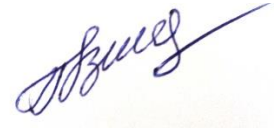


ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

ШЕВЧЕНКО Галина Валеріївна



УДК 576.3:52-423:581.84:58

**ЦИТОСКЕЛЕТ В ПРОЦЕСІ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО
МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА ГІПОКСІЇ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія)

Реферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2024

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Кравець Олена Адольфівна,
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
головний науковий співробітник відділу геноміки та молекулярної біотехнології

доктор біологічних наук, професор
Колупасв Юрій Євгенович,
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,
завідувач лабораторії фізіології та біохімії рослин

доктор біологічних наук, професор
Лихолат Юрій Васильович,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин

Захист відбудеться 20 березня 2024 р. об 11:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького (Осиповського), 2а. Тел/факс: (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» та на офіційному сайті <http://ifbg.or.ua/uk/pidgotovka-kadriv/specializovana-vchena-rada>

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доцент



Наталія ПАСТУХОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сприйняття та трансдукція сигналів зовнішнього середовища сприяють розвитку адаптивної реакції клітини, яка полягає у швидкій перебудові клітинного метаболізму, спрямованій на підтримання росту та забезпечення життєдіяльності рослини. Аналіз клітинних шляхів сприйняття зовнішніх сигналів та їхньої регуляції є вагомим внеском у розуміння механізмів пристосування рослин до варіабельності оточуючого середовища. Одним із клітинних компонентів, який опосередковує сприйняття та реагування рослин на навколишні умови є цитоскелет: мікротрубочки (МТ) – внутрішньо порожні трубки завтовшки 24 нм, сформовані протофіламентами – полімерами з α – та δ - субодиниць тубуліну (Hashimoto 2015; Brouhard and Rice 2018) та полімерні структури (завтовшки 6-7 нм) із глобулярних молекул білка актину – так звані актинові філаменти (АФ) або мікрофіламенти. Специфічна для рослин динамічність цитоскелету визначається як будовою самих МТ і АФ, так і активністю численних асоційованих білків, які регулюють просторове формування мережі цитоскелету та її залучення у життєдіяльність клітини (Staiger and Blanchoin 2006; Struk and Dhonukshe 2014; Krtková et al. 2016), зокрема у цитокінез, позиціонування органел, спрямований внутрішньоклітинний транспорт, екзоцитоз та клітинний сигналінг (Hussey et al. 2006; Higaki et al. 2007; Pleskot et al. 2014). Завдяки зв'язкам цитоскелету із цитоплазматичною мембраною (ЦМ) та клітинною стінкою (КС) формується континуум, функція якого полягає у сприйнятті та передаванні сигналів від біотичних та абіотичних чинників (Wyatt and Carpita 1993; Baluška et al. 2003). Незважаючи на досить розповсюджені дослідження цитоскелету рослин, пізнання його організації та регуляції потребує подальшого вивчення і це спонукає розробляти нові експериментальні підходи. Відомо, що цитоскелет еволюційно сформувався у полі постійного впливу земного тяжіння (1g), тому за його участю визначаються диференціація, полярність, ростові реакції клітин зони розтягу коренів (Кордюм та Шевченко 2003) тощо. Оскільки цитоскелет виступає індикатором реакції

рослинних клітин на зміну полярності та сили тяжіння, широко досліджується організація та динаміка його елементів у полі зміненої сили тяжіння – реальної мікрогравітації в космічному польоті та модельованої в наземних експериментах (Kordyum 1997). Виявлено зміни організації цитоскелету та його транскриптому, які пов'язують із пристосувальними реакціями рослин до цього стимулу (Manzano et al. 2022). Проте багато питань впливу мікрогравітації на цитоскелет залишаються дискусійними, і, насамперед, це стосується функціонування асоційованих із МТ та АФ білків, які регулюють з'єднання та функціональну взаємодію елементів між собою та з ЦМ. Відносно мало відомо про профайли генної експресії, пов'язаної із реорганізацією цитоскелету при мікрогравітації. Знання ролі цитоскелету у пристосуванні рослин до умов зміненої сили тяжіння актуальне для створення біореєнеративних систем життєзабезпечення космонавтів у довгострокових космічних місіях, неодмінним компонентом яких є рослини. Слід зазначити, що в космічному польоті змінюється конвекція повітря, що призводить до клітинної гіпоксії (Porterfield 2002), яка негативно впливає на ріст та розвиток рослин. Визначення реакції цитоскелету на гіпоксію в умовах космосу вимагає знання його організації у рослин, на які даний стимул діє у природних умовах і це підвищує важливість дослідження організації елементів цитоскелету у рослин, онтогенез яких проходить частково у воді, в умовах зниженої біодоступності кисню. Як відомо, у відповідь на нестачу кисню у корі коренів формується аеренхіма (АР) – система внутрішніх порожнин для покращення газообміну між стеблом та коренем (Evans 2003; Visser et al. 2003). Встановлено, що елементи цитоскелету беруть участь у процесах, пов'язаних із формуванням аеренхіми (Kordyum et al. 2019), однак, залишаються невирішеними питання послідовності участі та ролі АФ та МТ у формуванні аеренхіми різних типів у природних умовах і, тим більше, в умовах мікрогравітації. Проведення порівняльних досліджень організації цитоскелету у коренях повітряно-водних а також наземних рослин та рослин, вирощених в умовах кліноостатування вважаємо ефективним для відповіді на такі питання. Окреслені питання участі

МТ та АФ у реакції клітин коренів на зміну сили тяжіння та гіпоксію стали основою для визначення мети і формування завдань роботи.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за держбюджетними темами: «Фенотипічна та генетична пластичність в процесі адаптації рослин до змін навколишнього середовища» (№ ДР0107U000515, 2006-2009 рр.), «Стабільність та пластичність морфогенезу рослин та клітинної організації при змінах водного режиму в природних умовах» (№ ДР0106U000558, 2006-2009 рр.), «Пластичність онтогенезу рослин при змінах водного режиму екотопів: клітинні та молекулярні аспекти» (№ ДР0110U000087, 2010-2014 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті» (№ ДР0112U000059, 2012-2016 рр.), «Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях («Біолабораторія-М»), 2012 р., дисертант – керівник і виконавець), за допомогою грантової підтримки міжнародної програми з обміну науковими кадрами IRSES 612587 (2013-2017), (FP7, Maria Curie Actions) під час стажування в Університеті міста Геттінген (Німеччина) та Університеті міста Аберистуїт (Велика Британія).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – визначити роль кортикальних мікротрубочок, актинових філаментів та експресії генів асоційованих білків цитоскелету у реакціях клітин коренів рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію. Досягнення мети передбачає виконання наступних завдань:

1. Дослідити організацію елементів кортикального цитоскелету (кМТ та АФ) на послідовних стадіях диференціації клітин ростових зон коренів рослин *B. vulgaris*, *Z. mays*, *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium*.
2. Виявити участь МТ та АФ у реакції клітин ростових зон коренів *B. vulgaris*, *Z. mays* та *A. thaliana* на кліноостатування та дію інгібіторів цитоскелету.

3. Дослідити взаємозалежність організації МТ та АФ у клітинах зони розтягу коренів *A. thaliana* та визначити вплив кліноостатування на взаємозалежну організацію елементів цитоскелету.
4. Дослідити вплив оризаліну та цитохалазину D на організацію МТ та АФ (відповідно) у зоні розтягу коренів *A. thaliana* та визначити експресію генів *TUA6* та *ACT2* у коренях під час кліноостатування.
5. Визначити експресію генів *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDd*, *FH1* та *FH4* у клітинах коренів *A. thaliana* при кліноостатуванні та дії оризаліну та цитохалазину D.
6. Дослідити будову аеренхімних порожнин у коренях рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* та визначити її тип.
7. Порівняти показники перекисного окиснення мембрани та ступінь пошкодження ДНК у коренях суходільних та повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica*, *S. latifolium* та *S. sisaroides*.
8. Визначити роль МТ та АФ у формуванні природної аеренхіми коренів *A. plantago-aquatica*, *S. latifolium* та штучно індукованої аеренхіми у коренях *Z. mays*.
9. Проаналізувати роль МТ та АФ у реакціях клітин коренів на кліноостатування та гіпоксію.

Об'єкт дослідження: клітинні механізми адаптації рослин до абіотичного стресу за участі кортикального цитоскелету.

Предмет дослідження: особливості організації та регуляції елементів кортикального цитоскелету асоційованими білками під час реакцій рослин на кліноостатування та гіпоксію.

Методи дослідження: методи клітинної біології – світлова, електронна та конфокальна мікроскопія, класичні цитологічні та імуногістохімічні методи обробки рослинних об'єктів. Метод прижиттєвого спостереження об'єктів за допомогою конфокальної мікроскопії. Молекулярно-генетичні – виділення ДНК та РНК, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (qPCR). Біохімічні –

визначення перекисного окиснення мембран у рослинних об'єктах. Біоінформатичні – робота з білковими та генними базами даних. Методи статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджено кортикальні МТ та АФ на послідовних стадіях розвитку клітин коренів таких видів як *B. vulgaris*, *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium*, на основі чого визначена подібність організації елементів цитоскелету у клітинах ростових зон коренів вищих рослин. Оцінено вплив кліностатування на організацію МТ у ростових зонах коренів *B.vulgaris*, *Z.mays* та *A.thaliana*. Вперше встановлено, що кліностатування сприяє частковій дезорієнтації (близько 10-13%) кМТ від впорядкованого поперечного розміщення у клітинах дистальної зони розтягу кореня (ДЗР) і висунуто припущення, що дезорієнтація кМТ є складовою зміни темпів росту коренів. Припускається, що певний внесок у дезорганізацію кМТ при кліностатуванні складає знижена експресія генів, які кодують мономери тубуліну (*TUA6*) та білок CLASP (*CLASP*). Це може позначатися на порушенні полімеризації МТ та дезорганізації їхньої мережі. На морфологічному та молекулярному рівнях продемонстрований взаємозв'язок між кМТ та АФ у клітинах кори коренів вищих рослин. Виявлена взаємозалежність організації МТ та АФ та експресії їхніх кодуючих генів (*TUA6*, *ACT2*). Вперше встановлено зв'язок між руйнуванням кМТ та зменшенням транскрипції гену *CLASP*, який кодує білок – організатор та стабілізатор мережі МТ, а також між руйнуванням мережі АФ та транскрипцією *FH1* та *FH4*, які кодують форміни – організатори актинової мережі. Окрім того, вперше виявлено залежність експресії *MAP65-1* від дезорганізації АФ.

Вперше визначено, що при кліностатуванні відсутній зв'язок між організацією кМТ та АФ та експресією *TUA6*, *CLASP*, *FH1* та *FH4*, що свідчить про специфічний механізм функціонування кортикального цитоскелету. Припускається, що кліностатування чинить механічний стрес, який полягає у знятті навантаження на елементи кортикального цитоскелету і цей процес регулюється

на генному рівні. Запропонована схема реакції цитоскелету на кліноостатування і його участі у формуванні адаптаційної відповіді.

Вперше визначено специфічність формування аеренхіми (АР) лізигенного типу у повітряно-водної рослини *S.latifolium* та встановлені етапи програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) за участі кМТ під час формування природної АР коренів *A.plantago aquatica*, *S.latifolium* та штучної *Z. mays*. Висловлено припущення про функціональні зміни мережі АФ в процесі розвитку АР коренів. Всебічно проаналізована роль МТ та АФ у реакціях адаптації клітин коренів до механічного стресу та гіпоксії. Результати роботи окреслюють широке коло перспективних досліджень клітин рослин як в умовах мікрогравітації, так і дії інших типів абіотичного стресу.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлені реакції рослинної клітини на механічне навантаження і гіпоксію надають широкі можливості для конструювання рослин, толерантних до несприятливих умов і які можна вирощувати у закритих системах життєзабезпеченні під час космічних польотів. Окрім того, дані щодо реакції цитоскелету на навколишні стимули, зокрема, дезорієнтування у просторі, є цінними для біотехнології сільськогосподарських культур, стійких до механічних ушкоджень стебел під час буревіїв, що запобігає втраті врожаю. Дані роботи можуть бути використані у курсах з клітинної, молекулярної та космічної біології рослин.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною науковою працею, виконаною на основі власних експериментальних розробок та теоретичних узагальнень. Автором дисертаційної роботи самостійно сформульовано її концепцію та розроблено структуру, здійснений аналіз літературних джерел за тривалий період часу, окреслені експериментальні завдання, проведений аналіз експериментів, сформульовані узагальнення та висновки. Основна дослідна робота проведена дисертантом особисто. Інтерпретація та узагальнення частини результатів розділів 4–6 здійснювалися разом із співавторами публікацій. План дисертаційної роботи, вступ та висновки роботи обговорювалися із керівником

відділу клітинної біології та анатомії, член-кореспондентом НАН України, д.б.н., професором Є.Л. Кордюм. Усі наукові узагальнення, висновки, теоретичні положення та припущення сформульовані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на 24-х українських і міжнародних симпозиумах і конференціях, у т.ч. Міжнародній науковій конференції (Київ, 2019); European Low Gravity Research Association (ELGRA) Biennial Symposium and General Assembly (Granada, Spain, 2019; Juan-les-Pins, France, 2017; Vatican, Italy, 2013; Antwerp, Belgium, 2011; Bonn, Germany, 2009; Florence, Italy, 2007); Annual International Gravitational Physiology Meetings (ISGP), (Trieste, Italy, 2010; Cologne, Germany, 2005); Щорічній Українській конференції з космічних досліджень (Київ, 2018; Одеса, 2017, 2015; Євпаторія, 2013; 2012; 2006); 5th Conference of European Plant Science Organization (EPSO), Plants for Life (Olos, Finland, 2010); Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology (Coeur d'Alene, Idaho, USA, 2007); 2-му З'їзді Українського Товариства клітинної біології (Київ, 2007); International Symposium: The Plant Cytoskeleton: Genomic and Bioinformatic Tools for Biotechnology and Agriculture (Yalta, Crimea, 2006); XII з'їзді Українського ботанічного товариства (Одеса, 2006); Society Experimental Biology Meeting (Barce-lona, Spain, 2005); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); 14 FESPB Congress (Crakow, Poland, 2004).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 53 наукових праці, з них 24 статті у фахових виданнях (включаючи Q1-Q3), 2 розділи у книгах та 27 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їхнього обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел складається із 537 найменувань. Обсяг основного

тексту дисертації складає 296 сторінок друкованого тексту. Робота містить 14 таблиць, 75 рисунків та 3 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури складається із двох розділів, перший з яких «Структура цитоскелету вищих рослин» є аналізом будови та функціонування цитоскелету у клітинах коренів різних видів вищих рослин. Порівнюється організація МТ та АФ у дводольних та однодольних, відзначаються відмінність та подібність організації кортикального цитоскелету різних ростових зон коренів. Охарактеризовані асоційовані із МТ та АФ білки, які опосередковують зв'язок між цитоскелетом, ЦМ та КС та забезпечують динамічні реакції цитоскелету на зміну умов навколишнього середовища. У другому розділі «Реакції цитоскелету на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію» проаналізовані дані щодо впливу факторів космічного польоту на цитоскелет рослин. Наведені концепції альтернативної гравічутливості кореня рослин. Оцінено роль цитоскелету у процесах, які розвиваються у коренях при гіпоксії у природних умовах та відмічено актуальні напрямки дослідження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Умови вирощування рослин та експериментальні підходи. Зернівки *Z. mays* (гібрид LG 11, Semences SA (Chappes, France) та гібрид Достаток (Ін-т фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ та насіння *B. vulgaris* (сорт Бордо) пророщували у розчині Хогланда в умовах стаціонарного контролю і на горизонтальних кліностах (одноосьовий (1– D) кліностат з періодом 2об/хв). Довжину коренів зразків у варіантах: 1) стаціонарний контроль; 2) стаціонарний контроль із додаванням таксолу (50 мкМ); 3) кліностатування; 4) кліностатування із додаванням таксолу. У частині експериментів для інгібування АФ використовували 10 мкМ розчину CD (метаболіт гриба *Metarhizium anisopliae*). Насіння *A. thaliana* (Col-0, WT та трансформовані рослини *A. thaliana*–GFP–

MAP4 та *A. thaliana* – GFP – ABD2) пророщували на середовищі $\frac{1}{2}$ Мурашіге–Скуга (МС) з 0,5 % агару у чашках Петрі. Використовували $\frac{1}{2}$ МС з додаванням 5 мкМ оризаліну (OR, динітроаніліновий гербіцид) або CD (рис.1).

