

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

РОМАНЧУК СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА



УДК 582.683.2:577.218:57.012.4:581.43:58.02

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА β -ГЛЮКОЗИДАЗИ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРА ТІЛЕЦЬ
ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМУ В КЛІТИНАХ
КОРЕНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПІД ВПЛИВОМ КЛІНОСТАТУВАННЯ
ТА ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія
091-біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертація є рукописом

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кордюм Єлизавета Львівна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України, завідувач відділу
клітинної біології та анатомії

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

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Лобачевська Оксана Василівна,
Інститут екології Карпат НАН
України, завідувач відділу
екоморфогенезу рослин

Захист відбудеться «_____» _____ 2020 р. об ____.— год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. 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» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

Автореферат розіслано «_____» _____ 2020 р.

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



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Вищі рослини як джерела кисню та їжі визначено ключовими складовими біорегенеративних систем життєзабезпечення космонавтів у тривалих польотах в далекому космосі, побудови та експлуатації місячних баз, експедиціях до Марса (Karoliussen, Kittang, 2013; Kiss, 2014). У кабіні пілотованих космічних апаратів основними діючими факторами, які несуть найбільші ризики для біологічних об'єктів, є мікрогравітація та іонізуюча радіація. На основі даних численних космічних і модельованих наземних експериментів визначено особливості реакцій та адаптації рослин до дії мікрогравітації (Halstead, Dutcher, 1987; Claasen, Spooner, 1994; Kordyum, 1997; Kittang et al., 2014; Stankovic, 2018). Достатньо повно описано вплив мікрогравітації на структурну та функціональну організацію цитоплазматичних органел, зокрема мітохондрій, хлоропластів і вакуоль рослинних клітин, спеціалізованих та не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу (Klymchuk et al., 2003; Kochubeu et al., 2004; Kordyum, 2014; Бриков, 2015). Проте недостатньо з'ясованим залишається питання щодо впливу мікрогравітації на ендоплазматичний ретикулум (Cook, Croxdale, 2003; Van Loon et al., 2006) – поліфункціональну органелу, в компартментах якої здійснюється інтенсивний біосинтез і метаболізм речовин (білків, ліпідів, вуглеводнів) та їх транспорт і просторовий розподіл між різними компонентами рослинної клітини і між окремими клітинами (Howell, 2013; Angelos et al., 2017; Stefano, Brandizzi, 2018; Balla et al., 2019), а також на тільця ендоплазматичного ретикулуму (ER-тільця), високо специфічним компонентом яких є фермент β -глюкозидаза (глюкозид-глюкогідролаза, КФ 3.2.1.21) (Hayashi et al., 2001).

ER-тільця, які притаманні виключно видам родини Капустяні (Brassicaceae), беруть участь у відповідях клітин на дію несприятливих абіотичних і біотичних чинників та здійснюють захисну функцію завдяки наявності в них β -глюкозидази (Hara-Nishimura, Matsushima, 2003; Matsushima et al., 2003a, b; Xu et al., 2004; Nagano et al., 2008; Yamada et al., 2011; Nakano et al., 2014; Gotte et al., 2016; Nakazaki et al., 2019). Припускається, що саме з ER-тільцями пов'язана висока стійкість видів цієї родини, зокрема *Arabidopsis thaliana*, до іонізуючого випромінювання, однак експериментальні дані відсутні. Щодо дії мікрогравітації, то існує лише декілька повідомлень відносно збільшення кількості ER-тілець у клітинах дистальної зони розтягу кореневих апексів *A. thaliana* і *Brassica rapa* в умовах космічного польоту та кліноостатування (Калініна, 2007а; Булавін, 2017). Тому актуальними для подальшого пізнання механізмів адаптації рослин до факторів космічного польоту є дослідження ER-тілець та їхніх компонентів на клітинному і молекулярному рівнях у коренях модельного об'єкту *A. thaliana* під впливом модельованої мікрогравітації та іонізуючого випромінювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за темами: «Проведення перспективних наукових досліджень з клітинної біології та мікрогравітації» (2008–2012 рр., № ДР 0108U009552); «Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях («Біолабораторія–М»)»

(2012–2013 рр., № ДР 00112U004176); «Дослідження впливу мікрогравітації на фізико-хімічні властивості цитоплазматичної мембрани рослинних клітин (МЕМБРАНА)» (2014 р., № ДР 00113U002585); «Фізико-хімічні властивості біомембран рослинних клітин в умовах мікрогравітації: цитоплазматична та енергетичні мембрани» (2015–2016 рр., № ДР 0115U002737).

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було з'ясувати вплив повільного горизонтального кліностакування та Х-опромінення на структуру тілець ендоплазматичного ретикулуму (ЕР-тілець), експресію гена і функціональну активність β -глюкозидази в клітинах кореня проростків *A. thaliana*.

Для досягнення мети до завдань роботи входило:

1. Дослідити ультраструктуру клітин кореневого чохла і клітин дистальної зони розтягу власне кореня під впливом кліностакування та Х-опромінення.
2. Охарактеризувати особливості структурних змін ЕР-тілець у клітинах кореневого чохла і клітинах дистальної зони розтягу власне кореня під впливом кліностакування та Х-опромінення.
3. Визначити зміни активності β -глюкозидази проростків у відповідь на кліностакування та Х-опромінення.
4. Дослідити експресію гена *РУК10*, який кодує β -глюкозидазу ЕР-тілець, в проростках за впливу кліностакування та Х-опромінення.

Об'єкт дослідження: лабільність і чутливість ЕР-тілець до абіотичних чинників.

Предмет дослідження: структурні зміни ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла і клітинах дистальної зони розтягу власне кореня та участь їх ферменту β -глюкозидази у відповіді проростків *A. thaliana* на вплив кліностакування та Х-опромінення.

Методи дослідження: світлова, конфокальна і трансмісійна електронна мікроскопія, біохімічне визначення активності ферменту β -глюкозидази, молекулярно-біологічні методи (ПЛР-ампліфікація зворотних транскриптів та в режимі реального часу), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримано нові докази участі ЕР-тілець у відповідях клітин кореня *A. thaliana*, спеціалізованих (кореневий чохлак) і неспеціалізованих (дистальна зона розтягу) до сприйняття гравітаційного стимулу, на вплив модельованої мікрогравітації (кліностакування) та іонізуючої радіації (Х-опромінення): збільшення кількості та середньої площі ЕР-тілець на зріз клітини та варіабельності їхньої форми і розмірів у клітинах кореневого чохла і клітинах дистальної зони розтягу. Вперше показано, що кліностакування призводить до посилення в проростках експресії гена *РУК10*, що кодує β -глюкозидазу ЕР-тілець, проте не впливає на загальну активність цього ферменту. Вперше визначено, що Х-опромінення в діапазоні доз 0,5 Гр – 12 Гр викликає швидку тимчасову дозо-залежну активацію експресії гена *РУК10* та посилення загальної активності β -глюкозидази, що може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації. Одержані дані вперше доводять участь ЕР-тілець як похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в реакціях проростків *A. thaliana* на дію основних факторів космічного польоту – мікрогравітації та іонізуючої радіації.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані дані фундаментальних досліджень доповнюють та поглиблюють існуючі уявлення про клітинні механізми

адаптації рослин до умов модельованої та реальної мікрогравітації й іонізуючої радіації, а також можуть використовуватися для вирішення прикладних завдань космічної біології рослин. Враховуючи те, що ЕР-тільця є характерною особливістю представників родини Капустяні (*Brassicaceae*), цінність отриманих для *A. thaliana* даних посилюється тим, що багато овочевих культур, які пропонуються для вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення, також належать до цієї родини, а саме: редька (*Raphanus sativus* var. *sativus*), редиска (*R. sativus* var. *radicula*), дайкон (*R. sativus* subsp. *acanthiformi*), капуста (*B. oleracea*), ріпа (*B. rapa*) та хрениця (*Lepidium sativum*). Тому встановлені нами закономірності відкривають нові підходи до планування та проведення космічних і наземних експериментів щодо тестування стійкості цих овочевих культур до умов космічного польоту. Результати досліджень також можуть бути впроваджені у навчальний процес при підготовці спеціалістів із космічної біології, клітинної біології та екології рослин.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було означено проблему, обрано тему дисертації, розроблено її концепцію та структуру, визначено експериментальні завдання для вирішення проблеми. Здобувачем самостійно проведено пошук й аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури по тематиці дослідження, виконано експериментальну частину роботи, здійснено статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих даних.

Апробація результатів. Основні положення дисертації були представлені на міжнародних конференціях молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (11–15 серпня, 2009, Кременець, Україна; 21–25 вересня, 2010, Ялта, Крим; 9–13 серпня, 2011, Березне, Україна; 19–23 вересня, 2012, Ужгород, Україна; 5–10 вересня, 2017, Луцьк, Україна); ELGRA Symposium «Life in Space for Life on Earth» (13–18 June, 2010, Trieste, Italy); XI конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (22–24 червня, 2010, Київ, Україна); 10-й, 11-й, 14-й, 15-й та 17-й Українських конференціях з космічних досліджень (30 серпня – 3 вересня, 2010, Євпаторія, Крим; 29 серпня – 2 вересня, 2011, Євпаторія, Крим; 8–12 вересня, 2014, Ужгород, Україна; 24–28 серпня, 2015, Одеса, Україна; 21–25 серпня, 2017, Одеса, Україна); ELGRA Biennial Symposium and General Assembly «Gravity: from μ to x!» (5–9 September, 2011, Antwerp, Belgium); 4th International IMBG Conference for young scientists «Molecular biology: advances and perspectives» (14–17 September, 2011, Kyiv, Ukraine); Космическом форумі 2011, посвященном 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина (18–21 октября, 2011, Москва, РФ); 39th and 40th COSPAR Scientific Assemblies (14–22 July, 2012, Mysore, India; 2–10 August, 2014, Moscow, Russia); 9th and 10th International Conferences «Plant Functioning Under Environmental Stress» (12–15 September, 2012, Cracow, Poland; 16–19 September, 2015, Cracow, Poland); 19th and 20th IAA Humans in Space Symposiums (7–12 July, 2013, Cologne, Germany; 29 June – 3 July, 2015, Prague, Czech Republic); 36th Annual Meeting of the Society International for Gravitational Physiology (7–12 June, 2015, Ljubljana, Slovenia); 51st ESLAB Symposium «Extreme habitable worlds» (4–8 December, 2017, Noordwijk, The Netherlands); VII з'їзді Всеукраїнської асоціації біологів рослин та XIV Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (15–20 вересня, 2019, Київ, Україна).

