P. 78 – 80.
- 234. Sytnik K.M. Biological effects of weightlessness and clinostatic conditions registered in cells of the root meristem and cap of higher plants / K.M. Sytnik, E.L. Kordyum, N.A. Belyavskaya [et al.] // Adv. Space Res.- 1983. 3, 9. P. 251-255.
- 235. Swarup R. AUX/LAX family of auxin influx carriers–an overview /
 R. Swarup, B. Péret // Front. Plant Sci. 2012. 3. P. 225.
- 236. Swarup R. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormonetransport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex / R. Swarup, J. Friml, A. Marchant [et al.] // Genes Dev. – 2001. – 15. – P. 2648–2654.
- 237. Swarup R. Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1 / R. Swarup, J. Kargul, A. Marchant [et al.] // Plant Cell. – 2004. – 16. – P. 3069–3083.
- 238. Swarup R. Root gravitropism requires lateral root capand epidermal cells for transport and response to a mobileauxin signal / R. Swarup, E. M. Kramer, P. Perry [et al.] // Nat. Cell Biol. 2005. 7. P. 1057–1065.
- 239. Taha R. M. Plant regeneration and cellular behaviour studies in *Celosia cristata* grown *in vivo* and *in vitro* / R.M. Taha, S.N. Wafa // Sci. World J. 2012. P. 1–8.
- 240. Talalaev A. Expression of small heat shock proteins in pea seedlings under gravity-altered conditions / A. Talalaev // J. Gravit. Physiol. – 2005. – 12. – P. 203–204.

- 241. Talalaiev A. Expression of messenger RNA of two cytosolic small heat shock proteins under clinorotation / A. Talalaiev // J. Gravit. Physiol. 2006.
 13. P. 115 116.
- 242. Trewavas A.J. Signal perception and transductiuon: the origin of the phenotype / A.J. Trewavas, R. Malho // The Plant Cell. – 1997. – 9. – P. 1181–1195.
- 243. Tripathy B.C. Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space / B.C. Tripathy, C.S. Brown, H.G Levine [et al.] // Plant Physiol. 1996. 110, 3. P. 801– 806.
- 244. Ueda J. Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment / J. Ueda, K. Miyamoto, T. Yuda [et al.] // J. Plant Res. – 1999. – 112, 4. – P. 487–492.
- 245. Ulbrich C. The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells / C. Ulbrich, M. Wechland, J. Pietsch [et al.] // BioMed Res. Intern. – 2014. – 2014. – P. 1–16.
- 246. Volkmann D. Development and gravity sensing of cress roots under microgravity / D. Volkmann, H.M. Behrens, A. Sievers //Naturwissenschaften. - 1986. - 73, 7. - P. 438-441.
- 247. Volkmann D. Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flight of rockets / D. Volkmann [et al.] // Planta. – 1991. – 185. – P. 153–161.
- 248. Volkmann D. Statoliths motions in gravity-perceiving plant cells: does actomyosin counteract gravity / D. Volkmann [et al.] // FASEB J. – 1999. – 13, 1. – P. 143–147.
- 249. Voight B. GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings / B. Voight , A.C.J. Timmers, J. Samaj et al. // Eur J Cell Biol. Vol. 84. 2005. P. 595–608.

- 250. Wabnik K. Prototype cell-to-cell auxin transport mechanism by intracellular auxin compartmentalization / K. Wabnik, J. Kleine-Vehn, W. Govaerts [et al.] // Trends Plant Sci. 2011. 16. P. 468–475.
- 251. Wang H. 2-D Clinostat for Simulated Microgravity Experiments with Arabidopsis Seedlings / Wang H. [et al.] // Micrograv. Sci. Techn. – 2016. – 28, 1. – P. 59–66.
- 252. Wunsch C. Immunocytological detection of myosin in the root tip cells of *Lepidium sativum* / C. Wunsch, D. Volkmann // Eur. J. Cell Biol. 1993. Suppl. 61.– P. 46.
- 253. Zhang Y. Differential protein expression profiling of *Arabidopsis thaliana* callus under microgravity on board the Chinese SZ-8 spacecraft / Y. Zhang, L. Wang, J. Xie [et al.] // Planta. 2015. 241, 2. P. 475–488.
- 254. Zupanska A.K. Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in tissue culture cells of Arabidopsis thaliana / A.K. Zupanska, F.C. Denison, R.J. Ferl [et al.] // Am. J. Bot. 2013. 100, 1. P. 235–248.