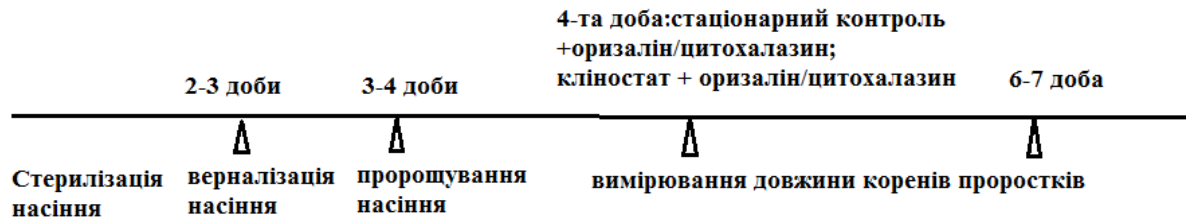


Рис. 1. Схема вирощування проростків *A.thaliana* при кліноостатуванні.

Спостерігали організацію кМТ у клітинах ДЗР коренів проростків *A. thaliana* – GFP–MAP4 та організацію АФ у *A. thaliana* – GFP – ABD2 після впливу почергово OR або CD.

Методи світлової мікроскопії та імуноцитохімії. Для анатомічних досліджень головні корені 6–7–ми добових проростків *Z.mays*, *B. vulgaris* а також *S. latifolium* та *A. plantago-aquatica* у (фазі бутонізації та квітнення) фіксували у 3,7 % формальдегіді та занурювали у спирторозчинний віск згідно стандартної методики (Baluška et al. 1997 b). Мікротрубочки виявляли за допомогою первинних мишачих моноклональних антитіл до бета-тубуліну (Т-4026, Sigma Co.) та вторинних мишачих антитіл із флуоресцентною міткою FITC-флуоресцинізотіоціанатом (F-9026, Sigma Co.). Для виявлення актинових філаментів застосовували мишачі моноклональні антитіла ICN (клон до актину С4, Sigma, Co., 69-100) та мічені барвником FITC вторинні мишачі антитіла (F-9026, Sigma, Co.). У коренях рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* мікрофіламенти виявляли за допомогою барвника phalloidin-FITC (6,6 мкМ; Sigma Co.). Цитоскелет досліджували у інвертному флуоресцентному мікроскопі AxioVert A1 Bio (Carl Zeiss, Germany) та конфокальному лазерному сканувальному мікро-

скопі LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Germany), обладнаному стандартними фільтрами (BP 450-490, LP 520).

Метод електронної та конфокальної мікроскопії. Кореневі апекси рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* фіксували у розчині 2,5 % глутарового альдегіду та 1 % розчину оксиду осмію (OsO_4). Зразки заливали сумішню смоли епон–аралдит та полімеризували. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM 1230EX (Jeol, Японія). Корені проростків *A.thaliana* – MAP4–GFP та *A.thaliana*–ABD2–GFP обстежували безпосередньо після зняття з кліноштату у конфокальному мікроскопі LSM5 Pascal (Zeiss, Німеччина). Знімки обробляли у програмі Image Browser LSM5 Pascal та переводили у формат jpg або tiff з роздільною здатністю 300 пікселів на дюйм.

Дослідження експресії генів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (qPCR). З коренів проростків *A. thaliana* (близько 100 мкг) виділяли загальну РНК, яку транскрибували в кодуючу ДНК. Експресію генів *TUA6*, *ACT2*, *MAP-65-1*, *CLASP*, *FH1*, *FH4* та *PLDδ* аналізували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT–qPCR) з використанням термоциклера Biometra (Analytik Jena, Йена, Німеччина) та наступних умов: 15 с при 95 ° C, 35 циклів по 1 хв при 94° C, 1 хв при 58° C і 1,5 хв при 72° C, після чого 20 хв при 72° C. Реакції містили SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics Corporation, США). Гени SAND та S18 (pre-ribosomal assembly protein) використовували як внутрішній стандарт ДНК для нормалізації. Зразки з 1 мкл вільної від РНК–ази води замість кДНК використовували як негативний контроль. Стандартні криві (графіки) та ефективність кожного праймера розраховували за допомогою програмного забезпечення qTower2 (<https://www.labwrench.com/thread/206903/analytik-jena-qtower2-software>). Специфічність послідовностей нуклеотидних пар праймерів перевіряли на основі бази TAIR BLAST (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>) та сервісу NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1).

Таблиця 1

Праймери ПЛР для досліджуваних генів

Гени	НомерNCBI GenBank	Нуклеотидна послідовність ПЛР праймерів, 5'-3'	
		Прямий	Зворотний
ACT2	AT3G18780	CTTGCACCAAGCAGCATG AA	CCGATCCAGACACTGTACT TCCTT
TUA6	AT4G14960	GTTCTGGTTCAGCCTGAT GG	CCAGTCCGTACCTCGTCAA T
MAP65-1	AT5G55230	ACATTAGTTGCCAAGACC CG	GCCTCCGTTTCTCCTCTTCT
CLASP	AT2G20190	CTGTTGAAAGGCTGCATC AA	CGACAACAGCAGGAACAA GA
PLDδ	AT4G35790	GGCGGAGAAAGTATCGGA GG	CGAGCTAGAGTCGCTTGAG G
FH1	AT5G25500	AGCCAACTTTGAGTCCGA GG	CATCAGCGCCTTTGACATC G
FH4	AT1G24150	GAGCTTAGGTCACGTGGC TT	CTTCGGTTAAGCACGCATC G
SAND	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTG ATCACT	TGATTGCATATCTTTATCGC CATC
S18	AT2G03810	ATTCTGGTCGGCATCGTT TA	GCGAAAGCATTTGCCAAGG

Експресію для кожної проби розраховували на основі трьох технічних повторів. Розрахунок $2^{-\Delta\Delta Ct}$, згідно Livak та Schmittgen (2001), використовували для визначення відносного рівня мРНК. Для оцінки різниці для кожного гена застосовували Wilcoxon rank test (програма PSPP (www.gnu.org)).

Відносна експресія генів вважалася зниженою/підвищеною, якщо вона відрізнялася щонайменше вдвічі від контрольної.

Дослідження впливу гіпоксії на клітини коренів. Аеренхіму (АР) вивчали на зрізах апексів коренів повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica*, *S. latifolium* та *S. sisaroides*, зібраних у природних умовах. У *Z. mays* штучно індукували розвиток аеренхіми коренів шляхом вирощування у водному середовищі із нестачею сірки (S) згідно модифікованої методики Bouranis та інших (2006, 2007).

Перекисне окиснення ліпідів мембрани клітин рослин. Окиснення ліпідів (ПОЛ) клітин рослин, визначали за кількістю продуктів розпаду жирних кислот цитоплазматичної мембрани (Dhindsa and Matowe 1981). Для цього виявляли адукти тіобарбітурової кислоти (ТБК), кількість яких виражали в концентрації малонового діальдегіду, оскільки ТБК зв'язується із киснем продуктів розпаду жирних кислот (альдегідних\кетонових груп). Абсорбційну фотометрію проводили на спектрофотометрі SPEC2000. Концентрації ТБК-активних продуктів визначали з коефіцієнтом екстинкції $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Статистичні методи обробки результатів експериментів. Всі експерименти проводили щонайменше у трикратній повторності. Довжину коренів проростків вимірювали за допомогою програми ImageJ (<http://www.imagej.net>). Залежні статистичні вибірки оцінювали у програмі забезпечення статистичного аналізу SPSS (PSPP, www.gnu.org). Порівнювали вибірки у контролі і при дії кліноостатування/інгібіторів елементів цитоскелету. Для визначення статистичної достовірності виборок користувалися коефіцієнтом Ст'юдента (t -test) і використовували результати із статистично достовірною різницею 95% ($p < 0,05$). Інгібування росту обчислювали за формулою $I = [(\mu_c - \mu_t) / \mu_c] \times 100$, де I – відсоток швидкості росту, μ_c – середнє значення довжини кореня в контролі та μ_t – значення для росту коренів при обробці агентами. Відмінність у організації МТ обчислювали порівнюючи процентне співвідношення кількості клітин із окремими дезорієнтованими ($\geq 45^\circ$) МТ із загальною кількістю обрахованих клітин. Наводили процентну різницю кількості клітин із дезорієнтованими і хаотичними МТ між контрольними і кліноостатованими рослинами.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

ОРГАНІЗАЦІЯ ЦИТОСКЕЛЕТУ КОРЕНІВ РОСЛИН

Тубуліновий цитоскелет. Вперше проведені дослідження цитоскелету на послідовних етапах диференціації у коренях *B.vulgaris*, *A.plantago-aquatica* та *S.latifolium* показало типову будову кортикальних та ендоплазматичних угру-

повань МТ та АФ. Кортикальні мікротрубочки організовані у щільні смуги, розміщені переважно впоперек напрямку видовження клітин (рис. 2 а, d, е), а ендоплазматичні МТ (еМТ) – утворюють скупчення навколо ядер та формують пучки різної щільності по всій цитоплазмі (рис. 2 а-d, f).

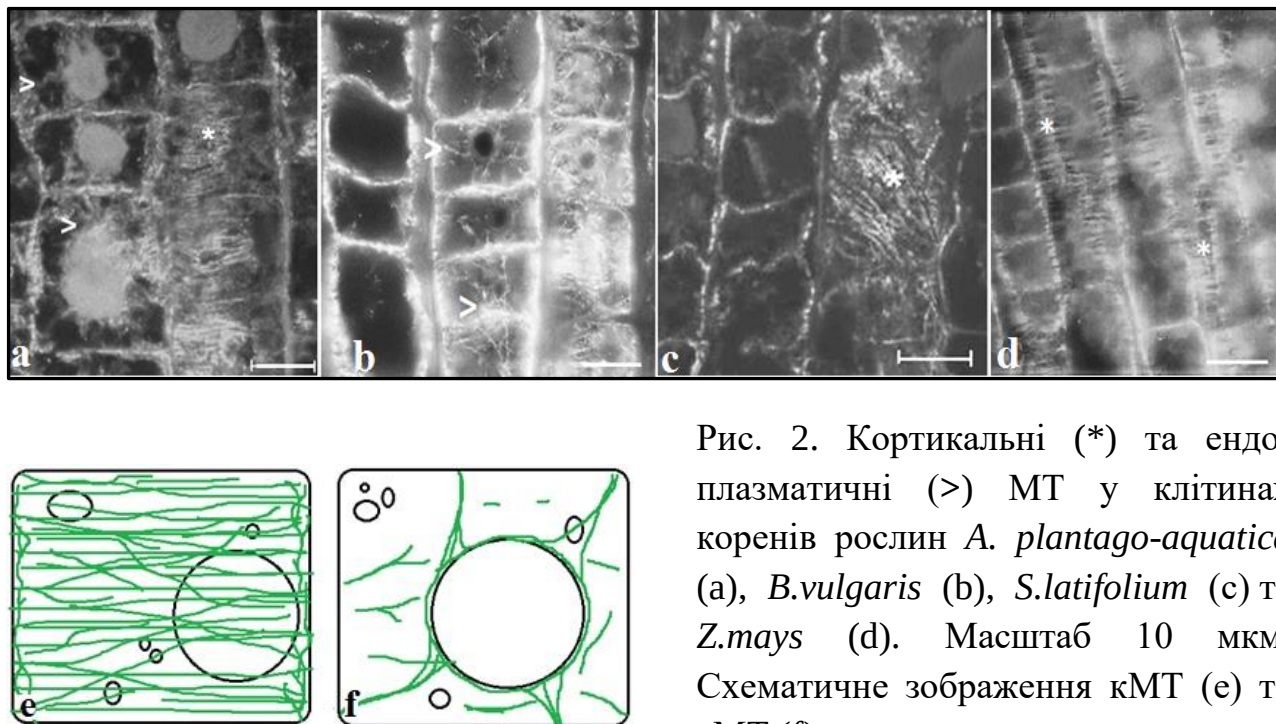


Рис. 2. Кортикальні (*) та ендоплазматичні (>) МТ у клітинах коренів рослин *A. plantago-aquatica* (а), *B. vulgaris* (b), *S. latifolium* (c) та *Z. mays* (d). Масштаб 10 мкм. Схематичне зображення кМТ (е) та еМТ (f).

Досліджені вперше **актинові філаменти** у клітинах меристеми та зони розтягу коренів проростків *B. vulgaris* та коренів рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* характеризуються типовою організацією, представленою переплетеною мережею і пучками різної щільності та довжини (рис. 3).

Актинові філаменти, зазвичай, оточують ядра, вакуолі та інші органели, по всій цитоплазмі вони формують кабелі різної товщини без переважної орієнтації. У примембранному просторі клітин щільніші скупчення коротких актинових філаментів формують екзоцитозну мережу, функція якої полягає у регуляції доставки та вбудовування везикул у цитоплазматичну мембрану (рис. 3 а, b), що забезпечує видовження клітини при рості.