Публікації. Отримані в ході дослідницької роботи результати досліджень були опубліковані в 31 науковій праці, з яких 8 статей у фахових українських і зарубіжних виданнях та 23-ох тезах доповідей у матеріалах українських і міжнародних конференцій, симпозіумів і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 180 сторінках друкованого тексту, містить 13 таблиць, 37 рисунків і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури, який містить 303 найменування, та 2-х додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У огляді літератури, який містить два розділи, висвітлено основні уявлення щодо структурно-функціональної організації рослин під впливом основних факторів космічного польоту, що діють на живі організми – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Розглянуто особливості структури і функцій ендоплазматичного ретикулуму та похідних від нього ER-тілець. Описано специфічний компонент ER-тілець – β -глюкозидазу, основна з яких кодується геном *PYK10*, та охарактеризовано її роль в захисті рослин від впливу абіотичних і біотичних чинників. На основі аналітичного огляду джерел літератури обґрунтовано актуальність проведення досліджень щодо особливостей реакції гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ER-тілець та їх компоненту β -глюкозидази на вплив кліностакування та X-опромінення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досліджень використовували проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0), які отримували з насіння, що стерилізували 70 % розчином етанолу впродовж 30 с, промивали стерильною водою, переносили в 12 % розчин гіпохлориту натрію, витримували в ньому 6 хв та п'ятикратно відмивали стерильною водою. Насіння стратифікували протягом 3-х діб за температури 4 °C та висівали на середовище Мурасіге і Скуга (Murashige, Skoog, 1962) у скляні стаканчики та чашки Петрі за стерильних умов і температури 22 °C – 24 °C.

Кліностакування. Використовували повільний горизонтальний кліностат (2 об/хв) для часткового моделювання впливу реальної мікрогравітації. Частина стаканчиків з насінням обертала на кліностаті, другу – залишали у вертикальному положенні (контроль). Проростки вирощували в темряві впродовж 3-х, 5-ти і 7-ми діб та аналізували їх відразу після закінчення експериментів.

X-Опромінення. Проростки вирощували із фотоперіодом 16 год світло / 8 год темрява при освітленні 93 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ впродовж 3-х та 13-ти діб. Проростки в чашці Петрі віком 3 доби піддавали гострому X-опроміненню на приладі РУМ-17 (Росія) у дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр і 12 Гр, з потужністю дози 0,43 сГр/с. Дози радіації обирали згідно з літературними даними таким чином, щоб вони включали діапазон доз, до певної міри еквівалентний такому в кабіні космічного корабля (International space station internal radiation monitoring (<http://www.nasa.gov>)) та не викликали значних пошкоджень проростків (< LD₅₀) (Гродзинський та ін., 2005;

Данильченко, 2005; Kurimoto et al., 2010; Літвінов, Рашидов, 2018). Проростки аналізували через 2 год та 10 діб після дії X-променів. Для контролю використовували 3- та 13-добові проростки, які не опромінювали.

Світлова та трансмісійна електронна мікроскопія. Апекси коренів довжиною 0,3 см – 0,8 см фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду на какодилатному буфері (0,1 М, рН=7,2) та 1 % розчині чотириокису осмію на тому ж буфері. Зразки зневоднювали в серії етанолу і ацетоні та заливали їх в суміш смол епон-аралдит за стандартною методикою (Bobkov, 2014). Напівтонкі зрізи одержували на приладі MT-XL Microtome (RMR Instruments, США), переносили їх на предметне скло, забарвлювали 0,12 % толуїдиновим синім і досліджували під мікроскопом Axioscop (Carl Zeiss, Німеччина). Тонкі зрізи одержували на тому ж ультрамікромомі, переносили їх на бленди, вкриті формваровою плівкою, контрастували 0,5 % ураніл ацетатом і цитратом свинцю (Reynolds, 1963) та досліджували під трансмісійними електронними мікроскопами JEM-1200 EX і JEM-1230 (Jeol, Японія) за напруги 60 кВ або 80 кВ. Аналіз отриманих цифрових зображень та виміри розмірів органел клітини проводили за допомогою засобів програми ImageTool v.3.0. (UTHSCSA, США).

Конфокальна мікроскопія. Апекси коренів поміщали у фіксатор Карнуа, забарвлювали акридиновим оранжевим на фосфатно-цитратному буфері (рН=5,2) та заключали в краплю 65 % сахарози (Шалумович, 1959). Візуалізацію зон кореня здійснювали на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 5 Pascal (Zeiss, Німеччина) з лінзами Plan Neofluar (вихід флуоресценції в області 488 нм, збір флуоресценції – 500 нм – 600 нм).

Визначення активності β -глюкозидази проводили спектрофотометричним методом (Matsuura, 1989; Pislewska et al., 2002). Субстрат 4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозид обрано згідно з відомостями літератури (Matsushima et al., 2003a; Ahn et al., 2010) із бази даних BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org>). Оптичну густину розчинів вимірювали при довжині хвилі 420 нм на спектрофотометрі СФ-2000 (Спектр, Росія). Кількість загального білку визначали за методом (Bradford, 1976). Активність β -глюкозидази вираховували за кількістю 4-нітрофенолу, що утворюється під час проходження реакції та виражали в одиницях активності – од. акт.

Виділення РНК проводили з набором реагентів TRI-Reagent® (Sigma, Німеччина) за інструкцією виробника (Sigma, 2010). Якість виділеної РНК перевіряли за допомогою 1 % агарозного денатуруючого гелю-електрофорезу в формальдегідному буфері (рН=7,0) (Maniatis et al., 1982). Кількість отриманої РНК визначали спектрофотометрично за стандартною методикою (Fleige, Praffl, 2006; Becker et al., 2010).

ЗТ-ПЛР. кДНК синтезували з отриманої мРНК з використанням набору реагентів Fermentas, який містить зворотну транскриптазу M-MLV (Fermentas, Литва), за інструкцією виробника (Fermentas, 2011b) на приладі Терцик (ДНК-Технологія, Росія).

ПЛР-ампліфікація. Використовували обрані з бази даних NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) праймери, які є комплементарними до найбільш консервативних ділянок гена *PYK10* (*At3g09260*). Для контролю використовували праймери до генів *UBQ5* (*At3g62250*) і *TUB9* (*At4g20890*). Реакцію проводили з використанням набору реагентів PCR Master Mix (Fermentas, Литва) за інструкцією виробника (Fermentas, 2010) на тому ж приладі. Розмір продуктів ампліфікації

визначали електрофоретичним розділенням у 1,5 % агарозному гелі в трис-ацетатному буфері (pH=8,0) (Maniatis et al., 1982) за маркером молекулярної ваги GeneRuler DNA Ladder Mix™ (Fermentas, Литва). Гель обробляли розчином етидію броміду (0,5 мкг/мл) та фотографували продукти ампліфікації в ультрафіолетових променях з використанням системи Bio-Vision (BioRad, США).

ПЛР у режимі реального часу. Дослідження проводили з тими ж праймерами та набором реагентів Maxima™ Sybr Green Real Time PCR (Fermentas, Литва) за інструкцією виробника (Fermentas, 2011a) на приладі Real-Time PCR IQ-Cycler (BioRad, США). Отримані дані аналізували за допомогою програмного забезпечення приладу. Кількісні дані ПЛР аналізували за методом відносної оцінки експресії (Pfaffl, 2001). Внутрішнім контролем була експресія гена *UBQ5*. Рівень відносної експресії виражали в умовних одиницях – у.о.

Методи статистики. Всі експерименти проводили щонайменше у трьох незалежних біологічних повторах, біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження – у трьох аналітичних. Результати опрацьовували з використанням пакетів програм Microsoft Office 2007 та 2010 (Excel). Достовірність різниці отриманих числових значень визначали за критеріями Стюдента (T-test) ($p \leq 5\%$) та Манна-Уїтні (U-test) ($p \leq 5\%$) (Baran, Warry, 2008).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна морфолого-анатомічна характеристика проростків. Дослідження проводили в двох серіях експериментів: вплив модельованої мікрогравітації (кліностатування) та іонізуючої радіації (X-опромінення). Вплив кліностатування вивчали на 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростках. Кліностатовані проростки відрізнялись від контрольних проростків, які росли за стаціонарних умов, дезорієнтацією росту, що пов'язано з постійною зміною їхнього положення відносно вектора гравітації (рис. 1). За довжиною кореня кліностатовані проростки не відрізнялися від контрольних.

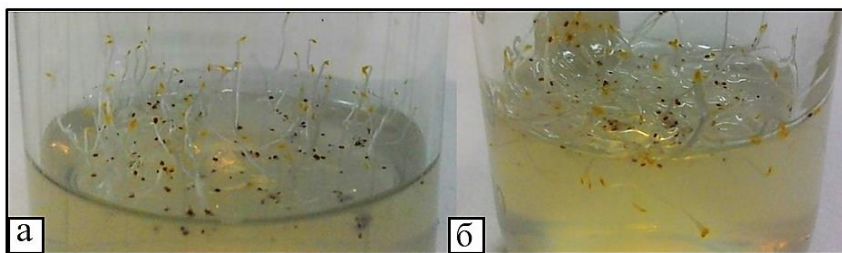


Рис. 1. 7-добові етіюльовані проростки *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліностатування (б).

В експериментах з X-опроміненням використовували проростки, які росли в умовах освітлення. 3-добові проростки опромінювали в дозах 0,5 Гр – 12 Гр та аналізували їх через 2 год і 10 діб після опромінення (3- та 13-добові проростки відповідно). Загальний стан проростків за візуальною оцінкою був подібний до контролю як через 2 год, так і через 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах (рис. 2). Довжина головного кореня статистично не відрізнялася від такої в контролі. Лише на 10-ту добу після опромінення дози від 8 Гр і вище викликали візуальні морфологічні ефекти, зокрема розетка набувала певної асиметрії.

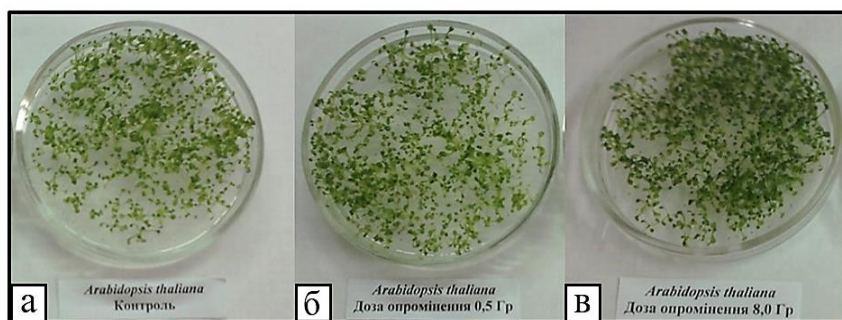


Рис. 2. 13-добові проростки *A. thaliana* в контролі (а) та через 10 діб після Х-опромінення дозами 0,5 Гр (б) і 8 Гр (в).

В апексах коренів проростків виділяли кореневий чохлак, зону меристеми, дистальну зону розтягу (ДЗР), центральну зону розтягу (ЦЗР) і зону кореневих волосків. Далі вивчали клітини кореневого чохлака, який містить гравірецепторні клітини центральної статенхіми, та клітини ДЗР, найбільш чутливі до впливу зовнішніх чинників (Ishikawa, Evans, 1993; Blancaflor, 2002; Mancuso et al., 2005) (рис. 3). За нашими даними, як кліноостатування, так і Х-опромінення проростків не

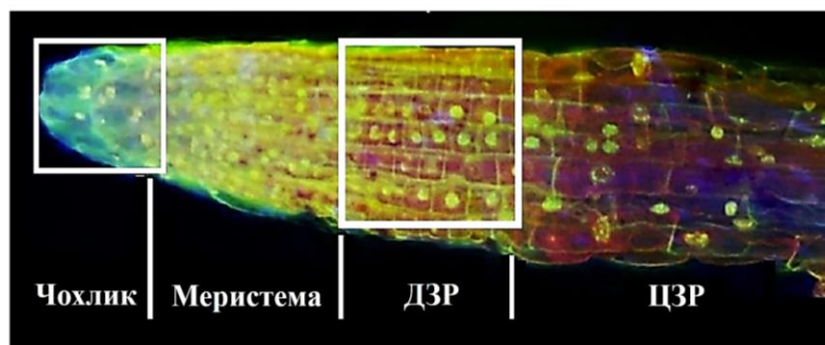


Рис. 3. Будова кореневого апекса *A. thaliana*. Квадратами виділено кореневий чохлак та дистальну зону розтягу (конфокальна мікроскопія). Масштаб – 50 мкм.

