

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису


РОМАНЧУК СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА

УДК 582.683.2:577.218:57.012.4:581.43:58.02

ДИСЕРТАЦІЯ
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)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 – С.М. Романчук

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

Київ – 2020

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. – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженням впливу модельованої мікрогравітації (горизонтального 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-тільця), що містять високоспецифічний компонент – фермент β -глюкозидазу (глюкозид-глюкогідролазу, КФ 3.2.1.21) та притаманні видам родини Капустяні (*Brassicaceae*), в клітинах кореня модельного об'єкту *Arabidopsis 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.

Вплив кліноостатування вивчали на 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростках, вплив Х-опромінення – на проростках, які росли в умовах освітлення. Для опромінення використовували проростки віком 3 доби. Дослідження проводили через 2 год (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після дії радіації.

Вивчали клітини кореневого чохла, який містить гравірецепторні клітини центральної статенхіми, та клітини дистальної зони розтягу власне кореня, найбільш чутливі до впливу зовнішніх чинників.

В стаціонарних умовах росту проростків у кореновому чохлаку ЕР-тілець були відсутні в зрілих статоцитах, проте з'являлися при переході статоцитів до секреції у кількості 1 шт – 2 шт на зріз клітини та мали округлу форму і вміст середньої електронної щільності. У власне секреторних клітинах кореневого чохла кількість ЕР-тілець на зрізі значно зростала, їх форма була округлою та овальною. В дистальній зоні розтягу ЕР-тілець спостерігали лише в клітинах епідерми, тоді як в інших тканинах цієї ростової зони кореня вони були відсутні. ЕР-тілець клітин епідерми характеризувалися округлою, іноді овальною формою і вмістом середньої електронної щільності. При цьому загальна площа ЕР-тілець та їх кількість (8 шт – 9 шт на зріз клітини) залишалися постійними протягом перших 7-ми діб росту проростків і збільшувалися удвічі на 13-ту добу. Відмічено, що ЕР-тілець з'являлись у зоні профілів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, вказуючи на те, що вони є похідними цієї структури. Це підтверджується наявністю рибосом на зовнішній поверхні мембрани ЕР-тілець.

Загальна активність β -глюкозидази і експресія гена *PYK10*, який кодує фермент ЕР-тілець, протягом росту проростків за нормальних умов суттєво не змінювалися.

В умовах кліноостатування постійна зміна положення проростків відносно вектора гравітації викликала дезорієнтацію їх росту. Проте на диференціювання клітин центральної статенхіми кореневого чохла і ріст клітин дистальної зони розтягу власне кореня не впливала. Ультраструктура клітин кореневого чохла і клітин дистальної зони розтягу кореня кліноостатованих проростків у загальних рисах була подібною до контролю, проте виявлено і певні відмінності.

За всіх строків клінонстатування амілопласти-статоліти в статоцитах кореневого чохла не осідали в дистальній частині клітини, а розміщувались по всьому об'єму цитоплазми або групувалися в її центрі. Тобто статоцити, які є спеціалізованими до сприйняття гравітаційного вектора, залишалися функціонально ненавантаженими. Встановлено, що за таких умов ЕР-тілець, як і в контролі, з'являлися при переході статоцитів 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 клінонстатування.

В клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня в умовах клінонстатування профілі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму ставали більш розгалуженими порівняно з такими в контролі. Звичайно, у безпосередній близькості біля профілів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму розміщувались ЕР-тіліця. Встановлено, що їх середня кількість та середня площа на зрізі клітини на всіх строках клінонстатування зростала щодо контролю в середньому у 2 рази. Також встановлено, що за формою та розмірами клітинна популяція ЕР-тілець при клінонстатуванні виявилась більш гетерогенною, зокрема їх форма була округлою, овальною та значно видовженою, що особливо було виражене в клітинах епідерми дистальної зони розтягу в 7-добових клінонстатованих проростків. В окремих ЕР-тілцях довжина перевищувала ширину більше ніж у 10 разів.

Вперше встановлено, що клінонстатування суттєво не впливало на зміни загальної активності β -глюкозидази в проростках. У той же час, за результатами аналізу ЗТ-ПЛР у режимі реального часу встановлено, що реакція проростків на клінонстатування містила значне у понад 3–5 разів посилення експресії гена *PYK10*, що кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець. Максимальне збільшення вмісту транскриптів виявляли у 3-добових проростків.

Як через 2 год, так і через 10 діб після Х-опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) загальний стан проростків за візуальною оцінкою був подібний до контролю. Лише на 10-ту добу після опромінення дози від 8 Гр і вище викликали візуальні морфологічні ефекти, зокрема розетка набувала певної асиметрії.

Встановлено, що після опромінення полярність статочитів кореневого чохлика зберігалася, і ЕР-тілець в них були відсутні. Як і в контролі, ЕР-тілець починали утворюватися при переході статочитів до секретії 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.

Після опромінення у всіх застосованих дозах радіації ультраструктура клітин епідерми дистальної зони розтягу коренів 3- та 13-добових проростків була подібною до контролю. Разом з цим, після опромінення профілі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму ставали більш видовженими та розгалуженими. Вперше встановлено, що під впливом Х-променів середня кількість ЕР-тілець збільшувалася 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 збільшувалася удвічі за всіх доз. Через 10 діб ці показники знижувалися, проте залишалися вищими у 1,5 рази за такі в неопроміненних проростках. Також встановлено, що ЕР-тілець на зрізах значно варіювали за розмірами і формою, що особливо ставало помітним у клітинах епідерми дистальної зони розтягу 13-добових проростків та залежало від дози радіації. При дозах 0,5 Гр – 4 Гр форма ЕР-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 ЕР-тілець перевищувала ширину у 6–10 разів.

Вперше встановлено, що при всіх застосованих дозах радіації (0,5 Гр – 12 Гр) в проростках відбувалося різке майже у 2 рази посилення загальної активності β -глюкозидази через 2 год і певне його послаблення через 10 діб. При цьому ступінь змін залежав від дози радіації. Також вперше встановлено, що 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). Найвищу стимуляцію обох процесів визначали після опромінення мінімальною дозою 0,5 Гр та дозою 8 Гр.

Отже, вперше отримані дані, викладені в дисертаційній роботі, доводять участь гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ЕР-тілець та їх високоспецифічного компонента ферменту β -глюкозидази у відповідях рослинних клітин 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.

З'ясовано, що функціонування ЕР-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.

Виявлене посилення видовження та розгалуженості профілів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня під впливом кліноостатування та Х-опромінення може вказувати на підвищення його функціональної активності. Визначене істотне збільшення кількості та середньої площі ЕР-тілець на зрізах статоцитів, що переходять до секреції, кореневого чохла та клітин епідерми дистальної зони розтягу кореня, а також їхньої варіабельності за формою і розмірами може свідчити про підвищення акумуляції в них β -глюкозидази, як під впливом кліноостатування, так і Х-опромінення.

Встановлена стрімка активація експресії гена *PYK10*, що кодує β -глюкозидазу ER-тілець, у проростках в умовах клінонстатування та у перші години після X-опромінення. Підвищення експресії гена *PYK10* під впливом клінонстатування дозволяє віднести його до групи генів, які змінюють експресію у відповідь на дію абіотичних стресів, в тому числі мікрогравітацію, тобто є гравічутливими. Індукція гена *PYK10* і активація ферменту β -глюкозидази під впливом X-опромінення, на нашу думку, може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації.

Посилення активності β -глюкозидази тільки у опромінених проростків вказує на специфічність їхньої реакції на дію X-променів, а саме підвищення метаболізму, особливо в перші години після опромінення, що має призвести до метаболічної адаптації. Високий ступінь активації експресії гена *PYK10* дозами 0,5 Гр і 8 Гр може свідчити про існування двох дозових порогів, що сприймаються клітинами як сигнал до включення адаптивних реакцій та їх реалізації. Отримані нами дані вказують на те, що β -глюкозидаза також бере участь у цих відповідях. Дози від 8 Гр і вище можуть викликати порушення ростових процесів, на що, зокрема, вказує поява певної асиметрії розетки при дозах 8 Гр – 12 Гр.

Встановлені закономірності відкривають нові підходи до вивчення та пізнання механізмів адаптації рослин на клітинному і молекулярному рівнях до факторів космічного польоту, що несуть найбільші ризики для біологічних об'єктів – мікрогравітації та іонізуючої радіації, зокрема овочевих культур родини Brassicaceae, які, в першу чергу, слід перевіряти на відповідність до вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення космонавтів у тривалих космічних місіях.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, ультраструктура, ендоплазматичний ретикулум, ER-тілець, β -глюкозидаза, експресія гена, клінонстатування, X-опромінення.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

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/S0095452710060010. (*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.) Неунh 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 ЕР-тілець у статоцитах і клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунh. під дією Х-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 Х-опромінення на експресію гена β-глюкозидази *РУК10* в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунh. // 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 *РУК10* у проростках

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. за умов клінонотатування 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).

Тези:

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 кліноостатування 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* Неупн. за умов кліноостатування // «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 клиноостатировании // «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 кліноостатуванні // «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* Нейнн. к условиям клиноротирования // 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 ER-тілець в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* (L.) Нейнн. 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.) Неунн. 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.

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. – M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 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 the highly specific component – β -glucosidase enzyme (glucoside-glucohydrolase, EC 3.2.1.21) and being inherent in Brassicaceae species, in root cells of *Arabidopsis 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.

The clinorotation effect was studied on 3-, 5-, and 7-day-old etiolated seedlings. The X-radiation effect was investigated on seedlings that grew under light conditions. 3-day-old seedlings were used for radiation. The studies were performed after 2 h (3-day-old seedlings) and 10 days (13-day-old seedlings) after the action of radiation.

The cells of root cap containing gravisensitive central statenchyma cells and the most sensitive to influence of external factors cells of the root distal elongation zone were studied.

In stationary growth conditions of seedlings, ER-bodies in the root cap were absent in mature statocytes; however, they appeared in the transition of statocytes to the secretion in the amount of 1–2 pieces per cell section and had a rounded shape and medium electron density content. In the secretory cells of the root cap, the number of ER-bodies on the section increased significantly; their shape was round and oval. In the distal elongation zone ER-bodies were observed only in the epidermal cells, whereas they were absent in other tissues of this root growth zone. ER-bodies of epidermal cells are characterized by rounded, sometimes oval form and content of average electron density. In the same time, the total area of the ER-bodies and their number (8–9 pieces per cell section) remained constant during the first 7th days of seedling growth and doubled on the 13th day. It is noted that the ER-bodies appeared in the area of the profiles of the granular endoplasmic reticulum, indicating that they are derivatives of this structure. This is confirmed by the presence of ribosomes on the outer surface of the ER-bodies membrane.

Total β -glucosidase activity and expression of the *PYK10* gene, which encodes the ER-bodies' enzyme, did not change significantly under normal conditions of seedling growth.

Constant change in the position of seedlings relative to the gravity vector under clinorotation conditions caused their growth disorientation. However, it did not affect the differentiation of root cap central statenchyma cells and cells growth in the root distal elongation zone. In general, the ultrastructure of the root cap cells and cells of the root distal elongation zone in clinorotated seedlings was similar to the control, but there were also some differences.

Under all clinorotation terms, amyloplasts-statoliths in statocytes of root cap did not settle in the distal part of the cell, but were located throughout the cytoplasm volume or grouped in its center. It means that statocytes which are specialized in the perception of the gravitational vector remained functionally unloaded. It was found that under such conditions as in control, the ER-bodies appeared during the transition of statocytes to secretion and had rounded shape

and content of average electron density. But number of ER-bodies and their average area per section of these cells increased in 1,5–2 times compared to the control under all clinorotation terms.

In the epidermal cells of the distal elongation zone under the clinorotation conditions, the profiles of the granular endoplasmic reticulum became more branched compared with those in the control. Usually, ER-bodies were located in the immediate nearness to the profiles of the granular endoplasmic reticulum. It was revealed that their average number and average area on the cell section under all clinorotation terms increased in two times compared to the control. Also it was founded that ER-bodies population was more heterogeneous in cell shape and size under clinorotation. In particular, their shape was rounded, oval and significantly elongated, which was especially pronounced in the cells of the epidermal of the distal elongation zone in 7-day-old seedlings. In some elongated ER-bodies, the length exceeded the width by more than 10 times.

For the first time, it was found that activity of β -glucosidase in seedlings was not significantly affected by clinorotation. However, real time RT-PCR detected that seedlings response on the clinorotation contained significant increase in *PYK10* gene expression encoding the β -glucosidase of ER-bodies of more than 3–5 times. Maximum increase in transcripts content was detected in 3-day-old seedlings.

At 2 h as well as at 10 days after X-irradiation at all doses (0,5 Gy – 12 Gy) the general state of the seedlings by visual evaluation was similar to the control. It was determined that after X-irradiation polarity of the root cap statocytes was maintained and ER-bodies were absent in them. As in the control, ER-bodies began to forming during the transition of statocytes to secretion and had a rounded shape. However, in response to the irradiation, the number and area of the ER-bodies per section of such cells increased significantly during 2 h and remained on the high level for the next 10 days. The increase in the average number of these structures and average area was in 1,5–2 times and in 2–2,5 times, respectively and little dependent on the dose.

After irradiation at all applied doses of radiation the cell ultrastructure of root distal elongation zone in 3- and 13-day-old seedlings was similar to that in control. At the same time, after irradiation, the profiles of the granular endoplasmic reticulum became more elongated and branched. It was found that under the influence of X-rays, the average number of ER-bodies increased 3 times at doses of 0,5 Gy – 2 Gy and in 2 times at higher doses (4 Gy – 12 Gy). Their average area per cell section increased twice at all irradiation doses. After 10 days, these parameters declined, but remained 1,5 times higher than in non-irradiated seedlings. It was also revealed that ER-bodies varied significantly in size and shape, which was especially noticeable in the epidermal cells of the distal elongation zone of 13-day-old seedlings and was dependent on the radiation dose. A shape of ER-bodies was mostly rounded, rarely oval after X-irradiation in doses of 0,5 Gy – 4 Gy. After irradiation in doses of 6 Gy – 12 Gy, their shape became rounded, oval and more elongated; in particular, the length of individual ER-bodies exceeded their width by 6–10 times.

For the first time, it was found sharp increase (almost in 2 times) in total β -glucosidase activity in seedlings after 2 h and its some weakening after 10 days at all applied radiation doses (0,5 Gy – 12 Gy). The degree of change depended on the radiation dose. Also it was studied that irradiation at all applied doses caused rapid (after 2 h) and significant (in 4,5–5,5 times depending on the dose) induction of *PYK10* gene expression, which subsequently had a decrease dynamics (after 10 days). The highest stimulation of the both processes was observed with a minimum radiation dose of 0,5 Gy and a dose of 8 Gy.

Thus, the first obtained data outlined in the dissertation, prove the involvement of the granular endoplasmic reticulum, ER-bodies and their highly specific component β -glucosidase enzyme in the plant cell responses to the action of clinorotation and X-irradiation, as well as tolerance of *A. thaliana* seedlings. The absence of deviations in seedlings morphology and growth under action of these factors is evidence of this assumption.

It is found that the functioning of the ER-bodies is related to the

localization and function of the cells. They are absent in the cells of the root cap central statenchyma, but they are formed during the statenchyma cells transition to secretion, as well as in the epidermal cells of the distal elongation zone.

The revealed increasing in the elongation and branching of the granular endoplasmic reticulum profiles in epidermal cells of the distal elongation zone under the clinorotation and X-irradiation influence may indicate an increase of its functional activity. Detected significant increase in the number and mean area of ER-bodies at the sections of cells of the root distal elongation zone, as well as their variability in shape and size may testify about β -glucosidase accumulation increase in them, both under the influence of clinorotation and X-irradiation.

A rapid activation of *PYK10* gene expression, encoding β -glucosidase of ER-bodies, in seedlings under the influence of the clinorotation and in the first hours after X-irradiation was established. Increased expression of *PYK10* gene under clinorotation allows attributing it to the list of genes which change the expression to respond on action of abiotic stresses, including microgravity, that is, they are gravisensitive. Induction of the *PYK10* gene and activation of the β -glucosidase enzyme under X-irradiation influence, in our opinion, can be used as a molecular marker of the effect of ionizing radiation. Increasing of β -glucosidase activity only in irradiated seedlings indicates the specificity of their reaction to the X-rays action, namely metabolism increase, especially in the first hours after irradiation, which should lead to metabolic adaptation.

The established patterns open up new approaches to the study and understanding of the mechanisms of plant adaptation at the cellular and molecular levels to the space flight factors – microgravity and ionizing radiation, in particular, the vegetable crops of the Brassicaceae family, which, first of all, should be tested for suitability for the cultivation in astronauts' bio-regenerative life support systems in long-term space missions.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП.....	22
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
РОЗДІЛ 1. РІСТ ТА РОЗВИТОК РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ РЕАЛЬНОЇ І МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ	28
1.1. Вплив реальної і модельованої мікрогравітації на процеси росту, розвитку та структурно-функціональну організацію рослин	29
1.2. Ефекти впливу іонізуючої радіації на рослини в космічному польоті та наземних експериментах	33
РОЗДІЛ 2. ЕНДОПЛАЗМАТИЧНИЙ РЕТИКУЛУМ, СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ	37
2.1. Основні функції ендоплазматичного ретикулуму в клітинах рослин	38
2.2. Клітинні структури, які походять від ендоплазматичного ретикулуму	41
2.3. β -глюкозидаза – основний компонент ER-тілець	44
2.4. Роль β -глюкозидази рослин	46
2.5. Експресія гена β -глюкозидази	47
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
3.1. Рослинний матеріал та умови проведення експериментів	50
3.2. Методи дослідження	53
РОЗДІЛ 4. ЗАГАЛЬНА МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОРОСТКІВ	60
4.1. Загальна характеристика проростків за умов кліноостатування	60
4.2. Загальна характеристика проростків при дії X-опромінення	62
4.3. Анатомія кореня за умов кліноостатування	64
4.4. Анатомія кореня при дії X-опромінення	69
РОЗДІЛ 5. УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛІТИН КОРЕНЯ.....	75
5.1. Ультроструктура клітин кореневого чохла та клітин дистальної	

	20
зони розтягу власне кореня за умов кліноостатування	75
5.2. Ультраструктура клітин кореневого чохла та клітин дистальної зони розтягу власне кореня при дії X-опромінення	88
РОЗДІЛ 6. АКТИВНІСТЬ β -ГЛЮКОЗИДАЗИ	102
6.1. Активність β -глюкозидази за умов кліноостатування	102
6.2. Активність β -глюкозидази при дії X-опромінення	104
РОЗДІЛ 7. ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА β -ГЛЮКОЗИДАЗИ (<i>PYK10</i>)	110
7.1. Експресія гена <i>PYK10</i> за умов кліноостатування	110
7.2. Експресія гена <i>PYK10</i> при дії X-опромінення	115
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	124
ВИСНОВКИ	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138
ДОДАТОК А	170
ДОДАТОК Б	175

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – апарат Гольджі

АЕР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум

ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум

год – година

ДЗР – дистальна зона розтягу

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

ЕР-тільца – тільца ендоплазматичного ретикулуму

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція зворотних транскриптів

кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

об/хв – оберти за хвилину

од. акт. – одиниця активності

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

РНКаза – рибонуклеаза

Трис – гідроксиметиламінометан

у.о. – умовна одиниця

хв – хвилинка

ЦЗР – центральна зона розтягу

шт – штука (одиниця рахунку)

BGLU – β -глюкозидаза

g – прискорення вільного падіння (одиниця вимірювання прискорення)

GFP – green fluorescent protein, зелений флуоресцентний білок

HSP – heat shock protein, білок теплового шоку

РΥК10 – beta-glucosidase complex, β -глюкозидазний комплекс

t – температура

ВСТУП

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 [169, 173]. 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 [83, 118, 141, 176, 178, 271]. 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 [7, 80, 178, 211]. Проте недостатньо з'ясованим залишається питання щодо впливу мікрогравітації на ендоплазматичний ретикулум [88, 297] – 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 [152, 195, 199, 272], а також на тільця ендоплазматичного ретикулуму (ЕР-тілця), високоспецифічним компонентом яких є фермент β -глюкозидаза (глюкозид-глюкогідролаза, КФ 3.2.1.21) [51].

ЕР-тілця, 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 [49, 55, 108, 109, 124, 143, 188, 280, 302]. Припускається, що саме з ЕР-тілцями 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 ЕР-тілець у клітинах дистальної зони розтягу кореневих апексів *A. thaliana* і *Brassica rapa* в умовах космічного польоту та кліноостатування [9, 17]. Тому актуальними для подальшого пізнання механізмів адаптації рослин до факторів космічного польоту є дослідження ЕР-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 кліноостатування 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 кліноостатування та

X-опромінення.

2. Охарактеризувати особливості структурних змін ЕР-тілець у клітинах кореневого чохла і клітинах дистальної зони розтягу власне кореня під впливом кліноостатування та X-опромінення.

3. Визначити зміни активності β -глюкозидази проростків у відповідь на кліноостатування та X-опромінення.

4. Дослідити експресію гена *PYK10*, який кодує β -глюкозидазу ЕР-тілець, в проростках за впливу кліноостатування та X-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 кліноостатування та X-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 чохла) і неспеціалізованих (дистальна зона розтягу) до сприйняття гравітаційного стимулу, на вплив модельованої мікрогравітації (кліноостатування) та іонізуючої радіації (X-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 кліноостатування призводить до посилення в проростках експресії гена *PYK10*, що кодує β -глюкозидазу ЕР-тілець, проте не впливає на загальну активність цього ферменту. Вперше визначено, що X-опромінення в діапазоні доз 0,5 Гр – 12 Гр викликає

швидко тимчасову дозо-залежну активацію експресії гена *PYK10* та посилення загальної активності β -глюкозидази, що може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації. Одержані дані вперше доводять участь ER-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 ER-тіляця 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*), редис (*R. sativus* var. *radicula*), дайкон (*R. sativus* subsp. *acanthiformi*), капуста (*B. oleracea*), ріпа (*B. rapa*) та хрiниця (*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.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

РІСТ ТА РОЗВИТОК РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ РЕАЛЬНОЇ І МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ

У зв'язку із далекосяжними планами людства щодо освоєння космосу (довгострокові польоти у далекий космос, експедиції на Марс, побудова баз на Місяці) постала необхідність створення біорегенеративних систем життєзабезпечення екіпажу [169, 173]. Рослини – основна складова автотрофної ланки таких систем, оскільки вони є джерелом кисню і поживних речовин [255], утилізаторами відходів та надають психологічну підтримку членам екіпажів [103, 236]. До критеріїв відбору видів рослин належать: короткий вегетаційний період [132, 209, 255, 265], харчова цінність [264], показники фотосинтезу [237], а також стійкість до впливу патогенів [287] та абіотичних чинників [298]. Особливо важливим аспектом є пошук видів із підвищеною радіорезистентністю [102, 105].

Показано, що рослини адаптуються до умов космічного польоту [118, 237], тобто здатні рости і розмножуватися у космічних оранжереях за більш-менш оптимальних умов [104, 157], включаючи такі показники, як інтенсивність та спрямованість світла [50], температура [279], аерація субстрату [79], вміст у повітрі CO₂ [237], достатня кількість води тощо [215, 277]. Повний цикл онтогенезу в космічному польоті пройшли рослини *A. thaliana* [157, 209], *B. rapa* [132, 182], *Triticum aestivum* [104] і *Pisum sativum* [265]. На орбіті були отримані два покоління пшениці сорту Апогей [104] і чотири покоління гороху карликового, які не відрізнялися від наземного контролю та давали життєздатне насіння [265]. Оскільки можливості проведення експериментів у космічному польоті значно обмежені, для створення модельованої мікрогравітації у наземних умовах

використовують різні засоби: параболічні польоти [228], водну імерсію [185], горизонтальне [177] і 3-D (тривимірне) [181] клінонстатування та діамагнітну левітацію [56]. Положення та обертання рослини на клінонстатах з різною швидкістю позбавляє її можливості до сприймання стимулу гравітації. Таким чином клінонстатування частково модулює біологічні ефекти мікрогравітації в космічному польоті, пов'язані з відсутністю гравітаційного вектора [172, 176].

1.1. Вплив реальної і модельованої мікрогравітації на процеси росту, розвитку та структурно-функціональну організацію рослин

Встановлено, що в умовах модельованої та реальної мікрогравітації відбувається збереження генетичної інформації та її реалізація під час формування генеративних і вегетативних органів рослин [20, 21, 104, 132, 157, 178, 209, 263, 265, 298]. У той же час встановлено істотні зміни структурної та функціональної організації рослин, які росли та розвивались в умовах модельованої та реальної мікрогравітації, порівняно з такою рослин у стаціонарному контролі, які стосувалися швидкості росту органів, проліферації та диференціювання клітин, їх ультраструктури.

Вважається, що зміни в темпах росту окремих органів і рослини в цілому сприяють їх адаптації до умов мікрогравітації [135, 159, 301]. Показано, що біомаса проростків *T. aestivum*, вирощених на борту космічного шатла протягом 10 діб, була на 25 % більшою порівняно з наземним контролем [137]. Встановлено значні зміни у рості, зменшенні товщини деревини і лігніфікації молодих дерев *Eucalyptus globulus*, що росли в умовах повільного клінонстатування [189]. Відмічено вкорочення довжини коренів проростків *P. sativum*, які росли за умов клінонстатування [1], та довжини коренів проростків *Lens culinaris* [232] і *Zea mays* [3], які росли за умов мікрогравітації.

Показано, що умови мікрогравітації викликають прискорення росту та диференціювання клітин меристеми та клітин, що ростуть розтягом, а також пришвидшення старіння диференційованих клітин і, таким чином, скорочення часу функціонування меристем [176, 178]. На прискорення процесу диференціації клітин кореневого апекса вказує прогресивна вакуолізація, яка часто спостерігається в цих клітинах в умовах симульованої та реальної мікрогравітації, наприклад, *B. rapa* [18] і *Glycine max* [80]. Відмічено прискорення проліферації меристематичних клітин [149], що на думку авторів пов'язано зі змінами в транспортуванні та розподілі ауксину вздовж усього кореня.

Значне зменшення вмісту основного компонента клітинних оболонок рослин целюлози на 54 % і деяке збільшення вмісту геміцелюлози описано у 24-добових рослин *P. sativum* в умовах космічного польоту [187]. Утворення клітинної стінки протопластами, ізольованими із клітин гіпокотилів *B. napus* і калусу *Daucus carota*, затримувалося в космічному польоті порівняно із наземним контролем [97, 278]. Потоншення клітинних стінок під впливом модельованої та реальної мікрогравітації описано у ряду видів, зокрема у проростків *P. sativum*, вирощених на 3-D кліностаці [135], а також *P. sylvestris*, *Vigna radiata*, *Avena sativa* [92, 136], *T. aestivum* [222] та *Oryza sativa* [134] в умовах космічного польоту, за рахунок зменшення в стінках вмісту лігніну, геміцелюлози та пектину порівняно із наземним контролем.

За допомогою методів флуоресцентної мікроскопії та хроматографії встановлено гравічутливість цитоплазматичної мембрани [14, 261] та її функціональних ліпід-білкових доменів [43].

На прикладі ряду рослин, зокрема *A. thaliana* [203] та *Nicotiana tabacum* [77], показано, що мікротрубочки за рахунок своєї переорієнтації беруть участь в адаптації клітинної оболонки до умов мікрогравітації [90].

Істотні зміни під впливом мікрогравітації структурно-функціональної організації енергетичних органел, а саме мітохондрій виявлено у листках і

коренях *Z. mays* [5], *A. sativa*, *V. radiata* [263], *B. rapa* [18, 182, 183] та *P. sativum* [7], які проявлялися у зменшенні або збільшенні поліморфності й площі мітохондрій, збільшенні площі їхніх крист та електронної щільності матриксу, появі великих органел чашоподібної та атипової форми, набряканні мітохондрій тощо. Такі зміни можуть призводити до порушення клітинного метаболізму, енергетичного обміну та інтенсифікації функціональної активності мітохондрій при дії мікрогравітації.

У різних експериментах модельована та реальна мікрогравітація неоднаково впливали на структуру фотосинтетичного апарату. Так, наприклад, показано збільшення кількості хлоропластів на 69,8 %, об'єму тилакоїдів у стромі – на 19,4 %, крохмальних зерен – на 20,6 % та пластоглобул – у 2 рази в рослин *B. rapa*, які росли на борту космічного корабля, у порівнянні з показниками наземного контролю [211]. Встановлено зменшення розмірів зерен крохмалю у пластидах клітин проростків *A. thaliana* в умовах мікрогравітації порівняно зі стаціонарним контролем [138]. За умов кліноостатування і в контролі кількість хлоропластів у *P. sativum* була майже однаковою, при цьому в кліноостатованих рослин виявлено зростання об'єму тилакоїдів гран і накопичення пластоглобул у стромі [40].

Встановлено, що розміри органів зародків *B. rapa* [132, 182], *P. sativum* [265], *A. thaliana* [157, 209] і *T. aestivum* [104], які сформувалися в умовах космічного польоту, були меншими порівняно з наземним контролем. Синтез запасних речовин (ліпідів і білків) уповільнювався в клітинах зародків *B. rapa* за умов симульованої та реальної мікрогравітації [30, 182]. На прикладі утворення міні-бульб *Solanum tuberosum* показана можливість вегетативного розмноження рослин в умовах мікрогравітації [46].

За умов мікрогравітації відомо підвищення або зниження рівня експресії значної кількості 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 [89, 268, 294]. Основними моделями у цих експериментах слугували проростки, калус і культура тканин *A. thaliana* [22]. Показана участь білків теплового шоку (heat shock protein (HSP)) в реакції рослин на мікрогравітацію: експресія генів HSP зростала у 12-добових проростків *A. thaliana* після 5-добового орбітального польоту і в клітинах культури тканин дикого типу, яка перебувала протягом 12,5 діб в умовах клінонстатування та космічного польоту [57, 266], що узгоджується з раніше отриманими даними про вплив клінонстатування на синтез HSP70 і HSP90 в проростках *P. sativum* [179]. Однак при короткочасному впливі мікрогравітації в параболічному польоті синтез HSP не індукувався [266].

Завдяки удосконаленню методів досліджень протеому і транскриптому отримано докази органо-специфічних реакцій рослин на молекулярному рівні. Так, наприклад, продемонстровані орган-специфічні зміни в транскриптомі 12–14-добових проростків *A. thaliana* трьох комбінованих ліній з репортерним геном *GFP* (green fluorescent protein) в умовах космічного польоту [227]. Експресія 480 генів підвищувалася принаймні у 1,9 рази, 58 – більш ніж у 7 разів. Підвищена експресія виявилася у генів, що відносяться до метаболізму ауксину і сигнальних шляхів сприйняття гравітації. Значні зміни в експресії окремих генів у різних органах вказує не тільки на відсутність простої реакції на умови космічного польоту, а й, швидше за все, на специфічність відповідей кожного органу в загальній стратегії, яка широко включає зміни клітинної оболонки. Автори приходять до думки, що в умовах космічного польоту зміни на клітинному рівні зачіпають весь рослинний організм, але в різних органах вони мають свою специфіку. Зроблено висновок, що подальше використання технологій досліджень протеому і транскриптому, як й інших «omics», дозволять відкрити диференціальні відповіді клітин різних типів всередині органів на умови космічного польоту [267]. У майбутньому саме

комплексні підходи поглиблюють уявлення, як про механізми специфічних відповідей клітин, так і про більш загальні процеси, що лежать в основі пристосування рослин до умов росту під час космічного польоту. На думку авторів, одними з таких загальних метаболічних адаптацій можуть бути зміни клітинної оболонки і сигналіngu ауксину [22].

Отже, накопичена кількість даних модельних (наземних) і космічних експериментів з рослинами щодо впливу мікрогравітації на ультраструктуру клітин, які є спеціалізованими і не спеціалізованими до сприйняття стимулу гравітації, в основному зосереджені на вивченні клітинної стінки та таких цитоплазматичних органел як мітохондрії, хлоропласти, вакуолі. Проте мало з'ясованим залишається питання про вплив мікрогравітації на ендоплазматичний ретикулум (ЕР). Результати багатьох дослідників в основному стосуються метаболічних змін та загального опису структури ЕР [88, 178, 297]. Існує лише декілька повідомлень про збільшення кількості похідних від ЕР структур (ЕР-тілець) в клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *A. thaliana* і *B. rapa* [9, 17] в умовах кліноостатування та космічного польоту. Тому вивчення впливу ефектів мікрогравітації на ЕР та ЕР-тілець є актуальним для глибокого розуміння механізмів клітинної відповіді на дію цього чинника та сприятиме поглибленню існуючих фундаментальних уявлень щодо адаптації рослин до умов мікрогравітації.

1.2. Ефекти впливу іонізуючої радіації на рослини в космічному польоті та наземних експериментах

Біологічні ефекти космічної радіації на ріст і розвиток рослин досліджуються як безпосередньо у космічному польоті, так і в наземних експериментах [74, 118, 301]. Властивості міжпланетного простору в значній мірі визначаються діяльністю Сонця, яке є джерелом потужних потоків корпускулярної та електромагнітної радіації. Мінімальні значення

швидкості та щільності сонячного вітру на орбіті Землі дорівнюють 250 км/с і 0,5 частинок у 1 см³. Під час масштабних та яскравих сонячних сплесків виникають потужні потоки сонячних космічних променів, які мають серйозну радіаційну небезпеку для біологічних об'єктів при польотах в міжпланетному просторі [32]. Сонячні протони високих енергій (~ 100 меВ) вільно проникають через оболонку сучасних космічних апаратів. В залежності від конструкції внутрішньої та зовнішньої обшивки космічного корабля (шатла), товщина захисного шару від променів радіації складає лише 1 см – 30 см, тоді як товщина шару екранування атмосфери Землі досягає 10 м [122, 207]. Електромагнітне випромінювання Сонця має значний діапазон: довгі, середні та короткі радіохвилі, інфрачервоне, оптичне, ультрафіолетове, X- та γ -випромінювання тощо. Випромінювання у видимому спектрі майже постійне, в той час як в ультрафіолетовому та радіаційному діапазонах воно змінюється з періодичністю 11 років, а також варіює в залежності від розвитку активних зон [32].

Вивчення впливу іонізуючої радіації в «малих» дозах на біологічні об'єкти під час коротко- та довготривалих космічних польотів має значний практичний інтерес [197]. Міжнародна космічна станція розташована на низькій навколосемній орбіті, тому випромінювання на борту станції складається із важких іонів від галактичних космічних променів (galactic cosmic rays (GCR)), подій сонячних протонів (solar particle events (SPE)), а також протонів та електронів при проходженні крізь південноатлантичну аномалію (south atlantic anomaly (SAA)) радіаційного поясу. Доза радіації на Міжнародній космічній станції може варіюватися, але, за оцінками, вона складає в середньому 15 сГр на рік для GCR, 4,6 сГр на рік для SAA і до 10 сГр протягом декількох днів під час інтенсивних SPE. За даними NASA (National Aeronautics and Space Administration (<http://www.nasa.gov>)) 2019 року біологічні об'єкти в межах кабіни космічного корабля піддаються дії іонізуючого випромінювання з ефективними дозами від 50 мЗв до 2000 мЗв, що відповідає дозам 0,05 Гр – 2 Гр.

Дані, отримані з космічних експериментів дають уявлення щодо дії іонізуючої радіації на живі організми [156, 214], у тому числі й рослини [64, 107, 168]. Основні дослідження з впливу космічної радіації на рослини проводилися на проростках, які виростили із насіння, що знаходилося на орбіті у повітряно-сухому стані протягом різних проміжків часу, в окремих експериментах – разом із додатковим і післяполітним опроміненням [66, 91, 96, 106]. В експериментах, які проводяться у наземних умовах, для одержання γ - та X-променів застосовують ядерні прискорювачі. γ - (з довжиною хвилі $<0,01$ нм) та X-випромінювання (з довжиною хвилі від 0,01 нм до 10 нм) мають однакову природу і схожі властивості при взаємодії з атомами або молекулами в клітині. При цьому утворюються вільні радикали, які можуть пошкоджувати або змінювати клітинні компоненти.

Для вивчення біологічних ефектів іонізуючої радіації у космічному польоті та наземних експериментах здебільшого використовують такі ознаки, як схожість насіння і енергія його проростання, ростова активність, чутливість фотосинтетичного апарату, наявність морфологічних аберацій, пошкодження ДНК, частота та характер мутацій, зміни експресії генів та протеому, активність ферментів. Ці дослідження проводилися на широкому колі видів рослин, зокрема *Allium fistulosum* і *Nigella damascene* [37], *P. sativum* і *T. aestivum* [12, 39], *G. max* [82], *B. pekinensis* [106], *O. sativa* [53], *B. rapa* [96] та *Phaseolus vulgaris* [59, 248]. Різна відповідь рослин на вплив іонізуючого випромінювання залежить від його природи, дози та тривалості дії, а також від виду рослини та її фізіологічного стану [105, 150]. Радіорезистентність регулюється на біохімічному та молекулярному рівнях [115]. Питання дії іонізуючої радіації в «малих» дозах та їх біологічних ефектів й досі залишається предметом дискусій і протилежних думок з приводу їх впливу на біологічні об'єкти. Вивчення генетичних процесів у організмів, які отримують «малі» дози радіації, привело до відкриття феномену радіоадаптації [23, 42]. Воно полягає в тому, що «малі» дози радіації значно посилюють стійкість організму до гострого опромінення за

рахунок індукції синтезу радіопротекторів [24, 191]. «Мала» доза тим вища, чим більшу радіорезистентність мають рослини. Високу радіорезистентність мають види родини Brassicacea, які витримують опромінення в дозах до 30 Гр і навіть більше [31, 42]. До цих рослин відноситься модельний вид *A. thaliana* [100, 150]. Показано, що при дії відносно «малих» та сублетальних доз (від 0,4 Гр до 12 Гр) гострого γ - та X-опромінення проростки та рослини *A. thaliana* ростуть і розвиваються так само як і в контролі: суттєвих змін у морфології, анатомії рослин, а також ультраструктурі клітин не спостерігається [13, 27, 184, 223, 238, 293]. «Малі» дози хронічної радіації можуть мати стимулюючу дію. Наприклад, дози γ -випромінювання від 3 сГр до 1 Гр стимулювали формування первинної розетки та ріст гіпокотіля проростків *A. thaliana*. В той же час, після формування первинної розетки, різниці у морфології між дослідними зразками та контролю не спостерігали [25, 26, 290]. Варто зазначити, що за високих доз гострого γ - та X-опромінення від 50 Гр до 150 Гр відбуваються істотні зміни в структурній та функціональній організації рослин. Значне набрякання тилакоїдів у хлоропластах, структурні зміни мітохондрій та ER, відшарування плазмалеми від клітинної стінки описано у клітинах стебел *A. thaliana* при дії γ -променів у дозі 50 Гр [293]. Показано, що дози X-опромінення 50 Гр та 150 Гр викликали зміни в організації цитоскелету, які призводили до зупинки росту листків [184].