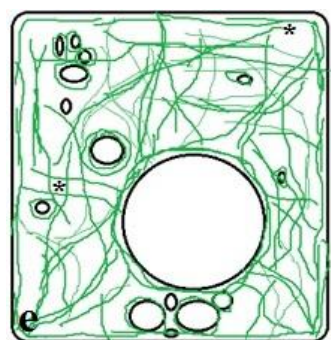
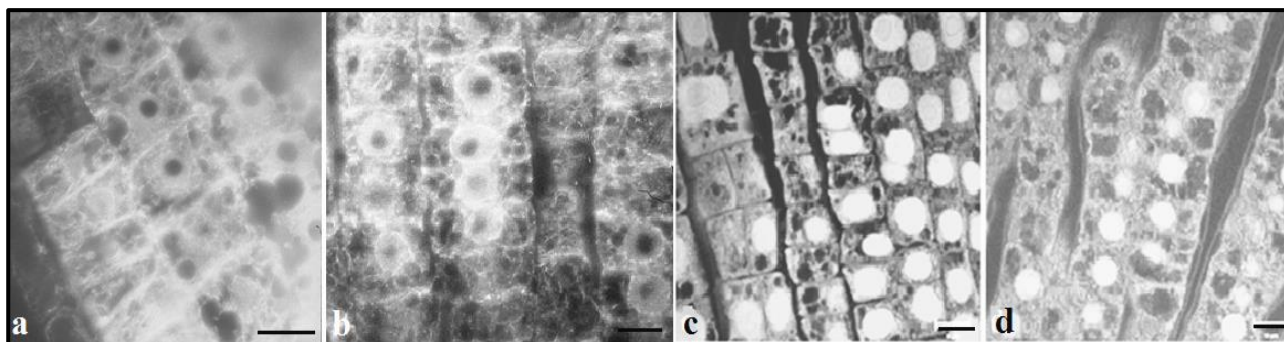


Рис. 3. Актинові філаменти у клітинах меристеми коренів проростків *B.vulgaris* (a) та *Z.mays* (b) та рослин *A.plantago-aquatica* (c) та *S.latifolium* (d). Масштаб 10 мкм. Схематичне зображення мережі мікрофіламентів у коренях проростків вищих рослин (e). Позначкою (*) помічені кортикальні актинові філаменти (e).

Через це спостерігається яскравіше свічення барвника саме по периметру клітин (рис. 3 a, b). Окрім того, відмічають товстіші пучки мікрофіламентів, які з'єднують ядро із цитоплазматичною мембраною.

ВПЛИВ МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ НА ЦИТОСКЕЛЕТ

Вплив кліноостатування на організацію кортикальних мікротрубочок у клітинах дистальної зони розтягу коренів проростків *A. thaliana*, *B.vulgaris* та *Z.mays*. Досліджували дистальну зону розтягу (ДЗР) – область між меристемою і центральною зоною розтягу, єдину зону кореня, у якій формується згин при гравістимуляції або навігації у ґрунті. У наших експериментах вперше показано, що у дистальній зоні розтягу коренів при кліноостатуванні відмічається посилене відхилення кортикальних мікротрубочок від впорядкованої поперечної орієнтації на кут більший від 45° (рис. 4) і це характерно для близько 10 % клітин коренів *A.thaliana* (контроль – 18% vs кліноостат – 28%) та *B.vulgaris* (контроль – 17% vs кліноостат – 27%) та близько 13% клітин коренів *Z.mays* (контроль – 19% vs кліноостат – 32%).

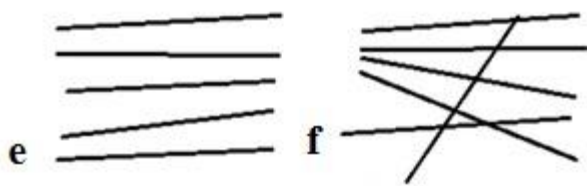
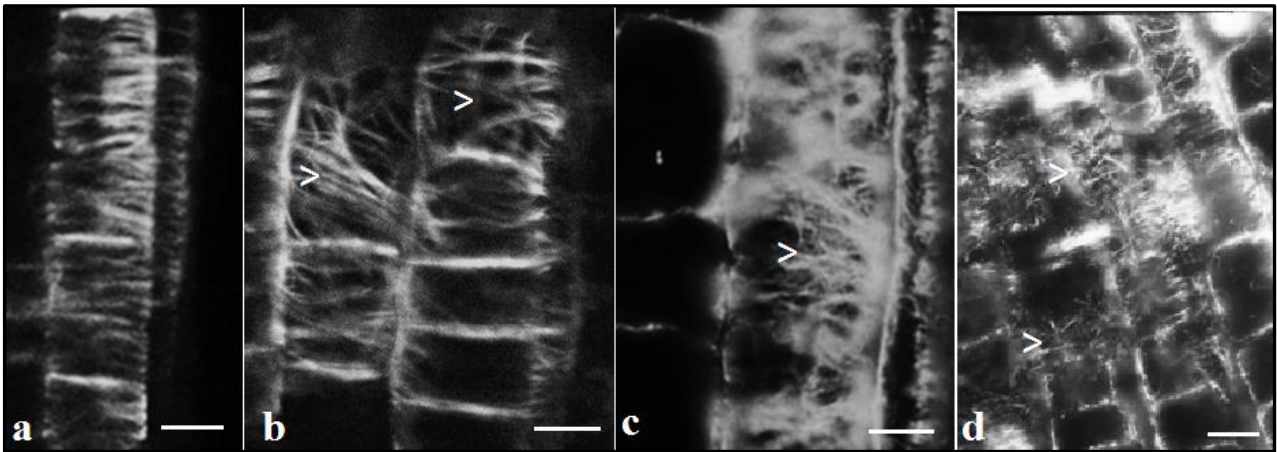


Рис. 4. Дезорганізовані кортикальні мікротрубочки у клітинах зони розтягу коренів проростків *A. thaliana* (a – контроль, b – кліноостат), *B.vulgaris* (c) та *Z.mays* (d) у процесі кліноостатування.

Масштаб 10 мкм. Схематичне розташування кМТ у клітинах кори зони розтягу рослин у контролі (e) та під час кліноостатування (f).

Припускаємо, що часткова дезорганізація МТ у ДЗР при кліноостатуванні є внеском у дискоординацію росту коренів – підсилення у *Z.mays* та пригнічення у *B.vulgaris* та *A. thaliana* (рис. 5).

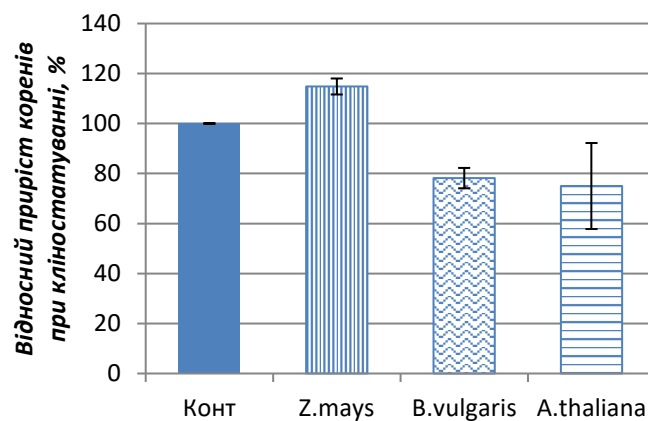


Рис. 5. Відносний приріст коренів рослин під час кліноостатування ($p < 0,05$).

Вперше показана на прикладі однодольних (*Z.mays*) та дводольних (*B.vulgaris*, *A. thaliana*) рослин різниця темпів росту головного кореня під час кліноостатування може бути пов'язана із відмінностями у будові кори. Як відомо, у *Z.mays* більше ніж вдвічі переважаюча кількість шарів кори і це може бути причиною затримки реакції коренів на стрес.

У серії експериментів дія цитохалазину D призводила до зменшення як довжини, так і ширини клітин дистальної зони розтягу коренів *A.thaliana* у стаціонарному контролі (рис. 6; контроль vs обробка CD).

При обробці коренів рослин цитохалазином D та оризалином при кліноостатуванні обидва параметри – довжина і ширина клітин збільшувалися (рис. 6; CD vs клін CD; OR vs клін OR) і це свідчить про відмінний від контролю механізм протидії руйнуванню цитоскелету.

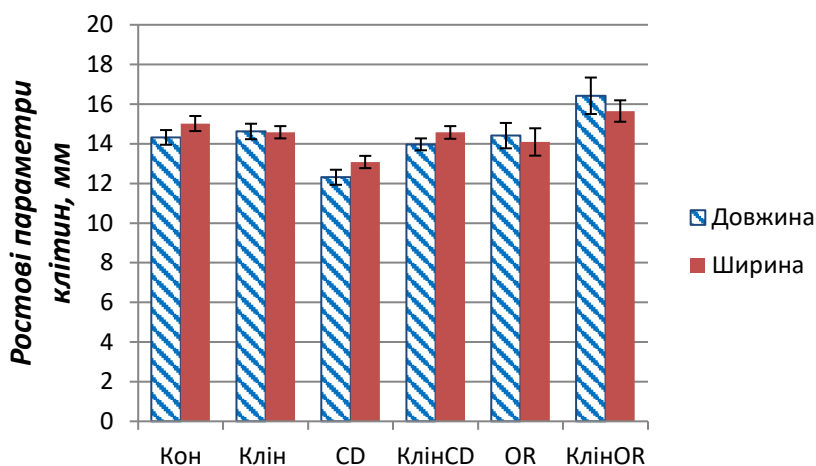


Рис. 6. Параметри клітин ДЗР коренів *A.thaliana*, оброблених CD або OR при кліноостатуванні ($p < 0,05$ для варіантів CD – кліноостат CD та OR – кліноостат OR).

Свій внесок у дезорієнтацію кМТ при кліноостатуванні опосередковано вносить зміна експресії генів, які кодують певні структурні та асоційовані із цитоскелетом білки.

Експерименти показали, що кліноостатування знижує експресію гена *TUA6* (рис. 7), який кодує α -ізоформу тубуліну і це може порушувати полімеризацію тубуліну і, як результат – сприяти дезорганізації мережі МТ.

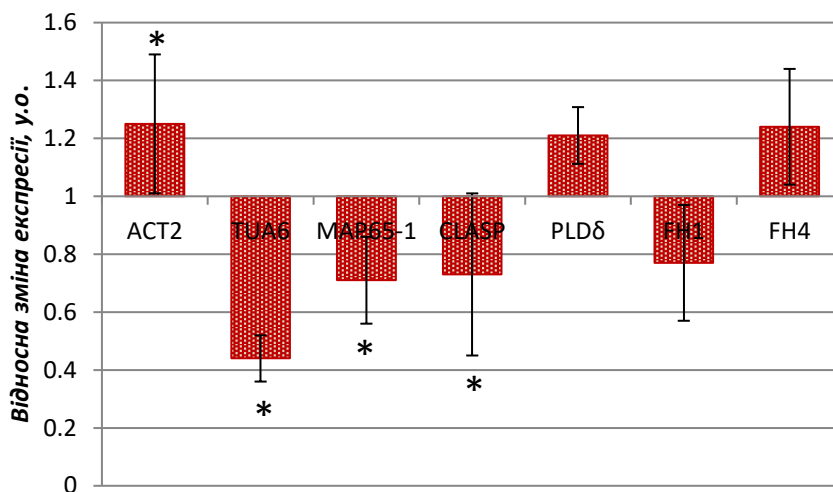


Рис. 7. Експресія генів *ACT2*, *TUA6*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLD δ* , *FH1* та *FH4* у кліноостатованих проростках *A. thaliana* (* $p < 0,05$).

Вищезгадане доводить вплив механічного стресу на організацію кМТ. Як відомо, МТ можуть самостійно виконувати сенсорну функцію і їхня полярна гетеродимерна білкова структура з альфа-субодиницею тубуліну на повільно зростаючому мінус-кінці та бета-субодиницею на швидкозростаючому плюс-кінці полімеру забезпечує швидке подовження або вкорочення полімера на зразок бігової доріжки (тредміллінг) (Elliott and Shaw 2018; Hsiao and Huang 2023) і здатна до спонтанної полімеризації у відповідь на внутрішньоклітинні та позаклітинні сигнали.

Також, знижена експресія *TUA6* під час кліноостатування може бути проявом зворотного впливу порушення полімеризації МТ і викликаной їм послідууючої динамічної нестабільності на експресію гена, кодуючого структуру мікротрубочок.

При кліноостатуванні знижується і експресія гена *CLASP* (рис.7), який кодує cytoplasmic linker CLIP-associated protein (CLASP) – білок + TIP комплексу

на зростаючому кінці мікротрубочок, який протидіє напруженню і стабілізує зростаючі мікротрубочки проти катастрофічного вигину протофіламентів назовні, спричиненого переходом димерів тубуліну у вигнуту конформацію (Kumar and Wittmann 2012). CLASP сприяє вирівнюванню мікротрубочок паралельно напрямку максимального напруження у клітині (Uyttewaal et al. 2012) і опосередковує приєднання мікротрубочок до цитоплазматичної мембрани (Ambrose et al. 2011), тому сам +TIP комплекс є основною мішенню механічного напруження на МТ і так само, експресія гена *CLASP* може бути проявом чутливості до зміни сили тяжіння. Пригнічувати експресію *CLASP* може порушення полімеризації мікротрубочок, оскільки при цьому знижується потреба у функціональній взаємодії CLASP і стабілізації кінців окремих МТ і це може мати зворотний вплив (Shevchenko and Krutovsky 2022).

Зниження експресії *CLASP* від деполімеризації МТ доводить також дія OR (рис. 8 а). Окрім того, безпосереднє залучення CLASP у реакцію на кліно-статування можна припустити виходячи із того факту, що цей білок пов'язує МТ з ендомембранами та регулює транспорт ауксину, взаємодіючи із сортуючим білком нексином 1 (SNX1) (компонентом білкового комплексу, відповідального за рециркуляцію носія ауксину PIN2 у ЦМ) (Kirik et al. 2007; Ambrose et al. 2013). CLASP також регулює проліферацію меристеми і інтегрує гормональні сигнали (ауксин, цитокінін та брасиностероїди) із організацією МТ (Halat et al. 2022). Переорієнтація рослини в процесі кліно-статування, яка змінює полярність потоків гормонів у коренях, може виявляти зв'язок між ними і експресією *CLASP* і, загалом, із полімеризацією МТ.

Виходячи із мультифункціонування CLASP як організатора мережі МТ, можна стверджувати, що даний білок опосередковує чутливість до зниженого гравітаційного навантаження від кліно-статування.

