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

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ШЕВЧЕНКО Галина Валеріївна

УДК 576.3:52-423:581.84:58

ДИСЕРТАЦІЯ

ЦИТОСКЕЛЕТ В ПРОЦЕСІ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА ГІПОКСІЇ

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

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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

Asues

Г.В. Шевченко

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091біологія). – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2024.

У дисертаційній роботі висвітлюються реакції рослинної клітини на такі стимули як модельована мікрогравітація (кліностатування) та гіпоксія, які є малодослідженими, але вкрай актуальними з точки зору запитів як космічної біології, так і біології стресу рослин. Приведені результати дослідження ролі елементів цитоскелету у реакціях рослин на вказані стимули і доводиться їхня участь у адаптації рослин до стресових чинників. Цитоскелет обрано як компонент, який, насамперед, забезпечує форму клітини та позиціонування органел, а також опосередковує численні внутрішньоклітинні процеси, серед яких тік цитоплазми, транспорт та клітинний поділ, екзоцитоз та сигналінг. У роботі наведені дані щодо організації цитоскелету у процесі диференціації клітин ростових зон кореня, як органу, чутливого до навколишніх стимулів, що забезпечує виживаність рослини у змінному довкіллі.

В рамках комплексного дослідження вперше проаналізовано організацію цитоскелету (мікротрубочок та актинових філаментів) у клітинах кори ростових зон коренів таких видів рослин як *Beta vulgaris* (буряк червоний) та повітряно-водних *Alisma plantago–aquatica* (частуха подорожникова) та *Sium latifolium* (вех широколистий). Проведена порівняльна характеристика організації мікротрубочок та актинових філаментів вказаних видів із такими у *Zea mays* (кукурудза) та *Arabidopsis thaliana* (різушка Таля або *Arabidopsis*). Визначена типова організація елементів цитоскелету у досліджуваних вищих рослинах з певними видовими особливостями топографії мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах зони розтягу коренів.

У таких рослин, як B. vulgaris, A. thaliana та Z. mays розглянуті зміна організації кортикальних мікротрубочок та актинових філаментів, а також їхня регуляція на генному рівні в умовах модельованої мікрогравітації за допомогою кліностатів, пристроїв зі швидкістю обертання 2 об/хв, що не дає можливості клітинам відчути спрямовуючу дію вектора сили тяжіння і мінімізує її вплив. Встановлено, що кліностатування впливає на ріст коренів рослин, причому гальмує його у B. vulgaris та A. thaliana та прискорює у Z. mays. Окрім того, у клітинах дистальної зони розтягу рослин виявлені порушення кортикамережі цитоскелету, які проявлялися у відхиленні льної окремих мікротрубочок від поперечного розташування на кут, більший за 45⁰. У *Z.mays* відмічали близько 13% клітин із дезорганізованими мікротрубочками, а у B.vulgaris та A. thaliana – близько 10 %. Таким чином, вперше на прикладі дводольних і однодольних рослин показані однакові закономірності щодо дії кліностатування на орієнтацію мікротрубочок у дистальній зоні розтягу кореня і протилежні щодо темпів приросту головного кореня. Підтверджено, що клітини дистальної зони розтягу кореня є чутливими до зміни орієнтації рослини і механічного стресу, викликаного мінімізованим впливом сили тяжіння. Висунуто припущення, що саме дезорганізація мікротрубочок є внеском у дискоординацію росту коренів, а різниця темпів росту між досліджуваними рослинами зумовлена товщиною кори (переважаюча кількість шарів кори у Z.mays) та/або видовою специфічністю. Вперше встановлено, що кліностатування безпосередньо впливає на експресію генів TUA6 та CLASP, які кодують структурний та асоційований білки тубулінового цитоскелету. У зв'язку з цим припускається, що зниження експресії вказаних генів призводить до зменшення кількості TUA6 та CLASP, позначається у зниженні рівня полімеризації мікротрубочок і призводить до відхилення від поперечної орієнтації окремих мікротрубочок, що, у цілому, частково порушує їхню кортикальну

мережу. Зниження експресії *CLASP* при кліностатуванні та дії деполімеризатора МТ, окрім формування МТ мережі, можливо, пов'язане також із роллю CLASP у забезпеченні транспорту ауксину, що зазнає зміни при інверсії рослин, а також доводить поліфункціональність даного білка у рослин.

Для повнішого розкриття організації цитоскелету та його просторової орієнтації у серії експериментів з кліностатування застосовували фармакологічний підхід і почергово виявляли вплив інгібітора полімеризації тубуліну (оризалін) і руйнівника актинових філаментів (цитохалазин D) на організацію як мікротрубочок, так і мікрофіламентів кортикальної області клітин кори у дистальній зоні розтягу кореня A.thaliana. Паралельно досліджували генетичну регуляцію організації елементів цитоскелету. А саме, визначали яким чином часткове руйнування мікротрубочок та актинових філаментів позначається на транскрипції генів TUA6 та ACT2, які кодують структурні білки цитоскелету а також генів, які кодують асоційовані із цитоскелетом білки. Увагу приділяли генам тих білків, які широко задіяні у організації континууму клітинна стінка –цитоплазматична мембрана – цитоскелет, а саме, асоційованим із мікротрубочками білкам, які забезпечують стабілізацію плюс-кінця полімера (CLASP) та просторову організацію мережі кортикальних мікротрубочок (МАР65-1), білкам, які зв'язуються із актиновими філаментами, забезпечують їхню нуклеацію та зв'язок із цитоплазматичною мембраною, клітинною стінкою та мікротрубочками (форміни FH1 та FH4), а також білку, який сприяє зв'язку мікротрубочок із мембраною та є складовою фосфоліпідного сигналінгу (фосфоліпаза PLDб).

Визначено, що у *A.thaliana* у контрольних стаціонарних умовах існує зв'язок між деполімеризацією мікротрубочок та зниженням експресії гену *TUA6*, деполімеризацією актинових філаментів та зниженням експресії *ACT2*. Це свідчить про зворотний вплив пулу вільних мономерів тубуліну та актину на експресію структурних генів цитоскелету *TUA6* та *ACT2*, що може бути проявом регуляторного зв'язку. Встановлено, що даний зв'язок не проявляється при кліностатуванні, що вказує на інший тип взаємодії між деполіме-

ризацією МТ та АФ та експресією їхніх структурних генів при вказаних умовах.

За результатами експериментів встановлено, що дія оризаліну також знижує експресію ACT2, а дія цитохалазину D інгібує експресію TUA6. Окрім того, відмічали часткові порушення мережі актинових філаментів після впливу оризаліну і порушення організації кортикальних мікротрубочок після впливу цитохалазину D, що підтверджує перехресну взаємну регуляцію і свідчить про взаємозалежне функціонування мікротрубочок та актинових філаментів кортикального цитоскелету у ростових процесах та реакціях на зовнішні стимули. Зв'язок між деполімеризацією МТ оризаліном і зниженням експресії ACT2 не залежав від кліностатування, що свідчить про нечутливість даного процесу до зміненого впливу сили тяжіння.

Вперше в наших дослідженнях продемонстрований вплив деполімеризації мікрофіламентів на експресію *MAP65-1*, що доводить зв'язок між актиновим цитоскелетом та MAP65-1, який зазвичай задіяний у формуванні мережі мікротрубочок. Не виключено, що MAP65-1 також взаємодіє і з актиновими філаментами, можливо, завдяки пост-трансляційним модифікаціям або опосередковано через інші асоційовані із цитоскелетом білки, і у такий спосіб бере участь в взаємозалежному функціонуванні кортикальних MT та AФ. Таким чином, вперше визначена важлива роль MAP65-1 у взаємодії основних елементів цитоскелету.

Для подальшого виявлення механізмів такої взаємозалежної регуляції елементів цитоскелету досліджували експресію генів білків формінів (FH1 та FH4). Показано, що деполімеризація актинових філаментів зворотно впливає на експресію формінів, причому знижує *FH1* та підвищує *FH4*. Незважаючи на приналежність до одного класу (клас формінів I), це може означати різні механізми регулювання білками FH1 та FH4 організації мікрофіламентів та їхнього з'єднання із цитоплазматичною мембраною. Висунуто припущення про те, що посилення експресії гена *FH4* свідчить про ключову роль білка FH4

у полімеризації актину, формуванню його кортикальної мережі а також взаємодії з мікротрубочками в умовах стресу.

У дослідженнях не виявлено зв'язку між кліностатуванням та/або деполімеризацією обох елементів цитоскелету та експресією гену рослинноспецифічної фосфоліпази *PLD* δ , яку вважають одним із ключових білків рослинного сигналінгу. Це свідчить про відсутність залучення PLD δ у реакцію клітин кореня на дані умови кліностатування.

На основі аналізу і узагальнення отриманих результатів зроблено висновок про те, що кліностатування є причиною механічного стресу клітин зони розтягу кореня, пов'язаного із зменшенням гравітаційного навантаження від протопласта на кортикальну область, що порушує зв'язки між континуумом цитоскелет – цитоплазматична мембрана – клітинна стінка. Механічний стрес даного типу знижує потребу у жорсткому цитоскелеті і клітинній стінці і є причиною зниження експресії генів *TUA6* та *CLASP*, що впливає на відхилення окремих МТ від поперечної орієнтації, розрідження мережі кМТ, зниження жорсткості кортикального цитоскелету та послідуюче зниження жорсткості мікрофібрильного каркасу клітинної стінки, що зменшує протидію механічному тиску, тим самим, збільшуючи параметри клітин дистальної зони розтягу коренів. Припускаємо, що у цілому, вказані процеси позначаються на відміченій зміні ростових показників у коренях. Водночас, зміна сили тяжіння активує специфічний механізм адаптації за участю цитоскелету. Визначено, що при кліностатуванні не виявляється зворотний зв'язок між деполімеризацією мікротрубочок та експресією TUA6 та CLASP, між деполімеризацією мікрофіламентів та експресією FH1, FH4 та MAP65-1. Це доводить активацію іншого регуляторного зв'язку між цитоскелетом та експресією генів, які кодують його структурні та асоційовані білки. Ймовірно, що при механічному стресі, викликаному модельованою мікрогравітацією впродовж певного періоду, актинові філаменти, FH1, FH4, CLASP та MAP65-1 задіяні у адаптації, яка включає функціонування та взаємодію елементів цитоскелету, а також забезпечення його зв'язку із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою. При дослідженні впливу гіпоксії на цитоскелет клітин коренів застосований новітній підхід і для експериментів використані природні модельні об'єкти – повітряно-водні рослини А. plantago-aquatica та S. latifolium, на які через заглиблення у ґрунті під водою впливає нестача кисню. Окрім того, на корені даних рослин діє архімедова сила, яка протидіє силі тяжіння, і тому коріння рослин знаходиться в умовах зміненої сили тяжіння. Дослідження A. plantago-aquatica та S. latifolium виявили формування внутрішньокореневих порожнин – аеренхіми, що є адаптивною реакцією, спрямованою на покращення газообміну між коренем та стеблом при гіпоксії. Встановлено, що для A. plantago-aquatica характерною є аеренхіма схизогенного типу, яка утворюється у корі кореня шляхом розходження клітинних рядів. При цьому клітини зберігають свою цілісність. Для S.latifolium характерною є аеренхіма змішаного типу – схизогенна та лізигенна, і це є ознакою пластичності у пристосуванні до зміни навколишніх умов. Визначено, що до процесу формування аеренхіми долучені елементи цитоскелету. Так, виявлено, що при утворенні аеренхіми схизогенного типу у A. plantago-aquatica мікротрубочки у клітинних рядах кори змінюють своє положення з поперечного до росту головного кореня на косе та інколи, стають дезорієнтованими, що, за припущенням, порушує їхнє з'єднання з мембраною та організацію клітинної стінки і, у кінцевому результаті, сприяє розходженню клітинних рядів та формуванню порожнин у міжряддях.

Підтверджено, що у такої рослини як *S. latifolium* до утворення аеренхіми лізигенного типу призводить перебудова тканин і елімінація клітин кори шляхом програмованої клітинної загибелі, яка відбувається апоптозо– подібним шляхом. Вперше досліджені особливості процесу програмованої загибелі у клітинах кори *S.latifolium* при формуванні аеренхіми і визначена їхня специфіка. Виявлено, що первинними реакціями при загибелі клітин кори є руйнування кортикальних мікротрубочок, яке спричиняє інвагінації мембрани та розшарування клітинної стінки, в результаті чого клітина втрачає цілісність. Органели та ядро у клітинах кори *S. latifolium* елімінуються поступово шляхом лізису, проте деякі з органел у невеликій кількості зберігаються до кінцевих етапів редукції клітин. Водночас, ендоплазматичні мікротрубочки разом із актиновими філаментами присутні до кінцевих етапів клітинної загибелі, чим зберігають загальну трофіку клітин та кореня. Це підтверджено і результатами дослідження організації мікротрубочок при штучному індукованні аеренхіми у коренях *Z.mays*.

У наведених дослідженнях не виявлено видимих змін організації клітинної мережі мікрофіламентів, проте припускаються її опосередковані зміни при впливі гіпоксії. Встановлені різні рівні перекисного окиснення ліпідів мембрани у повітряно-водних та наземних генотипів родини Sium. Висунуто припущення, що різні рівні перекисного окиснення ліпідів у повітряно-водних та наземних рослин можуть бути зумовлені видовою специфічністю рослин. Також підвищенний рівень перекисного окиснення ліпідів у наземних рослин S.sisaroideum, на противагу водному S. latifolium, може бути пов'язаний із більшим розбиранням мікрофіламентів, і така динамічність є достатньою для забезпечення лише ростових процесів. У той же час, для рослин, у яких формується аеренхіма, характерним є порівняно знижений рівень перекисного окиснення ліпідів мембрани і, отже, підвищенний рівень полімеризації актину, що може бути проявом залучення актинового цитоскелету як у ріст цілого кореня, так і клітин, які зазнають загибелі при формуванні порожнин аеренхіми, що, загалом зберігає трофіку кореня при розвитку деградаційних процесів. Припускається, що зміна динамічності цитоскелета є запорукою адаптаційних процесів до кліностатуванні і гіпоксії.

Представлені у дисертаційній роботі дані є значним внеском у визначення функціональної організації мікротрубочок та актинових філаментів цитоскелету та їхнього залучення у клітинні процеси, спрямовані на пристосування до нестабільних умов довкілля. Загалом, розуміння природи реакції рослинної клітини на механічне навантаження і гіпоксію надає широкі можливості для конструювання рослин, толерантних до несприятливих умов, наприклад таких, які можна вирощувати у закритих системах життєзабезпеченні під час космічних польотів. Контроль над реакціями на механічний стрес є важливим також і для сільського господарства, зокрема, для вирішення таких проблем як оптимізація поглинання коренем поживних речовин та досягнення максимальної ефективності фотосинтезу.

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

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

<u>Статті</u>

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

та проведення експериментів щодо виявлення організації цитоскелету у аеренхімі коренів рослин, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).

- <u>Shevchenko GV</u>, Brykov VA, Ivanenko GF. Specific features of root aerenchyma formation in *Sium latifoliun* L. (Apiaceae). Cytol Genetics. 2016; 50: 293-299. doi: 10.3103/S0095452716050121 (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо організації цитоскелету у коренях рослин, аналіз результатів, разом із співавторами – узагальнення результатів, написання статті).
- Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Організація мікрофіламентів цитоскелета в коренях повітряно- водних рослин Sium latifolium (APIACEAE) та Alisma platago-aquatica (ALISMATACEAE) у процесі формування аеренхіми. Укр бот журн. 2016; 73 (2): 185-193. doi: 10.15407/ukrbotj73.02.185 (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз результатів, разом із співавтором – узагальнення результатів, написання статті).
- <u>Shevchenko G.</u> Participation of proteins binding both actin filaments and microtubules in higher plant cell growth. Cytol Genetics. 2015; 49: 270-278. doi: 10.3103/S009545271504009X
- <u>Shevchenko G.</u> Actin microfilament organization in the transition zone of *Arabidopsis*-ABD2-GFP roots under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2012; 24 (6): 427-433. doi: 10.1007/s12217-012-9318-5. Q2.
- 10.<u>Шевченко ГВ</u>, Кордюм ЕЛ. Использование трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации. Косм наука техн. 2012; 18(6): 51-56. (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз результатів, написання статті, разом із співавтором – узагальнення результатів).
- 11.<u>Шевченко ГВ</u>, Кордюм ЄЛ. Тубуліновий цитоскелет у клітинах кореневих апексів повітряно-водних рослин *Alisma plantago-aquatica* L.

(Alismataceae) та Sium latifolium L. (Apiaceae). Укр бот журн. 2012; 69 (4): 568-579. (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації мікротрубочок у клітинах коренів, аналіз результатів, написання статті, разом із співавтором – узагальнення результатів).

- 12. Kalinina I, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Tubulin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2008; 21(1-2): 187-190. doi: 10.1007/s12217-008-9047-у. **Q2.** (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, аналіз стану мікротрубочок у зоні розтягу кореня, разом із іншими співавторами аналіз та узагальнення результатів, написання статті).
- 13.<u>Шевченко ГВ</u>. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корня *Arabidopsis thaliana*. Цитол генет. 2009; 43(4): 3-11.
- 14. <u>Shevchenko G, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravi-</u> sensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. Cell Biol Int. 2008; 32: 560-562. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.11.010. Q3. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявленя організації мікротрубочок, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті).
- 15.<u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. Adv Space Res. 2007; 39: 1171-1175. doi: 10.1016/j.asr.2007.02.072. **Q3**. (*Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів, аналіз організації мікротрубочок та мікрофіламентів у зоні розтягу кореня, разом із іншими співавторами аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
- 16. <u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ya, Kordyum E. Interrelation between cytoskeleton elements in root cells of *Arabidopsis*-GFP-MAP4 seedlings under clino-rotation. J Grav Physiol. 2006; 13(1):107-108. **Q3.** (Особистий внесок

здобувача: розробка та проведення експериментів, разом із іншими співавторами—аналіз та узагальнення результатів, написання статті).

- 17. Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YaB. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station. Acta Astronautica. 2005; 56: 613-621. doi: 10.1016/j.actaastro.2004.10.006. **Q2.** (*Особистий внесок здобувача: аналіз даних літератури щодо застосування GFP-методу у дослідженнях рослин, разом із іншими співавторами – узагальнення теоретичних положень, написання статті*).
- 18. Kozeko LYe, <u>Shevchenko GV</u>, Artemenko OA, Martyn GG, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2005; 12(1): 187-188. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявлення організації мікрофіламентів, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів).
- 19. Kordyum EL, Martyn GG, <u>Shevchenko G</u>, Kozeko LYe, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. J Grav Physiol. 2005; 12 (1): 189-190. (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації елементів цитоскелету у коренях, разом із іншими співавторами аналіз та узагальнення результатів, написання ста-тті).
- 20.<u>Shevchenko GV</u>, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. Adv Space Res. 2005; 35: 289-295. doi: 10.1016/j.asr.2005.02.021. **Q3.** (Особистий внесок здобувача: розробка та проведення експериментів щодо виявлення організації цитоскелету, разом із співавтором аналіз та узагальнення результатів та теоретичних положень, написання статті).
- 21.Kordyum EL, <u>Shevchenko GV.</u> Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Grav Physiol. 2003; 10 (1): 15-16. **Q3.** (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури щодо участі цитоскелету у

гравічутливості неспецифічних клітин рослин, разом із співавтором — узагальнення результатів, написання статті).

- 22. Thomas S, Osman K, de Graaf BHJ, <u>Shevchenko G</u>, Wheeler M, Franklin Ch, Franklin-Tong V. Investigating mechanisms involved in the selfincompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 2003; 358: 1033-1036. doi: 10.1098/rstb.2003.1288. **Q1.** (*Ocoбистий внесок* здобувача: виявлення організації мікрофіламентів при реакції самонесумісності, проведення тестів виживаності мітохондрій при реакції самонесумісності, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів).
- 23.Кордюм ЕЛ, Шевченко ГВ. Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитол генет. 2003; 37 (2): 56-68. (Особистий внесок здобувача: критичний аналіз теоретичних положень щодо ролі цитоскелету у гравічутливості рослин, разом із співавтором узагальнення теоретичних положень, написання статті).
- 24. Snowman BN, Kovar DR, <u>Shevchenko G</u>, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. Signal -mediated depolimerization of actin in pollen during the selfincompatibility response. The Plant Cell. 2002; 14 (10): 2613-2626. doi: 10.1105/tpc.002998. **Q1.** (*Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо виявлення організації мікрофіламентів при реакції самонесумісності, разом із іншими співавторами – аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).

Окремі розділи в книгах

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

26. Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. 2008. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The Plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. NATO Science for peace and security series- C: Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196. (Особистий внесок здобувача: аналіз практичних даних щодо ролі взаємної організації елементів цитоскелету у гравічутливості рослин, разом із співавторами – узагальнення результатів експериментів, написання розділу).

Тези

- <u>Shevchenko G.</u> Impact of clinorotation on microtubule regulation by tubulinassociated proteins in plants. 26th ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 14th International Conference on "Two-Phase Systems for Space and Ground Applications", European Space Agency Topical Teams meetings, 2019, 24-27 September, Granada, Spain. p. 140.
- <u>Шевченко ГВ.</u> Білки, асоційовані із тубуліновим цитоскелетом як можливі гравісенсори рослин. Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках. Міжнародна наукова конференція, 2019, 25-27 лютого, Київ. с. 197.
- Шевченко ГВ. Дослідження росту рослин в умовах мікрогравітації. Українська конференція з космічних досліджень, 2018, 17-20 вересня, Київ. с. 82.
- Шевченко ГВ. Изменения цитоскелета растений в условиях симулированной микрогравитации. 2-я Международная научнопрактическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», 2018, 28-31 мая, Минск, Беларусь. с.31-32.

- 5. <u>Шевченко ГВ.</u> Ассоциированные с микротрубочками белки чувствительны к воздействию микрогравитации. 17- та Українська конференція з космічних досліджень, 2017, 21-25 серпня, Одеса. с.69.
- <u>Shevchenko G.</u> Microtubule associated proteins might sense gravity changes.
 7th International Symposium on Physical Sciences in Space and 25th European Low Gravity Research Association Biennial Symposium and General Assembly, 2017, 2-6 October, Juan-les-Pins, France. p.99-100.
- Шевченко ГВ. Влияние клиностатирования на организацию цитоскелета растительной клетки. 15 Українська конференція з космічних досліджень, 2015, 24-28 серпня, Одеса. с. 55.
- Shevchenko G. Cortical microtubules and phospholipase D are involved in Arabidopsis root cell growth under clinorotation. European Low Gravity Association (ELGRA) Biennial Symposium and General Assembly, 2013, 11-14 September, Vatican, Italy. p.192.
- <u>Шевченко ГВ.</u> Роль цитоскелета в регулировании ростовых процессов клеток корня при клиностатировании. Українська конференція з космічних досліджень, 2013, 2-6 вересня, Євпаторія, Крим. с.95.
- 10.<u>Шевченко ГВ.</u> Влияние микрогравитации на цитоскелет в корнях *Arabidopsis thaliana*. 12-та Українська конференція з космічних досліджень, 2012, 3-7 вересня, Євпаторія, Крим. с.84.
- 11.<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Developmental rearrangement of microtubules in plant root cells under clinorotation. ELGRA Biennial General Assembly, 2011, 5-9 September, Antwerp, Belgium. p.179.
- 12.<u>Shevchenko G.</u> Developmental rearrangement of cortical microtubules in plant root cells. 31st Annual ISGP Meeting, 11th ESA Life Science Symposium, 5th ISSBB Symposium, ELGRA Symposium, 2010, 13-18 June, Trieste, Italy. p117.
- 13.<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Impact of microgravity on plant cell growth.5th Conference of European Plant Science Organization (EPSO), 2010, 18-22 April, Olos, Finland. p.162.

- 14.<u>Shevchenko GV.</u> Impact of clinorotation on the orientation of microtubules in plant root cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2009, 1-4 September, Bonn, Germany. p.240.
- 15.Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Sensitivity of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2007, 23-28 March, Coeur d"Alene, Idaho, USA. p.53
- 16.Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Spatial organization of cytoskeleton in *Arabidopsis* roots under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.68.
- 17.<u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ia, Kordyum E. Cytoskeleton rearrangements in the distal elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.67.
- Шевченко ГВ. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів. 2-гий з'їзд Українського Товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ. с. 224.
- 19. <u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Tubulin cytoskeleton in elongation zone of *Arabidopsis* root is affected by clinorotation. 6-я Украинская конференция по космическим исследованиям, 2006, 3-10 сентября, НЦУІКС, Євпаторія, Крим. с. 189.
- 20.Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E.Oryzalin sensitivity of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for biotechnology and agriculture, 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.47-48.
- 21.<u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for

biotechnology and agriculture. 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.86-88.

- 22.<u>Шевченко ГВ,</u> Овруцька II.Формування бічних коренів у різних екотипів веху широколистого (*Sium latifolium*) як прояв пластичності розвитку рослин. XII з'їзд Українського ботанічного товариства, 2006, 15-18 травня, Одеса. с. 517.
- 23.Kozeko LE, <u>Shevchenko GV</u>, Artemenko OA, Martyn GI, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June-1 July, Cologne, Germany. p.105.
- 24.Kordyum EL, Martyn GI, <u>Shevchenko GV</u>, Kozeko LE, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.106.
- 25.<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Actin cytoskeleton in the transition zone of *Beta vulgaris* roots is sensitive to clinorotation. Society Experimental Biology Meeting, Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 11-15 July, Barcelona, Spain. p. 327.
- 26.<u>Шевченко ГВ.</u> Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.
- 27.<u>Shevchenko G</u>, de Graaf B, Franklin-Tong V. Role of actin-binding proteins in remodeling of actin cytoskeleton during SI response in *Papaver rhoeas* pollen tubes. 14 FESPB Congress, Acta Physiologiae Plantarum 26(3), 2004, 23-27 August, Cracow, Poland. p. 49.

SUMMARY

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

Thesis for the scientific degree of Doctor of Science in Biology, the specialty 03.00.11 – Cytology, Cell Biology, Histology (091 – Biology). M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

The thesis highlights reactions of plant cell to such stimuli as modeled microgravity (clinorotation) and hypoxia, which are understudied, but extremely relevant from the point of view of their inquiries for both space biology and plant stress biology. Results of the study on the role of cytoskeleton in plant reactions to above stimuli are given, and participation of the cytoskeleton in cell adaptation to above stress factors is proven. Cytoskeleton is chosen as a component that primarily provides cell shape and organelle positioning, and also mediates numerous intracellular processes, including cytoplasmic flow, transport and cell division, exocytosis, and signaling from biotic and abiotic factors. Data are given on the organization of the cytoskeleton in different growth zones of the root, as sensitive organ to environmental stimuli, which ensures plant survival in a changing environment.

For the first time, as part of a comprehensive study, organization of the cytoskeleton (microtubules and actin filaments) was analyzed in the cortical region of the cells in roots growth zones of such plant species as *Beta vulgaris* (red beetroot) and air-water *Alisma plantago–aquatica* and *Sium latifolium*. A comparative characterization of microtubule and actin filament organization of above mentioned species with those of *Zea mays* (maize) and *Arabidopsis thaliana* was carried out.

Typical organization of cytoskeleton elements in the studied monocots and dicots with certain distinctive species features of microtubule and actin filament

organization in the cells of root elongation zone was determined. In such plants as B. vulgaris, A. thaliana, and Z. mays, change in cortical microtubule and actin filament organization as well as their genetic regulation in modeled microgravity conditions, which was simulated using clinostats, rotating specimen at a speed of 2 rpm, which does not allow cells to perceive directional influence of gravity and thus, minimizes its influence. It was established that clinorotation affects growth of plant roots, inhibiting it in B. vulgaris and A. thaliana and accelerating it in Z. mays. In addition, in the cells of the distal elongation zone, a certain disorientation of cortical microtubule network was detected, which was manifested in the deviation of individual microtubules from the transverse arrangement at an angle greater than 45 0. About 13% of cells with disoriented microtubules were noted in Z. mays, and about 10% in *B. vulgaris* and *A. thaliana*. Thus, for the first time, using the example of dicotyledonous and monocotyledonous plants, the same regularities regarding the effect of clinorotation on orientation of microtubules in the distal elongation root zone and the opposite regarding the rate of growth of the main root are shown. It has been confirmed that distal elongation root zone is one of the sensitive zones to external stimuli. It is hypothesized that disorganization of microtubules contributes to root growth discoordination, and the difference between the studied plants is due to the thickness of the cortex (predominant number of cortex layers in Z. mays) and/or species specificity.

For the first time, it was established that clinorotation directly affects expression of TUA6 and CLASP genes, encoding structural proteins of tubulin cytoskeleton. In this regard, we assume that a decrease in expression of mentioned genes leads to a decrease in the amount of TUA6 and CLASP, affects polymerization of microtubules and leads to a marked deviation of individual microtubules, which, in general, partially disrupts their cortical network. Decrease in CLASP expression during only clinorotation, in addition to stabilization of MT ends, may also be related to the role of CLASP in auxin transport, which undergoes changes during plant inversion, and also proves polyfunctionality of this protein in plants.

In order to reveal more precisely the organization of cytoskeleton and its spatial orientation we conducted series of experiments on clinorotation where a pharmacological approach was applied and influence of an inhibitor of tubulin polymerization (oryzalin) and a destroyer of actin filaments (cytochalasin D) on the organization of both microtubules and microfilaments in the cortical region of cortex cells in the root distal elongation zone was revealed. Simultaneously, genetic regulation of cytoskeleton organization was studied. Namely, it was determined how partial destruction of microtubules and actin filaments affects transcriptional regulation of TUA6 and ACT2 genes and the genes encoding regulatory proteins of the cytoskeleton. Attention was paid to genes encoding proteins widely involved in organization of cell-wall-cytoplasmic membrane-cytoskeleton continuum, namely, microtubule-associated proteins that provide stabilization of MT polymer plus-end (CLASP) and spatial organization of the cortical microtubule network (MAP65-1), proteins that bind to actin filaments, ensure their nucleation and connection with plasma membrane, cell wall and microtubules (formins FH1 and FH4), as well as proteins that contribute to connection of microtubules with plasma membrane and interaction between microtubules and actin filaments (phospholipase PLD δ).

It was determined that in *A. thaliana* under control stationary conditions there is a connection between microtubule depolymerization and a decrease in expression of *TUA6* gene, depolymerization of actin filaments and a decrease in expression of *ACT2*. This indicates the reverse influence of free monomers of tubulin and actin pool on expression of structural cytoskeleton genes *TUA6* and *ACT2* and may be a manifestation of a regulatory relationship. It was established that under clinorotation, this connection is not manifested for both *TUA6* and *ACT2*, which indicates another regulatory relationship between MT and AF depolymerization and expression of genes encoding their structural proteins.

According to the results, application of oryzalin also reduces expression of *ACT2*, and application of cytochalasin D inhibits expression of *TUA6*. In addition, partial disruptions of actin filament network after exposure to oryzalin and disruption of cortical microtubules after exposure to cytochalasin D were noted,

which confirms cross-reciprocal regulation and indicates interdependent functioning of microtubules and actin filaments in the responses of cell cortical cytoskeleton to external stimuli. There was no connection between MT depolymerization and decrease in *ACT2* expression and this indicates important role of actin in interconnection MT/AFs.

For the first time, our studies revealed effect of depolymerization of microfilaments on expression of *MAP65-1*, proving connection between actin cytoskeleton and MAP65-1, which is normally involved in formation of cortical microtubule network. It is possible that MAP65-1 also interacts with actin filaments, likely due to its possible posttranslational modifications or indirectly through other associated proteins and thus, participates in interdependent functioning of the elements of cortical cytoskeleton network.

To reveal the mechanisms of such interdependent regulation of the cytoskeleton, gene encoding formins (FH1 and FH4), which connect microtubules and actin filaments to each other and to cytoplasmic membrane, was studied. It was shown that depolymerization of actin filaments decreases *FH1* and increases *FH4*. Despite belonging to the same formin class I, this may mean different mechanisms of regulation by FH1 and FH4 proteins the organization of microfilaments and their connection with plasma membrane. It is suggested that increased expression of FH4 indicates the key role of FH4 protein in actin polymerization, formation of its cortical network, as well as interaction with microtubules under stress conditions.

Our investigations did not reveal any connection between clinorotation and/or depolymerization of both elements of the cytoskeleton and gene expression of plant-specific phospholipase $PLD\delta$, which is considered one of the key proteins of plant signaling. This evidences absence of PLD δ involvement in plant cell reaction to clinorotation, and probably, about absence of cMT separation from the plasma membrane under such type of mechanical stress.

Based on the analysis and generalization of the obtained results, it was concluded that clinorotation causes mechanical stress in the cells of the elongation root zone, associated with a decrease in gravitational load from protoplast to the cortical region, which eventually breaks the connection between the cytoskeletoncytoplasmic membrane-cell wall continuum. Mechanical stress reduces the need for a rigid cytoskeleton and cell wall and is the cause of decreased expression of the *TUA6* and *CLASP* genes, which resulted in separate MT disorientation, in loosening of both cMT and microfibril cell wall networks. Decrease of rigidity of cortical microtubules and cell wall reduces resistance to mechanical pressure and this resulted in increase of cellular parameters, in particular, cell length and width during 1D clinorotation. We assume that, in general, above specific processes are the cause of the observed change in growth rates in the plant roots.

At the same time, altered gravity activates a specific adaptation mechanism involving the cytoskeleton. It was determined that during clinorotation, there is no inverse relationship between the depolymerization of microtubules and expression of TUA6, between depolymerization of microfilaments and expression of *FH1*, *FH4* and *MAP65-1*. It proves activation of another regulatory relationship between the cytoskeleton and expression of genes encoding its structural and associated proteins. It is highly likely that such stress caused by altered gravity encompasses actin filaments, CLASP, FH1, FH4 and MAP65-1 involvement in the cytoskeleton functioning, interconnection of its elements as well as plasma membrane and cell wall connection in stressful conditions.