викликали суттєвих змін в розмірах клітин досліджуваних зон коренів. Лише за умов кліноостатування спостерігали незначне зменшення ширини клітин ДЗР, що узгоджується з даними літератури (Калініна, 2007а; Шевченко, Кордюм, 2012).

За нашими спостереженнями, в кореновому чохлаку ЕР-тілець були відсутні в зрілих статоцитах, проте з'являлися при переході статоцитів до секреції та мали округлу форму і вміст середньої електронної щільності. У власне секреторних клітинах кореневого чохлака кількість ЕР-тілець на зрізі значно зростала, їх форма була округлою та овальною. В ДЗР ЕР-тілець спостерігали лише в клітинах епідерми, тоді як в інших тканинах цієї ростової зони кореня вони були відсутні (рис. 4). ЕР-тілець клітин епідерми характеризувалися округлою, іноді овальною формою і вмістом середньої електронної щільності. Такі результати загалом узгоджуються з даними літератури (Булавін, 2017).

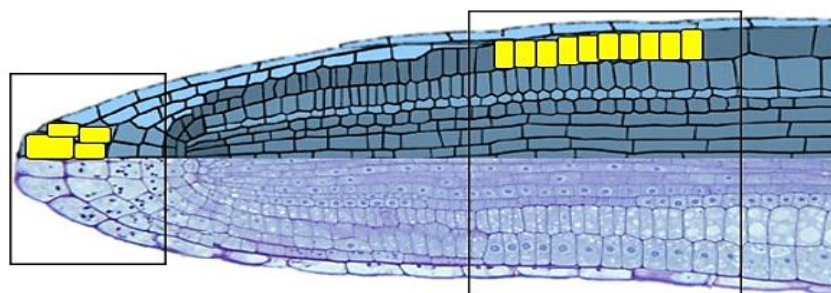


Рис. 4. Кореневий апекс *A. thaliana*. Жовтим кольором виділено клітини, в яких присутні ЕР-тілець (схематичне зображення та світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

Ультраструктура клітин кореневого чохлака та клітин дистальної зони розтягу кореня за умов кліностакування. Ультраструктура клітин кореневого чохлака кліностакованих проростків у загальних рисах була подібною до контролю, проте виявлено і певні відмінності. За всіх строків кліностакування амілопласти-статоліти в статочитах (рис. 5) не осідали в дистальній частині клітини, а

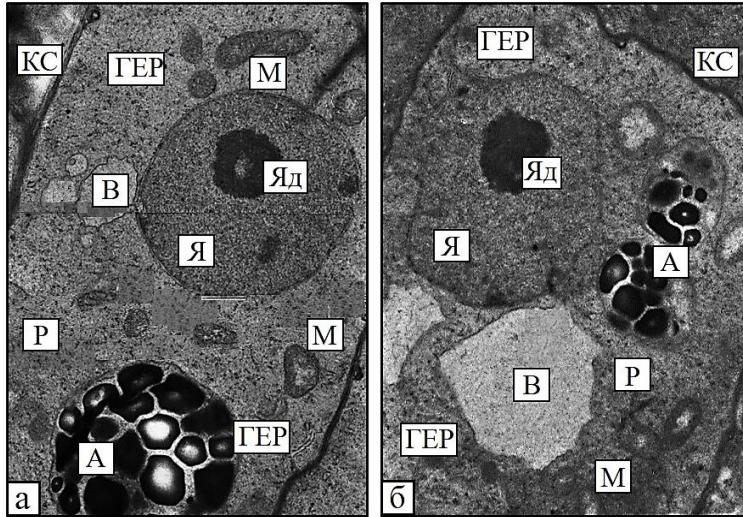


Рис. 5. Загальний вигляд статочитів корневих чохлаків етіюльованих проростків *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліностакування (б): КС – клітинна стінка, Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, А – амілопласт, М – мітохондрія, Р – рибосоми, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

розміщувалися по всьому об'єму статочита, що цілком узгоджується з даними літератури (Kordyum, 1997; Kraft et al., 2000). Крім того значно збільшувалися кількість та розміри вакуолей, з'являлися мітохондрії атипової форми. За таких умов ЕР-тілець, як і в контролі, з'являлися при переході статочитів до секреції та також мали округлу форму і вміст середньої електронної щільності. Проте середня кількість та середня площа ЕР-тілець на зріз цих клітин зростала порівняно з контролем в середньому у 1,5–2 рази за всіх строків кліностакування (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри ЕР-тілець на зріз статочита, що переходить до секреції, кореневого чохлака *A. thaliana* за умов кліностакування

Вік проростків (доба)	Контроль		Кліностакування	
	Параметри			
	Середня площа зрізу, мкм ²	Середня кількість, шт	Середня площа зрізу, мкм ²	Середня кількість, шт
3	0,015±0,002*	1,48±0,19*	0,029±0,003*	2,93±0,21*
5	0,017±0,001*	1,62±0,14*	0,035±0,005*	3,21±0,25*
7	0,019±0,003*	2,36±0,76*	0,042±0,008*	5,74±0,84*
M±m				

Примітка: * позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

У власне секреторних клітинах кореневого чохлака, як і в контролі, спостерігали велику кількість ЕР-тілець, округлих або овальних за формою (рис. 6). Відмічено, що ЕР-тілець з'являлись у зоні профілів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (ГЕР), вказуючи на те, що вони є похідними цієї структури. Це підтверджується наявністю рибосом на зовнішній поверхні мембрани ЕР-тілець.

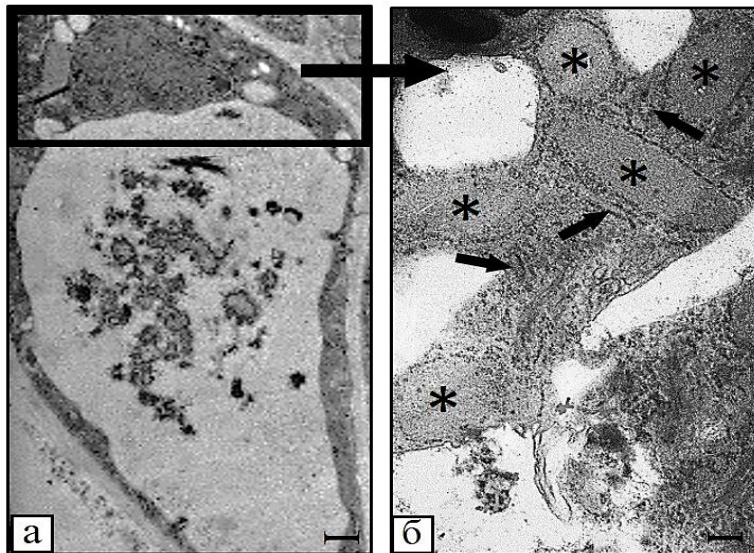


Рис. 6. Секреторна клітина кореневого чохлика етіольованого проростка *A. thaliana* (а) та її збільшена ділянка (б). Стрілками позначено ГЕР, зірочками позначено ЕР-тіляця (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб: а – 2 мкм, б – 500 нм.

За умов клінонстатування клітини епідерми ДЗР мали ультраструктуру ядра, пластид, диктіосом, мітохондрій, агранулярного ЕР (АЕР), а також клітинної стінки кореня подібну до такої в контролі (рис. 7). Проте було відмічено деяку хвилястість

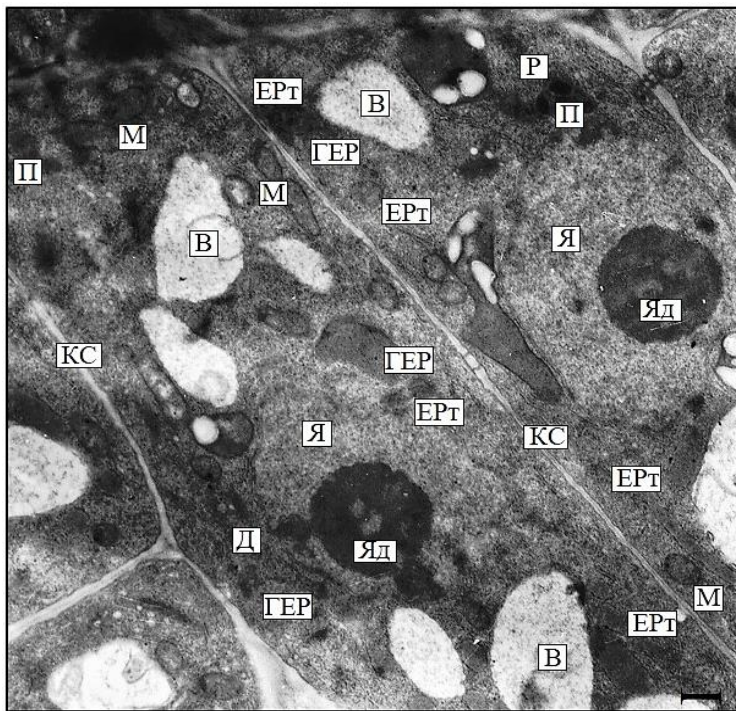


Рис. 7. Загальний вигляд клітин епідерми ДЗР кореня етіольованого проростка *A. thaliana*: КС – клітинна стінка, Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, Д – диктіосома, П – пластида, М – мітохондрія, ЕРт – ЕР-тіляце, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Р – рибосоми (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

поперечних клітинних стінок та посилення вакуолізації клітин, особливо на 7-му добу клінонстатування. Профілі ГЕР були більш розгалуженими порівняно з такими в контролі (рис. 8). У безпосередній близькості біля профілів ГЕР розміщувались ЕР-тіляця. Їх середня кількість та середня площа на зрізі клітини епідерми ДЗР на всіх строках клінонстатування зростала щодо контролю в середньому у 2 рази (табл. 2). За формою та розмірами клітинна популяція ЕР-тіляць при клінонстатуванні виявилась більш гетерогенною, зокрема їх форма була округлою, овальною та видовженою (рис. 9), що особливо було виражене в клітинах епідерми ДЗР у 7-добових клінонстатованих проростків. В окремих ЕР-тіляцях довжина перевищувала ширину більше ніж у 10 разів.