Отже, у зв'язку з тим, що *A. thaliana* є стійким до відносно «малих» та сублетальних доз іонізуючого випромінювання, відомості щодо їх впливу на структурно-функціональний стан клітин вкрай обмежені. Крім того, у більшості робіт вивчалися ефекти γ -радіації [25, 26, 194, 238, 290, 293], тоді як реакція рослин на X-промені досліджена меншою мірою [13, 27, 184, 223]. Виходячи з цього, дослідження впливу відносно «малих» та сублетальних доз X-опромінення на *A. thaliana* має важливе значення для розуміння механізмів реакції рослинних клітин на актуальні для космічного польоту дози іонізуючої радіації.

РОЗДІЛ 2

ЕНДОПЛАЗМАТИЧНИЙ РЕТИКУЛУМ, СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) – тривимірна система з'єднаних між собою плоских та/або розширених цистерн і циліндричних канальців, форма і протяжність якої визначається типом клітини та стадією її диференціювання [270, 272, 286].

Завдяки методам електронної [75, 145] та конфокальної мікроскопії [174, 243], прижиттєвого вивчення клітин в ультрафіолетових променях, флуоресцентної мікроскопії і відеозйомки [193, 244], заморожування-сколювання [93, 120, 269], високовольтної скануючої електронної мікроскопії та електронної томографії [81, 275] були сформовані уявлення щодо просторової організації ЕР та отримано його тривимірні зображення у нативному стані (рис. 2.1).

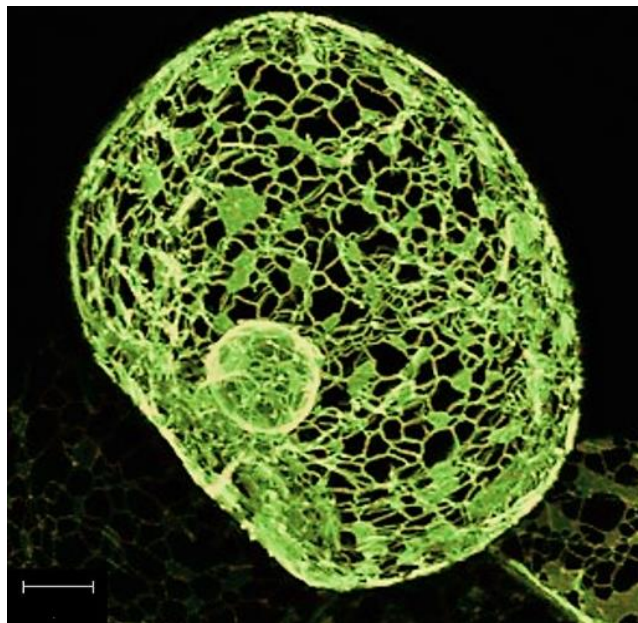


Рис. 2.1. 3-D модель ендоплазматичного ретикулуму в клітинах трансгенної рослини *Nicotiana tabacum* в культурі *in vitro* (конфокальна мікроскопія). Масштаб – 5 мкм. Взято з онлайн ресурсу The Plant Organelles Database. http://podb3.nibb.ac.jp/Organelleme/browse_movie.php?IDnum=69

Площа мембран ЕР становить більше ніж половину від загального об'єму всіх мембран клітини. Спостерігається зв'язок мембран ЕР із зовнішньою мембраною оболонки ядра, в утворенні якої ЕР бере безпосередню участь під час поділу клітини [60, 131]. Залежно від функціональної активності клітини ширина порожнин ЕР може варіювати в розмірах від 10 нм до декількох мікрометрів. Зазвичай діаметр цистерн у середньому становить від 50 нм до 100 нм, а каналців – від 10 нм до 30 нм. Товщина мембрани ЕР досягає в середньому 5 нм – 8 нм. Також сучасне прижиттєве вивчення клітин, показало, що ЕР зазнає значної реорганізації його морфології та динаміки протягом всього життєвого циклу клітини [98, 217, 272, 285].

2.1. Основні функції ендоплазматичного ретикулуму в клітинах рослин

Мембрани ЕР відмежовують його єдиний внутрішній простір від цитозолу, що обумовлює селективне розмежування речовин між цими двома компартментами. ЕР забезпечує зв'язки між ядром і цитозолем всередині клітини [131, 260] та між окремими клітинами за допомогою плазмодесм, що є унікальними для рослин каналами у клітинній стінці [190, 240]. ЕР контактує й з іншими органелами клітини – цитоплазматичною мембраною [217, 285], вакуолями [111, 144, 291], мітохондріями [123], хоропластами [54, 68], цистернами апарату Гольджі (АГ) [73, 208, 286] та амілопластами-статолітами [63, 230], що також забезпечує транспорт речовин між різними компартментами. Взаємодія ЕР з іншими органелами важлива не тільки для обміну речовинами, а й для їх просторового розподілу та функцій [111, 273]. Контакткування ЕР з іншими органелами у клітині здійснюється за участю білків міозину та актину [219, 233, 285]. Показано, що при порушенні роботи цих білків порушується розташування органел у

клітині, головним чином ЕР, АГ, пероксисом та мітохондрій [219, 233].
Схема контактів ЕР з іншими органелами клітини показана на рисунку 2.2.

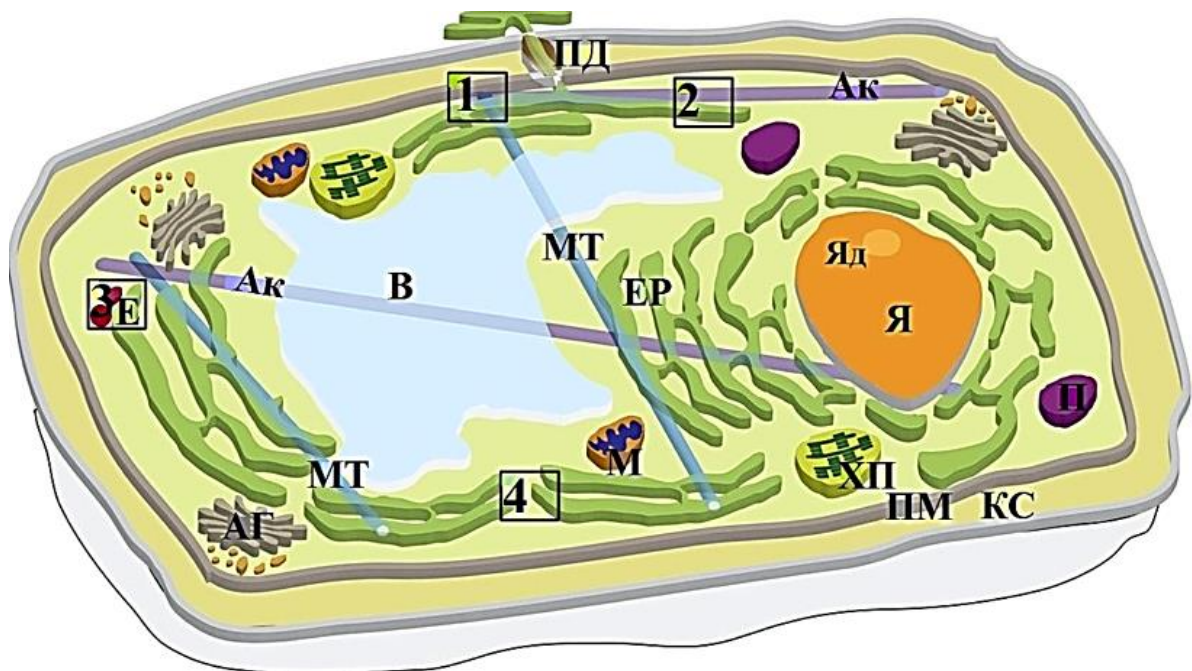


Рис. 2.2. Схема, яка показує зв'язок між ендоплазматичним ретикулом та іншими органелами в рослинній клітині: Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, ХП – хлоропласт, М – мітохондрія, ЕР – ендоплазматичний ретикулум, ПМ – плазматична мембрана, АГ – апарат Гольджі, П – пероксисома, Е – ендосома, Ак – актин, МТ – мікротрубочки, КС – клітинна стінка, ПД – плазмодесма. Пронумеровані квадратні області вказують на асоціації ЕР з іншими органелами або на його властивості: **1** – ЕР – плазматична мембрана, **2** – ЕР – актин, **3** – ЕР – ендосома, **4** – перегрупування каналців ЕР. За [272].

За структурою розрізняють два типи ЕР: агранулярний (гладенький, (АЕР)) та гранулярний (шорсткий (ГЕР)), на поверхні останнього розташовані рибосоми [93, 145, 270]. Звичайно ділянки АЕР та ГЕР чергуються в цитоплазмі. Інтенсивність розвитку ЕР може бути показником метаболічної активності клітини [270]. Основними функціями ГЕР є синтез і

подальший транспорт синтезованих білків за їх призначенням до певних компонентів клітини (цитоплазматичної мембрани, АГ, вакуоль та ін.) і позаклітинного простору [73, 208]. Під час перенесення білок ацетилюється, фосфорилується, глікозилується тощо [133, 213]. Більшість синтезованих на ЕР секреторних білків трансформуються в диктіосомах, звідки везикулами АГ транспортуються до місця їх призначення [144, 208]. Деякі синтезовані білки акумулюються безпосередньо в межах компартментів ГЕР за допомогою сигнального елемента, який знаходиться на С-кінці поліпептидного ланцюга, внаслідок чого утворюються локальні розширення цистерн цієї структури [126, 186].

АЕР є поліфункціональною органелою, в його компартментах здійснюється інтенсивний біосинтез ліпідів та їх транспорт по клітині [195]. Також в цистернах АЕР здійснюється низка реакцій, пов'язаних із метаболізмом внутрішньоклітинних полісахаридів, відбувається синтез терпенових і стероїдних сполук [93, 131, 269]. В АЕР відбувається біосинтез ненасичених жирних кислот, зокрема властивих лише рослинам – ліноленової, лінолевої та арахідонової. Гліколіпіди та фосфоліпіди, синтезовані в АЕР, є складовими компонентами мембран мітохондрій і хлоропластів, тонопласту, цитоплазматичної мембрани тощо. За рахунок розширення спеціалізованих областей АЕР утворюються вакуолі, в яких зберігаються іони та органічні солі, деякі ферменти і кислоти, пігменти та вторинні метаболіти [224, 235, 300].

ЕР також слугує місцем зберігання іонів кальцію і регулює його поглинання та вивільнення у цитоплазму [154, 163]. Кальцій як вторинний месенджер грає одну з ключових ролей у перетворенні ендо- та екзосигналів у специфічні відповіді, що проявляються у фізіологічних процесах [6, 175, 284]. Стрес-індуковане зростання кількості іонів кальцію в цитозолі є результатом надходження Ca^{2+} до цитозолу через селективні кальцієві канали у цитоплазматичній мембрані з апопласту та/або вихід із

внутрішньоклітинних депо, таких як ЕР, мітохондрії або вакуолі, який активується інозитол 1-, 4-, 5-трифосфатами [299].

ЕР відіграє одну із важливих функцій у стійкості рослинних клітин до впливу несприятливих абіотичних або біотичних чинників [199], яка проявляється в змінах синтезу білків, зокрема активації синтезу HSP, які виконують функцію молекулярних шаперонів та є компонентами системи контролю якості клітинних білків. HSP реагують на осмотичний та водний стреси, ультрафіолетове випромінювання, радіацію, мікро- та гіпергравітацію, кліностакування, нестачу поживних речовин, кисню тощо [99, 179, 180, 295].

При потраплянні патогенних мікроорганізмів до клітини спочатку в апопласті активуються мікробасоційовані молекулярні зв'язки (microbe-associated molecular patterns (MAMPs)), які сприймаються рецепторами плазматичної мембрани. Більшість білків цих рецепторів формуються в ЕР [87, 246]. Потім відбувається секреція антимікробних білків з ЕР до апопласту [297]. Синтез антимікробних білків у відповідь на дію патогенів та їхній транспорт до цитоплазматичної мембрани забезпечують швидкі та ефективні імунні реакції [161].

Дисфункції ЕР призводять до суттєвих порушень метаболізму: пригнічення синтезу білків, зниження активності ферментів, порушення обміну внутрішньоклітинних полісахаридів і ліпідів, порушення кальцієвого балансу тощо, які виникають власне у клітині, та впливають на розвиток рослини в цілому [116, 130, 158].

2.2. Клітинні структури, які походять від ендоплазматичного ретикулуму

З профілів ЕР формуються дрібні вакуолі та мікротільця [93, 120], розмірами від 0,01 мкм до 10 мкм, основними компонентами яких є білки

одного або декількох видів [48, 51, 186, 192, 283, 288, 291]. Такі структури утворюються у відповідних клітинах на певному етапі життєвого циклу рослин чи при дії стресу. У залежності від виду білка ER-похідні структури виконують різні фізіологічні функції [147, 229]. Наприклад, в ендоспермі насіння *Z. mays* та *O. sativa* утворюються білкові тіла, які забезпечують розвиток зародків [148]; у дозріваючих сім'ядолях *Cucurbita maxima* утворюються запасні білкові вакуолі [291]; при старінні у клітинах *V. mungo* та *Ricinus communis* утворюються вакуолі, які відповідають за утилізацію компонентів клітини [283, 288].

Мікротільця, що є похідними GER (ER-тілця [51]), вперше описані в клітинах кореня *R. sativus* [71] і пізніше названі «бонетками» на честь науковця, який їх відкрив. Надалі ER-тілця, які звичайно мали розміри менше 1 мкм та були оточені рибосомами, було виявлено та описано в клітинах коренів інших видів родини Brassicaceae [62, 125, 166, 167]. Їх називали «таємничими органелами» [140], тому що їхня функція залишалася невідомою. Розробка технології одержання трансгенних рослин із застосуванням GFP (зеленого флуоресцентного білка) [98, 247] забезпечила новий підхід до дослідження та одержання даних щодо вмісту та функцій ER-тілець [51, 110]. А також дозволила чітко відрізнити ER-тілця, які містять β -глюкозидазу, від інших білкових тілець у цитоплазмі (рис. 2.3) [81, 101], тому що інші похідні структури від ER також містять гідролітичні ферменти та мають розміри близькі до таких ER-тілець [48, 288]. З'ясовано, що у *A. thaliana* ER-тілця знаходяться у клітинах коренів, оскільки, на думку авторів, вони є найбільш чутливими до змін навколишнього середовища, тоді як в листках розетки ER-тілця відсутні [52, 280]. Показано, що при прорізанні листкової пластинки у 16-добових рослин *A. thaliana* ER-тілця з'являлися в клітинах епідерми протягом 44 год – 66 год саме навколо місця пошкодження. Спосіб пошкодження мав суттєве значення при утворенні ER-тілець, так як їх не спостерігали

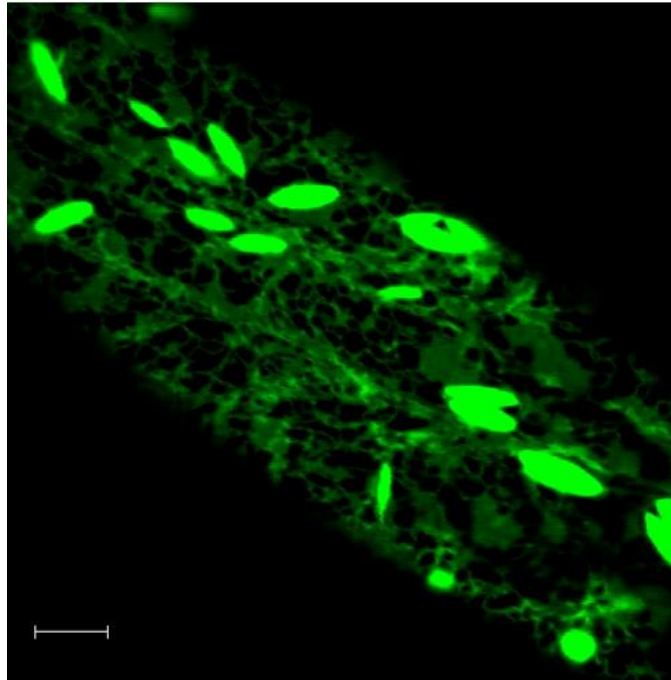


Рис. 2.3. ER-тільця в клітинах епідерми кореня трансгенної рослини *A. thaliana* з міткою GFP (конфокальна мікроскопія). Масштаб – 5 мкм. Взято з онлайн ресурсу The Plant Organelles Database.

http://podb3.nibb.ac.jp/Organelleme/browse_channel.php?IDnum=23

при натисканні металевим пінцетом на листкову пластинку [52]. Також показано, що після обробки 50 мкМ розчином метилжасмонату ER-тільця формувались в клітинах епідерми листків розетки 15-, 16- і 17-добових рослин *A. thaliana* протягом 34 год – 38 год [52, 221]. У той же час, при зануренні листків розетки у розчин метилжасмонату в герметичній камері, наповненій етиленовим газом, не відбувалося утворення ER-тілець, тобто етилен проявляв антогоністичну дію [85, 221, 250]. Тому на думку дослідників, процес утворення ER-тілець опосередковується дією фітогормонів, зокрема жасмонової кислоти та метилжасмонату, які сприяють захисту рослин від механічного пошкодження та поїдання листків і пагонів травоядними комахами [160, 282].

Отже, отримані дані із застосуванням сучасних методів досліджень [49, 51, 81, 101, 280] дозволили з'ясувати, що ER-тільця – похідні від ГЕР,

високоспецифічним компонентом яких є фермент β -глюкозидаза, притаманні виключно видам родини Капустяні (*Brassicaceae*).

2.3. β -глюкозидаза – основний компонент ER-тілець

β -глюкозидаза (глюкозид-глюкогідролаза, КФ 3.2.1.21) – фермент, що здійснює гідроліз арил- та алкіл- β -D-глюкозидів [114, 257]. β -глюкозидази, в яких розшифровано амінокислотні послідовності, належать до однієї з родин глюкозид гідролаз (glucoside hydrolases (GH)): GH1, GH3, GH5, GH9 та GH30 [146, 171]. Кожна родина GH має однакову будову каталітичної ділянки активного центру. Встановлення наявності β -глюкозидази в ER-тілцях підвищило інтерес до формування та ролі цих структур у клітині. Показано, що β -глюкозидаза ER-тілець належить до родини GH1. У *A. thaliana* всього виявлено 8 ізоформ β -глюкозидаз (BGLU), які мають сигнальний елемент утримання в компартментах ER, а саме: BGLU18, BGLU19, BGLU20, BGLU21, BGLU22, PUK10 / BGLU23 (далі – PUK10), BGLU24 та BGLU25. Варто зазначити, що аббревіатура PUK10 не має дослівного розшифрування, а пояснюється як «beta-glucosidase complex» (« β -глюкозидазний комплекс»). Синтез тієї чи іншої β -глюкозидази залежить від впливу абіотичних або біотичних чинників [86, 124]. З використанням імуноцитохімічного методу було з'ясовано, що ER-тілця клітин різних органів *A. thaliana* селективно накопичують PUK10 із сигнальним елементом утримання KDEL в компартментах ER на С-кінці амінокислотної послідовності білка та сигнальною послідовністю на N-кінці, яка відповідає за вивільнення ферменту із ER-тілець [49, 280]. Аббревіатура KDEL складена за відповідними маркувальними літерами до кожної амінокислоти, які входять у цю послідовність: K – лізин (lysine (Lys)), D – аспарагінова кислота (aspartic acid (Asp)), E – глютамінова кислота (glutamic acid (Glu)) і L – лейцин (leucine (Leu)). Саме послідовність

KDEL утримує білок у межах компартментів ЕР [95] і, таким чином, запобігає секреції білка з ЕР, а у разі випадкового вивільнення білка забезпечує його повернення до ЕР [170, 262]. Визначено, що молекулярна маса РҮК10, що є основним компонентом ЕР-тілець у клітинах *A. thaliana*, становить 65 кДа [49] (рис. 2.4).

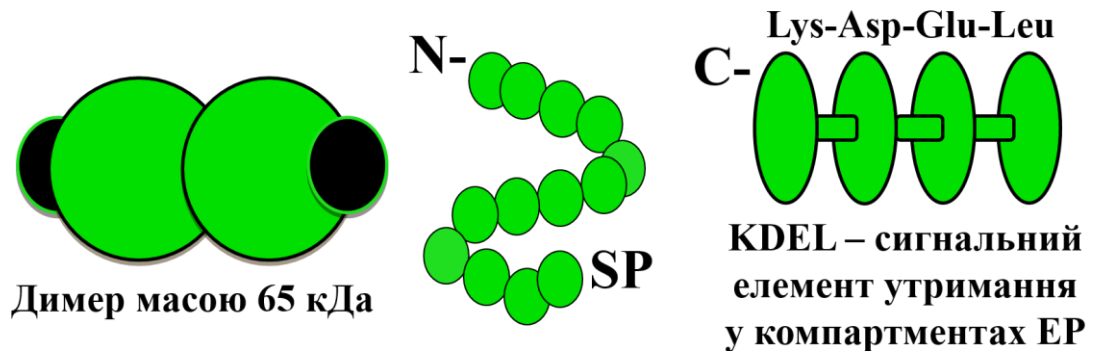


Рис. 2.4. Схематичне зображення β -глюкозидази (РҮК10), що є основним компонентом ЕР-тілець у *A. thaliana*: С- – С-кінець амінокислотної послідовності білка, N- – N-кінець амінокислотної послідовності білка, Lys-Asp-Glu-Leu – лізин-аспарагінова кислота-глутамінова кислота-лейцин, SP – сигнальна послідовність, яка відповідає за вивільнення β -глюкозидази.

Показано, що в умовах осмотичного стресу до складу ЕР-тілець *A. thaliana*, окрім РҮК10, можуть входити дві протеази RD21 (responsive to desiccation-21) та vVPE (vacuolar processing enzyme), які не мають на С-кінці послідовності KDEL [274, 296]. Припускається, що ці ферменти утримуються в ЕР-тілях за рахунок великої кількості β -глюкозидази і, таким чином, потрапляють до їх складу випадково [51]. Також визначено, що після обробки метилжасмонатом або гомогенації проростків у ЕР-тілях разом із РҮК10 накопичувалися мізерні кількості BGLU21 та BGLU22 [55, 302], а після поранення поверхневих тканин сім'ядольних листків у ЕР-тілях була присутня невелика кількість BGLU18 [86].

2.4. Роль β -глюкозидази рослин

β -глюкозидаза виконує різноманітні функції, зокрема розщеплення речовин клітинних стінок, обмін крохмалю та сахарози, біосинтез вторинних метаболітів тощо [65, 70, 113, 114, 239]. При пошкодженні рослинної клітини β -глюкозидаза зв'язується з відповідними цитоплазматичними факторами, за допомогою яких, як вважають автори, β -глюкозидаза опиняється на місці пошкодження клітини [55, 112, 200].

На сьогодні накопичено значний обсяг даних про локалізацію β -глюкозидази у окремих компартментах рослинних клітин різних видів та її здатність здійснювати гідроліз β -глюкозидних зв'язків [16, 200, 257]. β -глюкозидази, які гідролізують олігосахариди клітинної стінки, докладно вивчені в однодольних та дводольних рослин. Наприклад, субстратами β -глюкозидази у проростках *Hordeum sativum* визначено β -1,3- та β -1,4-зв'язані олігосахариди [65]. Показано, що в *A. thaliana* β -глюкозидаза ЕР-тілець гідролізує такі глюкозидази як скополін, ескулін, 4-метилумбеліферил- та 4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозиди, серед яких найвищу активність β -глюкозидаза має відносно скополіну [256]. Окрім гідролітичної функції, β -глюкозидази також каталізують реакції зворотного гідролізу та транс-глюкозилювання, які можуть бути використані для синтезу олігосахаридів та глюкозидів [94]. Вважається, що лігніфікація вторинних клітинних стінок включає активацію монолігнолів шляхом видалення залишків β -глюкозилу з монолінол-глюкозидів, наприклад, цинамілового спирту β -глюкозидів [151].

Встановлено, що крім виконання основних функцій, β -глюкозидаза бере участь: 1) у вивільненні летких речовин, які забезпечують аромати трав і квітів [127], та ефірних речовин, які відлякують травоядних комах і тварин [205]; 2) у синтезі антиоксидантів, вітамінів та інших корисних сполук, наприклад вітаміну В6 (піридоксину) [128, 165]; 3) у підтриманні

симбіотичних зв'язків між коренями рослини та ендоефітними грибами шляхом модуляції росту цих мікроорганізмів [241]. Зокрема, в ЕР-тілцях *A. thaliana* β -глюкозидаза забезпечує симбіоз з *Piriformospora indica*, шляхом запобігання заростання ним коренів та запуску відповідної реакції на захист при гіперінфекції [55, 241].

Отже, відповідно до відомостей літератури, β -глюкозидаза ЕР-тілець відноситься до важливих компонентів захисту рослин від абіотичних та біотичних стресових чинників [109, 129, 303]. Однак участь цього ферменту в реакції клітин на кліностагування та Х-опромінення залишається не вивченою.

2.5. Експресія гена β -глюкозидази

Геном *A. thaliana* кодує 47 β -глюкозидаз [124] (див. додаток А), 40 з яких мають сигнальну послідовність на N-кінці поліпептидного ланцюга і 8 – сигнальний елемент утримання в компартментах ЕР на С-кінці, про що детально описано вище (див. підрозд. 2.3). Ген, який кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець у *A. thaliana* – *PYK10*. Він розташований у верхній частині 3-ої хромосоми [49] та складається з 2963 пар нуклеотидів і має 12 екзонів та 11 інтронів [242].

За утворення ЕР-тілець у видів родини Brassicaceae відповідають транскрипційні фактори NAI1 та NAI2 («nai» – «відсутність» в перекладі з японської мови) [155, 303]. Для детального вивчення процесу утворення ЕР-тілець було створено нокаут-мутанти *A. thaliana nai1*, *nai1-1*, *nai1-2* [49, 221, 276, 302] і *nai2* [155, 303]. У рослин *nai1-1*, *nai1-2* [221] та *nai2* [155] ЕР-тілця були відсутні в клітинах усіх органів, у той час як в клітинах коренів мутантів *nai1* [49] спостерігались невеликі вузликові структури у межах компартментів ЕР. Таким чином було підтверджено, що NAI1 і NAI2 регулюють транскрипцію гена *PYK10*, а NAI1 – експресію гена *NAI2*.

З метою з'ясування впливу фітогормонів на утворення ЕР-тілець було сконструйовано нокаут-мутанти *coil* (coronatine-insensitive protein 1) з виключеним рецептором до екзогенної дії метилжасмонату [52, 58, 84] та *etr1-4* (ethylene receptor 1-4) – до дії етилену [52]. Показано, що у мутанта *leb-1* (long ER-body) та подвійного мутанта *bglu21-1+ryk10-1* з порушеною роботою гена *RYK10* в клітинах епідерми кореня утворювались ЕР-тільця атипової та більш видовженої форми порівняно з диким типом [245].

За результатами аналізу протеому і транскриптому мутантів *A. thaliana* *lec1* (leafy cotyledon 1), *leb-1*, *ryk10*, *nai1* та *nai2* ідентифіковано основну частину білків і генів, що беруть участь у формуванні та функціонуванні ЕР-тілець [49, 55, 109, 202, 220, 221, 245, 276, 302] (рис. 2.5).

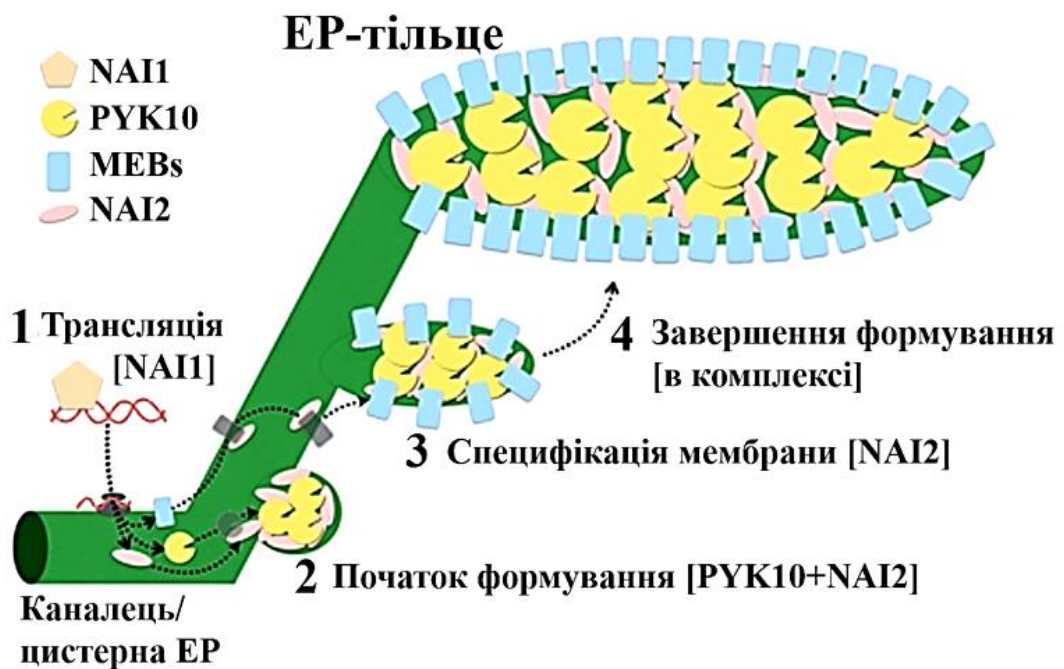


Рис. 2.5. Модель формування ЕР-тілець в проростках *A. thaliana*. **1** – NAI1 експресується у клітинах епідерми кореня для регуляції утворення ЕР-тілець. **2** – RYK10 та NAI2 можуть взаємодіяти з ендоплазматичним ретикуломом під час утворення ЕР-тілець. **3, 4** – NAI2 утворює комплекс з MEB1 і MEB2, а потім залучає їх до утворення специфічної мембрани ЕР-тілець. За [109].

Встановлено, що білок NAI2 є компонентом ER-тілець [109]. Визначено, що до складу мембрани ER-тілець входять два специфічні білки (membrane of ER body (MEB)) – MEB1 та MEB2, які на думку авторів, можуть виконувати важливу роль у функціонуванні ER-тілець [155].

Показано, що експресія гена *PYK10* підвищувалася у коренях, на яких паразитує нематода *Heterodera schachtii* [242]. Також посилення експресії гена *PYK10* встановлено в листках розетки при колонізації коренів рослини бактеріями *Pseudomonas fluorescens* [289]. А пригнічення фактора транскрипції NAI1 призводило до гіперколонізації коренів рослини грибом *P. indica* [241].

Отже, на основі аналізу описаних вище результатів досліджень [109, 242, 245] визначено, що ген *PYK10* експресується як за нормальних умов росту рослин, так і при дії на них зовнішніх чинників. Тому для наших досліджень обрали саме цей ген.

У двох розділах огляду літератури висвітлено основні уявлення щодо структурно-функціональної організації рослин під впливом основних факторів космічного польоту, що діють на живі організми – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Відмічено, що *A. thaliana* є стійким до відносно «малих» та сублетальних доз іонізуючого випромінювання, тому відомості щодо їх впливу на ультраструктуру клітин вкрай обмежені. Зазначено, що мало з'ясованим залишається питання про вплив мікрогравітації та іонізуючої радіації на ER, похідні від нього ER-тільця та їх фермент. Тому розглянуто особливості структури і функцій ER та 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 нами обґрунтовано актуальність проведення досліджень щодо особливостей реакції GER, ER-тілець та їх компоненту β -глюкозидази на вплив кліностагування та X-опромінення.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Рослинний матеріал та умови проведення експериментів

Для досліджень використовували проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0), які отримували з насіння, яке 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. За тим насіння стратифікували протягом 3-х діб за температури 4 °С та висівали на середовище Мурасіге і Скуга [218] у скляні стаканчики та чашки Петрі за стерильних умов і температури 22 °С – 24 °С.

Кліноостатування. Схема експерименту наведена на рисунку 3.1. Стерилізоване та стратифіковане насіння висівали у скляні стаканчики (висота = 9 см), від 20 до 30 насінин у кожній, які поміщали в контейнери з металу циліндричної форми. Частину контейнерів зі стаканчиками з насінням обертали на горизонтальному кліноостаті (2 об/хв). Другу частину контейнерів з матеріалом залишали у вертикальному положенні (контроль). Проростки вирощували у темряві протягом 3-х, 5-ти та 7-ми діб. Схожість насіння складала 96 % як у контролі, так і при кліноостатуванні. Аналізували проростки відразу після закінчення експериментів. Для оцінки ростової активності проростків вимірювали довжину коренів від кінчика кореневого апекса до початку гіпокотіля.

Х-Опромінення. Схема експерименту наведена на рисунку 3.2. Стерилізоване та стратифіковане насіння висівали у скляні чашки Петрі (діаметр = 12 см), від 100 до 120 насінин у кожній. Проростки вирощували із фотоперіодом 16 год світло / 8 год темрява при освітленні 93 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ протягом 3-х та 13-ти діб. Схожість насіння складала 98 %.

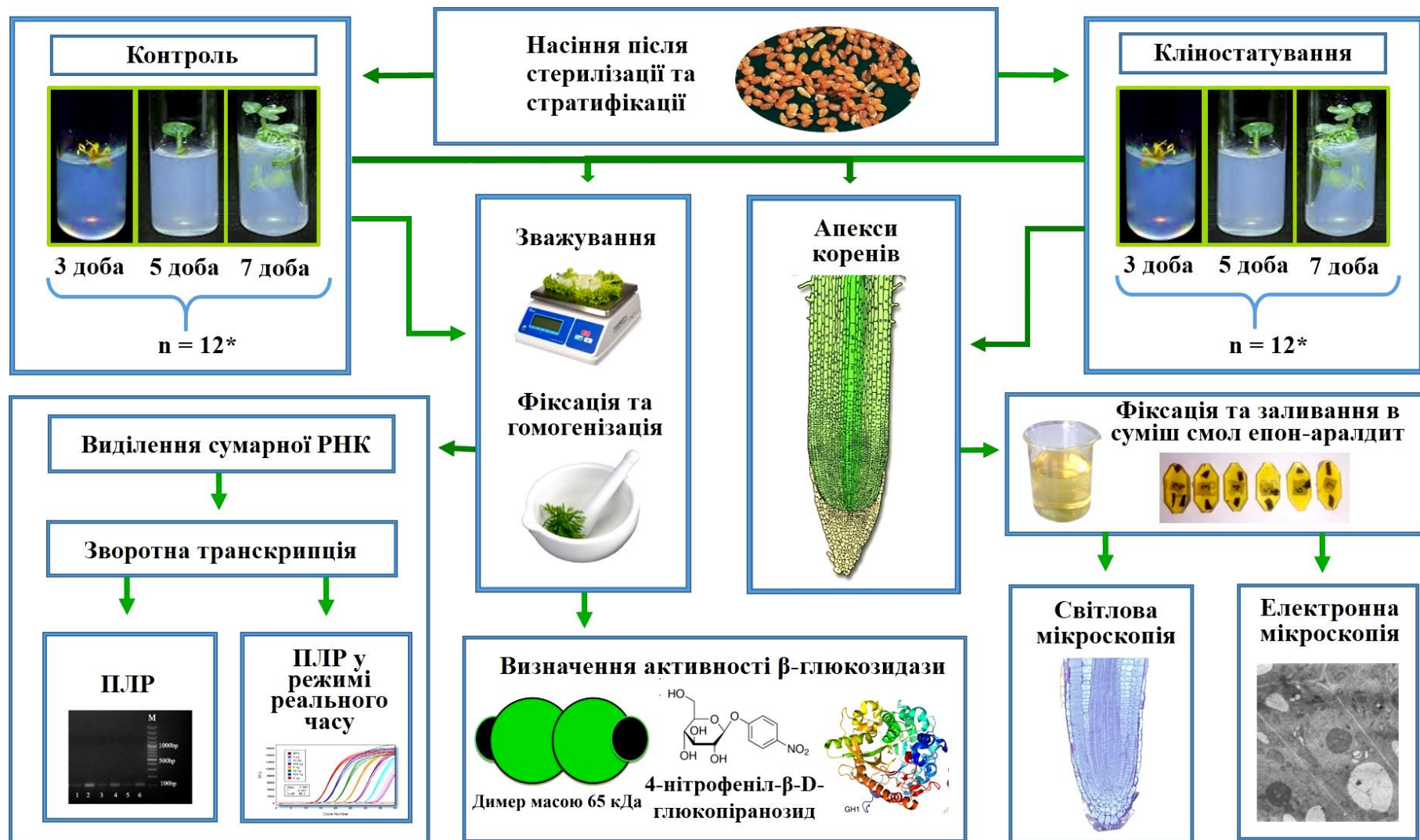


Рис. 3.1. Загальна схема проведення експериментів з кліностакуванням.

Примітка: * кількість стаканчиків для кожного дослідю.