When studying the effect of hypoxia on the cytoskeleton of root cells, a new approach was applied and natural model objects were investigated, in particular, airwater plants *A. plantago-aquatica* and *S. latifolium*, which are affected by a lack of oxygen due to constant immersion of their roots in the soil under water. In addition, the Archimedean force acts on the roots of these plants, counteracting gravity force, and therefore, roots of the plants are affected by altered gravity as well. Studies of *A. plantago-aquatica* and *S. latifolium* revealed formation of intra–root cavities – aerenchyma, which is an adaptive response and improves gas exchange between root and stem under hypoxia. It is established that *A. plantago-aquatica* has schizogenic type aerenchyma which is formed in root cortex cells by separation of the cell files (rows). During the row separation the cells are not damaged. In *S. latifolium* there is

a mixed type aerenchyma – schizogenic and lysigenous. Mixed type aerenchyma evidences plasticity necessary for plant adaptation to not stable environment. It was determined that elements of the cytoskeleton are involved in the process of aerenchyma formation. Thus, it was found that during development of schizogenic aerenchyma in *A. plantago-aquatica*, the microtubules in cell rows of the cortex change their position from transverse to the main root growth to oblique and sometimes, become disorganized, which, as it is assumed, disrupts their connection with plasma membrane distorting cell wall organization and ultimately, leads to separation of cell rows and formation of inner root cavities.

It has been confirmed that formation of lysigenous aerenchyma in S. latifolium leads to reorganization of tissues and elimination of cortex cells by means of programmed cell death, occurring in an apoptosis-like way. Firstly, specific features of programmed cell death in the tissue of S. latifolium root cortex were investigated. It has been found that the most prominent feature is nucleus lysis at the very first stages of the cell reduction. It has been found that first reactions during cell death is cell wall loosening. In cortex cell of S. latifolium root nucleus and organelles are eliminated gradually by lysis. At the same time, some of the organelles are preserved in small number till the final stages of cell reduction. It was established that cytoskeleton elements, namely cortical microtubules, begin to break down already at the initial stages of cell death. Destruction of microtubules causes membrane invagination and cell wall loosening, resulting in general loss of cell integrity. At the same time, endoplasmic microtubules together with remnants of actin cytoskeleton are preserved until the final stages of cell death, which preserves cell and root trophic. This was also confirmed by study of microtubule organization during formation of artificially induced aerenchyma in Z. mays roots.

In the present studies, no visible changes in organization of cellular microfilament network were found, but its mediated changes under hypoxia impact are assumed. Different levels of membrane lipid peroxidation were established in air-water and terrestrial genotypes of the *Sium* family. It is suggested that different levels of lipid peroxidation in air-water and terrestrial plants may be due to plant

species specificity. Also, increased level of lipid peroxidation in plasma membrane of terrestrial plant *S. sisaroideum* root, as opposed to aquatic *S. latifolium*, is associated with lower dynamics of actin cytoskeleton, which is necessary and sufficient to ensure only growth processes. At the same time, plants in which aerenchyma is formed are characterized by a comparatively reduced level of membrane lipid peroxidation and, subsequently, relatively increased actin dynamics, which may be an expression of actin cytoskeleton involvement in both whole root growth and growth of cells affected by cell death during aerenchyma formation. All above preserves normal functioning of root, where destructing processes take place. Thus, our data reveled that changes of cortical cytoskeleton dynamics is a prerequisite of plant adaptation to such stimuli as modeled microgravity and hypoxia.

The data presented in the dissertation are a significant contribution to determining the functional organization of microtubules and actin filaments and their involvement in cellular processes aimed at adaptation to unstable environmental conditions. In general, understanding the nature of plant cell response to mechanical stress and hypoxia provides ample opportunities for designing plants tolerant to adverse conditions, such as closed systems for life support during long-term space missions. Control of responses to mechanical stress is important for agriculture, in particular, to solve such problems as optimizing absorption of nutrients by the root, thus, achieving the maximum efficiency of photosynthesis.

Key words: tubulin microtubules, actin filaments, plant cytoskeleton, clinorotation, altered gravity, mechanical stress, cytoskeleton-associated proteins, root aerenchyma, distal elongation zone, hypoxia, cell wall, cytoplasmic membrane.

3MICT

ПЕРЕЛІК У	МОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	31
ВСТУП		33
ОГЛЯД ЛІТ	ЕРАТУРИ	41
РОЗДІЛ 1.	Структура цитоскелету вищих рослин	
1.1.	Організація та функціонування мікротрубочок	41
1.1.1.	Інтерфазні угруповання мікротрубочок	45
1.1.2.	Нуклеація мікротрубочок	46
1.1.3.	Сигнальні шляхи за участю мікротрубочок	47
1.2.	Організація та функціонування актинових філаментів	48
1.3.	Регуляція організації мікротрубочок та актинових	
	філаментів асоційованими білками	52
1.4.	Взаємозалежне функціонування елементів цитоскелету у	
	реакціях на зовнішній стрес	60
РОЗДІЛ 2.	Реакції цитоскелету рослин на модельовану	
	мікрогравітацію та гіпоксію	
2.1.	Мікрогравітація космічного польоту та модельована	
	мікрогравітація в наземних експериментах	62
2.1.1.	Моделювання умов космічного польоту на Землі	62
2.1.2.	1–D та 2–D кліностатування	63
2.1.3.	Терміни для визначення зміненої сили тяжіння	64
2.2.	Зона розтягу кореня вищих рослин	65
2.3.	Перебудови мікротрубочок та актинових філаментів в	
	умовах реальної мікрогравітації та кліностатування	69
2.4.	Реакції цитоскелету рослин на гіпоксію	71
2.4.1.	Розвиток гіпоксії у рослинах під час космічних польотів	71
2.4.2.	Формування аеренхіми у коренях вищих рослин	74
2.4.3.	Участь елементів цитоскелету у формуванні аеренхіми	
	коренів вищих рослин	77

РОЗДІЛ З. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

		26
3.1.	Матеріал для досліджень та підготовка експериментів	81
3.2.	Організація експериментів	82
3.2.1.	Використання кліностатів для моделювання умов зміненої	
	сили тяжіння	82
3.2.2.	Використані інгібітори тубуліну і актину	85
3.2.2.1.	Таксол	86
3.2.2.2.	Оризалін	87
3.2.2.3.	Цитохалазин D	87
3.2.2.4.	Фаллоідин	89
3.2.3.	Умови вирощування рослин Beta vulgaris та Zea mays	89
3.2.4.	Умови вирощування рослин Arabidopsis thaliana – GFP–	
	MAP4 та Arabidopsis thaliana – GFP–ABD2	90
3.2.5.	Відбір повітряно–водних рослин Alisma plantago–	
	aquatica та Sium latifolium	93
3.3.	Виявлення структури мікротрубочок та актинових	
	філаментів	94
3.3.1.	Методи імуноцитохімії та світлової мікроскопії	94
3.3.2.	Метод конфокальної та електронної мікроскопії	95
3.4.	Дослідження експресії генів методом ПЛР у	
	реальному часі	97
3.5.	Індукування розвитку аеренхіми в коренях рослин	100
3.6.	Аналіз ступеня пошкодження ДНК коренів рослин	100
3.7.	Визначення перекисного окиснення ліпідів мембрани	101
3.8.	Робота з базами даних	102
3.9.	Статистичні методи обробки результатів експериментів	102
РОЗДІЛ 4.	Вплив кліностатування на організацію цитоскелету на	
	послідовних стадіях диференціації клітин коренів <i>Beta</i>	
	vulgaris ta Zea mays	
4.1.	Обґрунтування напрямків досліджень	104

		27
4.2.	Кортикальні мікротрубочки у клітинах меристеми та зони	
	розтягу коренів	108
4.2.1.	Організація мікротрубочок у меристемі	108
4.2.2.	Організація мікротрубочок у зоні розтягу	110
4.2.3.	Вплив кліностатування на мікротрубочки клітин дистальної	
	зони розтягу	112
4.3.	Вплив таксолу на організацію кортикальних мікротрубочок	
	ростових зон кореня	119
4.4.	Актинові філаменти у ростових зонах кореня	123
4.4.1.	Організація актинових філаментів у меристемі	123
4.4.2.	Організація актинових філаментів у дистальній зоні розтягу	7
	кореня	125
4.5.	Вплив цитохалазину на організацію актинових філаментів	
	ростових зон кореня	129
РОЗДІЛ 5.	Взаємозалежна організація мікротрубочок і актинових	
	філаментів у зоні розтягу коренів Arabidopsis thaliana	
5.1.	Організація кортикальних мікротрубочок зони розтягу	
	коренів A.thaliana – GFP – MAP4 після впливу оризаліну та	
	кліностатування	137
5.2.	Кортикальні мікротрубочки зони розтягу після впливу	
	цитохалазину D та кліностатування	139
5.3.	Актинові філаменти зони розтягу Arabidopsis thaliana –GFP	
	–ABD2 після впливу цитохалазину D та кліностатування	143
5.4.	Актинові філаменти зони розтягу після впливу оризаліну та	
	кліностатування	145
5.5.	Експресія генів, білки яких регулюють організацію	
	цитоскелету коренів Arabidopsis thaliana в умовах	
	кліностатування	146
5.5.1.	Аналіз експресії TUA6, ACT2, MAP65-1, CLASP, PLDd, FH1	
	та FH4 при кліностатуванні	146

		28
5.5.2.	Організація мікротрубочок, актинових філаментів та	
	експресія ТИА6, АСТ2 при дії кліностатування, оризаліну	
	та цитохалазину	152
5.5.3.	Аналіз експресії МАР65-1, CLASP та PLDd при дії	
	кліностатування, оризаліну та цитохалазину	162
5.5.3.1.	Експресія МАР65-1	162
5.5.3.2.	Експресія CLASP	164
5.5.3.2.	Експресія фосфоліпази D delta (PLDб)	166
5.5.4.	Аналіз експресії формінів FH1 та FH4 при дії	
	кліностатування, оризаліну та цитохалазину	167
РОЗДІЛ 6.	Організація елементів цитоскелету у коренях рослин, як	i
	зазнають гіпоксії	
6.1.	Будова аеренхіми у коренях повітряно-водних рослин	
	Alisma plantago – aquatica та Sium latifolium	177
6.1.1.	Формування схизогенного типу аеренхіми	177
6.1.2.	Формування лізигенного типу аеренхіми	178
6.1.3.	Редукція клітин при формуванні лізигенної аеренхіми	185
6.2.	Тубуліновий цитоскелет коренів Alisma plantago- aquatica	
	та Sium latifolium	189
6.2.1.	Організація кортикальних мікротрубочок	190
6.2.2.	Організація ендоплазматичних мікротрубочок	195
6.3.	Організація мікротрубочок у клітинах коренів Zea mays при	
	індукуванні аеренхіми	196
6.4.	Організація актинових філаментів у клітинах коренів	
	повітряно-водних рослин Alisma plantago–aquatica та Sium	
	latifolium	201
6.4.1.	Перекисне окиснення ліпідів у клітинах коренів Alisma	
	plantago– aquatica, Sium latifolium та Sium sisaroideum	204
6.4.2.	Дослідження ступеня пошкодження ДНК у коренях Sium	
	latifolium та Sium sisaroideum	205

		29
РОЗДІЛ 7.	Аналіз та узагальнення результатів досліджень	
7.1.	Альтернативна гравічутливість у коренях та сприйняття	211
	модельованої мікрогравітації	
7.2.	Дистальна зона розтягу кореня – місце відчуття зміни	[
	механічного навантаження при кліностатуванні	216
7.2.1.	Механочутливість клітин рослин	222
7.2.2.	Біофізика росту рослинних клітин	228
7.2.3.	Механочутливі канали цитоплазматичної мембрани рослин	230
7.2.4.	Зв'язок механочутливих каналів плазмалеми із цитоскелетом	238
7.3.	Організація та взаємодія елементів цитоскелету у клітинах	
	коренів вищих рослин	241
7.3.1.	Кортикальні мікротрубочки	241
7.3.2.	Актинові філаменти	245
7.3.3.	Взаємозалежна організація мікротрубочок та актинових	
	філаментів у кортикальній площині клітин коренів	248
7.4.	Участь цитоскелету у специфічній реакції клітини на	
	кліностатування	252
7.4.1.	Організація мікротрубочок та актинових філаментів клітин	
	коренів при кліностатуванні	252
7.4.2.	Зміна транскрипції генів асоційованих із цитоскелетом	
	білків при кліностатуванні	255
7.5.	Роль цитоскелету в адаптації рослин до гіпоксії	265
7.5.1.	Формування аеренхіми у повітряно-водних рослинах	265
7.5.2.	Процеси програмованої клітинної загибелі при формуванні	
	аеренхіми	268
7.5.3.	Участь мікротрубочок та актинових філаментів у реакції	
	клітин коренів на гіпоксію	273
7.6.	Цитоскелет – компонент динамічної системи реагування	
	рослин на зовнішні подразники	285

ВИСНОВКИ	297
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	301
Додаток А	357
Додаток Б	359
Додаток В	360

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АК адвентивні корені
- АДГ алкогольдегідрогеназа
- АР аеренхіма
- АФ-актинові філаменти (мікрофіламенти)
- АФК активні форми кисню
- ДЗР- дистальна зона розтягу (кореня)
- ДНК дезоксирибонуклеїнова кислота
- ЕДТА етилендіамінтетраоцтова кислота
- еМТ- ендоплазматичні мікротрубочки
- ЕР ендоплазматичний ретикулум
- Кон контроль
- Клін кліностатування
- кМТ- кортикальні мікротрубочки
- КС клітинна стінка
- КЧ кореневий чохлик
- М середнє значення
- МС комплекс мінеральних солей Мурашіге та Скуга
- МТ тубулінові мікротрубочки цитоскелету
- МЧК механочутливі мембранні канали
- об/хв оберти за хвилину
- ПКЗ програмована клітинна загибель
- ПДК піруватдекарбоксилаза
- ПЛР полімеразна ланцюгова реакція
- ПОЛ перекисне окиснення ліпідів
- РК редуковані клітини аеренхіми
- РНК рибонуклеїнова кислота
- СОД супероксиддисмутаза
- ТБК тіобарбітурова кислота

- ТХL таксол
- ЦЗР центральна зона розтягу (кореня)
- ЦМ цитоплазматична мембрана
- CD цитохалазин D
- CLASP cytoplasmic linker associated protein
- 1-D-2-D-одно-і двовимірне (кліностатування)
- 1g сила тяжіння
- GFP-green fluorescent protein
- FITC флуоресцинізотіоцианат
- MAP microtubule associated protein
- NCBI Американський Національний Центр Біотехнологічної Інформації
- OR оризалін
- Р тургорний тиск
- РА фосфатидна кислота
- PLDδ фосфоліпаза D дельта (Phospholipase D delta)
- RPM random positioning machine (рандомізуючий 3-D кліностат)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сприйняття та трансдукція сигналів зовнішнього середовища сприяють розвитку адаптивної реакції клітини, яка полягає у швидкій перебудові клітинного метаболізму, спрямованій на підтримання росту та забезпечення життєдіяльності рослини в мінливих умовах. Аналіз клітинних шляхів сприйняття зовнішніх сигналів та їхньої регуляції є вагомим внеском у розуміння механізмів пристосування рослин до варіабельності оточуючого середовища. Одним із компонентів, який опосередковує сприйняття та реагування рослин на навколишні умови є цитоскелет: мікротрубочки (MT) – внутрішньо порожні трубки завтовшки 24 нм, сформовані протофіламентами – полімерами з α – та δ- субодиниць тубуліну (Hashimoto 2015; Muroyama and Lechler 2017; Brouhard and Rice 2018) та полімерні структури (завтовшки 6-7 нм) із глобулярних молекул білка актину так звані актинові філаменти (АФ) або мікрофіламенти. Специфічна для рослин надзвичайна динамічність цитоскелету визначається як будовою МТ і АФ, так і активністю численних асоційованих білків, які регулюють просторове формування мережі цитоскелету та її залучення у життєдіяльність клітини (Staiger and Blanchoin 2006; Henty-Ridilla et al. 2013; Struk and Dhonukshe 2014; Hashimoto 2015; Krtková et al. 2016), зокрема у цитокінез, позиціонування органел, спрямований внутрішньоклітинний транспорт, екзоцитоз та клітинний сигналінг (Wasteneys and Yang 2004; Hussey et al. 2006; Paredez et al. 2006; Higaki et al. 2007; Panteris et al. 2013; Pleskot et al. 2014; Hashimoto 2015). Завдяки зв'язкам цитоскелету із цитоплазматичною мембраною (ЦМ) та клітинною стінкою (КС) формується континуум, функція якого полягає у сприйнятті та формуванні відповіді на біотичні та абіотичні чинники (Wyatt and Carpita 1993; Baluška et al. 2003) у тому числі на іони металів (Al³⁺), дотик та електричний струм (Davies and Stankovic 2006), атаку патогенів та вплив різної інтенсивності освітлення (Blancaflor 2002). Незважаючи на досить розповсюджені дослідження цитоскелету рослин, пізнання його

організації та регуляції потребує подальшого вивчення і це спонукає розробляти нові експериментальні підходи. Відомо, що цитоскелет еволюційно сформувався у полі постійного впливу земного тяжіння (1g), тому за його участю визначаються диференціація, полярність та ріст клітин, гравітропізм верхівкової клітини протонеми мохів (Demkiv et al. 2003), ростові реакції клітин зони розтягу коренів (Кордюм та Шевченко 2003) тощо. Оскільки цитоскелет виступає індикатором реакції рослинних клітин на зміну полярності та сили тяжіння, широко досліджується організація та динаміка його елементів в полі зміненої сили тяжіння – реальної мікрогравітації в космічному польоті та модельованої в наземних експериментах (Kordyum 1997). Виявлено зміни організації мережі цитоскелету та його транскриптому, які пов'язують із пристосувальними реакціями рослин до цього стимулу (Manzano et al. 2022). Проте, багато питань впливу мікрогравітації на цитоскелет залишаються дискусійними, і, насамперед, це стосується функціонування асоційованих із МТ та АФ білків, які регулюють з'єднання та функціональну взаємодію елементів між собою та з ЦМ. Відносно мало відомо про профайли генної експресії, пов'язаної із реорганізацією елементів цитоскелету при мікрогравітації. Знання ролі цитоскелету у пристосуванні рослин до умов зміненої сили тяжіння актуальне для створення біорегенеративних систем життєзабезпечення космонавтів у довгострокових космічних місіях, неодмінним компонентом яких є рослини. Слід зазначити, що в космічному польоті змінюється конвекція повітря, що призводить до клітинної гіпоксії (Porterfield 2002) і негативного впливу на ріст та розвиток рослин. Визначення реакції цитоскелету на гіпоксію в умовах космосу вимагає знання його організації у рослин, на які даний стимул діє у природних умовах. І це підвищує важливість дослідження організації елементів цитоскелету у рослин, онтогенез яких проходить частково у воді, в умовах зниженої біодоступності кисню. Як відомо, у відповідь на нестачу кисню у корі коренів рослин формується аеренхіма (АР) – система внутрішніх порожнин для покращення газообміну між стеблом та коренем (Evans 2003; Visser et al. 2003). Встановлено, що елементи цитоскелету беруть участь у процесах,

пов'язаних із формуванням аеренхіми (Kordyum et al. 2019), однак, залишаються невирішеними такі питання як послідовність участі та роль актинових філаментів та мікротрубочок у формуванні аеренхіми різних типів у природних умовах і, тим більше, в умовах мікрогравітації. Тому проведення порівняльних досліджень організації цитоскелету у коренях повітряно-водних а також наземних рослин та рослин, вирощених в умовах кліностатування вважаємо ефективним для відповіді на такі питання. Окреслені питання участі МТ та АФ у реакції клітин коренів на зміну сили тяжіння та гіпоксію стали основою для визначення мети і формування завдань роботи.

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

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

- 1. Дослідити організацію елементів кортикального цитоскелету (мікротрубочок та актинових філаментів) на послідовних стадіях диференціації клітин ростових зон коренів рослин *Beta vulgaris, Zea mays, Alisma plantago– aquatica* та *Sium latifolium*.
- 2. Виявити участь мікротрубочок та актинових філаментів у реакції клітин ростових зон коренів *Beta vulgaris, Zea mays* та *Arabidopsis thaliana* на кліностатування та дію інгібіторів цитоскелету.
- 3. Дослідити взаємозалежність організації мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* та визначити вплив кліностатування на взаємозалежну організацію елементів цитоскелету.
- 4. Виявити вплив оризаліну та цитохалазину D на організацію мікротрубочок та актинових філаментів (відповідно) у зоні розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* та визначити експресію генів *TUA6* та *ACT2* у коренях під час кліностатування.
- 5. Визначити експресію генів *MAP65-1, CLASP, PLDd, FH1* та *FH4* у клітинах коренів *Arabidopsis thaliana* при кліностатуванні та дії оризаліну та цитохалазину D.
- 6. Дослідити будову аеренхімних порожнин у коренях рослин Alisma plantago- aquatica та Sium latifolium та визначити їхні типи.
- 7. Порівняти показники перекисного окиснення мембрани та пошкодження ДНК у коренях суходільних та повітряно-водних рослин Alisma plantago–aquatica, Sium latifolium та Sium sisaroideum.
- 8. Визначити роль мікротрубочок та актинових філаментів у формуванні природної аеренхіми коренів *Alisma plantago–aquatica, Sium latifolium* та штучно індукованої аеренхіми у коренях *Zea mays*.
- 9. Проаналізувати роль мікротрубочок та актинових філаментів у реакціях клітин коренів на кліностатування та гіпоксію.
Об'єкт дослідження: клітинні механізми адаптації рослин до абіотичного стресу за участі кортикального цитоскелету.

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

Методи дослідження: методи клітинної біології – світлова, електронна та конфокальна мікроскопія, класичні цитологічні та імуногістохімічні методи обробки рослинних об'єктів. Метод прижиттєвого спостереження об'єктів за допомогою конфокальної мікроскопії. Молекулярно–генетичні – виділення ДНК та РНК, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (qPCR). Біохімічні – визначення перекисного окиснення мембран у рослинних об'єктах. Біоінформатичні – робота з білковими та генними базами даних. Методи статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше досліджена та проаналізована організація елементів кортикального цитоскелету (мікротрубочок та актинових філаментів) на послідовних стадіях розвитку клітин коренів таких видів як B. vulgaris, A. plantago-aquatica та S. latifolium та проведена порівняльна характеристика із організацією елементів цитоскелету Z. mays, на основі чого визначена подібність організації елементів цитоскелету у клітинах ростових зон коренів вищих рослин. Оцінено вплив кліностатування на організацію мікротрубочок та актинових філаментів у різних ростових зонах коренів B.vulgaris, Z.mays та A.thaliana. Вперше встановлено, що кліностатування сприяє частковій дезорієнтації (близько 10-13%) кортикальних мікротрубочок від впорядкованого поперечного розміщення у клітинах дистальної зони розтягу кореня. Висунуто припущення, що дезорієнтація кМТ є ймовірною складовою зміни темпів росту коренів при кліностатуванні. Припускається, що певний внесок у дезорганізацію кМТ при кліностатуванні складає знижена експресія гену, який кодує мономери тубуліну (ТИАб) та зв'язаний із мікротрубочками білок CLASP (CLASP), який кодує організатор та стабілізатор мережі МТ. Зроблено припущення, що це може позначатися на порушенні полімеризації мікротрубочок та дезорганізації їхньої мережі. На морфологічному та молекулярному рівнях продемонстрований взаємозв'язок між кортикальними мікротрубочками та актиновими філаментами у клітинах коренів вищих рослин. Виявлена взаємозалежність організації МТ та АФ та експресії їхніх кодуючих генів (*TUA6*, *ACT2*). Вперше встановлений зв'язок між руйнуванням кМТ та зниженням транскрипції гену *CLASP*, а також між руйнуванням мережі АФ та транскрипцією *FH1* та *FH4*, які кодують форміни – організатори мережі АФ. Окрім того, вперше виявлена залежність експресії *MAP65-1* від дезорганізації АФ, що свідчить про участь MAP65-1 у взаємозалежному функціонуванні мережі МТ та АФ, яке, ймовірно, полягає у формуванні перехресних з'єднань елементів цитоскелету у кортикальній площині клітини.

Вперше визначено, що при кліностатуванні не відмічається зв'язок між організацією кортикальних МТ та АФ та експресією *TUA6, CLASP, FH1* та *FH4*, що свідчить про специфічний механізм функціонування кортикального цитоскелету при мінімізованому впливі гравітації. Припускається, що кліностатування чинить механічний стрес, який полягає у знятті навантаження на елементи кортикального цитоскелету і цей процес регулюється на генному рівні. Запропонована схема реакції кортикального цитоскелету на кліностатування і його участі у формуванні адаптаційної відповіді на даний вид механічного стресу.

Вперше визначена специфічність формування аеренхіми лізигенного типу у повітряно-водної рослини *S.latifolium* та встановлені етапи програмованої клітинної загибелі за участі кортикальних МТ під час формування природної аеренхіми коренів *A.plantago aquatica, S.latifolium* та штучної аеренхіми у коренях *Zea mays.* Висловлено припущення про функціональні зміни мережі АФ в процесі розвитку аеренхіми коренів. Всебічно проаналізована роль МТ та АФ у реакціях клітин коренів на механічний стрес та гіпоксію та представлена модель участі цитоскелету у адаптації до кліностатування. Результати роботи окреслюють широке коло перспективних досліджень стану клітин рослин як в умовах симульованої мікрогравітації, так і дії інших типів абіотичного стресу.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи суттєво розширюють уявлення про реакцію клітин коренів на такі типи абіотичного стресу як механічне навантаження та нестача кисню у середовищі, що є вагомим внеском у космічне рослинництво, оскільки дає підгрунття для створення умов вирощування рослин під час довготривалих пілотованих місій. Окрім того, дані щодо реакції цитоскелету на навколишні стимули, зокрема, дезорієнтування у просторі, є цінними для біотехнології сільськогосподарських культур, стійких до залягання та поламки стебел під час буревіїв, що запобігає втраті врожаю. Дані роботи можуть бути використані у курсах з космічної біології рослин, клітинної та молекулярної біології у контексті механізмів реалізації стійкості рослин до стресу.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною науковою працею, виконаною на основі власних експериментальних розробок та теоретичних узагальнень. Автором дисертаційної роботи самостійно сформульовано її концепцію та розроблено структуру, здійснений аналіз літературних джерел за тривалий період часу, окреслені експериментальні завдання, проведений аналіз результатів експериментів, сформульовані узагальнення та висновки. Основна дослідна робота проведена дисертантом особисто. До Розділу 6 включені дані щодо типу аеренхіми у коренях рослин, отримані разом із Бриковим В.О. та Іваненко Г.Ф. – співробітниками відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Інтерпретація та узагальнення частини результатів розділів 4-6 здійснювалися разом із співавторами публікацій: Крутовським К.В., Бриковим В.О., Калініною Я.М., Кордюм Є.Л., та Франклін-Тонг В. Матеріали статей обговорювали а висновки узгоджували із усіма учасниками публікацій. План дисертаційної роботи, теоретичні уявлення щодо впливу модельованої мікрогравітації та гіпоксії на рослинну клітину, вступ та висновки роботи обговорювалися із керівником відділу клітинної біології та анатомії, член-кореспондентом НАН України,

професором, д.б.н. С.Л. Кордюм. Висновки, наукові узагальнення, теоретичні положення та припущення сформульовані автором особисто.

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

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їхнього обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел складається із 537 найменувань. Обсяг основного тексту дисертації складає 293 сторінки друкованого тексту. Робота містить 14 таблиць, 74 рисунки та 3 додатки.

РОЗДІЛ 1

СТРУКТУРА ЦИТОСКЕЛЕТУ ВИЩИХ РОСЛИН

1.1. Організація та функціонування мікротрубочок

Один із основних компонентів цитоскелету рослин – мікротрубочки (МТ) являють собою порожнисті циліндри діаметром приблизно 24–25 нм, які у більшості еукаріот утворені 13-ма протофіламентами (Elliott and Shaw 2018). Мікротрубочки формуються шляхом самозбирання гетеродимерів α (альфа) та β (бета) тубуліну, молекулярна маса кожного із яких становить близько 50 кДа (рис.1.1).



Рис. 1.1. Полімерна структура мікротрубочки (Micro.magnet.fsu.esu)

Протофіламенти залягають паралельно, утворюючу циліндричну полярну структуру, в якій МТ утримуються разом бічними водневими зв'язками. Відкритий кінець МТ, на якому розміщений β –тубулін, є плюс–кінцем, а кінець з α –тубуліном називають мінус-кінцем (Hashimoto 2015; Elliott and Shaw 2018; Hsiao and Huang 2023). Тринадцять протофіламентів мікротрубочок еукаріотичних клітин утворюють решітку типу В зі швом. У решітці такого типу α – і β –тубулінові мономери одного протофіламенту асоціюються відповідно з α – і β – мономерами по всій довжині сусіднього протофіламента по типу «від голови до хвоста».

С-кінцеві залишки α – і β– субодиниць мають кислу реакцію, завдяки чому зазнають різних пост-трансляційних модифікацій (Blume et al. 2008 a, b). Оскільки кожна субодиниця тубуліну зв'язує одну молекулу GTP, гетеродимер β – тубуліну має два сайти зв'язування із GTP. N- сайт (незамінний – non echangable site) α – тубуліну залягає у поздовжній порожнині між димерами. GTP на N- сайті не гідролізується і виконує структурну роль. Вільні димери тубуліну із приєднаним GTP на E- сайті легко обмінюються нуклеотидами з GTP в цитоплазмі, таким чином генеруючи пул здатного до полімеризації тубуліну (Hashimoto 2015; Elliott and Shaw 2018). Протофіламенти, утворені із GTP-тубуліну, формують прямі структури і утворюють міцну решітку МТ, схильну до полімеризації, тоді як протофіламенти GDP – тубуліну – вигнуті і утворюють нестабільну решітку мікротрубочок, яка тримається разом за рахунок слабших бічних взаємодій і легко деполімеризується. Таким чином, полімеризація МТ та гідроліз GTP механістично пов'язані, що визначає характерну метастабільну поведінку МТ. Мікротрубочки у фазі росту зазнають динамічних переходів між полімеризацією та скороченням, і, як правило, мають конічні кінці, в яких декілька злегка вигнутих, приєднаних з боків протофіламентів простягаються із однієї сторони МТ і виявляють листоподібну організацію. Мікротрубочки, які деполімеризуються, мають рогоподібні кінці, у яких окремі протофіламенти не взаємодіють один з одним з боків і є вигнутими назовні (рис.1.2).

Плюс кінці МТ також можуть бути тупими, якщо протофіламенти мають майже однакову довжину і залишаються паралельними один до одного (Hashimoto 2015). Показано, що нові МТ ініціюють ріст на метастабільних тупих кінцях, які не зазнають катастрофи (швидкого розбирання) і поступово стають динамічнішими, а їхні кінці часто набувають конічної форми (Gardner et al. 2012).

Плюс кінці, які швидко деполімеризуються, раптово і стохастично припиняють скорочення і переходять до стану полімеризації *in vitro* та in *vivo*.



Рис.1.2. Молекулярна будова мікротрубочок (Microtubule Dynamics/SpringerLink, link.springer.com)

Така подія називається порятунком (на противагу катастрофі), і вона завершує цикл динамічної стабільності МТ (Hashimoto 2015). Таким чином, висока динамічність структур МТ, частково забезпечується постійним переходом від періоду росту до вкорочення, що є предметом механістичних досліджень. Слід зазначити, що дуже динамічні МТ ростуть зі швидкістю декілька сотень нанометрів на секунду та постійно реорганізуються у відповідь на зовнішні сигнали (Wasteneys 2004). $\alpha - i \beta - тубуліни поділяють$ близько 40 % ідентичних послідовностей амінокислот і їхні молекулярні структури в основному однакові (Gasic 2022). Послідовності білків TUA і TUB дуже консервативні у порівнянні між ізоформами тварин, рослин, та грибів з якими вони, зазвичай, поділяють 88% подібності амінокислот (Dutcher 2001). Геноми багатоклітинних еукаріот кодують кілька генів тубуліну. Множинні ізотипи рослинних тубулінів є результатом експресії цілої родини генів, які кодують різні субодиниці тубуліну. Наприклад, Arabidopsis thaliana має шість генів α -тубуліну (Корсzak et al. 1992) і дев'ять генів β -тубуліну (Nsamba et al. 2022). Більшість відмінностей між ізотипами Arabidopsis локалізовані на Скінцях. Деякі ізотипи тубуліну під час розвитку рослин експресуються у спеціалізованих клітинах або тканинах (Hashimoto 2013; Breviario et al. 2013; Elliott and Shaw 2018; Nsamba et al. 2022; Hsiao and Huang 2023). Tak, Y α -тубуліну (At1g64740) та *TUB9* β-тубуліну Arabidopsis гени TUA1

(At4g20890) експресуються виключно або переважно у пилку (Cheng et al. 2001), тоді як чотири інших – у вегетативних тканинах (Kopczak et al. 1992; Abe et al. 2004). З дев'яти TUB, у Arabidopsis, AtTUB1 i AtTUB5 експресуються переважно у коренях та листках (Cheng et al. 2001). У Oryza sativa також знайдена специфічна для пилку ізоформа (OryzaTUB8) та сім інших TUB, експресія яких змінюється під час розвитку (Yoshikawa et al. 2003). Велика неоднорідність ізоформ обох тубулінів є також результатом різних посттрансляційних модифікацій, які призводять до появи різних популяцій мікротрубочок з різними функціональними властивостями. Різні типи протеїнкіназ фосфорилюють серин/треонінові, а також тирозинові залишки рослинних тубулінів і це породжує високий рівень поліморфізму рослинного тубуліну (Blume et al. 2008 a, b). Амінокислота треонін 349 α-тубуліну мутанта Arabidopsis при гострому гіперосмотичному стресі миттєво фосфорилюється, а потім поступово дефосфорилюється (Fujita et al. 2013). Цей залишок треоніну знаходиться у поздовжньому просторі між димерами тубуліну і його фосфорилювання ефективно інгібує полімеризацію МТ *in vitro* та індукує швидку деполімеризацію мікротрубочок *in vivo* (Fujita et al. 2013). Оскільки ділянки фосфорилювання розташовані по всій довжині обох молекул тубуліну, цілком можливо, що цей тип пост-трансляційної модифікації в рослинах може брати участь у модуляції тубулін-тубулінової взаємодії та взаємодії тубулінів з іншими білками, включаючи асоційовані із мікротрубочками (microtubule associated proteins –MAPs), інші цитоскелетні білки та цитоплазматичну мембрану (ЦМ) а також у регулюванні функціональної стійкості/ нестабільності мікротрубочок (Blume et al. 2008 a; Hashimoto 2015; Bera and Gupta 2022). Слід додати, що функціональна гетерогенність мікротрубочок, зумовлена такими модифікаціями тубуліну, як детирозилювання на С-кінці, фосфорилювання та ацетилування, визначає концепцію «тубулінового коду» (Gadadhar et al. 2017; Rayevsky et al. 2019). Проте, досі залишаються невизначеними усі функції гетерогенних мікротрубочок (Blume et al. 2008 а; Bera and Gupta 2022).