ДОДАТОК

<u>Статті:</u>

 Булавін І.В. Ризогенез в культурі *in vitro Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта / І.В. Булавін // Укр. ботан . журн. – 2014. – Т. 71, 1. – С. 79–82.

2. Булавін І.В. Анатомія та ультраструктура коренів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* під впливом кліностатування / І.В. Булавін // Укр. ботан. журн. – 2015. – 72, 2. – С. 180–185.

3. Булавін І.В. Гравічутливість коренів, утворених з листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* / І.В. Булавін // Вісник Харківського національного аграрного університету. – 2015. – Серія: Біологія 1. – С. 6–13.

4. Bulavin I.V. "Rhizogenesis *in vitro*" as a model for plant space biology / I. V. Bulavin // Annals of R.S.C.B. – 2015. – V. 19, 3. – P. 1–8.

5. Булавин И.В. Ориентациия цитоскелета в клетках эпидермы корней, образованных *de novo* на листовых эксплантах в условиях клиностатирования / И.В. Булавин // Цитология и генетика. – 2016. – Т. 50, 2. – С. 58–64.

<u>Тези:</u>

6. Булавін І.В. Культура рослинних тканин *in vitro* як модель для вивчення біологічних ефектів мікрогравітаціїї на клітинному рівні / І.В. Булавін // XIV міжнародна молодіжна науково-практична конференція «Людина і космос», Дніпропетровськ, 11–13 квітня, 2012. – С. 217. (Усна доповідь).

7. Булавін І.В. Дослідження коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупh. в культуре *in vitro* в умовах кліностатування / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Ужгород, 19–23 вересня, 2012. – С. 192–193. (Усна доповідь).

8. Булавин И.В. Морфогенез корней Arabidopsis thaliana (L.) Неупh. в культуре *in vitro* в условиях симулированной микрогравитации / И.В. Булавин / Материалы VII Международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы», Харьков, 20–23 ноября, 2012. – С. 11. (Постерна доповідь).

9. Bulavin I.V. Cortical microtubules orientation in epidermal root cells of distal elongation zone *in vitro* under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of International Conference of Young Scientists "Advances in botany and ecology", Scholkine, 18–22 June, 2013. – P. 214–215. (Усна доповідь).

 Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root growth and anatomy under stationary condition and clinorotation / I.V. Bulavin // ELGRA News, Vol.
 Biennial Symposium and General Assembly 2013, Vatican City, 11–14 September, 2013. – P. 193. (Постерна доповідь).

11. Булавин И.В. Ультраструктура гравирецепторных клеток корневого чехлика растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в культуре *in vitro* при клиностатировании / И.В. Булавин / Тези доп. 13-ї Української конференції з космічних досліджень, 2–6 вересня, 2013, Євпаторія, Крим. – С. 82. (Усна доповідь).

12. Булавін І.В. Регенераційна здатність листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупh. в залежності від їх орієнтації на живильному середовищі / І.В. Булавін // Збірник тез міжнародної конференції «Геноміка рослин та біотехнологія» та другої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23–24 грудня, 2013, Київ, Україна. – С. 43. *(Заочна участь)*.

13. Bulavin I.V. *In vitro Arabidopsis thaliana* root cap structure under clinorotation / I.V. Bulavin // Proceedings of Plant Biology and Biotechnology

International Conference, Almaty, Kazakhstan, May 28–30, 2014. – Р. 158. (Постерна доповідь).

14. Булавін І.В. Диференціювання клітин коренів Arabidopsis thaliana в культурі in vitro в умовах модельованої мікрогравітаціїї / І.В. Булавін // Тези доп. 14-ї Української конференції з космічних досліджень, 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна. – С. 44. (Усна доповідь).

15. Булавін І.В. Анатомічна будова та гравітропічна реакція коренів *Arabidopsis thaliana* L., сформованих *de novo* за умов симульованої мікрогравітації / І.В. Булавін // Матеріали міжнародної конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Умань, 9–12 вересня, 2014. – С. 113. *(Заочна участь)*.

16. Bulavin I.V. Auxin distribution in *Arabidopsis thaliana* roots formed *de novo* under simulated microgravity / I.V. Bulavin // Abstracts of 15th Ukrainian Conference on Space Research, 24–28 August, 2015, Odessa,Ukraine. – Р. 36. (Усна доповідь).