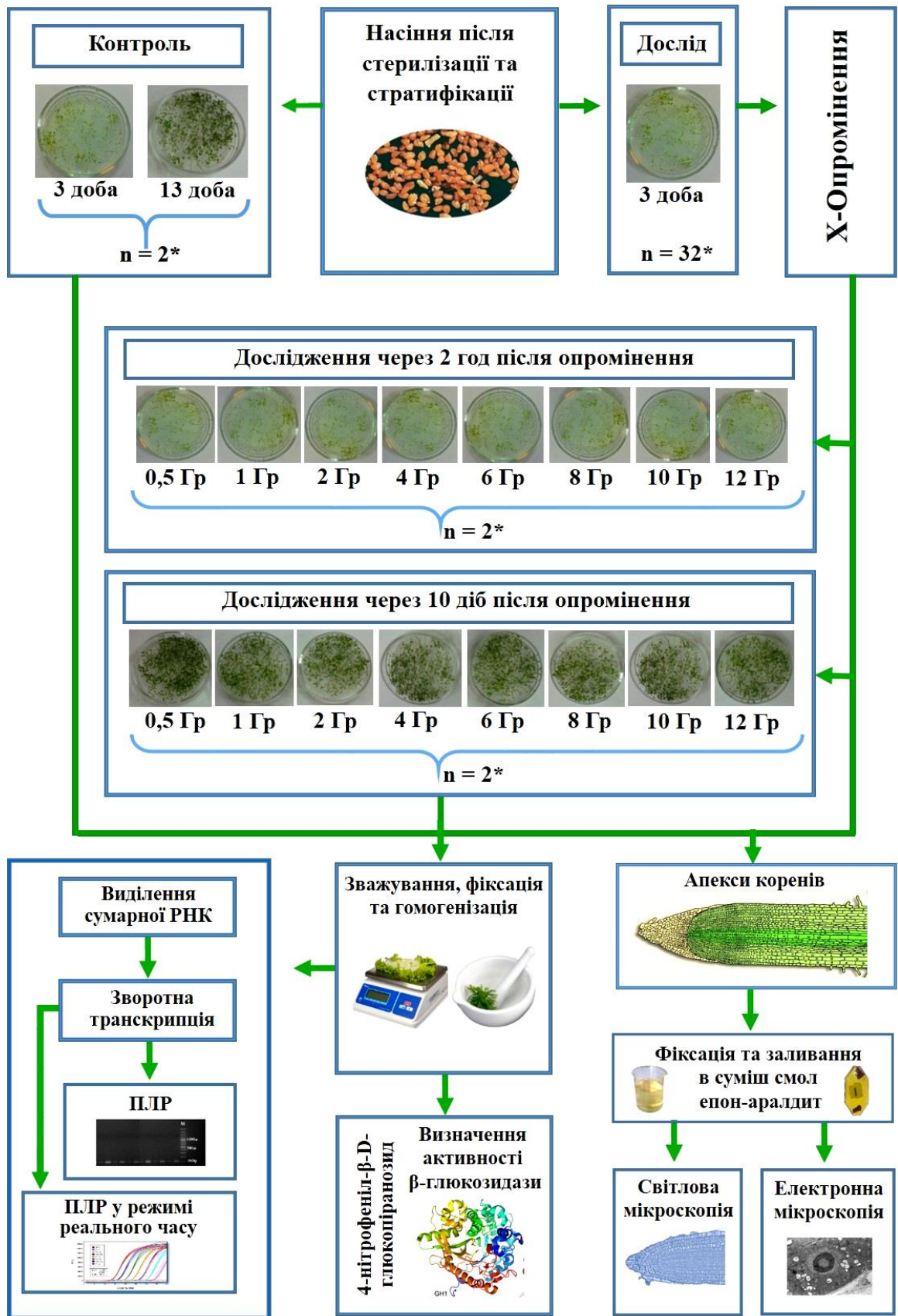


Рис. 3.2. Загальна схема проведення експериментів з Х-опроміненням.
Примітка: * кількість чашок Петрі для кожного дослідю.

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 ($< \text{LD}_{50}$) [13, 27, 31, 184]. Проростки аналізували через 2 год (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після дії X-променів. Для контролю використовували 3- та 13-добові проростки, які не опромінювали. Для оцінки ростової активності проростків вимірювали довжину коренів, як описано вище.

3.2. Методи дослідження

Світлова та трансмісійна електронна мікроскопія. Апекси коренів довжиною 0,3 см – 0,8 см фіксували в 2,5 % розчині глутарового альдегіду на какодилатному буфері (0,1 М, рН = 7,2), витримуючи 3 год за кімнатної температури, після чого двократно промивали тим самим буфером. Постфіксацію здійснювали 1 % розчином чотириокису осмію на какодилатному буфері (0,1 М, рН = 7,2), витримуючи 4 год за температури 4 °С. Після цього апекси коренів відмивали дистильованою водою. Зневоднення зразків здійснювали у серії розведень етанолу зростаючої концентрації, суміші абсолютного спирту з ацетоном і чистому ацетоні. Далі зразки просочували сумішшю ацетону та смол епон-аралдит, і заливали сумішшю смол епон-аралдит за стандартною методикою [69]. Полімеризацію епоксидної смоли зі зразками, залитими в блоки, проводили в термостаті за температури 37 °С, 40 °С та 60 °С.

Напівтонкі поздовжні зрізи апексів коренів (товщина = 0,5 мкм – 1,0 мкм) одержували з отриманих блоків зі зразками на приладі MT-XL

Microtome (RMR Instruments, США), переносили їх на предметне скло та забарвлювали 0,12 % толуїдиновим синім. Препарати досліджували за допомогою мікроскопа Axioscop (Carl Zeiss, Німеччина).

Тонкі поздовжні зрізи апексів коренів (товщина = 50 нм – 70 нм) одержували на тому ж ультрамікротомі, переносили їх на бленди, вкриті формваровою плівкою та контрастували 0,5 % розчином ураніл ацетату ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) і розчином цитрату свинцю ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{14}\text{Pb}_3$) за стандартним методом [249]. Зрізи досліджували під трансмісійними електронними мікроскопами JEM-1200 EX і JEM-1230 (Jeol, Японія) за напруги 60 кВ або 80 кВ та робили фотознімки на фототехнічну плівку (Agfa, Бельгія). Одержані негативи мікрознімків зі збільшенням 2 000 – 15 000 сканували з використанням програми Precisionscan Pro 3.1 (Hewlett Packard, США). Аналіз отриманих цифрових зображень та виміри розмірів органел клітини проводили за допомогою засобів програми ImageTool v.3.0. (UTHSCSA, США).

Конфокальна мікроскопія. Апекси коренів довжиною 0,3 см – 0,8 см фіксували в суміші Карнуа, яка складалася з 60 мл 96 % розчину етанолу, 30 мл хлороформу та 10 мл льодяної оцтової кислоти, за температури 4 °С на підкладці з льоду впродовж 1 год, трикратно промивали 96 % розчином етанолу впродовж 30 хв кожне промивання. Корені дофіксували 70 % розчином етанолу за температури 4 °С впродовж 12 год, один раз промивали фосфатно-цитратним буфером (рН = 5,2) за кімнатної температури впродовж 10 хв. Забарвлювали акридиновим оранжевим на фосфатно-цитратному буфері (рН = 5,2) у співвідношенні 1:30 000 за кімнатної температури впродовж 30 хв, трикратно промивали тим самим буфером. Зафіксовані корені поміщали на предметне скло, заключали в краплю 65 % сахарози, як описано Шалумович [44], накривали покривним скельцем та висушували за кімнатної температури впродовж 3-х діб. Візуалізацію зон кореня здійснювали за допомогою лазерного скануючого конфокального

мікроскопа LSM5 Pascal (Zeiss, Німеччина) з лінзами Plan Neofluar (вихід флуоресценції в області 488 нм, збір флуоресценції – 500 нм – 600 нм).

Визначення загальної активності β -глюкозидази проводили спектрофотометричним методом [78, 204]. Субстрат обрано згідно з відомостями літератури [49, 256] з бази даних BRENDA (The Comprehensive Enzyme Information System (<https://www.brenda-enzymes.org>)). Рослинний матеріал наважкою по 100 мг вносили у фарфорові ступки, додавали по 1,5 мл фосфатного буферу (0,05 М, рН = 7,0) та гомогенізували до утворення пастоподібної маси, 1 год витримували її за кімнатної температури. Гомогенат переносили у пластикові пробірки та 10 хв відкручували на центрифугі Jouan GR 2022 (Carlsbad Biosystem, США) (8000 g, t = кімнатна). Відбирали надосадову рідину, яку вносили у скляні пробірки, додавали до неї по 200 мкл субстрату (0,1 М розчин 4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозиду на фосфатному буфері (0,1 М, рН = 7,0)). Отриману суміш витримували в термостаті впродовж 40 хв за температури 37 °С. Зупиняли реакцію додаючи розчин карбонату натрію (0,25 М, рН = 9,0). Показники оптичної густини розчинів вимірювали при довжині хвилі 420 нм на спектрофотометрі СФ-2000 (Спектр, Росія). Кількість загального білку визначали за методом Bradford [72]. Активність β -глюкозидази вираховували за кількістю 4-нітрофенолу, що утворився під час проходження реакції. Одержані значення вимірювань представляли як кількість нМ 4-нітрофенолу/хв/мг білку та виражали в одиницях активності – од. акт.

Виділення РНК. З метою запобігання деградації РНК перед початком проведення всіх процедур реагенти, розчини, лабораторний посуд та обладнання, які використовували в роботі, попередньо обробляли диетилпірокарбонатом та автоклаували; робочі поверхні обробляли RNaseZap (Sigma, Німеччина). Всі процедури проводили в спеціальному стерильному боксі для молекулярно-біологічних досліджень та у попередньо кварцованому приміщенні. Для виділення РНК використовували

набір реагентів TRI-Reagent® (Sigma, Німеччина) та проводили операцію за інструкцією виробника [292]. Рослинний матеріал наважкою по 100 мг поміщали у попередньо стерилізовані та охолоджені фарфорові ступки, вносили по 1 мл TRI-Reagent та гомогенізували до утворення пастоподібної маси з використанням рідкого азоту за температури 4 °С на підкладці з льоду. Гомогенат переносили у пробірки та 10 хв відкручували на центрифугі, вказаній вище (12000 g, t = 4 °С). Відбирали надосадову рідину та переносили її в нові пробірки, вносили до неї по 200 мкл розчину хлороформу, ретельно перемішували і 15 хв відкручували на центрифугі (12000 g, t = 4 °С). Знову відбирали надосадову рідину та переносили її у нові пробірки, вносили до неї по 500 мкл ізопропанолу, ретельно перемішували та 24 год витримували за температури 4 °С для преципітації РНК. Після цього пробірки з преципітатом РНК 10 хв відкручували на центрифугі (12000 g, t = 4 °С) та вилучали надосадову рідину. Утворений осад відмивали 1 мл 70 % розчину етанолу, 5 хв відкручували на центрифугі (7500 g, t = 4 °С), після чого надосадову рідину вилучали. Осад 10 хв підсушували за кімнатної температури і розчиняли його у дистильованій деіонізованій воді, вільній від рибонуклеаз (РНКаз).

Якість виділеної РНК перевіряли за допомогою 1 % агарозного денатуруючого гель-електрофорезу [201] в формальдегідному буфері (рН = 7,0) з таким складом: 20 мМ розчин 3-(N-морфоліно) пропансульфонової кислоти, 10 мМ розчин ацетату натрію, 1 мМ розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти, у режимі 1 год – 1,5 год під напругою 4,5 В/см – 5,0 В/см. Перед внесенням у лунки гелю до 3 мкл зразку РНК додавали 7 мкл суміші для завантаження, яка містила 0,2 мкл 50x буферу I, 5 мкл формаміду, 1,75 мкл 37 % розчину формальдегіду та 0,01 мкл бромистого етидію. Отриману суміш інкубували за температури 65 °С впродовж 10 хв та вносили до неї 1 мкл буферу, який містив 1 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти, 50 % розчин гліцерину, 0,1 % розчин

ксиленціанолу та 0,1 % розчин бромфенолового синього.

Кількість отриманої РНК визначали за оптичною густиною розчину, яку вимірювали на спектрофотометрі, вказаному вище (довжини хвиль = 230 нм, 260 нм і 280 нм) та розраховували за стандартною методикою. При $A_{260}/280 \geq 1,8-2,0$ та при $A_{260}/230 \geq 2,0-2,2$ проби РНК вважали достатньо чистими. Отриману мРНК використовували для подальшого проведення ЗТ-ПЛР. За потреби проби зберігали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ЗТ-ПЛР. Для одержання кДНК використовували набір реагентів Fermentas, який містить зворотну транскриптазу M-MLV (Fermentas, Литва), та проводили операцію за інструкцією виробника [212] на приладі Терцик (ДНК-Технология, Росія). До виділеної мРНК вносили ДНКазу I (Fermentas, Литва) з метою очищення її від слідів геномної ДНК. До розчину, який містив 1 мкг тотальної мРНК, вносили оліго (dT) праймер у концентрації 100 пмоль та 5 хв інкубували за температури $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, потім вносили 4 мкл 5x буферу, 1 мкл 10 мМ дезокси-нуклеотидтрифосфатів, 1 мкл інгібітора РНКаз. Отриману суміш 5 хв інкубували за температури $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, потім вносили до неї 1 мкл M-MuLV зворотної транскриптази. Реакційну суміш доводили до об'єму 20 мкл дистильованою деіонізованою водою, вільною від РНКаз та 1 год інкубували її за температури $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакцію зупиняли шляхом нагрівання суміші до температури $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ та 10 хв витримували її за такої ж температури. Отриману кДНК використовували для подальшого проведення класичної ПЛР-ампліфікації та у режимі реального часу. За потреби проби зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ПЛР-ампліфікація. Використовували обрані з бази даних NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) прямий та зворотний праймери, які є комплементарними до найбільш консервативних ділянок гена *PYK10* (*At3g09260*):

Прямий: 5' AGGATTGTGAAGGATTTCCGAGA-3'

Зворотний: 5' AGAAGAGCAACGACCAGGTG-3'

Для контролю використовували прямий та зворотний праймери до генів *UBQ5* (убіквітину 5 (*At3g62250*)) і *TUB9* (тубуліну 9 (*At4g20890*)), рівень експресії яких незмінний при різних умовах росту рослин, а саме:

Прямий (*UBQ5*): 5' AACCTTGAGGTTGAATCCCGA-3'

Зворотний (*UBQ5*): 5' GTCCTTCTTTCTAAACGT-3'

Прямий (*TUB9*): 5' GTACCTTGAAGCTTGCTAATCCTA-3'

Зворотний (*TUB9*): 5' GTTCTGGACGTTTCATCATCTGTTC-3'

В кожную мікропробірку вносили по 25 мкл 2х PCR буферу, по 0,5 мкг кДНК та по 0,5 мкмоль кожного праймеру. Отриману реакційну суміш доводили до об'єму 50 мкл дистильованою деіонізованою водою, вільною від РНКаз. У мікропробірці суміш покривали 25 мкл мінеральної олії для молекулярно-генетичних досліджень. ПЛР проводили за такого температурного режиму: 95 °С – 30 с; 25 циклів: 95 °С – 30 с; 57 °С – 30 с; 72 °С – 1 хв; 72 °С – 10 хв; зберігання – 10 °С. Аналіз продуктів ампліфікації проводили стандартним електрофоретичним розділенням у 1,5 % агарозному гелі [201] в буфері (рН = 8,0) з таким складом: 40 мМ розчин трис ацетату, 1 мМ розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти, у режимі 2 год – 2,5 год під напругою 3,6 В/см – 4,5 В/см. Розмір продуктів ампліфікації визначали за маркером молекулярної ваги GeneRuler DNA Ladder Mix™ (Fermentas, Литва). Гель обробляли розчином етидію броміду (концентрація – 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 [206] при загальному об'ємі реакції 20 мкл на приладі Real-Time PCR IQ-Cycler (BioRad, США). В кожную мікропробірку вносили PCR 2 х Master Mix (концентрація = 0,5 мкг/мл), який мав такий склад: ПЛР-буфер, суміш дезоксинуклеотидів, Таq-ДНК-

полімерази та хлорид магнію. До суміші вносили відповідні праймери (концентрація = 5 пмоль) і пробу кДНК (концентрація = 0,05 мкг/мл). Інтенсивність флуоресценції вимірювали за температури 77 °С – 79 °С, криву плавлення – у діапазоні 50 °С – 94 °С з інтервалом 0,5 °С, із затримкою в 10 с. Отримані дані аналізували за допомогою програмного забезпечення приладу. Внутрішнім контролем була експресія гена *UBQ5*. Кількісні дані ПЛР аналізували за методом відносної оцінки експресії [234]. Обрахунок результатів проводили за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA). Рівень відносної експресії виражали в умовних одиницях – у.о.

Методи статистики. Всі експерименти проводили щонайменше в трьох незалежних біологічних повторях, 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 Стьюдента (T-test) ($p \leq 5\%$) та Манна-Уїтні (U-test) ($p \leq 5\%$) [61].

РОЗДІЛ 4

ЗАГАЛЬНА МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОРОСТКІВ

Для повної та достовірної оцінки ефектів впливу кліноостатування та Х-опромінення на ГЕР і ЕР-тільца на ультраструктурному, біохімічному і молекулярному рівнях перш за все оцінювали загальний стан проростків *A. thaliana*, звертаючи особливу увагу на основні морфологічні ознаки та анатомічну будову їх коренів, в контролі та при дії на проростки вказаних чинників.

4.1. Загальна характеристика проростків за умов кліноостатування

Горизонтальне кліноостатування частково відтворює ефекти мікрогравітації у космічному польоті, пов'язані з відсутністю вектора гравітації, оскільки позбавляє рослини можливості сприймати гравітаційний стимул. Вісь кліностата розміщена таким чином, щоб гравітаційний вектор був направлений поперечно до поздовжньої осі рослини. На рослини, які ростуть на кліностаті, діє відцентрова сила, компоненти сил тяжіння або ж їх комбінація.

Вплив кліноостатування вивчали на етіолованих проростках при обертанні на горизонтальному кліностаті (2 об/хв). Проростки вирощували в умовах темряви для того, щоб оцінити реакцію кореня на позбавлення стимулу гравітації та виключити вплив фототропічного стимулу.

3-, 5- та 7-добові етіюльовані проростки мали сім'ядольні листки з цільною листовою пластинкою жовтуватого кольору, овальною за формою. Кліноостатовані проростки відрізнялись від контрольних проростків, які росли за стаціонарних умов, дезорієнтацією росту, що пов'язано з постійною зміною їхнього положення відносно вектора гравітації (рис. 4.1).

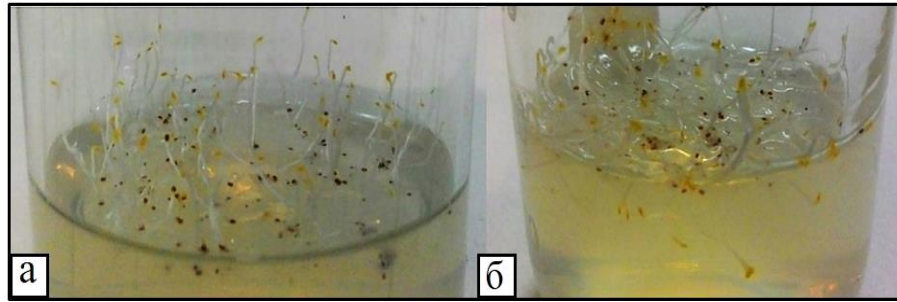


Рис. 4.1. 7-добові етіюльовані проростки *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліноостатування (б).

За довжиною кореня кліноостатовані проростки не відрізнялися від контрольних зразків (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Довжина коренів етіюльованих проростків *A. thaliana*
за умов кліноостатування, мм**

Вік проростків (доба)	Контроль	Кліноостатування
3	8,0±1,49	8,0±2,03
5	9,5±2,12	9,5±2,19
7	11,0±2,31	10,5±2,64
M±m		

За даними літератури реальна та модельована мікрогравітація у різних експериментах викликала як активацію, так і пригнічення росту рослин [135, 159, 301]. Так, довжина коренів проростків *L. culinaris*, які росли в умовах реальної мікрогравітації протягом 25 год – 35 год [232], та *P. sativum*, що росли в умовах кліноостатування 44 год [1], була меншою порівняно з контролем. В той же час довжина коренів проростків *L. culinaris* і *L. sativum*, які росли в космічному польоті 25 год і 32 год відповідно [231, 263] статистично достовірно не відрізнялася від контролю.

4.2. Загальна характеристика проростків при дії X-опромінення

Відомо, що під час вивчення залежності «доза – ефект» для різних видів рослин можливо визначити діапазон доз, які не спричиняють значних пошкоджень та/або викликають стимуляцію певних функцій (значень відповідних параметрів) у рослинному організмі. Зазвичай стимулюючі дози для рослин знаходяться в інтервалі 10^{-2} Гр – кілька десятків грей [31]. Зокрема визначено [13], що 3-добові проростки *A. thaliana* після гострого X-опромінення дозами 0,4 Гр – 10 Гр росли та розвивались так само як і без опромінення (в контролі), в той час як доза 17 Гр викликала повну зупинку росту кореня та побуріння його верхівки майже у половини проростків на 8-му – 10-ту добу експерименту. Також за показником виживаності апікальної меристеми, встановлено, що при гострому X-опроміненні ЛД₅₀ для 3-добових проростків *A. thaliana* становить 17 Гр. На підставі цих літературних відомостей [13, 31] та [27, 184], для гострого X-опромінення проростків *A. thaliana* нами обрано дози в діапазоні 0,5 Гр – 12 Гр, які також включають дози, до певної міри еквівалентні таким у кабіні космічного корабля (International space station internal radiation monitoring (<http://www.nasa.gov>)).

Опроміненню піддавали 3-добові проростки, які росли в умовах освітлення. X-Опромінення проводили в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр. Для того, щоб оцінити швидку реакцію клітин на опромінення та протягом їх відновлення, проростки аналізували через 2 год (3-добові проростки) і 10 діб (13-добові проростки) після опромінення.

Через 2 год після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) колір і загальний стан 3-добових проростків за візуальною оцінкою не змінювалися (рис. 4.2). Проростки мали сім'ядольні листки із цільною листовою пластинкою зеленого кольору, овальною за формою. Головний корінь мав зачатки бічних коренів. Довжина коренів проростків після

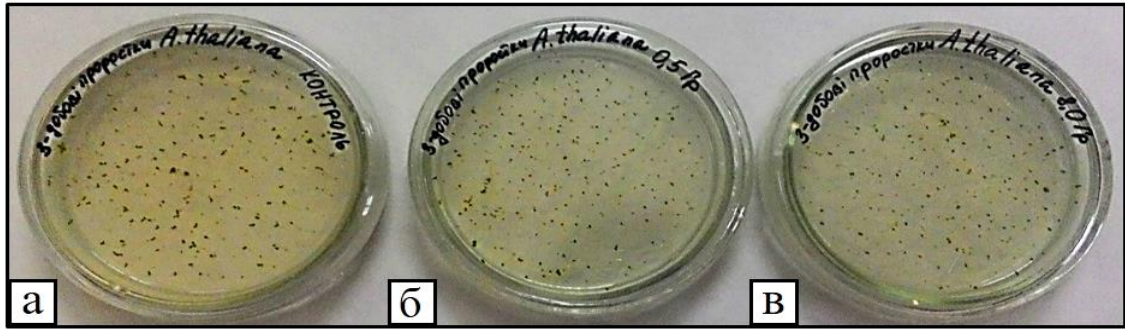


Рис. 4.2. 3-добові проростки *A. thaliana* в контролі (а) та через 2 год після Х-опромінення дозами 0,5 Гр (б) і 8 Гр (в).

опромінення була подібною до контролю (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Довжина коренів проростків *A. thaliana*
при дії Х-опромінення, мм**

Період після Х-опромінення	Контроль	Х-опромінення (دوزи 0,5 Гр – 12 Гр)
2 год (вік проростків – 3 доби)	10±2,29	10±3,06
10 діб (вік проростків – 13 діб)	22±3,87	22±4,56
M±m		

13-добові проростки з контролю за візуальною оцінкою мали розетку правильної форми, яка складалася з 4–6 листків овальної форми зеленого кольору. Коренева система складалася з головного та бічних коренів. Через 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) проростки за вказаними показниками були подібні до контрольних (рис. 4.3). Довжина головного кореня після дії радіації статистично не відрізнялася від такої в контролі (табл. 4.2). Розетка проростків після опромінення в дозах від 0,5 Гр до 6 Гр була правильної форми із листками

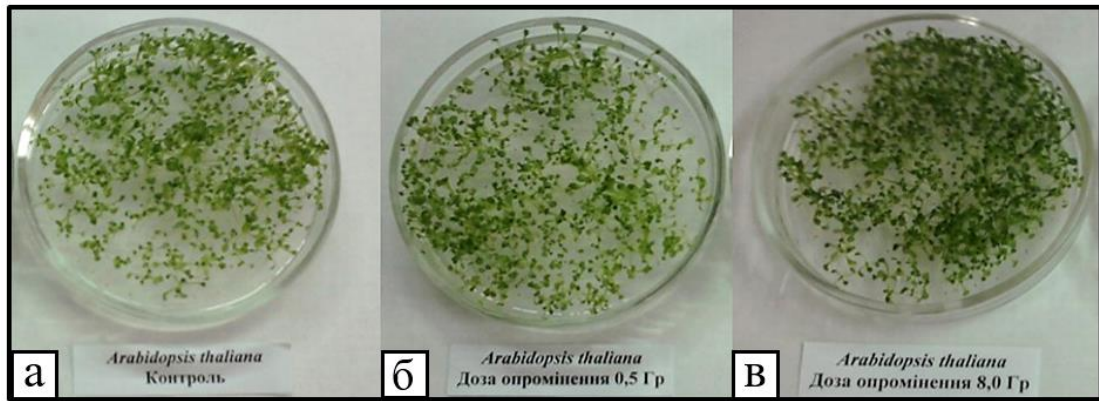


Рис. 4.3. 13-добові проростки *A. thaliana* в контролі (а) та через 10 діб після Х-опромінення дозами 0,5 Гр (б) і 8 Гр (в).

зеленого кольору. Із збільшенням дози від 8 Гр до 12 Гр розетка набувала певної асиметрії, листки розетки мали більш насичений темно-зелений колір (рис. 4.3).

Отже, Х-опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) не викликало суттєвих змін морфології проростків протягом 10 діб. Лише дози від 8 Гр і вище викликали візуальні морфологічні ефекти. Такі результати узгоджуються з даними літератури щодо реакцій проростків *A. thaliana* на вплив іонізуючої радіації відносно низькими та сублетальними дозами 0,4 Гр – 17 Гр [13, 184, 223, 293]. Наприклад, опромінення у дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр та 5 Гр не впливало на ростову активність стебла рослин цього виду [184, 293], тоді як після опромінення дозою 50 Гр довжина стебла була меншою в середньому на 5 см [293].

4.3. Анатомія кореня за умов кліностакування

Для проведення досліджень методами світлової, конфокальної та трансмісійної електронної мікроскопії кореневі апекси 3-, 5- і 7-добових етіюльованих проростків *A. thaliana* фіксували відразу після закінчення експериментів (після знімання проростків з кліностаку та в контролі).

В апексах коренів з контролю морфологічно виділяли кореневий чохлик, зону меристеми, дистальну зону розтягу (ДЗР), центральну зону розтягу (ЦЗР) і зону корневих волосків (рис. 4.4). Апекси коренів містили

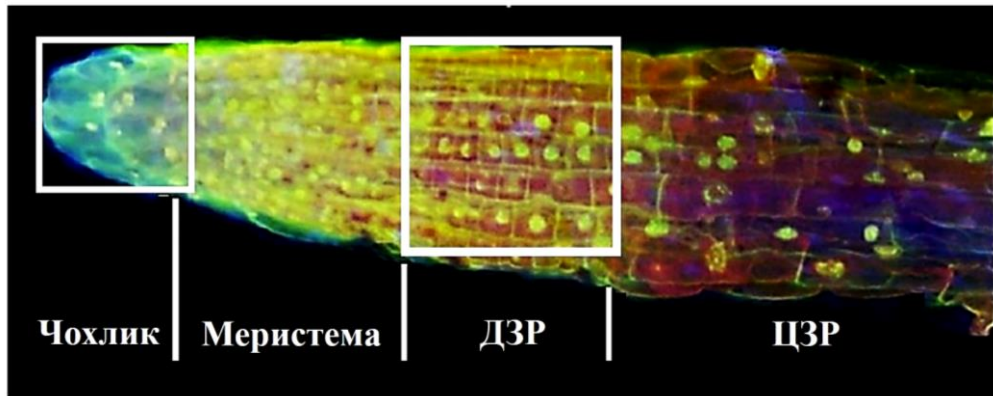


Рис. 4.4. Будова кореневого апекса *A. thaliana*: ДЗР – дистальна зона розтягу, ЦЗР – центральна зона розтягу. Квадратами виділено кореневий чохлик та ДЗР (конфокальна мікроскопія). Масштаб – 50 мкм.

меристематичні ініціалі епідерми, кори і центрального циліндра, а також ініціалі колумели і периферійної зони кореневого чохлика. Останні були локалізовані на дистальній поверхні центру спокою кореня, перші – на його проксимальній поверхні. Таким чином, диференціювання меристематичних клітин відбувалося в двох протилежних напрямках: до базальної частини власне кореня і до його апікальної частини. Колумела кореневого чохлика, а також меристема та зона розтягу власне кореня на поверхні клітин епідерми були оточені периферичними клітинами. Зона розтягу кореня складалася з трьох шарів клітин – епідерми, паренхіми та ендодерми. Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини. ДЗР починалася приблизно на відстані $144,26 \pm 2,71$ мкм від верхівки кореня. Колумела кореневого чохлика в апікальному напрямі звичайно складалася з меристематичних клітин, статоцитів, що диференціюються, зрілих статоцитів, статоцитів, що переходять до секреції слизу та секреторних

клітин (рис. 4.5).

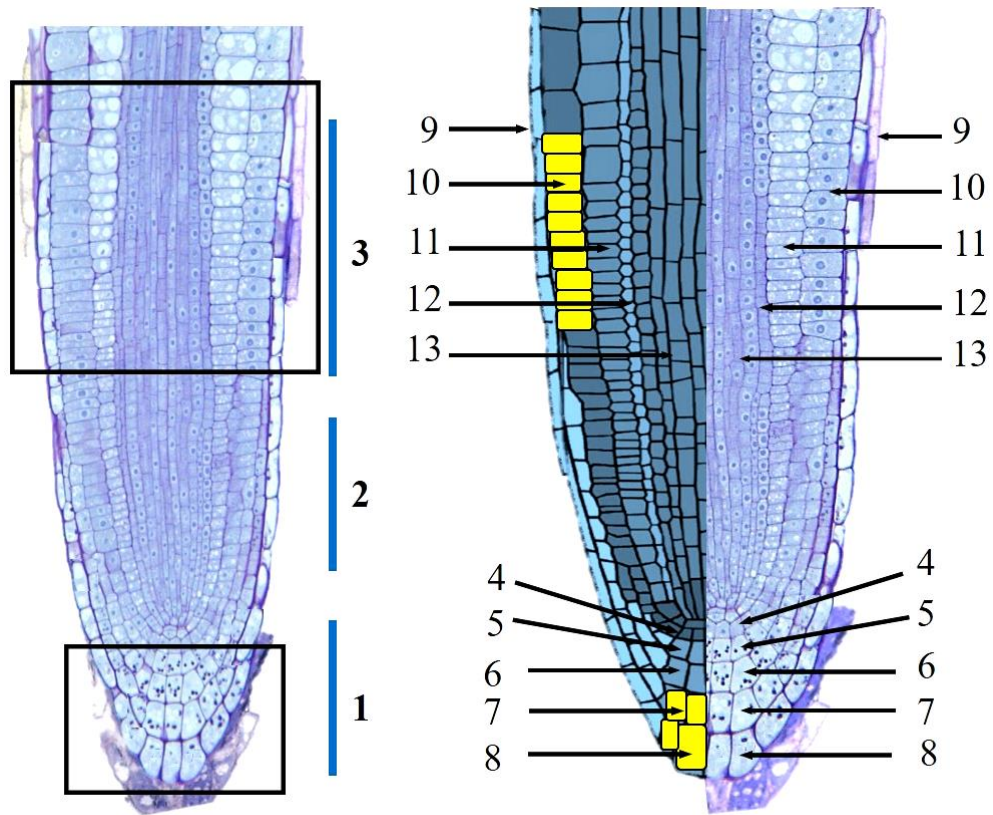


Рис. 4.5. Поздовжній зріз кореневого апекса етіюльованого проростка *A. thaliana*: **1** – кореневий чолик, **2** – меристема, **3** – дистальна зона розтягу, **4** – меристематичні клітини кореневого чолика, **5** – статоцити, що диференціюються, **6** – зрілі статоцити, **7** – статоцити, що переходять до секреції, **8** – секреторні клітини, **9** – периферичні клітини, **10** – епідерма, **11** – паренхіма, **12** – ендодерма, **13** – центральний циліндр. Жовтим кольором виділено клітини, в яких присутні ЕР-тільця (схематичне зображення та світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

Кліноостатування проростків протягом всіх строків не викликало суттєвих змін в анатомії кореня. В апексах коренів розрізняли кореневий чолик, зону меристеми, ДЗР, ЦЗР і зону корневих волосків. Порушень в диференціюванні клітин кореневого чолика та рості клітин ДЗР кореня не

спостерігали. Колумела кореневого чохла, як і в контролі, складалася з клітин меристеми, статоцитів, що диференціюються, зрілих статоцитів, статоцитів, що переходять до секреції слизу та секреторних клітин. У зоні розтягу власне кореня розрізняли по одному шару епідерми, паренхіми та ендодерми. Периферичні клітини оточували колумелу кореневого чохла, меристему та зону розтягу кореня. Суттєвої різниці у довжині корневих апексів кліноостатованих проростків щодо таких в стаціонарних умовах росту не спостерігали. ДЗР починалася приблизно на відстані $143,32 \pm 2,86$ мкм від верхівки кореня.

У наших дослідженнях головну увагу звертали на клітини кореневого чохла, який містить гравірецепторні клітини центральної статенхіми, та на клітини ДЗР кореня, найбільш чутливі до впливу зовнішніх чинників (рис. 4.4, 4.5). Кліноостатування протягом всіх термінів не впливало на розміри статоцитів корневих чохлаків проростків (табл. 4.3), але викликало незначне зменшення ширини клітин ДЗР кореня (табл. 4.4).

Таблиця 4.3

Параметри статоцитів кореневого чохла етіюльованих проростків *A. thaliana* за умов кліноостатування, мкм

Вік проростків (доба)	Контроль		Кліноостатування	
	Параметри			
	Довжина клітин	Ширина клітин	Довжина клітин	Ширина клітин
3	14,77±4,24	35,07±6,82	15,01±4,11	34,96±6,05
5	16,57±2,98	38,23±5,66	15,83±2,64	38,73±5,98
7	17,73±3,55	39,67±7,16	17,22±2,87	38,45±7,75
M±m				

Таблиця 4.4

**Параметри клітин ДЗР кореня етіюльованих
проростків *A. thaliana* за умов кліноостатування, мкм**

Вік проростків (доба)	Контроль		Кліноостатування	
	Параметри			
	Довжина клітин	Ширина клітин	Довжина клітин	Ширина клітин
3	13,78±0,99	13,97±0,74*	13,12±1,18	12,32±0,59*
5	15,98±1,96	15,52±2,58*	15,49±1,41	14,03±2,69*
7	16,01±1,87	16,58±2,02*	15,53±2,05	15,11±2,07*
M±m				

Примітка: * позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Дослідження клітин кореневого чохла і клітин ДЗР власне кореня показало, що ЕР-тільца притаманні статоцитам, що перейшли до секреції, кореневого чохла, а також клітинам епідерми ДЗР кореня (рис. 4.5), тоді як в зрілих статоцитах та інших тканинах ДЗР вони були відсутні (див. далі розділ 5). Загалом такі дані узгоджуються з відомостями літератури [9].

Отже, наші дослідження показали, що кліноостатування істотним чином не впливало на розміри та анатомічні ознаки апексів коренів 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростків *A. thaliana*. Раніше повідомлялося про збільшення довжини зони меристеми кліноостатованих 4-добових проростків *A. thaliana* [198] та її зменшення у 7-добових проростків *Zea sp.* [3]. Також зменшення довжини меристеми та ДЗР кореня показано у 6-добових проростків *B. rapa* [17]. Виявлені нами незначні відмінності у ширині клітин ДЗР в умовах кліноостатування суттєво не впливали на загальну будову

кореня. Іншими дослідниками також було відмічено зміну розмірів клітин за умов реальної та модельованої мікрогравітації [141, 198], зокрема показано, зменшення розмірів клітин ДЗР кореня *A. thaliana* у відповідь на кліноостатування [45, 258]. Також відомо, що з усіх ростових зон кореня ДЗР є найбільш чутливою до зовнішніх стимулів, таких як механічний вплив, дія іонів металів, кисню і ауксину [67, 119, 164, 226].

4.4. Анатомія кореня при дії X-опромінення

Для проведення досліджень методами світлової, конфокальної і трансмісійної електронної мікроскопії фіксували апекси коренів 3- та 13-добових проростків *A. thaliana* з контролю, через 2 год і 10 діб після X-опромінення проростків дозами 0,5 Гр – 12 Гр.

Будова корневих апексів 3- і 13-добових проростків з контролю була подібною до такої етіюльованих проростків (рис. 4.6). X-Опромінення у всіх

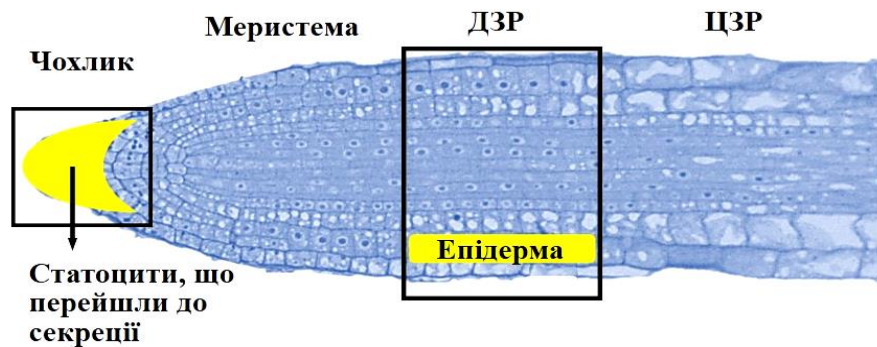


Рис. 4.6. Поздовжній зріз кореневого апекса проростка *A. thaliana*: ДЗР – дистальна зона розтягу, ЦЗР – центральна зона розтягу. Квадратами виділено кореневий чохлак та ДЗР. Жовтим кольором виділено клітини, в яких наявні ЕР-тільця (світлова мікроскопія). Масштаб – 20 мкм.

застосованих дозах, як через 2 год, так і через 10 діб, не порушувало напрями диференціювання клітин, яке відбувалося: 1) до кореневого

чохлика та 2) до ростових зон власне кореня. Звичайно виділяли кореневий чохлик, зону меристеми, ДЗР, ЦЗР та зону корневих волосків. Центральний циліндр складався з перициклу та провідної тканини. У кореневому чохлику розрізнялися колумела та периферичні клітини. Колумела складалася з меристематичних клітин, статоцитів на стадії диференціювання, зрілих статоцитів, статоцитів, що переходять до секреції слизу та секреторних клітин. У зоні розтягу кореня розрізняли одношарову епідерму, одношарову паренхіму та одношарову ендодерму. Периферичні клітини також оточували клітини епідерми ДЗР кореня. У 3-добових проростків з контролю ДЗР починалася приблизно на відстані $155,18 \pm 1,66$ мкм від верхівки кореня, у 13-добових проростків – $214,26 \pm 4,38$ мкм. Через 2 год після опромінення проростків у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) ДЗР починалася приблизно на відстані $153,78 \pm 3,16$ мкм від верхівки кореня, через 10 діб – $214,32 \pm 5,17$ мкм. Опромінення проростків як через 2 год, так і через 10 діб не впливало на розміри статоцитів кореневого чохлика та клітин ДЗР власне кореня (табл. 4.5, 4.6).