1.1.1.Інтерфазні угруповання мікротрубочок

У інтерфазній клітині рослини так звані кортикальні МТ (кМТ) утворюють мережу під цитоплазматичною мембраною, де, у залежності від типу клітини та фази росту, мають загалом поперечне або поздовжнє розташування (рис.1.3).



Рис. 1.3. Різні напрямки залягання кортикальних мікротрубочок у клітинах ростових зон кореня *Arabidopsis thaliana*: від поперечних у меристемі, навкісних у зоні розтягу до поздовжніх у зоні диференціації. Масштаб 10мкм

Кортикальні мікротрубочки локалізуються перпендикулярно до осі розширення клітини і спрямовують поперечну збірку целюлозних мікрофібрил, яка у свою чергу, сприяє осьовому росту. Коли кМТ у клітинах, які розширюються поздовжньо, змінюють орієнтацію на косу, напрямок росту починає здійснюватися у напрямку, перпендикулярному до вирівнювання мікротрубочок (Hashimoto 2011). Загалом вважають, що кМТ визначають форму клітини через спрямоване розміщення матеріалу клітинної стінки (КС). Жорсткі мікрофібрили целюлози обмежують напрямок розширення, що сприяє формуванню чіткої форми рослинних клітин. Оскільки МТ залягають сумісно з мікрофібрилами целюлози, вважають, що орієнтація мікрофібрил визначається орієнтацією кМТ і у такий спосіб МТ здійснюють спрямований контроль за анізотропним розширенням рослинних клітин (Baskin 2001).

Основна роль кортикальних МТ полягає у керуванні рухом вбудованих у цитоплазматичну мембрану целюлозо-синтазних комплексів, які синтезують ланцюги b–1,4–глюкану (Paredez et al. 2006; Gutierrez et al. 2009).

Окрім того, кМТ спрямовують ріст рослин та їхній морфогенез, впливаючи на поділ клітин, їхню полярність і відповідь на абіотичні стреси (Lindeboom et al. 2013; Pleskot et al. 2014). Порушення або зміна організації МТ призводить до анормального росту і розвитку клітин.

1.1.2. Нуклеація мікротрубочок

У рослин за відсутності чітких центрів нуклеації (центросом і центрів веретена поділу як у клітинах дріжджів та грибів), МТ ініціюються у численних дисперсійних сайтах поблизу цитоплазматичної мембрани (Masuda et al. 2013). Під час інтерфази і зокрема, у певних типах рослинних клітин (кореневі волоски) нуклеація МТ відбувається на поверхні ядра (Ambrose and Wasteneys 2014). Відомо, що ендоплазматичні МТ (eMT) забезпечують певне положення органел у клітині і разом із актиновим цитоскелетом можуть брати участь в доставці матеріалу клітинної стіни до периферії клітини на ЦМ (Hashimoto 2015). Нуклеація МТ забезпечується еволюційно консервативним у – тубуліновмісним кільцевим комплексом (γ -tubulin-containing ring complex (γ -TuRC) (Roostalu and Surrey 2017), який в основному регулюється білком Augmin (augmin-від латинського дієслова augmentare, «збільшувати») (Goshima et al. 2008). Білок катанін внутрішньо руйнує МТ, залежні від аденозин 5'- трифосфату (АТР), особливо у перехрестях МТ, де дочірні МТ, які від'єдналися, здатні через тредміллінг переміщуватися для формування нових конфігурацій МТ. Таким чином, у рослин γ -TuRC комплекс і катанін є центральними компонентами синтезу нових MT у кортикальній області клітини (Ehrhardt and Shaw

2006; Hsiao and Huang 2023). До цього процесу залучені також додаткові регуляторні фактори та / або пост-трансляційні модифікації білків комплексу нуклеації.

1.1.3. Сигнальні шляхи за участю мікротрубочок

Рослинні МТ здатні реорганізовуватися у відповідь на ендогенні сигнали та зовнішні стимули, а кМТ ϵ не лише мішенями для сигналінгу, але і активно задіяні у ньому. Відомо, що в епідермальних клітинах різних тканин рослин фітогормони спричиняють переорієнтацію кМТ на поперечні або поздовжні (Shibaoka 1994). Гіббереліни та брасиностероїди сприяють поперечній організації мікротрубочок, тоді як етилен та абсцизова кислота, зазвичай, індукують поздовжньо орієнтовані МТ. Синхронна обробка ауксином та гібереліном спричиняють утворення поперечних МТ у клітинах гіпокотилю *Arabidopsis*, який росте на світлі (Vineyard et al. 2013).

З іншого боку, здається, що добре вирівняні поперечні масиви мікротрубочок у меристемі стебла *Arabidopsis* стримують ініціацію органів, опосередковану ауксином (Sassi et al. 2014). В клітинах трихобластів коренів *Lactuca sativa* (салат), ініціація кореневих волосків пригнічується впорядкованими масивами к МТ (Takahashi et al. 2003). У коренях та етиольованих гіпокотилях *Arabidopsis*, екзогенне застосування концентрацій ауксину, що інгібують видовження, індукує швидку зміну орієнтації мікротрубочок з поперечної на поздовжню. Така швидка реакція на ауксин залежить в основному від ауксин-зв'язуючого білка 1 (ABP1; At4g02980) та його низхідного компоненту по ланцюгу сигналінгу, такого як ROP6 GTPase (At4g35020) і взаємодіючого з ROP- білка RIC1 (At2g33460) (Chen et al. 2014).

У вистелюючих клітинах (pavement cells) *Arabidopsis* ABP1-ROP6-RIC1 сигнальний шлях сприяє впорядкуванню кМТ в області виступу (Xu et al. 2010), де RIC1 модулює розділення мікротрубочок катаніном (Lin et al. 2013). Підвищена експресія кількох генів МАР регулююється фітогормонами і може

сприяти довгостроковій реорганізації кМТ (Wang et al. 2012 a, b). Окрім того, зневоднення, засолення, механічний стрес, низька температура та алюміній дестабілізують кортикальні МТ (Wang et al. 2011 b; Krtková et al. 2012; Ban et al. 2013). Сольовий стрес індукує швидку деполімеризацію МТ у *Arabidopsis* та формування їхньої нової мережі через реполімеризацію (Wang et al. 2011 a; Zhang et al. 2012).

1.2. Організація та функціонування актинових філаментів

Актиновий цитоскелет регулює більшість етапів розвитку рослинних клітин, клітинний морфогенез, встановлення та підтримку полярності клітин. Основні компоненти актинового цитоскелету представлені мономерним білком актином (G-актин) та його полімеризованою формою – актиновими філаментам (АФ, інакше - мікрофіламенти або F-актин). Мономерний актин є асиметричним поліпептидом 42 кДа з чотирма субдоменами, організованими навколо глибокої щілини, яка містить сайти зв'язування із нуклеотидами і двовалентними катіонами. Процес полімеризації актинових філаментів регулюється численними актин-асоційованими білками (Hussey et al. 2006; Staiger et al. 2009). Швидкість полімеризації філамента обмежується наявністю затравки із двох або трьох субодиниць актину і після нуклеації швидко починається подальше подовження. Філаменти діаметром 7-9 нм являють собою два ланцюги субодиниць з правостороннім спіральним закручуванням із 13 субодиницями на оберт (Oda et al. 2009). Актинові філаменти характеризуються полярністю із повільно зростаючим «загостреним» кінцем та швидкозростаючим «колючим» кінцем. Кожний АФ створюється збіркою мономерів відмінностями асиметричних та нуклеотидного складу субодиниць по довжині філамента. Загалом, всі клітини тканин еукаріот мають однакову будову угруповань актинових філаментів, які утворюють складну переплетену мережу із пучків мікрофіламентів різної щільності. Актинові філаменти оточують ядро і інші органели, які через це виглядають ніби «підвішеними» у клітині (рис. 1.4).



Рис.1.4. Актинові філаменти меристеми коренів *Lepidium sativum* (апоперечний зріз) та *Zea mays* (b-поздовжній зріз). Масштаб 10 мкм

Мережа актину з'єднана із більшістю клітинних органел і ендомембранних компартментів (Wang and Hussey 2015). Для АФ характерна динамічність, яка забезпечує швидку реакцію на позаклітинні та внутрішньоклітинні сигнали, включаючи механічну стимуляцію (Hardham et al. 2008) та дію гормонів (Lanza et al. 2012; Li et al. 2014).

Актинові філаменти – основна складова механізму клітинного транспорту (рух цитоплазми), руху органел, таких як апарат Гольджі (Hawes 2005), мітохондрії (Van Gestel et al. 2001) і пероксисоми (Jedd and Chua 2002). Окрім цитоплазматичної мережі АФ для клітин кори зони розтягу кореня *Beta vulgaris* описано також кортикальні мікрофіламенти примембранної області клітини (Shevchenko et al. 2007), які залягали як поздовжньо, так і невпорядковано. Поперечні кортикальні АФ у клітинах відмічали у меристемі коренів пшениці (McCurdy et al. 1988) та цибулі (Liu and Palevitz 1992). Мережа із впорядкованих (паралельних та поперечних) та хаотичних АФ та їхніх пучків різної щільності як у клітинному кортексі, так і у цитоплазмі описана для багатьох судинних та голонасінних рослин, клітин коренів кукурудзи, гороху, моркви, протопластів тютюну, суспензії клітин люцерни (Traas et al. 1987; Seagull et al. 1987; Hasezawa et al. 1989; Hush and Overall 1992), тощо. Відомо, що АФ забезпечують також екзоцитоз, формуючи треки, які опосередковують доставку везикул Гольджі до ЦМ. Із везикулами на ЦМ потрапляють компоненти, необхідні для побудови як самої мембрани, так і КС. У такий спосіб відбувається збільшення поверхні мембрани в процесі росту клітини і саме тому зміни організації АФ під впливом зовнішніх стимулів позначаються на ростових параметрах клітин. Під час анізотропного росту рослинної клітини (наприклад, корінь і гіпокотиль), більшість АФ розташовані паралельно напрямку видовження клітини (у той час як МТ в кортикальній ділянці цих клітин є поперечно орієнтованими) (Smertenko et al. 2010).

Окрім ізотропного росту, для клітин рослин характерний також і анізотропний ріст. У ізотропних та анізотропних клітин організація F-актину різна, причому мережі АФ є більш хаотичними у ізотропних клітинах (клітини епідермісу і мезофілу листків) порівняно з анізотропними клітинами (Kotzer and Wasteneys 2006).

Порівняння вистелюючих клітин (pavement cells) сім'ядолі, які ростуть ізотропно із анізотропними епідермальними клітинами у зоні розтягу кореня показало, що вистелюючі клітини містять динамічніші та звивисті пучки F-актину, порівняно із епідермальними клітинами кореня, де спостерігали упорядкованіші пучки AФ. Мережа такого типу як правило, характеризується зниженим темпом росту та скороченням кількості F–актину. Цікаво, що анізотропні клітини одного і того самого типу, які ростуть та які не ростуть, наприклад, епідермальні клітини гіпокотилю, мають подібну звивистість мікрофіламентів, подібну швидкість розпаду та видовження AФ, що вказує на те, що ріст не залежить від швидкості динаміки актину.

Реорганізація актинової мережі відбувається за допомогою двох різних механізмів, які співіснують у часі. Перший стосується формування нових АФ *in vivo* і розрізання або скорочення вже існуючих АФ. Згідно цього механізму мережа сформованих випадковим чином АФ підсилюється спонтанним бічним приєднанням інших АФ, в результаті чого утворюються товстіші

кабелі, які потім можуть випадковим чином подовжуватися і розділятися (стохастична динаміка) (Michelot et al. 2007). Подрібнення мікрофіламентів може відбуватися у декількох місцях за короткий проміжок часу і породжувати численні менші фрагменти, які переміщуються з потоком цитоплазми або дифузно, що призводить до розбирання цілої структури мікрофіламента. Такі фрагменти можуть розпадатися аж до G-актину, який потім знову використовується для полімеризації нових мікрофіламентів. У цитоплазмі клітин завжди є пул G-актину. Виявлено, що інгібування полімеризації філаментів на розрізаних кінцях час від часу призводить до утворення тонких виступаючих АФ. Ці АФ можуть з'являтися від видовження вже існуючих вільних загострених кінців або від утворення нових мікрофіламентів, що формуються білками вздовж вже існуючих АФ, наприклад такими, як формін (formin AtFH1) у Arabidopsis (Michelot et al. 2006). Другий механізм утворення мережі АФ не потребує формування нових АФ і включає в себе зв'язування, роз'єднання та ковзання АФ у постійній динамічній перебудові (Era et al. 2009; Staiger et al. 2009). Щільність АФ в клітинах кореня і в сім'ядолях коливається із певною періодичністю і ці дані свідчать на користь того, що динаміка АФ регулюється коливальним чином, що може співпадати із коливанням іонних середовищ, які безпосередньо або опосередковано регулюють ріст і скорочення мікрофіламентів (Smertenko et al. 2010). Активність багатьох актин-регулюючих білків є чутливою до концентрації Ca²⁺ або H⁺ (розглянуто в Hussey et al. 2006), а отже, роздрібнення та створення пучків АФ може сприяти цьому явищу. Функціонування АФ регулюється сотнями різновидів актин-зв'язуючих білків. Швидкість генерування $A\Phi$ з пулу мономерів *in vitro*, i, мабуть, *in vivo*, обмежується формуванням так званої затравки або ядра з трьох субодиниць актину (Thomas and Staiger 2014).

Цитоскелет рослин – надзвичайно складна багатокомпонентна система клітини, яка забезпечує сприйняття сигналів від зовнішнього середовища і опосередковує відповідь. Незважаючи на тривалі і копіткі дослідження організації МТ та АФ, багато питань щодо їхньої організації та функціонування ще залишаються відкритими. Зокрема не визначені механізми зміни організації мережі МТ та АФ при різних типах біотичного стресу. Існує багато невизначених питань щодо механізмів регулювання допоміжними білками взаємозалежної організації МТ та АФ. Все це потребує пошуку модельних об'єктів, розроблення нових підходів та застосування різноманітних методів дослідження елементів цитоскелету під впливом зовнішніх чинників.

1.3. Регуляція організації мікротрубочок та актинових філаментів асоційованими білками цитоскелету

Динаміка МТ регулюється набором гетерогенних білків, асоційованих з мікротрубочками (БАМ) (microtubule associated proteins або МАР). БАМ, які зв'язуються з МТ по довжині, можуть викликати розшарування МТ, що важливо для структурної організації усіх масивів МТ (Саі 2010). Це відбувається за участю родини **МАР65**, еволюційно консервативних білків із відносною молекулярною масою 60–65 кДа. У рослинних клітинах родина МАР65 стабілізує МТ, утворюючи поперечні з'єднання між МТ, які перехрещуються (Smertenko et al. 2004, 2008; Mao et al. 2005) (рис.1.5).

Білки МАР65 мають на N-кінці coiled-coil ділянку, яка забезпечує димеризаційну активність, а на C-кінці – 16-амінокислотну послідовність, яка відповідає за зв'язування з МТ (Но et al. 2012).

Геном *Arabidopsis* містить дев'ять генів МАР65, що кодують білки, які поділяють 28% (МАР65-4 та МАР65-8) та 78% (МАР65-1 та МАР65-2) подібності амінокислотних послідовностей та мають розміри від 54 до 80 кДа (Hussey et al. 2002; Smertenko et al. 2008) і така гомологія послідовностей свідчить про те, що члени родини МАР65 можуть мати різні властивості та функції (Neumann et al. 2008).



Рис.1.5. Локалізація білків родини МАР65 на кортикальних мікротрубочках (*Hashimoto*, 2015)

Впродовж клітинного циклу члени родини МАР65 по-різному локалізуються на угрупованнях МТ. Так, підродина МАР65-1, включаючи NtMAP65-1, MAP65 моркви та AtMAP65-1 зв'язується з кМТ, препрофазним пучком, мітотичним веретеном та фрагмопластом (Smertenko et al. 2004, 2008; Van Damme et al. 2004). AtMAP65-2 локалізується спільно з At-MAP65-1 майже у всіх масивах МТ рослинних клітин (Smertenko et al. 2008). AtMAP65-1, NtMAP65-1 та AtMAP65-5 декорують кМТ, стабілізують та індукують утворення пучків мікротрубочок (Smertenko et al. 2004; Van Damme et al. 2004). МАР65-1 індукує формування великих пучків МТ, утворюючи 25 нм поперечні містки, однаково розташовані по всій довжині МТ. Ступінь фосфорилювання визначає здатність МАР65-1 зв'язувати МТ, а саме, фосфорилювання послаблює активність зв'язування MAP65-1 і MT (Sasabe and Machida 2006). Енергія зв'язування МАР65 з МТ може посилювати бічні або поздовжні взаємодії тубулінових димерів і таким чином стабілізувати решітку МТ. Альтернативно, містки між МТ, створеними МАР65, можуть протидіяти напруженню, накладеному на решітку МТ через вигнуту конформацію GDP тубуліну. В обох випадках можна припустити, що триваліша асоціація МАР65 з МТ призводить до посилення полімеризації МТ (Smertenko et al. 2008).

Виходячи із організаційної ролі МАР65-1 у формуванні кортикальних мікротрубочок, не виключена його певна роль у механочутливості. У зв'язку з цим ми досліджували вплив механічного стимулу від кліностатування та руйнування обох основних елементів цитоскелету на експресію гену, який кодує МАР65-1.

Серед білків, які регулюють полімеризацію тубуліну та динаміку мікротрубочок-специфічні білкові комплекси на зростаючому плюс-кінці мікротрубочок (так звані + TIP білки), які протидіють напруженню полімеру і стабілізують зростаючі мікротрубочки, упереджуючи катастрофічний вигин протофіламентів назовні (рис.1.2). У клітинах рослин виявлено декілька різних типів + TIP білків мікротрубочок серед яких CLASP (cytoplasmic linker associated protein) – перший ідентифікований білок цієї групи (Ambrose et al. 2007; Bratman and Chang 2008). Родина CLASP локалізується в кінетохорах, мітотичному веретені, центросомах, везикулах Гольджі, примембранному просторі та залучена до широкого спектру функцій, які забезпечують клітинну рухливість, внутрішньоклітинний транспорт та мітоз (Kirik et al. 2007; Bratman and Chang 2008; Kumar et al. 2009). Відомо, що CLASP Arabidopsis має низку спільних мотивів з CLASP тварин і дріжджів, включаючи два активних N-термінальних домени гена надмірної експресії пухлин (TOG) і Стермінальний MAST домен (Kirik et al. 2007).

У клітинах *Arabidopsis*, які видовжуються, CLASP паралельно орієнтації МТ переміщується до поздовжніх країв, готових до поділу і розташовується в місцях, де препрофазні смужки перетинаються з краями клітин (Ambrose et al. 2011; Dhonukshe et al. 2012), де пригнічує ефекти (відомо, що катастрофа відбувається, коли зростаючі МТ досягають країв клітини) (Ambrose et al. 2011).



Рис. 1.6. Локалізація CLASP по довжині мікротрубочок у клітинах рослин. Відсутність CLASP (у мутанта *clasp-1*, нижній рисунок) призводить до вивільнення мікротрубочок із впорядковано організованої мережі (*Wasteneys and Ambrose 2009, TRENDS in Plant Science*)

Таким чином, CLASP допомагає МТ полімеризуватися коли вони різко згинаються досягаючи країв клітин (Hamant et al. 2019). Знижена активність CLASP у мутантів *clasp-1* полегшує тривалі відшарування кМТ та сприяє їх паралельному впорядкуванню (рис.1.6). При цьому МТ, які відшарувалися, здатні шукати інші МТ, тим самим збільшуючи ймовірність зв'язування та впорядкування МТ.

Відомо, що CLASP – це мультифункціональний білок і одна із його дій полягає у пов'язуванні МТ з ендомембранами та регулюванні транспорту ауксину, взаємодіючи при цьому із білком SNX1 (компонентом ретромерного білкового комплексу, відповідального за рециклювання переносника ауксину (PIN2) у цитоплазматичній мембрані (Jaillais et al. 2006; Ambrose et al. 2013), і таким чином сприяючи полярності клітин рослин. Оскільки CLASP забезпечує стабільність МТ і відіграє вирішальну роль у полярності, поділі та формоутворенні клітин (Ambrose et al. 2011, 2013), це не виключає залучення вищезгаданого білка до процесів механочутливості, де CLASP потенційно може виступати як мішень механо-трансдукційного сигналінгу та узгоджувати орієнтацію МТ паралельно максимальному напрямку напруги.

Інший цікавий білок з точки зору механочутливості є фосфоліпаза D, якої у рослин на основі доменів мембранної асоціації розрізняють шість підгруп – PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ i PLD ζ (Wang et al. 2012 a). Фосфоліпаза D delta (**PLD** δ) є центральним ферментом фосфоліпідної сигналізації у рослин, яка розщеплює фосфоліпіди (фосфатидилохолін) ЦМ з утворенням фосфатидної кислоти (PA) і переважно етаноламіну та холіну. На культурі клітин тютюну показано, що ізоформи PLD δ міцно асоціюються з ЦМ (Gardiner et al. 2001; Liu et al. 2015) і зв'язують з нею кортикальні MT (Gardiner et al. 2001; Hirase et al. 2006).

При сольовому (NaCl) та гіпоосмотичному стресі, обробці ксиланазою або мастопараном, PLDS активується і сприяє реорганізації МТ (показано на культурі BY2) (Dhonukshe et al. 2003 a; Distefano et al. 2015). Про зв'язок PLD з мембраною свідчить обробка 1-бутанолом, агентом, який впливає на активність PLD і індукує відшарування мікротрубочок від плазматичної мембрани в клітинах культури BY2 (Dhonukshe et al. 2003 a; Ho et al. 2009). У рослинних клітинах, окрім впливу на мікротрубочки, PLD і її продукт PA є важливими регуляторами мембранно-зв'язаного актину і можуть помітно змінити організацію A Φ (Huang et al. 2006; Pleskot et al. 2010, 2012). Окрім зв'язування з фосфоліпідами ЦМ, PLDδ зв'язується з рослинним гомологом флотиліну (Но et al. 2009), маркером ліпідного мікродомену, стійкої ділянки ЦМ, важливої для складання мультимолекулярних сигнальних комплексів, що містять G-білки або кінази (Martin et al. 2005; Tapken and Murphy 2015) і саме тому PLDδ може зв'язувати ЦМ з МТ у сайтах, де відбуваються процеси сигналізації клітин. Поряд з ЦМ та МТ, PLDδ взаємодіє також із F-актином, актином 7, Hsp70, АТФ-азою та клатрином (Ho et al. 2009; Krtkova et al. 2016). Таким чином, взаємодіючи з обома мережами цитоскелету, PLD8 є можливим посередником континууму КС-ЦМ-цитоскелет і завдяки вищеозначеній функціональній активності PLDδ доцільно розглядати як елемент трансдукції механічного сигналу.

Формування різних угрупувань у клітині АФ вимагає їхньої динамічной поведінки, яка залежить від скоординованої дії декількох класів актинзв'язуючих білків (actin-binding proteins (ABPs). Одними із таких білків є форміни –специфічні рослинні підродини, які сприяють видовженню філаментів і які поділяють на три класи (клас I – III). Форміни класів I та II зустрічаються у покритонасінних, а члени третього кладу (клас III) виявлені лише у мохів та лікофітів (Cvrčkova et al. 2004; Grunt et al. 2008; van Gisbergen and Bezanilla 2013). Форміни розрізняють за еволюційно консервативним доменом гомології форміну 2 (FH2), наявність якого, як правило, є достатньою для нуклеації актину (Cvrčkova et al. 2004) (рис. 1.7).

Завдяки домену FH2 форміни можуть нуклеювати і кепувати актинові філаменти, хоча до цих процесів, зазвичай, залучено і багато інших доменів (Grunt et al. 2008; Breitsprecher and Goode 2013).

SP PR TM FH1 FH2

Рис. 1.7. Доменна організація формінів класу I: SP- сигнальний пептид, PR – збагачений на пролін, зовнішньоклітинний домен, TM– трансмембранний домен, FH1 та FH2 домени гомології форміну (*Cvrčkova et al. 2004*)

Слід зазначити, що рослинні форміни регулюють різні аспекти динаміки актину, включаючи нуклеацію/ подовження, зв'язування у пучки, бічне приєднання та розрив філаментів, що показано для рису та *Arabidopsis* (Wang et al. 2012 b; Wang et al. 2013; van Gisbergen and Bezanilla 2013). На основі філогенезу домену FH2 форміни у покритонасінних класифікують за двома класами. Хоча типові форміни класу І є інтегральними білками мембрани, форміни класу II зазвичай містять фосфоліпід-зв'язуючий домен, пов'язаний з онкогеном РТЕN, і характеризуються альтернативним способом прикріплення до мембрани (Cvrčkova 2013). У *Arabidopsis* знайдено десять формінів класу I, які, на основі подібності послідовностей у домені FH2, групують у шість підгруп. За винятком AtFH7, усі форміни класу I мають сигнальний пептид та трансмембранний домен, за яким розташовані домени FH1 і FH2 (Cvrčkova 2004; Grunt et al. 2008) (рис.1.7). Як і їхні гомологи у тварин та грибів, домени гомології форміну 1 і 2 (FH1 і FH2) у формінів класу I модифікують динаміку актину, а саме, нуклеацію F-актину, зв'язування філаментів у пучки, кепування та блокування активності AФ (Deeks et al. 2005; Ingouff et al. 2005; Michelot et al. 2005).

Завдяки наявності трансмембранного домену декілька рослинних формінів І класу, включаючи Arabidopsis FORMIN 1 (AtFH1), AtFH5 і AtFH6, локалізовані у ЦМ (Cvrčkova et al. 2004; Cheung et al. 2010; Martiniere et al. 2011). У всіх покритонасінних рослин обидва класи формінів представлені багатьма паралогами; A. thaliana має 11 генів, що кодують форміни класу І та 10 генів формінів класу II (Grunt et al. 2008). Біологічна роль цього різноманіття залишається незрозумілою. Особливо у випадку формінів класу I, які, як правило, мають N-кінцевий Pro-багатий екстра цитоплазматичний домен, який може активувати прикріплення кортикального цитоскелету до клітинної стінки (Martiniere et al. 2011; Van Gisbergen and Bezanilla 2013; Borassi et al. 2016). Одним із найбільш досліджених є FH1 (At3g25500) – типовий представник I класу, здатний стимулювати полімеризацію та зв'язування пучків філаментів а також кепування гострого кінця $A\Phi$ *in vitro* (Michelot et al. 2005). Надмірна експресія AtFH1 індукує утворення довших і більших за кількістю $A\Phi$ (Cheung and Wu 2004). Встановлено, що AtFH1 локалізується у ЦМ та безпосередньо через свій поліпролін-позаклітинний домен взаємодіє із матеріалом КС (Martiniere et al. 2011) (рис.1.8).



Рис.1.8. Локалізація у клітині формінів AtFH1 та AtFH4 (Gisbergen and Bezanilla 2013; TRENDS in Cell Biology)

Здатність AtFH1 взаємодіяти як з компонентами клітинної стінки, так і з АФ важлива для регулювання активності АФ у кортикальній області клітини, і, отже, впливає на рух цитоплазми (Martiniere et al. 2011). Мутації AtFH1 індукують зв'язування актину у пучки, і, отже, знижують динаміку актинового цитоскелету, що, у свою чергу, зменшує темпи видовження клітин (Rosero et al. 2013).

Деякі форміни рослин взаємодіють з МТ безпосередньо (Wang et al. 2012 b). До класу I належить інтегрований із мембраною, формін AtFH4, який, окрім доменів FH1 та FH2, та трансмембранного домену, також містить специфічний домен (так званий GOE домен), який опосередковує асоціацію із MT (Deeks et al. 2010). Через наявність домену зв'язування із MT, вважають, що поєднання рослинноспецифічних та консервативних доменів дозволяє AtFH4 функціонувати у ролі регулятора між мембраною та обома основними компонентами цитоскелету. Нещодавно було відмічено, що, як біологічно активний FH4 з міткою GFP, так і його усічені на C – кінці, похідні, які не мали актин-зв'язуючих доменів, здатні швидко переміщуватися до сайтів відкладення калози в рослинних клітинах, атакованих грибковими або ооміцетовими збудниками (Sassman et al. 2018; Oulehlova et al. 2019), що доводить роль цього білка у біотичному стресі. Надмірно експресований AtFH4 накопичується також в мембранах EP. Також AtFH4 здатний з'єднувати MT з ЦМ, демонструючи потенціал додаткового механізму з'єднання MT-ЦМ, де інтегральний мембранний білок AtFH4 виступає у ролі лиштви для організації цитоскелету.

Незважаючи на велику кількість досліджень локалізації і динаміки формінів, багато аспектів їхнього функціонування залишається невизначеними, зокрема, роль формінів класу І у встановленні полярності клітин. Також залишається невизначеною регуляція мережі АФ при механічному стресі.

1.4. Взаємозалежне функціонування елементів цитоскелету у реакціях на зовнішній стрес

Асоціацію А Φ та МТ у рослин підтверджує їхня сумісна візуалізація у фіксованих тканинах, фармакологічні дослідження та існуванням білків, що зв'язують обидва елементи цитоскелету один із одним (Traas et al. 1987; Collings and Wasteney 2005; Collings 2008; Barton and Overall 2010; Schneider and Persson 2015).

Дослідження руху органел у водорості Chara показали, ЩО мікротрубочки та актинові філаменти залягають паралельно і сумісно задіяні у цьому процесі (Grolig et al. 2014). Також в цих клітинах спостерігали поперечно розташовані АФ, асоційовані із кортикальними МТ (Takeuchi et al. 2017). Кілька досліджень показали, що руйнування одного елемента цитоскелету може змінити організацію іншого. У А. thaliana і клітинах Daucus *carota* деполімеризація мікротрубочок призводила до часткової втрати організації тонких поперечних кортикальних актинових філаментів, що доводить існування асоціації між $A\Phi$ та MT (Traas et al. 1987; Collings and Wasteney 2005; Collings 2008). Крім того, продемонстровано, що зовнішні чинники або етапи розвитку клітин індукували зміни організації мікротрубочок та актинових філаментів, підтверджуючи їхню координовану взаємодію. Наприклад, переорієнтація масивів мікротрубочок спричиняла одночасні зміни в організації АФ у трахеарних елементах молодих клітини Zinnia elegans (Kobayashi et al. 1988) а руйнування актинових філаментів затримувало реорганізацію МТ у клітинах бобових (Vigna angularis) (Takesue and Shibaoka 1998). Динамічну взаємодію між АФ та МТ підтверджують експериментальні дослідження із застосуванням інгібіторного аналізу. Так, Sampathkumar та інші (2011) на живих клітинах Arabidopsis довели взаємодію кортикальних актинових філаментів та мікротрубочок, і визначили, що кМТ необхідні для відновлення кортикального актину після його деполімеризації. Paredez із співавторами (2006) спостерігали, що поперечні МТ поступово стають поздовжніми під впливом світла, що призводить до зменшення сумісного розміщення АФ та МТ. Ці зміни супроводжувалися зменшенням щільності кортикальних $A\Phi$ (Paredez et al. 2006; Chan et al. 2007). Також, Sampathkumar та колеги (2011) показали, що індукований світлом розподіл актину залежить від наявності інтактних мікротрубочок і це означає безпосередній зв'язок між двома елементами цитоскелету. Відновлення АФ після мікроін'єкції пилок-специфічного фактору деполімеризації актину у тичинкових волосках Tradescantia blossfeldiana показали, що новоутворені актинові філаменти залягали впоперек, що подібно масивам МТ, а не поздовжньо, як це характерно для необроблених клітин (Hussey et al. 1998). У кореневих волосках клітин Hydrocharis bubia ін'єкція сироватки до білка, який зв'язує актин, призвела до вбудовування товстих пучків актину у тонкі АФ у тій самій кортикальній площині, де залягають і МТ (Tominaga et al. 2000). Відомо, що мікротрубочки можуть відігравати роль у позиціонуванні нуклеації актину, оскільки після усунення дії латрункуліну В (LatB) відбувається полімеризація АФ вздовж кМТ (Sampathkumar et al. 2011). Актинові філаменти та актин-зв'язуючі білки необхідні також на ранній стадії стабілізації масивів кортикальних МТ. У дріжджів та тварин деякі білки плюс кінців мікротрубочок асоціюються із білками формінами (Wen et al. 2004; Martin and Chang 2005), і плюс кінці МТ також довели свою роль у використанні регуляторних факторів для нуклеації актину у дріжджах і клітинах культури тканин тварин (Basu and Chang 2007).

Про зв'язок між мікротрубочками і актиновими філаментами свідчить також їхні сумісна участь у багатьох метаболічних клітинних процесах. Так, виявлено пригнічення експресії генів тубуліну та посилення транскрипції гена актину у клітинах культури тканин *Arabidopsis* та *Petunia* при розвитку процесів старіння (Swidzinski 2002; Bai 2010).

РОЗДІЛ 2 РЕАКЦІЇ ЦИТОСКЕЛЕТУ РОСЛИН НА МОДЕЛЬОВАНУ МІКРОГРАВІТАЦІЮ ТА ГІПОКСІЮ

2.1. Мікрогравітація космічного польоту та модельована мікрогравітація наземних експериментів

2.1.1. Моделювання умов космічного польоту на Землі

Щоб зрозуміти, яким чином рослини сприймають і реагують на гравітацію, в умовах Землі проводять досліди, в яких імітують умови мікрогравітації космічних польотів і створюють різного виду тренажери. Такі тренажери не усувають силу тяжіння 1g а лише рандомізують з часом напрямок сили тяжіння по відношенню до об'єкту (одностороння стимуляція по принципу кліностату). Кліностат – це пристрій, в якому об'єкти обертаються у спосіб, який запобігає відчуттю біологічною системою дії вектора прискорення гравітації. Перший класичний кліностат був розроблений в 1879 р Джуліусом Саксом (Julius Sachs). Бріглеб ввів поняття швидкого кліностату, який швидко обертається для досягнення «функціональної невагомості» для малих об'єктів, в основному, поодиноких клітин (Briegleb 1992). Різні конфігурації кліностатів різняться щодо кількості осей обертання, а також швидкості та напрямку обертання. Кліностати з однією віссю обертання, перпендикулярної до напрямку вектора гравітації, називають 1–D або 2–D кліностати (рис.2.1).