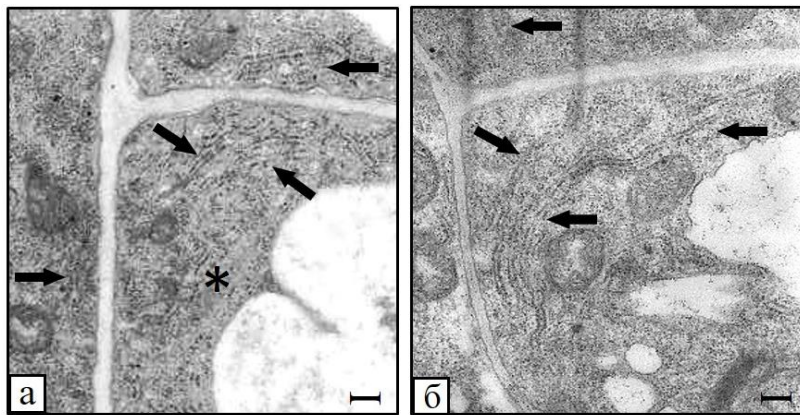


Рис. 8. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів етіолованих проростків *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліноостатування (б). Стрілками позначено GER, зірочкою позначено ER-тілець (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб – 500 нм.

Таблиця 2

**Параметри ER-тілець на зріз клітини епідерми ДЗР
кореня *A. thaliana* за умов кліноостатування**

Вік проростків (доба)	Контроль		Кліноостатування	
	Параметри			
	Середня площа зрізу, мкм ²	Середня кількість, шт	Середня площа зрізу, мкм ²	Середня кількість, шт
3	0,054±0,004*	8,05±0,37*	0,114±0,009*	16,11±1,14*
5	0,056±0,003*	9,21±0,26*	0,122±0,010*	17,09±2,41*
7	0,060±0,007*	9,19±0,29*	0,132±0,015*	19,07±2,34*
M±m				

Примітка: * позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

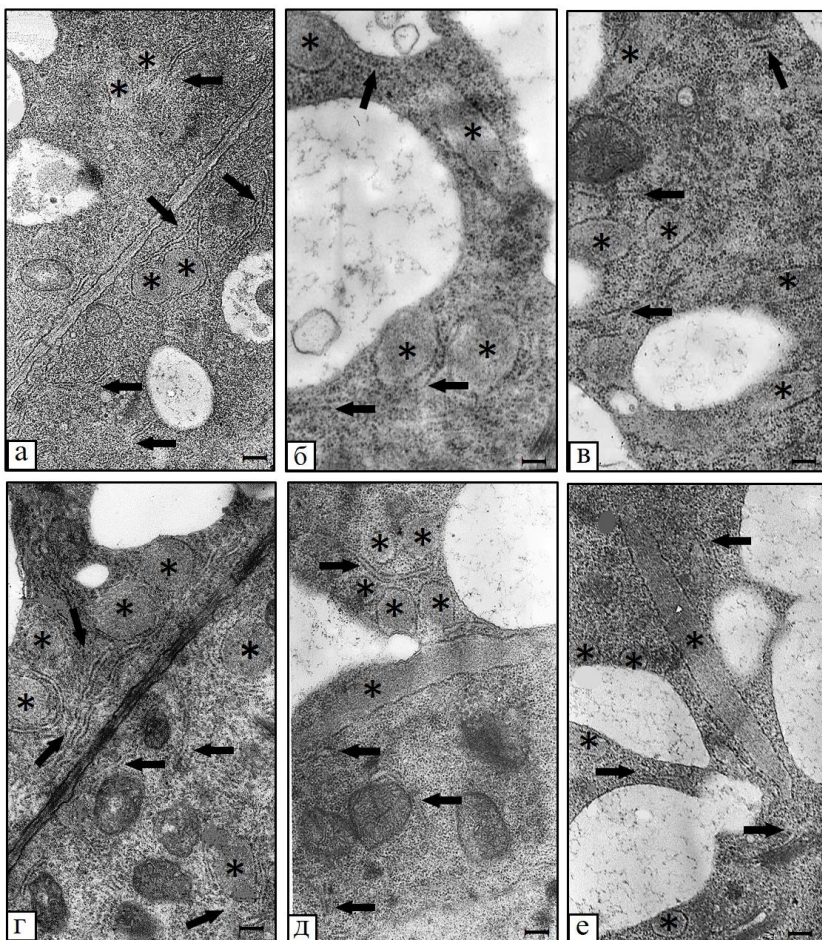


Рис. 9. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів етіолованих проростків *A. thaliana* в контролі та за умов кліноостатування: а, б, в – 3-, 5- та 7-добові проростки контролю відповідно; г, д, е – 3-, 5- та 7-добові кліноостатовані проростки відповідно. Стрілками позначено GER, зірочками позначено ER-тілець (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

Отже, збільшення майже у 2 рази середньої кількості та середньої площі ЕР-тілець на зріз клітини, а також їх варіювання за розмірами і формою при дії кліноостатування можливо розглядати як прояв адаптивної реакції клітин до впливу несприятливого чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах.

Стосовно інших органел, описана нами ультраструктура клітин кореневого чохла та клітин ДЗР власне кореня етіюльованих проростків *A. thaliana* з контролю та кліноостатованих зразків узгоджується з даними літератури (Kordyum, 1997; MacCleery, Kiss, 1999; Калініна, 2007а, б; Shevchenko et al., 2007; Булавін, 2017).

Ультраструктура клітин кореневого чохла та клітин дистальної зони розтягу кореня при Х-опроміненні. Встановлено, що після опромінення при всіх застосованих дозах полярність статоцитів кореневого чохла зберігалася, і ЕР-тіляця в них були відсутні. Як і в контролі, ЕР-тіляця починали утворюватися при переході статоцитів до секреції та мали округлу форму. Проте у відповідь на опромінення кількість та площа ЕР-тілець на зрізі таких клітин значно зростала за 2 год і залишалась на високому рівні протягом наступних 10 діб. Підвищення середньої кількості цих структур складало в середньому 1,5–2 рази, а середньої площі – 2–2,5 рази і мало залежало від дози (табл. 3).

Таблиця 3

Параметри ЕР тілець на зріз статоцита, що переходить до секреції, кореневого чохла *A. thaliana* через 2 год та 10 діб після Х-опромінення

Період після Х-опромінення	Параметри	Контроль	Х-опромінення / доза							
			0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
2 год (вік проростків – 3 доби)	Середня площа зрізу, мкм ²	0,015± 0,001*	0,044± 0,002*	0,043± 0,002*	0,041± 0,004*	0,041± 0,003*	0,040± 0,004*	0,040± 0,005*	0,039± 0,003*	0,038± 0,005*
	Середня кількість, шт	1,52± 0,29*	3,51± 0,28*	3,09± 0,34*	3,17± 0,38*	3,12± 0,36*	2,98± 0,41*	2,83± 0,27*	2,84± 0,14*	2,84± 0,19*
10 діб (вік проростків – 13 діб)	Середня площа зрізу, мкм ²	0,016± 0,002*	0,036± 0,003*	0,036± 0,005*	0,036± 0,005*	0,034± 0,003*	0,032± 0,004*	0,032± 0,003*	0,032± 0,003*	0,032± 0,002*
	Середня кількість, шт	1,61± 0,27*	2,71± 0,22*	2,78± 0,24*	2,74± 0,33*	2,75± 0,27*	2,73± 0,32*	2,63± 0,14*	2,68± 0,25*	2,72± 0,28*
M±m										

Примітка: * позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Після опромінення у всіх застосованих дозах радіації ультраструктура ядра, вакуоль, мітохондрій, пластид, диктіосом та АЕР клітин епідерми ДЗР, а також клітинної стінки коренів 3- та 13-добових проростків була подібною до контролю. Разом з цим, після опромінення профілі ГЕР ставали більш видовженими та розгалуженими (рис. 10). Під впливом Х-променів середня кількість та середня площа ЕР-тілець на зріз клітини епідерми ДЗР зростала у 2–3 рази через 2 год і залишалась вищою за контроль у 1,5 рази через 10 діб після опромінення (табл. 4).

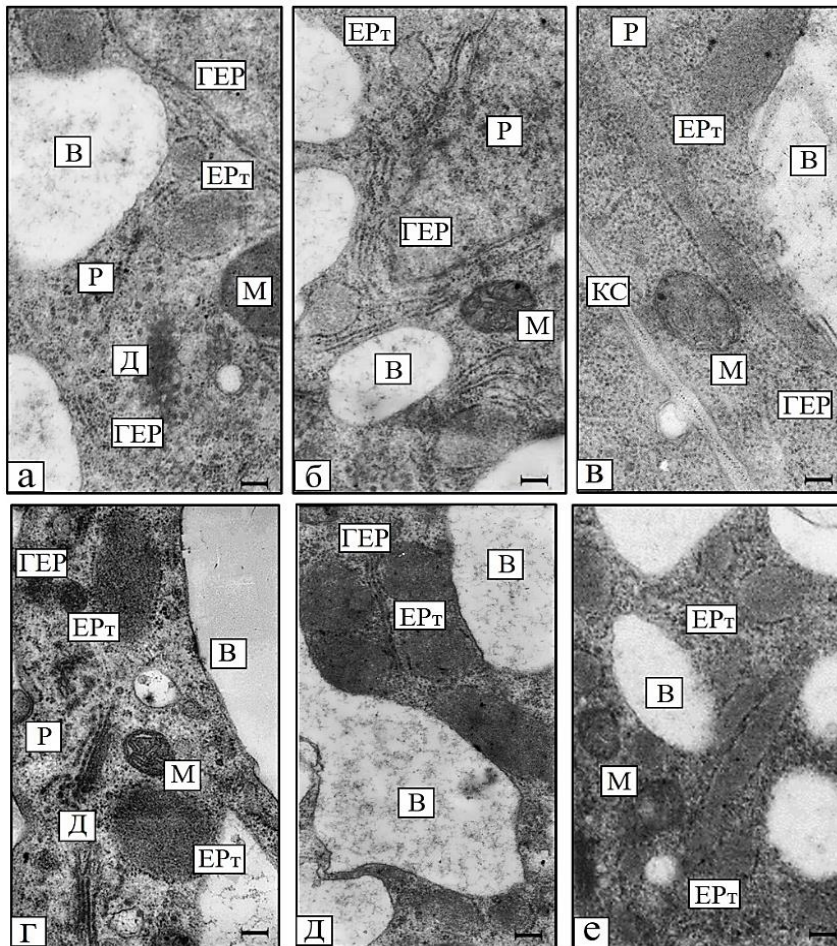


Рис. 10. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 3- (а-в) та 13-добових (г-е) проростків *A. thaliana* в контролі (а, г), через 2 год (б, в) та 10 діб (д, е) після Х-опромінення: КС – клітинна стінка, В – вакуоль, М – мітохондрія, Д – диктіосома, ЕРт – ЕР-тілець; ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Р – рибосоми, б, д – доза 0,5 Гр, в, е – доза 8 Гр (трансмійсна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

Таблиця 4

Параметри ЕР тілець на зріз клітини епідерми ДЗР кореня *A. thaliana* через 2 год та 10 діб після Х-опромінення