Отже, дози 0,5 Гр – 12 Гр через 2 год і 10 діб після опромінення не викликали суттєвих змін у розмірах та анатомічній структурі коренів 3- і 13-добових проростків *A. thaliana*. Відсутність достовірної різниці у розмірах статоцитів і клітин ДЗР кореня узгоджується з даними літератури щодо стійкості рослинних клітин до дії «малих» доз радіації [238]. Відомо, що однакові дози іонізуючої радіації по-різному впливають на морфологічні та анатомічні ознаки рослини залежно від її виду та сорту [105, 150]. Показано, що при дозі 0,3 Гр та навіть високих дозах радіації 10 Гр, 50 Гр і 100 Гр анатомічна структура рослин *P. vulgaris* не відрізнялася від контролю [59, 248]. Поряд з цим досліджено, що зі збільшенням дози радіації від 4 Гр до 10 Гр у коренях 3-добових проростків *P. sativum* скорочувалися розміри меристеми, зростали частота інактивації клітин, порушень пакетування і деформацій клітинних рядів у меристемі та зоні розтягу. При цьому

Таблиця 4.5

**Параметри статочитів кореневого чохла проростків
A. thaliana через 2 год та 10 діб після X-опромінення, мкм**

Період після X-опромінення	Параметри	Контроль	X-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)	Довжина клітин	15,98± 5,06	16,32± 4,86	17,42± 4,58	16,12± 5,04	15,92± 5,21	15,75± 5,47	15,87± 5,25	16,27± 4,43	16,10± 5,77
	Ширина клітин	37,69± 8,43	37,55± 8,67	37,97± 8,06	37,97± 8,99	37,27± 9,02	37,39± 8,74	37,17± 8,85	37,32± 8,88	37,93± 9,09
10 діб (вік проростків – 13 діб)	Довжина клітин	20,18± 4,87	20,20± 4,36	21,15± 3,95	21,31± 3,78	20,54± 4,62	20,38± 4,72	20,76± 4,39	21,24± 3,81	20,73± 4,54
	Ширина клітин	44,05± 6,74	43,53± 7,17	43,68± 6,12	43,47± 6,92	44,36± 6,74	43,84± 6,45	43,52± 5,96	42,98± 7,79	43,75± 7,15
M±m										

Таблиця 4.6

**Параметри клітин ДЗР кореня проростків *A. thaliana*
через 2 год та 10 діб після X-опромінення, мкм**

Період після X-опромінення	Параметри	Контроль	X-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)	Довжина клітин	15,53± 1,05	15,97± 0,72	15,64± 0,92	15,78± 1,05	15,57± 0,88	15,26± 1,28	15,44± 1,19	15,72± 0,87	15,29± 1,33
	Ширина клітин	16,02± 0,98	16,11± 0,89	15,98± 1,04	16,05± 0,99	16,16± 1,06	16,20± 0,88	16,07± 1,02	16,34± 0,76	15,99± 1,08
10 діб (вік проростків – 13 діб)	Довжина клітин	18,98± 2,43	18,83± 2,60	18,87± 2,52	18,95± 2,47	18,79± 2,82	18,69± 2,97	18,86± 2,33	18,99± 2,44	18,81± 2,71
	Ширина клітин	19,56± 2,57	19,44± 2,89	19,48± 2,67	19,52± 2,61	19,47± 2,75	19,42± 2,84	19,57± 2,58	19,39± 2,94	19,44± 2,69
M±m										

деформації рядів в ДЗР були виражені сильніше ніж в зоні меристеми [39]. За показниками виживання апікальних меристем коренів *P. sativum* та *Z. mays* визначено, що через 10 діб після опромінення дозами від 3 Гр до 32 Гр радіорезистентність у різних точках клітинного циклу незначно відрізнялася між видами [139]. На прикладі двох сортів *S. tuberosum* (Сілана та Діамант) показано, що доза опромінення 10 Гр у рослин першого сорту мала стимулюючу, а у другого – пригнічуючу дію на діаметр бульби, який залежав від кількості та розміру клітин [142]. Отримані нами дані підтверджують стійкість проростків *A. thaliana* до доз іонізуючого випромінювання 0,5 Гр – 12 Гр на ряду з іншими видами рослин.

Отримані результати досліджень даного розділу наведені в таких публікаціях:

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.

2. Романчук С. Ультраструктура ЕР-тілець у статоцитах і клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. під дією Х-опромінення // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019. Вип. 1 (77). С. 61–67.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

РОЗДІЛ 5

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛІТИН КОРЕНЯ

5.1. Ультраструктура клітин кореневого чохла та клітин дистальної зони розтягу власне кореня за умов кліноостатування

У 3-, 5- та 7-добових етіолованих проростків *A. thaliana* з контролю диференційовані статоцити кореневого чохла були видовженої форми та мали характерну для таких клітин полярність: в проксимальній частині клітини розміщувалося ядро, а в дистальній – амілопласти-статоліти (рис. 5.1). На зрізах статоцитів ядро мало лопатеву, округлу або овальну

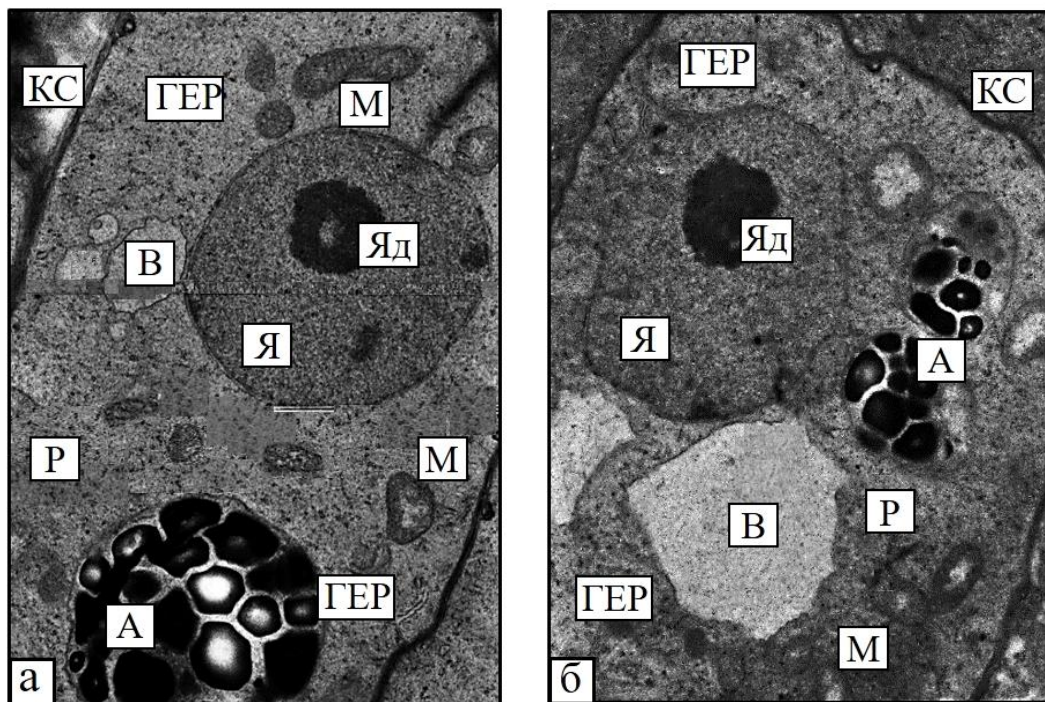


Рис. 5.1. Статоцити корневих чохлаків етіолованих проростків *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліноостатування (б): КС – клітинна стінка, Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, А – амілопласт, М – мітохондрія, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Р – рибосоми (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

форму. В амілопластах-статолітах крохмальні зерна, овальні, округлі або атипові за формою, були щільно упакованими. Варіювання кількості крохмальних зерен амілопластів залежало від їхнього розміру. Численні вільні рибосоми рівномірно розміщувались в гіалоплазмі. В деяких місцях гіалоплазми спостерігали скупчення рибосом – полісоми та електронно-прозорі зони невеликого розміру. Невеликі за розміром вакуолі у невеликих кількостях були локалізовані переважно біля ядра. Іноді на зрізах статоцитів спостерігали 1 шт – 2 шт вакуолі більшого розміру. Частіше вакуолі мали округлу, рідше атипову форму, їх вміст був, як слабо-гранулярним, так і електронно-прозорим. Мітохондрії, які рівномірно розміщувалися в цитоплазмі, на зрізах статоцитів варіювали за формою від округлої до видовженої. Система крист мітохондрій була значно розвинена, в їх електронно-щільному матриксі проглядалися електронно-прозорі зони. В проксимальній та дистальній частинах статоцитів поодинокі зустрічалися диктіосоми, цистерни яких мали виразні контури. На зрізах статоцитів спостерігали окремі невеликі за розміром профілі АЕР, основна частина яких зосереджувалась на периферії клітини. Невеликого розміру каналці та цистерни ГЕР основним чином розміщувались біля амілопластів-статолітів або в кутах проксимальної та дистальної частини статоцита, поряд з клітинною стінкою. ЕР-тільця на зрізах зрілих статоцитів кореневого чохлика були відсутні.

При поступовому переході диференційованих статоцитів до фази секреції слизу амілопласти вже розміщувались по всьому об'єму цитоплазми. Поряд з цим спостерігали зменшення розмірів крохмальних зерен, що, вочевидь, пов'язано із початком лізису крохмалю. Ядро розміщувалося в центрі клітини або зберігало проксимальне положення. Клітини ставали більш вакуолізованими. Вакуолі розміщувалися переважно в центрі клітини або на її периферії. Цистерни диктіосом ставали більш розширеними та накопичували слиз, їх контури були менш виразними.

Також спостерігали розширення цистерн і каналців ГЕР та АЕР. На ряду із вказаними змінами структурної організації, спостерігали появу ЕР-тілець у кількості 1 шт – 2 шт на зрізі, які формувалися з профілів ГЕР, про що свідчили наявні на зовнішній поверхні їхніх мембран рибосоми. Середня площа зрізу ЕР-тілець була такою: $0,015 \pm 0,002$ мкм², $0,017 \pm 0,001$ мкм² та $0,019 \pm 0,003$ мкм² у 3-, 5- та 7-добових проростків відповідно. На зрізах ЕР-тілець, як і каналці та цистерни ГЕР, мали тонкофібрилярний вміст середньої електронної щільності. Форма ЕР-тілець була округлою (рис. 5.2).

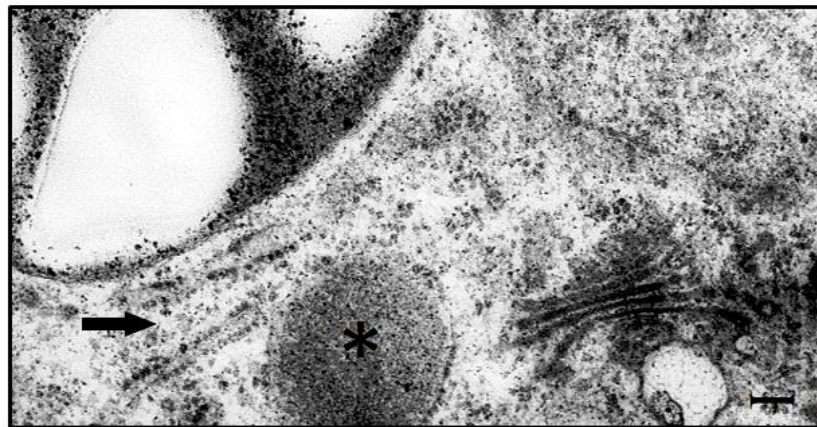


Рис. 5.2. Фрагмент статоцита, що переходить секреції, кореневого чохла етіольованого проростка *A. thaliana*. Стрілкою позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочкою позначено ЕР-тілець (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 200 нм.

У власне секреторних клітинах кореневого чохла кількість ЕР-тілець на зрізі значно збільшувалася, їх форма була округлою та овальною (рис. 5.3б). Звичайно ЕР-тілець розміщувалися біля профілів ГЕР, які виглядали досить розширеними. За рахунок утворення великої вакуолі, розміщеної в центрі клітини, залишки цитоплазми та її органели, в тому числі ЕР-тілець та ГЕР, відтіснялися до клітинної стінки (рис. 5.3а). Переважна більшість органел ставала лізованою, особливо цистерни диктіосом та крохмальні зерна в амілопластах, а також клітинна стінка.

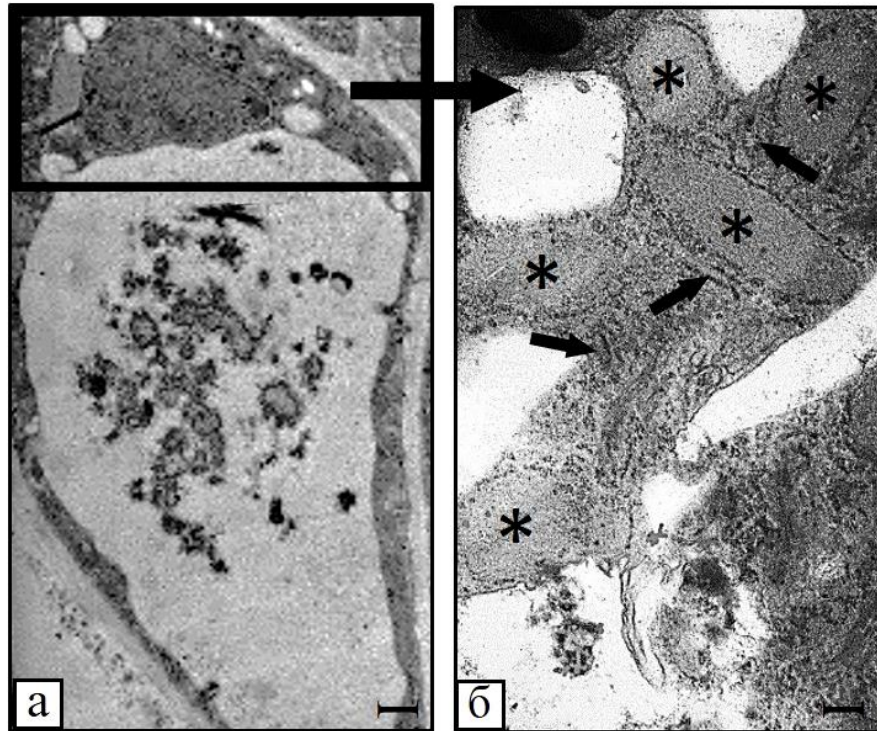


Рис. 5.3. Секреторна клітина кореневого чохла етіольованого проростка *A. thaliana* (а) та її збільшена ділянка (б). Стрілками позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочками позначено ЕР-тілця (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб: а – 2 мкм, б – 500 нм.

Перші від меристеми клітини 2-х шарів ДЗР кореня у 3-, 5- та 7-добових проростків з контролю мали по одному округлому ядру, яке знаходилось в центрі клітини, у клітинах 3-го та 4-го шарів ядро набувало лопатевої форми та поступово переміщувалося до периферійної частини клітини. Діаметр ядерця переважно досягав більше половини діаметра ядра. Іноді в ядрі спостерігали «просвіти», які вказують на існування вигинів ядерної оболонки. Вакуолі поступово збільшувалися в об'ємі та зливалися між собою. Нечисленні пластиди були розміщені поряд з ядром. На зрізах клітин пластиди були овальної форми, у деяких з них проглядалися крохмальні зерна. Диктіосоми знаходились в різних частинах клітини та продукували велику кількість везикул, що свідчило про їх активний стан. Гетерогенні за розмірами та формою, а також за структурою і кількістю

крист, мітохондрії розміщувались рівномірно по цитоплазмі клітини. На зрізах клітин АЕР був представлений дещо розширеними цистернами та везикулами, розмір і форма яких варіювали. Між тонопластом та клітинною стінкою розміщувались цистерни та каналці ГЕР, які сполучалися між собою. За нашими спостереженнями, ЕР-тільца були наявні в клітинах епідерми ДЗР, тоді як в клітинах інших тканин цієї ростової зони кореня вони були відсутні, тому далі досліджували саме ці клітини. Загальний вигляд досліджуваних клітин епідерми ДЗР кореня наведено на рисунку 5.4.

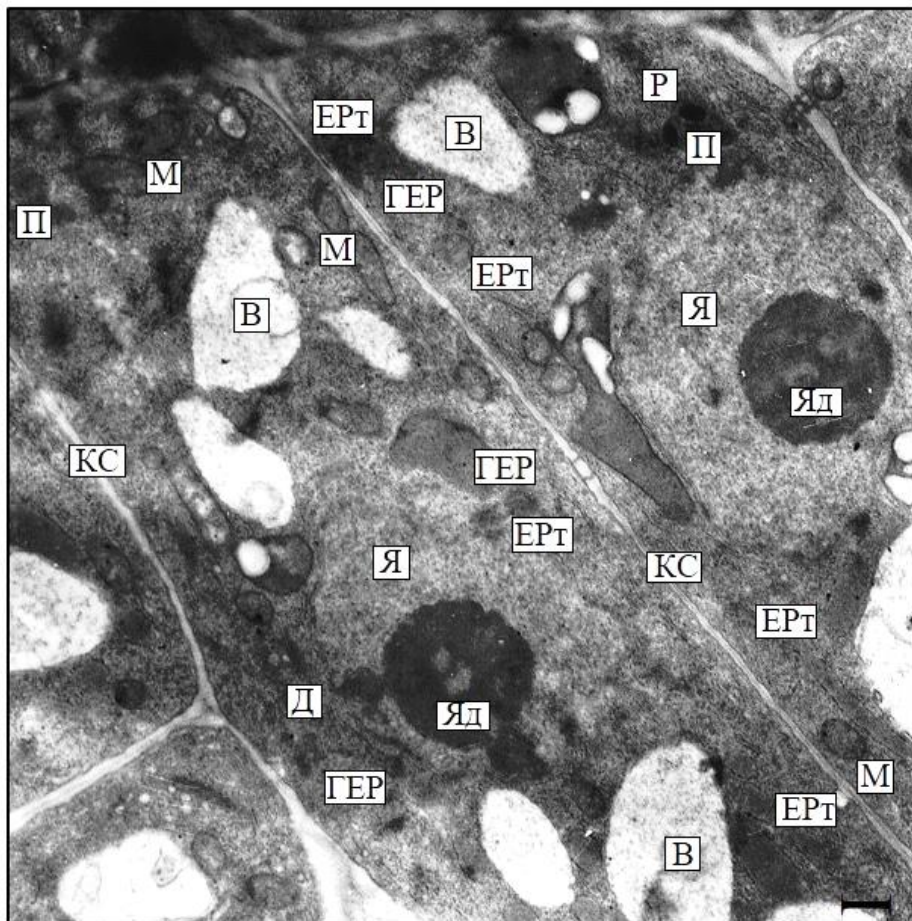


Рис. 5.4. Загальний вигляд клітин епідерми ДЗР кореня етіольованого проростка *A. thaliana*: КС – клітинна стінка, Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, Д – диктіосома, П – пластида, М – мітохондрія, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ЕРт – ЕР-тільце, Р – рибосоми (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

На зрізах клітин епідерми ДЗР кореня ЕР-тілця розміщувалися біля клітинної стінки та безпосередньо близько біля профілів ГЕР або між ними, що вказує на те, що вони є похідними цієї структури. Це також підтверджується наявністю рибосом на зовнішній поверхні мембрани ЕР-тілець. Вміст каналців і цистерн ГЕР та ЕР-тілець був тонкофібрилярним середньої електронної щільності (рис. 5.5а). На зрізах

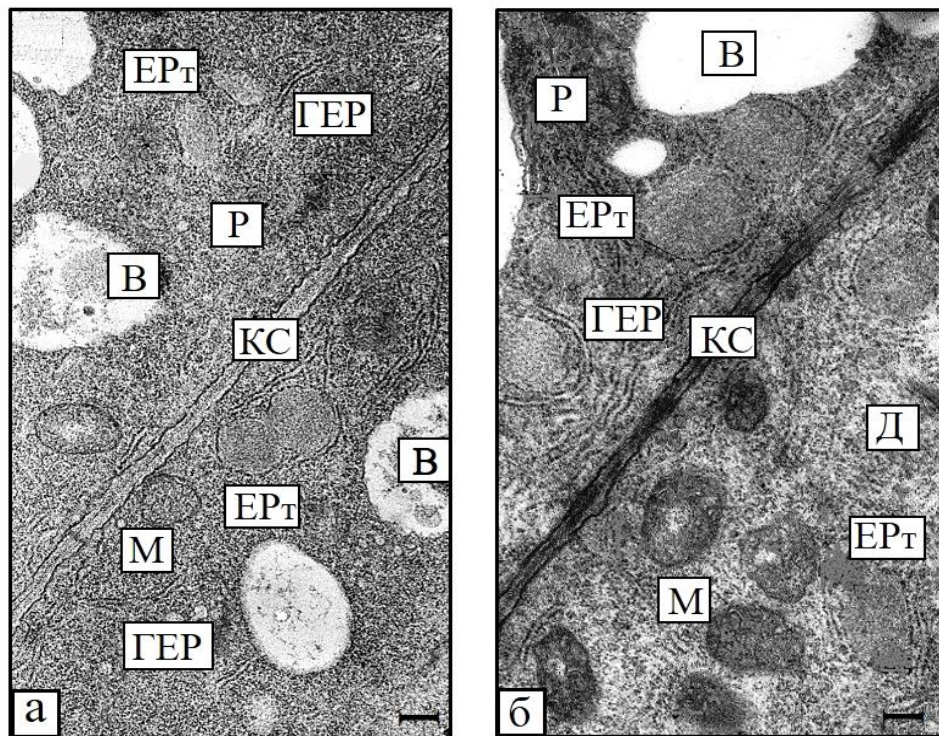


Рис. 5.5. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 3-добових етіюльованих проростків *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліноостатування (б): КС – клітинна стінка, В – вакуоль, М – мітохондрія, Д – диктіосома, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ЕРт – ЕР-тілець, Р – рибосоми (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

клітин 3-добових проростків ЕР-тілця були переважно округлої форми, на зрізах клітин 5- та 7-добових проростків – як округлої, так і овальної. В середньому налічували 8 шт – 9 шт ЕР-тілець на зрізі клітини. При

цьому середня площа зрізу ЕР-тілець була такою: $0,054 \pm 0,004$ мкм² – у 3-добових проростків, $0,056 \pm 0,003$ мкм² – у 5-добових проростків та $0,060 \pm 0,007$ мкм² – у 7-добових проростків.

В умовах кліноостатування загальні характеристики ультраструктури клітин кореневого чохлака 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростків були подібними до контролю. Поряд з цим нами виявлено і деякі відмінності.

За всіх строків кліноостатування в клітинах центральної статенхіми – диференційованих статоцитах ядро займало проксимальне положення, в той час як амілопласти-статоліти не осідали в дистальній частині клітини, а розміщувались по всій її площі (рис. 5.1). Одночасно з такими змінами в амілопластах зменшувалася кількість крохмальних зерен та осмофільних глобул, відбувався частковий лізис строми. Спостерігали значне збільшення розмірів і кількості вакуоль, тобто посилення вакуолізації статоцитів. Поряд з мітохондріями округлої та овальної форми збільшувалася кількість мітохондрій атипової форми, зменшувалася площа крист і слабшав контраст зовнішньої мембрани. Основна частина мітохондрій зосереджувалась на периферії клітини. Канальці та цистерни ГЕР на зрізах статоцитів виглядали більш розширеними порівняно з такими в контролі. Розміщення профілів ГЕР спостерігали переважно біля амілопластів-статолітів або поряд з клітинною стінкою. Особливих змін в організації АЕР та диктіосом, а також щільності гіалоплазми не спостерігали. Пухирці та везикули АЕР були невеликого розміру та локалізувалися у різних частинах клітини. Цистерни диктіосом мали чіткі контури. Кількість рибосом в гіалоплазмі була досить великою. ЕР-тілець на зрізах диференційованих статоцитів, як і за стаціонарних умов росту, були відсутні.

При кліноостатуванні у статоцитах, що переходять до фази секреції слизу, ядро, як і в контролі, переважно розміщувалося в центрі клітини, рідше – на її периферії. Амілопласти розміщувалися по всьому об'єму

цитоплазми клітини. Спостерігали початкові процеси лізису деяких органел, посилення ступеня вакуолізації клітин, збільшення розмірів цистерн диктіосом, розширення цистерн і каналців АЕР та ГЕР. Звичайно у зоні профілів ГЕР відбувалося утворення ЕР-тілець, які мали округлу форму, тонкофібрилярний вміст середньої електронної щільності та були оточені власне мембранами ГЕР. У стаатоцитах, що переходять до секреції, корневих чохлаків проростків всіх строків кліноостатування середня кількість ЕР-тілець становила в середньому 3 шт – 6 шт на зрізі, а середня площа їх зрізу збільшувалася щодо контролю в середньому у 1,5–2 рази (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Параметри ЕР-тілець на зріз стаатоцита, що переходить до секреції, кореневого чохлака етіольованих проростків *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	0,015±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.

В умовах кліноостатування у секреторних клітинах кореневого чохлака, як і в контролі, більшість органел була лізованою, зокрема

цистерни диктіосом та крохмальні зерна в амілопластах, а також клітинна стінка кореневого чохла. Залишки цитоплазми разом із її органелами відтіснялися до периферії клітини за рахунок утворення великої вакуолі. Профілі ГЕР виглядали значно розширеними. Звичайно на зрізах секреторних клітин спостерігали велику кількість ЕР-тілець. Вони були округлі та овальні за формою, на зовнішній поверхні мембрани мали рибосоми.

Умови клінонстатування суттєво не впливали на загальні ультраструктурні характеристики клітин епідерми ДЗР кореня 3-, 5- та 7-добових проростків (рис. 5.4). Змін в розміщенні ядра не спостерігали: ядро, овальної або лопатевої форми, частіше займало центральне положення, рідше дещо зміщувалось. Діаметр ядерця складав більше половини діаметра ядра. Іноді в ядрі спостерігали зони, заповнені гіалоплазмою. Суттєвих змін в організації вакуоль, пластид, диктіосом, мітохондрій та АЕР також не спостерігали. Лише відмічали на зрізах клітин деяку хвилястість поперечних клітинних стінок та спостерігали посилення вакуолізації клітин, особливо на 7-му добу клінонстатування. Пластиди головним чином розташовувалися навколо ядра та варіювали за формою і розмірами. Крохмальні зерна у пластидах були відсутніми або, за наявності, досягали невеликого розміру. Диктіосоми перебували в активному стані та продукували велику кількість везикул, які відрізнялись між собою за розмірами. Форма та розміри мітохондрій були гетерогенними, також в них відрізнялись кількість і розміри крист. Спостерігали розширені везикули і цистерни АЕР. Візуально профілі ГЕР виглядали значно видовженими та розгалуженими, в порівнянні з такими в контролі (рис. 5.6). Канальці та цистерни ГЕР головним чином розміщувались у кутах проксимальної і дистальної частини клітини достатньо близько до клітинної стінки та тонопласту, а також поряд з мітохондріями. Біля профілів ГЕР та між

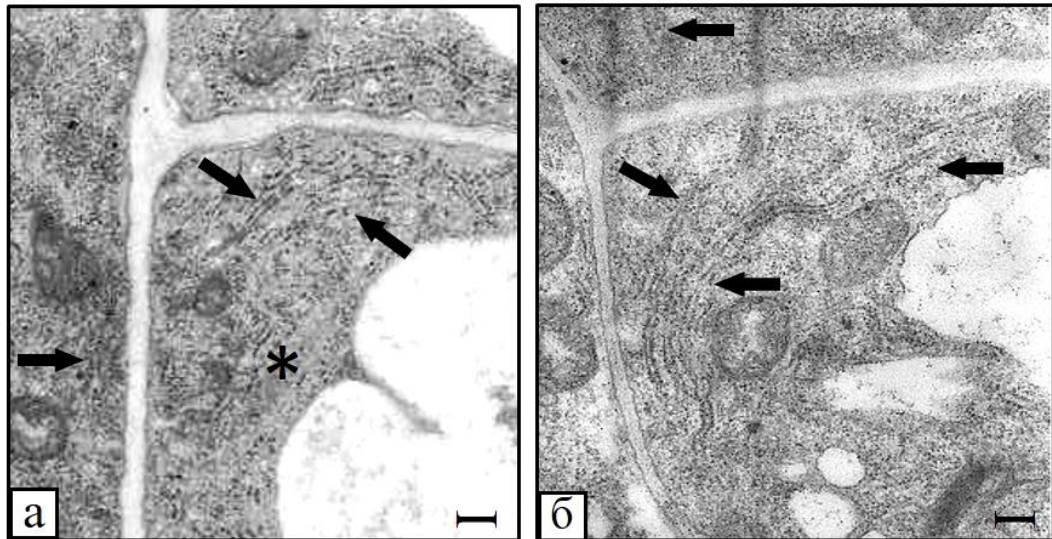


Рис. 5.6. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів етіюльованих проростків *A. thaliana* в контролі (а) та за умов кліноостатування (б). Стрілками позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочкою позначено ЕР-тілець (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб – 500 нм.

ними розміщувались ЕР-тілець, що, як добре було видно на деяких зрізах клітин, являли собою локальні розширення ГЕР. Звичайно вміст ЕР-тілець, цистерн та каналців ГЕР був тонкофібрилярним середньої електронної щільності. На зовнішній поверхні мембран ЕР-тілець знаходились рибосоми (рис. 5.5б).

В умовах кліноостатування виявлено гетерогенність клітинної популяції ЕР-тілець за формою та розмірами (рис. 5.7), особливо це було виражено у клітинах епідерми ДЗР 7-добових кліноостатованих проростків. Форма таких ЕР-тілець на зрізах була округлою, овальною та видовженою. В окремих значно видовжених ЕР-тілях довжина перевищувала ширину більше ніж у 10 разів. Також видовжені за формою ЕР-тіля спостерігали на зрізах клітин 5-добових кліноостатованих проростків. На зрізах клітин 3-добових кліноостатованих проростків ЕР-тіля мали здебільшого округлу форму, рідше овальну.

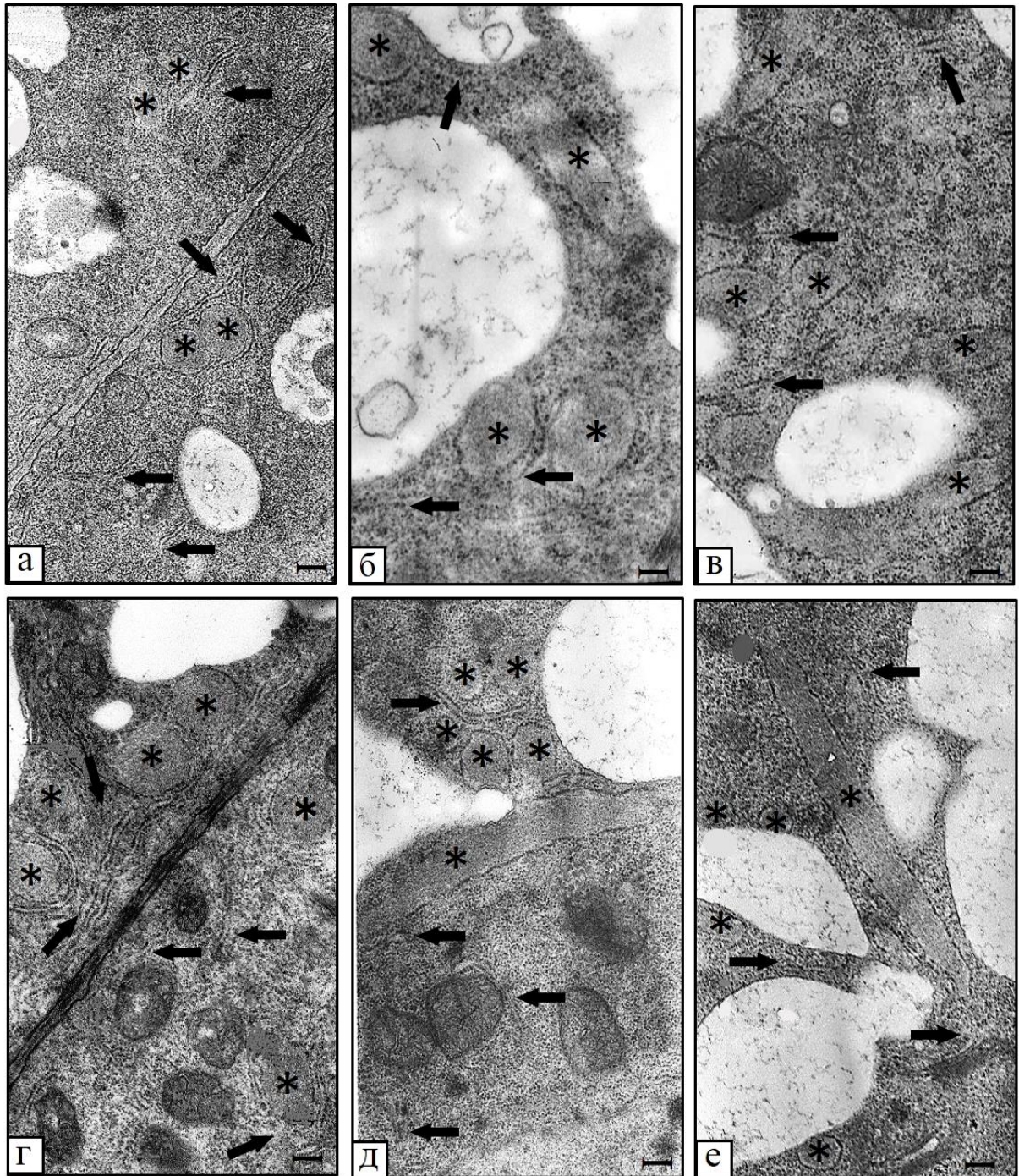


Рис. 5.7. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів етіюльованих проростків *A. thaliana* в контролі та за умов кліностагування: а, б, в – 3-, 5- та 7-добові проростки контролю відповідно; г, д, е – 3-, 5- та 7-добові кліностаговані проростки відповідно. Стрілками позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочками позначено ЕР-тільца (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

Середня кількість та середня площа ЕР-тілець на зрізі клітини епідерми ДЗР кореня проростків всіх строків клінонстатування зростала щодо контролю в середньому у 2 рази (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Параметри ЕР-тілець на зріз клітини епідерми ДЗР кореня етіюльованих проростків *A. thaliana* за умов клінонстатування

Вік проростків (доба)	Контроль		Клінонстатування	
	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.

Отже нами досліджено, що за умов клінонстатування диференціювання клітин статенхіми кореневого чохла і ріст клітин ДЗР кореня 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростків *A. thaliana* здійснюється аналогічно до контрольних зразків, що узгоджується з даними літератури [21, 41, 176, 177, 198]. Відмінності в ультраструктурі клітин вказують на деякі зміни функціонального навантаження органел під впливом клінонстатування. Так, розміщення амілопластів-статолітів по всьому об'єму статоцита узгоджується з раніше встановленими відомостями про те, що при дії мікрогравітації гравірецепторний апарат формується, але залишається

функціонально ненавантаженим [9, 162, 176, 181, 281]. Збільшення об'єму вакуоль в клітинах мезофілу листків та ростових зон кореня описано і для інших видів, зокрема *G. max* [80] та *B. rapa* [18, 211] в умовах мікрогравітації, що вказує, на думку авторів, на інтенсифікацію процесів автофагії, що веде до прискорення диференціювання клітин та їх старіння. Також є припущення, що збільшення ступеня вакуолізації клітин пов'язано зі змінами синтетичної активності клітин та підвищенням гідролазної функції ферментів [33]. Вважається, що характер перебудов структурної та функціональної організації мітохондрій і підвищення дихання, описаних в кліностаатних і космічних експериментах у *V. radiata*, *Impatiens balsamina*, *P. sativum* та *B. rapa* [7, 11, 17, 28, 177, 182], свідчить про зміни енергетичного обміну клітин, що є одним із засобів підтримання клітинного метаболізму на нормальному рівні і, таким чином, сприяє адаптації рослин до умов модельованої та реальної мікрогравітації. Встановлена хвилястість поперечних клітинних стінок в ДЗР кореня за умов кліностаатування та космічного польоту пов'язується із зміною орієнтації тубулінових мікротрубочок [8, 9, 258, 259].

Вперше досить детально охарактеризовані нами зміни в ультраструктурі ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла і клітинах ДЗР власне кореня в умовах кліностаатування демонструють їх чутливість до дії модельованої мікрогравітації. Збільшення майже у 2 рази середньої кількості та середньої площі ЕР-тілець на зрізі статоцита, що переходить до секреції, та зрізі клітини епідерми ДЗР кореня, а також їх варіювання за розмірами і формою при дії кліностаатування можливо розглядати як прояв адаптаційної реакції клітин до дії абіотичного чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах. Характер таких перебудов у клітині може свідчити про певні зміни метаболізму, що здійснюється в діапазоні фізіологічної відповіді клітини.

5.2. Ультраструктура клітин кореневого чохлака та клітин дистальної зони розтягу власне кореня при дії X-опромінення

Ультраструктура диференційованих статоцитів корневих чохлаків 3- і 13-добових проростків *A. thaliana* з контролю, що зростали в умовах освітлення, була подібною для такої етіюльованих проростків (див. підрозд. 5.1). Статоцити, звичайно, мали видовжену форму, в їх проксимальній частині знаходилося ядро, в дистальній – амілопласти-статоліти з різною кількістю крохмальних зерен (рис. 5.8). В гіалоплазмі

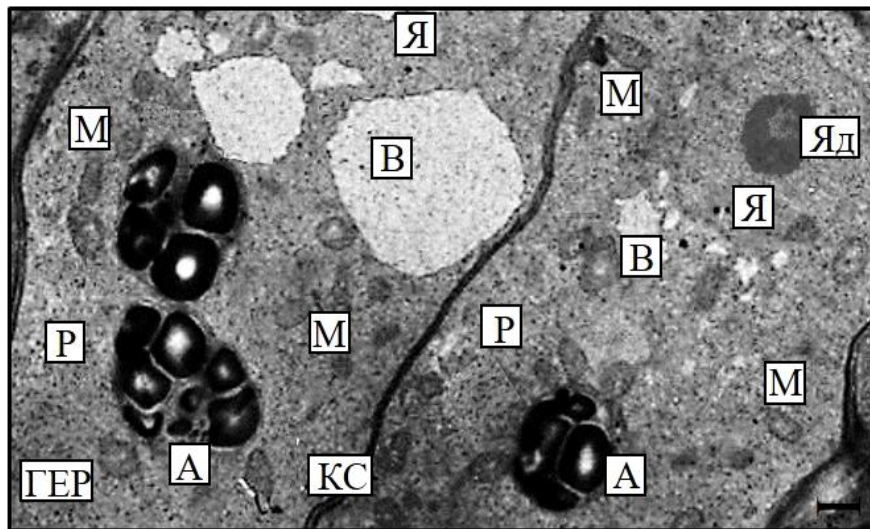


Рис. 5.8. Статоцити кореневого чохлака проростка *A. thaliana*: КС – клітинна стінка, Я – ядро, Яд – ядерце, В – вакуоль, А – амілопласт, М – мітохондрія, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Р – рибосоми (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

спостерігали велику кількість вільних рибосом, а також зустрічали полісоми та електронно-прозорі ділянки. Невелику кількість вакуоль, округлої та іноді атипової форми, спостерігали, як в центрі клітини, так і на її периферії. Численні мітохондрії, овальної або округлої форми, та поодинокі диктіосоми, розташовувалися більш-менш рівномірно по площі цитоплазми

клітини. Поодинокі профілі АЕР та невелика кількість профілів GER переважно знаходились в дистальній частині статоцита біля клітинної стінки та/або поряд з амілопластами-статолітами. Цистерни і каналці GER мали тонкофібрилярний вміст середньої електронної щільності. ER-тілець в зрілих статоцитах кореневого чохла були відсутні.