Рис. 2.1. 1-D та 2-D кліностати, g – вектор гравітації

1–D або 2–D залежить від того, чи розглядають розміри осі обертання або всю її область. 2–D кліностатування означає розміщення об'єкта перпендикулярно до осі обертання. Кліностати з двома осями називаються тривимірними (3–D) кліностатами (Briegleb 1992; Klaus 2001; Hemmersbach et al. 2006; Brungs et al. 2011; Horn et al. 2011).

У випадку кожного окремого пристрою потрібно критично оцінювати його фізичні параметри та принципи дії, а також специфічний вплив на біологічні процеси та об'єкти різних розмірів.

2.1.2. 1-D та 2-D кліностатування

Використання кліностатів у наукових дослідженнях рослин почалося з експериментів, в яких об'єкт обертався відносно повільно (1–10 об / хв; класичний кліностат) (рис.2.1). Проростки і невеликі рослини, які обертали на 1–D та 2–D кліностатах, не виявляли гравітропічної реакції. 2–D кліностат не тільки упереджує седиментацію статолітів у статоцитах коренів, але також індукує їхню агрегацію навколо ядер. 2–D кліностати дозволяють обертати об'єкти уздовж горизонтальної осі перпендикулярно до гравітаційного вектора, що надає високої якості зниженим умовам гравітації (Herranz et al. 2013). Цей метод дозволяє досліджувати рослини впродовж всього вегетаційного циклу. Багато досліджень доводять перевагу 1–D та 2–D кліностатування над іншими видами симуляції мікрогравітації (Kordyum 1997; Wang et al. 2015) і завдяки їм численні експерименти, які проводилися у багатьох лабораторіях із залученням різних моделей рослин покращили наше розуміння механізмів відповіді та її генної регуляції на симульовану мікрогравітацію (Aarrouf et al. 1999; Shevchenko and Kordyum 2005; Soh et al. 2011; Brykov and Kordyum 2015).

Узагальнення досліджень стану тваринних та рослинних об'єктів на кліностатах виявили вплив механічного стимулу (Ferranti et al. 2021) у тому випадку, коли його дію вивчали на неспеціалізованих до гравісприйняття клітинах рослин.

2.1.3. Терміни для визначення зміненої сили тяжіння

При використанні експериментальних платформ, таких як кліностати та рандомізуючі машини, для опису стану прискорення, в основному, використовують термін «симульована\модельована\імітована мікрогравітація» або «симульована невагомість». 1-D та 2-D кліностат визначають як інструмент для отримання «усередненого вектора гравітації» або забезпечення «нуліфікації гравітаційного стимулу» (Sarkar et al. 2000). Використовують також такі терміни як «модельована мікрогравітацію» (Plett et al. 2004; Zayzafoon et al. 2004), «орбіта вільного падіння поблизу Землі» (Zayzafoon et al. 2004), «мікроваговий симулятор» (як синонім для RPM), «рандомізуюча мікрогравітація» (RPM; England et al. 2003) або «середовище низького зсуву» (low shear environment) (Nickerson et al. 2004). Інші автори використовують формулювання, яке точно описує лише експериментальні методи, такі як «кліностатування («кліноротація» або «обертання стінки судин» «wall vessel rotation» (Brungs et al. 2011; Li et al. 2011). З фізичної точки зору, «мікрогравітація» – це умова в якій абсолютна сума всіх мас-залежних прискорень не перевищує певного невеликого рівня «шуму» (зазвичай 10⁻⁵-10⁻⁶ разів g) (Albrecht-Buehler 1992).

Невагомість також описують як «відсутність механічної підтримки маси» (Briegleb 1992), що є результатом «від суми всіх присутніх сил, рівних

нулю, а не від відсутності сили тяжіння» (Klaus 2001). Останнє визначення може вводити в оману, оскільки в «мікрогравітації» не всі сили рівні нулю, оскільки існують капілярні сили, гідростатичний тиск та сили зв'язування поверхні клітин (Albrecht-Buehler 1992).

Термін «мікрогравітація» (або «мікро-д середовище», або «цд») часто використовується як синонім «невагомості» і «zero-g », що вказує на те, що gсила не становить насправді нуль, але є просто «дуже маленькою». «Справжня» невагомість, принаймні, більша за декілька секунд може бути досягнута лише у в космосі. На практиці космічні експерименти вимагають космічних кораблів (наприклад, МКС). Всередині корабля якість невагомості порушують так звані «g-вібрація», тобто коливання, викликані бортовою технікою, рухом астронавтів, тощо і рівень «мікрогравітації» може варіювати від 10⁻³ до 10⁻ ⁶g залежно від місця в космічному кораблі та частоти вібрації (Penley et al. 2002; Jules et al. 2004). Оскільки величина гравітаційного вектора Землі стала (1g), у модельованих експериментах можна змінити лише його вплив (Briegleb 1992). Слід зазначити, що термін «мікрогравітація» також пов'язують із числовими вимірами сили тяжіння, як то 0,26 g або 0,35 g (Kiss et al. 2019), які досягають під час космічних польотів у залежності від висоти орбіти. Щоб уникнути плутанини, пропонується використання терміну «модельована (симульована, імітована) мікрогравітація» для експериментів виконаних в пристроях на землі, в яких гравітація може бути усереднена з часом до нуля, але повністю не нейтралізована. Саме тому термін «мікрогравітація» використовують виключно для тих експериментів, які були виконані на Міжнародній космічній станції (МКС), супутниках, звукових ракетах, при падінні з вежі, або у літаку під час параболічного польоту.

2.2. Зона розтягу кореня вищих рослин

Онтогенез рослинних клітин поділяють на чіткі фази. Більшість клітин походять із апікальної меристеми, де відбувається постійний поділ і генерація

нових клітин. У меристемі розширення клітин в основному відбувається повільно і здійснюється ізотропно. Однак незабаром ріст клітин поляризується і вони починають швидко рости анізотропно уздовж апікально-базальної осі кореня (Baluška et al. 1997 b; 2001). У кореневих апексах *Zea mays, з*ону, де клітини після виходу з меристеми ростуть повільно та ізотропно спочатку називали постмітотичною «ізодіаметричною» зоною росту (Ishikawa and Evans 1992), а пізніше перейменували на «дистальну зону видовження» (ДЗР) (Ishikawa and Evans 1993).

Слід зазначити, що клітини цієї зони ще не видовжуються із великою швидкістю і багато в чому нагадують меристематичні клітини (Baluška et al. 1997 b, 2001; Baluška and Mancuso 2013). Оскільки у цій зоні відбуваються фундаментальні зміни цитоархітектури та фізіології клітини, а також значні перебудови цитоскелету (Baluška et al. 1997 b), для неї ввели специфічний термін і стали часто називати «перехідною зоною» (Baluška et al. 2001) (найпоширеніше).

Поряд з цим, для визначення зон росту кореня *Arabidopsis* досі зберігається традиційний анатомічний погляд на поздовжню зональність кореневої верхівки, успадкований від анатомів 19-го століття (Dolan and Davies 2003; Verbelen et al. 2006), які виділяли зону меристеми, видовження та диференціації. Хоча деякі автори визнають наявність перехідної зони у коренях *Arabidopsis* (Blancaflor et al. 2006), зазвичай, перехідну зону розтягу (або ДЗР) не виділяють і вважають частиною меристеми. Проте, численні дані підтверджують той факт, що ранні постмітотичні клітини кореня спочатку проходять перехідну зону, і лише потім вивільняються у зону швидкого розтягу (видовження). У перехідній зоні клітини коренів набувають унікальних фізіологічних властивостей, як наприклад, стають чутливими до факторів навколишнього середовища, таких як сила тяжіння, вологість, світло та кисень, всі з яких опосередковують тропізми і мають велике значення для морфогенезу коренів. Концепція перехідної зони базується на висновках про те, що постмітотичні кореневі клітини, що залишають меристему, виявляють більше схожості із інтерфазними клітинами меристеми, ніж із клітинами, які видовжуються. Фактично клітини, які вийшли із меристеми, не починають одразу розтягуватися, а набувають необхідної для цього компетенції лише після перебування впродовж деякого часу у перехідній зоні, здобувши необхідну цитоархітектуру та метаболічні властивості (Baluška et al. 1997 b, 2001). Наприклад, клітини, що походять з апікальної меристеми, не мають вакуоль, які б сприяли надзвичайно швидкому розтягу клітин, та позбавлені необхідних механічних властивостей клітинних стінок, що дозволяло б швидкий поділ. Клітини проксимальної частини ДЗР компетентні починати швидко розтягуватися, тоді як клітини дистальної частини здатні повертатися назад до активного клітинного циклу.

Поперечні масиви кМТ у постмітотичних клітинах коренів *Z.mays*, що вийшли із меристеми, не повністю впорядковані, і АФ також не зібрані у поздовжні пучки. У постмітотичних клітинах, які вийшли із меристеми відбувається суттєва перебудова цитоскелету, яка має важливе значення для переходу до подальшого строго полярного швидкого росту (Baluška et al. 1997 b, 2001).

Цікавим є те, що клітини ДЗР продовжують рости також в умовах осмотичного стресу, тоді як ріст в області швидкого видовження незворотно припиняється (Baluška et al. 2001; Sharp et al. 2004). Це залежить від накопичення ABA та зниження продукування етилену (Sharp et al. 2004).

Відомо, що кілька інших гормонів по-різному впливають на ДЗР та зону видовження. Так, рівень ендогенного цитокініну специфічно впливає на клітини зони швидкого видовження (Beemster and Baskin 2000), так само, як і етилен (Le et al. 2001). Екзогенний ауксин інгібує ріст клітин у зоні швидкого видовження, але може стимулювати ріст клітин у ДЗР при гравістимуляції (Ishikawa and Evans 1993; Vanstraelen and Benková 2012). Особливо важливими для ДЗР виявляються гібереліни, що контролюють ріст клітин, зональність кореневої верхівки (Baluška and Mancuso 2013; Shani et al. 2013), стабільність РІN2 та спрямований до стебла транспорт ауксину, а також полярність клітин та визначення осі за допомогою поперечної організації кМТ (Locascio et al. 2013).

Дистальна зона розтягу є унікальним місцем з точки зору сприйняття та pearyвання на низку (зовнішніх) факторів. Однією із унікальних властивостей клітин ДЗР є виражена іонно-транспортна активність. Іонні потоки показують не лише піки у дистальній зоні розтягу, але й проявляють сильну коливальну природу, що не відмічають в усіх інших зонах кореня (Shabala et al. 2006; McLamore et al. 2010). Окрім іонних потоків, інші транспортні процеси також демонструють піки своєї активності і специфічного коливання саме в дистальній зоні. Це стосується вмісту кисню та полярних потоків ауксину (Mancuso et al. 2007; McLamore et al. 2010), а також емісії нітроксиду (NO) (Illéš et al. 2006). Також, визначено, що дистальна зона розтягу може бути місцем альтернативної гравічутливості клітин рослин (Wolverton et al. 2002).

Встановлено, що дистальна зона розтягу є стрес-чутливим резервуаром клітин для усіх інших зон кореня і саме від росту клітин та проходження цієї зони залежить загальна швидкість росту та орієнтація у ґрунті кореня рослини в процесі навігації при пошуку поживних речовин. Досліджені реакції, які відбувається у дистальній зоні розтягу у відповідь на позаклітинний вміст іонів, фітогормонів ауксину та гібереліну, гравістимуляції, фізичних стимулів та біотичних стимулів, тощо. Визначено, що численні реакції клітин на дію зовнішніх факторів опосередковуються елементами цитоскелету, мікротрубочками та актиновими філаментами. Вважають, що ДЗР також може бути центром альтернативної гравічутливості кореня поза межами кореневого чохлика. У зв'язку із цим актуальним є дослідження реакцій мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах дистальної зони розтягу на змінену силу тяжіння та вплив цього фактора на ріст кореня.

2.3. Перебудови мікротрубочок та актинових філаментів в умовах реальної мікрогравітації та кліностатування

Оскільки широкі дослідження цитоскелету розпочалося вже наприкінці ери інтенсивних космічних польотів, про стан його елементів у космосі відомо відносно мало. Визначено, що орієнтація МТ опосередкована гравітацією; тому зміна сили тяжіння визначає зміну організації МТ, що викликає зміну відкладення целюлозних мікрофібрил під час розвитку клітинної стінки (Skagen and Iversen 1999). Отримана в результаті розпушена КС характеризується меншою механічною стійкістю і тим самим визначає формування більших клітин (De Micco et al. 2008 b) а також уповільнення росту проростків сої у космосі (De Micco and Aronne 2008 a, De Micco et al. 2010).

Виявлено, що гіпергравітація здатна змінювати орієнтацію кМТ. Так, в епідермісі епікотилів боба азукі при 1g переважали клітини з поперечними кМТ. Відсоток таких клітин знижувався, тоді як з поздовжніми МТ збільшувався (Soga et al. 2006). Крім того, гіпергравітація тимчасово збільшувала експресію генів γ-тубуліну та катаніну (Soga et al. 2008), які відповідають за переорієнтацію кМТ (Murata et al. 2005). Ці результати показують, що кМТ беруть участь у гравітаційному опорі, ймовірно, в процесі трансдукції сигналу, що призводить до змін КС.

У моху *Ceratodon purpureus*, вирощеному на апараті BRIC, протонема зростала спірально закрученою, що маскувалося в умовах Землі (Kern et al. 2005). Виявлено, що на 2-D кліностаті спостерігали такі ж сильні закручування *act2-3* мутанта *Arabidopsis*. Також виявлено, що космічний політ призводив до посиленого утворення вакуоль в коренях як дикого типу, так і *act2-3* мутантів. Існують можливі пояснення того, чому корені *act2-3* сильніше коливаються у космосі, порівняно із корінням дикого типу. Можливо, це відбувається через те, що актиновий цитоскелет завдяки молекулярним моторам міозину бере участь у постачанні на мембрану везикул, які містять попередники клітинної стінки (Sparkes 2011; Blancaflor 2013). Під час космічних польотів, спотворений актиновий цитоскелет *act2-3* мутантів може посилювати аномалії клітинної стінки, що доведено більш високою частотою нерівномірно депонованого матеріалу КС (появою хвилястості) і зменшенням її електронно-непрозорих областей. Такі дефекти формування клітинної стінки у мутанта *act2-3* могли стати результатом вираженого диференційного росту між флангами кореня, що призводить до сильнішої реакції згортання в просторі.

Відомо про зміни росту коренів рослин в умовах космічних польотів, проте, вони інколи вступають у протиріччя одне з одним, оскільки доводять як посилення, так і інгібування росту коренів при мікрогравітації. Наприклад, етиольовані проростки, складені у вологих мішках в BRIC-60 під час місії STS-87, збільшили кореневу біомасу у космосі (Levine and Piastuch 2005), що узгоджувалося із результатами дослідження коренів *Arabidopsis* в експериментах на STS -54 і STS-68. Результати з використанням апаратури розширеної системи біологічних досліджень ABRS на Міжнародній космічній станції (MKC) доводили, як правило, повільніший ріст коренів *Arabidopsis*, які росли на світлі (Paul et al. 2012). Таким чином, актиновий цитоскелет відіграє важливу роль у визначенні як ендогенної спрямованості росту кореня у космосі, так і його темпів (Nakashima et al. 2014). Дані показують, що частково вплив актину на орієнтацію та ріст коренів може бути через регулювання та доставку компонентів клітинної стінки до мембрани у первинних коренях.

Встановлено, що стимул, отриманий як від гравістимуляції, так і від кліностатування, регулюється Ca^{2+} сигналінгом (Belyavskaya 1996). Так, у кореневих волосках виявляли градієнт концентрації іонів Ca^{2+} , який збільшувався при кліностатуванні та додаванні позаклітинного Ca^{2+} (з 240,8 ± 12,6 нМ до 461,8 ± 31,4 нМ у верхівці). Застосування одночасне гадолінію і позаклітинного кальцію призводило до відсутності реакції у вигляді певного кута нахилу волоска до основного кореня та відсутності апікально —

базального градієнту іонів Ca²⁺ (300,4 \pm 55,2 нМ у верхівці при кліностатуванні *vs.* 286,1 \pm 42,7 нМ у контролі) (Шевченко та Кордюм 2007).

2.4. Реакції цитоскелету рослин на гіпоксію

2.4.1. Розвиток гіпоксії у рослинах під час космічних польотів

Під час космічних польотів відмічають загальне погіршення стану рослин, про що свідчить зменшення їхньої свіжої ваги у середньому на 25 %. Це пояснюють біофізичними обмеженнями штучних систем росту, у яких відсутні механічний потік повітря та газообмін, через що коренева система рослин відчуває гіпоксію. Природа біофізичних обмежень космосу полягає у тому, що обмін дрібними молекулами, включаючи іони, газ і воду між рослинами та навколишнім середовищем діє згідно фізичних законів поведінки молекул ззовні рослини. Сила тяжіння опосередковує значну частину обміну невеликими молекулами з рослинами. Викликана плинністю термальна конвекція активується силою тяжіння і спрямовує рух рідин і газів у навколишньому середовищі. Без цього процесу доступність газів або розчинених речовин обмежується тим, що може забезпечити дифузія (дифузія навколо рослини). У свою чергу, дифузія залежить від Броунівського руху і не залежить від гравітації. Це особливо важливо для грибів, бактерії та будь-яких інших організмів, не здатних механічно вентилювати і забезпечувати газообмін. Вплив обмеженого дифузією обміну є значним. Так, наприклад, полум'я свічки набуде сферичної форми і горітиме лише 30-40 с до гасіння через нестачу кисню. Фізико – математичні моделі доводять наявність подібних обмежень щодо транспорту і обміну маси у біологічних системах під час дії мікрогравітації (Porterfield 2002, Liao et al. 2004). Біодоступність кисню знижується при послабленні дії сили тяжіння. Дані свідчать про те, що орієнтація коренів за відсутності сили тяжіння, спрямована на пошук кисню (Porterfield et al. 1997). Окситропізм випробовували також на рослинах гороху дикого типу та агравітропного гороху, в результаті чого відмічено, що корінь позитивно реагує на градієнт кисню і його ріст переорієнтовується у напрямку вищої концентрації кисню (Porterfield and Musgrave 1998). Найбільш вагомий вплив обмеження біодоступності кисню – пригнічення поглинання іонів поживних речовин і транспорту до пагонів (Drew et al. 1997). Рослини з корінням, позбавленими кисню, характеризуються різким зниження азоту, калію та фосфору в тканинах листків (Porterfield. 2002).

Під час космічних польотів на низькій орбіті Землі плинність повітря інгібується відповідно до градації дії сили тяжіння. Зменшення при мікрогравітації потоку повітря лише у 100 разів, зменшує потік CO₂ всередину листка на 10 % від нормального рівня. Мікрогравітація впливає на метаболізм рослин оскільки аналіз рослин гороху та *Arabidopsis* на космічній станції «Салют 7» показав, що у низькорослих рослин майже повністю відсутні запаси крохмалю (до 40 % від рівня наземного контролю) (Musgrave et al. 1998; Guisinger and Kiss 1999). Під дією мікрогравітації у рослин виявлені ультраструктурні ознаки, пов'язані зі зниженням наявності кисню. До них відносять зміну форми, розміру мітохондрій (Kordyum 1994), загальне зменшення запасів крохмалю (Kordyum 1994; Guisinger and Kiss 1999). Відомо, що, як зміна ультраструктури мітохондрій, так і зменшення запасів тканинного крохмалю (Guglielminetti et al. 1995) свідчать про вплив на корені середовища з низьким вмістом кисню (Porterfield 2002).

Дослідження кореневої системи рослин під час космічних польотів виявили зміни, які свідчать про гіпоксію. Доведено індукування експресії гену, чутливого до гіпоксії ферменту алкогольдегідрогенази (АДГ), що асоціюється із підвищенням її активності. Виявлено, що після 6–ти денного польоту у коренях *А. thaliana* активність АДГ збільшувалася на 90% а після 11–ти денного експерименту підвищення активності АДГ на 89% було пов'язане зі збільшенням мРНК АДГ на 136% (Porterfield et al. 1997). Підвищення рівня АДГ під час космічних польотів спричиняється гіпоксією, яка виникає внаслідок інгібування транспорту О₂, опосередкованого силою тяжіння.
Різні етапи розвитку *Brassica гара* вивчали під час Спільного американо –українського експерименту у 1997 році (Stout et al. 2001). У коренях рослин на вегетативній стадії АДГ збільшувалася на 50 %, тоді як активність піруватдекарбоксилази (ПДК) зростала лише на 9 %. У квітучих рослин АДГ та ПДК коренів збільшувалися майже в 5 разів та 1,5 рази відповідно. У трансгенного *Arabidopsis* (конструкція: ген b–глюкуронідази (GUS), керований промотором АДГ) під час мікрогравітації відмічено активування гену АДГ у кінчиках коренів рослин. Таку ж саму активацію гену АДГ спостерігали у гіпоксичному контролі рослин, які зазнали затоплення кореневої зони/гіпоксії (Paul et al. 2001). Показано, що порівняно із гіпоксією рослин на Землі, у космічних польотах рослини відрізнялися відсутністю експресії АДГ у верхівка пагона, що означає порушення передачі сигналу між корінням і пагонами. Розроблений датчик також показав зміну біодоступності кисню в умовах мікрогравітації (Liao et al. 2004).

Контроль та зменшення потенційних наслідків біофізичних обмежень мікрогравітації у кореневій системі рослин вимагає складного підходу через необхідність подавати до коріння як поживний розчин, так і кисень.

Таким чином, встановлено, що при мікрогравітації корені рослин зазнають гіпоксії внаслідок порушення конвекції повітря і функціонування транспортної системи корінь – пагон. Хоча розроблені новітні технології вирощування рослин у ростових камерах певною мірою усувають ці недоліки, все ж таки будь-яка система не відтворює на 100% земні умови вирощування і не є технічно досконалою. Не слід забувати, що, окрім гіпоксії та аноксії, АДГ також може бути індукована впливом засолення, температури та висиханням грунту. Сьогодні є актуальними дослідження пристосувальних ознак рослин до нестачі кисню та погіршення газообміну. Відомо, що аноксична коренева зона рослин в космосі нагадує середовище, подібне до затопленого грунту на землі (Stankovic 2018), тому, насамперед, потрібно звернути увагу на водні та повітряно-водні рослини, корені яких зазнають гіпоксії у природних умовах.

Виявлення механізмів протидії гіпоксії потребує дослідження процесів, які відбуваються у рослин на клітинному рівні під час штучно індукованої гіпоксії. До теперішнього часу такі дослідження не досить поширені.

2.4.2. Формування аеренхіми у коренях вищих рослин

Аеренхімою (АР) називають тканини рослин, що містять збільшені газові порожнини, які за розмірами перевищують звичайні внутрішньоклітинні проміжки. АР утворюється в коренях і пагонах водноболотних видів, і, за несприятливих умов, у деяких суходільних рослин, як конститутивно, так і в результаті абіотичного стресу (Evans 2003). Зазвичай, появу АР пов'язують з гіпоксією, яка виникає внаслідок заболочення ґрунту, але вона також може бути спричинена і іншими видами стресу, включаючи високу температуру, посуху та дефіцит поживних елементів.

Sachs (1882) вперше визначив так звані лізигенний і схизогенний типи АР. Формування лізигенної АР передбачає загибель клітин, при цьому клітини, що утворилися в процесі раннього розвитку, гинуть і «видаляються», утворюючи натомість простір для газу. Схизогенна АР є аспектом нормального розвитку, як правило, пов'язаного з утворенням спеціалізованих клітин кори, які діляться і диференційно збільшуються для утворення упорядкованих газових проміжків шляхом поділу. Зазвичай, схизогенна АР є конститутивною, хоча у деяких видів вона може розширюватися при гіпоксії (Visser et al. 2003). У таких видів як, наприклад, Saggitaria lancifolia, в різних тканинах утворюється і лізигенна і схизогенна АР (Schussler et al. 1997). Зазначено, що загибель клітин під час утворення аеренхіми зменшує потребу кореня у кисні, оскільки при цьому спостерігається менше дихаючих клітин на певний об'єм, що, у цілому, полегшується стрес від гіпоксії (Fan et al. 2003). Слід зазначити, що АР забезпечує вихід від ризосфери до атмосфери газу метану, який є важливим чинником глобального потепління і, як вважається, створює близько 20% його ефекту. Концентрація метану в атмосфері за останні два сторіччя зросла вдвічі і затоплені рисові поля є його основним джерелом.

Встановлено, що аеренхіма у коренях рослин, окрім гіпоксії, може формуватися також і від нестачі певних елементів у поживному середовищі, зокрема сірки (S), яка є одним із основних мікроелементів ґрунту (Bouranis et al. 2003; Fan et al. 2003; Visser and Voesenek 2004; Postma and Lynch 2011). За умов нестачі сірки відбувається зниження темпів росту рослин, інгібується асиміляція енергії у клітинах, що, загалом, знижує якісні показники врожаю та шкодить сільському господарству.

Утворення індукованої лізигенної аеренхіми ініціюється внутрішніми і зовнішніми подразниками. У таких культур як соняшник (*Helianthus annuus*), квасоля (*Phaseolus vulgaris*), томат (*Lycopersicon esculentum*), пшениця (*Triticum aestivum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*) та *Trifolium subterraneum* AP розвивається в результаті затоплення і, у більшості випадків, цей процес контролюється низьким парціальним тиском кисню та підвищеним вмістом етилену у середовищі (Aschi-Smiti et al. 2003; Ni 2018). До формування AP залучені і інші фактори, наприклад, тепловий стрес, і всі ці фактори впливають на клітинне дихання, а отже, енергетичний та окиснювально-відновний стан цитоплазми. Окрім того, AP може також утворюються в коренях від механічного тиску ґрунту, в результаті дефіциту нітрату, фосфату або сульфату (Bouranis et al. 2003), що доводить можливість різноманітних стресів ініціювати одні і ті ж самі програми загибелі клітин.

Відомо, що головним внутрішнім ініціатором лізигенії при гіпоксії є етилен, який при затоплені швидко накопичується всередині тканини (Gunawardena et al. 2001 a; Steffens et al. 2011; Yamauchi et al. 2014, 2015). Утворення АР може викликати як ендогенний, так і екзогенний етилен (Jackson and Armstrong 1999; Gunawardena et al. 2001 a). Вважають, що сигнальні властивості активних форм кисню (АФК) є критичними для формування етилен–залежної АР (Yamauchi et al. 2017) і АФК відіграють роль

у регулюванні індукованої етиленом загибелі клітин епідермісу рису (Steffens et al. 2012).

Ще одним абіотичним чинником, який спричиняє запрограмовану клітинну загибель, є механічний стрес. Вважають, що до цього залучений оксид азоту (NO). Так, при навантаженні листків *Kalanchoe diagramontiana* вантажем у 10–50 г протягом 10–60 хв індукували загибель клітин і на початковій стадії спостерігали TUNEL – позитивні хлоропласти а потім ядра (Evans 2003) (метод TUNEL (мічення tDNA dUTP кінця) передбачає мічення вільних OH на кінцях розірваної ДНК за допомогою дезоксинуклеотид трансферази. Сигналінг оксиду азоту та АФК тісно взаємопов'язані, а стрес, який індукує появу H_2O_2 , також може індукувати активність фосфоліпази, стимулюючи синтетазу оксиду азоту та спричиняючи вивільнення NO. Пропонується, що зміни концентрації NO і АФК змінюють рівні сигнальних молекул та такі гормони, як жасмонова кислота, саліцилова кислота та етилен (Rao and Davis 2001).

У суходільних рослин, таких як кукурудза, горох (Gladish et al. 2006), *Luffa cylindrica, Rumex palustris* (Pierik et al. 2009) і пшениця (Yamauchi et al. 2014) при заболоченні AP утворюється шляхом розвитку програмованої загибелі клітин (ПКЗ) та їхнього лізису. ПКЗ – невід'ємна частина диференціації тканин під час нормального росту. В деяких випадки вона може тривати тижні (старіння листя), дні (клітини суспензору ембріона)табо години (*in vitro* диференціація трахеарних елементів *Zinnia*). При цьому перший етап утворення AP шляхом ПКЗ – це загибель клітин кори. Відмічено, що у кукурудзи ПКЗ прогресує радіально і тангенціально в навколишніх клітинах.

На відміну від клітин ссавців, одним із перших симптомів перед міжнуклеосомним розщепленням ДНК, як це спостерігається при TUNEL фарбуванні та конденсації хроматину, були зміни цитоплазми, включаючи інвагінації мембрани та інтенсивне утворення везикул. Пізніше спостерігали конденсацію клітин і хроматину а також оточення мембранами органел, таких як мітохондрії та тіла Гольджі, що, загалом, нагадує апоптотичні тіла клітин ссавців.

Загальна елімінація клітин, необхідна для утворення великих повітряних просторів досягається завдяки активності багатьох ферментів, що руйнують клітинну стінку, насамперед, естерифікованих та деестерифікованих пектинів (Gunawardena et al. 2001 b), експансинів, целюлаз, ксилоглюкан ендо-трансглікозилаз (XET) та пектиназ (Jackson and Armstrong 1999).

Слід відмітити, що порівняння процесів ПКЗ при формуванні АР у різних системах показало, що вони загалом подібні до цитоплазматичної загибелі клітин, але не ідентичні їй. Тому доречно вважати процес загибелі клітин в аеренхімі унікальним, який відрізняється як від апоптозу, так і від цитоплазматичної загибелі клітин, хоча і з властивостями, що нагадують ці обидва процеси.

2.4.3. Участь цитоскелету у формуванні аеренхіми коренів вищих рослин

Досить невизначеною лишається роль елементів цитоскелету у етапах ПКЗ при утворенні АР. Існують певні дані щодо реорганізації цитоскелету у процесах ПКЗ, спричинених елімінацією клітин. Так, доведено, що зміни полімеризації актину та тубуліну опосередковують ПКЗ у рослин (пилкові трубки *Papaver rhoes*) а також у клітинах тварин та дріжджах (Snowman et al. 2002; Smertenko and Franklin-Tong 2011), тому припускають, що АФ та МТ сумісно опосередковують прогрес ПКЗ у пилку *P.rhoes* (Franklin-Tong and Gourlay 2008).

Експерименти з токсинами, які порушують динаміку полімеризації актину та мікротрубочок надають важливі докази того, що зміни їх динаміки можуть або викликати ПКЗ у рослинах, або порушити її прогресування. Не виключена також перехресна взаємодія між МТ та АФ у цьому процесі. Так, зміни орієнтації МТ спостерігали у трахеарних елементах *Zinnia*, диференціація яких потребує локалізованого відкладання олігосахаридного матеріалу вторинної клітинної стінки, після чого клітини елімінуються шляхом ПКЗ (Oda and Hasezawa 2006). Перед диференціюванням трахеарних елементів кортикальні МТ у Zinnia орієнтовані поперечно і розташовані хаотично (Kobayashi 1988) а після диференціювання МТ утворюють товсті пучки. Актинові мікрофіламенти і мікротрубочки сумісно задіяні у процесі відкладання матеріалу вторинної клітинної стінки (Oda et al. 2005; Oda and Hasezawa 2006). Під час відкладання вторинної КС організація F-актину змінюється від поздовжньої мережі до поперечних пучків, розташованих між пучками МТ. Докази того, що зв'язування МТ у пучки може бути важливим для ініціації ПКЗ, надають дефектні по ембріогенезу мутанти Picea, які позбавлені асоційованого з кортикальними мікротрубочками МАР65, і не піддаються ПКЗ (Smertenko et al. 2003; Keech 2010). Транскрипція білку МАР18, який забезпечує розрив МТ, збільшується при активації старіння, що також натякає на рушійну силу розбирання мікротрубочок при ПКЗ (Keech 2010). У клітинах суспензорах соматичних зародків ялини норвезької (Picea abies) МТ фрагментуються і розбираються але рівень тубуліну залишається стабільним (Smertenko et.al. 2003), тоді як поздовжні АФ пучкуються і утворюють довгі кабелі, які зникають із фрагментацією ДНК. У багатьох моделях розвитку ПКЗ мікротрубочки деполімеризуються, чим послаблюють динаміку Г-актину за рахунок уповільнення швидкості полімеризації та деполімеризації (Barton 2008; Smertenko et al. 2010). Реорганізація F-актину в клітинах-суспензорах зародку супроводжується підвищенням експресії трьох генів актину (Schwarzerova 2010).

Деполімеризація мікротрубочок під час ПКЗ, здається, контролюється зменшенням нуклеації полімерів, пригніченням утворення пучків та посиленням розриву МТ. Дані щодо участі цитоскелету у процесах старіння клітин рослин, які супроводжуються апоптозо-подібними реакціями, досить лімітовані. Виявлено пригнічення експресії генів тубуліну та посилення транскрипції гена актину у старіючих клітинах культури тканин Arabidopsis та *Petunia* (Swidzinski 2002; Bai 2010).

Показано, що актин у процесах ПКЗ рослин (Lord et al. 2013) зазнає різно-манітніх морфологічних змін, включаючи: деполімеризацію з подальшою агрегацією у пунктирних скупченнях під час реакції самонесумісності як у пилку маку *P. rhoeas* (Snowman et al. 2002), так і пилку *Pyrus pyrifolia* (Liu et al. 2012) а також з'єднання в щільні пучки під час гіперчутливої відповіді у клітинах культури BY2 тютюну (Higaki et al. 2007).