Період після Х-опромінення	Параметри	Контроль	Х-опромінення / доза							
			0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
2 год (вік проростків – 3 доби)	Середня площа зрізу, мкм ²	0,061± 0,002*	0,153± 0,029*	0,152± 0,028*	0,152± 0,026*	0,150± 0,031*	0,151± 0,034*	0,152± 0,036*	0,151± 0,026*	0,151± 0,037*
	Середня кількість, шт	8,09± 0,32*	24,18± 2,15*	23,49± 2,24*	23,72± 2,09*	22,15± 1,79*	20,43± 2,12*	16,22± 2,88*	17,48± 3,01*	18,19± 1,99*
10 діб (вік проростків – 13 діб)	Середня площа зрізу, мкм ²	0,098± 0,007*	0,171± 0,024*	0,168± 0,041*	0,168± 0,041*	0,168± 0,035*	0,169± 0,028*	0,171± 0,043*	0,170± 0,033*	0,169± 0,051*
	Середня кількість, шт	15,19± 3,89*	28,17± 4,12*	27,56± 4,19*	27,43± 4,13*	25,24± 2,88*	23,06± 2,98*	22,17± 2,16*	22,34± 2,06*	22,05± 1,79*
M±m										

Примітка: * позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

В клітинах епідерми ДЗР коренів опромінених проростків ЕР-тілець на зрізах значно варіювали за розмірами та формою, що особливо ставало помітним у 13-добових проростків та залежало від дози радіації (рис. 11). При дозах 0,5 Гр – 4 Гр

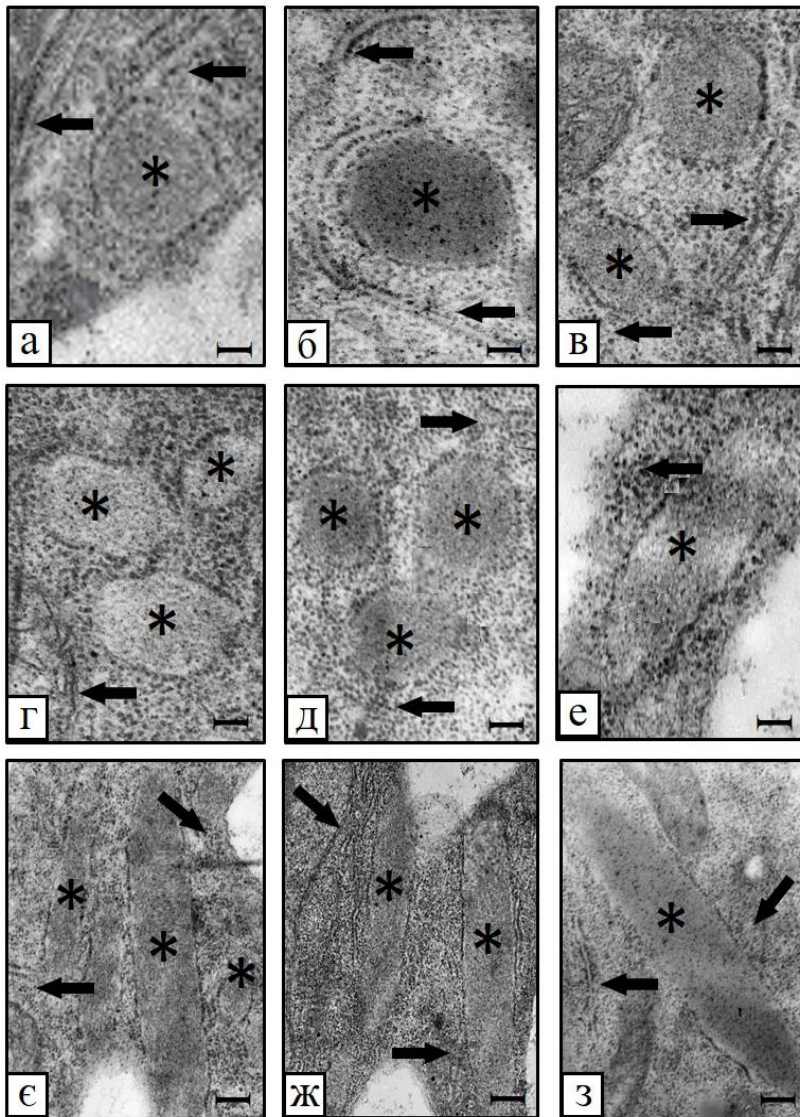


Рис. 11. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 13-добових проростків *A. thaliana* в контролі (а) та через 10 діб після Х-опромінення: б–з – дози 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр і 12 Гр відповідно. Стрілками позначено GER, зірочками позначено ER-тільца (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб: а–е – 200 нм, є–з – 500 нм.

форма ER-тілець в цій зоні кореня була переважно округлою, рідше овальною, при дозах 6 Гр – 12 Гр ставала округлою, овальною та значно видовженою: зокрема, довжина окремих ER-тілець перевищувала ширину у 6–10 разів.

Отже, встановлені зміни доводять чутливість ER-тілець до Х-опромінення. Разом з отриманими нами даними щодо впливу кліноостатування, такі результати вказують на участь ER-тілець в реакції на модельовану мікрогравітацію та іонізуючу радіацію – за рахунок більш активного утворення в клітинах, яким вони притаманні і в нормі, та збільшення гетерогенності за формою і розмірами. Як відомо з джерел літератури, ER-тільца також чутливі до механічного пошкодження епідерми листків рослини (Matsushima et al., 2002; Ogasawara, 2009), колонізації коренів ендofітними бактеріями та грибами (Nitz et al., 2001; Pozo et al., 2008), дії фітогормонів (Matsushima et al., 2004; Gotte et al., 2015, 2016). Отже, загалом такі відомості характеризують ER-тільца як систему відповіді на зовнішні чинники.

Активність β -глюкозидази за умов кліноостатування. За всіх строків кліноостатування загальна активність β -глюкозидази в проростках суттєво не відрізнялась від контролю (рис. 12). Варто зазначити, що в умовах модельованої та реальної мікрогравітації відповідь ферментів різних класів була неоднаковою.

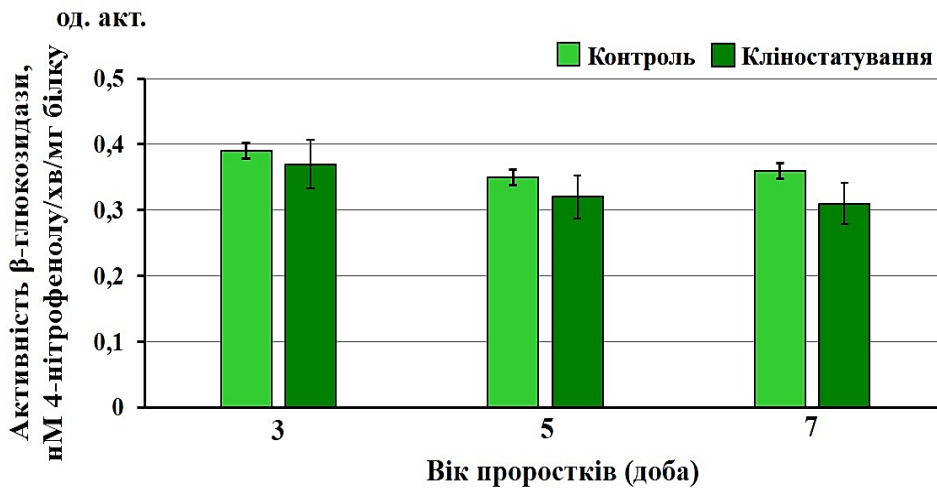


Рис. 12. Активність β-глюкозидази в етіюльованих проростках *A. thaliana* за умов кліностагування. од. акт. – одиниці активності.

Показано посилення активності алкогольдегідрогенази (Stout et al., 2001), супероксиддисмутази (Бараненко, 2003) та фосфорилази (Шнюкова, Недуха, 2004), зниження активності хлорофілази, дегідратази і δ-амінолевулінової кислоти (Фомішина та ін., 2010) та сталість активності аскорбат-пероксидази і каталази (Кияк, Хоркавців, 2016).

Активність β-глюкозидази при X-опроміненні. Опромінення в усіх застосованих дозах викликало в проростках різке майже у 2 рази посилення загальної активності β-глюкозидази через 2 год і певне його послаблення через 10 діб (рис. 13). При цьому ступінь змін залежав від дози радіації: найбільшу активність ферменту визначали після опромінення в дозах 0,5 Гр та 8 Гр.

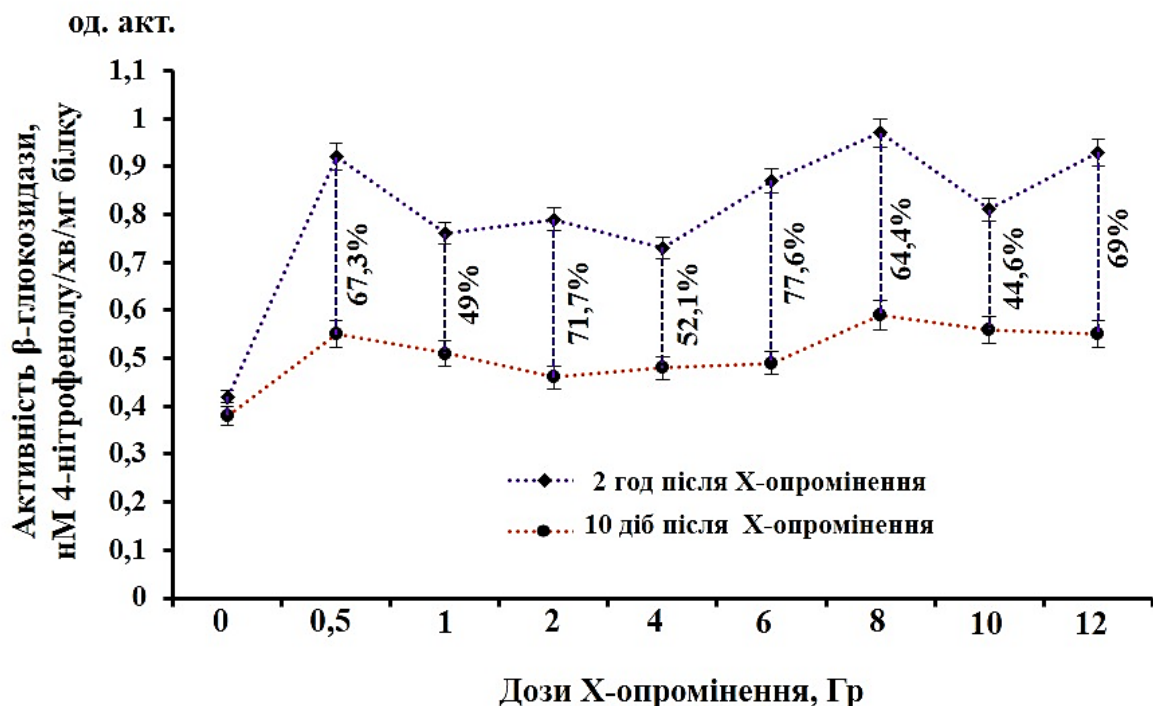


Рис. 13. Активність β-глюкозидази в проростках *A. thaliana* через 2 год та 10 діб після X-опромінення в різних дозах. од. акт. – одиниці активності. Різницю між активністю β-глюкозидази показано у відсотках.