Звичайно на зрізах статоцитів, що переходять до фази секреції слизу, в зоні профілів GER спостерігали утворення ER-тілець, які мали округлу форму та тонкофібрилярний вміст середньої електронної щільності. На поверхні їхньої зовнішньої мембрани знаходились рибосоми, що знову підтверджувало походження ER-тілець від GER. На зрізі клітини кількість ER-тілець становила 1 шт – 2 шт, а середня площа їх зрізу мала такі значення: $0,015 \pm 0,001$ мкм² та $0,016 \pm 0,002$ мкм² у 3- і 13-добових проростків відповідно. Ядро переважно займало центральне положення в клітині, а амілопласти розміщувались по всьому об'єму її цитоплазми. Зменшення розмірів крохмальних зерен в амілопластах свідчило про початок процесів лізису крохмалю. Статоцити, що переходять до секреції, були досить вакуолізовані. Вакуолі розміщувалися переважно в центрі клітини, рідше – на її периферії. Цистерни GER, АЕР та диктіосом ставали більш розширеними, останні накопичували слиз.

У власне секреторних клітинах кореневого чохла відбувалося посилення процесів лізису та утворення великої кількості ER-тілець, які мали округлу і овальну форму та були оточені мембранами GER. Канальці та цистерни GER, в свою чергу, були значно розширеними. Велика вакуоль, утворена в центрі клітини, відтісняла залишки цитоплазми та її органели, в тому числі ER-тілець та GER, до клітинної стінки, яка була лізованою.

Ультраструктура клітин епідерми ДЗР коренів 3- і 13-добових проростків з контролю, що зростали в умовах освітлення (рис. 5.9), також була подібною для такої етіюльованих проростків: розміщення та ультраструктура ядра, вакуоль, диктіосом, пластид, мітохондрій і АЕР

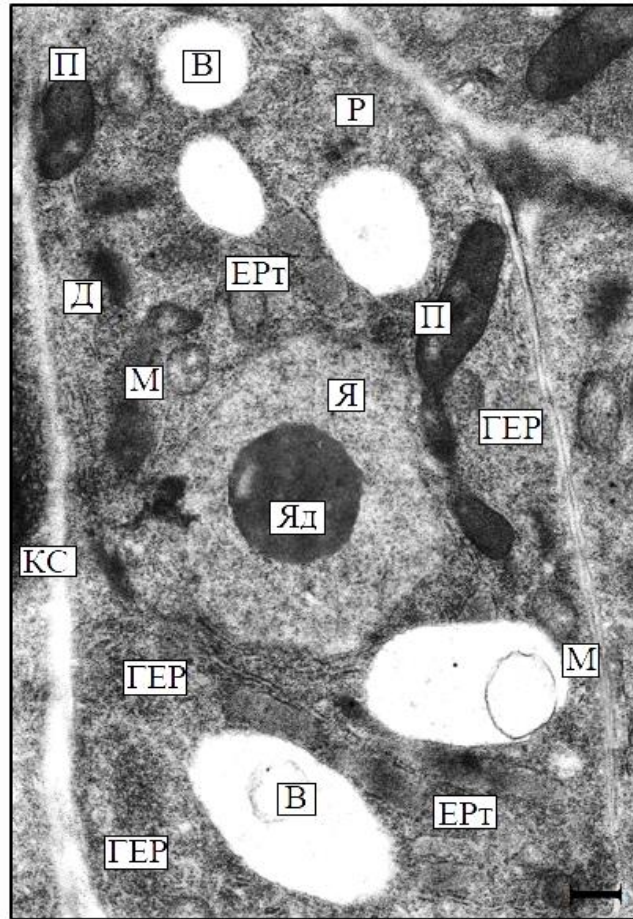


Рис. 5.9. Загальний вигляд клітини епідерми ДЗР кореня проростка *A. thaliana*: КС – клітинна стінка, В – вакуоль, М – мітохондрія, Д – диктіосома, П – пластида, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ЕРт – ЕР-тільце, Р – рибосоми (трансмійсна електронна мікроскопія). Масштаб – 2 мкм.

детально описані в підрозділі 5.1. Канальці та цистерни ГЕР розміщувалися біля тонопласту та клітинної стінки, переважно в кутах проксимальної і дистальної частини клітини. Поряд з профілями ГЕР та між ними, звичайно, спостерігали ЕР-тільця, оточені мембранами ГЕР, з тонкофібрилярним вмістом середньої електронної щільності (рис. 5.10а). На зрізах клітин 3-добових проростків ЕР-тільця за формою були переважно округлими, на зрізах клітин 13-добових проростків – округлими, іноді овальними. Середня кількість ЕР-тілець у клітинах 3-добових проростків становила 8 шт на зрізі,

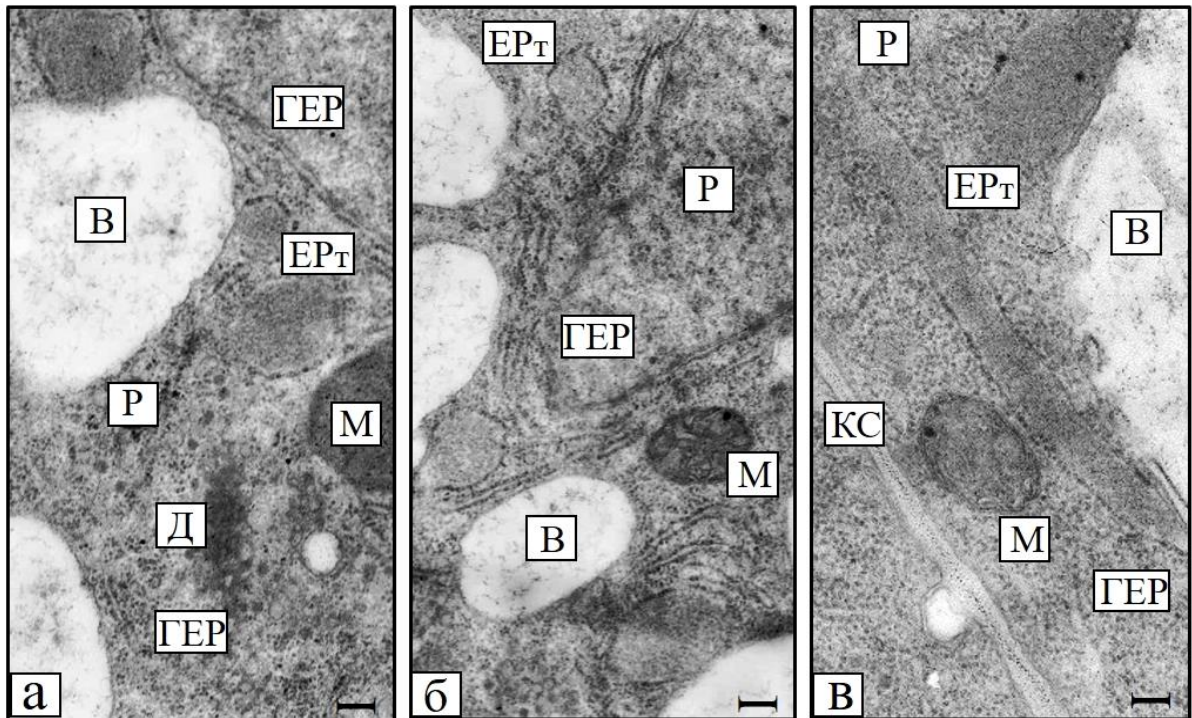


Рис. 5.10. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 3-добових проростків *A. thaliana* в контролі (а) та через 2 год після X-опромінення дозами 0,5 Гр (б) і 8 Гр (в): КС – клітинна стінка, В – вакуоль, М – мітохондрія, Д – диктіосома, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ЕРТ – ЕР-тілець, Р – рибосоми (трансмійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

у клітинах 13-добових проростків – від 15 шт до 20 шт. Середня площа зрізу ЕР-тілець була такою: $0,061 \pm 0,002$ мкм² та $0,098 \pm 0,007$ мкм² у клітинах 3- і 13-добових проростків відповідно.

Через 2 год та 10 діб при всіх застосованих дозах X-опромінення (0,5 Гр – 12 Гр) ультраструктура клітин кореневого чохла 3- і 13-добових добових проростків у загальних рисах залишалася подібною до контролю. Поряд з цим виявлено і деякі відмінності. Після дії радіації у клітинах центральної статенхіми – диференційованих статоцитах кореневого чохла у проксимальній частині знаходилось ядро, у дистальній – амілопласти-статоліти, тобто статоцити зберігали свою полярність (рис. 5.8). Крохмальні

зерна в амілопластах-статолітах були щільно упакованими та варіювали за кількістю, формою і розмірами. В гіалоплазмі спостерігали велику кількість вільних рибосом, а також нечисленні полісоми та електронно-прозорі ділянки. Суттєвих змін в ультраструктурі вакуоль, мітохондрій, АЕР та ГЕР також не спостерігали. Невеликі вакуолі округлої або атипової форми, із слабо-гранулярним та/або електронно-прозорим вмістом, переважно розташовувалися біля ядра або в центрі статоцита, рідше – на його периферії. Іноді на зрізах статоцитів спостерігали 1 шт – 2 шт вакуолі більшого розміру. Гетерогенні за формою та розмірами мітохондрії мали розвинену систему крист та рівномірно розміщувалися по цитоплазмі клітини. Поодинокі диктіосоми, які мали виразні контури, розміщувалися в проксимальній та дистальній частинах статоцита. На периферії клітини зустрічали невеликі за розміром профілі АЕР. Біля амілопластів-статолітів і в кутах проксимальної та дистальної частини статоцита, поряд з клітинною стінкою знаходилися невеликі профілі ГЕР. ЕР-тільца на зрізах зрілих статоцитів кореневого чохла, як і в контролі, були відсутні.

Після опромінення, при поступовому переході диференційованих статоцитів до фази секреції слизу, амілопласти спостерігали по всьому об'єму цитоплазми. Ядро поступово займало центральне положення. Відмічали початкові процеси лізису органел, зокрема цистерн диктіосом та крохмальних зерен в амілопластах. При цьому цистерни диктіосом ставали більш розширеними та накопичували слиз, а крохмальні зерна в амілопластах зменшувалися в розмірах. Також спостерігали посилення вакуолізації клітин. Вакуолі зосереджувалися в центрі клітини, а також в меншій кількості були розташовані на її периферії. Цистерни і каналці АЕР та особливо ГЕР ставали значно розширеними. Безпосередньо близько біля профілів ГЕР знаходились ЕР-тільца, які звичайно на зовнішній поверхні мембран мали рибосоми, та були заповнені тонкофібрилярним вмістом середньої електронної щільності (рис. 5.11в). За формою ЕР-тільца на зрізах

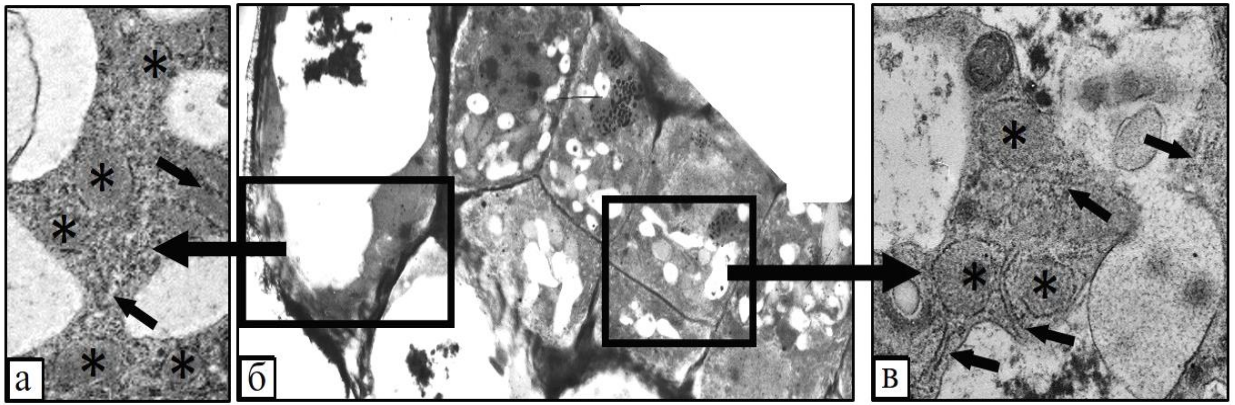


Рис. 5.11. Кореневий чохлак проростка *A. thaliana* (б) та збільшені ділянки секреторної клітини (а) і статоцита, що переходить до секреції (в). Стрілками позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочками позначено ЕР-тільца (трансмисійна електронна мікроскопія). Масштаб: а, в – 500 нм, б – 5 мкм.

були переважно округлими, іноді овальними. Як через 2 год, так і через 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) середня кількість ЕР-тілець на зрізі статоцита, що переходить до секреції, щодо контролю зростала в середньому у 1,5–2 рази, а їх середня площа зрізу – у 2–2,5 рази (табл. 5.3).

При дії Х-променів у власне секреторних клітинах кореневого чохлака, як і в контролі, спостерігали посилення процесів лізису, про що свідчили лізис крохмалю в зернах амілопластів та накопичення слизу в цистернах диктіосом, а також лізис клітинної стінки. Залишки цитоплазми секреторної клітини та її органели, в тому числі ЕР-тільца і ГЕР, відтіснялися до клітинної стінки, що пов'язано з утворенням великої центральної вакуолі (рис. 5.11б). Канальці та цистерни ГЕР були значно розширеними. Звичайно на зрізі секреторної клітини біля профілів ГЕР спостерігали велику кількість ЕР-тілець. ЕР-тільца, як завжди, були оточені мембранами ГЕР та заповнені тонкофібрилярним вмістом середньої електронної щільності (рис. 5.11а).

Таблиця 5.3

**Параметри ЕР-тілець на зріз статочита, що переходить до секретії,
кореневого чохла проростків *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.

Через 2 год та 10 діб після дії радіації у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) ультраструктура ядра, вакуоль, мітохондрій, пластид, диктіосом та АЕР клітин епідерми ДЗР, а також клітинної стінки коренів 3- і 13-добових проростків була подібною до контролю (рис. 5.9). Проте спостерігали підвищений ступінь вакуолізації клітин, особливо через 10 діб після опромінення. Ядро округлої, іноді дещо лопатевої форми в основному розміщувалося в центрі клітини. Діаметр ядерця переважно досягав більше половини діаметра ядра. Іноді в ядрі спостерігали «просвіти», які вказують на існування вигинів ядерної оболонки. Поряд з ядром спостерігали нечисленні пластиди, які були овальні за формою. У деяких пластидах проглядалися крохмальні зерна. Диктіосоми звичайно були в активному стані та продукували велику кількість везикул різного розміру. Мітохондрії варіювали за формою і розмірами, а також за структурою і кількістю крист. Диктіосоми та мітохондрії розміщувались рівномірно по цитоплазмі клітини. Дещо розширені цистерни та везикули АЕР також варіювали за розмірами і формою. Цистерни та каналці ГЕР, які були звивистими та сполучалися між собою, розміщувалися між тонопластом і клітинною стінкою, переважно в кутах проксимальної та дистальної частини клітини.

Як через 2 год, так і через 10 діб при всіх застосованих дозах опромінення (0,5 Гр – 12 Гр) на зрізах клітин епідерми ДЗР кореня профілі ГЕР виглядали значно видовженими та розгалуженими, ніж в контролі (рис. 5.10, 5.12). Біля профілів ГЕР та між ними знаходились ЕР-тілець, звичайно оточені мембранами ГЕР з тонкофібрилярним вмістом середньої електронної щільності. Через 2 год після дії радіації середня кількість ЕР-тілець на зріз клітини зростала щодо контролю у 3 рази при дозах 0,5 Гр – 2 Гр і у 2 рази при вищих дозах (4 Гр – 12 Гр), а їх середня площа на зріз клітини при цьому збільшувалася удвічі за всіх доз. Через 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) ці показники

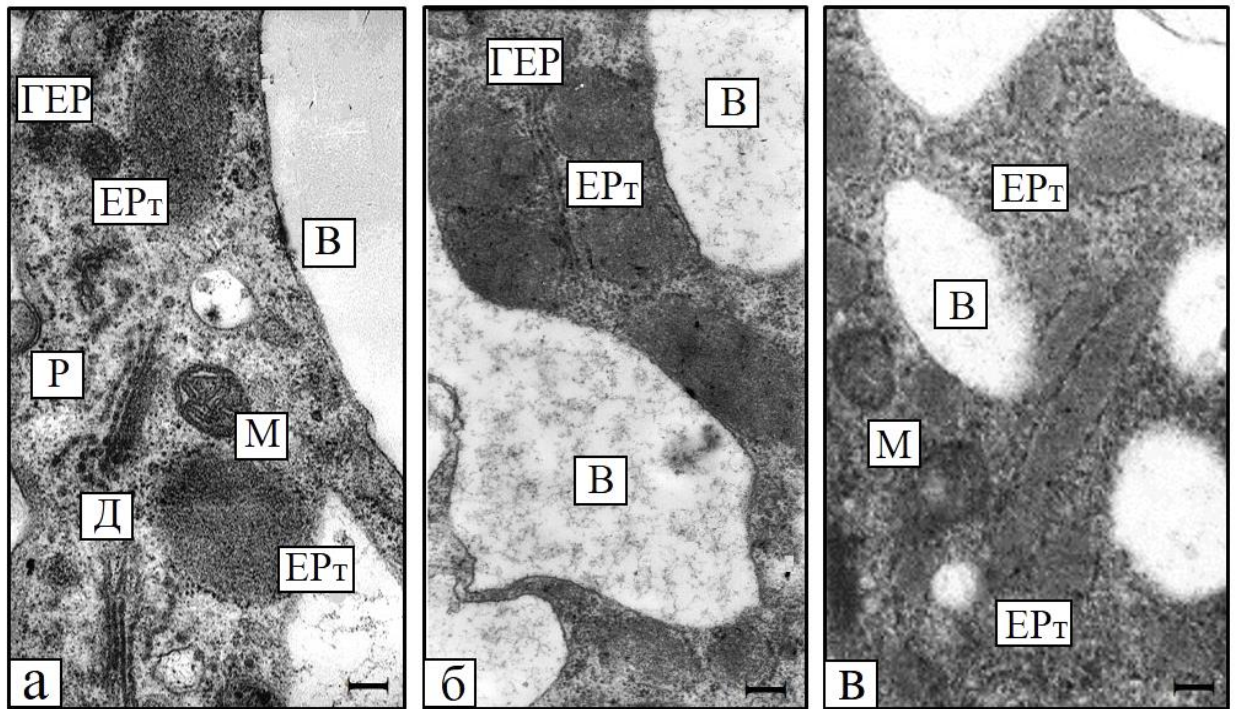


Рис. 5.12. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 13-добових проростків *A. thaliana* в контролі (а) та через 10 діб після X-опромінення дозами 0,5 Гр (б) і 8 Гр (в): В – вакуоль, М – мітохондрія, Д – диктіосома, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ЕР_т – ЕР-тільце, Р – рибосоми (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб – 1 мкм.

знижувалися, проте залишалися вищими за такі в неопромінених проростках у 1,5 рази (табл. 5.4).

В клітинах епідерми ДЗР коренів опромінених 3- та 13-добових проростків на зрізах ЕР-тільця значно варіювали за розмірами та формою, що особливо це було помітно у 13-добових проростків та залежало від дози радіації (рис. 5.13). При дозах 0,5 Гр – 4 Гр форма ЕР-тілець в цій зоні кореня була переважно округлою, рідше овальною, при дозах 6 Гр – 12 Гр – округлою, овальною та значно видовженою. В окремих ЕР-тільцях довжина перевищувала ширину у 6–10 разів і навіть більше.

Таблиця 5.4

**Параметри ЕР тілець на зріз клітини епідерми ДЗР кореня
проростків *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.

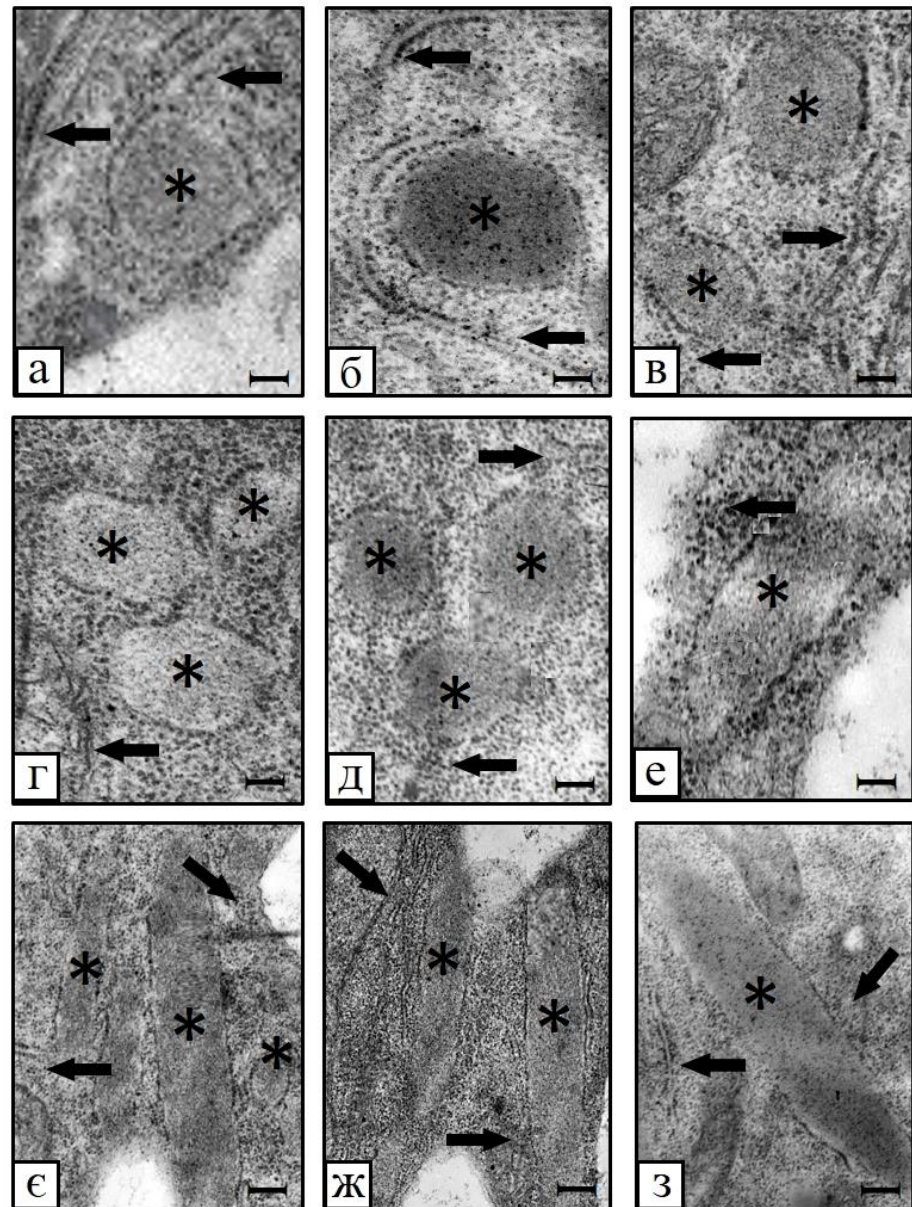


Рис. 5.13. Фрагменти клітин епідерми ДЗР коренів 13-добових проростків *A. thaliana* в контролі (а) та через 10 діб після X-опромінення: б-з – дози 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр і 12 Гр відповідно. Стрілками позначено гранулярний ендоплазматичний ретикулум, зірочками позначено ER-тільця (трансмісійна електронна мікроскопія). Масштаб: а-е – 200 нм, е-з – 500 нм.

Отже нами встановлено, що через 2 год і 10 діб при всіх застосованих дозах опромінення (0,5 Гр – 12 Гр) змін в диференціюванні статоцитів

кореневого чохла і рості клітин ДЗР власне кореня 3- та 13-добових проростків *A. thaliana* не відбувалося. Полярність статоцитів залишалася постійною протягом 13-ти діб росту проростків. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників при вивченні впливу іонізуючої радіації у відносно «малих» та сублетальних дозах на ультраструктуру клітин стебел та листків проростків і рослин *A. thaliana* [184, 293]. Водночас варто зазначити, що при дії радіації в дозах 50 Гр і 150 Гр змінювалася структура клітинної стінки та цитоплазматичних органел, зокрема хлоропластів, мітохондрій, ЕР [293] та цитоскелету [184].

Вперше встановлені нами зміни у розмірах і кількості ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла та клітинах ДЗР власне кореня при дії Х-опромінення виявили їхню чутливість до дії іонізуючої радіації. Суттєве збільшення середньої площі зрізу ЕР-тілець при дозах 0,5 Гр – 2 Гр, а також їх варіабельності за формою при збільшенні доз опромінення (6 Гр – 12 Гр) можливо розглядати як прояв адаптивної реакції клітин на вплив цього чинника, що забезпечує ріст проростків за таких умов.

Разом з отриманими нами даними щодо впливу клінонотатування, такі результати вказують на участь ЕР-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, ЕР-тілець також чутливі до механічного пошкодження епідерми листків розетки [52, 86], колонізації коренів ендofітними бактеріями і грибами [242, 289] та дії фітогормонів [108, 210, 221]. Отже, загалом такі відомості характеризують ЕР-тілець як систему відповіді на зовнішні чинники.

Отримані результати досліджень даного розділу наведені в таких публікаціях:

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.

2. Романчук С. Ультраструктура ЕР-тілець у статоцитах і клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. під дією Х-опромінення // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019. Вип. 1 (77). С. 61–67.

3. 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.

4. 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.

5. 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>.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. Романчук С.М. Вплив кліноостатування 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.

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

11. Романчук С.Н. Формирование ЭР-телец в *Arabidopsis thaliana* в стационарных условиях и при клиноостатировании // «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.

12. 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.

13. Романчук С.М. Ультраструктура ER-тілець в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. 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.

14. 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.

РОЗДІЛ 6

АКТИВНІСТЬ β -ГЛЮКОЗИДАЗИ

β -глюкозидаза РҮК10 є основним компонентом ЕР-тілець [49], а також у найбільшій кількості РҮК10 зосереджена у коренях *A. thaliana* та складає основну частку від всіх наявних β -глюкозидаз у цьому органі [221, 302], тому в наших експериментах визначали загальну активність ферменту.

6.1. Активність β -глюкозидази за умов кліноостатування

Для визначення загальної активності β -глюкозидази використовували 3-, 5- та 7-добові проростки *A. thaliana*, які зростали в умовах темряви, відразу після закінчення експериментів (після знімання проростків з кліноостату та в контролі). Матеріалом для проведення досліджень слугувала надосадова фракція, виділена з контрольних або кліноостатованих зразків, до якої додавали субстрат 4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозид. β -глюкозидазну активність визначали спектрофотометрично за кількістю 4-нітрофенолу, що утворився під час проходження реакції.

У 3-, 5- та 7-добових етіюльованих проростках з контролю загальна активність β -глюкозидази становила $0,39 \pm 0,021$ од. акт., $0,35 \pm 0,017$ од. акт. та $0,36 \pm 0,019$ од. акт. відповідно. У 3-, 5- та 7-добових кліноостатованих проростках β -глюкозидазна активність мала такі значення: $0,37 \pm 0,041$ од. акт., $0,32 \pm 0,036$ од. акт. та $0,31 \pm 0,037$ од. акт. відповідно.

Отже, нами встановлено, що за всіх строків кліноостатування етіюльованих проростків *A. thaliana* загальна активність β -глюкозидази суттєво не відрізнялась від контролю (рис. 6.1). В літературі відомості відносно змін активності ферментів у рослин, які зростали в умовах модельованої та реальної мікрогравітації неоднозначні, так як досліджували ферменти різних класів. Наведемо декілька прикладів. Збільшення

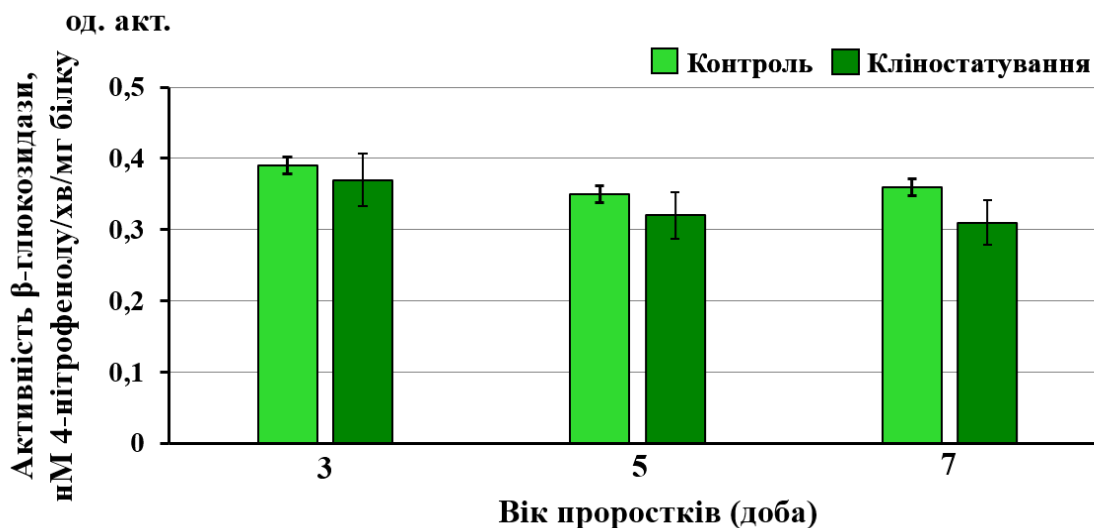


Рис. 6.1. Активність β -глюкозидази в етіюльованих проростках *A. thaliana* за умов кліностакування. од. акт. – одиниці активності.

активності алкогольдегідрогенази на 47 % і 475 % під дією мікрогравітації визначено в коренях 15- та 30-добових рослин *B. rapa* у порівнянні з контролем, який ріс в наземних умовах [117]. Під час тривалого кліностакування (до 30 діб) виявлено значне посилення активності фосфорилази в міні-бульбах *S. tuberosum* [46]. Відмічено зниження активності хлорофілази, дегідратази та δ -амінолевулінової кислоти у 7-добових кліностакованих проростків *H. vulgare* щодо контролю [10]. Визначено підвищення активності супероксиддисмутази в коренях, листках і хлоропластах *P. sativum* під час 7-добового кліностакування, тоді як під час 14-добового впливу цього чинника активність ферменту знижувалась, хоча залишалася вищою ніж у контролі [2]. На прикладі *Pohlia nutans* показано, що зміна активності ферментів, які беруть участь в антиоксидантному захисті залежить від тривалості кліностакування та має каскадний характер, так як протягом 7-ми діб росту активність таких ферментів як каталаза, гваякол-, аскорбат- і бензидин-пероксидаза то різко підвищувалася, то знижувалася, особливо в перші 2 доби росту. Варто відмітити, що на 7-му добу кліностакування активність аскорбат-пероксидази та каталази була

майже такою як у контролі [19].

6.2. Активність β -глюкозидази при дії X-опромінення

3- і 13-добові проростки *A. thaliana* зростали в умовах освітлення. Опромінювали 3-добові проростки. Для визначення загальної активності β -глюкозидази досліджували проростки з контролю, через 2 год (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після опромінення дозами 0,5 Гр – 12 Гр. Матеріал та субстрат були такі самі, як і в експериментах з кліноостатуванням (див. підрозд. 6.1).

Загальна активність β -глюкозидази в 3-добових проростках з контролю становила $0,42 \pm 0,023$ од. акт. Нами встановлено, що через 2 год після опромінення активність цього ферменту в проростках підвищувалась у різних величинах в залежності від дози. Ці зміни показані на рисунку 6.2.

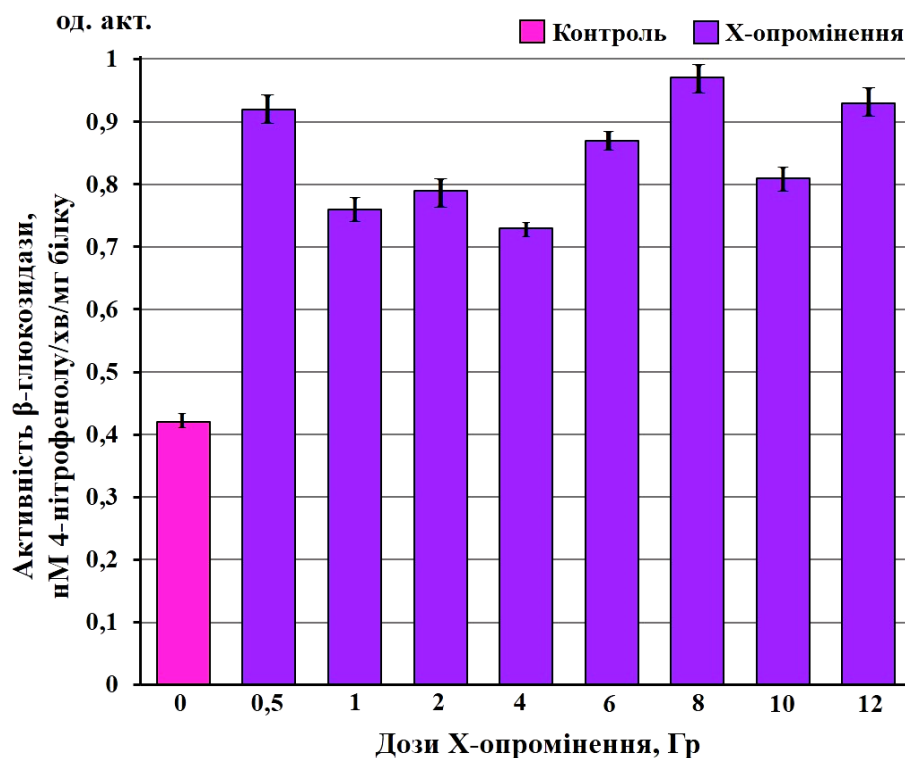


Рис. 6.2. Активність β -глюкозидази у 3-добових проростках *A. thaliana* через 2 год після X-опромінення в різних дозах. од. акт. – одиниці активності.

Найбільше посилення загальної активності β -глюкозидази в проростках визначено при дозах 0,5 Гр, 8 Гр та 12 Гр, яка мала такі значення: $0,92 \pm 0,059$ од. акт., $0,97 \pm 0,061$ од. акт. і $0,93 \pm 0,058$ од. акт. відповідно до вказаної дози. За цих доз активність ферменту була вищою щодо контрольних зразків в середньому у 2,3 рази. При дозах 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр і 10 Гр загальна активність β -глюкозидази в проростках дещо знижувалась, але звичайно залишалась вищою щодо контролю в середньому у 1,9 рази. При вказаних дозах радіації загальна активність ферменту була такою: $0,76 \pm 0,048$ од. акт., $0,79 \pm 0,060$ од. акт., $0,73 \pm 0,025$ од. акт., $0,87 \pm 0,035$ од. акт. та $0,81 \pm 0,052$ од. акт. відповідно.

У 13-добових проростках з контролю загальна активність β -глюкозидази становила $0,38 \pm 0,019$ од. акт. Через 10 діб після дії радіації також спостерігали посилення загальної активності цього ферменту в проростках у різних величинах в залежності від дози (рис. 6.3).

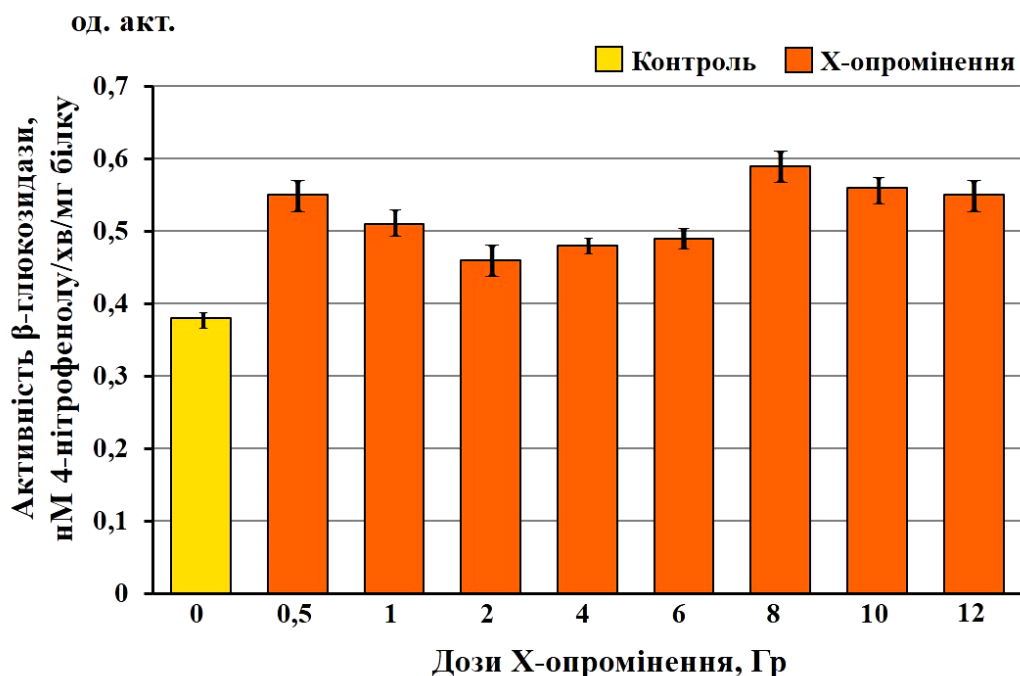


Рис. 6.3. Активність β -глюкозидази у 13-добових проростках *A. thaliana* через 10 діб після X-опромінення в різних дозах. од. акт. – одиниці активності.

Найвищі значення загальної активності β -глюкозидази в проростках визначено при дозах 0,5 Гр ($0,55 \pm 0,039$ од. акт.), 8 Гр ($0,59 \pm 0,041$ од. акт.), 10 Гр ($0,56 \pm 0,037$ од. акт.) та 12 Гр ($0,55 \pm 0,040$ од. акт.). При цих дозах загальна активність ферменту в проростках була вищою щодо контролю в середньому у 1,5 рази. При дозах 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр та 6 Гр загальна β -глюкозидазна активність дещо знижувалась та мала такі значення: $0,51 \pm 0,039$ од. акт., $0,46 \pm 0,035$ од. акт., $0,48 \pm 0,020$ од. акт. і $0,49 \pm 0,024$ од. акт. відповідно до вказаної дози. При цих дозах загальна активність β -глюкозидази була вищою щодо контрольних зразків в середньому у 1,2 рази.