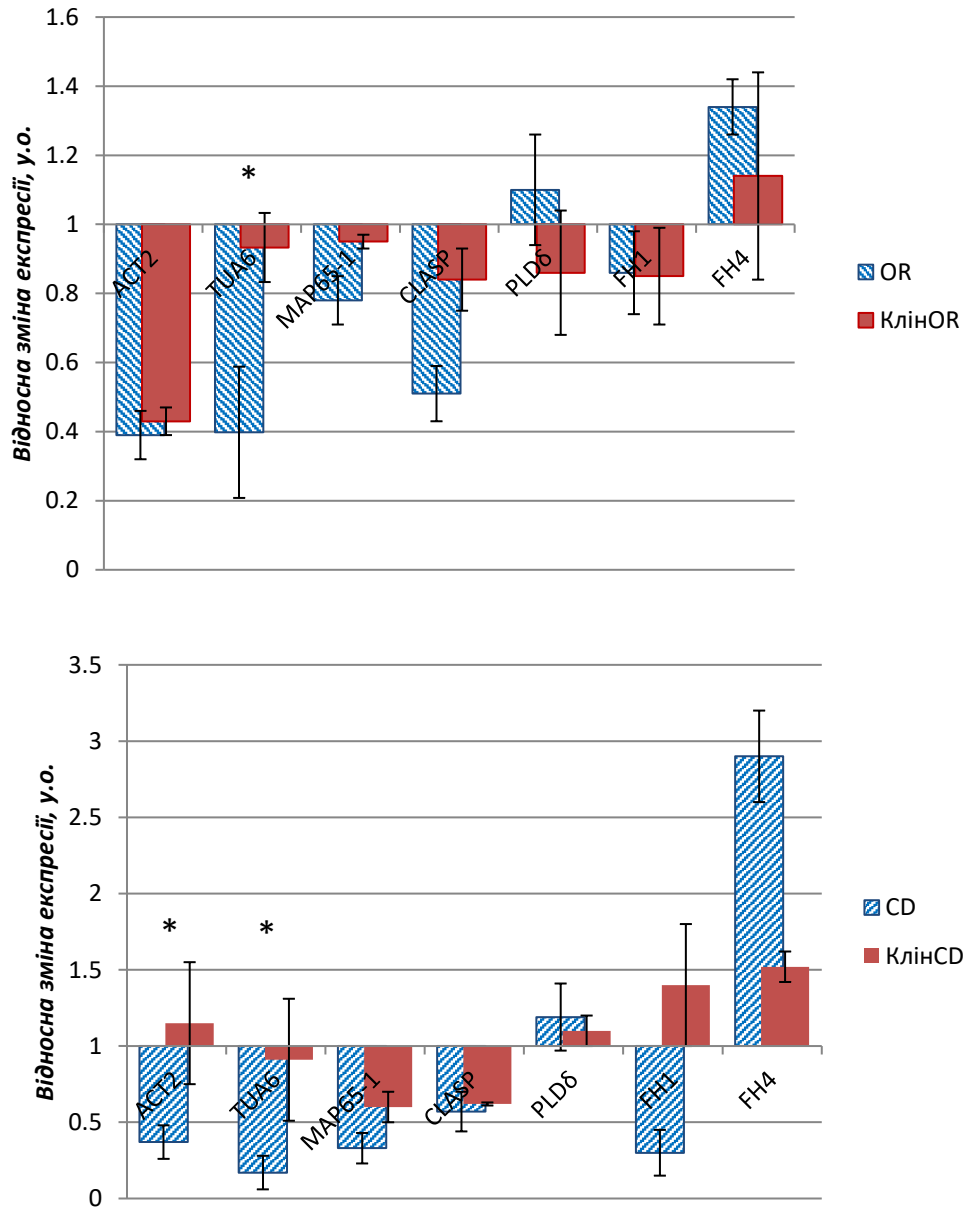


Рис. 8. Відносна експресія генів *ACT2*, *TUA6*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDδ*, *FH1* та *FH4* у не/кліностатованих проростках *A.thaliana* оброблених OR (а) або CD (б), (* між вибірками $p < 0,05$).

Хоча ми не виявили перебудови актинових філаментів у ДЗР коренів під час кліностакування, це не виключає зміну організації мережі АФ, яку, можливо, важко визначити застосованими цитологічними методами.

Вплив цитоскелету на експресію генів його структурних білків.

Експерименти показали, що дія OR знижувала експресію *TUA6* (рис. 8 а) а дія CD – експресію *ACT2* (рис. 8 b). Цей феномен можна пояснити тим, що в результаті деполімеризації МТ з'являється пул вільних мономерів тубуліну, який зворотно регулює експресію *TUA6*. Також, можливо, що відбувається так звана «ауторегуляції тубуліну», при якій концентрація тубуліну автоматично регулюється зворотним контролем кількості його мРНК через невідомий механізм (Lin et al. 2020; Gasic 2022). Так само може відбуватися і у випадку з експресією *ACT2*. Відомо, що руйнування цитоскелету може активувати певні транскрипційні фактори і порушення мережі АФ цитохалазинами а мережі МТ колхіцином або нокодазолом призводило до активації транскрипційного фактора NF- κ B та експресії залежних від нього генів у клітинах епітелію шлунка людини і доведено, що р65–компонент комплексу транскрипційного фактора NF- κ B, здатний безпосередньо взаємодіяти з АФ (Olson and Nordheim 2011). Не виключено, що і у рослин взаємодія із транскрипційними факторами може відігравати певну роль у зниженні експресії структурних генів цитоскелету при частковому руйнуванні його мережі. На противагу стаціонарним, у кліноостатованих рослин дія OR не змінювала експресію *TUA6* (рис. 8 а) а дія CD не змінювала експресію *ACT2* (рис. 8 b) і це свідчить про інший механізм регулювання залежності експресії *TUA6/ACT2* від організації МТ/АФ (відповідно) під час мінімізованого механічного навантаження.

Взаємозалежна організація елементів цитоскелету. У клітинах ДЗР коренів кліноостатованих проростків *A. thaliana* –GFP-ABD2 порівнювали вплив OR на організацію АФ та вплив CD на організацію кМТ у *A.thaliana*–GFP-MAP4. В результаті дії CD на клітини кори кореня у меристемі і ДЗР *A.thaliana* –GFP –MAP4 з'являлися невпорядковані точкові угруповання з тубуліну (рис. 9 b, c).

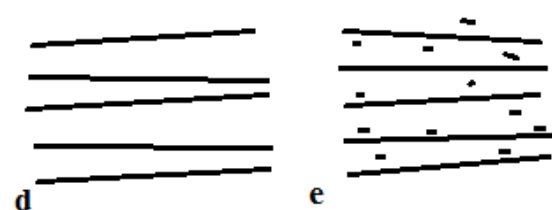
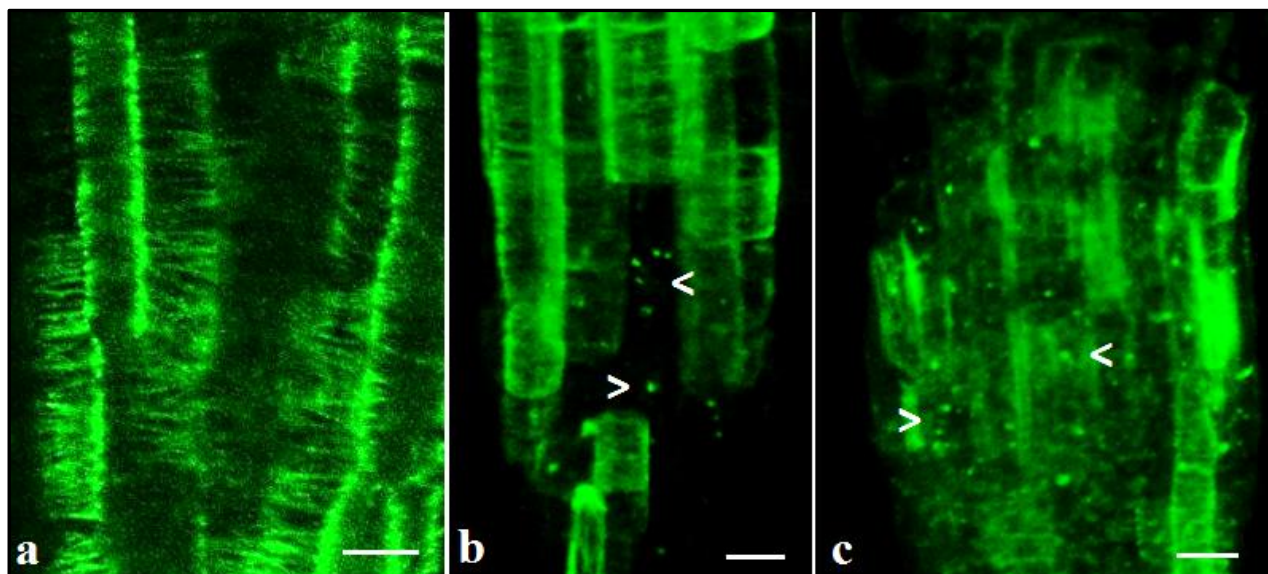


Рис. 9. Кортикальні мікротрубочки у клітинах кори коренів *A.thaliana*–GFP–MAP4 у контролі (a, d), після обробки CD стаціонарних (b, e) та кліностатованих (c, e) проростків. Угруповання тубуліну показані стрілками. Масштаб 10 (a) та 20

(b, c) мкм.

Слід зазначити, що після деполімеризації мікротрубочок оризаліном у всіх ростових зонах коренів *Arabidopsis*–GFP–ABD2 також спостерігали точкові угруповання із актину (рис.10 c, d).

Таким чином, почергова дія інгібіторів як оризаліну, так і цитохалазину D на організацію кортикальних мікротрубочок та актинових філаментів призводить до тих самих результатів – появи точкових осередків тубуліну та актину (відповідно), що ілюструє організаційний взаємозв'язок між елементами цитоскелету.

Скупчення з актину та тубуліну, можливо, є наслідком руйнування з'єднань між мікрофіламентами та мікротрубочками у кортикальній площині клітини.

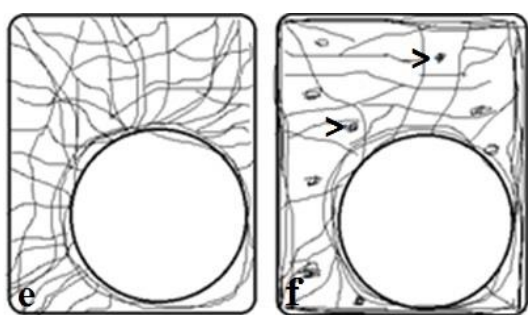
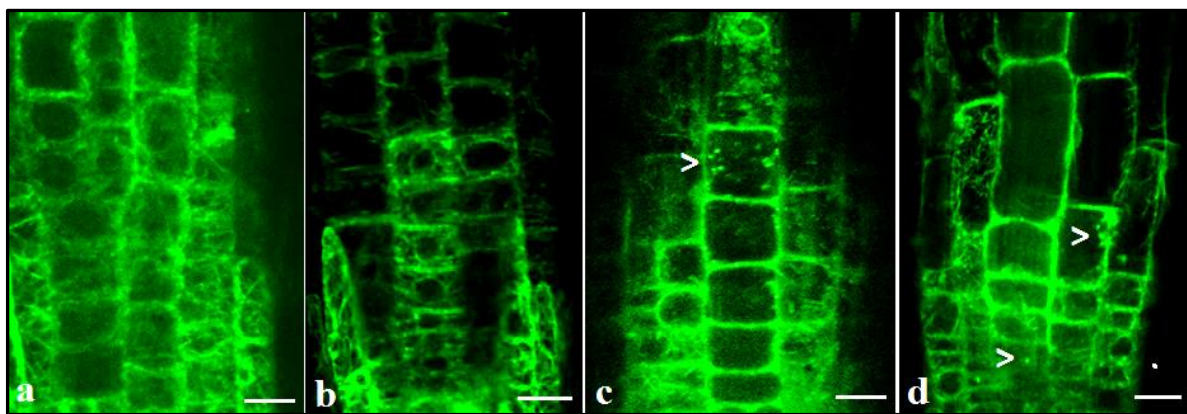


Рис. 10. Організація АФ у клітинах ДЗР коренів проростків *A.thaliana* - GFP –ABD2 у контролі (а,е); кліноостатуванні (b); дії OR (с, f); обробці OR при кліноостатуванні (d). Стрілками позначені осередки актину. Масштаб 20 мкм.

Взаємодія між елементами цитоскелету регулюється транскрипційно, що доведено дослідженнями впливу руйнування організації МТ та АФ на експресію генів *TUA6* та *ACT2*. Показано, що пул вільних мономерів тубуліну, який з'являється після дестабілізації МТ оризалином, пригнічує експресію *ACT2* (рис. 8 а), а збільшена внаслідок дії CD кількість мономерів актину здатна зменшувати експресію *TUA6* (рис. 8 b). Знижену експресію *ACT2* після дії OR спостерігали також і при кліноостатуванні, що передбачає незалежність взаємозв'язку між станом МТ та *ACT2* від зниження механічного навантаження (рис. 8 b). На противагу, дія CD/ OR не впливала на експресію *TUA6* при кліноостатуванні (рис. 8 а, b), що, знову ж таки, доводить існування відмінного типу регуляції при даних умовах.

У частині експериментів досліджували експресію генів білків, які координують організацію кортикального цитоскелету – MAP65-1 та форміна FH1 а

також пов'язаних із континуумом – КС– ЦМ – цитоскелет – форміна FH4 та фосфоліпази PLD δ .

Експресія MAP65-1. У некліностатованих рослин *A.thaliana* експресія MAP65-1 знижувалася після обробки CD (рис. 8 b), що передбачає її регулювання актиновим цитоскелетом і, наскільки нам відомо, це перше спостереження зв'язку між організацією АФ та експресією MAP65-1, який кодує білок, асоційований з тубуліном. Можливо такий феномен можна пояснити виходячи із можливостей пострансляційних модифікацій MAP65-1, оскільки відомо, що неконсервативний домен зв'язування з МТ С-кінцевої частини AtMAP65-1-МТВ2 містить дев'ять потенційних сайтів фосфорилування для декількох різних кіназ, включаючи мітоген–активовану протеїнкіназу, казеїнакіназу та циклінзалежну кіназу (Sasabe and Machida 2006; Smertenko et al. 2008). Не виключено, що за допомогою різних сигнальних шляхів за участю протеїнкіназ можуть регулюватися різні функції AtMAP65-1, включаючи зв'язок із АФ.

Експресія FH1 та FH4. Зафіксовано зворотний зв'язок між деполімеризацією АФ (при обробці CD контрольних проростків *A.thaliana*) та зниженням рівня експресії FH1 а також її посиленням у FH4 (рис. 8 b). Незважаючи на приналежність до одного класу формінів (клас I), така відмінність у реакції може означати різницю у механізмах регулювання білками FH1 та FH4 функціонування АФ. Відомо, що AtFH1 підсилює полімеризацію актину та кепує АФ, з'єднує їх з ЦМ та сприяє загальній рухливості актинової мережі (Martiniere et al. 2011), і у зв'язку з цим зменшення кількості FH1 може бути внеском у пригнічення динаміки актину у кортикальній області клітини, що, у цілому, інгібує ріст коренів. Відомо, що завдяки існуванню позаклітинного та трансмембранного домену GOE, FH4 здатний передавати механічні сигнали з клітинної стінки через ЦМ на МТ та АФ (Oulehlova et al. 2019) і, можливо, посилення експресії FH4 при руйнуванні АФ необхідне для активної участі FH4 у підтриманні функціонування континууму клітинна стінка – цитоплазматична мембрана – мікротрубочки/актинові філаменти.