Посилення загальної активності β -глюкозидази під впливом X-опромінення свідчить про участь цього ферменту в реакції рослинних клітин на дію іонізуючої радіації, як це раніше було визначено і за впливу інших чинників: фітогормонів, температурних змін, гіпоксії, засолення та посухи (Carrao-Panizzi, Bordingnon, 2000; Esen, Blanchard, 2000; Morant et al., 2008; Ершова, Баркалова, 2009).

Експресія гена *PYK10* за умов кліноостатування. Геном *A. thaliana* кодує 47 β -глюкозидаз (Xu et al., 2004), 4 ізоформи яких за даними літератури можуть бути присутні в складі ER-тілець (Nagano et al., 2008; Ogasawara et al., 2009). Основна β -глюкозидаза ER-тілець у *A. thaliana* кодується геном *PYK10* (Nitz et al., 2001). Оскільки він експресується як за нормальних умов, так і при дії стресових чинників, для досліджень обрали саме цей ген.

За результатами аналізу ЗТ-ПЛР у реальному часі встановлено, що реакція проростків на кліноостатування містить значне у понад 3–5 разів посилення експресії гена *PYK10* (рис. 14). Максимальне збільшення вмісту транскриптів виявляли у

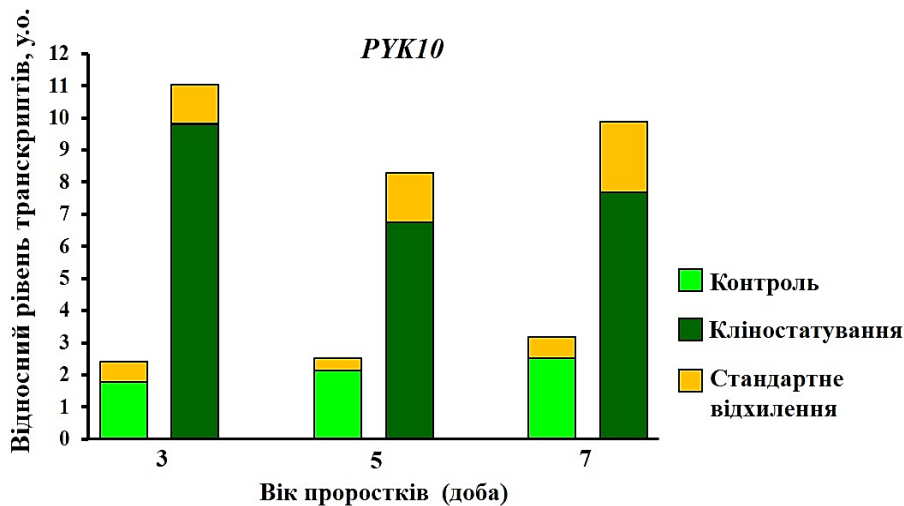


Рис. 14. Експресія гена *PYK10* в етіюльованих проростках *A. thaliana* за умов кліноостатування. у.о. – умовні одиниці.

3-добових проростків. Такі дані узгоджуються з відомостями літератури відносно синтезу мРНК β -глюкозидази в *A. thaliana* при впливі абіотичних факторів (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998; Sherameti et al., 2008).

Оскільки вважається, що ER функціонує як сенсор сигналів навколишнього середовища, а сигнал ER-стресу ініціює систему внутрішньоклітинних реакцій (Liu, Li, 2019; Zupanska et al., 2019), посилена експресія гена *PYK10* за умов кліноостатування дозволяє віднести його до групи генів, які змінюють експресію у відповідь на дію мікрогравітації, тобто є гравічутливими. Як відомо, під впливом мікрогравітації змінюється експресія численних генів, що залучені у широке коло клітинних процесів, включаючи Ca^{2+} - і ліпідний сигналінг, загальний метаболізм, у першу чергу, вуглеводний і ліпідний, синтез білків, біосинтез клітинної стінки, реакції на стрес (Bohnert et al., 2006; Paul et al., 2012; Correll et al., 2013).

Експресія гена *PYK10* при X-опроміненні. Опромінення в усіх застосованих дозах викликало стрімку (вже через 2 год) та значну (у 4,5–5,5 разів в залежності від дози) індукцію експресії гена *PYK10*, яка в подальшому мала динаміку до зниження (через 10 діб) (рис. 15). Найвищий рівень експресії визначали при дозах 0,5 Гр

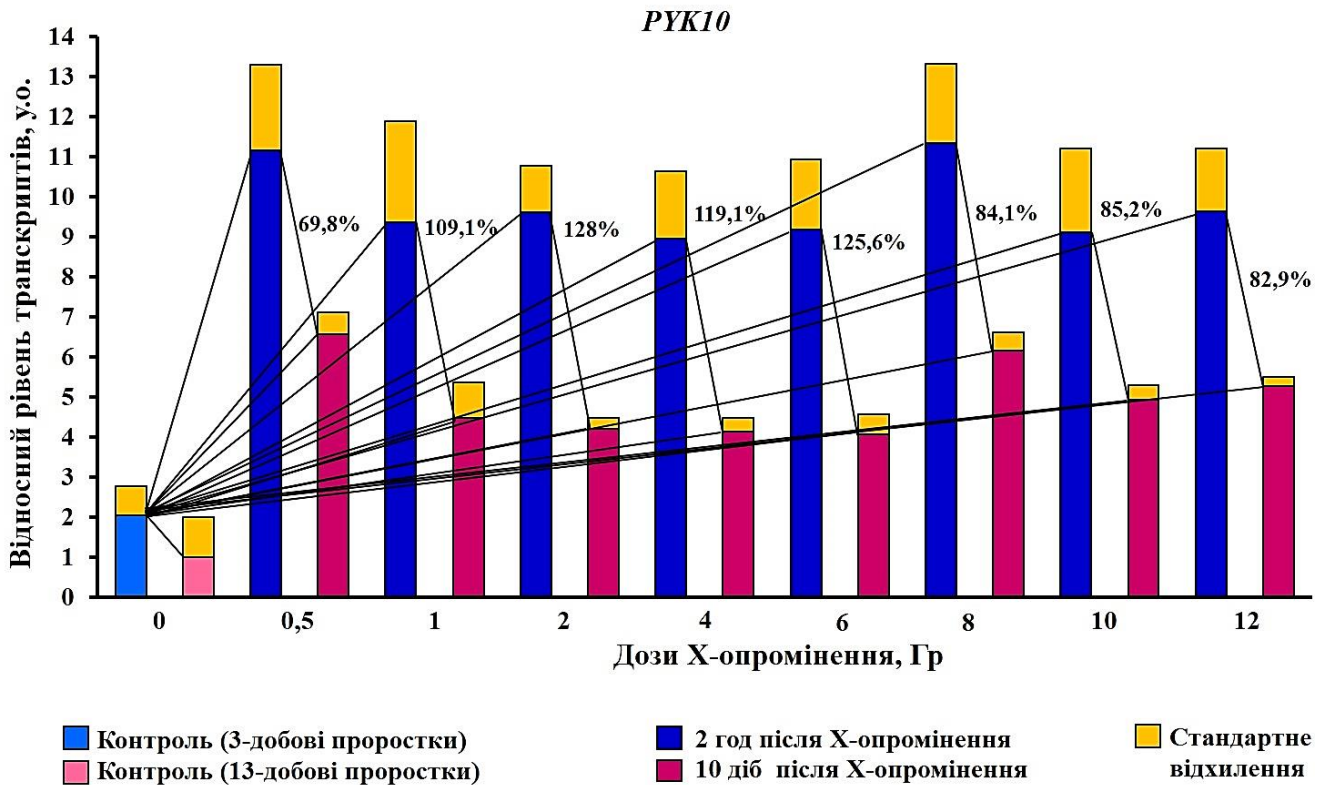


Рис. 15. Експресія гена *РУК10* в проростках *A. thaliana* через 2 год та 10 діб після X-опромінення в різних дозах. у.о. – умовні одиниці. Різницю у відносній експресії гена *РУК10* показано у відсотках.

та 8 Гр. Такі зміни цілком відповідають наведеним вище змінам активності відповідного ферменту. За даними літератури, при X-опроміненні дозою 0,5 Гр ступінь пошкодження ДНК у клітинах 3-добових проростків *A. thaliana* досягає певних порогових значень, що сприймаються клітинами як сигнал до включення адаптивних реакцій та їх реалізації (Данильченко, 2005). Отримані нами дані вказують на те, що β-глюкозидаза також бере участь у цих процесах. Проте високий ступінь активації експресії гена *РУК10* дозою 8 Гр може свідчити про існування іншого дозового порогу, який викликає порушення ростових процесів, на що, зокрема, вказує поява певної асиметрії розетки при дозах 8 Гр і вище.

Як відомо, космічна радіація впливає на експресію генів та структуру геному в цілому через пошкодження ДНК та появу мутацій (Nevzgodina, 1999), проте такі ефекти не мають суттєвої згубної дії на ріст та виживання рослин (Karoliussen, Kittang, 2013). Доказом цього є те, що в умовах космічного польоту одержано кілька поколінь рослин різних видів (Bingham et al., 2000; Sychev et al., 2007).

Отже, у всіх застосованих дозах X-опромінення викликало посилення як експресії гена *РУК10*, так і загальної активності β-глюкозидази, на відміну від кліностагування, яке на активність ферменту суттєво не впливало. Враховуючи те, що зміни щодо β-глюкозидази при опроміненні не супроводжувались помітними порушеннями росту та морфології проростків, індукція експресії гена *РУК10* і активація ферменту, на нашу думку, може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації.

Загалом проведені дослідження, результати яких узагальнено на схемі (рис. 16), дозволили з'ясувати вплив кліностакування та Х-опромінення на ЕР-тілець в клітинах кореня модельного об'єкту *A. thaliana* на структурному і молекулярному рівнях.