Отже, одержані нами результати досліджень вказують на те, що через 2 год та 10 діб при всіх застосованих дозах радіації (0,5 Гр – 12 Гр) зміни загальної β -глюкозидазної активності в проростках мали схожий характер. Для повної оцінки впливу опромінення на загальну активність ферменту в проростках порівнювали його значення через 2 год та 10 діб після дії X-променів. З рисунку 6.4 видно, що загальна активність β -глюкозидази через 2 год після опромінення була вищою ніж через 10 діб після дії цього чинника. Поряд з цим найвище посилення загальної активності ферменту визначали за мінімальної дози радіації 0,5 Гр та починаючи від дози 8 Гр, як через 2 год, так і через 10 діб після опромінення.

Відомо, що рослинні клітини мають активну реакцію на дію іонізуючої радіації [64, 106], однією з яких є зміни активності ферментів, насамперед гідролітичних, до яких належить β -глюкозидаза. Наприклад, було встановлено залежність підвищення РНКазної активності від X-опромінення дозами 1 Гр, 3 Гр, 5 Гр та 15 Гр в листках *Linum usitatissimum* на послідовних стадіях їх онтогенезу та під час старіння [4] і вивчено динаміку посилення α -амілазної активності в сім'ядолях проростків *P. sativum* при дії γ -променів у дозах 2 Гр, 5 Гр, 10 Гр та 50 Гр [38]. Дані зазначених експериментів, так само як і результати наших досліджень,

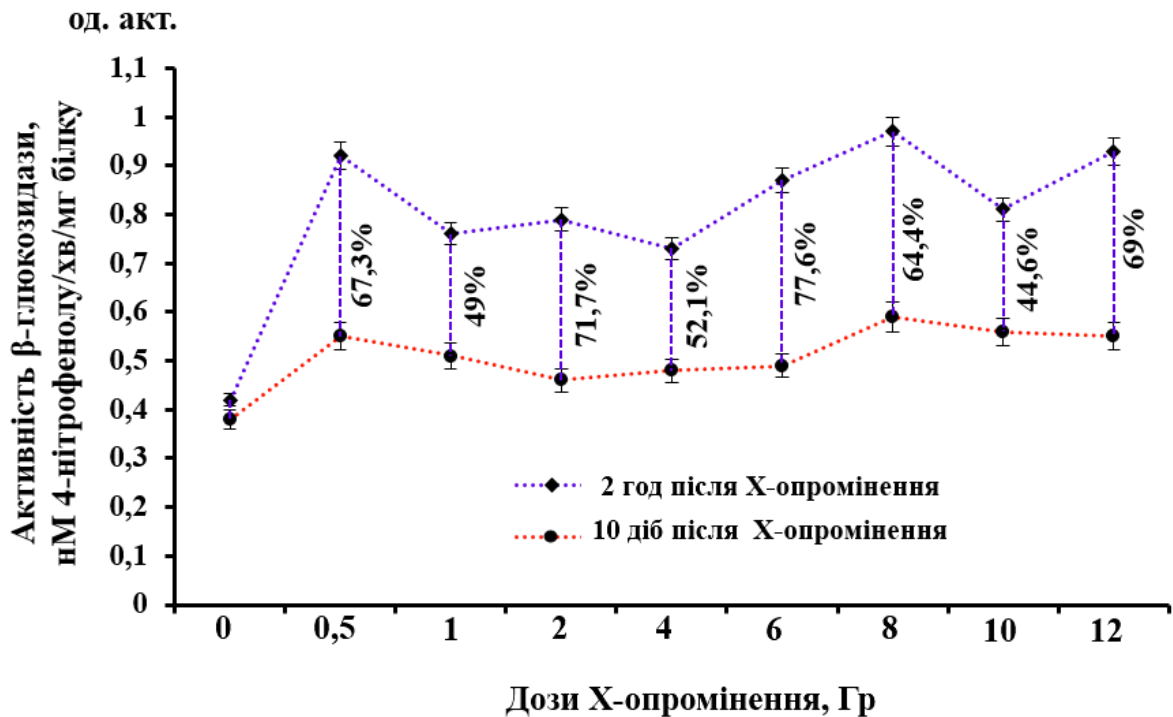


Рис. 6.4. Активність β-глюкозидази у проростках *A. thaliana* через 2 год та 10 днів після X-опромінення в різних дозах. од. акт. – одиниці активності. Різницю між активністю β-глюкозидази показано у відсотках.

показали, що по мірі збільшення доз радіації, зміни активності ферментів відбувалися нелінійно. Ми можемо припустити, що така реакція ензимів на дозу опромінення залежить від особливостей виду рослини та ступеня її стійкості до радіації.

В наших дослідженнях опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) викликало в проростках різке майже у 2 рази посилення загальної активності β-глюкозидази через 2 год і певне його послаблення через 10 днів. Схожу реакцію β-глюкозидази спостерігали й на інші зовнішні впливи. Наприклад, встановлено, що при нанесенні на листки проростків *P. sativum* епібрасинолідів та кінетину в умовах короткострокового дефіциту кисню β-глюкозидазна активність зростала майже у 3 рази впродовж від 5-ти до 10-ти днів, а через 10 днів стрімко знижувалась [15]. Такі дані можуть вказувати на те, що протягом 10-ти днів росту захисні реакції рослинних

клітин набувають адаптивного характеру, основна роль в яких надається β -глюкозидазі. Ми припускаємо, що β -глюкозидаза підсилює гідролітичні процеси, що спрямовані на відновлення клітини після дії іонізуючої радіації. Варто звернути увагу, що активність β -глюкозидази значно не відрізнялася при дії відносно «малих» та сублетальних доз радіації, що вказує на стійкість проростків *A. thaliana* до доз 0,5 Гр – 12 Гр, яка здійснюється за рахунок належного спрацювання захисних механізмів клітини.

Отримані результати досліджень даного розділу наведені в таких публікаціях:

1. 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.

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

3. 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.

4. 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.

5. Романчук С.Н., Кордюм Е.Л. Роль β -глюкозидазы в адаптации растений *Arabidopsis thaliana* Heunh. к условиям клиноостатирования // 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.

6. 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>.

7. 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.

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

9. 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.

РОЗДІЛ 7

ЕКСПЕРСІЯ ГЕНА β -ГЛЮКОЗИДАЗИ (*PYK10*)

Геном *A. thaliana* кодує 47 β -глюкозидаз [124], 4 ізоформи яких за даними літератури можуть бути присутні в складі ЕР-тілець в залежності від впливу зовнішніх факторів, а саме: BGLU18 [52, 86], BGLU21, BGLU22 та PYK10 [49, 55]. Основна β -глюкозидаза ЕР-тілець у *A. thaliana* кодується геном *PYK10* [242]. Оскільки він експресується як за нормальних умов росту проростків, так і при дії стресових чинників, для досліджень обрали саме цей ген.

7.1. Експресія гена *PYK10* за умов кліноостатування

Для визначення експресії гена *PYK10* використовували 3-, 5- та 7-добові проростки *A. thaliana*, які зростали в темряві, відразу після закінчення експериментів (після знімання проростків з кліноостату та в контролі). Матеріалом для проведення ЗТ-ПЛР-ампліфікації та у режимі реального часу слугувала фракція виділеної сумарної РНК з контрольних або кліноостатованих зразків, цілісність якої є ключовою умовою для точної інтерпретації одержаних даних [121]. Тому після кожного виділення РНК з проростків проводили електрофоретичне розділення тотальної РНК. Про загальну цілісність виділеної РНК у кожному зразку свідчили два треки, які відповідали 18S та 28S рибосомальним РНК та відсутність треків більшої молекулярної ваги, що підтверджувало відсутність залишків геномної ДНК у досліджуваних зразках тотальної РНК (рис. 7.1). Далі проводили спектрофотометричні дослідження зразків тотальної РНК. Відповідно до даних літератури допустимими значеннями для $A_{260}/280$ вважали показники 1,8–2,0 [121], для $A_{260}/230$ – 2,0–2,2 [216].

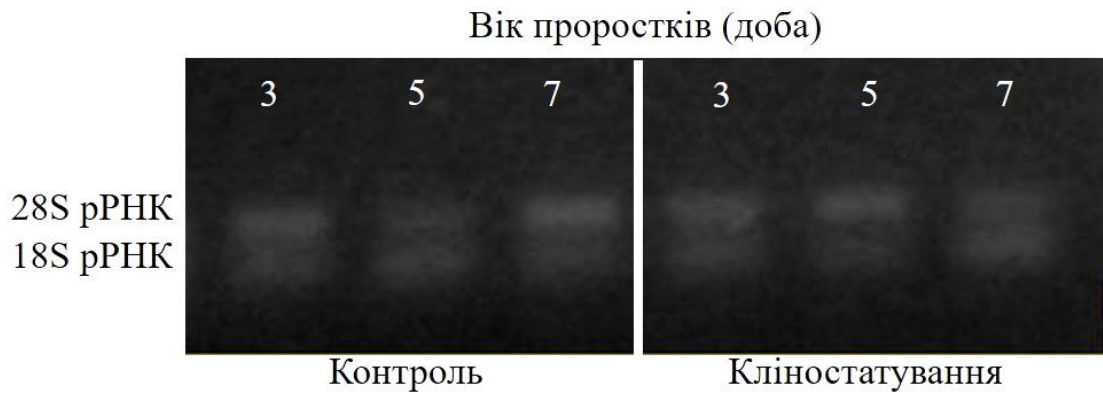


Рис. 7.1. Електрофореграма розділення тотальної РНК, виділеної з етіюльованих проростків *A. thaliana* за умов кліноостатування.

Для коректного та точного дослідження змін у рівні експресії гена *PYK10* перевіряли специфічність праймерів методом класичної ПЛР, отримані дані оцінювали електрофоретично за розміром продуктів (рис. 7.2).

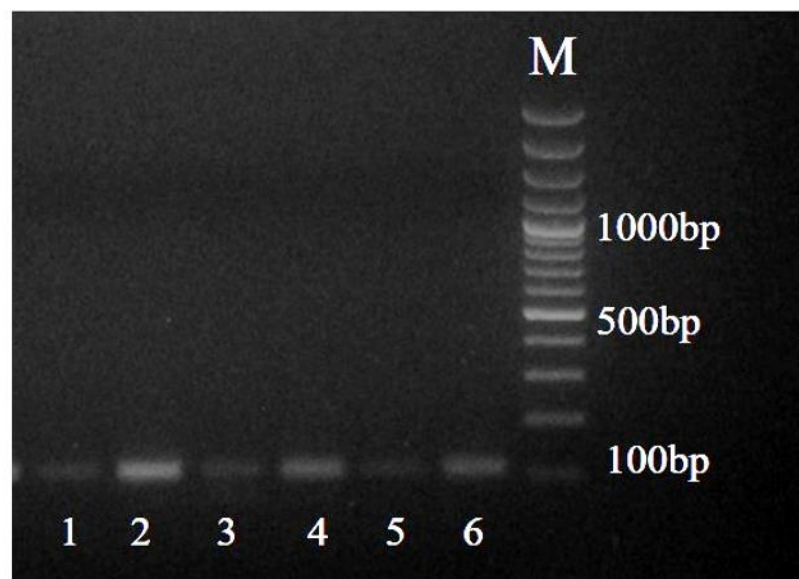


Рис. 7.2. Електрофореграма розділення продуктів ПЛР, отриманих з використанням специфічних праймерів до гена *PYK10* в проростках *A. thaliana* за умов кліноостатування. 1, 3, 5 – 3-, 5- та 7-добові проростки контролю відповідно; 2, 4, 6 – 3-, 5- та 7-добові кліноостатовані проростки відповідно. М – маркер молекулярної ваги, bp – пара нуклеотидів.

Як видно з рисунку 7.2, експресію гена *PYK10* детектували у всіх досліджуваних варіантах та відмічали її підвищення за всіх строків кліноостатування по відношенню до контролю. Найбільшу інтенсивність свічення продуктів ПЛР спостерігали у 3-добових кліноостатованих проростків, що свідчило про найвищий рівень експресії гена *PYK10*. Далі проводили ЗТ-ПЛР в режимі реального часу.

Отримані дані за результатами досліджень та розрахована відносна експресія гена *PYK10* в проростках з контролю та за умов кліноостатування наведені в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Результати досліджень експресії гена *PYK10* в етіюльованих проростках *A. thaliana* за умов кліноостатування

Вік проростків (доба)	Контроль				Кліноостатування			
	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
3	29,87	0,25	1,78	0,62	20,73	0,54	9,81	1,22
5	27,15	0,32	2,13	0,38	25,27	0,19	6,74	1,54
7	26,18	0,46	2,51	0,67	23,94	0,36	7,69	2,19

Примітка: C_t – середнє значення порогового циклу флуоресценції ($n = 9$), R – відносна експресія, s.d. – стандартне відхилення.

Наявність відповідної кДНК, а значить і експресію гена *PYK10* визначали в проростках з контролю та кліноостатованих зразках всіх строків росту. Найвище значення порогового циклу флуоресценції (C_t), а значить і найменшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у

зразках 3-добових проростків з контролю. Тому відповідні значення цих зразків використовували як референсні. Найнижче значення порогового циклу флуоресценції (C_t), а значить і найбільшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у 3-добових проростках, вирощених на кліностації.

На діаграмі (рис. 7.3) відображено відносну експресію гена *PYK10* в контрольних та кліностаатованих зразках. В проростках з контролю рівні

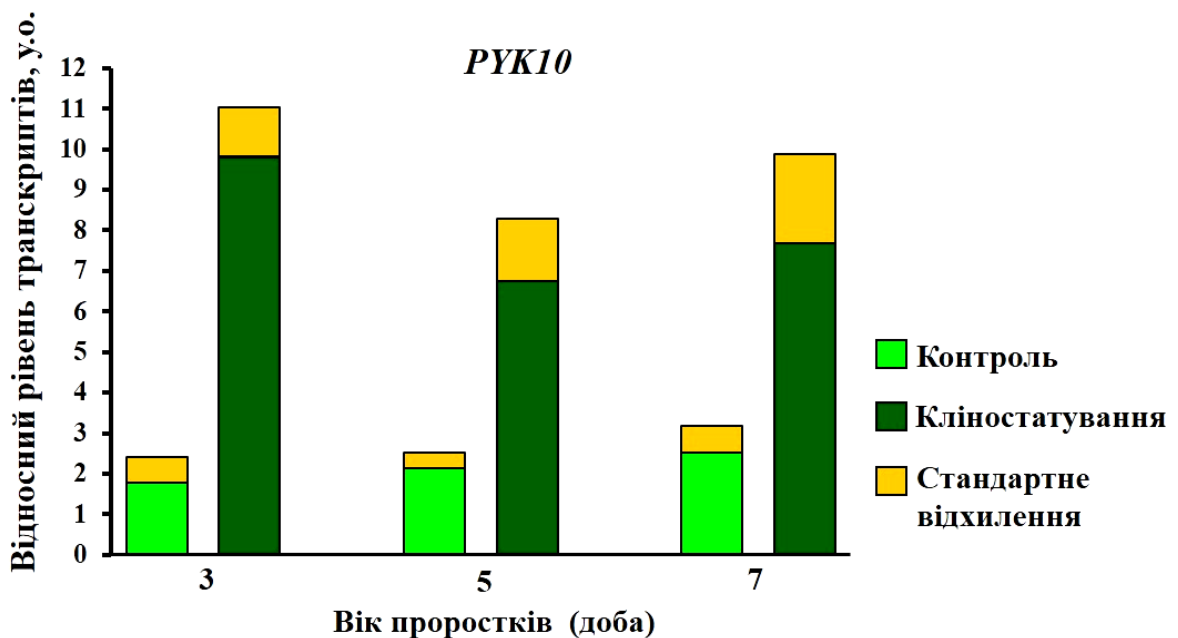


Рис. 7.3. Експресія гена *PYK10* в етіюльованих проростках *A. thaliana* за умов кліностакування. у.о. – умовні одиниці.

транскриптів суттєво не відрізнялись за всіх строків росту. За умов кліностакування суттєве посилення експресії гена *PYK10* щодо контролю спостерігали в кожному зразку. Максимальне збільшення вмісту транскриптів виявляли у 3-добових кліностаатованих проростках. В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою від контролю у 5,3 рази. З тривалістю кліностакування кількість транскриптів в проростках

знижувалася, що вказує на деяку адаптацію до дії цього чинника. Враховуючи значення похибок вміст транскриптів у 5- та 7-добових кліноостатованих проростках був подібним. В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою від контролю в середньому у 3,2 рази.

Отже, нами вперше досліджено експресію гена *PYK10*, який кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець, в 3-, 5- і 7-добових етіюльованих проростках *A. thaliana* та встановлено її посилення за всіх строків кліноостатування. Такі дані в повній мірі підтверджують відомості літератури відносно синтезу мРНК β -глюкозидази в проростках і рослинах *A. thaliana* при впливі абіотичних або біотичних факторів [52, 58, 84, 86, 108, 210, 221, 241, 242, 289]. Ми припускаємо, що підвищена експресія гена *PYK10* в проростках *A. thaliana* в умовах кліноостатування є ваговою складовою внутрішньоклітинної програми захисту цих рослин від впливу несприятливих чинників.

Отримані нами дані цілком відповідають наведеним вище змінам ультраструктури ЕР-тілець у відповідь на кліноостатування: збільшення кількості та середньої площі ЕР-тілець на зріз статоцита, що переходить до секреції, кореневого чохла та зріз клітини епідерми ДЗР власне кореня в середньому у 2 рази щодо контролю (див. підрозд. 5.1). Поряд з цим нами показано, що в умовах кліноостатування загальна активність β -глюкозидази суттєво не змінювалась щодо контролю (див. підрозд. 6.1). Така неоднакова відповідь на ультраструктурному та молекулярному рівнях може бути пов'язана з особливостями швидкого утворення ЕР-тілець у відповідь на дію стресового чинника [49, 52]. Вочевидь адаптивна відповідь ферменту не детермінувалась первинними змінами, які проявилися в збільшенні площі зрізу ЕР-тілець за умов кліноостатування. Тому отримані результати щодо експресії гена *PYK10* засвідчують, що

збільшення кількості та середньої площі зрізу ЕР-тілець відбувається саме за рахунок високої експресії гена *PYK10* та синтезу ферменту β -глюкозидази без підвищення його активності, оскільки вплив кліноостатування на ЕР-тілець не потребує адаптації на рівні функціонування ферменту.

7.2. Експресія гена *PYK10* при дії Х-опромінення

3- і 13-добові проростки *A. thaliana* зростали в умовах освітлення. Опроміненню піддавали 3-добові проростки. Для визначення експресії гена *PYK10* досліджували проростки з контролю, через 2 год (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після опромінення дозами 0,5 Гр – 12 Гр. Визначення цілісності фракції виділеної сумарної РНК, ЗТ-ПЛР та в режимі реального часу проводили так само, як і в експериментах з кліноостатуванням (див. підрозд. 7.1). Специфічні праймери до гена *PYK10* спрацьовували належним чином.

Результати досліджень та розрахована відносна експресія гена *PYK10* в 3-добових проростках з контролю та через 2 год після опромінення наведені в таблиці 7.2. Наявність відповідної кДНК, а значить і експресію гена *PYK10* визначали в контрольних зразках та проростках після дії радіації у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр). Найвище значення порогового циклу флуоресценції (C_t), а значить і найменшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у зразках з контролю. Тому як референсні використовували відповідні значення саме цих зразків. Найнижче значення порогового циклу флуоресценції (C_t), а значить і найбільшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у проростках опромінених дозами 0,5 Гр та 8 Гр.

Таблиця 7.2

Результати досліджень експресії гена *PYK10* у 3-добових проростках *A. thaliana* через 2 год після X-опромінення

Контроль				X-опромінення / доза							
				0,5 Гр				1 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
28,23	0,49	2,05	0,73	25,56	0,18	11,17	2,13	26,74	0,21	9,37	2,52
X-опромінення / доза											
2 Гр				4 Гр				6 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
26,15	0,16	9,62	1,15	27,05	0,39	8,97	1,67	26,93	0,25	9,18	1,75
X-опромінення / доза											
8 Гр				10 Гр				12 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
25,12	0,10	11,34	1,99	27,04	0,32	9,13	2,07	26,18	0,21	9,64	1,58

Примітка: C_t – середнє значення порогового циклу флуоресценції ($n = 9$), R – відносна експресія, s.d. – стандартне відхилення.

Відносну експресію гена *PYK10* в 3-добових проростках з контролю та через 2 год після опромінення відображено на діаграмі (рис. 7.4).

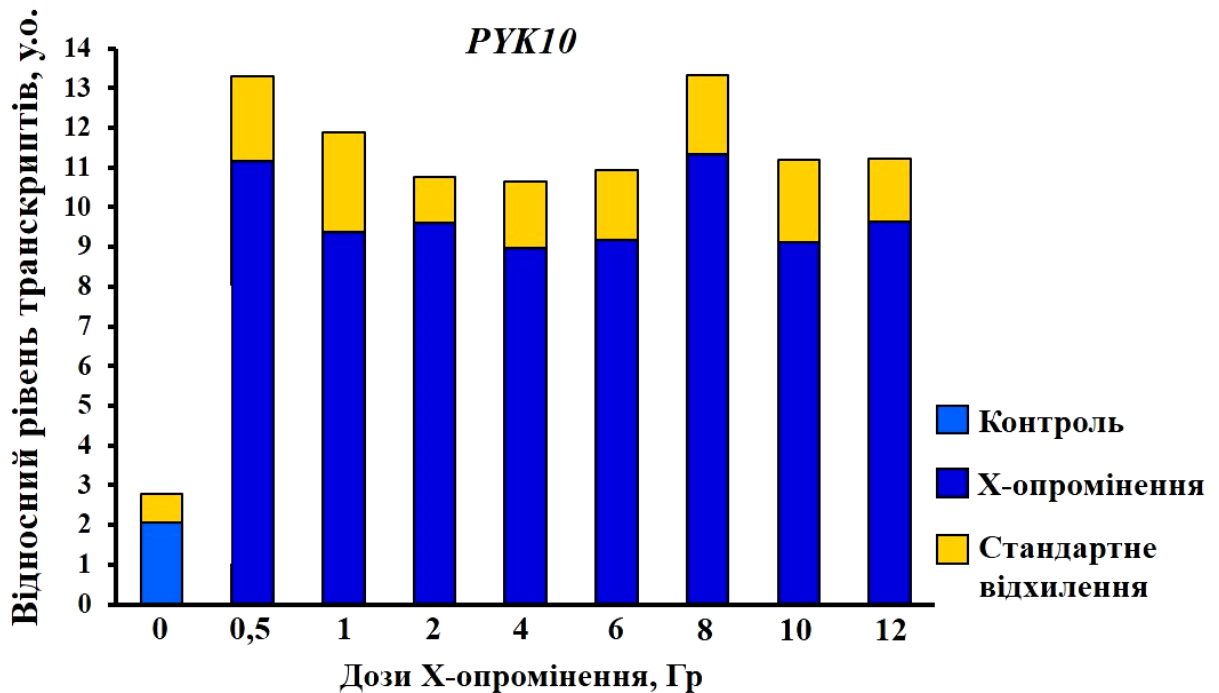


Рис. 7.4. Експресія гена *PYK10* у 3-добових проростках *A. thaliana* через 2 год після X-опромінення в різних дозах. у.о. – умовні одиниці.

Стрімке підвищення експресії гена *PYK10* в проростках через 2 год після дії радіації спостерігали за кожної застосованої дози (0,5 Гр – 12 Гр). Найбільший вміст транскриптів у проростках визначали при дозах 0,5 Гр та 8 Гр. В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою щодо контролю в середньому у 5,5 разів. При дозах 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 10 Гр та 12 Гр вміст транскриптів у проростках дещо знижувався. В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою щодо контролю в середньому у 4,5 разів.

Отримані результати та розрахована відносна експресія гена *PYK10* в 13-добових проростках з контролю та через 10 діб після опромінення наведені в таблиці 7.3. Наявність відповідної кДНК, а значить і експресію гена *PYK10* визначали в проростках з контролю та після дії радіації у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр). Найвище значення порогового циклу

Таблиця 7.3

Результати досліджень експресії гена *PYK10* у 13-добових проростках *A. thaliana* через 10 діб після X-опромінення

Контроль				X-опромінення / доза							
				0,5 Гр				1 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
24,99	0,42	1,00	1,00	21,45	0,61	6,58	0,55	23,73	0,44	4,48	0,90
X-опромінення / доза											
2 Гр				4 Гр				6 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
22,40	0,27	4,22	0,26	22,98	0,29	4,15	0,33	23,25	0,42	4,07	0,51
X-опромінення / доза											
8 Гр				10 Гр				12 Гр			
C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.	C_t	C_t s.d.	R	R s.d.
20,87	0,18	6,16	0,45	22,76	0,35	4,93	0,38	22,10	0,33	5,27	0,23

Примітка: C_t – середнє значення порогового циклу флуоресценції ($n = 9$), R – відносна експресія, s.d. – стандартне відхилення.

флуоресценції (C_t), а значить і найменшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у зразках з контролю. Тому відповідні значення цих зразків використовували як референсні. Найнижче значення порогового циклу флуоресценції (C_t), а значить і найбільшу кількість відповідних кДНК β -глюкозидази, спостерігали у проростках через 10 діб після опромінення дозами 0,5 Гр та 8 Гр.

На діаграмі (рис. 7.5) відображено відносну експресію гена *PYK10* в 13-добових проростках з контролю та через 10 діб після опромінення. Через

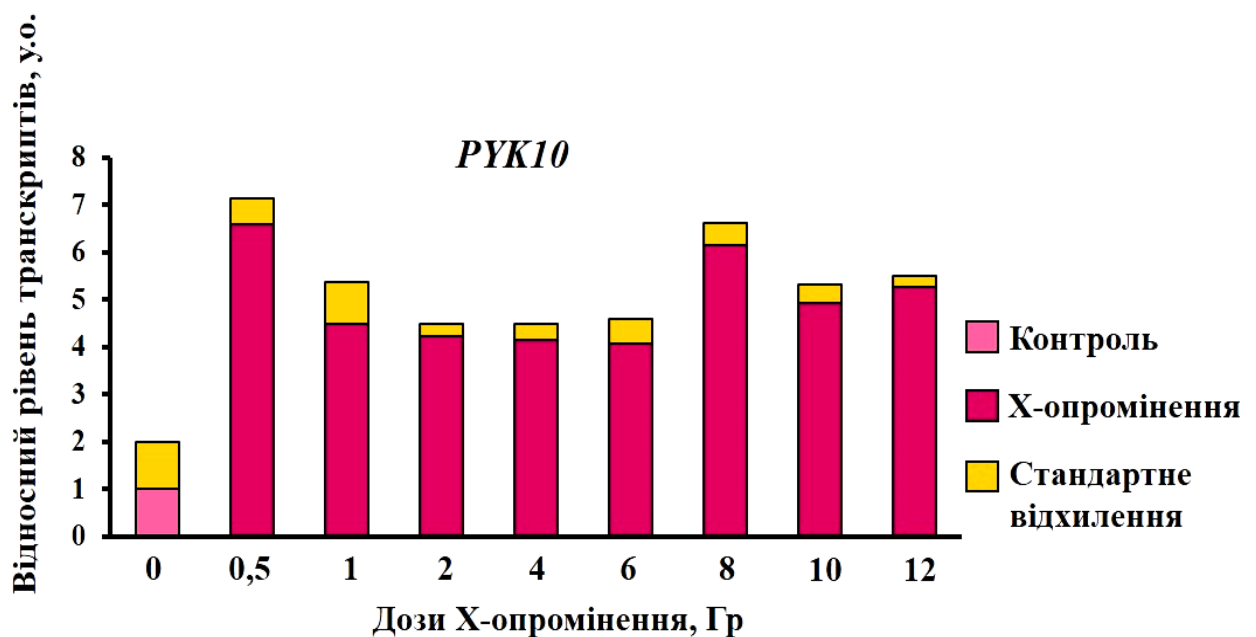


Рис. 7.5. Експресія гена *PYK10* у 13-добових проростках *A. thaliana* через 10 діб після X-опромінення в різних дозах. у.о. – умовні одиниці.

10 діб при всіх застосованих дозах радіації (0,5 Гр – 12 Гр) також спостерігали посилення експресії гена *PYK10*. Найбільший вміст транскриптів у проростках також визначали при дозах 0,5 Гр і 8 Гр. В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою щодо контролю в середньому у 6,6 та 6,2 рази відповідно до вказаної дози. При дозах 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 10 Гр та 12 Гр вміст транскриптів у проростках дещо знижувався.

В цих зразках експресія гена *PYK10* була вищою щодо контролю в середньому у 4,3 рази при дозах 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр та 6 Гр і у 5,1 рази при дозах 10 Гр та 12 Гр.

Для повної оцінки впливу X-опромінення на експресію гена *PYK10* у проростках порівнювали її значення через 2 год та 10 діб після дії радіації. З діаграми (рис. 7.6) видно, що через 2 год після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) відбувалося стрімке накопичення транскриптів у проростках, вміст яких через 10 діб після опромінення в цих дозах знижувався.

Отже, вперше встановлені зміни експресії гена *PYK10*, що кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець, у 3- і 13-добових проростках *A. thaliana* під впливом X-опромінення в дозах 0,5 Гр – 12 Гр цілком відповідають наведеним вище змінам активності відповідного ферменту (див. підрозд. 6.2). Найбільша стимуляція обох процесів відмічена за мінімальної дози радіації 0,5 Гр та дози 8 Гр. 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 [13]. Отримані нами дані вказують на те, що β -глюкозидаза також бере участь у цих процесах. Високий ступінь активації експресії гена *PYK10* дозою 8 Гр може свідчити про існування іншого дозового порогу, який викликає порушення ростових процесів, на що вказує поява певної асиметрії розетки при дозах 8 Гр і вище (див. підрозд. 4.2).

Таким чином, незважаючи на відсутність суттєвих відхилень у морфології та рості проростків, як через 2 год так і 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) (див. підрозд. 4.2 та 4.4), на молекулярному рівні відбувались зміни, які проявились в підвищенні загальної активності β -глюкозидази та експресії гена *PYK10*, що, на нашу думку, може бути молекулярним маркером впливу іонізуючої радіації.

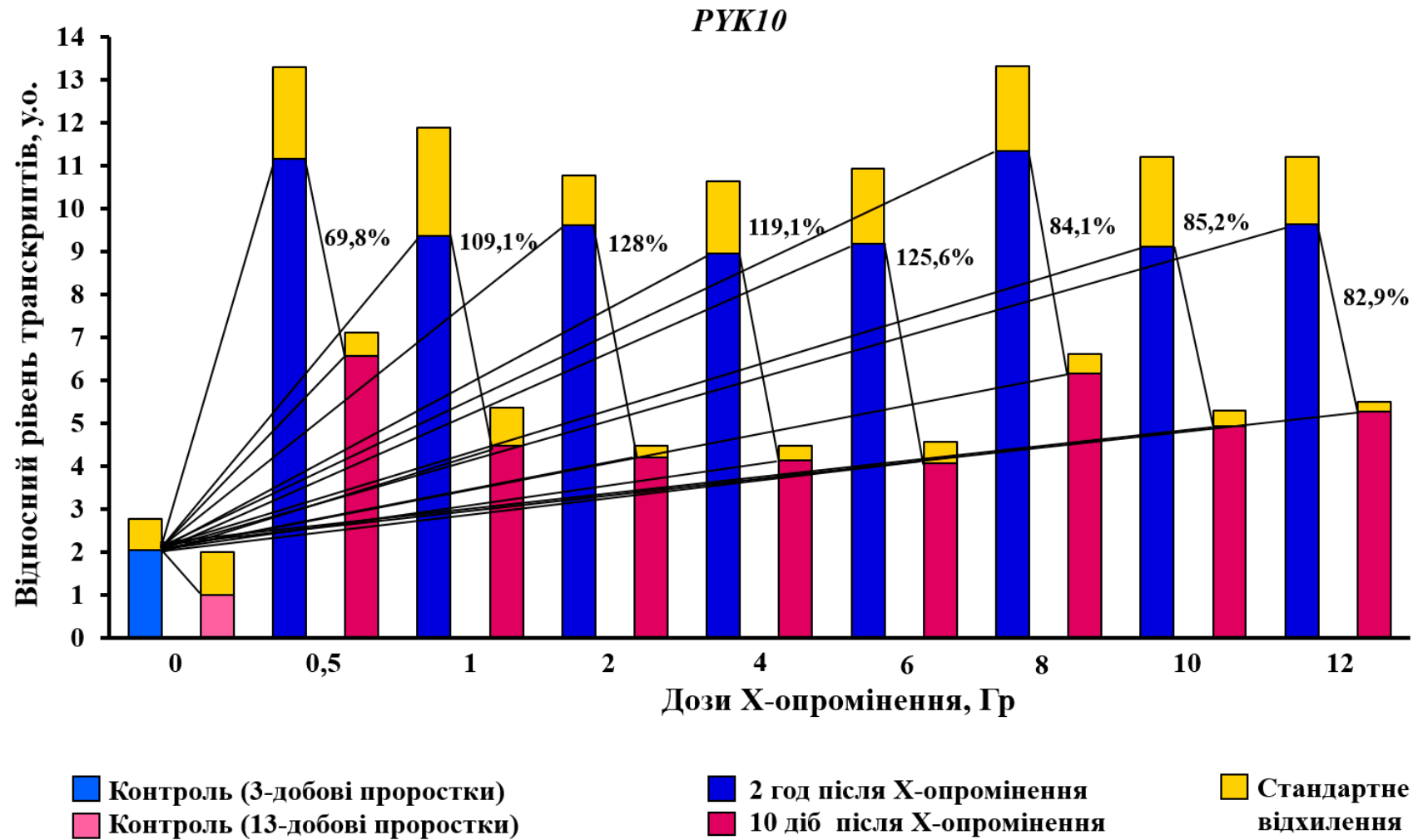


Рис. 7.6. Експресія гена *PYK10* в проростках *A. thaliana* через 2 год та 10 діб після X-опромінення в різних дозах. у.о. – умовні одиниці. Різницю у відносній експресії гена *PYK10* показано у відсотках.

Отримані результати досліджень даного розділу наведені в таких публікаціях:

1. Вплив X-опромінення на експресію гена β -глюкозидази *PYK10* в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. // Доповіді НАН України. 2019. № 5. С. 91–96.

2. Романчук С.М. Експресія гена β -глюкозидази *PYK10* у проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. за умов кліноостатування та за X-опромінення // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019. Т. 25. С. 166–171.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

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

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проведені комплексні дослідження, результати яких викладені в даній дисертаційній роботі, дозволили встановити лабільність і чутливість ЕР-тілець, похідних ГЕР, специфічним компонентом яких є фермент β -глюкозидаза, в клітинах кореня проростків *Arabidopsis thaliana* до впливу кліноостатування (модельованої мікрогравітації) 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.

Дослідження проводили в двох серіях експериментів: 1) вплив кліноостатування вивчали на 3-, 5- та 7-добових етіольованих проростках; 2) вплив Х-опромінення – проростках, які росли в умовах освітлення. Для опромінення використовували 3-добові проростки. Дослідження проводили через 2 год (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після опромінення. Вивчали клітини кореневого чохла, який містить гравірецепторні клітини центральної статенхіми, та клітини ДЗР власне кореня, найбільш чутливі до впливу зовнішніх чинників. А також визначали загальну активність β -глюкозидази проростків та експресію гена *PYK10*, що кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець.

ВПЛИВ КЛІНОСТАТУВАННЯ (МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ)

Результати досліджень показали, що загальні характеристики етіольованих проростків *A. thaliana* при кліноостатуванні та в контролі були подібні. Кліноостатовані проростки відрізнялись від контрольних проростків, які росли за стаціонарних умов, дезорієнтацією росту, що пов'язано з постійною зміною їхнього положення відносно вектора гравітації. Розміри та анатомічні ознаки апексів коренів після кліноостатування в основному

були такими як у контролі. Виявлені незначні відмінності у ширині клітин ДЗР в умовах кліноостатування суттєво не впливали на загальну будову коренів.

Диференціювання клітин центральної статенхіми кореневого чохла і ріст клітин ДЗР власне кореня відбувалися подібно до контролю, проте виявлено і певні відмінності ультраструктури цих клітин. За всіх строків кліноостатування в статоцитах кореневого чохла амілопласти-статоліти не осідали в дистальній частині клітини, а розміщувалися по всьому об'єму її цитоплазми. ЕР-тіляця в зрілих статоцитах, як і в контролі, були відсутні. При поступовому переході диференційованих статоцитів до секреції слизу спостерігали появу ЕР-тілець, середня кількість та середня площа зрізу яких в умовах кліноостатування збільшувалася щодо контролю у 1,5–2 рази. Появу ЕР-тілець відмічали у зоні профілів ГЕР, що вказує на те, що вони є похідними цієї структури. Це підтверджується наявністю рибосом на зовнішній поверхні мембрани ЕР-тілець. У власне секреторних клітинах кореневого чохла кількість ЕР-тілець була досить великою, як при кліноостатуванні, так і в контролі. У статоцитах, що перейшли до секреції, зміни структури ЕР-тілець супроводжувались посиленням вакуолізації та процесами лізису більшості цитоплазматичних органел клітини і клітинної стінки кореневого чохла.

В клітинах епідерми ДЗР кореня під впливом кліноостатування профілі ГЕР ставали дещо розширеними та значно розгалуженими, збільшувалися середня кількість та середня площа ЕР-тілець на зріз клітини в середньому у 2 рази. Виявлено гетерогенність клітинної популяції ЕР-тілець за формою та розмірами, яка посилювалася з тривалістю кліноостатування. Форма таких ЕР-тілець на зрізах була округлою, овальною та видовженою. В окремих ЕР-тіляцях довжина перевищувала ширину більше ніж у 10 разів. ЕР-тіляця переважно розміщуються біля клітинної стінки та тонопласту поряд з профілями ГЕР. Також виявлено деяку хвилястість поперечних клітинних

стінок ДЗР та посилення вакуолізації клітин цієї зони кореня.

Одержані нами результати щодо загальної активності β -глюкозидази в проростках показали, що кліноостатування суттєво не впливало на її зміни відносно контролю. У той же час встановлено, що реакція проростків на кліноостатування містила значне у понад 3–5 разів посилення експресії гена *PYK10*, що кодує основну β -глюкозидазу ER-тілець. Максимальне збільшення вмісту транскриптів виявляли на перших термінах кліноостатування.