Експресія фосфоліпази *PLD δ* . Згідно з нашими експериментами, ні саме лише кліноостатування, ні інгібітори полімеризації МТ або АФ не викликали змін у експресії гена *PLD δ* , біфункціональний білок якого регулює зв'язки між АФ та МТ (Petrašek and Schwarzerova 2009) а також з'єднує МТ з ЦМ (Gardiner et al. 2003). Однак не виключений вплив кліноостатування на функціонування даного білка на інших термінах (можливо найраніших).

Специфічний механізм регуляції організації цитоскелету при кліноостатуванні. Аналіз виявив специфічність реакції цитоскелету на повільне 1D кліноостатуванням впродовж щонайменше однієї доби. Про відмінний від стаціонарного контролю механізм свідчить декілька фактів, серед яких: підсилення росту коренів *B.vulgaris* після часткового пригнічення цитоскелету таксолем та CD (рис. 11) (а у *A. thaliana* – лише при дії CD) та збільшення як ширини, так і довжини клітин ДЗР (рис.6) при обробці як CD, так і OR.

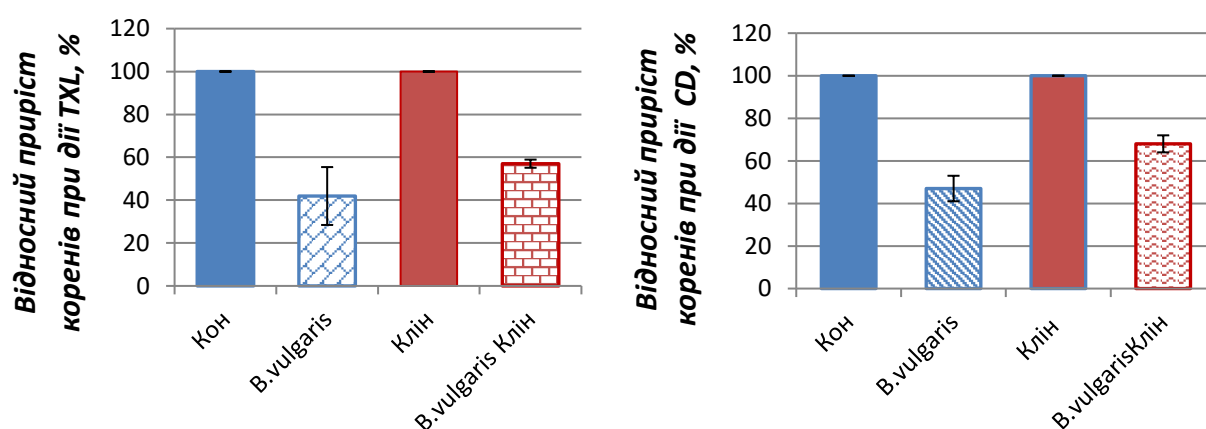


Рис. 11. Ростовий приріст коренів при дії таксолу та цитохалазину D у кліноостатованих проростків *B. vulgaris* ($p < 0,05$).

Окрім того, при кліноостатуванні не відзначали зворотного зв'язку між порушенням організації кМТ та АФ та експресією генів *ACT2*, *TUA6*, між організацією МТ та експресією гена *CLASP*, організацією АФ та експресією генів *MAP65-1*, *FH1* та *FH4* (рис. 8 а, b) і це свідчить про активацію механізму, який

регулює динаміку цитоскелету при зменшенні тиску протопласта на клітинну стінку та відповідне збурення континууму КС–ЦМ–цитоскелет. У даному випадку зменшення навантаження на кортикальну область клітини (рис. 12) є причиною механічного стресу.

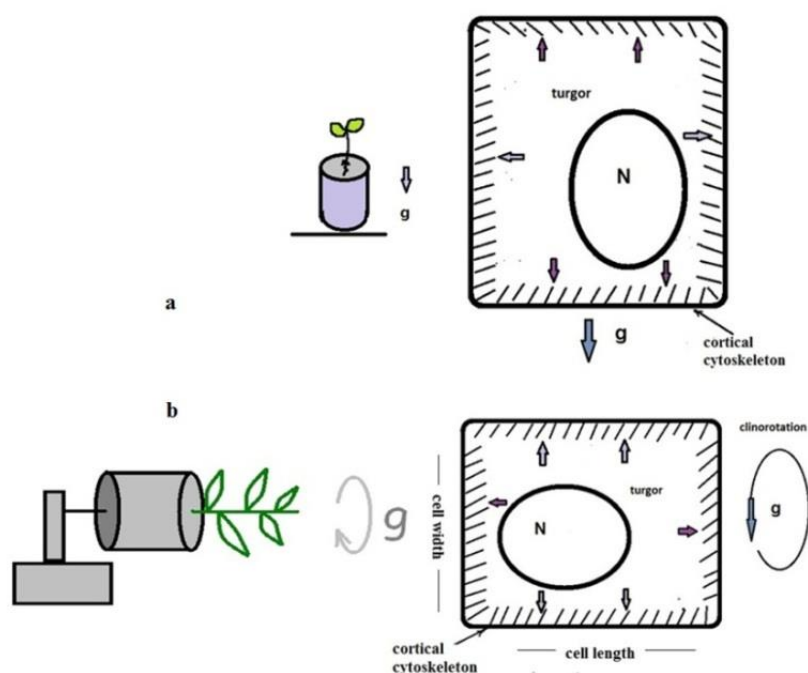


Рис. 12. Розподіл навантаження на кортикальну область клітини в нормі (a) і при кліноостатуванні (b).

Фактичне зняття гравітаційного навантаження із кортикального цитоскелету усуває необхідність у його жорсткості і пригнічує транскрипційну регуляцію генів його структурних білків. У такий спосіб механічні сили впливають на білки цитоскелету і на полімеризацію його складових. Це є проявом адаптації до даного стимулу, яка може керуватися декількома механізмами. Так, зміна тиску протопласта на ЦМ при кліноостатуванні призводить до активації механочутливих мембранних каналів, серед яких – розтяг – та Ca^{2+} -чутливі, які, у свою чергу, пов'язані із МТ та АФ (рис. 13 а).

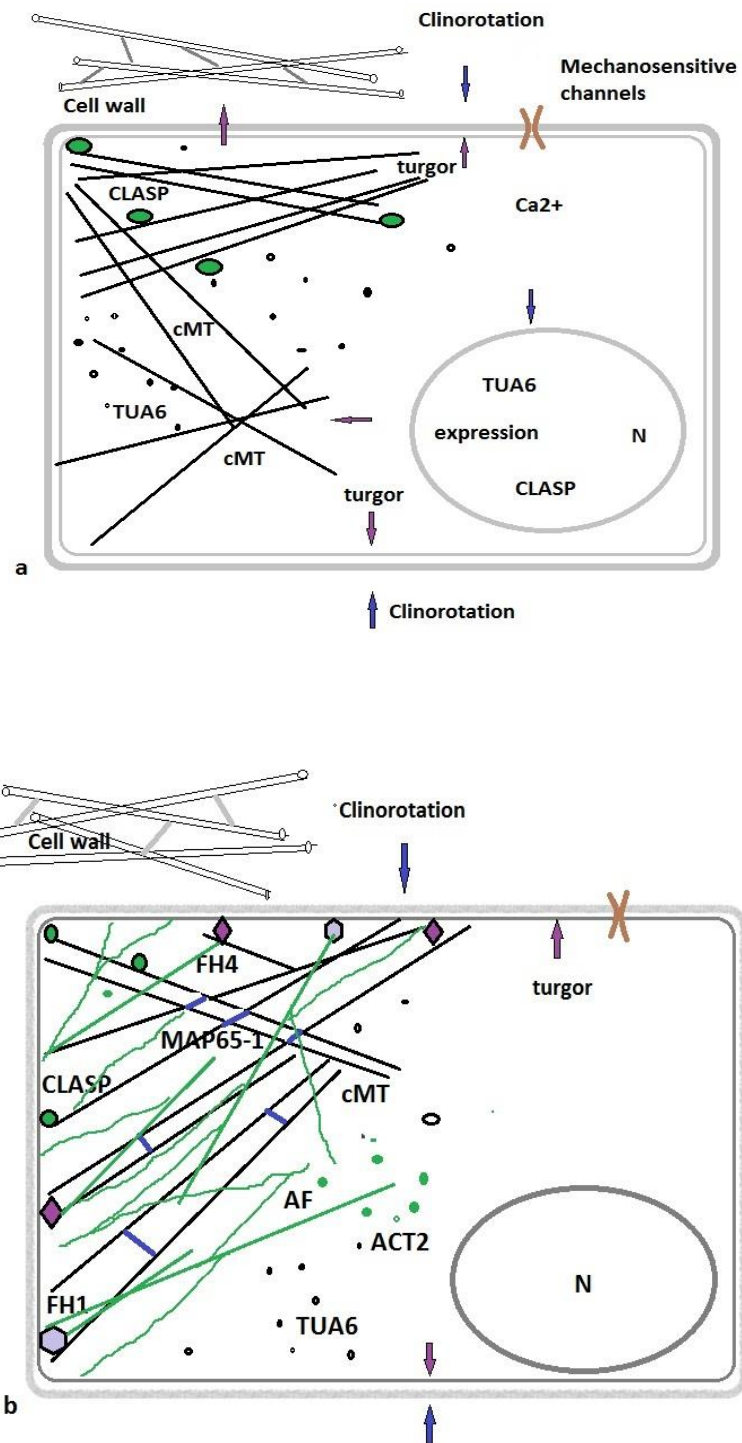


Рис. 13. Адаптаційні механізми при кліностауванні: безпосередня реакція на кліностаування тубулінового цитоскелету (a); реакції адаптації до зменшеного механічного навантаження (b).

Другий механізм реагування на модельовану мікрогравітацію полягає у тому, що КС і кМТ самі можуть виступати сенсорами механічних сигналів, що, ймовірно, порушує їхню полімеризацію і сприяє появі деполімеризованого тубуліну. Можливо, що при цьому збільшення кількості мономерних субодиниць тубуліну зворотно пригнічує експресію гену як структурного TUA6, так і асоційованого з МТ білка CLASP (рис.13 а) і це може відбуватися через активацію специфічних транскрипційних факторів або через досі невизначений механізм.

Водночас, навіть часткове руйнування елементів цитоскелету при кліно-статуванні не зменшує експресію *ACT2* та генів асоційованих із цитоскелетом білків FN4, FN1 та MAP65-1 (рис. 8 а, b). Така реакція, на наш погляд, є проявом пристосування цитоскелету до нових умов навантаження, однією із складових якої є незмінна активність вказаних білків, необхідна для взаємодії елементів цитоскелету та забезпечення ростової функції. Це твердження підтримується нашими експериментами щодо виявлення експресії генів вже після доби кліно-статування, адже у такому випадку йдеться не про початкову реакцію, а про адаптацію та стабільний ріст клітин при згаданих умовах. Таким чином, полімеризація та деполімеризація цитоскелету здатні транскрипційно регулювати гени, які кодують як його структурні, так і асоційовані білки. В умовах кліноста-тування таку регуляцію не спостерігали, що свідчить про інший механізм.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ НА ЦИТОСКЕЛЕТ

Організація цитоскелету у коренях рослин, які зазнають гіпоксії. Знижена внаслідок порушення гравіталежної теплової конвекції доступність кисню в умовах космічних польотів призводить до гіпоксії, що сприяє продукуванню активних форм кисню (АФК) і активації деградаційних процесів (Porterfield 2002). У природних умовах нестачу кисню зазнають повітряно-водні рослини і, як протидія гіпоксії, у коренях таких рослин утворюється аеренхіма (АР) – система порожнин для поліпшення газообміну між коренем та стеблом.

Утворення аеренхіми – комплексний процес, однією із складових якого є програмована клітинна загибель (ПКЗ).

Будова аеренхіми у коренях *A. plantago aquatica* та *S. latifolium*. У коренях *A. plantago-aquatica* відмічають аеренхіму схизогенного типу, утворену лізисом пектинової серединної пластинки та послідуною реорганізацією КС, в результаті чого розділяються та розмежовуються сусідні ряди клітин (рис.14 а).

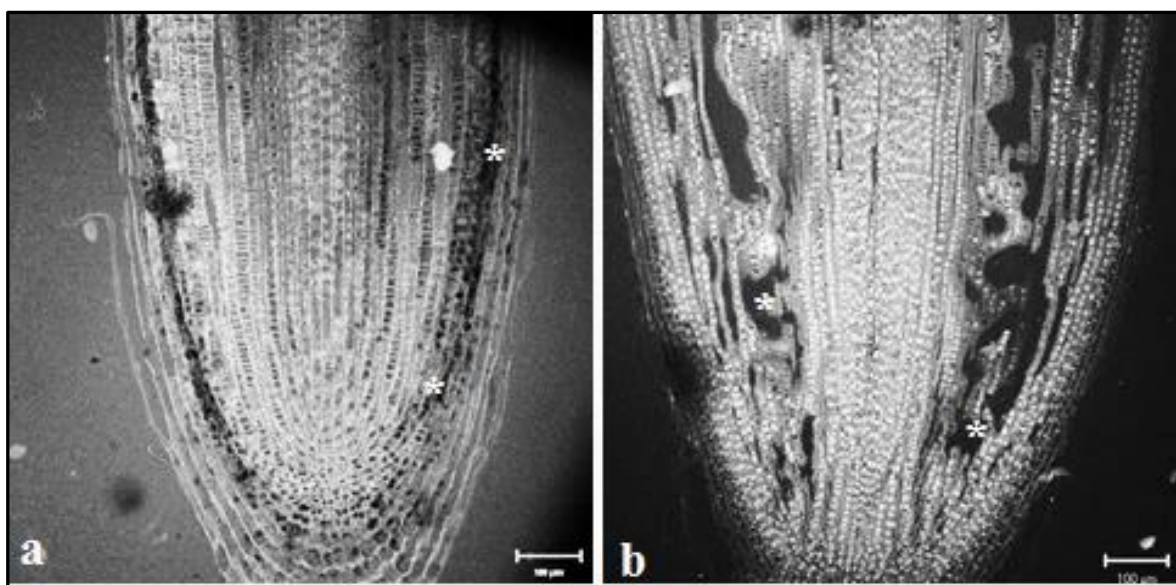


Рис. 14. Порожнини аеренхіми (*) в апексах коренів *A. plantago-aquatica* (а) та *S. latifolium* (b). Масштаб 100 мкм.

У коренях іншого виду досліджуваних повітряно-водних рослин – *S. latifolium* окрім схизогенного типу аеренхіми відзначають також наявність аеренхіми лізигенної, відміною рисою якої є деградація (редукція) клітин кори коренів в результаті програмованої загибелі (Jackson and Colmer 2005). Наші дослідження показали, що під час розвитку процесів програмованої загибелі у коренях *S. latifolium* клітини кори перебувають на різних стадіях редукції (рис. 15 а, b).