Фармакологічний підхід продемонстрував, що зміни динаміки актину можуть спричинити ПКЗ у тварин, дріжджах і клітинах рослин (Franklin-Tong and Gourlay 2008; Smertenko and Franklin-Tong 2011). Tian та інші (2009) навіть припускають можливість зміни організації актинового цитоскелету рослин як безпосередньої ланки процесу ПКЗ, де він може бути, водночас, і ефектором і мішенню ПКЗ (Gourlay and Ayscough 2005; Hao and August 2005). Обробка ранніх зародків *Picea* актин-деполімеризуючими препаратами латрункуліном В і цитохалазином D збільшувала швидкість загибелі клітин та інгібувала диференціювання клітини-суспензора (Smertenko et al. 2003; Schwarzerova 2010). Це говорить про те, що полімеризація актину важлива для ініціювання або опосередкування відносно повільної вакуолярної ПКЗ в суспензорах зародка. На противагу, обробка трахеарних елементів Zinnia цитохалазином В не впливала на ПКЗ, але порушувала диференціацію (Kobayashi 1988). Запропоновано, що тонкий баланс динаміки полімеризації актину є важливим для «здорового» стану клітини і зміни його активної динаміки відіграють функціональну роль у ініціації ПКЗ. Регуляція опосередкування цитоскелетом ПКЗ може здійснюватися актин-асоційованими білками, такими як гельзолін-подібний білок (PrABP80), профілін, CAP та ADF (Tian 2009; Smertenko and Franklin-Tong 2011).

Таким чином, встановлено, що під час процесів ПКЗ, викликаних різноманітніми біотичними і абіотичними чинниками, мікротрубочки та акти-

нові філаменти зазнають структурних перебудов. Відмічають часткове руйнування мережі цитоскелету, відбувається формування нехарактерних для норми щільних пучків, часто відмічають часткову деполімеризацію елементів цитоскелету, що призводить до появи конгломератів із решток МТ та АФ та неполімеризованих тубуліну і актину. Окрім того, відмічена реорганізація та деструкція МТ послаблює динаміку АФ, що впливає на загальне функціонування клітини. Загалом, ПКЗ призводить до руйнування мережі цитоскелету у клітині. Незважаючи на численні роботи стосовно порушення мережі цитоскелету під час ПКЗ, лізису та старіння, все ще лишається питання послідовності етапів участі елементів цитоскелету у її реакціях, які розвивається при формуванні аеренхіми коренів. Також невідомо на якому з етапів програмованої клітинної загибелі відбуваються зміни організації елементів цитоскелету різних модельних систем рослин і яким є зв'язок між руйнуванням актинових філаментів та мікротрубочок у реакціях ПКЗ.

РОЗДІЛ З

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Матеріал для досліджень та підготовка експериментів

У експериментальній роботі використовували наступні лабораторні, культурні та дикорослі рослини:

- кукурудза (*Zea mays* (L.) Роасеае, однодольні), гібрид LG 11, отриманий від Semences SA (Chappes, France) та гібрид Достаток, отриманий від оригінатора – Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (м. Київ);
- червоний буряк (*Beta vulgaris* (L.) Amaranthaceae, дводольні) сорт Бордо (Торговий насінневий дім, м. Запоріжжя);
- різушка (резушка) Таля, гусимка звичайна або арабідопсис Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Brassicaceae, дводольні) генотип (Col-0).
- трансформовані лінії A. thaliana (L.) Неупһ екотипу Columbia–GFP– МАР4 (продукт злиття гену тубуліну, асоційованого із доменом гена тваринного білка МАР4, який зв'язується із мікротрубочками і гена зеленого флуоресцентного білка GFP (Green fluorescent protein) (Marc et al. 1998) та Arabidopsis thaliana – ABD2–GFP (продукт злиття генів GFP і асоційованого із актином домена 2 (ABD2) белка фімбрина1) (Voigt et al. 2005; Wang et al. 2008). Насіння люб'язно надане професорами Dieter Volkmann і Frantishek Baluška (Інститут молекулярної ботаніки при Університеті м. Бонн, Німеччина).
- дикорослі повітряно-водні та наземні генотипи рослин частухи подорожникової (*Alisma plantago–aquatica* (L.), Alismataceae, однодольні) та веха широколистого (*Sium latifolium* (L.), Apiaceae, дводольні). Детальніше фенотипування останніх років (2017–2018) показало, що суходільна форма *Sium* була формою *S. sisaroideum*.

Рослини отримували з природних популяцій навколо р. Псьол у смт Велика Багачка (Полтавська обл.).

Для дослідження елементів цитоскелету методом імуноцитохімії використовували 6–7–ми добові головні корені рослин *Z. mays* та *B. vulgaris* та адвентивні корені дикорослих рослин *A. plantago–aquatica* та *S. latifolim* (стадія бутонізації), які попередньо промивали у дистильованій воді та фосфатному буфері (pH 6,9) і обробляли згідно цитологічної методики (підрозділ 3.4.1.). Для дослідження цитоскелету *in vivo* використовували цілі 6–7–ми добові проростки рослин *Arabidopsis*, трансформовані конструкціями *A.thaliana* – MAP4 – GFP та *A.thaliana* – ABD2 – GFP, корені яких аналізували у конфокальному мікроскопі безпосередньо у середовищі росту.

3.2. Організація експериментів

3.2.1. Використання кліностатів для моделювання умов зміненої сили тяжіння

Відомі на сьогоднішній день так звані симулятори мікрогравітації не відтворюють усі умови невагомості, а скоріше досягають всесторонньої стимуляції клітини шляхом рандомізації напрямку гравітації у часі (кліностат і машина випадкового позиціонування (random positioning machine)) або компенсують гравітаційну силу силою протидії (магнітна левітація). Слід зазначити, що умови – аналоги реальної мікрогравітації просто відтворюють її вплив на фізіологічні реакції організмів і такі методи моделювання певною мірою дублюють фактори, пов'язані з невагомістю, які зустрічаються в умовах 0 g; а саме, знижений перепад тиску, спричинений гравітацією, кінематичні напруги при русі та атмосферно-індуковані гідростатичні сили тіла (Brungs et al. 2016).

Кліностати імітують відсутність спрямованого впливу сили тяжіння і цього вдається досягти шляхом усереднення дії вектора гравітації через обертання з часом. У зв'язку з цим кліностат часто застосовували для переорієнтації органу або клітини у гравітаційному полі на певний період часу з метою усунути, наскільки це можливо, вплив постійної дії сили тяжіння Теоретичне обгрунтування використання кліностатів орган. було на розроблено Dedolph та Dipert (1971). Вчені продемонстрували важливість швидкості обертання для ефективності кліностата, оскільки це впливає на шлях седиментації крохмальних статолітів, основного засобу гравісприйняття у рослин (Kiss 2000). Ті ж самі Dedolph та Dipert (1971) виявили, що швидкість обертання 0,3-3 об/хв відповідає найефективнішій рандомізації, оскільки мінімізує довжину шляху осідання статоліту. Тому, саме цей тип кліностатів вважають найбільше придатним для імітування умов мікрогравітації (Wang 2015; Brungs et al. 2016; Kiss et al. 2019; Ferranti et al. 2021) і результати, отримані на горизонтальному 1-D кліностаті з періодом обертання 2 об/хв є одними із тих, які найбільше відтворюють умови космічних польотів (Wang et al. 2015; Kiss et al. 2019). На сьогоднішній день кліностати використовують багатьма дослідниками для порівняння ефектів з космічними експериментами. Незважаючи на подібність біологічних ефектів, вважають, що умови 1-D та 2-D кліностатування за сприйняттям сили тяжіння подібні до мікрогравітації космічного польоту, але не тотожні їм, що доведено після дослідження поведінки наночастинок, на які певний дуже короткий час діє сила тяжіння (рис. 3.1.).



Рис. 3.1. Розподіл наночастинок при мікрогравітації та кліностатуванні. (*Palma-Jiménez et al. 2017*)

Таким чином доведено, що кліностатування частково зберігає вплив сили тяжіння, проте, він значно мінімізується (Kiss et al. 2019). Також одноосьове кліностаті може призвести і до механічного стресу (Manzano et al. 2009; Ferranti et al. 2021).

Завдяки усуненню спрямовуючої дії вектора гравітації кліностатування усереднює тиск протопласта на кортикальну зону клітини. При цьому величина сили тяжіння залишається 1g але клітина не встигає її відчути. Результатом є механічне стимулювання кортикальної області клітини, що впливає на континуум цитоскелет – цитоплазматична мембрана – клітинна стінка (Ferranti et al. 2021).

У представленій роботі використовували кліностат з єдиною віссю (1– D кліностат), яка обертається горизонтально з періодом 2 оберти за хвилину (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Використаний у експериментах горизонтальний кліностат з проростками *Arabidopsis thaliana* у чашках Петрі

У кліностатах типу 1–D вертикальна вісь організму є продовженням основної осі обертання самого кліностата (рис.3.1), тоді як у 2–D кліностатах експериментальний зразок обертається в площині, перпендикулярній до

сновної осі обертання (Ferranti et al. 2021). Кліностатування проводили при фотоперіоді 8/16 год та температурі 25°С.

При проведенні експериментів у камері кліностату розміщували від 2 до 4 чашок Петрі у залежності від їхнього об' єму та форми (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Проростки *Arabidopsis thaliana*, вирощені в умовах контролю (Con), впливу оризаліну (OR) та цитохалазину D (CD)

Після закінчення періоду кліностатування експериментальні об' єкти фіксували для світлової мікроскопії, безпосередньо під мікроскопом досліджували трансформовані GFP- проростки *A. thaliana* або заморожували у рідкому азоті і зберігали у фрізері при -70 ⁰C впродовж 2–3 тижнів для подальших досліджень з молекулярної біології.

3.2.2. Використані інгібітори тубуліну і актину

Прогрес сучасних підходів у дослідженні клітини, включаючи геноміку, протеоміку, молекулярну генетику, а також нові та вдосконалені технології візуалізації за допомогою різних видів мікроскопії надає можливість детально дослідити організацію, функціонування та регуляцію цитоскелету рослин. З часів свого відкриття у рослин у 1960–1970–х роках функцію мікротрубочок і актинових мікрофіламентів аналізували переважно фармакологічними методами. Застосування препаратів, що руйнують цитоскелет надає широкі уявлення про участь окремо МТ та АФ у специфічних функціях клітини. Більш інтегративний підхід революціонізував погляд на цитоскелет рослин і сьогодні

дослідження цитоскелету спрямовані на розуміння того, яким чином організація та динаміка його елементів інтегровані в регуляторні мережі, що лежать в основі складних процесів у рослинах, від розмноження до морфогенезу органів і клітинної диференціації. Фармакологічний підхід є однією із складових сучасного наукового пошуку. У своїх дослідженнях ми використовували наступні деполімеризатори та стабілізатори полімерів МТ та АФ:

3.2.2.1. Таксол. У якості інгібітора організації МТ застосовували таксол (TXL) Paclitaxel (TaxolTM, Sigma Co.,St LOUIS, MO, USA), який порушує організацію мережі, стабілізує полімер МТ і запобігає його розбиранню (рис.3.4).

Паклітаксель ($C_{47}H_{51}NO_{14}$) — природний лікарський препарат, за своїм хімічним складом алкалоїд із кори тисового дерева *Taxus brevifolia*, який належить до групи таксанів. Паклітаксель перешкоджає функціонуванню МТ шляхом їхньої гіперстабілізації і через це блокується мітоз, а МТ втрачають свою динаміку (Cusidó 2002).



Рис. 3.4. Хімічна структура стабілізатора мікротрубочок – таксолу, інгібітора полімеризації тубуліну – оризаліну, дезорганізатора

мікрофіламентів – цитохалазину D та декоратора мікрофіламентів – фаллоідину. (*PubChem*)

У присутності таксолу сповільнюється ріст рослин (Baluška et al. 1997 а). У експериментах таксол використовували у концентрації 25-50 мкМ, на фото, представлені результати дії таксолу 50 мкМ.

3.2.2.2. Оризалін. Інший дезорганізатор мережі МТ – оризалін (OR) (3,5-динітро-N4, N4-дипропілсульфаніламід) – динітроаніліновий гербіцид (рис. 3.4), зв'язується із тубуліном, упереджує полімеризацію МТ і перешкоджає полімеризації нових МТ на всіх стадіях мітотичного циклу (Morejohn et al. 1987). Оризалін використовували у концентраціях 5 мкМ у експериментах із дослідження експресії генів цитоскелету під дією кліностатування (Shevchenko and Krutovsky 2022) та 5-20 мкМ у експериментах i3 дослідження взаємозалежної організації елементів цитоскелету. У останніх експериментах інгібітор вносили у середовище росту за 6 год до спостереження організації МТ у мікроскопі (Shevchenko et al. 2006, 2007). При застосуванні різних (5-20 мкМ) концентрацій оризаліну руйнування МТ були дозо-залежними, проте подібними. Дія оризаліну сприяє появі коротших МТ і розрідженню їхньої мережі, що впливає на клітинну стінку і призводить до появи сферичних клітин. Молекулярний аналіз мутантів бур'янів, які набули стійкості до багаторазового використання гербіцидів, показав, що гербіциди динітроанілінового ряду, у тому числі оризалін, зв'язують α-тубулін в області між димерами (Anthony and Hussey 1999 a).

3.2.2.3. Цитохалазин D. Для дезорганізації мережі актинових філаментів використовували цитохалазин D (CD) – метаболіт гриба *Metarhizium anisopliae* (Holzinger and Blaas 2016) (рис.3.4). Загальновизнано, що цитохалазини уповільнюють полімеризацію AФ шляхом інгібування швидкості подовження полімера. Це відбувається завдяки високій спорідненості зв'язуванням цитохалазинів з колючим швидкозростаючим (плюс кінцем) F–актину. Цитохалазин запобігає додаванню мономерів до ростучого кінця полімера через його кепування (Holzinger and Blaas 2016). По суті, після зв'язування цитохалазини закривають кінець філаменту. Оскільки при цьому G–актин не вбудовується у мікрофіламент, індукується загальна деполімеризація актинової мережі (Hussey et al. 2006).

Показано, що цитохалазини С та D реорганізують тонку мережу кортикальних AФ, завдячи чому вони перетворюються на короткі, відносно стабільні стрижні (Foissner and Wasteneys 2000). Один цитохалазин зв'язується із одним актиновим філаментом. Дослідження із цитохалазином D (CD), виявили, що димери CD–актин містять ATФ – зв'язаний актин. Такі цитохалазин D–актин димери відновлюються до CD–актин мономерів в результаті гідролізу ATФ. Отриманий цитохалазин D–актин мономер може зв'язувати ATP–актин мономер і заново утворювати димер цитохалазин D–актин.

Цитохалазин D дуже ефективний навіть при низьких концентраціях (0,2 мкМ). Проаналізовано вплив багатьох різних цитохалазинів (A, B, C та D) на актинові філаменти і виявлено, що для руйнування кабелів волокон філаментів необхідні більш високі концентрації CD (2–20 мкМ) (Goddette and Frieden 1987). Обробка цитохалазином D руйнує організацію мережі актину, збільшує кількість вільних кінців A Φ і призводить до утворення ниткоподібних агрегатів або точкових скупчень із залишків філаменів (Vaughan and Vaughn 1987). Вважається, що значний вплив цитохалазину D на клітини виникає як від безпосередньої взаємодії препарату з актиновими філаментами, так і від вторинної клітинної відповіді. Перший призводить до негайного порушення впорядкованої цитоскелетної мережі, яке виявляється у розриві актинових філаментів. В результаті утворюються фокальні точкові скупчення з мікрофіламентів та розірвана мережа актинового цитоскелету.

У дослідницькій роботі цитохалазин D використовували у концентраціях 5 мкМ (експерименти із дослідження транскрипційної регуляції генів цитоскелету) (Shevchenko and Krutovsky 2022) та 10 мкМ (експерименти із мікроскопічних досліджень взаємозалежної організації цитоскелету)

(Shevchenko et al. 2007). У останніх експериментах інгібітор вносили у середовище росту за 6 год до спостереження організації МТ.

3.2.2.4. Фаллоідин. Для виявлення актинових філаментів на парафінових зрізах використовували токсин фаллоідин (клас фаллотоксинів) (6,6 мкМ) – витяжку із смертельно отруйного гриба *Amanita phalloides* («бліда поганка») із флуоресцентною міткою флуоресцинізотіоцианатом (FITC). Це жорсткий біциклічний гептапептид (рис. 3.4), який специфічно вмонтовується на межі між субодиницями F–актину, блокуючи сусідні субодиниці разом. Фаллоідин зв'язується з актиновими філаментами набагато міцніше, ніж з мономерами актину і це призводить до зниження константи швидкості дисоціації субодиниць актину від кінців філаментів, що по суті стабілізує актинові філаменти шляхом запобігання деполімеризації (Соорег 1987). Похідні фаллоідину зазвичай з'єднують із різними флуоресцентними барвниками, найпоширенішими із яких є флуоресцинізотіоцианат (FITC) та/або родамін, що допомагає візуалізації актинового цитоскелету у численних біологічних та біомедичних дослідженнях.

3.2.3. Умови вирощування рослин Zea mays та Beta vulgaris

Попередньо замочені у воді (6 год) зернівки рослин *Z. mays* та насіння рослин *B.vulgaris* пророщували на вологому фільтрувальному папері впродовж щонайбільше 4–х діб в умовах стаціонарного контролю і на кліностатах (2 об/хв). Папір попередньо змочували стандартним розчином Хогланда та слідкували за його постійним зволоженням. Вимірювання довжини головних коренів проводили на 4–5–тий та 6–7–ий дні росту проростків у залежності від загальних темпів росту рослин (рис. 3.5).

Різницю росту відмічали через період у 16 год, загалом впродовж двох днів. У експериментах із таксолом фільтрувальний папір змочували розчином Paclitaxel (50 мкМ у середовищі Хогланда), на якому розміщували зернівки

Z.mays та насіння *B. vulgaris* (Baluška et al. 1997 b) та залишали рости у стаціонарному контролі та на кліностатах, слідкуючи за постійним зволоженням паперу (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Схема експериментального вирощування зернівок Zea mays та насіння Beta vulgaris в умовах стаціонарного контролю та кліностатування із застосуванням таксолу

Усього ставили чотири зразки: 1– стаціонарний контроль (середовище Хогланда); 2 – стаціонарний контроль із таксолом (середовище Хогланда з додаванням таксолу); 3 – кліностатування (середовище Хогланда); 4 – кліностатування з таксолом (середовище Хогланда з додаванням таксолу).

У частині експериментів для інгібування організації актинових філаментів використовували розчин цитохалазину D (20 мкМ). Відмічено, що руйнування АФ цитохалазином D були дозо-залежними.

3.2.4. Умови вирощування рослин Arabidopsis thaliana – GFP– MAP4 та Arabidopsis thaliana – GFP – ABD2

Насіння *A. thaliana* (Col–0, WT) стерилізували протягом 2 хв у 70 % етанолі, потім протягом 20 хв у 5 % гіпохлориті натрію та 0,02% (v/v) Triton–100. Після трьох промивань дистильованою водою насіння висівали на середовище ½ Мурашіге–Скуга (Murashige-Scoog medium (MC)) (Murashige and Skoog 1962) з агаром (0, 5 %) у пластикові плашки або чашки Петрі та розміщували при 4°С на два дні для верналізації. Через 2–3 доби холодної обробки плашки із насінням переміщували в камеру росту (25°С, 18/6 фотоперіод) для проростання. У експериментах використовували 1/2 МС з додаванням 5 мкМ оризаліну (OR) або цитохалазину D (CD). Концентрації останніх відбирали після аналізу, який показав здатність даних концентрацій оризаліну та порушувати організацію мікротрубочок цитохалазину та актинових філаментів (відповідно), знижувати ріст коренів та відновлювати його після усунення інгібіторів із середовища росту. Проводили наступні типи обробки рослин: триденні проростки *A. thaliana* переносили на 1 – чисте середовище ¹/2 МС (стаціонарний контроль); 2 – середовище ¹/2 МС із додаванням OR; 3 – середовище ¹/₂MC із додаванням CD; 4 – середовище ¹/₂ MC для кліностатування; 5 – середовище ¹/₂ MC для кліностатування та додавання OR; 6 – ¹/2 МС середовище для кліностатування та додавання CD для росту впродовж наступної доби (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Схема експеримента вирощування проростків *Arabidopsis thaliana* при дії кліностатування

Спостереження за коренями проростків проводили у середовищі росту, запобігаючи пересиханню об'єкта. Досліджували організацію кортикальних мікротрубочок у клітинах коренів проростків *A. thaliana* – GFP–MAP4 та організацію актинових філаментів у *A. thaliana* – GFP – ABD2– після впливу інгібіторів та дестабілізаторів мережі цитоскелету: окремо оризаліну і цитохалазину D (рис. 3.7).

Таким чином, ми порівнювали пошкодження елементів цитоскелету від дії OR та CD у клітинах коренів саджанців, вирощених у стаціонарному контролі з пошкодженнями від OR/CD у кліностатованих рослинах (Шевченко та Кордюм 2012).

Довжину коренів проростків вимірювали перед розміщенням на кліностат та дією інгібіторів, а також, через 1 та 2 дні кліностатування та дії інгібіторів (всього впродовж 48 год) (рис. 3.6).



Рис. 3.7. Схема дослідження організації мікротрубочок у клітинах коренів *Arabidopsis thaliana* – GFP– MAP4 та організації актинових філаментів у *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 після впливу оризаліну і цитохалазину D

Аналізували поздовжні зрізи коренів, а саме клітини дистальної зони розтягу (ДЗР). Статистичний аналіз проводили за допомогою програми Origin 6.1 (t_test).

Для виділення РНК коріння проростків арабідопсису збирали у епендорфи об'ємом 1,5 мл, відразу фіксували у рідкому азоті та зберігали при мінус -70°С впродовж щонайбільше тижня.

3.2.5. Відбір повітряно-водних рослин Alisma plantago–aquatica, Sium latifolium та Sium sisaroideum

Для виявлення організації мікротрубочок та актинових філаментів у коренях повітряно-водних рослин вивчали апекси коренів *A. plantago–aquatica* та *S. latifolium*, які збирали у природних умовах росту в районі смт. Великої Багачки (Полтавська область) та селища Конча Заспа (Київська область) впродовж 2006–2014 рр (рис. 3.9).



Рис. 3.8. Рослини Alisma plantago-aquatica (a) та Sium latifolium (b) у природних водоймах (www.plantarium.de)

Для порівняння *S. latifolium* брали корені рослин, які під час росту були повністю зануреними у воду і ті, які росли на вологих грунтах. У процесі доскональної класифікації об'єктів дослідження у 2018 році виявилося, що *Sium*, який росте на суходолі відносять до виду *Sium sisaroideum*. Для *Alisma plantago–aquatica* брали рослини, корені яких росли у воді і ті рослини, які повністю росли на суходолі.

Для стандартних цитологічних досліджень використовували попередньо промиті у дистильованій воді корені завдовжки приблизно 1 см (розділи 3.4.1 та 3.4.2).

3.3. Виявлення структури мікротрубочок та актинових філаментів

3.3.1. Методи імуноцитохімії та світлової мікроскопії

Для анатомічних досліджень корені завдовжки 1 см проростків Z.mays, B. vulgaris та дорослих рослин S. latifolium та A. plantago-aquatica у (фазі бутонізації та квітнення) промивали у фосфатному буфері (pH 6,9), фіксували 1 год у 3,7 % формальдегіді, проводили по висхідним концентраціям спиртів (30^{0} , 50^{0} , 70^{0} , 90^{0} , 97^{0} у фосфатному буфері та 100^{0}) та занурювали в спирторозчинний віск Стідмана згідно стандартної цитологічної методики (Baluška et al. 1997 b; Shevchenko et al. 2007). Поздовжні зрізи коренів завтовшки 10 мкм отримували на мікротомі Reichert (Austria). Зрізи розміщували на предметному склі та проводили по низхідних концентраціях спиртів (97^{0} , 70^{0} i 50^{0}) і фарбували 0,1 %-ним розчином толуїдину синього для з'ясування анатомічної будови коренів. Проаналізовано щонайменше 50 коренів кожного виду рослин.

У всіх видів досліджених рослин мікротрубочки виявляли імуноцитохімічно за допомогою первинних мишачих моноклональних антитіл до бета-Sigma тубуліну (T-4026, Co.) та вторинних мишачих антитіл i3 флуоресцентною міткою флуоресцинізотіоцианатом (FITC) (F-9026, Sigma Со.). Для виявлення структури актинового цитоскелету у коренях Z.mays та В. vulgaris застосовували мишачі моноклональні антитіла ICN (клон до актину C4, Sigma, Co., 69-100) та вторинні мишачі антитіла мічені FITC (F-9026, Sigma, Co). Y A. plantago-aquatica ta S. latifolium мікрофіламенти також виявляли за допомогою барвника phalloidin-FITC (Sigma Co.) (6,6 мкМ). Ядра фарбували барвником 4,6 – диамідино-2-феніліндолом дигідрохлоридом (DAPI, 5 мкМ) упродовж 5 хв. У всіх випадках пофарбовані зрізи монтували в середовище із суміші гліцерину (80 %) і фосфатного буфера (20 %) та агента проти вицвітання препаратів. Організацію мікротрубочок та актинових філаментів у коренях Z.mays та B. vulgaris спостерігали на інвертному флуоресцентному мікроскопі AxioVert A1 Bio (Carl Zeiss, Germany). Аналіз організації елементів цитоскелету у коренях рослин A. plantago–aquatica та S. latifolium проводили на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Germany), обладнаному стандартними фільтрами (BP 450-490, LP 520). Досліджували організацію кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у клітинах кори на рівні меристеми та зони розтягу коренів. Довжину первинних коренів (як один із маркерів реакції рослини на дію кліностатування) вимірювали приблизно у 120 рослин кожного виду. Досліди із застосуванням інгібіторів проводили щонайменше у трикратній повторності для 100 рослин кожного виду.

3.3.2. Метод конфокальної та електронної мікроскопії

Для перегляду у конфокальному мікроскопі корені проростків A.thaliana - MAP4-GFP та A.thaliana-ABD2-GFP розміщували на предметном склі у середовищі росту (агар або МС) щоб запобігти висушуванню. Корені кліностатованих проростків обстежували безпосередньо після зняття з кліностату. При обстеженні під лазерним променем застосовували агент проти вицвітання у середовищі МС. Зразки аналізували на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі LSM5 Pascal (Zeiss, Німеччина) з числовою апертурою 20 x, 40 x і 60 x і лінзами 1,25. Для уточнення деталей організації цитоскелета застосовували опцію збільшення зображення (сгор) та опцію покрокового розрізу зображення та послідуючого накладання знімків для отримання об'ємної картини. Барвник FITC збуджували лазером 488 нм і флуоресцентні зображення аналізували у довжинах хвиль 500-600 нм. Фотографували за допомогою програми конфокального мікроскопу та обробляли у програмі Image Browser LSM5 Pascal. Знімки переводили у формат png, jpg або tiff з роздільною здатністю 300 пікселів на дюйм. Контрастність та яскравість усіх знімків вирівнювали згідно однакового стандарту. Кількість точкових

угруповань з актину та тубуліну після перехресного впливу інгібіторів цитоскелету підраховували у щонайменше 14-ти клітинах ДЗР та ЦЗР коренів.

дослідження ультраструктури клітин Для методом електронної мікроскопії кореневі апекси A. plantago-aquatica та S.latifolium фіксували 2 години у розчині 2,5 % глутарового альдегіду, після чого проводили постфіксацію 1 годину в 1 % розчині оксиду осмію (OsO₄). Зразки зневоднювали у серії спиртів висхідних концентрацій та ацетоні, потім заливали сумішшю смоли епон-аралдит та полімеризували при різних температурах у термостаті стандартної методики. Ультратонкі (50-70 нм) зрізи препаратів згідно отримували на мікротомі MT-XL (RMC, США) і контрастували розчинами уранілацетата та цитрату свинцю. Ультраструктуру клітин на різних збільшеннях досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM 1230EX (Jeol, Японія). Знімки аналізували за допомогою програмного забезпечення Image J (http://imagej.nih.gov).

Редуковані клітини (РК) меристеми ідентифікували згідно цілого ряду ознак: розмір та форма, ступінь сегрегації (площа контакту клітин з порожнисусідніми AP перевищує площу контакту i3 клітинами), нами відсутність/наявність ядер, інвагінації цитоплазматичної мембрани, потовщена/звивиста/розпушена клітинна стінка або її відсутність. Для морфометричного аналізу вимірювали площу клітин а також розміри та кількість вакуоль, мітохондрій, пластид та ліпідних капель у 15-ти редукованих безядерних клітинах і 15-ти контрольних. При підрахунку кількості органел на одиницю площі цитоплазми клітин у нормі розміри ядер не враховували. При аналізі даних використовували *t-test* для порівняння незалежних вибірок. Попередньо числові вибірки кількості різних органел перевіряли на нормальність.

3.4. Дослідження експресії генів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (qPCR)

У проростків *А. thaliana* відокремлювали верхню частину із первинними листками, а для експериментальної роботи використовували корені. Близько 70 – 85–ти коренів (загальна маса близько 100 мкг) подрібнювали у рідкому азоті у ступці та виділяли загальну РНК за допомогою міні–набору RNeasy Plant (Qiagen, Hildesheim, Німеччина) згідно із протоколом виробника. Кількість РНК оцінювали спектрофотометром SPEC2000, а цілісність РНК перевіряли гель-електрофорезом (1,5 % агар). Вилучену РНК обробляли ДНК–азою (Qiagen, Hildesheim, Німеччина), щоб усунути потенційне забруднення геномної ДНК. Загальна РНК (~ 1 мкг) транскрибувалася в кодуючу ДНК за допомогою набору зворотної транскриптази (Thermo Scientific, Литва) згідно з інструкціями виробника.

Експресію генів аналізували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі (RT–qPRC), виконаної в оптичній 96-лунковій платівці з використанням термоциклера Biometra (Analytik Jena, Йєна, Німеччина) та наступних умов: 15 с при 95 ° C, 35 циклів по 1 хв при 94° C, 1 хв при 58° C i 1,5 хв при 72° C, після чого 20 хв при 72° C. Реакції містили SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics Corporation, Індіанаполіс, США). Досліджували та аналізували експресію генів *TUA6, ACT2, MAP-65-1, CLASP, FH1, FH4* та *PLD* δ . Специфічність послідовностей нуклеотидних пар праймерів перевіряли на основі бази даних стенограм *A.thaliana* за допомогою TAIR BLAST (http://www.arabidopsis.org/Blast/) та сервісу NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm. nih.gov). Попередньо ліофілізовані праймери розчиняли, проводили стандартну обробку та використовували у концентрації 1:10. Послідовності пар праймерів для ПЛР–ампліфікації кодуючої ДНК представлені в таблиці 3.1.

Праймери ПЛР для генів, що кодують асоційовані з мікротрубочками та актин-зв'язуючі білки

	Номер	Нуклеотидна послідовність ПЛР праймерів, 5´-3´	
Гени	NCBI	Πησμιμ	Зеопотній
	GenBank	прыти	<i>360p0mmu</i>
ACT2	AT3G18780	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
TUA6	AT4G14960	GTTCTGGTTCAGCCTGATGG	CCAGTCCGTACCTCGTCAAT
MAP65-	AT5G55230	ACATTAGTTGCCAAGACCCG	GCCTCCGTTTCTCCTCTTCT
1	1110000200		
CLASP	AT2G20190	CTGTTGAAAGGCTGCATCAA	CGACAACAGCAGGAACAAGA
ΡLDδ	AT4G35790	GGCGGAGAAAGTATCGGAGG	CGAGCTAGAGTCGCTTGAGG
FH1	AT5G25500	AGCCAACTTTGAGTCCGAGG	CATCAGCGCCTTTGACATCG
FH4	AT1G24150	GAGCTTAGGTCACGTGGCTT	CTTCGGTTAAGCACGCATCG
SAND	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
S18	AT2G03810	ATTCCTGGTCGGCATCGTTTA	GCGAAAGCATTTGCCAAGG

Амплікони, генеровані за допомогою звичайної ПЛР, перевіряли гельелектрофоретичним аналізом разом із стандартною ДНК на 50 п.н. (Invitrogen GmbH, Карлсруе, Німеччина). Для цього використовували 1,5 мкл ДНК буферу, 1,5 мкл MgCl₂, 1 мкл dNTP, 1 мкл прямого праймера (із розчину 1:10), 1 мкл зворотного праймера (1:10), 0,2 мкл Таq полімерази, 6,8 мкл води. У кожну лунку добавляли 12,5 мкл ПЛР суміші та 1 мкл ДНК *Arabidopsis*. Використовували стандартну програму для проведення ПЛР у реальному часі.

Довжина амплікону для всіх праймерів становила близько 150 – 200 п.н. (рис. 3.9).



Рис. 3.9. Елекстрофореграма використаних праймерів для виявлення генів *TUA6*, *ACT2*, *FH4*, *FH1*, *MAP65-1* та *PLDdelta* у агарозному гелі

Гени SAND та S18 (pre-ribosomal assembly protein) використовували як внутрішній стандарт ДНК для нормалізації. Зразки з 1 мкл вільної від РНК– ази води замість кДНК використовували як негативний контроль. Стандартні криві (графіки) та ефективність праймера розраховували за допомогою програмного забезпечення, наданого компанією виробником qTower2 (https://www.labwrench.com/thread/206903/analytik-jena-qtower2-software). Експресію для кожної проби розраховували на основі трьох технічних повторень через стандартну криву (яка враховує ефективність праймера). Розрахунок 2^-ΔΔCt, згідно Livak та Schmittgen (2001), використовували для визначення відносного рівня мРНК.

Для кожної проби проводили три технічні повтори, принаймні, з трьох біологічних повторів (зазвичай п'ять- шість повторів) (пули щонайменше із сімидесяти – восьмидесяти проростків). Для оцінки різниці між кожним набором заходів для кожного гена використовували тест непараметричної статистики Wilcoxon rank test (статистична програма PSPP (www.gnu.org)). В експериментах із обробкою зразків OR та CD експресію генів порівнювали з експресією у контролі та при кліностатуванні. Відносна експресія генів вважалася зниженою/підвищенною, якщо вона відрізнялася щонайменше вдвічі від такої у контролі.