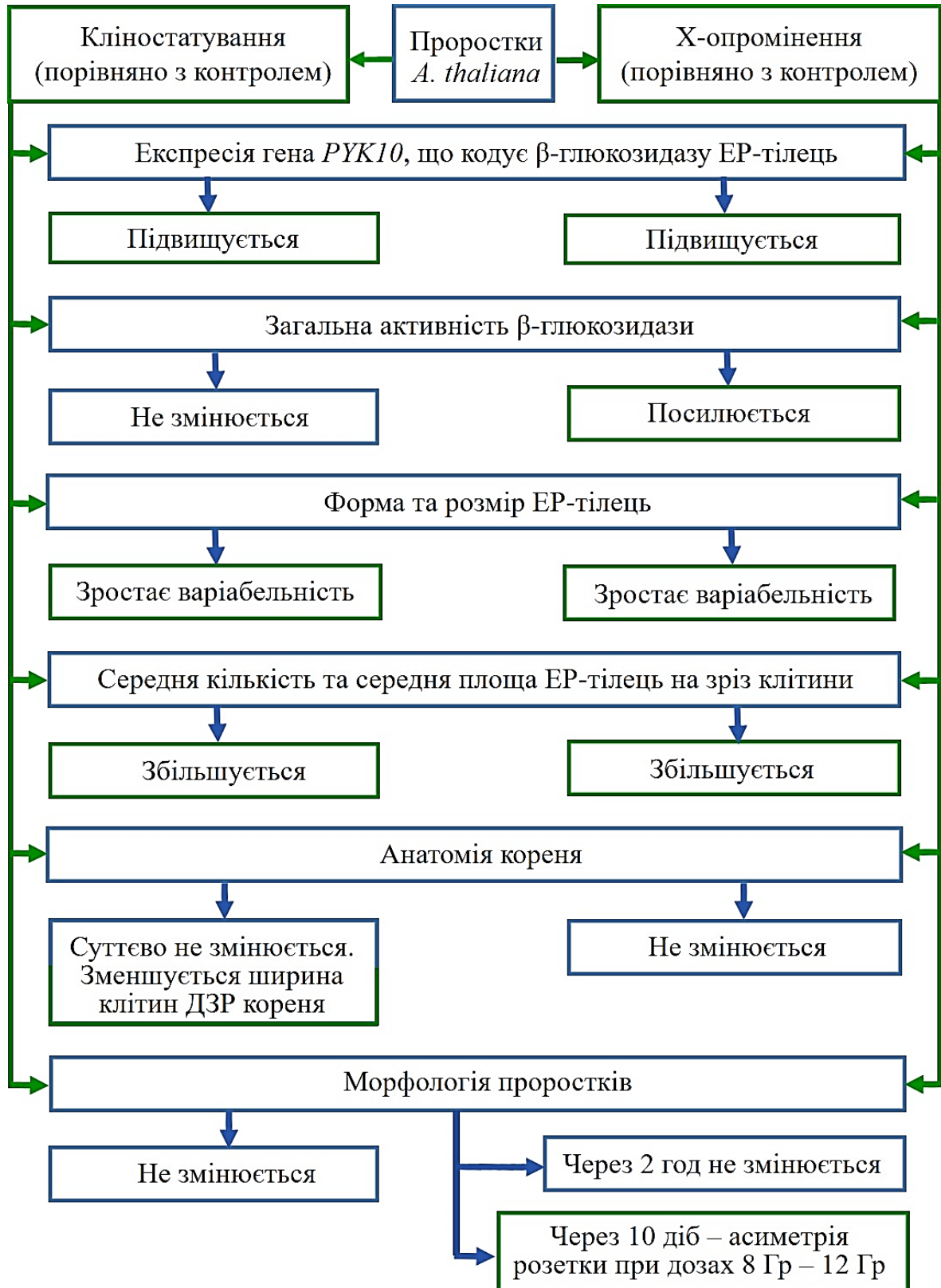


Рис. 16. Вплив кліностакування та Х-опромінення на ЕР-тілець в проростках *A. thaliana* на структурному і молекулярному рівнях.

ВИСНОВКИ

У результаті комплексного дослідження ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, специфічним компонентом яких є фермент β -глюкозидаза, в корневих апексах проростків *Arabidopsis thaliana* під впливом модельованої мікрогравітації (горизонтального кліностакування, 2 об/хв) та іонізуючої радіації (Х-опромінення в дозах 0,5 Гр – 12 Гр) отримано нові дані щодо участі цього унікального клітинного компартменту видів родини Капустяних (Brassicaceae) в реакціях рослинних клітин на дію цих чинників.

1. В корневому чохлаку ЕР-тіляця відсутні в клітинах центральної статенхіми (статоцитах), проте з'являються при їх переході до секреції. В клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня середня площа ЕР-тілець та їх кількість (8 шт – 9 шт на зріз клітини) залишаються постійними протягом перших 7-ми діб росту проростка і збільшуються удвічі на 13-ту добу. Загальна активність β -глюкозидази і експресія гена *PYK10*, який кодує фермент ЕР-тілець, протягом росту проростка за нормальних умов суттєво не змінюються.

2. Кліностакування не впливає на диференціювання клітин кореневого чохлака, проте статоцити, які є спеціалізованими до сприйняття гравітаційного вектора, залишаються функціонально ненавантаженими: амілопласти-статоліти не осідають у дистальній частині, а розташовані по всьому об'єму цитоплазми або групуються в центрі статоцита. За таких умов, як і за стаціонарних умов, ЕР-тіляця утворюються при переході статоцитів до секреції, проте удвічі більшої кількості.

3. В клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня за умов кліностакування профілі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму стають більш розгалуженими; кількість та середня площа ЕР-тілець на зріз клітини збільшуються удвічі; за формою і розмірами ЕР-тіляця стають більш гетерогенними, що посилюється з віком проростків.

4. За умов кліностакування загальна активність β -глюкозидази в проростках не змінюється, проте рівень експресії гена *PYK10*, що кодує β -глюкозидазу ЕР-тілець, підвищується у 3–5 разів.

5. Х-Опромінення, не порушуючи диференціювання клітин кореневого чохлака і виконання статоцитами гравірецепторної функції (збереження полярності статоцитів), викликає посилення формування ЕР-тілець при переході статоцитів до секреції: збільшення їх кількості у 1,5–2 рази та їх середньої площі на зрізі – у 2–2,5 рази.

6. В клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня після Х-опромінення профілі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму стають більш видовженими і розгалуженими. Посилене утворення ЕР-тілець є швидкою дозо-залежною реакцією, максимально вираженою через 2 год після опромінення: кількість ЕР-тілець збільшується у 3 рази при дозах 0,5 Гр – 2 Гр і у 2 рази при вищих дозах (4 Гр – 12 Гр), їх середня площа на зріз клітини при цьому збільшується удвічі за всіх доз; через 10 діб ці показники знижуються, проте залишаються вищими за такі в неопроміненні проростках.

7. X-Опромінення проростків викликає швидке (через 2 год) дозо-залежне посилення загальної активності β -глюкозидази (у 2 рази) та індукцію експресії гена *PYK10* (у 4,5–5,5 разів), які мають динаміку до зниження в подальшому (через 10 діб). Найбільша стимуляція обох процесів відмічена за мінімальної дози радіації 0,5 Гр та дози 8 Гр.

8. Функціонування ER-тілець пов'язано з локалізацією і функціями клітин: в клітинах центральної статенхіми кореневого чохла вони відсутні, проте утворюються при переході останніх до секреції, а також в клітинах епідерми дистальної зони розтягу власне кореня. Посилення формування ER-тілець та активація експресії гена відповідної β -глюкозидази за впливу як кліностакування, так і X-опромінення вказує на їх участь у захисній реакції клітин на зовнішні чинники різної природи.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Romanchuk S.M. Ultrastructure of the statocytes and cells of the distal elongation zone of *Arabidopsis thaliana* under the conditions of clinorotation // Cytol. Genetics. 2010. Vol. 44, № 6. P. 329–333. DOI: 10.3103/S00954527110060010. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

2. Романчук С.М. Активність β -глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh при дії іонізуючого випромінювання // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 29 (2). С. 103–108. DOI: 10.26565/2075-5457-2017-29-13. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

3. Романчук С. Ультраструктура ER-тілець у статоцитах і клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. під дією X-опромінення // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019. Вип. 1 (77). С. 61–67. DOI: 10.17721/1728_2748.2019.77.61-67. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

4. Романчук С.М. Вплив X-опромінення на експресію гена β -глюкозидази *PYK10* в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. // Доповіді НАН України. 2019. № 5. С. 91–96. DOI: 10.15407/dopovidi2019.05.091. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

5. Романчук С.М. Експресія гена β -глюкозидази *PYK10* у проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. за умов кліностакування та за X-опромінення // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019. Т. 25. С. 166–171. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1159. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

6. Romanchuk S. ER bodies in *Arabidopsis thaliana* root apices under clinorotation and after X-Ray irradiation // Cracow-Plant-Stress Conference. Series No. 9 (problem issues). The F. Gorski Institute of Plant Physiology, PAS, Cracow, Poland. 2013.

P. 185–192. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті*).

7. Romanchuk S.N., Kordyum E.L. ER bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings are sensitive to simulated microgravity and ionizing radiation // ELGRA Newsletter (Newsletter of the European Low Gravity Research Association). The Netherlands. World Cat. 2014. Vol. 9. P. 10–11. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, спільно зі співавтором написання статті*).

8. Romanchuk S.M., Kordyum E.L. The role of ER-bodies in Brassicaceae resistance under clinorotation // «Life in Space for Life on Earth», Proceedings of the conference held at Aberdeen, UK, 2013. ESA-SP 706. Id. 44. URL: <http://articles.adsabs.harvard.edu/pdf/2013ESASP.706E..44R>. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, спільно зі співавтором написання статті*).

9. Романчук С.М. Утворення ендоплазматичних тілець у *Arabidopsis thaliana* та їх захисна функція // «Актуальні проблеми ботаніки та екології» : матеріали міжнар. конф. молодих учених (м. Кременець, 11–15 серп. 2009 р.). Кременець, 2009. С. 213–214.

10. Romanchuk S., Kordyum E. Clinorotation affects the formation of ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* // «Life in Space for Life on Earth» : Abstract Book of 31st Annual ISGP Meeting, 11th ESA Life Sciences Symposium, 5th ISSBB Symposium and ELGRA Symposium (Trieste, Italy, 13–18 Jun. 2010). Trieste, 2010. P. 118.

11. Романчук С.М. Спеціалізована функція ендоплазматичного ретикулуму в клітинах рослин *Arabidopsis thaliana* // «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» : матеріали XI конф. молодих вчених (м. Київ, 22–24 черв. 2010 р.). Київ, 2010. С. 156–157.

12. Романчук С.М. Вплив кліностагування на ультраструктуру гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та ендоплазматичних тілець в *Arabidopsis thaliana* // 10-а Українська конференція з космічних досліджень : тези доп. (м. Євпаторія, Крим, 30 серп. – 3 верес. 2010 р.). Київ, 2010. С. 40.

13. Романчук С.М. Ультраструктура ендоплазматичних тілець у клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* Heunh. за умов кліностагування // «Актуальні проблеми ботаніки та екології» : матеріали міжнар. конф. молодих учених (м. Ялта, Крим, 21–25 верес. 2010 р.). Ялта, 2010. С. 403 – 404.

14. Романчук С.Н. Формирование ЭР-телец в *Arabidopsis thaliana* в стационарных условиях и при клиностатировании // «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» : материалы II (IV) Всероссийской молодежной науч.-практ. конф. (г. Новосибирск, РФ, 5–8 окт. 2010 г.). Новосибирск, 2010. С. 290–292.

15. Романчук С.М. Активність β-глюкозидази як показник захисної системи рослин *Brassicaceae* Juss. при кліностагуванні // «Актуальні проблеми ботаніки та екології» : матеріали міжнар. конф. молодих учених (м. Березне, 9–13 серп. 2011 р.). Березне, 2011. С. 195–196.

16. Романчук С.М. Активність β-глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* в умовах зміненої гравітації // 11-а Українська конференція з космічних досліджень :

тези доп. (м. Євпаторія, Крим, 29 серп. – 2 верес. 2011 р.). Київ, 2011. С. 90.

17. Romanchuk S. Beta-glucosidase activity in *Arabidopsis thaliana* seedlings under clinorotation // «Gravity: from μ to x!» : Program and Abstracts of ELGRA Biennial Symposium and General Assembly (Antwerp, Belgium, 5–9 Sept. 2011). Antwerp, 2011. Vol. 27. P. 176.