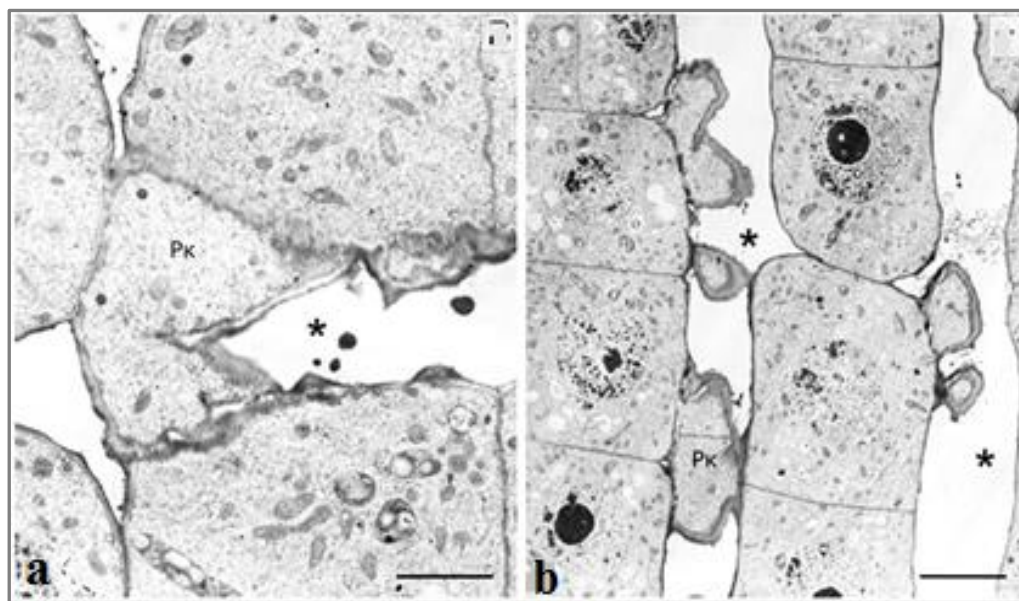


Рис. 15. Редуковані клітини (РК) кори коренів *S. latifolium*, які оточують порожнини АР (*). Електронна мікроскопія. Масштаб 1 мкм (а), 5мкм (b).

Для редукованих клітин (РК) характерні значно менші розміри, змінена форма, відсутність вакуоль та ядер, наявність інших органел у значно меншій кількості та часте розпушення клітинної стінки (рис. 15). Редукція клітин ряду призводить до утворення порожнин у міжряддях клітинних файлів кори кореня.

Організація мікротрубочок у клітинах коренів *A.plantago-aquatica* та *S.latifolium* при формуванні аеренхіми. У клітинах, прилеглих до аеренхімних порожнин у дистальній зоні розтягу коренів *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* відзначали зміну поперечної організації кортикальних мікротрубочок на косу, також спостерігали велику кількість дезорієнтованих та дезорганізованих (фрагментованих) мікротрубочок, що часто призводило до втрати формотворчої функції цитоскелету та зміни прямокутної форми клітин на неправильну (рис. 16 a, b) і навіть округлу (рис. 16 d).

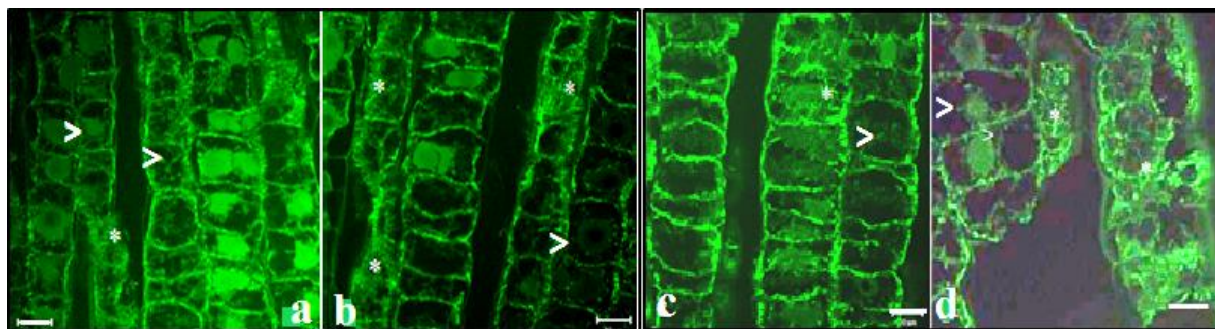


Рис. 16. Кортикальні (*) та ендоплазматичні (>) мікротрубочки у клітинах, прилеглих до порожнин аеренхіми у коренях *A. plantago-aquatica* (a, b) та *S. latifolium* (c, d). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм.

У цілому, у коренях *A. plantago-aquatica* клітини відокремлених рядів не зазнавали деградації, ряди зберігали трофіку і не виключалися із архітекτονіки кори (рис. 17 а). МТ у даного виду разом із АФ забезпечують процеси екзоцитозу і потрапляння на поверхню літичних ферментів (зокрема пектиназ), що необхідно для відокремлення та розділення сусідніх клітинних рядів.

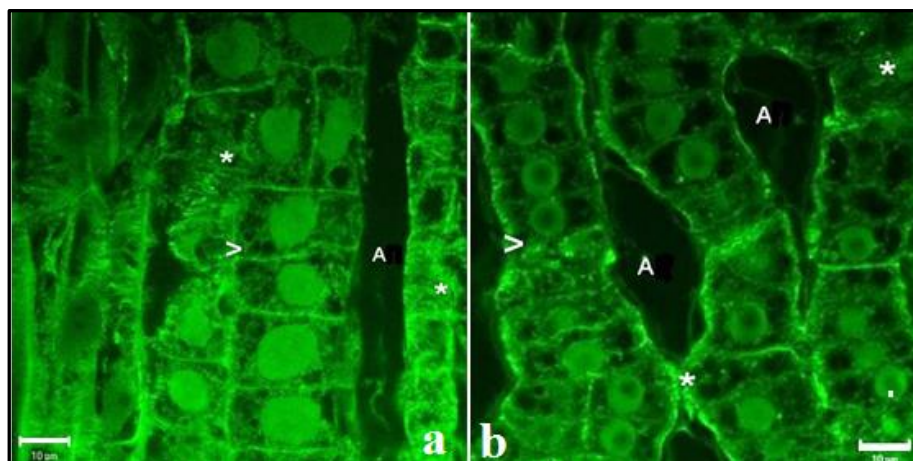


Рис. 17. Початкові етапи формування порожнин аеренхіми у коренях рослин *A. plantago-aquatica* (a) та *S. latifolium* (b). Кортикальні МТ (*) та еМТ (>), А – аеренхіма. Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм.

При формуванні лізигенної АР у *S. latifolium* окрім навскісних кМТ, спостерігали хаотично орієнтовані та дезорганізовані (рис. 16 с, d) а також скупчення тубуліну, особливо в примембранному просторі клітин (рис. 17 b). У цього виду також відзначали руйнування самих клітин (рис. 16 d). У *S. latifolium* зміна організації кМТ з упорядкованої поперечної на невпорядковану хаотичну є одним із перших етапів лізису клітин в процесі ПКЗ, і відокремлення МТ від ЦМ призводить до дезорієнтації, а руйнування – до рошарування КС і, кінець кінцем, до втрати клітинної форми і виходу із цитоархітектоніки ряду (рис. 16 d; 17 b).

Таку ж саму дезорганізацію кМТ та еМТ спостерігали і у клітинах коренів *Z. mays* при штучному індукуванні АР, де на рівні меристеми і ДЗР кМТ ставали невпорядкованими, часто мали хаотичний вигляд або фрагментувалися (рис. 18 b, d).

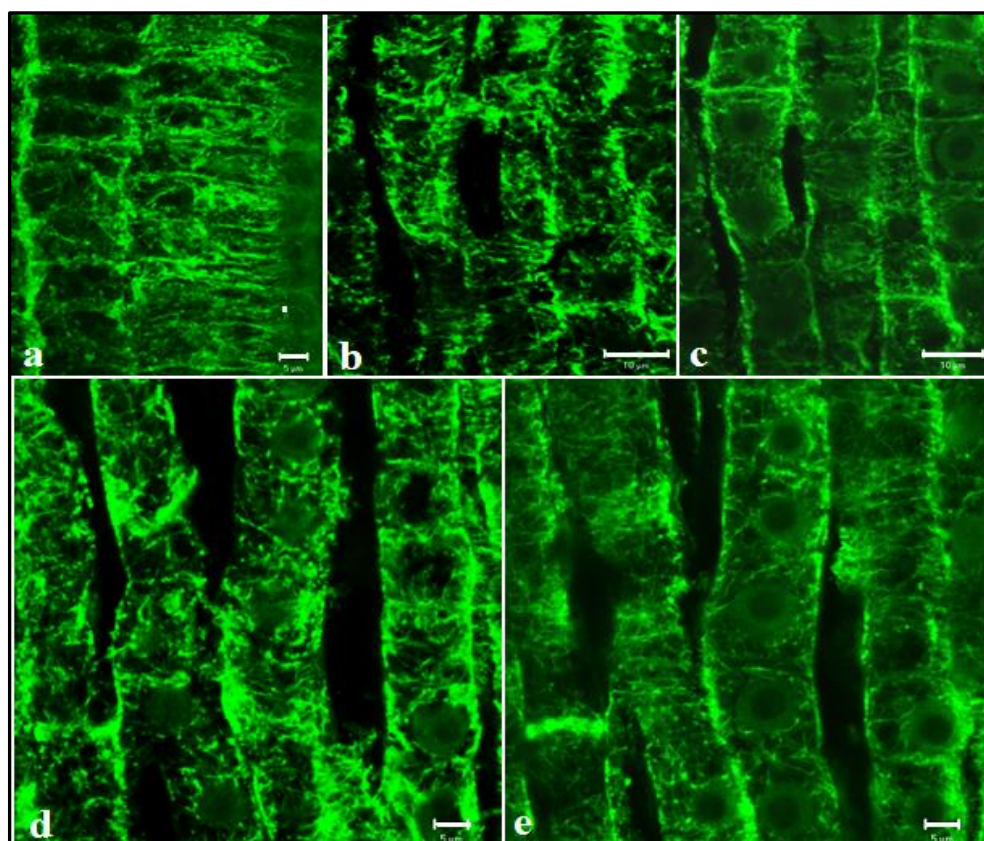


Рис. 18. Організація МТ клітин адвентивних коренів *Z. mays* у нормі (a) та в процесі розвитку ПКЗ (b–e); кМТ (b, d) і еМТ (c, e). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 5 мкм (a, d, e), 10 мкм (b, c).

Отримані дані свідчать про те, що як у процесі природного, так і штучного утворення АР кМТ та еМТ беруть участь у різних за часом етапах загибелі клітин. Кортикальні МТ першими зазнають дезорганізації, оскільки розпушення клітинних стінок і від'єднання МТ від ЦМ відбувається ще за функціонування екзоцитозної сітки МТ та АФ, яка, окрім росту забезпечує також потрапляння ферментів лізису на мембрану та руйнування компонентів КС. Даний етап характерний і для схизигенної АР у *A. plantago-aquatica* і для лізигенної АР у *S. latifolium* та *Z. mays* (рис. 19 б). Відмічено, що при формуванні АР схизогенного типу відбувається дезорієнтація кМТ (рис. 19 б) а при АР лізигенного типу – швидка дезорганізація та руйнування кМТ (рис. 19 с).



Рис. 19. Організація кМТ у коренях повітряно–водних рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* у нормі (а) та на перших етапах розвитку схизогенної (б) та лізигенної (с) аеренхіми.

Як при формуванні природної, так індукованої АР ендоплазматичні МТ зазнають деградації на останніх етапах процесів ПКЗ (17 б; 18 с, е), водночас із рештою клітинних органел, чим також підтримують трофіку кори та кореня.

Організація АФ у клітинах коренів *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* при формуванні АР. Мережа актинових філаментів у клітинах кори коренів *A. plantago-aquatica* не зазнає суттєвого руйнування (рис. 20 а). АФ у клітинах кореня *S. latifolium* руйнуються поступово разом із клітиною і, зазвичай, вони виглядають невідпорядкованими а їхні рештки скупчуються по всьому периметру клітини (рис. 20 б).

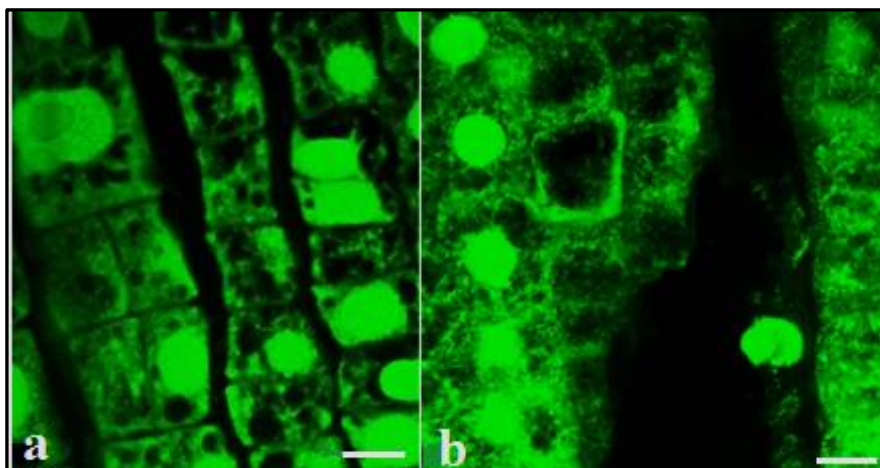


Рис. 20. Актинові філаменти у процесі формування АР коренів рослин *A. plantago-aquatica* (a) та *S. latifolium* (b); цитохімія. Масштаб 10 мкм.

Збереження організації АФ до кінцевих етапів руйнування клітин дозволяє цитоскелету забезпечувати клітинний метаболізм та екзоцитоз, чим підтримувати життєдіяльність коренів.

Однак, не виключено, що мережа АФ змінюється внаслідок внутрішньоклітинних процесів, наприклад активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мембрани, що збільшує кількість вторинних окиснених продуктів, може порушувати організацію мембрани і вбудованих білків та впливати на їхнє з'єднання з цитоскелетом, зокрема, з мікрофіламентами. Оскільки ПКЗ при утворенні лізигенної АР починає розвиватися із підвищеного рівня АФК, логічно припустити збільшення кількості окиснених продуктів мембрани (концентрації ТБК-продуктів (малонового діальдегіду)) саме у повітряно-водних рослин *S. latifolium*. Проте, наші дослідження не виявили підвищеного вмісту окиснених продуктів у *S. latifolium* ($0,0023 \pm 0,001$ мкМ) і поряд з тим, визначена на порядок вища концентрація ТБК-продуктів саме у наземного представника *Sium* – *S. sisaroides* ($0,0487 \pm 0,002$ мкМ). У рослин *A. plantago-aquatica* також виявлене збільшення

окиснених продуктів мембрани у наземної форми ($0,075 \pm 0,008$ мкМ vs $0,0032 \pm 0,001$ мкМ у повітряно-водної).