3.5. Індукування розвитку аеренхіми в коренях рослин

згідно модифікації Рослини Zea mays вирощували методики, розробленої Bouranis та інші (2006, 2007) для росту рослин Zea mays у водному середовищі, яке характеризується нестачею сірки (S), що призводить до утворення аеренхіми у коренях. Попередньо зернівки кукурудзи замочували впродовж 3 днів на фільтрувальному папері у темряві (26 °С, вологість – 40 %,) до появи коренів. Проростки з корінням довжиною 1–2 см ставили на 5 год у (дистильовану) dH_2O . Потім тримали 1 добу у 1/10 повного розчину солей, 1 добу – у 1/2 повного розчину солей і 3 доби – у повному розчині солей: 7 мМ КNO₃, 1 мМ КH₂PO₄, 2,15 мМ Mg(NO₃)₂, 0,1 мМ NaCl, 2,5 мМ MgSO₄, 0,074 мМ EDTA FeNa, 5 мМ Ca(NO₃)₂, 0,95 мМ Zn ацетат, 25,1 мМ H₃BO₃, 0,5 мМ Cu(NO₃)₂, 0,081 мМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (фотоперіод 16 годин, постійна аерація середовища). Після появи третього листка (доба 0), частину рослин продовжували тримати у повному розчині солей, а частину залишали у розчині, позбавленому SO42- впродовж наступних 12 діб при постійній аерації водного середовища. Для анатомічних досліджень адвентивні корені крони (crown roots) кукурудзи завдовжки 1 см обробляли згідно стандартної цитологічної методики заключення у віск Стідмана та застосовували імуноцитохімічну реакцію для візуалізації мікротрубочок (підрозділ 3.4.1). Досліджували організацію кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у клітинах кори, прилеглих до аеренхімних порожнин у меристемі та зоні розтягу коренів. Усього проаналізовано понад 20 контрольних та 20 експериментальних коренів.

3.6. Аналіз ступеня пошкодження геномної ДНК

ДНК виділяли СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide) методом (Aboul-Maaty and Oraby 2019). Для цього 100 мг свіжих коренів *A.plantago–aquatica* та *S.latifolium* подрібнювали та перемішували у 1,5 мл пробірці «Eppendorf» із

500 мкл СТАВ-буфером для ДНК екстракції, додавали 1 мкл РНКази А (10 мг/мл), перемішували на вортексі і інкубували при 55-65°С впродовж 60 хв. Додатково інкубували при 37°С 10–15 хв, для того, щоб РНК-аза зруйнувала геномну РНК. Після цього у епендорфи додавали рівний об'єм (500-600 мкл) суміші хлороформ: ізоаміловий спирт (25:1), перемішували на вортексі (для розділення ДНК та білків) та центрифугували при 14000 об/хв 5 хв (для розділення органічної та водної фаз). Верхню водну фракцію переносили у чисту 1,5 мл пробірку із 600 мкл холодного ізопропанолу ($+ 4^{\circ}$ C), і ретельно перемішували на вортексі (при перемішуванні спирт осаджує ДНК із розчину). ДНК осаджали центрифугуванням впродовж 5 хв при 14000 об/хв; надосадну рідину зливали. У пробірку із осадженою ДНК добавляли 1 мл 70 % етанолу, перемішували на вортексі і центрифугували впродовж 5 хв при 14000 об/хв; надосадну рідину зливали. Осаджену ДНК одразу розчиняли у 200–500 мкл 1хТЕ (10 мМ Тріс-НСІ, рН 8.0 1 мМ ЕДТА) при 55°С, періодично перемішували 10-20 хв. ДНК зберігали при температурі -20°С впродовж тижнів. Отриману ДНК розбавляли (1:10) і розбавлену розганяли у 2% агарозному гелі. Концентрація виділеної ДНК становила 1,3 мг/мл. У Sium порівнювали цілісність виділеної ДНК у повітряно-водних (S. latifolium) і суходільних рослин (S.sisaroideum).

3.7. Визначення перекисного окиснення ліпідів мембрани клітин рослин

Окиснення ліпідів клітин рослин, яке опосередковано свідчить про реактивність форм кисню визначали за кількістю продуктів розпаду жирних кислот цитоплазматичної мембрани. Для цього виявляли адукти тіобарбітурової кислоти (ТБК), кількість яких виражали в концентрації малонового діальдегіду, оскільки ТБК зв'язується із киснем продуктів розпаду жирних кислот (альдегідних\кетонових груп). Підвищення рівня продуктів, які зв'язуються з ТБК (ТБК-активних продуктів) означає активацію процесів пероксидації ліпідів мембран. За методикою Дріндса та Матова (Dhindsa and Matowe 1981) розтерті корені повітряно-водних та суходільних форм рослин *S. latifolium* та *A. plantago-aquatica* (завдовжки 1–2 см) гомогенізували в 5 мл 0,1%–ої трихлороцтової кислоти і в 1 мл 0,5 %–ої тіобарбітурової кислоти. Суміш інкубували на водяній бані 45 хв із подальшим охолодженням. Вміст пробірок ретельно перемішували та центрифугували 20 хв на 4000 g. Оптичну щільність розчинів вимірювали на спектрофотометрі SPEC 2000. Верхню фазу фотометрували у довжинах хвилі 535–570 нм. Концентрації ТБК-активних продуктів визначали з коефіцієнтом екстинкції 1,56 × 10⁵ см⁻¹ М⁻¹.

Кожний екперимент проводили щонайменше у трьох біологічних повторах. Статистичну обробку результатів експериментів проводили за допомогою програми Origin 7.5.

3.8. Робота з базами даних

Пошук білків, які регулюють активність цитоскелету у різних видів рослин здійснювали по електронній базі даних UniprotKB/SwissProt (https://www.uniprot.org/help/uniprotkb) по послідовності доменів зв'язування із МТ та/або АФ або по цілій послідовності білка. Частину пошуку проводили по базі NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Також по базі NCBI проводили пошук білків цитоскелету, які у рослин опосередковують ендо/екзоцитоз. Праймери конструювали за допомогою програм Perl Primer та бази NCBI.

3.9. Статистичні методи обробки результатів експериментів

Всі експерименти проводили у трикратній повторності. Довжину коренів проростків вимірювали за допомогою програми ImageJ (http://www.imagej.net).

Залежні статистичні вибірки перевіряли на нормальність за допомогою діаграм, опції Q-Q plot та Shapiro-Wilk test у програмі забезпечення статистичного аналізу SPSS (PSPP, www.gnu.org). Порівнювали вибірки у контролі і при дії кліностатування/інгібіторів елементів цитоскелету. Для визначення статистичної достовірності нормальних виборок користувалися коефіцієнтом Ст'юдента (*t–test*), який обчислювали по програмам статистичного аналізу STATISTICA та Origin 6.1. Для обчислень використовували результати із статистично достовірною різницею 95% (p < 0.05).

Інгібування росту обчислювали за формулою I = $[(\mu c - \mu t) / \mu c] \times 100$, де I - відсоток швидкості росту, μc - середнє значення довжини кореня в контролі та μt - значення для росту коренів при обробці агентами. Відносні проценти представлені у гістограмах.

Відмінність у організації мікротрубочок у зоні розтягу коренів проростків обчислювали порівнюючи процентне співвідношення кількості клітин із окремими дезорієнтованими (≥ 45 °) МТ із загальною кількістю обрахованих клітин. Враховували кількість клітин із дезорієнтованими і хаотичними мікротрубочками як у стаціонарному контролі, так і при кліностатуванні. Обраховували близько 15–20 коренів для кожного вимірювання. Як остаточний результат наводили різницю у процентах між кількістю дезорієнтованих клітин у контролі і при кліностатуванні.

Через невелику вибірку (3–5 біологічних повторів із пулу 60-80 коренів *Arabidopsis*), які являли собою середнє значення триразового вимірювання експресії гена (технічні повтори) при статистичному аналізі результатів полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі користувалися методом непараметричної статистики і застосовували Wilcoxon rank test, який вираховували у програмі PSPP (www.gnu.org). Для обчислення використовували результати із статистично достовірною різницею 95%.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ КЛІНОСТАТУВАННЯ НА ОРГАНІЗАЦІЮ ЦИТОСКЕЛЕТУ НА ПОСЛІДОВНИХ СТАДІЯХ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КЛІТИН КОРЕНІВ Zea mays та Beta vulgaris

4.1. Обґрунтування напрямків досліджень

Відомо, що цитоскелет є компонентом сигнальних реакцій, які відбуваються у рослинній клітини у відповідь на дію внутрішніх та зовнішніх чинників (Hussey et al. 2006; Blancaflor et al. 2006; Hardham et al. 2008; Lanza et al. 2012; Ban et al. 2013; Fujita et al. 2013 та інші). Незважаючи на багаторічні дослідження чимало механізмів організації та функціонування елементів цитоскелету у рослин все ще залишаються невизначеними. Насамперед, це стосується просторового розташування мікротрубочок та актинових філаментів клітин коренів багатьох однодольних та дводольних рослин, які розрізняються щодо товщі кори та розмірів ростових зон. Різні види рослин мають свої специфічні риси організації елементів цитоскелету у клітинах коренів (Baluška et al. 1997 b, 2001), проте залишається малодослідженою його організація у коренях ще багатьох видів рослин, серед яких водні та повітряно–водні.

У зв'язку з цим, ми вважали за потрібне вперше дослідити організацію актинових філаментів та мікротрубочок у наземних та повітряно-водних рослин на прикладі однодольних (*A.plantago–aquatica*) та дводольних (*B. vulgaris, S. latifolium*) а також провести порівняльну характеристику їхньої організації із вже досить добре проаналізованими видами однодольних (*Z.mays*) та дводольних (*A. thaliana*) рослин. Мета такого дослідження полягала у виявленні специфічних міжвидових особливостей організації цитоскелету клітин ростових зон коренів.

Слід зазначити, що динамічні перебудови цитоскелету забезпечують швидку відповідь рослин на дію зовнішніх стимулів, що призводить до

перебудови клітинного метаболізму і, як результат, пристосування до змінених умов. Залишаються невизначеними багато ланок сигнальних реакцій, які опосередковують реакцію клітин на дію зовнішніх стимулів. Серед фізичних факторів, які потенційно впливають на реакцію клітин за участю цитоскелету слід зазначити змінену силу тяжіння, виявлення впливу якої набуває особливого значення у зв'язку із інтенсифікацією космічних подорожей. Через необхідність отримувати врожаї культурних рослин в умовах невагомості актуальності набуває дослідження пристосування рослин до реальної мікрогравітації та дії цього стимулу на елементарну складову рослин – клітину. Насамперед, це стосується клітин кореня, який є чутливим органом до орієнтації, поживного середовища та газообміну із стеблом. Невизначеність механізмів функціонування вимагає пошуку нових підходів та застосування комплексних методів дослідження елементів цитоскелету у рослин. Одним із таких підходів є використання кліностатування, як методу, який дозволяє позбавити рослини відчуття спрямованого впливу та мінімізувати дію сили земного тяжіння. Кліностатування усереднює тиск протопласта на кортикальну зону клітин і частково відтворює умови мікрогравітації для гравічутливих клітин кореня (статоцитів), завдяки чому цей метод використовують у лабораторних умовах як моделювання умов реальної мікрогравітації (Wang et al. 2015; Kiss et al. 2019). У своїх дослідженнях ми використовували одноосьове кліностатування (1–D, 2 об/хв), яке мінімізує вплив сили тяжіння в основному на бокові стінки клітин коренів. Сумісне застосування фармацевтичного підходу та кліностатування дозволяє точніше визначити механізми організації та функціонування складових елементів цитоскелету (Hoson et al. 2010) та їхньої взаємодії одне із одним (Collings and Wasteneys 2005; Collings 2008).

У роботі на прикладі *Z. mays, B. vulgaris* та *A. thaliana* обговорюються дані щодо впливу кліностатування на організацію АФ та МТ різних ростових зон коренів, що дозволяє прослідкувати його будову на послідовних стадіях росту та диференціації клітин. Використання інгібіторів актину (цитохалазин D) та тубуліну (таксол та оризалін) сприяє визначенню ролі як окремих елементів цитоскелету так і їхньої сумісної організації у ростових реакціях коренів.

Дослідження генної регуляції білків, асоційованих як із АФ, так і з МТ, розкриває механізми динамічної організації цитоскелету та його участі у сигналінгу рослин. Актуальності набуває клітинному визначення транскрипційної регуляції генів білків, які забезпечують функціонування мережі МТ під час зміни механічного навантаження при кортикальної кліностатуванні. У роботі досліджували експресію генів, які кодують структурні білки цитоскелету – TUA6 та АСТ2. Відомо, що ці ізотипи експресуються у вегетативних тканинах рослин і, зокрема, експресія і функціонування TUA6 є малодослідженими. Також, досліджували транскрипцію генів таких асоційованих із мікротрубочками білків як MAP65-1 (Chan et al. 2003; Smertenko et al. 2008; Lucas et al. 2011; Ho et al. 2012), CLASP (Kirik et al. 2007; Al-Bassam et al. 2010; Ambrose et al. 2011, 2013) Ta PLDS (delta) (Gardiner et al. 2001; Dhonukshe et al. 2003 a; Ho et al. 2009), асоційованих з актином білків – формінів FH1 (Oulehlová et al. 2019) та FH4 (Cheung et al. 2010; Deeks et al. 2010; Breitsprecher and Goode 2013; Cvrčkova 2013), серед яких PLDδ (Pleskot et al. 2012, 2014) Ta FH4 (Deeks et al. 2010; Wang 2012 b; Van Gisbergen and Bezanilla 2013) залучені у сумісну організацію з'єднань між АФ та МТ. Усі вказані білки присутні у примембранному просторі клітини і забезпечують організацію та функціонування континууму клітинна стінка – цитоплазматична мембрана – цитоскелет у рослин, який є первинною мішенню зовнішнього впливу (Baluška et al. 2003; Wang and Hussey 2015). Насамперед, нас цікавило, яким чином зміна механічного навантаження від кліностатування, а саме, його зменшення, впливає на організацію цитоскелету та його регуляцію асоційованими білками, які опосередковують активність мережі цитоскелетних елементів у кортикальній області клітини.

Поряд з тим змінена сила тяжіння не є єдиним фактором, який впливає на рослину у космічному польоті, і відомо, що під час довготривалих

космічних місій при рості у закритих камерах внаслідок зміни конвекції повітря у рослин порушується газообмін між коренем та стеблом. Внаслідок цього рослини зазнають гіпоксії, результатом якої є пригнічення ростових параметрів і втрата врожайності (Porterfield et al. 1997, 1998, 2002). Гіпоксія характерна і для коренів рослин, які в умовах Землі ростуть зануреними у воду (Schussler et al. 1997; Postma et al. 2011). Як пристосування до гіпоксії у коренях водних та повітряно-водних рослин розвивається аеренхіма – система внутрішньо кореневих порожнин, які поліпшує газообмін між коренем та стеблом (Evans 2003). Елементи цитоскелету задіяні у сигнальних реакціях програмованої загибелі клітин при формуванні кореневої аеренхіми (Smertenko et al. 2003; Gourlay and Ayscough 2004, 2005; Franklin-Tong and Gourlay 2008; Keech et al. 2010). Окрім, того, через наявність архімедової сили у воді частково послаблюється вплив сили тяжіння. Тому актуальним є дослідження механізмів, які відбуваються за участю цитоскелету у коренях повітряно-водних рослин в процесі розвитку аеренхіми. У роботі представлені дослідження щодо визначення ролі АФ та МТ на послідовних стадіях розвитку аеренхіми коренів A. plantago-aquatica та S. latifolium. Формування аеренхіми є пристосувальною реакцією до гіпоксії середовища, вона сприяє поліпшенню газообміну і у означених видів рослин формується двома різними шляхами – без руйнування частини клітин кори коренів (A. plantagoaquatica) та з руйнуванням та елімінацією частини клітинних рядів кори (S. latifolium), що відбувається шляхом програмованої загибелі. Вважали актуальним дослідити організацію мережі мікротрубочок та актинових філаментів на послідовних етапах розвитку процесів елімінації клітин кори коренів, щоб з'ясувати роль цитоскелету у загибелі клітин при формуванні аеренхіми внаслідок гіпоксії. Порівняльний аналіз реакцій елементів цитоскелету на мікрогравітацію та нестачу кисню надасть можливість виз-начити стресові умови росту та розробити заходи їхнього поліпшення у космічних польотах та сільському господарстві.

4.2. Кортикальні мікротрубочки у клітинах меристеми та зони розтягу коренів

4.2.1. Організація мікротрубочок у меристемі

Клітини кори у меристемі коренів рослин Z.mays та B. vulgaris на поперечних зрізах коренів характеризуються овальною та округлою формою (рис. 4.1 a, b).

На поздовжніх зрізах коренів в акропетальному напрямку форма клітин – витягнуті прямокутники. Клітини меристеми коренів, зазвичай, характеризуються щільною цитоплазмою та малою кількістю вакуоль. Ядро у таких клітинах займає серединну позицію. Імуноцитохімічний метод, який передбачає забарвлення первинними антитілами до тубуліну та вторинними антитілами із флуоресцентною міткою (по типу сендвіча), надає змогу розрізнити у клітинах кортикальні та ендоплазматичні мікротрубочки (відповідно кМТ та еМТ) (рис. 4.1. а, b). «Розмиті» ділянки клітини свідчать про присутність неполімеризованого тубуліну. Через високу щільність цитоплазми, характерну для меристематичних клітин, часто в них важко розрізнити ендоплазматичні мікротрубочки.

Кортикальні мікротрубочки, які формують мережу безпосередньо під цитоплазматичною мембраною, являють собою впорядковані пучки різної щільності, розміщені переважно повздовжньо до поперечного зрізу клітини, що є впоперек основній осі росту кореня (рис. 4.1. a, b; додаток A). Трапляються також пучки мікротрубочок, які відхиляються на незначний кут від основного масиву MT.


Рис. 4.1. Кортикальні (позначка*) та ендоплазматичні мікротрубочки (позначка <) у клітинах меристеми коренів (поперечні зрізи) *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a, b) і під час кліностатування (c, d). Масштаб 10 мкм

Клітини апікальної меристеми вищих рослин швидко діляться, тому у цій зоні кореня розрізняють структури клітинного поділу, сформовані МТ, як то препрофазна смужка (ППС), веретено поділу (ВП) та фрагмопласт (ФР) (рис. 4.2).

Дослідження структури кМТ у меристемі кліностатованих коренів *Z.mays* та *B.vulgaris* не виявили відмінностей як між вказаними видами, так від їхньої організації у стаціонарному контролі (Шевченко 2021). У вказаних видів кортикальні МТ являли собою поперечні смуги (рис. 4.2 b).



Рис. 4.2. Структури клітинного поділу у меристемі *Zea mays* у контролі (а) і під час кліностатування (b). Препрофазна смужка (ППС), веретено поділу (ВП) та фрагмопласт (ФР). Масштаб 10 мкм

Також при кліностатуванні не відмічали змін і у структурах клітинного поділу, сформованих МТ.

4.2.2. Організація мікротрубочок у зоні розтягу

Дистальна зона розтягу кореня (ДЗР або перехідна зона), яка знаходиться між меристемою і зоною швидкого видовження (центральна зона розтягу (ЦЗР)), характеризується переважно дифузним (ізотропним) ростом, із-за чого на поздовжніх зрізах клітини поступово втрачають прямокутну форму, характерну для меристеми, починають видовжуватися і набувати форми, подібної до квадратної (рис. 4.3) (Shevchenko et al. 2006, 2007, 2008). ДЗР являє собою резервуар постачання клітин в зону активного розтягу і швидкість, з якою клітини проходять ДЗР, сприяє пошуку коренем поживного середовища та визначає існування рослин у певних умовах (Baluška et al. 1997 b, 2001). Це єдина зона кореня, яка здатна формувати відповідь на зовнішні сигнали у вигляді згину і реагує на них зміною темпів росту клітин (Mancuso et al. 2006). Окрім того, клітини цієї зони мають певні особливості, такі як піки коливання іонних потоків та ауксину, а також входу кисню (Baluška and Мапсиso 2013). У всіх тканинах дистальної зони розтягу як контрольних, так і кліностатованих коренів рослин реєстрували кортикальні і ендоплазматичні мікротрубочки у клітинах коренів означених видів представлені як мережею окремих МТ, так і їхніх пучків різної щільності, які оточують ядро і радіально розходяться від навколоядерної області до клітинної периферії, де деякі з них закріплюються на цитоплазматичній мембрані (ЦМ), як відомо, за допомогою спеціальних білків (рис. 4. 3 а - с) (Shevchenko et al. 2005 b).

Не відмічали різниці у будові мережі кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у клітинах зони розтягу між коренями досліджуваних рослин *Z. mays* і *B. vulgaris*. Несуттєву різницю спостерігали лише щодо ступеня проявлення кортикальних мікротрубочок, яка була чіткішою у клітинах коренів *B. vulgaris* що, ймовірно, зумовлене різною спорідненістю антитіл до тубуліну серед тканин коренів досліджуваних рослин.

Кортикальні мікротрубочки в районі пізньої меристеми та дистальної зони розтягу, в основному, представлені щільними тяжами, розміщеними перпендикулярно поздовжній осі головного кореня (рис. 4. 3; додаток А).

Подібна організація кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок описана для *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, BY cell culture, *Daucus carota*, *Medicago trunculata* та багатьох інших рослин (Hasezawa et al. 1988; Kutsuna et al. 2002; Wasteneys et al. 2009).

Кліностатування помітно не впливало і не змінювало організацію ендоплазматичних мікротрубочок як у *Z.mays*, так і у *B.vulgaris* (рис. 4.3. c, d; додаток А).



Рис. 4.3. Кортикальні (*) та ендоплазматичні (<) мікротрубочки в дистальній зоні розтягу коренів *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a, c) та під час кліностатування (b, d). Масштаб 10 мкм

Проте, розташування кортикальних мікротрубочок у клітинах зони розтягу коренів вказаних рослин при кліностатуванні зазнавало певних змін, описаних у підрозділі 4.2.3.

4.2.3. Вплив кліностатування на мікротрубочки клітин дистальної зони розтягу

Детальний аналіз кліностатованих проростків Z.mays, B.vulgaris а також порівняння із дослідженим пізніше A.thaliana показав, що у деяких клітинах коренів пізньої меристеми та дистальної зони розтягу відмічаються як відхилення окремих кМТ від поперечної організації на кут, більший ніж 45⁰, так і хаотичні кортикальні мікротрубочки (рис. 4.4 а, b, d, f). Слід відмітити, що відхилення кортикальних мікротрубочок спостерігали і у рослин у стаціонарному контролі, однак, у корі кліностатованих рослин кількість таких дезорієнтованих кортикальних мікротрубочок дещо зростала (Kalinina et al. 2008, 2009; Шевченко 2021; Shevchenko and Krutovsky 2022). Слід зазначити, що відмінність у організації мікротрубочок у дистальній зоні розтягу коренів проростків обчислювали порівнюючи процентне співвідношення кількості клітин із окремими дезорієнтованими ($\geq 45^{0}$) мікротрубочками із кількістю клітин із поперечними мікротрубочками у контролі і при кліностатуванні. Представлений результат є різницею (у процентах) у кількості клітин із дезорієнтованими мікротрубочками між кліностатованими та контрольними коренями проростків (порівняння вибірок p<0,05). Так, у *Z.mays* відмічали близько – 13 % таких клітин, у *B.vulgaris* та *A. thaliana* – близько 10 % (табл. 4.1).

Подібна орієнтація кортикальних мікротрубочок була притаманна досліджуваним однодольним і дводольним видам рослин (додаток А).

Інколи у клітинах коренів досліджуваних рослин спостерігали хаотичні кМТ (рис. 4.4 b). Слід зазначити, що поряд із обробкою коренів *Z.mays* та *B.vulgaris* класичною цитологічною методикою препаратів для світлової мікроскопії та імуноцитохімії ми спостерігали за організацією мікротрубочок і у живих клітинах лінії *A.thaliana*– GFP– MAP4 (рис. 4.4 е, f), де також відмічали подібну організацію, а саме, хаотизацію мережі кортикальних мікротрубочок у близько 10 % клітин кореня рослин (табл. 4.1).



Рис. 4.4. Розташування кортикальних мікротрубочок у клітинах кори пізньої меристеми та зони розтягу проростків *Zea mays* (a, b), *Beta vulgaris* (c, d), *Arabidopsis thaliana* – GFP – MAP4 (e, f) у контролі (a, c, e) та під час кліностатування (b, d, f). Масштаб 10 мкм

	Рослини				
Тип обробки	Zea mays	Beta vulgaris	Arabidopsis		
рослин			thaliana		
Контроль (%)	19,3 ± 2,6	17,38 ± 5,3	18,58 ±2,4		
Значення р	3,89E-07	5,21E-08	4,77E-12		
Кліностатування	32, 38 ± 3,8	27,29 ± 5,2	28,26 ±2,8		
(%)					
Значення р	3,94E-09	1,65E-08	1,62E-08		
Різниця	13,08	10,52	9,68		

Кількість клітин із дезорієнтованими мікротрубочками у дистальній зоні кореня при кліностатуванні (%)

Виходячи з вищеозначеного, на прикладі одно– і дводольних рослин показано, що кліностатування підвищує частоту дезорганізації кортикальних мікротрубочок у клітинах кори на рівні пізньої меристеми і зони розтягу кореня (Shevchenko et al. 2003, 2005). Дискоординовану організацію МТ у *A.thaliana*–GPF–MAP4 при кліностатуванні відмічали і інші дослідники (Pozhvanov et al. 2021). Не виключено, що дезорієнтація та хаотизація мікротрубочок у ДЗР при кліностатуванні призводить до помітної дискоординації росту – його підсилення у *Z.mays* та пригнічення у *B.vulgaris* (рис. 4.5; табл. 4–2).



Рис. 4.5. Відносний приріст (%) коренів проростків Zea mays та Beta vulgaris під час кліностатування (p< 0,05)

Таблиця 4.2

Статистична характеристика вибірок довжини коренів Zea mays та Beta vulgaris при кліностатуванні

Повто ри	μc	n1	μt	n2	t(n1 + n2 - 2)	р
	Контроль/Кліностат Z. mays					
1	$7,8 \pm 2,3$	41	$11,2 \pm 3,6$	45	-4,80 (84)	0,000007
2	$1,32 \pm 0,6$	20	2,35±1,0	37	-4,05 (55)	0,000165
3	$2,19 \pm 0,9$	34	$2,0 \pm 0,9$	29	0,81 (61)	0,420267
Контроль/Кліностат B. vulgaris						
1	$1,30 \pm 0,4$	84	$1,11 \pm 0,5$	183	3,14 (265)	0,001869
2	$2,22 \pm 0,77$	53	$1,97 \pm 0,6$	28	1,49 (79)	0,141388

Протилежну реакцію коренів Z.mays та B.vulgaris на дії самого лише кліностатування можна пояснити декількома причинами. Насамперед, це може бути пов'язаним із видовою особливістю рослин. По друге, розміри кореня *Z.mays*, зокрема його ширина, більш, ніж удвічі переважає розміри кореня *B.vulgaris* (рис. 4.6).



Рис. 4.6. Зовнішній вигляд коренів *Zea mays* (a) та *Beta vulgaris* (b), які зазнали впливу кліностатування та таксолу

Така відмінність зумовлена будовою тканин кореня, зокрема кори, оскільки для кукурудзи характерні 6–12 шарів кори, тоді як у буряка їх не більше 4–х. Не виключено, що у коренях із товстішою корою реакція на зовнішній стимул відбувається одразу не в усіх клітинних файлах, завдяки чому і спостерігається відмінність серед темпів росту загального кореня.

Окрім того, відомо, що дезорганізація МТ впливає на організацію клітинної стінки, роблячи її менш жорсткою і це також може прискорювати ріст кореня. Не виключена дискоординація росту окремих клітинних файлів, кількість яких робить внесок у різницю росту цілого кореня. Окрім того, різниця між рослинами, ймовірніше за все, зумовлена ще і тим, що регуляція ростових реакцій коренів є складним багатокомпонентним процесом, у який, окрім цитоскелету, залучені також багато інших факторів. Тому не виключено, що між однодольними (*Z.mays*) та дводольними (*B.vulgaris*) видами рослин існують певні відмінності у координації ростових процесів при кліностатуванні. У ЦЗР клітини видовжуються переважно в одному напрямку (рис. 4.7. a, c) – ростуть анізотропно (Ishikava and Evans 1993; Baluška and Mancuso 2013). Ендоплазматичні МТ у клітинах майже не відмічають через високу

вакуолізацію клітин (рис. 4.7 b, c). У проксимальній частині дистальної зони розтягу коренів починають зустрічатися навскісні мікротрубочки (рис. 4.7 a, c, d), а в центральній зоні розтягу – кортикальні мікротрубочки, і їхня частота суттєво підвищується.



Рис. 4.7. Організація кортикальних мікротрубочок у клітинах центральної зони розтягу коренів *Zea mays* та *Beta vulgaris* у контролі (а, b) та при кліностатованні (c, d). Масштаб 10 мкм

Однак, виходячи із збільшення кількості частково дезорієнтованих кортикальних мікротрубочок y дистальній зоні розтягу коренів зразків, логічно кліностатованих припустити подальше підвищення хаотичності кортикальних мікротрубочок у центральній зоні розтягу коренів при кліностатуванні.

4.3. Вплив таксолу на організацію кортикальних мікротрубочок ростових зон кореня

У клітинах ДЗР коренів *Z.mays* та *B.vulgaris* при дії таксолу (50 мкМ) відмічали помітне руйнування кортикальних МТ (рис. 4.8).



Рис. 4.8. Дія таксолу на мікротрубочки клітин пізньої меристеми та зони розтягу коренів рослин *Zea mays* та *Beta vulgaris* у стаціонарному контролі (a, b) та при кліностатуванні (c, d). Зірочками (*) позначені кортикальні, а позначками (< та >) ендоплазматичні мікротрубочки. Масштаб 10мкм

Спостерігали порушення організації впорядкованих поперечних кМТ та розмиті області деполімеризованого тубуліну (рис. 4.8 a, b, d; додаток Б). Слід відмітити, що дослідження кристалічної структури тубуліну та структури таксолу, показали, що останній навіть сприяє збірці тубуліну через посилення

бічних взаємодій між протофіламентами або фіксацію поздовжніх тубулінових інтерфейсів у GTP–тубуліноподібній конформації (Alushin et al. 2014). Таксол стабілізує та індукує зв'язування МТ у пучки.

Руйнування таксолом були подібними у Z. mays (рис. 4.8 а) і у B. vulgaris (рис. 4.8 b) і призводило до спотворення кМТ, появі числених конгломератів з тубуліну. Ендоплазматичні МТ при руйнуванні таксолом також фрагментувалися (рис. 4.8). Різниці у ступені руйнування мікротрубочок у клітинах ДЗР коренів Z. mays та B. vulgaris, та між контрольними та кліностатованими рослинами не відмічали (рис. 4.8 с, d). Відомо, що таксол перешкоджає нормальному функціонуванню МТ, блокуючи їх, в результаті чого МТ перестають функціонувати, що, загалом, позначається на пригніченні росту коренів (рис. 4.9).



Рис. 4.9. Відносний ростовий приріст коренів при дії таксолу у стаціонарних та кліностатованих проростків Zea mays та Beta vulgaris (p < 0.05)

Повт ори	μc	n_1	μt	n_2	$t(n_1+n_2-2)$	p
		Конт	роль/Дія орг	изалін	y Z. mays	
1	1,43 ± 0,6	33	$1,08 \pm 0,4$	39	2,77 (70)	0,007095
2	$2,19 \pm 0,9$	34	1,4 ± 0,6	32	3,999081 (64)	0,000167
3	1,32 ± 0,6	20	$1,0 \pm 0,5$	25	1,94 (43)	0,05
Контроль/Дія оризаліну B. vulgaris						
1	1,11 ± 0,3	14	$0,78 \pm 0,26$	30	3,44 (42)	0,001335
2	1,30 ± 0,4	84	0,81 ± 0,31	100	9,49 (182)	1,28721960861 951E-17
Дія OR на стаціонарні рослини/Дія OR на кліностатовані Z. mays						
1	1,08 ± 0,4	39	1,31 ± 0,4	47	-2,75 (84)	0,007219
2	$1,0 \pm 0,5$	25	$1,06 \pm 0,3$	26	-0,57 (49)	0,571215
3	$1,2 \pm 0,6$	33	$0,78 \pm 0,4$	45	4,01 (76)	0,000141
Дія OR на стаціонарні рослини /Дія OR на кліностатовані B. vulgaris						
1	$0,79 \pm 0,3$	30	$0,92 \pm 0,2$	65	-2,67 (93)	0,009066
2	0,81 ± 0,3	100	$0,84 \pm 0,2$	55	-0,70 (155)	0,483634

Характеристика вибірок довжини коренів Zea mays та Beta vulgaris при дії таксолу та кліностатування

μс – середнє значення довжини коренів у контролі, *μt* – середнє значення довжини коренів у експерименті, *t* – значення коефіцієнта Cr'юдента, *n1* та *n2* – розмір вибірки, *p* – значення статистичної вірогідності.

У обох видів не відмічали різниці у ступені інгібування росту проростків між обробкою таксолом стаціонарних та кліностатованих рослин.

При цьому відмічають, що у *Z. mays* застосування таксолу при кліностатуванні призводило до пригнічення росту коренів, а у *B. vulgaris*, навпаки, до посилення (рис. 4.9). Така різниця свідчить про протилежний вплив цього стимулу на ріст коренів різних видів рослин, враховуючи той факт, що саме лише кліностатування діє навпаки і підсилює ріст коренів саме *Z. mays*. Це може бути проявом видоспецифічної реакції рослин (Шевченко 2021).

Оскільки, у деяких випадках при руйнуванні цитоскелету при кліностатуванні відбувається підсилення росту не виключена активація специфічного механізму стабілізації росту, спрямованого на забезпечення життєдіяльності клітин коренів при стресових умовах.

Слід зазначити, що цитоскелет є одним із численних компонентів складної системи регулювання росту клітин рослин при дії різного роду стресу. Зокрема відомо, що ураження МТ еліситором Нагріп призводить до активації експресії генів, які задіяні у реакції-відповіді на дію патогену (Qiao et al. 2010).

У клітинах ЦЗР таксол призводив до подальшого руйнування мережі мікротрубочок. Проте, руйнування кабелів (щільних пучків) кМТ у цій зоні, на відміну від ДЗР та меристеми були менш помітними. Ймовірніше всього, це пов'язано із збільшеною товщиною пучків мікротрубочок (рис. 4.10 a, b; додаток Б).