За даними літератури реальна та модельована мікрогравітація у різних експериментах викликала як активацію, так і пригнічення росту рослин [135, 159, 301]. Відомо, що з усіх ростових зон кореня ДЗР є найбільш чутливою до зовнішніх стимулів, таких як механічний вплив, дія іонів металів, кисню і ауксину тощо [67, 119, 164, 226]. Виявлене нами незначне зменшення ширини клітин ДЗР кореня узгоджується з даними літератури: раніше повідомлялося про зменшення довжини ДЗР кореня *B. rapa* [17] та розмірів клітин ДЗР кореня *A. thaliana* у відповідь на кліноостатування [45, 258].

Описана нами ультраструктура клітин кореневого чохла та клітин ДЗР власне кореня етіюльованих проростків *A. thaliana* з контролю та кліноостатованих зразків відповідає даним літератури [9, 17, 18, 41, 176, 177, 198]. Розміщення амілопластів-статолітів по всьому об'єму статоцита узгоджується з раніше встановленими відомостями про те, що у разі постійної дезорієнтації проростків по відношенню до вектора гравітації гравірецепторний апарат формується, але залишається функціонально ненавантаженим [162, 176, 181, 281]. Наявність ER-тілець в клітинах епідерми ДЗР та їх відсутність в інших тканинах цієї ростової зони кореня описана й іншими дослідниками [9].

Вперше досить детально охарактеризовані нами зміни ультраструктури GER та ER-тілець у клітинах кореневого чохла та клітинах ДЗР кореня в умовах кліноостатування демонструють їх чутливість

до дії модельованої мікрогравітації. Посилення розгалуженості та деяке розширення профілів ГЕР в клітинах епідерми ДЗР кореня може свідчити про посилення функціональної активності цих органел. Збільшення майже в 2 рази середньої кількості та середньої площі ЕР-тілець на зрізі статоцита, що переходить до секреції, та клітини епідерми ДЗР, а також їх варіювання за розмірами і формою при дії кліноостатування можливо розглядати як прояв адаптивної реакції клітини до дії абіотичного чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах.

Сталість загальної активності β -глюкозидази в проростках під впливом кліноостатування, вочевидь можна пояснити, тим, що адаптивна відповідь ферменту не детермінувалася первинними змінами, які проявилися в збільшенні кількості та середньої площі ЕР-тілець на зрізі клітини за умов кліноостатування.

Вперше встановлене стрімке накопичення транскриптів *PYK10* у проростках за умов кліноостатування цілком узгоджується з наведеними вище змінами ультраструктури ЕР-тілець у відповідь на дію цього чинника. Такі зміни відбуваються саме за рахунок високої експресії гена *PYK10* та синтезу ферменту β -глюкозидази без збільшення його активності. Вочевидь вплив кліноостатування на ЕР-тілець не потребує адаптації на рівні функціонування ферменту. Проте дане питання потребує подальшого додаткового вивчення.

ВПЛИВ X-ОПРОМІНЕННЯ (ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ)

Результати досліджень показали, що як через 2 год, так і через 10 діб після X-опромінення у всіх застосованих дозах (0,5 Гр – 12 Гр) загальний стан проростків за візуальною оцінкою був подібний до контролю. Лише на 10-ту добу після опромінення дози від 8 Гр і вище викликали візуальні морфологічні ефекти, зокрема розетка набувала певної асиметрії.

Анатомічна структура кореня та розміри клітин досліджуваних зон у загальних рисах залишалися такими, як у контролі. Змін в диференціюванні статоцитів кореневого чохла і рості клітин ДЗР власне кореня також не виявляли. Полярність клітин центральної статенхіми кореневого чохла залишалася постійною протягом всіх строків росту проростків, тобто при дії радіації статоцити виконували свою гравірецепторну функцію. ЕР-тілець в них як в контролі, так і після опромінення були відсутні. Далі при переході диференційованих статоцитів до секреції спостерігали появу ЕР-тілець. На поверхні їхньої зовнішньої мембрани знаходились рибосоми, що знову підтверджувало походження ЕР-тілець від ГЕР. Як через 2 год, так і через 10 діб після опромінення у всіх застосованих дозах середня кількість ЕР-тілець на зрізі таких клітин щодо контролю зростала в середньому у 1,5–2 рази, а середня площа – у 2–2,5 рази. Звичайно в секреторних клітинах кореневого чохла ЕР-тілець у великій кількості були присутні як у контролі, так і після опромінення. У статоцитах, що перейшли до секреції також спостерігали процеси лізису та посилення вакуолізації клітин.

В клітинах епідерми ДЗР кореня після опромінення відбувалося деяке підвищення ступеня вакуолізації; профілі ГЕР ставали більш видовженими та розгалуженими; середня кількість та середня площа ЕР-тілець на зрізі клітини зростала порівняно з контролем у 2–3 рази через 2 год і в 1,5 рази через 10 діб після опромінення. ЕР-тілець значно варіювали за розмірами та формою, що особливо це було помітно через 10 діб після опромінення проростків та залежало від дози радіації. При дозах 0,5 Гр – 4 Гр форма ЕР-тілець в цій зоні кореня була переважно округлою, рідше овальною, при дозах 6 Гр – 12 Гр – округлою, овальною та значно видовженою. В окремих ЕР-тілецях довжина перевищувала ширину у 6–10 разів.

Вперше встановлено, що при всіх застосованих дозах радіації в проростках відбувалося різке майже у 2 рази посилення загальної активності β -глюкозидази через 2 год і певне його послаблення через 10 діб. При цьому

ступінь змін залежав від дози радіації. Також встановлено, що 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). Найвищу стимуляцію обох процесів визначали після опромінення мінімальною дозою 0,5 Гр та дозою 8 Гр.

Отримані нами дані щодо стану проростків після опромінення узгоджуються з даними літератури відносно реакцій *A. thaliana* на X-опромінення відносно низькими і сублетальними дозами [13, 27, 184, 223] та підтверджують їх стійкість до опромінення дозами 0,5 Гр – 12 Гр.

Вперше встановлені нами структурні зміни ГЕР та ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла і клітинах ДЗР кореня при дії X-опромінення виявили їхню чутливість до впливу іонізуючої радіації. Посилення розгалуженості та видовження профілів ГЕР в клітинах епідерми ДЗР може свідчити про посилення функціональної активності цих органел. Суттєве збільшення середньої кількості та середньої площі зрізу ЕР-тілець при дозах 0,5 Гр – 2 Гр, а також їх варіабельності за формою і розмірами при збільшенні доз опромінення (6 Гр – 12 Гр) можливо розглядати як прояв адаптивної реакції клітин на вплив цього чинника, що забезпечує ріст проростків за таких умов.

Вперше встановлені зміни експресії гена *PYK10* під впливом X-опромінення цілком відповідають наведеним вище змінам активності відповідного ферменту. Таким чином, підвищена експресія гена *PYK10* призводить до посилення синтезу β -глюкозидази, що на структурному рівні підтверджується збільшенням розмірів і кількості ЕР-тілець та їх середньої площі на зріз клітини. Посилення активності β -глюкозидази тільки у опромінених проростків вказує на специфічність їхньої реакції на дію X-променів, а саме підвищення метаболізму, особливо в перші години після опромінення, що має призвести до метаболічної адаптації.

Отримані результати досліджень узагальнено на схемі (рис.).

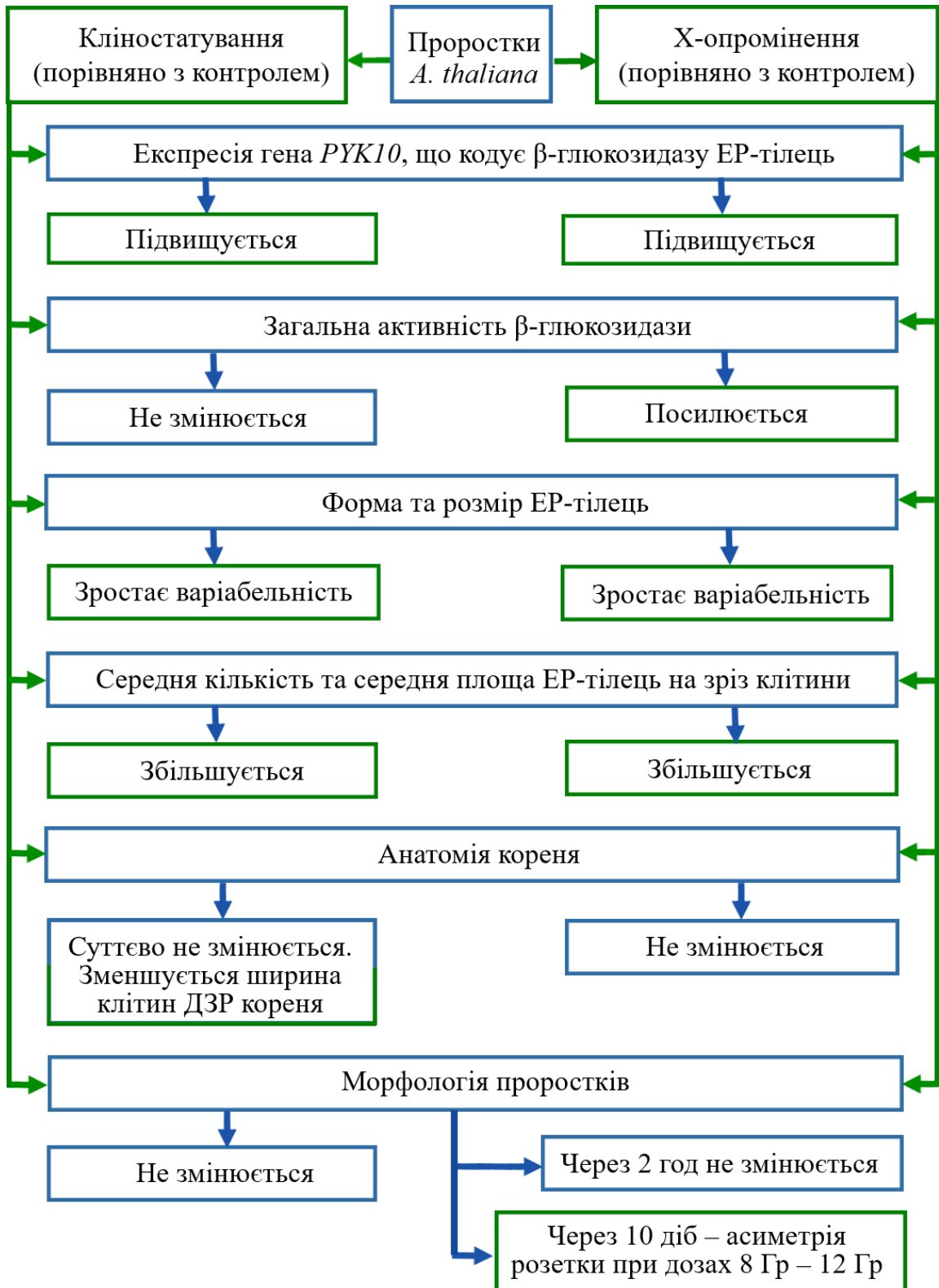


Рис. Схема впливу кліноостатування та Х-опромінення на EP-тіляця в проростках *A. thaliana* на структурному і молекулярному рівнях.

Отже, одержані дані доводять участь ЕР-тілець, унікального компартменту клітин видів родини Капустяні (*Brassicaceae*), у відповідях на дію кліноостатування та Х-опромінення і 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 та молекулярному рівнях до факторів космічного польоту, що несуть найбільші ризики для біологічних об'єктів – мікрогравітації та іонізуючої радіації, зокрема овочевих культур родини *Brassicaceae*, які, в першу чергу, слід перевіряти на відповідність до вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення космонавтів у тривалих місіях в далекому космосі.

Оскільки вважається, що ЕР функціонує як сенсор сигналів навколишнього середовища, а сигнал ЕР-стресу ініціює систему внутрішньоклітинних реакцій [153, 196], посилена експресія гена *РУК10* 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 [89, 268, 294].

З джерел літератури відомо, що космічна радіація впливає на експресію генів та структуру геному в цілому через пошкодження ДНК та появу мутацій [225], проте такі ефекти не мають суттєвої згубної дії на ріст та виживання рослин [169]. Доказом цього є те, що в умовах космічного польоту одержано кілька поколінь рослин різних видів [104, 265].

Окрім чутливості ЕР-тілець клітин кореня проростків *A. thaliana* до модельованої мікрогравітації [251–254] та іонізуючої радіації [36, 251, 252], численні результати інших дослідників показали, що ЕР-тілець в клітинах

рослин цього виду також чутливі до механічного пошкодження епідерми листків розетки [52, 86], колонізації коренів ендofітними бактеріями і грибами [242, 289] та дії фітогормонів [108, 210, 221].

Дані щодо посилення експресії гена *PYK10* під впливом кліноостатування та X-опромінення [34, 35] в повній мірі підтверджують відомості літератури відносно синтезу мРНК β -глюкозидази в рослинах *A. thaliana* при впливі абіотичних факторів [58, 84, 241]. X-опромінення викликало посилення як експресії гена *PYK10*, так і загальної активності β -глюкозидази [33], на відміну від кліноостатування, 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 *PYK10* і активація ферменту, на нашу думку, може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації.

Посилення загальної активності β -глюкозидази під впливом X-опромінення [33] може свідчити 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 і посухи [16, 76, 112, 129].

Варто звернути увагу, що найбільша стимуляція загальної активності β -глюкозидази та експресії гена *PYK10* відмічена за мінімальної дози радіації 0,5 Гр та дози 8 Гр. 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 [13]. Отримані нами дані вказують на те, що β -глюкозидаза також бере участь у цих процесах. Проте високий ступінь активації експресії гена *PYK10* 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.

Обговорюючи функціональне значення показаних нами змін, можна відмітити наступне. Нами встановлено, що ЕР-тілець були відсутні в зрілих статоцитах кореневого чохла проростків *A. thaliana*, проте починали утворюватися при переході цих клітин до секреції слизу і ставали численними у власне секреторних клітинах. На нашу думку, утворення ЕР-тілець в цьому випадку може бути пов'язано з процесами лізису клітинної стінки, а також цитоплазматичних органел клітини, зокрема диктіосом та крохмальних зерен в амілопластах.

Інше важливе спостереження стосується того, що активне утворення ЕР-тілець за впливу кліностакування та Х-опромінення відбувалось одночасно з посиленням вакуолізації клітин. Можна припустити, що обидва процеси можуть бути пов'язані між собою. Згідно з даними літератури, збільшення об'єму вакуоль у клітинах в умовах мікрогравітації може вказувати на інтенсифікацію процесів автофагії, що веде до прискорення диференціювання та старіння клітин [17, 80, 211]. Також є припущення, що збільшення ступеня вакуолізації клітин пов'язано із змінами синтетичної активності клітин та підвищенням гідролазної функції ферментів [32], до яких, до речі, належить β -глюкозидаза. Однак, варто зазначити, що посилення вакуолізації клітин кореня за умов мікрогравітації описано і для видів рослин інших родин, тоді як утворення ЕР-тілець притаманне лише родині Brassicaceae.

Крім того, в клітинах епідерми ДЗР кореня активація утворення ЕР-тілець при кліноставанні супроводжувалась виникненням певної хвилястості клітинних стінок. Відомо, що клітинна оболонка рослин є антигравітаційною структурою та забезпечує механічну міцність, гнучкість і еластичність клітин у відповідь на впливи модельованої та реальної мікрогравітації, шляхом зміни кількості своїх компонентів [29, 261]. Показано, що потоншення клітинних стінок за умов реальної мікрогравітації

та кліностагування відбувається за рахунок зменшення в них вмісту целюлози [187], лігніну [92], геміцелюлози та пектину [134] порівняно із контролем. Зокрема тенденцію до потоншення клітинних стінок і хвилястість поперечних клітинних стінок відзначали в протодермі та епідермі ДЗР коренів кліностагованих проростків *A. thaliana* [9]. Проте, молекулярні механізми таких змін з'ясовані частково [29]. Відомо, що β -глюкозидаза бере участь у розщепленні β -глюкозидних зв'язків полісахаридів, у першу чергу целюлози [256], лігніфікації вторинних клітинних стінок [151] та у реакціях зворотного гідролізу і транс-глюкозилування, які використовуються для синтезу полісахаридів [94]. Це забезпечує нормальний ріст рослинних клітин [47, 257]. Отже, виявлене нами розміщення ЕР-тілець переважно біля клітинної стінки за всіх досліджених умов може свідчити про локалізацію β -глюкозидази саме в тих ділянках, де необхідна її участь.

Варто відмітити здатність β -глюкозидази протидіяти впливу патогенів різної природи [70, 239, 241, 242, 289], адже потоншені клітинні оболонки рослин в умовах мікрогравітації стають більш вразливими до вторгнення можливих патогенів [187]. Це також необхідно враховувати при створенні космічних оранжерей у біорегеративних системах життєзабезпечення космонавтів під час космічних польотів, оскільки представники родини Brassicaceae можуть бути важливою харчовою ланкою для членів екіпажу. Показано, що утворення ЕР-тілець та посилення активності β -глюкозидази можна стимулювати додаванням певних фітогормонів [52, 85, 250], і таким чином впливати на підвищення міцності клітинної стінки при дії несприятливих чинників та патогенів [160, 282]. Проте можливий зв'язок зазначених процесів в реакції клітин на модельовану мікрогравітацію та іонізуючу радіацію з функціонуванням ЕР-тілець потребує подальших досліджень.

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 кліноостатування, 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-тільця 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 *РУК10*, який кодує фермент ЕР-тілець, протягом росту проростка за нормальних умов суттєво не змінюються.

2. Кліноостатування 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-тільця утворюються при переході статоцитів до секреції, проте удвічі більшої кількості.

3. В клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня за умов кліноостатування профілі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму стають більш розгалуженими; кількість та середня площа ЕР-тілець на зріз

клітини збільшуються удвічі; за формою і розмірами ЕР-тілець стають більш гетерогенними, що посилюється з віком проростків.

4. За умов кліноостатування 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. X-Опромінення, не порушуючи диференціювання клітин кореневого чохла і виконання статочитами гравірецепторної функції (збереження полярності статочитів), викликає посилення формування ЕР-тілець при переході статочитів 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 X-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 неопромінених 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 ЕР-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 ЕР-тілець та активація експресії гена відповідної β -глюкозидази

за впливу як кліноостатування, так і X-опромінення вказує на їх участь у захисній реакції клітин на зовнішні чинники різної природи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Артеменко О.А. Мітотична активність клітин кореневої меристеми паростків гороху в умовах кліноостатування // Вісн. Львів. ун-ту. Серія Біологія. 2002. Вип. 28. С. 80–83.

2. Бараненко В.В. Пероксидне окиснення ліпідів та активність супероксиддисмутази в рослинах гороху за умов кліноостатування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : [спец.] 03.00.11 «Цитологія, клітинна біологія, гістологія» / Ін-т клітин. біології та генет. інженерії НАН України. Київ, 2003. 24 с.

3. Бармичева Е.М., Гриф В.Г., Таирбеков М.Г. Рост и структура клеток кончика корня кукурузы в условиях космического полета // Цитология. 1989. Т. 41, № 11. С. 1324–1328.

4. Берестяна А.М., Гродзинський Д.М. Зміни рибонуклеазної активності опромінених УФ-В та рентгенівською радіацією сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* у процесі старіння // Доповіді НАН України. 2014. № 12. С. 142–151.

5. Биологические исследования на боиспутниках «Космос» / М.Г. Таирбеков, Г.П. Парфенов, Р.Н. Платонова, В.П. Жваликовская. Москва : Наука, 1979. 160 с.

6. Білявська Н.О. Роль іонів кальцію в механізмі гравірецепції у рослин та в ефектах мікрогравітації на клітинному рівні : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра. біол. наук : [спец.] 03.00.22 «Клітинна біологія» / Ін-т клітин. біології та генет. інженерії НАН України. Київ, 1998. 32 с.

7. Бриков В.О. Біоенергетика рослинних клітин в умовах гравітації // Косм. наука і технол. 2015. Т. 21, № 4. С. 84–93.

8. Булавин И.В. Ориентация цитоскелета в клетках эпидермы корней, образованных *de novo* на листовых эксплантах в условиях

клиностатирования // Цитология и генетика. 2016. Т. 50, № 2. С. 58–64.

9. Булавін І.В. Особливості морфогенезу коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. в культурі *in vitro* в умовах клінонстатування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : [спец.] 03.00.11 «Цитологія, клітинна біологія, гістологія» / ДУ «Ін-т харчової біотехнології та геноміки НАН України». Київ, 2017. 20 с.

10. Вплив клінонстатування на активність ферментів метаболізму тетрапірольних сполук проростків *Hordeum vulgare* L. / Р.М. Фомішина, О.О. Сиваш, Т.О. Захарова, О.К. Золотарьова // Укр. ботан. журн. 2010. Т. 67, № 2. С. 289–295.

11. Газенко О.Г. Результаты исследований на биоспутниках : научное издание. Москва : Наука, 1992. 430 с.

12. Дальнейшее изучение влияния условий космического полета на хромосомы первичных корешков зародышей в семенах гороха и пшеницы / В.В. Хвостова, М.А. Гостимский, В.С. Можаяева [и др.]. // Косм. Исслед. 1963. Т. 1, № 1. С. 186–188.

13. Данильченко О.О. Радіоадаптивна відповідь, індукована ультрафіолетовим випроміненням, у рослин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : [спец.] 03.00.01 «Радіобіологія» / Київський національний ун-т ім. Тараса Шевченка. Київ, 2005. 24 с.

14. Дослідження впливу модельованої мікрогравітації на біліпідний шар цитоплазматичної мембрани рослинних клітин / Є.Л. Кордюм, О.М. Недуха, В.П. Грахов [та ін.] // Косм. наука технол. 2015. Т. 21, № 3. С. 40–47.

15. Еремина Н.А. Влияние гипоксии и повышенных концентраций диоксида углерода на внутриклеточную компартментацию свободных аминокислот и активность β -глюкозидазы растений : дис. на соискание ученой. степ. канд. биол. наук : [спец.] 03.00.12 «Физиология растений» / Воронежский государственный пед. ун-т. Воронеж, 2007. 281 с.

16. Ершова А.Н., Баркалова О.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO_2 -среды // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9, вып. 5. С. 714–721.

17. Калініна Я.М. Ріст та диференціація клітин кореня *Brassica rapa* в умовах мікрогравітації та кліноостатування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : [спец.] 03.00.11 «Цитологія, клітинна біологія, гістологія» / Ін-т клітин. біології та генет. інженерії НАН України. Київ, 2007а. 19 с.

18. Калініна Я.М. Ультраструктура кортикальних клітин різних ростових зон кореня *Brassica rapa* за умов кліноостатування // Вісн. Львівськ. ун-ту: Серія Біологія. 2007б. Вип. 43. С. 221–227.

19. Кияк Н.Я., Хоркавців Я.Д. Оцінка окиснювального стресу моху *Pohlia nutans* (hedw.) lindb. залежно від впливу гравітації // Косм. наука технол. 2016. Т. 22, № 4. С. 58–66.

20. Кордюм Є.Л. Біологія рослин в космосі: наукові результати та проблеми // Косм. наука технол. 2013. Т. 19, № 4. С. 65–77.

21. Кордюм Е.Л., Мартын Г.И., Овчаренко Ю.В. Рост и дифференцировка клеток колумеллы корневого чехлика и собственно корня в стационарных условиях и при клиноостатировании // Цитология и генетика. 2008. Т. 42, № 1. С. 3–12.

22. Кордюм Е.Л., Чепмен Д.К. Растения и микрогравитация: некоторые аспекты влияния микрогравитации на клеточном и молекулярном уровнях // Цитология и генетика. 2017. Т. 51, 2. С. 47–58.

23. Кузин А.М. Проблема малых доз и идеи гормезиса в радиобиологии // Радиобиология. 1991. Т. 31, вып. 1. С. 16–21.

24. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующих излучений на биологические процессы : научное издание. Москва, 1977. 275 с.

25. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и

проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений // Ядерна фізика та енергетика. 2014. Т. 15, № 4. С. 406–414.

26. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Изменение параметров морфогенеза *Arabidopsis thaliana* L. при хроническом облучении семян и проростков малыми дозами редкоионизирующей радиации // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Т. 18. С. 51–55.

27. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana* Atmsh2 SALK_002708 у діапазоні сублетальних доз опромінення рідкоіонізуючою радіацією // Ядерна фізика та енергетика. 2018. Т. 19, № 2. С. 145–149.

28. Метаболическая активность митохондрий корней гороха в условиях моделированной микрогравитации / В.А. Брыков, И.П. Генерозова, А.Г. Шугаев, Е.Л. Кордюм // Доповіді НАН України. 2011. № 9. С. 142–146.

29. Недуха О.М. Клітинна оболонка рослин і фактори середовища : монографія. Київ : Альтерпрес. 2015. 289 с.

30. Попова А.Ф., Масгрейв М., Куанг А. Развитие зародышей растений *Brassica rapa* в условиях микрогравитации // Цитология и генетика. 2009. Т. 43, № 2. С. 21–26.

31. Радіаційний гормезис – ретроспектива і сучасність / Д.М. Гродзинський, Ю.В. Шиліна, О.М. Міхеєв, М.І. Гуца // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. 2005. Вип. 3, ч. 2. С. 17–30.

32. Растительная клетка при изменении геофизических факторов : монография / К.М. Сытник, Е.Л. Кордюм, Е.М. Недуха [и др.]. Киев : Наук. думка, 1984. 164 с.

33. Романчук С.М. Активність β -глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн при дії іонізуючого випромінювання // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2017. Вип. 29 (2). С. 103–108.

34. Романчук С.М. Вплив X-опромінення на експресію гена β -глюкозидази *PYK10* в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Доповіді НАН України. 2019а. № 5. С. 91–96.

35. Романчук С.М. Експресія гена β -глюкозидази *PYK10* у проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. за умов кліноостатування та за X-опромінення // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019б. Т. 25. С. 166–171.

36. Романчук С. Ультраструктура ЕР-тілець у статоцитах і клітинах дистальної зони розтягу корневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. під дією X-опромінення // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2019в. Вип. 1 (77). С. 61–67.

37. Сидоров В.Н., Соколов Н.Н. Влияние условий космического полета на семена *Allium fistulosum* и *Nigella damascene* // Пробл. Косм. Биол. 1962. № 1. С. 248–251.

38. Системність механізмів радіогермесисних ефектів у рослин / О.М. Міхєєв, Л.Г. Овсяннікова, Л.В. Войтенко [та ін.] // Доповіді НАН України. 2016. № 4. С. 106–110.

39. Структурная архитектура апикальной меристемы корня в связи с количественной оценкой степени ее радиационного поражения / Е.А. Кравец, В.В. Бережная, В.И. Сакада [и др.] // Цитология и генетика. 2012. Т. 46, № 2. С. 12–23.

40. Структурно-функціональні зміни клітин мезофілу 12-добових кліноостатованих проростків гороху / Н.І. Адамчук, Р.М. Фомішина, О.К. Михайленко, О.К. Золотарьова // Косм. наука технол. 2001. Т. 7, № 1. С. 170–172.

41. Тарасенко В.А. Ультраструктура клеток колумеллы в корневом чехлике арабидопсиса в условиях клиноостатирования и микрогравитации : автореф. дис. на соискание ученой. степ. канд. биол. наук : [спец.] 03.00.17 «Цитология» / Ин-т цитологии АН СССР. Ленинград, 1985. 35 с.

42. Формирование радиобиологической реакции растений : научное издание / под общей ред. Д.М. Гродзинського / Д.М. Гродзинский, К.Д. Коломиец, И.Н. Гудков [и др.]. Киев : Наук. думка. 1984. 216 с.

43. Чутливість ліпідних рафтів рослинних клітин до впливу модульованої мікрогравітації (кліноостатування) / Є.Л. Кордюм, О.М. Клименко, І.В. Булавін [та ін.] // Косм. наука технол. 2018. Т. 24, № 4. – С. 48–58.

44. Шалумович В.П. Среда для заключения флуорохромированных гистологических срезов //Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1959. 36Б, № 2. С. 79.

45. Шевченко Г.В., Кордюм Е.Л. Использование трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*-GFP-ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации // Косм. наука і технол. 2012. Т. 18, № 6. С. 51–56.

46. Шнюкова Є.І., Недуха О.М. Вплив імітованої мікрогравітації на формування запасних полісахаридів міні-бульб картоплі // Косм. наука і технол. 2004. Т. 10, № 5–6. С. 229–232.

47. A combined biochemical screen and TILLING approach identifies mutations in *Sorghum bicolor* L. Moench resulting in acyanogenic forage production / C.K. Blomstedt, R.M. Gleadow, N. O'Donnell [et al.] // Plant Biotechnol. J. 2012. Vol. 10, № 1. P. 54–66.

48. A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment / M. Schmid, D. Simpson, F. Kalousek, C. Gietl // Planta. 1998. Vol. 206, № 3. P. 466–475.

49. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis* / R. Matsushima, M. Kondo, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // Plant J. 2003a. Vol. 33, № 3. P. 493–502.

50. A novel phototropic response to red light is revealed in microgravity / K.D.L. Millar, P. Kumar, M.J. Correll [et al.] // *New Phytol.* 2010. Vol. 186. P. 648–656.

51. A proteinase storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis* / Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2001. Vol. 42. P. 894–899.

52. An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis* / R. Matsushima, Y. Hayashi, M. Kondo [et al.] // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 130. P. 1807–1814.

53. Analysis of cytogenetic damage in rice seeds induced by energetic heavy ions on-ground and after spaceflight / L.J. Wei, Q. Yang, H.M. Xia [et al.] // *J. Radiat. Res.* 2006. Vol. 47, № 3–4. P. 273–278.

54. Andersson M.X., Goksor M., Sandelius A.S. Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 1170–1174.

55. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana* / A.J. Nagano, Y. Fukao, M. Fujiwara [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2008. Vol. 49. P. 969–980.

56. Application of diamagnetic levitation technology in biological science research / A.R. Qian, D.C. Yin, P.F. Yang [et al.] // *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 2013. Vol. 23. P. 1–5.

57. *Arabidopsis* gene expression patterns are altered during Spaceflight / A.L. Paul, M.P. Popp, W.B. Gurley [et al.] // *Adv. Space Res.* 2005. Vol. 36, № 7. P. 1175–1181.

58. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, in sensitive to methyl jasmonate, and resistant to bacterial pathogen / B.J.F. Feys, C.E. Benedetti, C.N. Penfold, J.G. Turner // *Plant Cell.* 1994. Vol. 6. P. 751–759.

59. Arena C., De Micco V., Maio A. Growth alteration and leaf

biochemical responses in *Phaseolus vulgaris* exposed to different doses of ionising radiation // Plant biology. 2014. Vol. 16, № 1. P. 194–202.

60. Audhya A., Desai A., Oegema K.A. Role for *Rab5* in structuring the endoplasmic reticulum // J. Cell Biol. 2007. Vol. 178. P. 43–56.

61. Baran E., Warry F. Simple data analysis forbiologists. Phnom Penh : World Fish Center and the Fisheries Administration. 2008. 67 pp.

62. Behnke H.-D., Eschlbeck G. Dilated cisternae in Capparales – an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum // Protoplasma. 1978. Vol. 97. P. 351–363.

63. Belyavskaya N.A. Calcium and gravitropism in plants: Inhibitor analysis // Int. Rev. Cytol. 1996. Vol. 168. P. 123–185.

64. Bhowmik S. Effect of radiation and vacuum // Handbook of adhesion technology. 2011. P. 823–844.

65. Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase / R. Leah, J. Kigel, I. Svendsen, J. Mundy // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 15789–15797.

66. Biological damage induced by ionizing cosmic rays in dry *Arabidopsis* seeds / A.R. Kranz, U. Bork, H. Bucker, G. Reitz // Int. J. Rad. Appl. Instrum. D. 1990. Vol. 17, № 2. P. 155–65.

67. Blancaflor E.B. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants // J. Plant Growth Regul. 2002. Vol. 21. P. 120–136.

68. Block M.A., Jouhet J. Lipid trafficking at endoplasmic reticulum-chloroplast membrane contact sites // Curr. Opin. Cell Biol. 2015. Vol. 35. P. 21–29.

69. Bobkov S. Obtaining callus and regenerated plants in anther cultures of pea // Czech J. Genet. Plant Breed. 2014. Vol. 50. P. 123–129.

70. Bones A.M., Rossiter J.T. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry // Physiol. Plant. 1996. Vol. 97. P. 194–208.

71. Bonnett H.T.J., Newcomb E.H. Polyribosomes and cisternal

accumulations in root cells of radish // *J. Cell Biol.* 1965. Vol. 27, № 2. P. 423–432.

72. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analyt. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

73. Brandizzi F. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in plants: Where are we now? // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. Vol. 809. P. 94–105.

74. Brinckmann E. ESA hardware for plant research on the international space station // *Adv. Space Res.* 2005. Vol. 36. P. 1162–1166.

75. Buvat R. Electron microscopy of plant protoplasm // *Int. Rev. Cytol.* 1963. Vol. 14. P. 41–155.

76. Carrao-Panizzi M.C., Bordignon J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in *Soybean Cultivars* affected by the environment // *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia.* 2000. Vol. 35, № 5. P. 873–878.

77. Cell growth and organ differentiation in cultured tobacco cells under spaceflight condition / F. Sato, S. Takeda, H. Matsushima, Y. Yamada // *Biol. Sci. Space.* 1999. Vol. 13. P. 18–24.

78. Cell wall-associated isoflavonoids and β -glucosidase activity in *Lupinus albus* plants responding to environmental stimuli / M. Pislewska, P. Bednarek, M. Stobiecki [et al.] // *Plant Cell Environ.* 2002. Vol. 25. P. 29–40.

79. Changes in *Arabidopsis* leaf ultrastructure, chlorophyll and carbohydrate content during spaceflight depend on ventilation / M.E. Musgrave, A. Kuang, C.S. Brown, S.W. Mathews // *Ann. Bot.* 1998. Vol. 81, № 4. P. 503–512.

80. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity / D.O. Klymchuk, E.L. Kordyum, T.V. Vorobyova [et al.] // *Adv. Space Res.* 2003. Vol. 31, № 10. P. 2283–2288.

81. Characterization of organelles in the vacuolar-storing pathway by

visualization with GFP in Tobacco BY-2 cells / N. Mitsuhashi, T. Shimada, S. Mano [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2000. Vol. 41, № 9. P. 993–1001.

82. Cheng T.S., Chandless J.M. The structural, biochemical, and genetic characterization of a new radiation-induced variegated leaf mutant of soybean *Glycine* // *Proc. Nat. Sci. Council, Republic of China. Part B.* 1999. Vol. 23, № 1. P. 27–37.

83. Claassen D.E., Spooner D.S. Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.* 1994. Vol. 156. P. 301–373.

84. *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility / D.-X. Xie, B.F. Feys, S. James [et al.] // *Science.* 1998. Vol. 280. P. 1091–1094.

85. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis* / I.A.M.A. Penninckx, B.P.H.J. Thomma, A. Buchala [et al.] // *Plant Cell.* 1998. Vol. 10. P. 2103–2113.

86. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases / K. Ogasawara, K. Yamada, J.T. Christeller [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2009. Vol. 50, № 3. P. 480–488.

87. Control of the pattern-recognition receptor EFR by an ER protein complex in plant immunity / V. Nekrasov, J. Li, M. Batoux [et al.] // *EMBO J.* 2009. Vol. 28. P. 3428–3438.

88. Cook M.E., Croxdale J.G. Ultrastructure of potato tubers formed in microgravity under controlled environmental conditions // *J. Exp. Botany.* 2003. Vol. 54, № 390. P. 2157–2164.

89. Correll M.J., Pyle T.P., Millar K.D.L. Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes // *Planta.* 2013. Vol. 238. P. 519–533.

90. Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants / T. Hoson, S. Matsumoto, K. Soga, K. Wakabayashi // *Plant Signal. Behav.* 2010.

Vol. 5. P. 752–754.

91. Cosmic ionizing radiation effects in plant seeds after short and long duration exposure flights / K.E. Gartenbach, M. Pickert, M.W. Zimmermann, A.R. Kranz // *Adv. Space. Res.* 1994. Vol. 14, № 10. P. 105–108.

92. Cowles J., LeMay R., Jahns G. Seedling growth and development on space shuttle // *Adv. Space Res.* 1994. Vol. 14, № 11. P. 3–12.

93. Craig S., Staehelin L.A. High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems // *Eur. J. Cell Biol.* 1988. Vol. 46, № 1. P. 81–93.

94. Crout D.H., Vic G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998. Vol. 2, № 1. P. 98–111.

95. Denecke J., De Rycke R., Botterman J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope // *EMBO J.* 1992. Vol. 11. P. 2345–2355.

96. Deoli N., Hasenstein K.H. Radiation effects on *Brassica* seeds and seedlings // 41st COSPAR Scientific Assembly : Abstracts (Istanbul, Turkish, 30 Jul. – 7 Aug. 2016). Istanbul, 2016. URL: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2016cosp...41E.445D>.

97. Development of plant protoplasts during the IML-1 mission / O. Rasmussen, R.L. Bondar, C. Baggerud, T.H. Iversen // *Adv. Space Research.* 1994. Vol. 14. P. 189–196.

98. Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein / R.W. Ridge, Y. Uozumi, J. Plazinski [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40. P. 1253–1261.

99. Differential protein expression profiling of *Arabidopsis thaliana* callus under microgravity on board the Chinese SZ-8 spacecraft / Y. Zhang, L. Wang, J. Xie, H. Zheng // *Planta.* 2015. Vol. 241, № 2. P. 475–488.

100. Dishlers V.Y., Rashals I.D. The influence of gamma or neutron radiation on the changes of plant productivity in populations of *Arabidopsis thaliana* in eight generations // *Arabidopsis Inf. Service*. 1977. Vol. 14. P. 58–61.

101. Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells? / I. Hara-Nishimura, R. Matsushima, T. Shimada, M. Nishimura // *Plant Physiol*. 2004. Vol. 136, № 3. P. 3435–3439.

102. Doucet-Chabeaud G., Godon C., Brutesco C. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in *Arabidopsis* // *Mol. Genet. Genom*. 2001. Vol. 265, № 6. P. 954–963.

103. Drysdale A.E., Ewert M.K., Hanford A.J. Life support approaches for Mars missions // *Adv. Space Res*. 2003. Vol. 31, № 1. P. 51–61.

104. Effects of gravity on plant growth / G.E. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sytchev, I.G. Podolsky // *J. Gravit. Physiol*. 2000. Vol. 7. P. 5–8.

105. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants / V. De Micco, C. Arena, D. Pignalosa, M. Durante // *Radiat. Envir. Biophysics*. 2011. Vol. 50, № 1. P. 1–19.

106. Effect of the spaceflight radiation factor on the growth of *Brassica pekinensis* and micromycetes *Fusarium oxysporum* / S.O. Smolianina, V.V. Tsetlin, I.V. Korsak [et al.] // *Radiats. Biol. Radioecol*. 2006. Vol. 46, № 1. P. 37–44.