Встановлено, що АФ беруть участь у розвитку процесів ПКЗ (Tian et al. 2009) і деполімеризація АФ може активувати клітинний сигналінг, посилювати активацію фактора транскрипції і подовжувати вивільнення Ca^{2+} (лімфоцити) (Nao and August 2005). Подібний сценарій може відбуватися і у клітинах рослин. Відомо, що підвищена концентрація АФК знижує динаміку АФ (швидкість розбирання полімера) (Wilkins et al. 2011; Liu et al. 2012), що є індикатором деградаційних процесів, а низька концентрація АФК, навпаки, посилює динаміку АФ у клітинах тварин, рослин та дріжджах (Leadsham et al. 2010; Wilkins et al. 2011). За даними наших експериментів знижена динаміка актину притаманна суходільним *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* а інтактні динамічніші АФ – їхнім повітряно-водним формам та близьким видам. З одного боку, такий феномен можна пояснити видовою особливістю рослин. З іншого – знижений рівень АФК у повітряно-водних *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* може бути пов'язаним із тим, що динамічні інтактні АФ залучені до внутрішньоклітинних метаболічних процесів, включаючи як етапи ПКЗ, так і екзоцитоз. А саме, АФ забезпечують при ПКЗ безперебійний екзоцитоз, потрапляння на ЦМ та у позаклітинний простір літичних ферментів, необхідних для руйнування міжклітинних зв'язків та розділення клітинних рядів. Регулювання мережі актинових філаментів активними формами кисню є також необхідним для екзоцитозу, який забезпечує ріст клітин, що підтримує у цілому життєдіяльність кореня навіть в умовах деградаційних процесів при формуванні АР. У свою чергу, менш динамічні АФ суходільних форм за відсутності АР у коренях задіяні переважно у внутрішньоклітинних процесах та екзоцитозі, який забезпечує ріст (рис. 21).

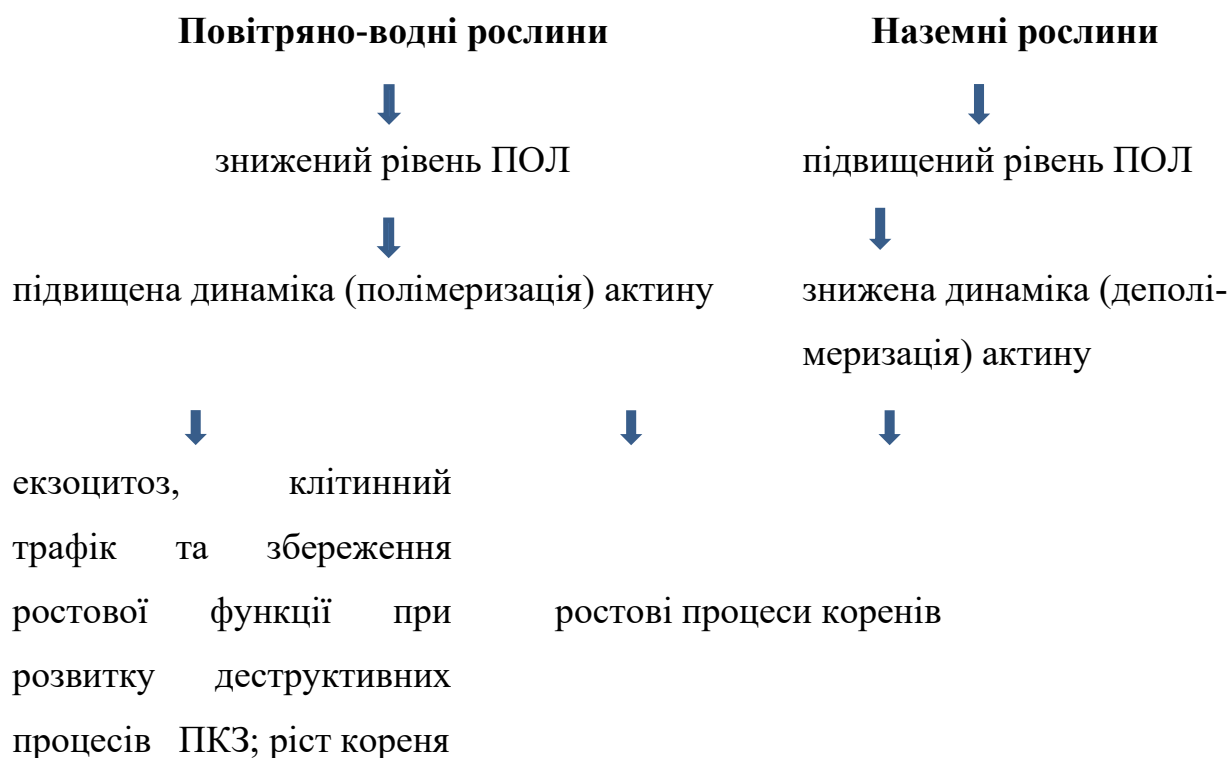


Рис.21. Етапи формування аеренхіми коренів рослин із залученням актинових філаментів.

Особливості ПКЗ у коренях *Sium latifolium*. У *S. latifolium* відзначають досить унікальну ситуацію із руйнуванням ядра. Хоча РК завжди безядерні, ми не спостерігали на послідовних зрізах проміжних етапів елімінації ядра – зміни форми або його фрагментації, що вважають явною ознакою ПКЗ ссавців і деяких рослин (Gladish et al. 2006). Деградація ядерного матеріалу у даного виду, ймовірно, відбувається дуже швидко шляхом лізису або аутофагії (Bozhkov and Jansson 2007).

Цитоскелет – первинний компонент динамічної системи реагування рослин на зовнішні подразники. Реакції рослинної клітини на зовнішній стрес включають взаємодію елементів кортикального цитоскелету із ЦМ і КС. Усі компоненти даного континууму функціонально пов'язані, що забезпечує швидку реакцію і пристосування до змінних умов довкілля. Наші дослідження показали,

що організація цитоскелету, а саме, його полімеризація та деполімеризація, здатні транскрипційно регулювати гени, які кодують його структурні і асоційовані білки-регулятори. У перебудові мережі цитоскелету задіяні численні асоційовані із цитоскелетом білки, виявлення яких визначає перспективний напрямок дослідження. Також відомо, що цитоскелет є невід'ємним компонентом внутрішньоклітинних сигнальних реакцій, зокрема, ПКЗ, у яких динамічна зміна організації цитоскелету, так само, як і у випадку реакції на механічний стрес є складовою сигналіngu, опосередкованого АФК і іншими факторами катаболізму.

Аналізуючи реакцію цитоскелету на модельовану мікрогравітацію і гіпоксію, можна зробити висновок про те, що спільним у реакції цитоскелету коренів на обидва фактори є перебудови кортикальних МТ. Як у випадку кліно-статування, так і утворення схизогенної та первинних етапів лізигенної АР у клітинах коренів порушується організація кМТ, відбувається розшарування пучків МТ та відхилення від поперечної орієнтації. Це, у свою чергу, позначається на пом'якшенні КС та змінах темпів росту коренів та/або відокремленні клітинних рядів внаслідок послаблення міжклітинних з'єднань. Цей процес регулюється динамікою МТ (полімеризацією/деполімеризацією). Аналіз результатів роботи складає підґрунття для широкої перспективи розгляду таких молодосліджених питань, як адаптація цитоскелету до механічного стресу та гіпоксії, а саме: 1) регуляція динаміки МТ та АФ численними асоційованими білками; 2) транскрипційна регуляція структурних генів цитоскелету та асоційованих білків, які забезпечують динамічне функціонування континууму КС–ЦМ–цитоскелет в умовах стресу; 3) сигналінг за участі цитоскелету при реакції на механічний стрес та гіпоксію та багатьох інших. У свою чергу, це окреслює перспективу для розробки напрямків, які сприятимуть розвитку фундаментальних та прикладних досліджень космічної біології та біології стресу рослин. Представлені у роботі дані являються внеском у розвиток біотехнологій рослинництва, здатного давати високі врожаї під час довготривалих космічних місій а також при швидких змінах екологічних умов.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені новітні уявлення щодо організації та функціонування елементів цитоскелету у коренях рослин в умовах модельованої мікрогравітації (кліноостатування) та гіпоксії. Встановлено, що кліноостатування чинить механічний стрес на кортикальну зону клітини, який проявляється у знятті навантаження на структури цитоскелету. Реакція на даний вид стресу включає регуляторний зв'язок між руйнуванням мережі мікротрубочок та експресією генів її структурних та асоційованих білків, а адаптація відбувається згідно специфічного механізму. Визначені етапи програмованої загибелі клітини, саме на яких руйнуються угруповання мікротрубочок і актинових філаментів внаслідок гіпоксії. Виявлені подібності залучення елементів цитоскелету до реакцій на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію. На основі результатів роботи сформовано наступні висновки:

1. Повільне одноосьове кліноостатування спричиняє часткову дезорганізацію мережі кортикального тубулінового цитоскелету, що проявляється у відхиленні окремих мікротрубочок від поперечної орієнтації у клітинах зони розтягу коренів проростків *B. vulgaris*, *A. thaliana* та *Z. mays* (10-13% клітин). При кліноостатуванні відбувається зниження рівня експресії генів *TUA6* та *CLASP* у коренях, що вказує на чутливість процесу полімеризації мікротрубочок та просторової організації їхньої кортикальної мережі до зміни механічного навантаження. Дезорієнтація мікротрубочок у клітинах зони розтягу є внеском у зміну темпів росту коренів.
2. Показана залежність між деполімеризацією мікротрубочок та зниженням експресії генів *TUA6* та *CLASP*, а також між деполімеризацією мікрофіламентів та зниженням експресії генів *ACT2*, *MAP65-1*, *FH1* та *FH4*. Це свідчить про регуляторний зв'язок між динамікою цитоскелету та транскрипцією генів, які регулюють його структурну організацію та взаємодію

- елементів, функціонування мережі, а також опосередковують з'єднання цитоскелету із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою.
3. Зниження експресії *FH1* на тлі дії цитохалазину D пов'язано із роллю білка *FH1* у нуклеації, організації та стабілізації мережі актинових філаментів та їхнього прикріплення до ЦМ та КС, тоді як підвищення при цьому експресії *FH4* підтверджує ключову роль *FH4* у опосередкуванні зв'язку між актиновими філаментами та мікротрубочками та їхньою взаємодією із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою у протидії стресу. При кліноостатуванні даний зв'язок не проявляється.
 4. Виявлено, що деполімеризація мікротрубочок пригнічує також експресію *ACT2*, тоді як деполімеризація мікрофіламентів інгібує експресію *TUA6*. Це вказує на функціональну взаємодію між мікротрубочками та актиновими філаментами, яка регулюється на генному рівні. Вперше показано, що у взаємодії між мікротрубочками та мікрофіламентами може брати участь асоційований з мікротрубочками білок *MAP65-1*.
 5. У коренях *A.thaliana* та *B.vulgaris* при кліноостатуванні послаблюється руйнівна дія інгібіторів на мережу як мікрофіламентів, так і мікротрубочок, а також не проявляється зворотний зв'язок між деполімеризацією елементів цитоскелету та транскрипційною регуляцією генів структурних та асоційованих білків: деполімеризація мікротрубочок не впливає на експресію *TUA6* та *CLASP*, а дезорганізація мікрофіламентів не впливає на експресію як *TUA6* та *ACT2*, так і *FH1*, *FH4* та *MAP65-1*. Така відмінність взаємозв'язку між станом цитоскелету та експресією генів його певних структурних та асоційованих білків є проявом адаптації до механічного стресу, спричиненого зменшеним гравітаційним навантаженням на кортикальну зону клітини і вказує на залучення вищезгаданих білків у цей процес.
 6. Вперше визначено, що кортикальні мікротрубочки клітин конститутивної аеренхіми схизогенного типу у повітряно-водних рослин *A. plantago-*

aquatica характеризуються частковою втратою поперечної орієнтації, натомість вони стають навскісними та невідповідними, що призводить до порушення організації клітинної стінки, послаблює міжклітинні зв'язки та сприяє розходженню клітинних рядів. Однак, при такій реорганізації мікротрубочок клітини зберігають свою форму і трофіку і не виключаються із архітекtonіки кори кореня.

7. Вперше визначено, що для *S.latifolium* характерна змішана аеренхіма – схизогенна сотового типу та лізигенна пакетного типу, що значно розширює адаптаційні можливості рослини у протидії гіпоксії. Специфічні ознаки утворення лізигенної аеренхіми – зникнення ядра та вакуолю на первинних етапах клітинної загибелі і збереження зменшеної кількості інших клітинних органел до останніх етапів руйнування.
8. Руйнування мережі кортикальних мікротрубочок відбувається вже на первинних стадіях формування лізигенної аеренхіми коренів природним шляхом у *S.latifolium* та індукованим у *Z. mays*, що призводить до розпушення клітинних стінок і втрати характерної форми клітини. Ендоплазматичні мікротрубочки дезорганізуються на останніх етапах редукції клітин.
9. Мережа актинових філаментів при формуванні аеренхіми лізигенного типу руйнується поступово згідно з етапами програмованої клітинної загибелі у коренях рослин. У повітряно–водних *S. latifolium* актинові філаменти опосередковують екзоцитоз до кінцевих етапів редукції клітин, завдяки чому процес загибелі проходить поступово, що сприяє збереженню клітинних рядів і трофіки кореня.
10. Зв'язок між динамікою цитоскелету та експресією генів його структурних та регуляторних білків – складова реакцій континууму цитоскелет – цитоплазматична мембрана–клітинна стінка на модельовану мікрогравітацію. Зміна динаміки та реорганізація цитоскелету у кортикальній площині клітини – спільний механізм при реакції коренів рослин як на зменшення механічного навантаження, так і на дію гіпоксії

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті

1. Shevchenko GV, Krutovsky KV. Mechanical stress effects on transcriptional regulation of genes encoding microtubule- and actin-associated proteins. *Physiol Mol Biol Plants*. 2022; 28(1): 17–30. doi:10.1007/s12298-021-01123-x. **Q1**. *(Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз генної експресії, разом із співавтором – аналіз даних, обговорення результатів та написання статті)*.
2. Шевченко ГВ. Порівняльна організація тубулінових мікротрубочок у клітинах коренів *Zea mays* (Poaceae) та *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae s. str. Amaranthaceae s. l.) під впливом кліностатування. *Укр бот журн*. 2021; 78(6): 426-433. doi:10.15407/ukrbotj78.06.426
3. Шевченко ГВ. Мікротрубочки цитоскелету у формуванні індукованої аеренхіми адвентивних коренів *Zea mays* (Poaceae). *Укр бот журн*. 2020; 77(3): 225–231. doi: 10.15407/ukrbotj77.03.225
4. Shevchenko GV. Putative gravisensors among microtubule associated proteins. *Cell Biol Int*. 2017; 43(9): 983-990. doi: 10.1002/cbin.10811. **Q3**.
5. Kordyum EL, Shevchenko GV, Brykov VO. Cytoskeleton during aerenchyma formation in plants. *Cell Biol Int*. 2017; 43(9): 991-998. doi:10.1002/cbin.10814. **Q3**. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експериментів щодо виявлення організації цитоскелету у аеренхімі коренів рослин, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті)*.
6. Shevchenko GV, Brykov VA, Ivanenko GF. Specific features of root aerenchyma formation in *Sium latifolium* L. (Apiaceae). *Cytol Genetics*. 2016; 50: 293-299. doi: 10.3103/S0095452716050121 *(Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо організації цитоскелету у коренях рослин, аналіз результатів, разом із співавторами – узагальнення результатів, написання статті)*.

7. Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Організація мікрофіламентів цитоскелета в коренях повітряно- водних рослин *Sium latifolium* (APIACEAE) та *Alisma platago-aquatica* (ALISMATACEAE) у процесі формування аеренхіми. Укр бот журн. 2016; 73 (2): 185-193. doi: 10.15407/ukrbotj73.02.185 (*Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз результатів, разом із співавтором – узагальнення результатів, написання статті*).
8. Shevchenko G. Participation of proteins binding both actin filaments and microtubules in higher plant cell growth. Cytol Genetics. 2015; 49: 270-278. doi: 10.3103/S009545271504009X
9. Shevchenko G. Actin microfilament organization in the transition zone of *Arabidopsis*-ABD2-GFP roots under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2012; 24 (6): 427-433. doi: 10.1007/s12217-012-9318-5. **Q2**.
10. Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Использование трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* – GFP– ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации. Косм наука техн. 2012; 18(6): 51-56. (*Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз результатів, написання статті, разом із співавтором – узагальнення результатів*).
11. Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Тубуліновий цитоскелет у клітинах кореневих апексів повітряно-водних рослин *Alisma plantago-aquatica* L. (*Alismataceae*) та *Sium latifolium* L. (*Apiaceae*). Укр бот журн. 2012; 69 (4): 568-579. (*Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації мікротрубочок у клітинах коренів, аналіз результатів, написання статті, разом із співавтором – узагальнення результатів*).
12. Kalinina I, Shevchenko G, Kordyum E. Tubulin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2008; 21(1-2): 187-190. doi: 10.1007/s12217-008-9047-y. **Q2**. (*Особистий внесок здобу-*

вача: проведення експериментів, аналіз стану мікротрубочок у зоні розтягу кореня, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).

13. Шевченко ГВ. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корня *Arabidopsis thaliana*. Цитол генет. 2009; 43(4): 3-11.
14. Shevchenko G, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. Cell Biol Int. 2008; 32: 560-562. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.11.010. **Q3**. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявлення організації мікротрубочок, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
15. Shevchenko GV, Kalinina YaM, Kordyum EL. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. Adv Space Res. 2007; 39: 1171-1175. doi: 10.1016/j.asr.2007.02.072. **Q3**. *(Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз організації мікротрубочок та мікрофіламентів у зоні розтягу кореня, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
16. Shevchenko G, Kalinina Ya, Kordyum E. Interrelation between cytoskeleton elements in root cells of *Arabidopsis*-GFP-MAP4 seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2006; 13(1):107-108. **Q3**. *(Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
17. Kordyum EL, Shevchenko GV, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YaB. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station. Acta Astronautica. 2005; 56: 613-621. doi: 10.1016/j.actaastro.2004.10.006. **Q2**. *(Особистий внесок здобувача: аналіз даних літератури щодо застосування GFP-методу у дослідженнях*

рослин, разом із іншими співавторами – узагальнення теоретичних положень, написання статті).

- 18.Kozeko LYe, Shevchenko GV, Artemenko OA, Martyn GG, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2005; 12(1): 187-188. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявлення організації мікрофіламентів, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів).
- 19.Kordyum EL, Martyn GG, Shevchenko G, Kozeko LYe, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. J Grav Physiol. 2005; 12 (1): 189-190. (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації елементів цитоскелету у коренях, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).
- 20.Shevchenko GV, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. Adv Space Res. 2005; 35: 289-295. doi: 10.1016/j.asr.2005.02.021. **Q3**. (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації цитоскелету, разом із співавтором – аналіз та узагальнення результатів та теоретичних положень, написання статті).
- 21.Kordyum EL, Shevchenko GV. Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Grav Physiol. 2003; 10 (1): 15-16. **Q3**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури щодо участі цитоскелету у гравічутливості неспецифічних клітин рослин, разом із співавтором – узагальнення результатів, написання статті).
- 22.Thomas S, Osman K, de Graaf BHJ, Shevchenko G, Wheeler M, Franklin Ch, Franklin-Tong V. Investigating mechanisms involved in the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 2003; 358: 1033-1036. doi: 10.1098/rstb.2003.1288. **Q1**. (Особистий внесок здобувача: виявлення

організації мікрофіламентів при реакції самонесумісності, проведення тестів виживаності мітохондрій при реакції самонесумісності, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів).

23. Кордюм ЕЛ, Шевченко ГВ. Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитол генет. 2003; 37 (2): 56-68. *(Особистий внесок здобувача: критичний аналіз теоретичних положень щодо ролі цитоскелету у гравічутливості рослин, разом із співавтором – узагальнення теоретичних положень, написання статті).*

24. Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. The Plant Cell. 2002; 14 (10): 2613-2626. doi: 10.1105/tpc.002998. **Q1.** *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявлення організації мікрофіламентів при реакції самонесумісності, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

Окремі розділи в книгах

25. Kordyum E, Borisova T, Krisanova N, Pozdnyakova N, Shevchenko G, Kozeko L, Romanchuk S, Lobachevska O, Charkavtsiv Ya, Kyyak N, Zaimenko N, Ivanytska B, Brykov V, Mischenko L. In: Fedorov O, editor. Space research in Ukraine. 2019-2020. Kyiv: Akadempriodyka; 2020. p. 71–78. *(Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо визначення ролі асоційованих білків цитоскелету у гравічутливості неспецифічних клітин, аналіз результатів, написання окремого розділу).*

26. Kordyum EL, Shevchenko GV, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. 2008. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The Plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. NATO Science for peace and security series- C:

Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196. (*Особистий внесок здобувача: аналіз практичних даних щодо ролі взаємної організації елементів цитоскелету у гравічутливості рослин, разом із співавторами – узагальнення результатів експериментів, написання розділу*).

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Shevchenko G. Impact of clinorotation on microtubule regulation by tubulin-associated proteins in plants. 26th ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2019, 24-27 September, Granada, Spain. p. 140.
2. Шевченко ГВ. Білки, асоційовані із тубуліновим цитоскелетом як можливі гравісенсори рослин. Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках. Міжнародна конференція, 2019, 25-27 лютого, Київ. с. 197.
3. Шевченко ГВ. Дослідження росту рослин в умовах мікрогравітації. Українська конференція з космічних досліджень, 2018, 17-20 вересня, Київ. с. 82.
4. Шевченко ГВ. Изменения цитоскелета растений в условиях симулированной микрогравитации. 2-я Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», 2018, 28-31 мая, Минск, Беларусь. с.31-32.
5. Шевченко ГВ. Ассоциированные с микротрубочками белки чувствительны к воздействию микрогравитации. 17- та Українська конференція з космічних досліджень, 2017, 21-25 серпня, Одеса. с.69.
6. Shevchenko G. Microtubule associated proteins might sense gravity changes. 7th International Symposium on Physical Sciences in Space and 25th European Low Gravity Research Association Biennial Symposium and General Assembly, 2017, 2-6 October, Juan-les-Pins, France. p.99-100.
7. Шевченко ГВ. Влияние клиностатирования на организацию цитоскелета растительной клетки. 15 Українська конференція з космічних досліджень, 2015, 24-28 серпня, Одеса. с. 55.
8. Shevchenko G. Cortical microtubules and phospholipase D are involved in *Arabidopsis* root cell growth under clinorotation. European Low Gravity

- Association (ELGRA) Biennial Symposium and General Assembly, 2013, 11-14 September, Vatican, Italy. p.192.
9. Шевченко ГВ. Роль цитоскелета в регулировании ростовых процессов клеток корня при клиностатировании. Українська конференція з космічних досліджень, 2013, 2-6 вересня, Євпаторія, Крим. с.95.
 10. Шевченко ГВ. Влияние микрогравитации на цитоскелет в корнях *Arabidopsis thaliana*. 12-та Українська конференція з космічних досліджень, 2012, 3-7 вересня, Євпаторія, Крим. с.84.
 11. Shevchenko G, Kordyum E. Developmental rearrangement of microtubules in plant root cells under clinorotation. ELGRA Biennial General Assembly, 2011, 5-9 September, Antwerp, Belgium. p.179.
 12. Shevchenko G. Developmental rearrangement of cortical microtubules in plant root cells. 31st Annual ISGP Meeting, 11th ESA Life Science Symposium, 5th ISSBB Symposium, ELGRA Symposium, 2010, 13-18 June, Trieste, Italy. p117.
 13. Shevchenko G, Kordyum E. Impact of microgravity on plant cell growth. 5th Conference of European Plant Science Organization (EPSO), 2010, 18-22 April, Olos, Finland. p.162.
 14. Shevchenko GV. Impact of clinorotation on the orientation of microtubules in plant root cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2009, 1-4 September, Bonn, Germany. p.240.
 15. Kalinina Ia, Shevchenko G, Kordyum E. Sensitivity of cortical microtubules in *A. thaliana* root cells under clinorotation. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2007, 23-28 March, Coeur d'Alene, Idaho, USA. p.53
 16. Kalinina Ia, Shevchenko G, Kordyum E. Spatial organization of cytoskeleton in *Arabidopsis* roots under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.68.
 17. Shevchenko G, Kalinina Ia, Kordyum E. Cytoskeleton rearrangements in the distal elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.67.

18. Шевченко ГВ. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів. 2-й з'їзд Українського Товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ. с. 224.
19. Shevchenko GV, Kalinina YaM, Kordyum EL. Tubulin cytoskeleton in elongation zone of *Arabidopsis* root is affected by clinorotation. 6-я Украинская конференция по космическим исследованиям, 2006, 3-10 сентября, НЦУІКС, Євпаторія, Крим. с. 189.
20. Kalinina Ia, Shevchenko G, Kordyum E. Oryzalin sensitivity of cortical microtubules in *A.thaliana* root cells under clinorotation. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for biotechnology and agriculture, 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.47-48.
21. Shevchenko G, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for biotechnology and agriculture. 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.86-88.
22. Шевченко ГВ, Овруцька П. Формування бічних коренів у різних екотипів веху широколистого (*Sium latifolium*) як прояв пластичності розвитку рослин. XII з'їзд Українського ботанічного товариства, 2006, 15-18 травня, Одеса. с. 517.
23. Kozeko LE, Shevchenko GV, Artemenko OA, Martyn GI, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.105.
24. Kordyum EL, Martyn GI, Shevchenko GV, Kozeko LE, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual IGPS Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.106.

25. Shevchenko G, Kordyum E. Actin cytoskeleton in the transition zone of *Beta vulgaris* roots is sensitive to clinorotation. Society Experimental Biology Meeting, 2005, 11-15 July, Barcelona, Spain. p. 327.
26. Шевченко ГВ. Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.
27. Shevchenko G, de Graaf B, Franklin-Tong V. Role of actin-binding proteins in remodeling of actin cytoskeleton during SI response in *Papaver rhoeas* pollen tubes. 14 FESPB Congress, Acta Physiologiae Plantarum 26 (3), 2004, 23-27 August, Cracow, Poland. p. 49.

АНОТАЦІЯ

Шевченко Г.В. Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук 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, 2023.

У роботі наведені результати дослідження впливу модельованої мікрогравітації (кліноостатування) та гіпоксії на цитоскелет (мікротрубочки та актинові філаменти) коренів рослин та проаналізовані реакції адаптації до даних чинників. Виявлена дезорганізація кМТ у клітинах зони розтягу коренів кліноостатованих рослин *B. vulgaris*, *Z.mays* та *A.thaliana*, і припускається, що однією з причин цього є зменшення експресії структурного гена цитоскелета – *TUA6* та гена білка *CLASP*, який бере участь у стабілізації мережі кМТ. Визначено, що деполімеризація МТ регулює рівень експресії генів *TUA6* та *CLASP*, а деполімеризація АФ – генів *ACT2* та генів формінів *FH1* та *FH4*.

Вперше виявлено, що експресія *MAP65-1* залежить від організації АФ. Встановлено, що кліноостатування чинить механічний стрес на клітину, який полягає у знятті гравітаційного навантаження з її кортикальної області, що призводить до активації специфічного адаптаційного механізму, частиною якого є відмінна від стаціонарного контролю регуляція експресії генів *TUA6*, *CLASP*, *MAP65-1*, *FH1* та *FH4* і це свідчить про залучення вказаних білків у протидію стресу. Вперше визначені особливості організації цитоскелету у клітинах кори ростових зон коренів *B. vulgaris* та повітряно-водних *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium*. Встановлені етапи участі цитоскелету у процесах формування (включаючи клітинну загибель) аеренхіми коренів в умовах гіпоксії. Зміна динаміки та дезорієнтація кортикального цитоскелету є загальною реакцією клітин коренів рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію.

Ключові слова: мікротрубочки, актинові філаменти, цитоскелет рослин, модельована мікрогравітація, кліноостатування, механічний стрес, асоційовані з цитоскелетом білки, аеренхіма коренів, дистальна зона розтягу, гіпоксія.

SUMMARY

Shevchenko G.V. Cytoskeleton in the process of plant adaptation to simulated microgravity and hypoxia. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science (Dr. Sci.) degree in Biology, speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology (091-biology). IM.G. Kholodny Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine. Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

Manuscript presents the study of simulated microgravity (clinostating) and hypoxia impact on cytoskeleton (microtubules and actin filaments) of plant roots and analyzed adaptation to these factors. Cortical MT disorganization was detected in cells of the distal elongation (transition) zone of roots of clinorotated *B. vulgaris*, *Z. mays*

and *A. thaliana* plants, and it is assumed that one of the reasons for this is a decrease in the expression of structural gene of the cytoskeleton - *TUA6* and gene of protein CLASP, which is involved in the stabilization of cortical MT network. It was determined that MT depolymerization regulates expression of *TUA6* and *CLASP* genes, and AF depolymerization regulates *ACT2* gene and formin *FH1* and *FH4* genes. For the first time, it was found that expression of *MAP65-1* depends on the organization of AF. It was established that clinorotation exerts mechanical stress on the cell, which consists in removing the gravitational load from its cortical region and this leads to activation of a specific adaptation mechanism, part of which is different from stationary control regulation of *TUA6*, *CLASP*, *MAP65-1*, *FH1* and *FH4* gene expression. This indicates involvement of above proteins in combating the stress.

For the first time, the features of cytoskeleton organization in cortex cells of the growth zones of *B. vulgaris* roots and roots of *A. plantago-aquatica* and *S. latifolium* water plants were determined. The stages of cytoskeleton involvement in the processes of root aerenchyma formation (including cell death) under conditions of hypoxia have been established. Alteration of dynamics and disorientation of the cortical cytoskeleton, namely MT, is a general response of plant root cells to simulated microgravity and hypoxia.

Key words: microtubules, actin filaments, plant cytoskeleton, modeled microgravity, clinostating, mechanical stress, proteins associated with the cytoskeleton, root aerenchyma, distal stretch zone, hypoxia.