Рис. 4.10. Дія таксолу на організацію мікротрубочок центральної зони розтягу коренів *Zea mays* (а) та *Beta vulgaris* (b). Масштаб 10мкм

Дія таксолу на еМТ у ЦЗР коренів обох видів не відрізнялася від руйнувань даним реагентом у меристемі та ДЗР (рис. 4.10 с, d; додаток Б). Подібні руйнування МТ таксолом були описувані у *A. thaliana* (Baskin et al. 2001). Ступінь руйнування був різним серед різних клітинних файлів, що зумовлено різною проникністю розчину таксолу у тканини кореня. Слід відмітити також майже відсутність даних літератури стосовно одночасної дії і хімічного і фізичного чинника на організацію елементів цитоскелету. При цьому не відмічали впливу фізичних факторів на ступінь пошкодження цитоскелету дією інгібіторів. У наших експериментах також не відмічали різниці як між ступенем руйнування кортикальних мікротрубочок у кліностатованих та контрольних рослинах обох видів, так і ступенем руйнування МТ між видами (рис. 4.10). Проте, слід зазначити, що таку різницю важко виявити візуально, і, окрім того, вона може бути зумовленою зміною активності численних асоційованих із цитоскелетом білків.

4.4. Актинові філаменти у ростових зонах кореня

4.4.1. Організація актинових філаментів у меристемі

У клітинах епідермісу і кори на рівні меристеми коренів Z.mays та B.vulgaris мережа мікрофіламентів складається з переплетених $A\Phi$ а також їхніх пучків різної щільності. Актинові філаменти оточують ядра і вакуолі, пучки мікрофіламентів відходять від області навколо ядра і закріплюють ядро на периферії клітин. Як відомо, актинові філаменти прикріплюються за допомогою асоційованих білків до цитоплазматичної мембрани. Загалом, мережа актинових філаментів має вигляд густої переплетеної сітки, яка оточує органели у клітині, чим забезпечує їхнє позиціонування. Окрім того, мережа актинових філаментів також забезпечує екзоцитоз та клітинний транспорт (Kozeko et al. 2005; Shevchenko and Kordyum 2005). У Z.mays спостерігали як окремі виразні пучки актинових філаментів, так і переплетену мережу з мікрофіламентів. І у Z.mays, і у B.vulgaris у примембранному просторі клітин відмічали щільніші угруповання з актину (рис. 4.11 а, b; додаток A), що свідчить про навність специфічної мережі із коротших актинових філаментів, яка формує угруповання актинових філаментів, задіяне у опосередкуванні екзоцитозу (Wang and Hussey 2015). Подібну організацію для актинових філаментів у меристемі коренів вищих рослин описували також Clayton та Lloyd (1985).

Для рослин *Z.mays* організація мережі актинових філаментів у різних типах клітин ростових зон коренів досконально описана у Baluška та інші (1997 b, 2001).



Рис. 4.11. Актинові філаменти у клітинах меристеми коренів (поперечні зрізи коренів) *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у стаціонарному контролі (a, b) і під час кліностатування (c, d). Масштаб 10 мкм

У наших дослідженнях не відмічали різниці у організації кортикальної мережі актинових філаментів клітин меристеми між коренями рослин *Z.mays* та *B.vulgaris*.

4.4.2. Організація актинових філаментів у дистальній зоні розтягу кореня

У клітинах кори на рівні пізньої меристеми та ДЗР *Z. mays* та *B. vulgaris* мережа актину являла собою переплетені АФ без переважної орієнтації (рис.4.12 a, c, d; додаток A).



Рис. 4.12. Актинові філаменти у клітинах дистальної зони розтягу коренів (поздовжні зрізи коренів) *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a, b) і під час кліностатування (c, d). Зірочками (*) відмічені

специфічні для *Z.mays* угруповання з актинових філаментів; стрілочки – кортикальні філаменти. Масштаб 10 мкм

Актинові філаменти оточували ядра та вакуолі, яких у цій зоні у порівнянні із меристемою побільшало (рис. 4.12 b). А саме, актинові філаменти були представлені типовою «корзинкою», у якій розміщувалися ядра і вакуолі і різної щільності пучками АФ, які радіально простягалися від навколоядерної області до цитоплазматичної мембрани клітин, на якій відмічали їхнє закріплення (рис. 4.12 a, c, d). Відзначали також наявність неполімеризованого актину у вигляді нечітких, на знімках розмитих зон (рис. 4.12 b - d). Таку саму організацію актинового цитоскелету описували і інші (Clayton and Lloyd 1985; Liu et al. 2011).

Саме у дистальній зоні розтягу розрізняють також так звані кортикальні актинові філаменти, які формують тонку мережу поперечних кабелів у клітинах епідермісу і шарів кори (рис. 4.12 с). Така мережа кортикальних актинових філаментів, загалом, співпадає із розміщенням мережі кортикальних мікротрубочок.

Виразні кортикальні мікрофіламенти а також їхні пучки характерні для *Z.mays* (рис. 4.12 a, c). У *B.vulgaris* мережі кортикальних актинових філаментів дуже тонка, не формує виразних пучків, що вимагає спеціального наведення об'єктиву мікроскопа (Shevchenko and Kordyum 2005).

У *Z.mays* в дистальній зоні розтягу коренів відмічали товсті пучки актинових філаментів, які оточували ядра і залягали поздовжньо напрямку головного кореня (рис. 4.12 с, зірочки). Вважають, що такі пучки забезпечують транспорт везикул на цитоплазматичну мембрану, чим сприяють розтягу і росту клітин (Baluška et al. 1997 b).

У *B.vulgaris* у оточенні ядер відмічали лише поодинокі актинові філаменти. На відміну від *Z.mays*, для *B.vulgaris* не характерні специфічні утворення із актинових філаментів. Для клітин центральної зони розтягу (ЦЗР) коренів як для *Z.mays*, так і для *B.vulgaris* характерна поширена вакуолізація із формуваннями великої центральної вакуолі, тому мережа актину тут розрізняється не чітко (рис. 4.13 а, b; додаток Б).

Проте, поодинокі АФ видимі у площинах, не зайнятих вакуолями. По всій цитоплазмі клітини спостерігають неполімеризований актин. Також, актинові філаменти присутні у примембранній області клітин, де формують щільні скупчення.



Рис. 4.13. Актинові філаменти у клітинах центральної зони розтягу коренів (поздовжні зрізи) рослин *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a,b) та під час кліностатування (c, d). Масштаб 10 мкм

У центральній зоні розтягу через посилену вакуолізацію рештки зруйнованих АФ накопичувалися у області біля ЦМ, іноді, конгломерати з актину спостерігали і у цитоплазмі (рис. 4.13). Не спостерігали різниці у організації АФ у клітинах меристеми, ДЗР та ЦЗР між контрольними та кліностатованими коренями рослин *Z. mays* та *B. vulgaris* (рис. 4.12 с, d; рис. 4.13 с, d).

Проте, деякі дослідження свідчать на користь перебудови актинового цитоскелету у клітинах рослин під час кліностатування (Pozhvanov et al. 2021). Слід зазначити, що мережа актинового цитоскелету надзвичайно тонка (товщина полімера близько 7 нм). Окрім того, АФ надзвичайно чутливі до багатьох класичних фіксаторів цитології, зокрема високих концентрацій параформальдегіду, а також глютаральдегіду, що значно обмежує їхнє дослідження на препаратах і може надавати хибну інформацію щодо зміни орієнтації філаментів.

Найточнішу інформацію надає дослідження рослин, трансформованих конструкціями, які декорують філаменти флуоресцентними барвниками. Проте, дослідження таких конструкцій також може надавати недостовірну інформацію у зв'язку з тим, що не всі структури актинового цитоскелету можуть декоруватися і також, через те, що програма, яка виявляє зміну орієнтації може орієнтуватися здебільшого на товстіші пучки актинових філаментів, ніж на окремі тонкі мікрофіламенти.

Ми також не виключаємо таку можливість і вважаємо, що поряд із візуальними спостереженнями за можливими перебудовами мережі АФ потрібні дослідження зміна активності білків, які асоціюються із актином і опосередковують його організацію і функціонування. У своїй роботі ми експериментували з одними з найбільш досліджених із таких білків – форміном FH4 та білком ЦМ – фосфоліпазою PLDδ (delta), проте, кількість таких білків досить численна. Слід зауважити, що пошук таких білків і дослідження їхньої активності розкриває багато перспектив для визначення механізмів як структурної організації цитоскелету, так і його залучення у різноманітні сигнальні процеси клітин у реакціях адаптації до мінливості зовнішнього середовища.

4.5. Вплив цитохалазину на організацію актинових філаментів ростових зон кореня

В експериментах із обробкою цитохалазином D (CD 10 -20 мкМ) мережа кортикальних AФ зазнавала однакового руйнування як у контролі, так і при кліностатуванні (рис. 4.14; додаток Б). При 10 і 20 мкМ руйнування були подібними, проте, при концентрації 20 мкМ відмічали сильніші порушення мережі МТ і зупинку росту коренів (рис. 4.14).



Рис. 4.14. Дія цитохалазину D на актинові філаменти у клітинах меристеми коренів (поперечні зрізи) *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a, b) і під час кліностатування (c, d). Масштаб 10 мкм

При дії 10 мкМ цитохалазину D у меристемі Z.mays та B.vulgaris мережа актинових філаментів фрагментувалася, окремі угрупування з актину розміщувалися хаотично по всій площі клітини (рис. 4.14). Відбувається деполімеризація актинових філаментів, про що свідчить порівняння конгломератів з актину із іншими типами деполімеризованої мережі актинових філаментів, наприклад, у пилкових трубках *Papaver rhoas* (Snowman et al. 2002).

Відмічали однакові ознаки руйнування актинових філаментів цитохалазином як у *Z.mays*, так і у *B.vulgaris*. Однак, часто, у *B.vulgaris* мережа актинових філаментів, загалом, виглядала зруйнованішою (рис. 4.14 b, d).

Не виключено, що ступінь руйнування актину може бути різний у залежності від проникнення інгібітора у клітини, що, значною мірою, залежить від товщі кори. Відомо, що кора коренів у рослин *Z.mays* майже вдвічі товща за кору у *B.vulgaris* (підрозділ 4.1).

У дистальній зоні розтягу коренів як у *Z.mays*, так і у *B.vulgaris* цитохалазин D також часткового порушував організацію мережі актинових філаментів. Актинові філаменти фрагментувалися і рештки з актину розташовувалися по всьому периметру клітин у вигляді конгломератів різного розміру та щільності (рис. 4.15; додаток Б). Це відбувалося через перешкоджання цитохалазином D полімеризації філаментів.

Скупчення з деполімеризованого актину спостерігали в усіх клітинах, через що забарвлення актину антитілами давало яскраву картину (рис. 4.15 a, d). Порівняно із меристемою дистальна зона розтягу коренів *B.vulgaris* вакуолізованіша. Скупчення актину відмічали у цитоплазмі у оточенні численних вакуоль різного діаметра (рис.4.15 b, d).

У клітинах коренів наявний неполімеризований актин у вигляді розмитих нефокусованих зон (рис. 4.15). У центральній зоні розтягу обох видів досліджуваних рослин спостерігали руйнування актинових філаментів однакового ступеня (Kozeko et al. 2005).



Рис. 4.15. Вплив цитохалазину D на актинові філаменти у клітинах дистальної зони розтягу (поздовжні зрізи) коренів *Zea mays* (a, c) та *Beta vulgaris* (b, d) у контролі (a, b) і під час кліностатування (c, d). Масштаб 10 мкм

Слід зазначити, що цитохалазин D призводив до уповільнення росту коренів Z.mays i B.vulgaris як у стаціонарному контролі, так і під час кліностатування (рис. 4.16). Причому, у Z. mays кліностатування помітно не впливало на ступінь руйнування актинових філаментів цитохалазином D, що призводило до майже однакових темпів росту коренів (рис. 4.16). Проте, слід відмітити, що вплив кліностатування на ріст кореня був меншим у обробленого цитохалазином B. vulgaris (рис. 4.16), темп якого збільшувався. Таку ж закономірність спостерігали і для A. thaliana при нижчій концентрації інгібітора (розділ 5), що може бути пов'язане із критичною роллю актинових філаментів у регулюванні росту клітин дводольних у несприятливих умовах. Вважають, що цитохалазин уповільнює динаміку актину (швидкість розбирання та збирання полімера), чим і впливає на ростові процеси у клітинах (Holzinger and Blaas 2016).



Рис. 4.16. Приріст головних коренів проростків Zea mays та Beta vulgaris після дії цитохалазину D у контролі і під час кліностатування (p < 0.05)

Можливо, що при кліностатуванні відбувається активація специфічного механізму адаптації та підтримання росту коренів рослин у стресових умовах, частиною якого є актинові філаменти.

Таким чином, вперше досліджена організація кортикальних та ендоплазматичних МТ у клітинах коренів *B. vulgaris* виявилася подібною до такої у *Z.mays*. У клітинах меристеми і зони розтягу коренів еМТ представлені як мережею окремих МТ, так і їхніх пучків різної щільності, які оточують ядро і радіально розходяться від навколоядерної області до клітинної периферії, де частина закріплюється на цитоплазматичній мембрані. Не відмічали суттєвої різниці у будові еМТ між *Z. mays* та *B. vulgaris*. Кортикальні МТ в районі пізньої меристеми та ДЗР в основному, представлені щільними смугами, розміщеними перпендикулярно поздовжній осі головного кореня.

Вплив кліностатування на мікротрубочки клітин дистальної зони розтягу позначався у появі як хаотичних кМТ, так і відхиленні окремих кМТ на кут, більший ніж 45⁰ від поперечної орієнтації. У *Z.mays* відмічали близько 13 % таких клітин, у *B.vulgaris* – близько 10 %. Дезорієнтація МТ у ДЗР при кліностатуванні є внеском у помітну дискоординацію росту – підсилення у Z.mays та пригнічення у B.vulgaris. Це може бути видоспецифічною ознакою, але може також залежати від анатомії кореня. Слід зазначити про відмінність у будові кори рослин, оскільки для кукурудзи на рівні пізньої меристеми і ДЗР характерні 9-14 шарів кори, тоді як у буряка їх не більше 4-х. Відомо, що дезорганізація МТ впливає на організацію клітинної стінки, порушуючи відкладання фікрофібрил целюлози, що робить КС менш жорсткою і, у свою чергу, може позначатися на прискоренні росту кореня. Не виключена дискоординація росту окремих клітинних файлів, кількість яких робить свій внесок у різницю росту цілого кореня. Окрім того, різниця між рослинами, ймовірніше за все, зумовлена тим, що регуляція ростових реакцій коренів є складним багатокомпонентним процесом, до якого, окрім цитоскелету, долучені також багато інших факторів.

Мережа вперше описаних АФ у *B.vulgaris* також подібна до такої у *Z.mays* і складається у меристемі і ДЗР з переплетених АФ, а також їхніх пучків різної щільності. Актинові філаменти облямовують ядро і органели і сприяють їхньому позиціонуванню у клітині. Не спостерігали різниці у організації АФ у клітинах меристеми, ДЗР та ЦЗР між стаціонарними контрольними та кліностатованими коренями рослин *Z.mays* та *B.vulgaris*.

Відмічали протилежний вплив на ріст коренів самого лише кліностатування (підсилення у Z. mays і пригнічення у B. vulgaris) та сумісної дії кліностатування та оризаліну/цитохалазину D (пригнічення у Z. mays та посилення у B. vulgaris). Це може означати активацію специфічного механізму стабілізації росту коренів при зміненій силі тяжіння, спрямованого на забезпечення життєдіяльності коренів при стресових умовах. Ми вважаємо, що це є адаптацією до даного типу стресу. Поряд з тим, слід зазначити, що цитоскелет є одним із численних складових взаємозалежної багатокомпонентної системи регулювання росту клітин при стресі, чим і можуть бути зумовлені розбіжності впливу зовнішніх чинників на його організацію та ростові темпи клітин коренів різних рослин.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 4:

Шевченко ГВ. Порівняльна організація тубулінових мікротрубочок у клітинах коренів *Zea mays* (Poaceae) та *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae s. str. Amaranthaceae s. l.) під впливом кліностатування. Укр бот журн. 2021; 78(6): 426-433.

Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. 2008. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The Plant cytoskeleton: a key tool for agrobiotechnology. NATO Science for peace and security series- C: Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196.

Kozeko LYe, <u>Shevchenko GV</u>, Artemenko OA, Martyn GG, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2005; 12(1): 187-188.

Kordyum EL, Martyn GG, <u>Shevchenko G</u>, Kozeko LYe, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. J Grav Physiol. 2005; 12 (1): 189-190.

<u>Shevchenko GV</u>, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. Adv Space Res. 2005; 35: 289-295. doi: 10.1016/j.asr.2005.02.021.

Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>. Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Grav Physiol. 2003; 10 (1): 15-16. Q3 Кордюм ЕЛ, <u>Шевченко ГВ.</u> Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитол генет. 2003; 37 (2): 56-68.

Шевченко ГВ. Дослідження росту рослин в умовах мікрогравітації. Українська конференція з космічних досліджень, 2018,17-20 вересня, Київ. с. 82.

Шевченко ГВ. Влияние клиностатирования на организацию цитоскелета растительной клетки. Українська конференція з космічних досліджень, 2015, 24-28 серпня, Одеса. с. 55.

Шевченко ГВ. Роль цитоскелета в регулировании ростовых процессов клеток корня при клиностатировании. Українська конференція з космічних досліджень, 2013, 2-6 вересня, Євпаторія, Крим. с.95.

Шевченко ГВ. Влияние микрогравитации на цитоскелет в корнях *Arabidopsis thaliana*. 12-та Українська конференція з космічних досліджень, 2012, 3-7 вересня, Євпаторія, Крим. с.84.

<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Developmental rearrangement of microtubules in plant root cells under clinorotation. ELGRA Biennial General Assembly, 2011, 5-9 September, Antwerp, Belgium. p.179.

<u>Shevchenko G.</u> Developmental rearrangement of cortical microtubules in plant root cells. 31st Annual ISGP Meeting, 11th ESA Life Science Symposium, 5th ISSBB Symposium, ELGRA Symposium, 2010, 13-18 June, Trieste, Italy. p117.

<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Impact of microgravity on plant cell growth.5th Conference of EPSO, 2010, 18-22 April, Olos, Finland. p.162.

<u>Shevchenko GV.</u> Impact of clinorotation on the orientation of microtubules in plant root cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2009, 1-4 September, Bonn, Germany. p.240.

Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Sensitivity of cortical microtubules in *A. thaliana* root cells under clinorotation. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2007,23-28 March, Coeur d'Alene, Idaho, USA. p.53 Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Spatial organization of cytoskeleton in *Arabidopsis* roots under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.68.

<u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ia, Kordyum E. Cytoskeleton rearrangements in the distal elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.67.

Шевченко ГВ. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів. 2гий з'їзд Українського Товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ. с. 224.

<u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Tubulin cytoskeleton in elongation zone of *Arabidopsis* root is affected by clinorotation. 6-я Украинская конференция по космическим исследованиям, 2006, 3-10 сентября, НЦУІКС, Свпаторія, Крим. с. 189.

Kozeko LE, <u>Shevchenko GV</u>, Artemenko OA, Martyn GI, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.105.

Kordyum EL, Martyn GI, <u>Shevchenko GV</u>, Kozeko LE, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.106.

<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Actin cytoskeleton in the transition zone of *Beta vulgaris* roots is sensitive to clinorotation. Society Experimental Biology Meeting, Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 11-15 July, Barcelona, Spain. p. 327.

Шевченко ГВ. Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.

РОЗДІЛ 5

ВЗАЄМОЗАЛЕЖНА ОРГАНІЗАЦІЯ МІКРОТРУБОЧОК І АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ У ЗОНІ РОЗТЯГУ КОРЕНІВ Arabidopsis thaliana

5.1. Організація кортикальних мікротрубочок зони розтягу коренів *A.thaliana* –GFP –МАР4 після впливу оризаліну та кліностатування

Спостереження за мікротрубочками у живих рослинах надає достовірну інформацію щодо організації цитоскелету та вітальності клітин кореня (Kordyum et al. 2005; Шевченко та Кордюм 2012). У клітинах дистальної зони розтягу кортикальні мікротрубочки розміщені у вигляді пучків різної цільності впоперек поздовжній ростовій осі коренів (рис. 5.1 а). Сама ДЗР у *Arabidopsis* – GFP-MAP4 розташована на відстані ~ 143,58 ± 2,24 мкм від центра спокою кореня. Дослідження показали, що одне лише кліностатування призводило до появи дезорганізованих кМТ у ДЗР коренів, а саме, при цьому спостерігали МТ, які відхилялися від поперечних масивів МТ на кут більший за 45⁰ (рис. 5.1 b).

Це відмічали приблизно для 10 % клітин (контроль 18,58 \pm 2,4 % (p = 4,77E-12), кліностатування 28,26 \pm 2,8 (p = 1,62E-08) (підрозділ 4.1, табл. 4.3) (Shevchenko 2021; Shevchenko and Krutovsky 2022).

Дія оризаліну проявлялася у різному ступені руйнуванні кортикальних MT: з'являлися розірвані пучки мікротрубочок, зменшувалася щільність їхніх поперечних угруповань. Крім того, відмічали появу конгломератів з тубуліну по периметру клітин біля цитоплазматичної мембрани (рис 5.1 с). У цілому, мережа MT виглядала спотвореною. Спостерігали також появу деполімеризованого тубуліну, в результаті чого, у цілому, структури цитоскелету мали «розмитий» вигляд (рис 5.1 с).



Рис. 5.1. Організація мікротрубочок у клітинах дистальної зони розтягу коренів Arabidopsis thaliana у стаціонарному контролі (a), при дії кліностатування (b) та оризаліну (c). Відхилення мікротрубочок від поперечної орієнтації позначені стрілками (b). Оскільки не відмічали різниці V ступені руйнування мікротрубочок оризаліном між стаціонарними та кліностатованими рослинами, рисунку на представлені лише останні. Масштаб 10мкм

Відомо, що гербіциди дінітроанілінового ряду, такі як оризалін, зв'язують з α -тубуліном в області, близькій до порожнин між димерами (Anthony and Hussey 1999 b; Blume at al. 2003). Слід додати, що декілька структурних груп гербіцидів дестабілізують або індукують деполімеризацію рослинних мікротрубочок. Оризалін є потужним дестабілізатором мікротрубочок і визначено, що навіть низькі його концентрації (50 – 100 нМ) пригнічують динамічність кортикальних МТ, змінюють їхню організацію і стимулюють ріст епідермальних клітин коренів *Arabidopsis* (Nakamura et al. 2004). Порушення динаміки та організації мікротрубочок оризаліном руйнує напрямок спрямованості росту у кореневих волосках (Bibikova et al. 1999).

В наших експериментах у коренях кліностатованих рослин при дії оризаліну зустрічали аналогічні фрагменти мікротрубочок в усіх зонах. Не відмічали суттєвої різниці щодо ступеня руйнування мікротрубочок між стаціонарними рослинами у контролі та кліностатованими (Kordyum et al. 2008; Shevchenko and Krutovsky 2022).

5.2. Кортикальні мікротрубочки зони розтягу після впливу цитохалазину D та кліностатування

Результатом дії цитохалазину D (CD) на тканини кореня *A.thaliana* –GFP –MAP4 на рівні пізньої меристеми і ДЗР стало часткове порушення організації кортикальних MT. В усіх тканинах з'являлися невпорядковані точкові кластери з тубуліну (рис. 5.2 b, c).



Рис. 5.2. Організація мікротрубочок у клітинах кортексу коренів *Arabidopsis thaliana*–GFP–MAP4 у контролі (а), після обробки цитохалазином D стаціонарних (b) та кліностатованих (c) рослин. Точкові угруповання тубуліну після дії цитохалазину показані зірочками. Масштаб 20 мкм

Точкові угруповання з тубуліну спостерігали у клітинах епідермісу і кори. Їхня приблизна кількість була більшою у клітинах ДЗР стаціонарного контролю ніж у коренях кліностатованих рослин (табл. 5.1).

Окрім того, угруповання такого типу були малочисленними у клітинах ЦЗР (2,89 ± 0,93 – контрольні рослини). Це може спостерігатися завдяки товщим кабелям пучків МТ у цій зоні, які слабше піддаються руйнуванню даною концентрацією інгібітора. Точкові угруповання із актину відмічали і у коренях

Arabidopsis – GFP – ABD2 після деполімеризації мікротрубочок, спричиненої OR (рис. 5.6 b, c; табл.5.1).

Таблиця 5.1

Кількість точкових угруповань з тубуліну та актину у клітинах зони розтягу коренів після дії цитохалазину D та оризаліну у стаціонарних та кліностатованих pocлинах *Arabidopsis thaliana*

Повтори	μc	n_1	μt	n_2	$t(n_1 + n_2 - 2)$	р
Точкові уг	Точкові угруповання з тубуліну у клітинах коренів А. thaliana–GFP–MAP4					FP-MAP4
Контроль + CD vs, Кліностат + CD						
1	$5,93 \pm 1,73$	14	$2,5 \pm 0,76$	14	6,79(26)	0,015948
Точкові угруповання з актину у клітинах коренів А. thaliana–GFP–ABD2						
Контроль + OR vs. Кліностат+OR						
1	8,00 ± 3,29	13	$4,23 \pm 1,36$	13	3,81 (24)	0,000841

Знову ж таки, їхня кількість у контролі переважала таку у коренях кліностатованих рослин (табл. 5.1) і ЦЗР (2,11 \pm 0,78). Поява зруйнованих МТ після обробки CD дає підставу для висновку про існування зв'язку між МТ та АФ і того факту, що мікрофіламенти сприяють функціонуванню масивів МТ під час диференційного росту клітин у меристемі та ДЗР. При цьому основна функція АФ полягає у забезпеченні екзоцитозу на ЦМ, що сприяє розтягу і росту клітини (Shevchenko et al. 2007; Шевченко 2009).

Вимірювання параметрів клітин в ДЗР кореня показали, що у кліностатованих рослин довжина та ширина клітин не відрізнялася від такої у контрольних (рис. 5.3; табл. 5.2) (Shevchenko et al. 2006; Shevchenko 2012).



Рис. 5.3. Параметри клітин дистальної зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* при дії кліностатування, цитохалазину D (CD) та оризаліну (OR)

Таблиця 5.2

Параметри клітин у дистальній зоні розтягу коренів *A.thaliana* при кліностатуванні та обробці цитохалазином і оризаліном

	Тип обробки		
Параметри клітин	Контроль	Кліностатування	
(мкм)			
Довжина	$14,32 \pm 0,37$	14,62 ± 0,39	
Ширина	$15,02 \pm 0,38$	$14,58 \pm 0,31$	
	Цитохалазин D		
Довжина	12,31 ± 0,21	13,97 ± 0,3 *	
Ширина	13,08 ± 0,31	14,57 ± 0,32 *	
	Оризалін		
Довжина	14,41 ± 0,64	16,42 ± 0,92	
Ширина	14,09 ± 0,69	15,65 ± 0,54 *	

Примітка. * p <0,05 для варіантів: CD-кліностат CD; кліностат –

кліностат OR (ширина).

Вплив цитохалазину D зменшував як довжину, так і ширину у стаціонарному контролі (контроль vs. CD; рис.5.3). Це свідчить про стрес, який призводить до дискоординації росту. Проте, при обробці CD в умовах кліностатування як ширина, так і довжина клітин збільшувалися (рис.5.3; CD vs. клін CD) і це може свідчити про адаптацію до стресу і активацію специфічного механізму за участю АФ, спрямованого на забезпечення росту у даних умовах. Даний факт доводить критичну роль АФ у ростових процесах клітини (Shevchenko et al. 2006, 2007; Шевченко 2009).

Відомо, що дискоординація росту клітин у стресових умовах відбувається внаслідок руйнування мікротрубочок та пом'якшення клітинної стінки. При обробці оризаліном при кліностатуванні у клітинах також зростала як довжина, так і ширина (рис. 5.3; OR vs. клін OR; табл. 5.2). Цей факт можна пояснити виходячи з природи 1–D кліностатування, при якому зменшується гравітаційний тиск протопласта на поверхню клітини, що при частковій дезорганізації кМТ та клітинної стінки може збільшувати параметри (Shevchenko et al. 2007, 2008). До такого процесу залучені і АФ.

Таким чином, дія оризаліну позначалася на організації мережі $A\Phi$, її частковому порушенні і появі фрагментів $A\Phi$ біля ЦМ клітини. З'являлися точкові угруповання актину у кортикальному просторі клітин. Подібні точкові угруповання з тубуліну з'являлися у ДЗР коренів рослин і після дії CD. Такий перехресний вплив інгібіторів полімеризації актину і тубуліну на мережу як $A\Phi$, так і МТ, доводить їхню взаємну організаційну регуляцію (Shevchenko et al. 2006-2008; Шевченко 2009). Можливо, що точкові угруповання з актину/тубуліну є наслідком руйнування з'єднань між $A\Phi$ і МТ у кортикальній площині клітини. Обчислення руйнувань показало, що кліностатування послаблювало руйнівну дію інгібіторів як CD, так і OR (табл.5.1, 5.2). Це свідчить про те, що при даних стресових умовах можлива активація певного механізму, який сприяє стабільному функціонуванню цитоскелету. Збільшення ширини та довжини клітин при сумісній дії інгібіторів та кліностатування свідчить про протидію стресу і залучення цитоскелету до підтримання росту клітин в заданих умовах.

5.3. Актинові філаменти зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 після впливу цитохалазину D та кліностатування

У клітинах кори на рівні дистальної зони розтягу коренів АФ характеризуються типовою будовою, а саме, вони формують переплетену мережу без переважної орієнтації окремих АФ та їхніх пучків (рис. 5.4 а). Актин знаходиться у оточенні ядер та вакуолей, подекуди, у примембранній області клітин, де формує ущільнені угруповання, які забезпечують екзоцитоз. Відмічають також АФ, закріплені на цитоплазматичній мембрані (рис. 5.4 а).

Не виявлено помітної різниці у організації АФ між контрольними та кліностатованими *A.thaliana* (рис. 5.4 a, b), оскільки мережа актину щільна і окремі АФ не мають переважної орієнтації (Shevchenko 2012).



Рис. 5.4. Організація актинових мікрофіламентів у клітинах дистальної зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana*–GFP–ABD2 у контролі (а) та при кліностатуванні (b). Масштаб 20 мкм

Дія цитохалазину D призводила до втрати цілісності мережі актинових філаментів та її часткової роздробленості (рис. 5.5 a, b). У клітинах з'являлися короткі філаменти, або їхні фрагменти.



Рис. 5.5. Організація мікрофіламентів у клітинах зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 у контролі (а); при дії цитохалазину D (b); при дії цитохалазину D та кліностатування (c). Зірочками позначені точкові угруповання актину. Масштаб 10 мкм

Фрагменти актинових філаментів та конгломерати неполімеризованого актину у вигляді точок зустрічалися по всьому периметру клітин. Залишки актинових філаментів утворювали потовщення у примембранному просторі клітин (рис. 5.5 b, c), що свідчить про руйнування екзоцитозної мережі. У обох випадках мережа актинових філаментів зазнавала подібних руйнувань без явних специфічних особливостей. Не визначено різниці між дією цитохалазину D на контрольні стаціонарні та кліностатовані рослини (рис. 5.5 b, c).
5.4. Актинові філаменти зони розтягу після впливу оризаліну та кліностатування

Внаслідок обробки проростків *A.thaliana* оризаліном частково порушувалася організація актинових філаментів в усіх зонах кореня (рис. 5.6 a, b).



Рис. 5.6. Організація актинових філаментів у клітинах зони розтягу коренів *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 у контролі (а); при дії оризаліну (b); при дії оризаліну та кліностатування (c). Зірочками позначені точкові угруповання з актину. Масштаб 10 мкм

У ДЗР коренів тяжі мікрофіламентів ставали тоншими та мережа мікрофіламентів розріджувалася. У деяких випадках спостерігали точкові скупчення актину хаотично розміщені по всіх тканинах кореня (рис. 5.6 b, c, табл. 5.1). Актин акумулювався біля клітинних стінок (рис. 5.6 b). Порушення організації актинових філаментів внаслідок дії інгібітора полімеризації тубуліну (оризалін), у свою чергу, свідчить про вплив мікротрубочок на організацію мережі актинових філаментів і доводить взаємозв'язок між мікрофіламентами та мікротрубочками. Слід зазначити, що точкові угруповання із тубуліну спостерігали також при дії на *A.thaliana*–GFP–MAP4 цитохалазину D (підрозділ 5.2), тому не виключено, що точкові скупчення з актину з'являються у місцях перехресту мікрофіламентів з мікротрубочками і зумовлені руйнуванням останніх (Shevchenko 2012; Shevchenko and Kordyum 2012). Слід відмітити, що ступінь руйнування актинових філаментів інгібіторами як актину, так і тубуліну між коренями контрольних і кліностатованих рослин (рис. 5.5 с; 5.6 с) був на користь рослин із стаціонарного контролю. Таке послаблення дії інгібітора тубуліну на організацію актинових філаментів при кліностатуванні може свідчити про активацію специфічного механізму адаптації до стресу.

5.5. Експресія генів, білки яких регулюють організацію цитоскелету коренів *Arabidopsis thaliana* в умовах кліностатування

5.5.1. Аналіз експресії *TUA6*, *ACT2*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDd*, *FH1* та *FH4* при кліностатуванні

Досліджували експресію генів ACT2, TUA6, MAP65-1, CLASP, PLD δ та формінів FH1 та FH4 у не/кліностатованих рослин A.thaliana, паралельно оброблених інгібітором полімеризації тубуліну – оризаліном (OR), або інгібітором полімеризації актину – цитохалазином D (CD) (Shevchenko 2015, 2019).

Слід зазначити, що ген *TUA6* кодує alpha–ізоформу тубуліну (TUBULIN ALPHA–6), необхідну для правостороннього спірального росту як кореня, так і інших швидкоростучих органів (Корсzak et al. 1992). Він експресується у вегетативних тканинах. Окрім того, на відміну від β – тубулінів, α – тубуліни рослин є вкрай малодослідженими. *ACT2* кодує актин (AT3G18780 (ACT2), який, як визначено, також конститутивно експресується у вегетативних тканинах.