18. Romanchuk S. Beta-glucosidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings under clinorotation // «Molecular biology: advances and perspectives» : Abstract Book of The 4th International IMBG Conference for young scientists (Kyiv, 14–17 Sept. 2011). Kyiv, 2011. P. 143.

19. Романчук С.Н., Кордюм Е.Л. Роль β -глюкозидазы в адаптации растений *Arabidopsis thaliana* Нейн. к условиям клиностатирования // Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина : сборник материалов (г. Москва, РФ, 18–21 окт. 2011 г.). Москва, 2011. С. 213–214.

20. Romanchuk S.M., Ruszkowski S.R. ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* root apices after X-ray irradiation // «Plant Functioning Under Environmental Stress» : Book of Abstracts of the 9th International Conference (Cracow, Poland, 12–15 Sept. 2012). Cracow, 2012. P. 103–104.

21. Романчук С.М. Ультраструктура ЕР-тілець в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* (L.) Нейн. при дії рентгенівського випромінення // «Актуальні проблеми ботаніки та екології» : матеріали міжнар. конф. молодих учених (м. Ужгород, 19–23 верес. 2012 р.). Ужгород, 2012. С. 237–238.

22. Romanchuk S. ER-bodies formation in *Arabidopsis thaliana* root apices under clinorotation and after X-ray irradiation // 19th IAA Humans in Space : Abstracts (Cologne, Germany, 7–12 Jul. 2013). Cologne, 2013. P. 82.

23. Romanchuk S. Beta-glucosidase activity of ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings under clinorotation and after X-ray irradiation // 40th COSPAR Scientific Assembly : Abstracts (Moscow, Russia, 2–10 Aug. 2014). Id. F2.1-31-14., Moscow, 2014. URL: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2014cosp...40E2771R/abstract>.

24. Романчук С.М. Експресія гена β -глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* за умов кліностатування та після рентгенівського опромінення // 14-а Українська конференція з космічних досліджень : тези доп. (м. Ужгород, 8–12 верес. 2014 р.). Київ, 2014. С. 57.

25. Романчук С.М. Стійкість рослин *Arabidopsis thaliana* до впливу модельованої мікрогравітації та іонізуючої радіації // 15-а Українська конференція з космічних досліджень : тези доп. (м. Одеса, 24–28 серп. 2015 р.). Київ, 2015. С. 51.

26. Romanchuk S. Clinorotation and ionizing radiation influence on ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings // 36th Annual Meeting of the Society International for Gravitational Physiology : Book of Abstracts (Ljubljana, Slovenia, 7–12 Jun. 2015). Ljubljana, 2015. P. 117.

27. Romanchuk S. ER-bodies in *Arabidopsis thaliana* seedlings are sensitive to simulated microgravity and ionizing radiation // 20th IAA Humans in Space Symposium : Book of Abstracts (Prague, Czech Republic, 29 Jun. – 3 Jul. 2015). Prague, 2015. P. 188.

28. Romanchuk S. Biochemical and molecular aspects of *Arabidopsis thaliana* adaptation after X-Ray irradiation // «Plant Functioning Under Environmental Stress» : Book of Abstracts of the 10th International Conference (Cracow, Poland, 16–19 Sept. 2015).

Cracow, 2015. P. 52.

29. Романчук С.М. Захисна система клітин проростків *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. до впливу іонізуючого випромінювання // 17-а Українська конференція з космічних досліджень : тези доп. (м. Одеса, 21–25 серп. 2017 р.). Київ, 2017. С. 67.

30. Романчук С.М. Морфологія проростків *A. thaliana* Heunh. при дії рентгенівських променів в різних дозах // «Актуальні проблеми ботаніки та екології» : матеріали міжнар. конф. молодих учених (м. Луцьк, 5–10 верес. 2017 р.). Луцьк, 2017. С. 85.

31. Romanchuk S. Species of plant Brassicaceae as a component of an autotrophic element of bioregenerating life support systems of a spacecraft // «Extreme habitable worlds» : Programme & Abstract Book of 51st ESLAB Symposium, ESA, ESTEC (Noordwijk, The Netherlands, 4–8 Dec. 2017). Noordwijk, 2017. P. 72–73.

АНОТАЦІЯ

Романчук С.М. Експресія гена β -глюкозидази та ультраструктура тілець ендоплазматичного ретикулуму в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* під впливом кліноостатування та іонізуючої радіації. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженням впливу модельованої мікрогравітації (горизонтальне кліноостатування, 2 об/хв) та іонізуючої радіації (Х-опромінення в дозах 0,5 Гр – 12 Гр), яка включає діапазон доз, до певної міри еквівалентний такому в кабіні пілотованих космічних апаратів, на тільця, похідні гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (ЕР-тілця), що містять фермент β -глюкозидазу та притаманні видам родини Brassicaceae, в клітинах кореня модельного об'єкту *A. thaliana* із використанням методів світлової, конфокальної і трансмісійної електронної мікроскопії, біохімії та молекулярної біології для з'ясування їхньої участі у толерантності проростків до дії цих чинників.

Встановлено істотне збільшення середньої площі ЕР-тілець на зрізах клітин кореневого чохла і клітин дистальної зони розтягу кореня та їхньої варіабельності за формою і розмірами, що може свідчити про підвищення акумуляції в них β -глюкозидази, а також посилення розгалуженості профілів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, як під впливом кліноостатування, так і Х-опромінення. Загальна активність ферменту в проростках майже не змінювалася під впливом кліноостатування порівняно із контролем, але значно посилювалася після Х-опромінення у різних величинах залежно від дози радіації. Зафіксовано стрімку активацію експресії гена *PYK10* в проростках під впливом кліноостатування та у перші години після Х-опромінення. На 10-ту добу після опромінення рівні експресії гена *PYK10* та загальної активності β -глюкозидази знижувалися щодо таких через 2 год після дії радіації. Підвищення експресії гена *PYK10* в умовах кліноостатування дозволяє віднести його до групи генів, які реагують на мікрогравітацію, тобто є

гравічутливими. Одержані дані доводять участь ЕР-тілець у відповідях на дію кліноостатування та Х-опромінення й толерантності проростків *A. thaliana*, про що свідчить відсутність суттєвих відхилень у морфології та рості проростків під впливом цих чинників. Встановлені закономірності відкривають нові підходи до вивчення та пізнання механізмів адаптації рослин на клітинному і молекулярному рівнях до умов космічного польоту.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, ультраструктура, ендоплазматичний ретикулум, ЕР-тілець, β -глюкозидаза, експресія гена, кліноостатування, Х-опромінення.

АННОТАЦІЯ

Романчук С.Н. Экспрессия гена β -глюкозидазы и ультраструктура телец эндоплазматического ретикулума в клетках корня *Arabidopsis thaliana* под влиянием клиностатирования и ионизирующей радиации. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2020.

Диссертация посвящена исследованию влияния моделируемой микрогравитации (горизонтальное клиностатирование, 2 об/мин) и ионизирующей радиации (Х-облучение в дозах 0,5 Гр – 12 Гр), которая включает диапазон доз, до некоторой степени эквивалентен таковому в кабине пилотируемых космических аппаратов, на тельца, производные гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭР-тельца), содержащие фермент β -глюкозидазу и присущие видам семейства Brassicaceae, в клетках корня модельного объекта *A. thaliana* с использованием методов световой, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии, биохимии и молекулярной биологии для выяснения их роли в толерантности проростков к действию этих факторов.

Установлено существенное увеличение средней площади ЭР-тельца на срезах клеток корневого чехлика и клеток дистальной зоны растяжения корня, и их варибельности по форме и размерам, что может свидетельствовать о повышении аккумуляции в них β -глюкозидазы, а также усиление разветвленности профилей гранулярного эндоплазматического ретикулума, как под влиянием клиностатирования, так и Х-облучения. Общая активность фермента в проростках почти не менялась под влиянием клиностатирования по сравнению с контролем, но значительно усиливалась после Х-облучения в разной степени в зависимости от дозы радиации. Зафиксировано стремительную активацию экспрессии гена *PYK10* в проростках под влиянием клиностатирования и в первые часы после Х-облучения. На 10-е сутки после облучения уровни экспрессии гена *PYK10* и общей активности β -глюкозидазы снижались по сравнению с таковыми через 2 ч после действия радиации. Повышение экспрессии гена *PYK10* в условиях клиностатирования позволяет отнести его к группе генов, которые реагируют на микрогравитацию, то есть, являются гравичувствительными. Полученные данные доказывают участие ЭР-тельца в ответах на действие клиностатирования и Х-облучения и толерантности проростков

A. thaliana, о чем свидетельствует отсутствие существенных отклонений в морфологии и росте проростков под влиянием этих факторов. Установленные закономерности открывают новые подходы к изучению и познанию механизмов адаптации растений на клеточном и молекулярном уровнях к условиям космического полета.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, ультраструктура, эндоплазматический ретикулум, ЭР-тельца, β -глюкозидаза, экспрессия гена, клиноротирование, X-облучение.

SUMMARY

Romanchuk S.M. Expression of the β -glucosidase gene and ultrastructure of endoplasmic reticulum bodies in root cells of *Arabidopsis thaliana* under the influence of clinorotation and ionizing radiation. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Sciences in Biology, the speciality 03.00.11 – Cytology, Cell Biology, Histology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to investigations of the influence of simulated microgravity (horizontal clinorotation, 2 rev/min) and ionizing radiation (X-radiation at doses of 0,5 Gy – 12 Gy), which includes a dose range, is to some extent equivalent to that in the cabin of manned spacecraft, on the bodies, derivatives of the granular endoplasmic reticulum (ER-bodies), containing β -glucosidase enzyme and being inherent in Brassicaceae species, in root cells of *A. thaliana* model object, by methods of light, confocal, and transmission electron microscopy, biochemistry and molecular biology, to determine the role of ER-bodies in seedlings tolerance to the effects of these factors.

A significant increase in the average area of ER-bodies on the section of cell in the root cap and in the root distal elongation zone, and their variability in shape and size, which may indicate an increase in the accumulation of β -glucosidase in them, as well as the profiles of granular endoplasmic reticulum, both under the influence of clinorotation and X-irradiation have been established. The total enzyme activity was almost unchanged under clinorotation compared to the control, but increased significantly after X-irradiation to varying degrees depending on the radiation dose. The rapid activation of *PYK10* gene expression in seedlings under clinorotation and in the first hours after X-irradiation was recorded. On the 10th day after irradiation, *PYK10* gene expression levels and total β -glucosidase activity decreased as compared with those at 2 h after irradiation. Increasing expression of *PYK10* gene under clinorotation allows attributing it to the list of genes that respond to microgravity, that is, they are gravisensitive. The obtained data demonstrate the involvement of the granular endoplasmic reticulum and its derivatives ER-bodies in responses to the action of the clinorotation and X-irradiation and tolerance of *A. thaliana* seedlings, as evidenced by the absence of deviations in the morphology and growth of seedlings under the influence of these factors. The established patterns open up new approaches to the study and knowledge of the mechanisms of plant adaptation at the cellular and molecular levels to spaceflight conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, ultrastructure, endoplasmic reticulum, ER-bodies, β -glucosidase, gene expression, clinorotation, X-radiation.