107. Elemental composition and energy spectra of galactic cosmic rays during solar cycle 23 / K.A. George, M.E. Lave, W.R. Wiedenbeck [et al.] // *Astroph. J*. 2009. Vol. 2. P. 1666–1681.

108. Endoplasmic reticulum body-related gene expression in different root zones of *Arabidopsis* isolated by laser-assisted microdissection / M. Gotte, M. Benard, M.-C. Kiefer-Meyer [et al.] // *The Plant Genome*. 2016. Vol. 9, № 2. P. 1–13.

109. ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and

association with innate immunity / R.T. Nakano, K. Yamada, P. Bednarek [et al.] // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5, № 73. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00073/full>.

110. ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP / C. Hawes, C. Saint-Jore, B. Martin, H.-Q. Zheng // *Trends Plant Sci.* 2001. Vol. 6, № 6. P. 245–246.

111. ER network homeostasis is critical for plant endosome streaming and endocytosis / G. Stefano, L. Renna, Y. Lai [et al.] // *Cell Discovery.* 2015. Vol. 1. URL: <https://www.nature.com/articles/celldisc201533>.

112. Esen A., Blanchard D.J. A specific β -glucosidase-aggregating factor is responsible for the β -glucosidase null phenotype in *Maize* // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 122. P. 563–572.

113. Esen A. β -Glucosidases // *Handbook of food enzymology* / J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong [eds.]. Marcel Dekker Inc. : New York, 2003. P. 791–804.

114. Esen A. β -glucosidases: overview // *β -Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology* / A. Esen [eds.]. Washington, DC : American Chemical Society, 1993. P. 1–14.

115. Esnault M.-A., Legue F., Chenal C. Ionizing radiation: Advances in plant response // *Envir. Exp. Botany.* 2010. Vol. 68, № 3. P. 231–237.

116. Evidence for the involvement of the *Arabidopsis* SEC24A in male transmission / R. Conger, Y. Chen, S. Fornaciari [et al.] // *J. Exp. Bot.* 2011. Vol. 62, № 14. P. 4917–4926.

117. Evidence of root zone hypoxia in *Brassica rapa* L. grown in microgravity / S.C. Stout, D.M. Porterfield, L.G. Briarty [et al.] // *Int. J. Plant. Sci.* 2001. Vol. 162, № 2. P. 249–255.

118. Exploration of plant growth and development using the European Modular Cultivation System facility on the International Space Station / A.-I. Kittang, T.-H. Iversen, K.R. Fossum [et al.] // *Plant Biol.* 2014. Vol. 16,

№ 3. P. 528–538.

119. Fasano J.M., Massa G.D., Gilroy S. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch // *J. Plant Growth Regul.* 2002. Vol. 21, № 2. P. 71–88.

120. Fernandez D.E., Staehelin L.A. Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells? // *Plant Physiol.* 1987. Vol. 85. P. 487–496.

121. Fleige S., Prafl M.V. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance // *Molecular Aspects of Medicine.* 2006. Vol. 27. P. 126–139.

122. Friedberg W., Copeland K. Ionizing radiation in earth's atmosphere and in space near earth. Final report DOT/FAA/AM-11/9. Office of Aerospace Medicine Washington, 2011. URL: https://www.faa.gov/data_research/research/med_humanfacs/oamtechreports/2010s/media/201109.pdf.

123. Friedman J.R., Webster B.M., Mastronarde D.N. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules // *J. Cell Biol.* 2010. Vol. 190. P. 363–375.

124. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1 / Z. Xu, L. Escamilla-Trevino, L. Zeng [et al.] // *Plant Mol. Biol.* 2004. Vol. 55. P. 343–367.

125. Gailhofer M., Thaler I., Rucker W. Dilated ER in callus cells and in cells from *Armoracia* plants cultivated *in vitro* // *Protoplasma.* 1979. Vol. 98. P. 263–274.

126. Gall M.I., Torrent M., Ludevid D. Two structural domains mediate two sequential events in [gamma]-zein targeting: protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation // *Plant Cell.* 1994. Vol. 6. P. 1911–1922.

127. β -Glucosidase activity is involved in scent production in *Narcissus* flowers / M. Reuveni, Z. Sagi, D. Eynor, A. Hetzroni // *Plant Sci.* 1999. Vol. 147. P. 19–24.

128. β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase

activities of rice BGlu1 / R. Opassiri, Y. Hua, O. Wara-Aswapati [et al.] // *Biochem. J.* 2004. Vol. 379. P. 125–131.

129. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense / A.V. Morant, K. Jorgensen, C. Jorgensen [et al.] // *Phytochemistry*. 2008. Vol. 69. P. 1795–1813.

130. Golgi traffic and integrity depend on N-myristoyl transferase-1 in *Arabidopsis* / L. Renna, G. Stefano, W. Majeran [et al.] // *Plant Cell*. 2013. Vol. 25. P. 1756–1773.

131. Grabski S., De Anita A.W., Schindler M. Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells // *Plant Cell*. 1993. Vol. 6. P. 23–38.

132. Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa* / M.E. Musgrave, A. Kuang, Y. Xiao [et al.] // *Planta*. 2000. Vol. 210. P. 400–406.

133. Greenwood J.S., Chrispeels M.J. Immunocytochemical localization of phaseolin and phytohemagglutinin in the endoplasmic reticulum and Golgi complex of developing bean cotyledons // *Planta*. 1985. Vol. 164, № 3. P. 295–302.

134. Growth and cell wall changes in rice roots during spaceflight / T. Hoson, K. Soga, K. Wakabayashi [et al.] // *Plant Soil*. 2003. Vol. 255. P. 19–26.

135. Growth and development in higher plants under simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat / T. Shimazu, T. Yuda, K. Miyamoto [et al.] // *Adv. Space Res.* 2001. Vol. 27, № 5. P. 995–1000.

136. Growth and lignification in seedlings exposed to eight days of microgravity / J.R. Cowles, H.W. Scheld, R. Lemay, C. Petersen // *Ann. Bot.* 1984. Vol. 54. P. 33–48.

137. Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space / B.C. Tripathy, C.S. Brown, H.G. Levine, A.D. Krikorian // *Plant Physiol.* 1996. Vol. 110. P. 801–806.

138. Growth, development, anatomy and morphological structure of *Arabidopsis thaliana* Heynh. under spaceflight conditions. / A.J. Merkys, R.S. Laurinavicius, A.V. Jarosius [et al.] // Institute of Botany, Academy of Science of the Lithuanian SSR, Vilnius, 1987. P. 105–116.

139. Gudkov I.N., Grodzinsky D.M. Cell radiosensitivity variation in synchronously-dividing root meristems of *Pisum sativum* L. and *Zea mays* L. during the mitotic cycle // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1982. Vol. 41. P. 401–409.

140. Gunning B.E.S. The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* expressing GFP // Trends Plant Sci. 1998. Vol. 3, № 11. P. 417.

141. Halstead T.W., Dutcher F.R. Plants in space // Annu. Rev. Plant. Physiol. 1987. Vol. 38, № 1. P. 317–345.

142. Hamideldin N., Hussien O.S. Morphological, physiological and molecular changes in *Solanum tuberosum* L. in response to pre-sowing tuber irradiation by gamma rays // Am. J. Food Sci. Technol. 2013. Vol. 1, № 3. P. 36–41.

143. Hara-Nishimura I., Matsushima R. A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: A plant strategy against environmental stress? // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. Vol. 6. P. 583–588.

144. Hawes C.R., Brandizzi F., Andreeva A.V. Endomembranes and vesicle trafficking // Curr. Opin. Plant Biol. 1999. Vol. 2. P. 454–461.

145. Hawes C.R., Juniper B.E., Horne J.C. Low and high voltage electron microscopy of mitosis and cytokinesis in maize roots // Planta. 1981. Vol. 152. P. 397–407.

146. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // Biochem J. 1991. Vol. 280. P. 309–316.

147. Herman E.M. Endoplasmic reticulum bodies: solving the insoluble // Curr. Opin. Plant Biol. 2008. Vol. 11. P. 672–679.

148. Herman E.M., Larkins B.A. Protein storage bodies and vacuoles //

Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 601–613.

149. Herranz N., Medina F.J. Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments // Plant Biology. 2014. Vol. 16, № 1. P. 23–30.

150. Holst R.W., Nagel D.J. Radiation effects on plants // Plants for environmental studies / W. Wang, J.W. Gorsuch, J.S. Hughes [eds.]. Boca Raton, FL : Lewis Publishers. 1997. P. 37–81.

151. Hosel W., Surholt E., Borgmann E. Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chick pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension culture // Eur. J. Biochem. 1978. Vol. 84. P. 487–492.

152. Howell S.H. Endoplasmic reticulum stress responses in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. Vol. 64. P. 477–499.

153. HSFA2 functions in the physiological adaptation of undifferentiated plant cells to spaceflight / A.K. Zupanska, C. LeFrois, R.J. Ferl, A.L. Paul // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 2. E 390. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/390/htm>.

154. Identification of acalmodulin-regulated Ca^{2+} ATPase in the endoplasmic reticulum / B. Hong, A. Ichida, Y. Wang [et al.] // Plant Physiol. 1999. Vol. 119. P. 1165–1175.

155. Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins / K. Yamada, A.J. Nagano, M. Nishina [et al.] // Plant Physiol. 2013. Vol. 161. P. 108–120.

156. Ikushima T., Aritomi H., Morisita J. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells // Mutat. Res. 1996. Vol. 358. P. 193–198.

157. Improvements in and actual performance of the plant experiment unit onboard Kibo, the Japanese experiment module on the international space station / S. Yano, H. Kasahara, D. Masuda [et al.] // Adv. Space Res. 2013. Vol. 51. P. 780–788.

158. In *Arabidopsis*, the spatial and dynamic organization of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus is influenced by the integrity of the C-terminal domain of RHD3, a non-essential GTPase / G. Stefano, L. Renna, T. Moss [et al.] // *Plant J.* 2012. Vol. 69. P. 957–966.

159. *In vitro* root development in *Arabidopsis thaliana* wild type and *scr* mutants under clinorotation / E.L. Kordyum, V.V. Sarnatska, A.S. Talalaiev, Yu.V. Ovcharenko // *J. Gravit. Physiol.* 2008. Vol. 15, № 1. P. 165–166.

160. Induced plant defense responses against chewing insects: Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against cotton worm but not diamondback moth / H.U. Stotz, B.R. Pittendrigh, J. Kroymann [et al.] // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 124. P. 1007–1017.

161. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance / D. Wang, N.D. Weaver, M. Kesarwani, X. Dong // *Science.* 2005. Vol. 308. P. 1036–1040.

162. Influence of microgravity on cellular differentiation in root caps of *Zea mays* / R. Moore, W.M. Fondren, C.E. McClelen, C.L. Wang // *Amer. J. Bot.* 1987. Vol. 74, № 7. P. 1006–1012.

163. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins / S. Papp, E. Dziak, M. Michalak, M. Opas // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 160. P. 475–479.

164. Ishikawa H., Evans M.L. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity // *Plant Physiol.* 1993. Vol. 102, № 4. P. 1203–1210.

165. Isolation from rice bran of a bound form of vitamin B6 and its identification as 50-O-β-D-glucopyranosyl-pyridoxine / K. Yasumoto, H. Tsuji, K. Iwami, H. Mitsuda // *Agric. Biol. Chem.* 1977. Vol. 41. P. 1061–1067.

166. Iversen T.-H. Cytochemical localization of myrosinase (β-thio-glucosidase) in root tips of *Sinapis alba* // *Protoplasma.* 1970a. Vol. 71.

P. 451–466.

167. Iversen T.-H. The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the Cruciferae // *Protoplasma*. 1970b. Vol. 71. P. 467–477.

168. Kahler S.W. Energetic particle acceleration by coronal mass ejections // *Adv. Space Res.* 2003. Vol. 32, № 12. P. 2587–2596.

169. Karoliussen I.B.E., Kittang A.-I. Will plants grow on Moon or Mars? // *Curr. Biotechnol.* 2013. Vol 2. P. 235–243.

170. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex / M. Stornaiuolo, L.V. Lotti, N. Borgese [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* 2003. Vol. 14, № 3. P. 889–902.

171. Ketudat Cairns J.R., Esen A. β -Glucosidases // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. Vol. 67, № 20. P. 3389–3405.

172. Kiss J.Z. Mechanisms of the early phases of plant gravitropism // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2000. Vol. 19. P. 551–573.

173. Kiss J.Z. Plant biology in reduced gravity on the Moon and Mars // *Plant Biol.* 2014. Vol. 16. P. 12–17.

174. Knebel W., Quader H., Schnepf E. Mobile and immobile endoplasmic reticulum in onion bulb epidermis cells: short- and long-term observations with a confocal laser scanning microscope // *Eur. J. Cell Biol.* 1990. Vol. 52, № 2. P. 328–340.

175. Knight H. Calcium signaling during abiotic stress in plants // *Int. Rev. Cytol.* 2000. Vol. 195. P. 269–324.

176. Kordyum E.L. Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* 1997. Vol. 171. P. 1–72.

177. Kordyum E.L. Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostatic experiments // *Adv. Space Res.* 1994. Vol. 14, № 8. P. 77–85.

178. Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // *Plant Biology*. 2014. Vol. 16, № 1. P. 79–90.
179. Kozeko L.Ye., Kordyum E.L. Altered gravity effect on the heat shock protein level in plant // *J. Gravit. Physiol.* 2006. Vol. 13. P. 117–118.
180. Kozeko L.Ye., Kordyum E.L. Effect of hypergravity on the level of heat shock proteins 70 and 90 in pea seedlings // *Microgravity Sci. Techn.* 2009. Vol. 21, № 1. P. 175–178.
181. Kraft T.F., Van Loon J.J., Kiss J.Z. Plastid position in *Arabidopsis* columella cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine // *Planta*. 2000. Vol. 211. P. 415–422.
182. Kuang A., Popova A., Musgrave M. Dynamics of storage reserve deposition during *Brassica rapa* L. pollen and seed development in microgravity // *Intern. J. Plant Sci.* 2005. Vol. 16. P. 85–96.
183. Kuang A., Popova A., Musgrave M. Pollination and embryo development in *Brassica rapa* in microgravity // *Int. J. Plant. Sci.* 2000. Vol. 161, № 2. P. 203–211.
184. Kurimoto T., Constable J.V., Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana* // *Health Phys.* 2010. Vol. 99, № 1. P. 49–57.
185. Laboratory science with space data. Accessing and using space-experiment data / D. Beysens, L. Carotenuto, J.J. W.A. Van Loon, M. Zell. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. 213 pp.
186. Larkins B.A., Hurkman W.J. Synthesis and deposition of protein bodies of maize endosperm // *Plant Physiol.* 1978. Vol. 62. P. 256–263.
187. Laurinavichius R.S., Yaroschus A.V., Marchukajtis A. Metabolism of pea plants grown under space flight conditions // *Biologicheskii issledovaniya na orbitalnikh stanziyakh Salyut* / N.P. Dubinin [eds.]. M. : Nauka, 1984. P. 96–102.
188. Leaf endoplasmic reticulum bodies identified in *Arabidopsis* rosette leaves are involved in defense against herbivory / A. Nakazaki, K. Yamada, T. Kunieda [et al.] // *Plant Physiol.* 2019. Vol. 179. P. 1515–1524.

189. Legue V., Cabane M., Ladouce N. The impact of gravity on wood formation in *Eucalyptus globulus*: Experiences in simulated microgravity // 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting : abstracts (Cologne, Germany, 26 Jun. – 1 Jul. 2005). Cologne, 2005. P. 21.

190. Levy A., Zheng J.Y., Lazarowitz S.G. Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement // *Curr. Biol.* 2015. Vol. 25. P. 2018–2025.

191. Li K.H. Coherence in physics and biology // *Recent Adv. Biophoton Res.* / F.A. Popp, K.H. Li, Q. Gu [eds.]. Singapore : World Sci. Publ., 1992. P. 113–156.

192. Li X., Wu Y., Zhang D.-Z. Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process // *Science*. 1993. Vol. 262. P. 1054–1056.

193. Lichtscheidl I.K., Weiss D.G. Visualization of submicroscopic structures in the cytoplasm of *Allium cepa* inner epidermal cells by video-enhanced contrast light microscopy // *Eur. J. Cell Biol.* 1988. Vol. 46. P. 378–382.

194. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways / H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuyper [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 48. P. 778–786.

195. Lipid dynamics at contact sites between the endoplasmic reticulum and other organelles / T. Balla, Y.J. Kim, A. Alvarez-Prats, J. Pemberton // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2019. Vol. 35. P. 85–109.

196. Liu L., Li J. Communications between the endoplasmic reticulum and other organelles during abiotic stress response in plants // *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10, № 749. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00749/full>.

197. Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control. Contributed papers. Vienna : IAEA, 1997. 696 pp.

198. MacCleery S.A., Kiss J.Z. Plastid sedimentation kinetics in roots of

wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 120. P. 183–192.

199. Maintaining the factory: the roles of the unfolded protein response in cellular homeostasis in plants / E. Angelos, C. Ruberti, S.J. Kim, F. Brandizzi // *Plant J.* 2017. Vol. 90, № 4. P. 671–682.

200. Maize β -glucosidase-aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for β -glucosidase aggregation / F.S. Kittur, M. Lalgondar, H.Y. Yu [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 10. P. 7299–7311.

201. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.

202. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome / T.P. Dunkley, S. Hester, I.P. Shadforth [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 6518–6523.

203. Matsumoto S., Kumasaki S., Soga K. Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of *Arabidopsis* tubulin mutants // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 152. P. 918–926.

204. Matsuura M., Obata A., Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control // *J. Food Sci. Chicago.* 1989. Vol. 54, № 3. P. 602–605.

205. Mattiacci L., Dicke M., Posthumus M.A. Beta-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 2036–2040.

206. Maxima Sybr Green Real Time. Product information. Technacal manual. Lithuania : Fermentas, 2011a. 6 pp.

207. Medina D.F. Solar radiation and spacecraft shielding // *Handbook of cosmic hazards and planetary defense.* 2014. P. 1–17.

208. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent:

evidence from selective photobleaching / F. Brandizzi, E.L. Snapp, A.G. Roberts [et al.] / *Plant Cell*. 2002. Vol. 14. P. 1293–1309.

209. Merkys A.I., Laurinavichius R.S. Complete cycle of individual development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants on board the Salyut-7 orbital station // *Dokl. Akademii Nauk SSSR*, 1983. Vol. 271. P. 509–512.

210. Methyl jasmonate affects morphology, number and activity of endoplasmic reticulum bodies in *Raphanus sativus* root cells / M. Gotte, R. Ghosh, S. Bernard [et al.] // *Plant Cell Physiol*. 2015. Vol. 56. P. 61–72.

211. Microgravity affects the photosynthetic apparatus of *Brassica rapa* / S.M. Kochubey, N.I. Adamchuk, E.L. Kordyum, J.A. Guikema // *Plant Biosystems*. 2004. Vol. 138, № 1. P. 1–9.

212. M-MLV reverse transcriptase. Product information sheet. Lithuania : Fermentas, 2011b. 4 pp.

213. *Molecular Biology of the Cell* [4th eds.] / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, [et al.]. New York : Garland Science, 2002. 712 pp.

214. Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects // *Radiat Res*. 2003. Vol. 159. P. 581–596.

215. Morrow R.C., Crabb T.M. Biomass production system (BPS) plant growth unit // *Adv. Space Res*. 2000. Vol. 26. P. 289–298.

216. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis / C. Becker, A. Hammerle-Fickinder, I. Reidmaier, M.V. Pfaffl // *Methods*. 2010. Vol. 50. P. 237–243.

217. Multiscale structural analysis of plant ER-PM contact sites / H.E. McFarlane, E.K. Lee, L.S. Van Bezouwen [et al.] // *Plant Cell Physiol*. 2017. Vol. 58. P. 478–484.

218. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, № 13.

P. 473–497.

219. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells / H. Ueda, E. Yokota, N. Kutsuna [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. P. 6894–6899.

220. Nagano A.J., Matsushima R., Hara-Nishimura I. Activation of an ER-body-localized β -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2005. Vol. 46. P. 1140–1148.

221. NAI1 gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body / R. Matsushima, Y. Fukao, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. 1536–1549.

222. Nedukha E. Effects of microgravity on the structure and function of plant cell walls // Int. Rev. Cytol. 1997. Vol. 170. P. 39–77.

223. Negative modulation of bystander DNA repair potential by X-ray targeted tissue volume in *Arabidopsis thaliana* / C. Deng, J. Wu, T. Wang [et al.] // Radiat. Res. 2019. Vol. 191. P. 556–565.

224. Neuhaus J., Rogers J. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells // Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 38. P. 127–144.

225. Nevzgodina L.V. Chromosomal aberrations as a biomarker for cosmic radiation. In fundamentals for the assessment of risks from environmental radiation // NATO science series : Springer Netherlands: Houten, The Netherlands. 1999. P. 203–208.

226. Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode / S. Mancuso, A.M. Marras, V. Magnus, F. Baluska // Anal. Biochem. 2005. Vol. 341. P. 344–351.

227. Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight / A.L. Paul, A.K. Zupanska, E. Schultz, R.J. Rerl // BMC Plant Biol. 2013. Vol. 13. P. 112–122.

228. Oriented movement of statoliths. Studies in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets / D. Volkmann, B. Buchen, Z. Hejnowicz [et al.] // *Planta*. 1991. Vol. 185. P. 153–161.

229. Overexpression of BiP has inhibitory effects on the accumulation of seed storage proteins in endosperm cells of rice / H. Yasuda, S. Hirose, T. Kawakatsu [et al.] // *Plant Cell Physiol*. 2009. Vol. 50. P. 1532–1543.

230. Perbal G., Driss-Ecole D. Mechanotransduction in gravisensing cells // *Trends Plant Sci*. 2003. Vol. 8. P. 498–504.

231. Perbal G., Driss-Ecole D., Salle G. Perception of gravity in the lentil root // *Naturwissenschaften*. 1986. Vol. 73. P. 444–446.

232. Perbal G., Driss-Ecole D. Transduction of the gravity stimulus in the root statocyte // *Adv. Space Res*. 1994. Vol. 14, № 8. P. 11 –19.

233. Peremyslov V.V., Prokhnevsky A.I., Dolja V.V. Class XI myosins are required for development, cell expansion, and F-Actin organization in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2010. Vol. 22. P. 1883–1897.

234. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acid Res*. 2001. Vol. 29, № 9. – P. 2003–2007.

235. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments / N. Paris, C.M. Stanley, R.L. Jones, J.C. Rogers // *Cell*. 1996. Vol. 85. P. 563–572.

236. Plant growth and human life support for space travel / R.M. Wheeler, G.W. Stutte, G.V. Sobarrao, N.C. Yorio // *Handbook of plant and crop physiology* / M. Pessarakli [eds.]. Marcel Dekker Inc. : New York, USA. Basel, Switzerland. 2001. P. 925–941.

237. Plant mineral nutrition, gas exchange and photosynthesis in space: A review / S.A. Wolff, L.H. Coelho, M. Zabrodina [et al.] // *Adv. Space Res*. 2013. Vol. 51. P. 465–475.

238. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants / O. Kovalchuk, A. Arkhipov, I. Barylyak [et al.] // *Mutat. Res*. 2000.

Vol. 449. P. 47–56.

239. Poulton J.E. Cyanogenesis in plants // *Plant Physiol.* 1990. Vol. 94. P. 401–405.

240. Putting the squeeze on plasmodesmata: a role for reticulons in primary plasmodesmata formation / K. Knox, P. Wang, V. Kriechbaumer [et al.] // *Plant Physiol.* 2015. Vol. 168. P. 1563–1572.

241. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica* / V. Sherameti, Y. Venus, C. Drzewiecki [et al.] // *Plant J.* 2008. Vol. 54, № 3. P. 428–439.

242. *PYK10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana* / I. Nitz, H. Berkefeld, P.S. Puzio, F.M.W. Grundler // *Plant Sci.* 2001. Vol. 161, 2. P. 337–346.

243. Quander H. Formation and disintegration of cisternae of the endoplasmic reticulum visualized in live cells by conventional fluorescence and confocal laser scanning microscopy: Role of calcium and the cytoskeleton // *Protoplasm.* 1990. Vol. 151. P. 167–170.

244. Quander H., Schnepf E. Endoplasmic reticulum and cytoplasmic streaming: Fluorescence microscopical observations in adrenal epidermis cells of onion bulb scales // *Protoplasma.* 1986. Vol. 131. P. 250–252.

245. Quantitative analysis of ER body morphology in an *Arabidopsis* mutant / A.J. Nagano, A. Maekawa, R.T. Nakano [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2009. Vol. 50, № 12. P. 2015–2022.

246. Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity / Y. Saijo, N. Tintor, X. Lu [et al.] // *EMBOJ.* 2009. Vol. 28. P. 3439–3449.

247. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly / J. Haseloff, K.R. Siemering, D.C. Prasher, S. Hodge // *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 1997. Vol. 94. P. 2122–2127.

248. Response of *Phaseolus vulgaris* L. plants to low-let ionizing radiation: growth and oxidative stress / C. Arena, V. De Micco, G. Aronne [et al.] // *Acta Astronautica*. 2013. Vol. 91. P. 107–114.

249. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electronmicroscopy // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 17. P. 208–212.

250. Rojo E., Leon J., Sanchez-Serrano J.J. Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1999. Vol. 20. P. 135–142.

251. 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, 2013a. P. 185–192.

252. 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.

253. 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, 2013b. ESA-SP 706. Id. 44. URL: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2013ESASP.706E..44R>.

254. 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.

255. Salisbury F.B., Gitelson J.I., Lisovsky G.M. Bios-3: Siberian experiments in bioregenerative life support // *Bioscience*. 1997. Vol. 47. P. 575–585.

256. Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of *Arabidopsis* / Y.O. Ahn, B. Shimizu, K. Sakata [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2010. Vol. 51, № 1.

P. 132–143.

257. Shah M.A., Chaudhuri T.K., Mishra S. Strategy for purification of aggregation prone β -glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach // *New Biotechnology*. 2012. Vol. 29, № 3. P. 311–320.

258. Shevchenko G., Kalinina Ia., Kordyum E.L. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation // *Adv. Space Res.* 2007. Vol. 39. P. 1171–1175.

259. Shibaoka H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 45. P. 527–544.

260. Shibata Y., Voeltz G.K., Rapoport T.A. Rough sheets and smooth tubules // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 435–439.

261. Sieber M., Hanke W., Kohn F.P.M. Modification of membrane fluidity by gravity // *Open J. Biophysics*. 2014. Vol. 4. P. 105–111.

262. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum / S. Pagny, P. Lerouge, L. Faye, V. Gomord // *J. Exp. Botany*. 1999. Vol. 50, № 331. P. 157–158.

263. Slocum R.D., Gaynor J.J., Galston A.W. Cytological and ultrastructural studies on root tissues // *Ann. Bot.* 1984. Vol. 54. P. 65–76.

264. Soilless cultivation of soybean for bioregenerative life-support systems: A literature review and the experience of the MELiSSA project – Food characterisation phase I / R. Paradiso, V. De Micco, R. Buonomo [et al.] // *Plant Biol.* 2014. Vol. 16. P. 69–78.

265. Spaceflight effects on consecutive generations of peas grown onboard the Russian segment of the International Space Station / V.N. Sychev, M.A. Levinskikh, S.A. Gostimsky [et al.] // *Acta Astronautica*. 2007. Vol. 60. P. 426–432.

266. Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in tissue culture cells of *Arabidopsis thaliana* / A.K. Zupanska,

F.C. Denison, R.J. Ferl [et al.] // *Am. J. Bot.* 2013. Vol. 100, № 1. P. 235–248.

267. Spaceflight induces specific alterations in the proteomes of *Arabidopsis* / R.J. Ferl, J. Koh, F. Denison, A.L. Paul // *Astrobiology*. 2015. Vol 15, № 1. P. 32–56.

268. Spaceflight transcriptomes: Unique responses to a novel environment / A.-L. Paul, A. Zupanska, D.T. Ostrow [et al.] // *Astrobiology*. 2012. Vol. 12. P. 40–56.

269. Staehelin L.A., Chapman R.L. Secretion and membrane recycling in plant cells: novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells // *Planta*. 1987. Vol. 171, № 1. P. 43–57.

270. Staehelin L.A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains // *Plant J.* 1997. Vol. 11. P. 1151–1165.

271. Stankovic B. Plants in Space // *Into Space – A Journey of how humans adapt and live in microgravity* / T. Russomano, L. Rehnberg [eds.]. 2018. URL: <https://www.intechopen.com/books/into-space-a-journey-of-how-humans-adapt-and-live-in-microgravity/plants-in-space>.

272. Stefano G., Brandizzi F. Advances in plant ER architecture and dynamics // *Plant Physiol.* 2018. Vol. 176. P. 178–186.

273. Stefano G., Renna L., Brandizzi F. The endoplasmic reticulum exerts control over organelle streaming during cell expansion // *J. Cell Sci.* 2014. Vol. 127. P. 947–953.

274. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana* / M. Koizumi, K. Yamaguchi-Shinozaki, H. Tsuji, K. Shinozaki // *Gene*. 1993. Vol. 129. P. 175–182.

275. Suppression of peroxisome biogenesis factor 10 reduces cuticular wax accumulation by disrupting the ER network in *Arabidopsis thaliana* / A. Kamigaki, M. Kondo, S. Mano [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2009. Vol. 50,

№ 12. P. 2034–2046.

276. The *Arabidopsis* transcription factor NAI1 is required for enhancing the active histone mark but not for removing the repressive mark on *PYK10*, a seedling-specific gene upon embryonic-to-postgerminative developmental phase transition / M. Yoshii, A. Yamamoto, Y. Kagaya [et al.] // *Plant Signal. Behav.* 2015. Vol. 10, № 12. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4854352/>.

277. The astroculture TM flight experiment series, validating technologies for growing plants in space / R.C. Morrow, R.J. Bula, T.W. Tibbitts, W.R. Dinauer // *Adv. Space Res.* 1994. Vol. 14. P. 29–37.

278. The effect of exposure to microgravity on the development and structural organisation of plant protoplasts flown on Biokosmos 9 / O. Rasmussen, D.A. Klimchuk, E.L. Kordyum [et al.] // *Physiol. Plantarum.* 1992. Vol. 84. P. 162–170.

279. The effect of gravity on surface temperatures of plant leaves / Y. Kitaya, M. Kawai, J. Tsuruyama [et al.] // *Plant Cell Environ.* 2003. Vol. 26. P. 497–503.

280. The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis* / R. Matsushima, Y. Hayashi, K. Yamada [et al.] // *Plant Cell Physiol.* 2003b. Vol. 44. P. 661–666.

281. The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells / C. Ulbrich, M. Wechland, J. Pietsch [et al.] // *BioMed Res. Intern.* 2014. P. 1–16.

282. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling / A. Chini, S. Fonseca, G. Fernandez [et al.] // *Nature.* 2007. Vol. 448. P. 666–671.

283. The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum / M. Schmid, D.J. Simpson, H. Sarioglu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 5353–5358.

284. The role of calcium ions in cytological effects of hypogravity / E.L. Kordyum, N.A. Belyavskaya, E.M. Nedukha [et al.] // *Adv. Space Res.* 1984. Vol. 4. P. 23–26.

285. The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum / P. Wang, T.J. Hawkins, C. Richardson [et al.] // *Curr. Biol.* 2014. Vol. 24. P. 1397–1405.

286. The plant endoplasmic reticulum: A cell-wide web / I.A. Sparkes, L. Frigerio, N. Tolley, C. Hawes // *Biochem. J.* 2009. Vol. 423. P. 145–155.

287. Theoretical and practical considerations of staggered crop production in a BLSS / G.W. Stutte, C.L. Mackowiak, N.C. Yorio, R.M. Wheeler // *Life Supp. Biosphere Sci.* 1999. Vol. 6, № 4. P. 287–291.

288. Toyooka K., Okamoto T., Minamikawa T. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds // *J. Cell Biol.* 2000. Vol. 148. P. 453–463.

289. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* / M.G. Pozo, S. Van Der Ent, L.C. Van Loon, C.M.J. Pieterse // *New Phytologist.* 2008. Vol. 180. P. 511–523.

290. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation / I. Kovalchuk, J. Molinier, Y.L. Yao [et al.] // *Mutat. Res.* 2007. Vol. 624. P. 101–113.

291. Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles / I. Hara-Nishimura, T. Shimada, K. Hatano [et al.] // *Plant Cell.* 1998. Vol. 10. P. 825–836.

292. TRI-Reagent Protocol. Product information. Technical bulletin. Germany : Sigma. 2010. 5 pp.

293. Ultrastructural changes of cell organelles in stems after gamma irradiation / S.G. Wi, B.Y. Chung, J.-H. Kim [et al.] // *J. Plant Biology.* 2005.

Vol. 48, № 2. P. 195–200.

294. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – Getting genomics going / H.J. Bohnert, Q. Gong, P. Li, S. Ma // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. Vol. 9. P. 180–188.

295. Urade R. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants // *FEBS J.* 2007. Vol. 274, № 5. P. 1152–1171.

296. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions / T. Kinoshita, K. Yamada, N. Hiraiwa [et al.] // *Plant J.* 1999. Vol. 19. P. 43–53.

297. Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 135–162.

298. Vandenbrink J.P., Kiss J.Z. Space, the final frontier: A critical review of recent experiments performed in microgravity // *Plant Sci.* 2016. Vol. 243. P. 115–119.

299. Ward J., Pei Z., Schroeder J. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants // *Plant Cell.* 1995. Vol. 7. P. 833–844.

300. Wink M. The plant vacuole: a multifunctional compartment // *J. Exp. Bot.* 1993. Vol. 44. P. 231–248.

301. Wolverson S.C., Kiss J.Z. An update on plant science biology // *Gravit. Space Biol. Bull.* 2009. Vol. 22. P. 13–20.

302. Yamada K., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants // *Plant Cell Physiol.* 2011. Vol. 52, № 12. P. 2039–2049.

303. Yamada K., Nagano A.J., Nishina M. NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* 2008. Vol. 20. P. 2529–2540.

ДОДАТОК А

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОФОРМ β -ГЛЮКОЗИДАЗИ А. *THALIANA*

Назва ферменту	Ген	СЕУ	СП	Наявність в ЕР-тілцях	Основні функції
1	2	3	4	5	6
BGLU 1	At1g45191	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 2	At5g16580	-	-	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 3	At4g22100	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 4	At1g60090	-	+	-	Відповідь на вплив каррикінів. Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 5	At1g60260	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 6	At1g60270	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 7	At3g62740	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 8	At3g62750	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 9	At4g27820	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 10	At4g27830	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів та антоціанвмісних сполук.
BGLU 11	At1g02850	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 12	At5g42260	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 13	At5g44640	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів, а також рості пилкової трубки.

1	2	3	4	5	6
BGLU 14	At2g25630	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів, а також рості пилкової трубки.
BGLU 15	At2g44450	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 16	At3g60130	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 17	At2g44480	-	-	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 18	At1g52400	+	+	+ (після поранення або дії метил-жасмонату)	Відповідь на сольовий стрес, водний дефіцит, вплив патогенів, поїдання комахами, пошкодження епідерми листків розетки, дію фітогормонів. Участь в утворенні індуцибельних EP-тілець, полімеризації білків, метаболізмі вуглеводнів і абсцизової кислоти, катаболізмі глюкозинолатів, а також у регуляції руху продохів.
BGLU 19	At3g21370	+	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 20	At1g75940	+	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.

1	2	3	4	5	6
BGLU 21	At1g66270	+	+	+ (після дії метил-жасмонату або механічного пошкодження (гомогенізації))	Відповідь на сольовий та осмотичний стреси, вплив низьких температур, фосфатне голодування, дію ауксину. Участь у метаболізмі вуглеводнів і кумарину та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 22	At1g66280	+	+		Відповідь на сольовий стрес та вплив низьких температур. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 23 / PYK 10	At3g09260	+	+	+ (основний компонент)	Відповідь на сольовий і осмотичний стреси, вплив низьких температур, дію ауксину, метилжасмонату та жасмонової кислоти, колонізацію коренів ендоефітними бактеріями і грибами, поїдання травоядними комахами, механічне пошкодження епідерми листків розетки. Розщеплення / синтез компонентів клітинної оболонки. Участь в утворенні ЕР-тілець, метаболізмі вуглеводнів і глюкозинолатів, а також у регуляції захисних систем (реакцій) рослинних клітин.
BGLU 24	At5g28510	+	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 25	At3g03640	+	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 26	At2g44490	-	-	-	Відповідь на сольовий стрес, колонізацію коренів ендоефітними бактеріями і грибами. Участь у метаболізмі вуглеводнів і глюкозинолатів. Розщеплення калози клітинної оболонки.

1	2	3	4	5	6
BGLU 27	At3g60120	-	-	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 28	At2g44460	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес та вплив каррикінів. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 29	At2g44470	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 30	At3g60140	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів. Підтримання рослини під час старіння.
BGLU 31	At5g24540	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес та вплив патогенів. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 32	At5g24550	-	+	-	Відповідь на сольовий стрес та вплив патогенів. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 33	At2g32860	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 34	At1g47600	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів.
BGLU 35	At1g51470	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 36	At1g51490	-	-	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 37	At5g25980	-	+	-	Відповідь на поїдання травоядними комахами та дію абсцизової кислоти. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів; участь у регуляції руху прорихів.

1	2	3	4	5	6
BGLU 38	At5g26000	-	+	-	Відповідь на поїдання трав'яїдними комахами, вплив патогенних мікроорганізмів та дію абсцизової кислоти. Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі глюкозинолатів, а також участь у регуляції руху продохів.
BGLU 39	At5g48375	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 40	At1g26560	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 41	At5g54570	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 42	At5g36890	-	-	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів та катаболізмі целюлози.
BGLU 43	At3g18070	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 44	At3g18080	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.
BGLU 45	At1g61810	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів та біосинтезі лігніну.
BGLU 46	At1g61820	-	+	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів та біосинтезі лігніну.
BGLU 47	At4g21760	-	-	-	Участь у метаболізмі вуглеводнів.

Примітка: BGLU – β -глюкозидаза, CEУ – сигнальний елемент утримання β -глюкозидази в компартментах ендоплазматичного ретикулуму, СП – сигнальна послідовність, що відповідає за вивільнення β -глюкозидази. За [109, 124, 302] та базою даних The Arabidopsis Information Resource (<https://www.arabidopsis.org>).

ДОДАТОК Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

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/S0095452710060010. (*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.) Неунh 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 кореневих апексів *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунh. 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 *РУК10* в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунh. // 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 клінонотування 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).

Тези:

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 кліноостатування 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* Неупн. за умов кліноостатування // «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 клиноостатировании // «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 кліноостатуванні // «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* Нейнн. к условиям клиноротирования // 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 ER-тілець в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* (L.) Нейнн. 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.) Неунн. 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.