Відомо, що кліностатування порушує організацію мережі МТ (Shevchenko 2007, 2008; Шевченко 2021). Фармацевтичний підхід із застосуванням невеликих доз інгібіторів посилює руйнування цитоскелетної

мережі і, цілком вірогідно спричиняє відповідь на генному рівні. Мета дослідження полягала у визначені впливу кліностатування а також часткового руйнування мережі кортикальних мікротрубочок та актинових філаментів інгібіторами полімеризації тубуліну і актину на експресію певних генів, які регулюють організацію кортикального цитоскелету. У своїх експериментах ми досліджували експресію генів починаючи з 6 год дії інгібіторів цитоскелету. Однак, результати експресії генів ранніх періодів коливалися, що не показувало цілісної картини. Стабільні результати (збільшення або зниження експресії) були отримані після 1 – 2 днів дії інгібіторів елементів цитоскелету. Можливо, це зумовлене адаптацією цитоскелету до кліностатування впродовж цього часу, що і відображається у вирівняній експресії генів цитоскелету. Так, експерименти виявили, що серед ycix протестованих генів, дія лише кліностатування безпосередньо позначалася на експресії генів *TUA6* та *CLASP*, знижуючи її (рис. 5.7, табл. 5.3).



Рис. 5.7. Експресія генів ACT2, TUA6, MAP65-1, CLASP, PLDδ, FH1 та FH4 у кліностатованих проростках Arabidopsis thaliana

Це передбачає також вплив механічного стресу на організацію кортикальних мікротрубочок. Як відомо, мікротрубочки можуть самостійно виконувати сенсорну функцію, і тубулін, завдяки динамічній природі полімера мікротрубочки, здатний до спонтанної полімеризації. Завдяки полярності гетеродимерної білкової структури, утвореної альфа-субодиницею тубуліну на повільно зростаючому мінус–кінці та бета–тубуліну на швидкозростаючому плюс–кінці полімеру, мікротрубочки проходять так званий тредміллінг (швидке подовження або укорочення полімеру на зразок бігової доріжки).

Таблиця 5.3

	Результати тесту Wilcoxon		
Гени	n	р	
ACT2	5	0,046	
TUA6	5	0,027	
MAP65-1	5	0,043	
CLASP	4	0,043	
FH1	3	0,068	
FH4	3	0,18	
$PLD\delta$	4	0,109	

Статистичні результати аналізу експресії генів–регуляторів кортикального цитоскелету при дії кліностатування

Тредміллінг є координованим процесом, який передбачає збирання та розбирання МТ у відповідь на різноманітні внутрішньоклітинні та позаклітинні сигнали (Elliott and Shaw 2018; Hsiao and Huang 2023).

Знижена експресія *TUA6* під час кліностатування може бути проявом зворотного впливу порушення динаміки полімеризації полімера мікротрубочки і викликаної ним послідуючої динамічної нестабільності на експресію його кодуючого гену. В результаті порушення полімеризації з'являється пул вільних мономерів тубуліну і, ймовірно, це зворотно впливає на експресію як *TUA6*, так і *CLASP*. CLASP, як відомо, регулює динаміку МТ, стабілізуючи її швидкоростучі плюс-кінці, що сприяє організації мережі кМТ. Порушення процесу полімеризації МТ може пригнічувати експресію *CLASP*, оскільки зникає потреба у функціональній взаємодії CLASP із мікротрубочками і це може мати зворотний вплив.

Таким чином, результатом спотворення полімеризації тубуліну і стабілізації мікротрубочок внаслідок впливу зниженої сили тяжіння, можливо, є динамічна нестабільність і часткова дезорганізація масивів кМТ. Так, візуально спостерігали, що у 10 % клітин коренів кліностатованих рослин на рівні меристеми та ДЗР кМТ відхилялися від поперечної організації на кут близький до 45 0 (рис. 5.8 b; підрозділ 4.2.3).



Рис.5.8. Відхилення мікротрубочок від поперечної організації у клітинах кори пізньої меристеми коренів проростків *Arabidopsis thaliana*– GFP– MAP4 при кліностатуванні (а– контроль, b– кліностатування). Масштаб 10 мкм

Не виключено, що зниження експресії TUA6 та CLASP пов'язане із зниженням потреби у жорсткому каркасі клітини, що є результатом зменшення навантаженням на кортикальну область від механічного стресу, спричиненого кліностатуванням. Таким чином, зниження експресії генів структурних і асоційованих білків МТ, скоріше за все, зменшує і кількість відповідних білків, а, отже, призводить до зміни темпу росту клітин (Shevchenko and Krutovsky 2022).

Це стає можливим завдяки порушенню формування каркасу мікрофібрил КС і її розрідженню. Виміри параметрів росту показали, що довжина коренів зменшується в кліностатованих *A. thaliana* (рис. 5.9). Застосування OR та CD також спричиняло зменшення довжини кореня як у стаціонарному контролі, так і на кліностатах (рис. 5.9; табл. 5.4).



Рис. 5.9. Відносний приріст (100% контроль/кліностат) довжини коренів у проростків *Arabidopsis thaliana* при дії кліностатування (Клін), впливу оризаліну (OR) та цитохалазину D (CD), *p*<0,05

Безумовно, механічне спотворення мережі кМТ призводить до зниження ростових параметрів коренів *A. thaliana*, які складали 75,4 ± 17,4 % (рис. 5.9; табл. 5.4). Вищезазначене узгоджується із нашими попередніми спостереженням погіршення росту та наявності рандомізованих кМТ у клітинах ДЗР коренів *B. vulgaris* (Шевченко 2021) та *Z. mays* (розділ 4).

Статистичні результати порівняння вибірок при обчисленні

росту коренів

Повт						
op-	μc	n_1	μt	n_2	$t(n_1 + n_2 - 2)$	р
ності						
		Контр	оль vs. Клін	остат		
1	$1,14 \pm 0,14$	43	$0,85 \pm 0,15$	53	9,55 (93)	1,81E-15
2	$1,46 \pm 0,25$	90	1,01±0,19	77	12,75 (165)	2,34E-26
3	$1,25 \pm 0,33$	67	$0,72 \pm 0,18$	61	9,00 (154)	2,29E-20
Контроль vs. Контроль + OR						
1	$1,13 \pm 0,25$	48	$0,74 \pm 0,16$	61	9,9333 (107)	7,22E-17
2	$1,05 \pm 0,18$	43	$0,78 \pm 0,16$	53	7,8216(94)	7,54E-12
3	$1,53 \pm 0,33$	42	$0,70 \pm 0,08$	21	11,2091 (61)	1,89E-16
Контроль vs. Контроль+CD						
1	$1,15 \pm 0,38$	80	$0,\!47\pm 0,\!11$	63	13,728 (141)	9,21E-28
2	0,58 ± 0,13	69	$0,56 \pm 0,1,$	91	1,003 (158)	0,317372
3	1,11±0,22	65	$0,58 \pm 0,12$	49	15,189(112)	5,77E-29
Кліностатування vs. Кліностатування + OR						
1	$1,17 \pm 0,24$	45	$0,82 \pm 0,19$	67	8,6556(110)	4,61E-14
2	$1,44 \pm 0,23$	63	0,41 ± 0,09	59	31,56 (120)	0,001
3	$1,41 \pm 0,28$	31	0,67 ± 0,13	31	13,3836 (60)	1,14E-19
Кліностатування vs. Кліностатування + CD						
1	$0,70 \pm 0,22$	76	$0,\!48 \pm 0,\!09$	45	6,45(119)	2,45E-09
2	0,66± 0,12	88	$0,\!49 \pm 0,\!04$	57	10,4228(143	2,84E-19
3	$0,702 \pm 0,26$	48	0,65 ± 0,18	55	1,1684(101)	0,2453

Не виключено, що рандомізація кМТ внаслідок порушення полімеризації призводить до появи окремих вільних МТ і роз'єднання пучків

MT. Все це розріджує мережу кМТ. Такий ж самий феномен спостерігали і при реакції кМТ на зміну полярності клітини.

У свою чергу, визначено, що вільні мікротрубочки або ті, які не були вбудовані у кортикальну мережу внаслідок порушення полімеризації, намагаються зв'язатися у впорядковані пучки, що необхідно для встановлення нового балансу мережі кортикальних мікротрубочок (Dixit and Cyr 2004; Deinum et al. 2011).

На користь такої ідеї свідчать спостереження розриву мікротрубочок після реорієнтації внаслідок механічного стимулювання (Uyetterwal et al. 2012) і експерименти по стабілізації мікротрубочок *in vitro* при стресі від напруження (Hamant et al. 2019). Nick (2012) навіть припускає існування специфічної субпопуляції мікротрубочок, задіяної у сприйнятті механічних сил. Завдяки такій функції у механосенсориці, МТ беруть участь в архітектурній інтеграції, мінімізуючи механічний стрес, створений силою тяжіння.

5.5.2. Організація мікротрубочок, актинових філаментів та експресія *TUA6*, *ACT2* при дії кліностатування, оризаліну та цитохалазину

Згідно ідеї експерименту застосування оризаліну або цитохалазину D як інгібіторів мережі мікротрубочок та актинових філаментів допомагає виявити залежність експресії *TUA6* та *ACT2* від організації відповідно MT та AФ. Обробка інгібіторами полімеризації як актину, так і тубуліну при кліностатуванні сприяє визначенню впливу кліностатування на залежність експресії *TUA6/ACT2* від організації кМТ та AФ, тим самим проливаючи світло на регулювання загальної організації та функціонування мережі цитоскелету. Якщо за вказаних умов відмічається зміна генної експресії, це відображає відмінність транскрипційної регуляції генів при кліностатуванні і може свідчити про залучення білків, які кодують досліджувані гени, до реакції на механічний стрес. Результати наших експериментів показали, що дія OR та CD інгібувала експресію як *TUA6/ACT2*, так і інших регуляторних генів цитоскелету та виявили різні типи взаємодії A Φ та кMT у стаціонарному контролі та при кліностатуванні. Так, оризалін зменшував експресію *ACT2* у рослин у стаціонарному контролі (рис. 5.10 а; табл. 5.5).



Рис. 5.10. Відносна зміна експресії генів *ACT2*, *TUA6*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDδ*, *FH1* та *FH4* у не/кліностатованих проростках *Arabidopsis thaliana*

оброблених оризаліном (а) або цитохалазином D (b), (* *p* <0,05 між контрольними і експериментальними вибірками)

Таблиця 5.5

Статистичні результати ПЛР-реакції порівняння дії інгібіторів OR та CD на експресію генів у стаціонарних та кліностатованих рослинах

	Результати тесту Wilcoxon					
Гени	μc	n1	μt	n2	р	
	Дія оризаліну OR					
ACT2	$0,39 \pm 0,07$	5	$0,\!43 \pm 0,\!04$	5	0,144	
TUA6	$0,35 \pm 0,19$	6	$0,74 \pm 0,26$	4	0,046	
MAP65-1	$0,\!78\pm0,\!07$	5	$0,95 \pm 0,02$	2	0,285	
CLASP	$0,\!69 \pm 0,\!45$	5	$0,88 \pm 0,26$	5	0,109	
FH1	$0,86 \pm 0,12$	2	$0,85 \pm 0,14$	3	0,18	
FH4	$1,34 \pm 0,09$	3	$1,14 \pm 0,28$	4	0,109	
PLDδ	$1,09 \pm 0,16$	6	$0,86 \pm 0,18$	5	0,144	
Дія цитохалазину CD						
ACT2	$0,37 \pm 0,11$	5	$1,15 \pm 0,44$	9	0,043	
TUA6	$0,17 \pm 0,11$	5	$0,91 \pm 0,42$	5	0,043	
MAP65-1	$0,33 \pm 0,12$	2	$0,59 \pm 0,19$	2	0,18	
CLASP	0,66 ± 0,13	2	$0,62 \pm 0,01$	2	0,317	
FH1	$0,30 \pm 0,15$	2	$1,\!41 \pm 0,\!42$	3	0,18	
FH4	$2,91 \pm 0,28$	3	$1,\!49 \pm 0,\!13$	5	0,18	
$PLD\delta$	$1,19 \pm 0,22$	3	$1,06 \pm 0,1$	4	0,285	

Це свідчить про вплив дезорганізованої мережі кМТ на експресію *ACT2* та припускає взаємозв'язок між пулом вільних мономерів тубуліну та експресією *ACT2*.

Ймовірно, що збільшення кількості мономерів тубуліну певним чином перехресно впливає і пригнічує експресію генів, які кодують актин. Такий вплив свідчить про взаємозалежність між МТ та АФ та доводить взаємодію між кМТ та АФ, яка стає очевидною при виявленні пошкоджень мережі АФ у епідермальних та кортикальних клітинах коренів після дії оризаліну (рис. 5.11 а, с). Так, мережа актину розріджувалася, виглядала невпорядкованою, відмічали скупчення актину у примембраній частині клітин. У деяких клітинах з'являлися точкові актинові угруповання (рис. 5.11 с, d).



Рис. 5.11. Організація актинових філаментів у клітинах кори коренів на рівні дистальної зони розтягу та її схематичне зображення у кліностатованих рослин *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 та оброблених оризаліном (а – контроль, b – кліностатування, с – обробка OR кліностатованих рослин (подібні до контрольних). Масштаб 10 мкм

За припущенням деяких авторів при деполяризації мікротрубочок відбуфіламентів i3 роз'єднання актинових мікротрубочками, вається i мікрофіламенти починають вільніше використовувати простір, через ЩО мережа АФ стає менш організованою (Durant-Smet et.al. 2020). Знижену експресію ACT2 після дії оризаліну спостерігали також і при кліностатуванні, що передбачає незалежність взаємозв'язку між станом мікротрубочок та ACT2 від зниження механічного навантаження (рис. 5.10 а). У свою чергу це свідчить про стійкість взаємоорганізації мікротрубочок із актиновими філаментами до механічного стресу і що така стійкість, значною мірою, визначається кортикальними МТ. У своїх дослідженнях ми не виявили відмінностей у організації актинових філаментів між не- та кліностатованими проростками A.thaliana при дії оризаліну (рис. 5.11 с, d) (Shevchenko 2012).

Обробка проростків цитохалазином D також позначалася на зниженні експресії гену ACT2 у контролі, показуючи її залежність від організації актинових філаментів (рис. 5.10 b). Пул вільних мономерів актину у цитоплазмі (після деполімеризації мікрофіламентів) може мати зворотній вплив на експресію ACT2. Часткові порушення сітки актинових філаментів після дії цитохалазину D спостерігали візуально. Вони проявлялися у руйнуванні мережі мікрофіламентів та утворенні щільних актинових угруповань у примембранному просторі клітин (рис. 5.12 b), що доводить порушення процесів екзоцитозу, які залежать від мережі мікрофіламентів у кортикальній області клітини. Але, на противагу стаціонарним, у кліностатованих рослин дія цитохалазину D не змінювала експресію ACT2 (рис. 5.10 b). Вищезазначене може свідчити про інший механізм регулювання залежності експресії ACT2 від організації АФ під час мінімізованого та гомогенізованого гравітаційного навантаження.

У своїх експериментах ми не відмічали візуальної різниці між дією цитохалазину D на актинові філаменти контрольних стаціонарних та кліностатованих рослин. Проте, повідомляли, що мережа актину змінюється під час зміни полярності клітин, як, наприклад, це відбувається у клітинах *Dictyostelium*, де АФ поступово реорганізуються під час реверсії клітин внаслідок стресу від тиску близько 2,1 Па, що призводить до зсуву протопласту і зміни механічного навантаження.



Рис. 5.12. Організація мережі актинових філаментів після обробки цитохалазином D (b) у клітинах кори коренів *Arabidopsis thaliana* – GFP – ABD2 на рівні меристеми та дистальної зони розтягу та її схематичне зображення. Масштаб 10 мкм

Впродовж 60 с після реверсії потоку цитоплазми АФ швидко розбираються а потім швидко полімеризуються впродовж 30-60 с вже на новому місці, яке і визначає нову клітинну полярність (Dalous et al. 2008). Не виключено, що у випадку реверсії при кліностатуванні перебудова АФ відбувається також, проте її важко помітити візуально.

Обробка контрольних рослин OR також знижувала експресію *TUA6* (рис.5.10 а) і це знову доводить взаємозв'язок організації MT та експресії *TUA6* і вказує на зворотну залежність між присутністю деполімеризованих мономерів тубуліну у цитоплазмі та експресією *TUA6*. Дія OR призводить до розрідження пучків кMT, зменшення їхньої щільності, появи невпорядкованих і розірваних кMT (рис. 5.13 с).



Рис. 5.13. Організація кортикальних мікротрубочок після обробки оризаліном (c) та цитохалазином D (d) у клітинах кори коренів *Arabidopsis thaliana*–GFP–MAP4 на рівні меристеми та дистальної зони розтягу та її схематичне зображення. Масштаб 20 мкм

При обробці контрольних рослин CD відмічали зниження експресії *TUA6* (рис. 5.10 b). Візуалізація підтвердила, що внаслідок дії CD у мережі кМТ виявляли появу невпорядкованих точкових скупчень із тубуліну (рис. 5.13 d).

Вищезазначене явище вказує на взаємозалежність організації $A\Phi$ та експресії гена *TUA6* і на здатність пулу мономерного актину зворотно регулювати експресію *TUA6*. Перехресну взаємодію елементів цитоскелету доводить також зниження темпів росту коренів рослин після дії інгібіторів як оризаліну, так і цитохалазину D (рис. 5.9). Окрім того, на користь перехресної взаємодії МТ та $A\Phi$ свідчить вплив пулу деполімеризованого тубуліну на експресію гену *ACT2*.

Таблиця 5.6

Вплив оризаліну і цитохалазину D на експресію генів *TUA6, ACT2, MAP65-1, CLASP, PLDδ* та формінів *FH1* та *FH4* у не/кліностатованих проростках *Arabidopsis thaliana*

	Тип обробки				
Гени	Кон	троль	Кліност	Кліностатування	
	OR	CD	OR	CD	
ACT2	Х	X	X		
TUA6	Х	X			
MAP65-1		Х			
CLASP	Х				
FH1		X			
FH4		X			

Залежність функціонування МТ від організації АФ притаманна також клітинам тварин (Durant-Smet et.al. 2020). Деякі автори припускають, що дезорганізація кМТ при деполімеризації актину має слабший ефект за той, який зазнає мережа АФ при деполімеризації МТ. Оскільки МТ створюють жорсткіші конструкції у клітинах рослин, вони повинні виконувати домінуючу роль у організації цитоскелету при зміні положення та форми клітини (DurantSmet et al. 2020). Наші дослідження виявили візуально сильніші руйнування мережі АФ при дії OR, ніж руйнування мережі МТ після дії CD.

Таким чином, посилаючись на дані наших експериментів із застосуванням інгібіторів актину і тубуліну в контролі, основний висновок можна зробити щодо регуляції транскрипції генів, що кодують білки, складові МТ та АФ.

У стаціонарних рослин знижена експресія як TUA6, так і ACT2 після дії CD або OR вказує на взаємодію між активністю MT та AФ та експресією TUA6та ACT2. Причому OR та CD впливали перехресно і у обох випадках знижували експресію TUA6 та ACT2. Це свідчить про перехресну взаємодію між організацією MT і AФ. Функціональний взаємозв'язок між основними цитоскелетними елементами вочевидь ілюструється нашими експериментами з інгібіторами полімеризації актину/тубуліну та взаємними перехресним спотворенням мережі MT/AФ. Вплив CD на організацію кМТ та пошкодження мережі AФ дією OR призводить до тих самих результатів – появи точкових кластерів та угруповань тубуліну та актину (відповідно). Можливо, це є результатом руйнування з'єднань MT/AФ (опосередкованих асоційованими білками цитоскелету) у кортикальної області клітини, часткової дезорганізації мережі цитоскелету, що у подальшому призводить до зниженням темпів росту коренів.

Відомо, що інтактний цитоскелет здатний активувати у цитоплазмі певні транскрипційні фактори, які регулюють експресію їхніх кодуючи генів (Wu 2013). Не виключено, що руйнування елементів цитоскелету може порушувати сигнальний каскад, який регулює експресію їхніх білків. Взаємозалежна функціональна організація МТ/АФ, а також вплив тубуліндеполімеризуючих факторів на організацію актину, і навпаки, було показано і раніше у досить численних роботах (Collings et al. 2006, 2008; Sampathkumar et al. 2011). Kengen та Derksen відмічали асоціацію МТ із АФ на відстані до 1,46 мкм у протопластах тютюну (Kengen and Derksen 1991). Фармакологічні дослідження показують, що F-актин або відіграє певну роль у організації кортикальних МТ, або кМТ можуть регулювати організацію актину. Присутність МТ, з'єднаних з АФ через поперечні молекули-містки (Lancelle et al. 1991), свідчить про те, що на організацію таких МТ впливає пряма взаємодія з F-актином. Під час утворення трахеарних елементів В культивованих клітинах Zinnia F-актин утворюється між пучками МТ. Той факт, що руйнування F-актину цитохалазином впливає на організацію МТ, свідчить про те, що F-актин бере участь в організації МТ (Kobayashi et al. 1988). Відмічено, що короткі фрагменти АФ можуть ковзати уздовж МТ за допомогою моторних білків. Слід зазначити, що деталі взаємодії між МТ та АФ у кортикальній області клітини вивчені слабо. Sampathkumar та інші (2011) продемонстрували, що повторне збирання актинового філамента залежить від МТ та опосередковується білками формінами. Раніше повідомлялося, що АФ та МТ взаємодіють під час реакції клітини на зміну її геометрії, а коли МТ деполімеризуються, мережа актину стає менш впорядкованою. Durantта інші припускають, що організація актину залежить від мережі Smet мікротрубочок. У той же час автори не спостерігали залежності мікротрубочок від актинового цитоскелету (Durant-Smet et al. 2020).

Інші автори відмічали, що стабілізація кМТ не має суттєвого впливу на динаміку актину, що вказує на те, що МТ не перешкоджають подовженню АФ. Однак, деполімеризація МТ посилювала як полімеризацію актину, так і швидкість його деполімеризації, що вказує на те, що динаміка актину все ж таки модулюється МТ. Ці дані демонструють, що динаміка F–актину залежить від цілісності мережі МТ, що також надає переконливі докази взаємодії між цими двома філаментними системами цитоскелету (Smertenko et al. 2010).

Кліностатування не впливало на залежність експресії *ACT2* від стану МТ (рис. 5.10 а) і, ймовірно, це означає її важливість для реакції на змінену силу тяжіння. При кліностатуванні застосування як OR, так і CD не впливало на *TUA6* (рис. 5.10). Це вказує на те, що взаємозв'язок між станом МТ/АФ та експресією *TUA6* залежить від зниження гравітаційного навантаження. Точний

механізм такої взаємодії залишається невідомим, але, вочевидь, що взаємозв'язок між організацією МТ/АФ та експресією *TUA6* при кліностатуванні регулюється відмінно від стаціонарного контролю. Так само відмінним є механізм регулювання експресії *ACT2* станом АФ при кліностатуванні. Різницю у впливі кліностатування на експресію їхніх генів можна пояснити виходячи із ролі АФ та МТ у взаємодії. Оскільки, на відміну від *ACT2*, експресія *TUA6* не реагує на зміни як кМТ, так і організації АФ, можна припустити, що кМТ відіграють провідну роль у взаємозв'язку МТ–АФ під час зниженого впливу гравітації, сприяючи стабільному функціонуванню цитоскелета. Не виключено, що внесок АФ у взаємодію із МТ при стабілізації кортикального цитоскелету у кліностатованих рослин не є значним у порівняні із роллю МТ. Таким чином, в умовах зниженого гравітаційного навантаження активується механізм адаптації за участі TUA6.

5.5.3. Аналіз експресії генів *MAP65-1*, *CLASP* та *PLDd* при дії кліностатування оризаліну та цитохалазину

5.5.3.1. Експресія *МАР65-1.* Цікаві спостереження були зроблені щодо експресії гена, який кодує тубулін- асоційований білок МАР65-1. Кліностатування безпосередньо не впливало на експресію гена *МАР65-1* (рис. 5.7), що свідчить про відсутність залежності від зменшеної сили тяжіння. Можливо, що МАР65-1 безпосередньо не задіяний у механочутливості, хоча його функціонування безпосередньо пов'язане із організацією мережі кМТ. Відомо, що С-кінцева частина AtMAP65-1 має дві області зв'язування з МТ (домени МТВ1 і МТВ2) (Smertenko et al. 2004). Послідовність домену МТВ1 дуже консервативна серед усіх членів родини МАР65, тоді як послідовність МТВ2 неконсервативна і містить дев'ять потенційних сайтів фосфорилювання для декількох різних кіназ, включаючи мітоген–активовану протеїнкіназу, казеїнкіназу та циклінозалежну кіназу (CDK) (Sasabe and Machida 2006; Smertenko et al. 2008). Зв'язування пучків мікротрубочок AtMAP65-1 *in vivo* має слабкий

вплив на їх динаміку, завдяки чому МАР65-1 ідеально підходить для просторової організації високодинамічних масивів рослинних МТ (Chang et al. 2005). Це підвищує можливість того, що кожна група може контролюватися унікальним механізмом, який залежить від комбінованої активності різних шляхів за участю протеїнкіназ (Smertenko et al. 2008).

Обробка лише OR не змінювала експресію MAP65-1, також OR не змінював експресію МАР65-1 і у кліностатованих проростках (рис. 5.10 а), доводячи відсутність впливу зниженої сили тяжіння на зв'язок між МТ та МАР65-1. Але, на наш подив, експресію МАР65-1 у некліностатованих рослин знижувала обробка CD (рис. 5.10 b), що вказує на зв'язок між організацією АФ та експресією МАР65-1. Це передбачає регулювання експресії МАР65-1 актиновим цитоскелетом, а саме, зворотну залежність між пулом вільних мономерів актину та експресією МАР65-1. Наскільки нам відомо, це перше спостереження зв'язку між організацією АФ та експресією МАР65-1, який кодує асоційований з тубуліном білок. У зв'язку з цим, не виключено, що МАР65-1 також взаємодіє з АФ. Оскільки сам МАР65-1 не має сайтів з'єднання із АФ, окрім зв'язування із МТ, він також може опосередковано взаємодіяти із CLASP у регулюванні функціонування цитоскелету. Механізм такої взаємодії поки що залишається невідомим, але, можливо припустити, що він відбувається в результаті порушення мережі МТ на фоні руйнування взаємодії АФ-МТ деполімеризацією АФ. Вищезазначене може відображати нову функцію зв'язування мікротрубочок за допомогою МАР65-1 і також його роль в організації, зокрема, актинової мережі, та вказує на перспективу для подальших досліджень. Слід зазначити, що МАР65-1 здатний функціонально взаємодіяти із багатьма іншими регуляторними білками цитоскелету (обговорення у підрозділі 7.4.) Також, взаємодія МАР65-1 із АФ ймовірна, виходячи із можливостей пострансляційних модифікацій даного білка. Виявилося, що зв'язок між експресією МАР65-1 та організацією АФ залежить від кліностатування (рис. 5.10 b), оскільки не відмічається при даних умовах.

Це вказує на інший механізм регулювання взаємодії АФ та *MAP65-1* в умовах зниженого рівня гравітаційного навантаження.

5.5.3.2. Експресія CLASP. Оскільки МТ являють собою нестабільну конструкцію, вони здатні реагувати на зовнішні стимули, зокрема на механічний стрес. При полімеризації МТ відчувають певне механічне напруження, спричинене переходом димерів тубуліну у вигнуту конформацію, коли залишок GTP новоприкріплених димерів поступово дефосфорилюється до GDP і це призводить до збільшення відстані димера від зростаючого кінця (Akhmanova and Steinmetz 2008). Специфічні білкові комплекси на зростаючому плюс-кінці МТ (так звані + ТІР білки) протидіють цьому напруженню і таким чином стабілізують зростаючі МТ, що протидіє катастрофічного вигину протофіламентів назовні. Комплекс + TIP є основною мішенню механічного напруження на МТ. У клітині існує кілька різних типів + TIP білків, серед яких CLASP (cytoplasmic linker CLIP-associated protein) перший ідентифікований білок цієї групи, бере участь у регулюванні динаміки плюс-кінців МТ та стабілізації згинання полімерів МТ по краях клітин (Ambrose et al. 2011). CLASP задіяний у кепуванні МТ-плюс кінців, стабілізації МТ та запобіганні катастрофі полімерів тубуліну (Al-Bassam et al. 2010; Kumar and Wittmann 2012). Показано, що надмірна експресія CLASP стабілізує мікротрубочки, підтримуючи їхній полімерний статус та утворюючи стійкі до оризаліну МТ пучки (Branzzinni and Wasteneys 2013). Також, відомо, що CLASP сприяє вирівнюванню МТ паралельно напрямку максимального напруження у клітині (Uyttewaal et al. 2012). Виходячи із функціонування CLASP як організатора мережі МТ, заслуговує на увагу його участь у механічній чутливості клітин рослин. У зв'язку з вищеозначеним ми досліджували яким чином такий стимул як модельована мікрогравітація впливає на експресію CLASP.

Наші дослідження показали, що кліностатування знижує експресію *CLASP* (рис. 5.7), що свідчить про безпосередній вплив рівномірно розподіленого зменшеного рівня гравітації на експресію *CLASP*. Слід зазначити, що це відбувається на тлі безпосереднього впливу кліностатування на експресію TUA6. Ймовірно, між цими дома процесами є певний взаємозв'язок. Оскільки CLASP стабілізує кінці полімерів МТ, порушення полімеризації останніх може зворотно впливати на експресію CLASP. Дія оризаліну також призводила до зниження експресії CLASP (рис. 5.10 а), що знову доводить зворотній зв'язок між пошкодженням МТ, появою пулу вільного тубуліну та експресією *CLASP*. Не виключено, що часткова втрата належної організації тубулінового цитоскелету внаслідок деполімеризації МТ інгібує експресію CLASP, оскільки у таких умовах CLASP втрачає свою функцію стабілізації кінців окремих МТ. Залучення CLASP у стабілізацію масивів кМТ доводить його знижена активність у мутантах clasp-1, у яких кМТ дезорганізуються і вирівнюються паралельно напрямку максимального напруження (Struk and Dhonukshe 2014). Але зниження експресії *CLASP* при руйнуванні МТ суперечить посиленню частоти процесу «порятунку», який відмічають при збільшенні концентрації вільного тубуліну та наявності CLASP (Komarova et al. 2002; Al-Bassam et al. 2010; Uyttewaal et al. 2012). В умовах одночасного руйнування МТ і кліностатування експресія CLASP не зазнавала змін (рис.5.10 а), що свідчить про залежність взаємозв'язку між організацією МТ і експресією CLASP від зниженого гравітаційного навантаження і його відмінне регулювання від такого у стаціонарних рослин. Задіяність CLASP у реакції на знижену гравітацію також можна припустити виходячи із того факту, що CLASP пов'язує МТ з ендомембранами та регулює транспорт ауксину, взаємодіючи із сортуючим білком нексином 1 (SNX1) (компонентом білкового комплексу, відповідального за рециркуляцію носія ауксину PIN2 у цитоплазматичній мембрані) (Kirik et al. 2007; Ambrose et al. 2013), сприяючи таким чином формуванню полярності рослинних клітин. Проте, не дивлячись на залучення CLASP до багатьох процесів (Kirik et al. 2007; Ambrose et al. 2011; Branzzinni and Wasteneys 2013), багато його функцій у рослин все ще залишаються невизначеними.

Дія CD не впливала на експресію *CLASP*, також це відмічали і при кліностатуванні (рис. 5.10 b), що доводить незалежність регулювання CLASP від стану актинового цитоскелету.

5.5.3.3. Експресія фосфоліпази D delta (*PLD* δ). Унікальний характер і функції кортикальних мікротрубочок у рослинних клітинах значною мірою зумовлені їхнім близьким контактом із цитоплазматичною мембраною. Вважають, що ліпід-гідролізуючий фермент цитоплазматичної мембрани – фосфоліпаза D (PLD) причетний до організації кортикального масиву мікротрубочок і їхнього прикріплення до мембрани (Gardiner et al. 2001; Andreeva et al. 2009; Liu et al. 2015). Одним із кандидатів для участі у механотрансдукції є фосфоліпаза D дельта (PLDδ) (Ho et al. 2009; Cvrčkova 2013), можливий медіатор континууму клітинна стінка – цитоплазматична мембрана (ЦМ) – цитоскелет (Marc et al. 1996; Gardiner et al. 2001, Brandizzi 2013). and Wasteneys Фосфоліпаза D зв'язує мікротрубочки та цитоплазматичну мембрану, оскільки в Arabidopsis вона містить один із двох доменів РН/РХ або С2, які асоціюються із білками мембрани (Qin and Wang 2002). Відомо, що активація фосфоліпази Dδ призводить до відшарування кортикальних мікротрубочок від ЦМ та втрати їхнього паралельного розташування (Dhonukshe et al. 2003 a). Доведено, що при цьому інгібується нормальний розвиток проростків Arabidopsis (Gardiner et al. 2003). Окрім того, PLDб зв'язується з рослинним гомологом флотиліну (Ho et al. 2009), маркером ліпідного мікродомену мембрани (Martin et al. 2005), де мультимолекулярні сигнальні комплекси, що містять G-білки, кінази, флотилін, PLDδ, мікротрубочки, актинові філаменти, Hsp70 та інші компоненти беруть участь у передачі сигналів у клітину та опосередковують трафік везикул (Martin et al. 2005; Ho et al. 2009; Tapken and Murphy 2015). Таким чином, PLD виступає як регулятор активності МТ та $A\Phi$ та їхнього зв'язку із ЦМ (Petrasek et al. 2009; Krtkova et al. 2016). PLDδ може зв'язувати ЦМ з цитоскелетом у місцях, де проходить клітинний сигналінг (Ho et al. 2009), і PLDδ може відігравати певну роль у ініціюванні ремоделювання цитоскелету. Виходячи із значної ролі PLDδ у формуванні шару кМТ, ми припускали залучення даного білка до реакції клітин на змінену гравітацію.

Проте, наші дослідження показали, що безпосередньо кліностатування не впливає на експресію *PLD* δ (рис. 5.7). Експерименти із кліностатуванням і застосуванням OR i CD також не змінювали експресії *PLD* δ (рис. 5.10), що доводить незалежність експресії даного гена від організації мікротрубочок та актинових філаментів та нечутливість експресії *PLD* δ до даного виду кліностатування. Проте, відомо, що сольовий стрес та обробка мастопараном все ж таки активують експресію гена фосфоліпази D δ (*PLD* δ) (Pleskot et al. 2014). Також, існують повідомлення про те, що індукована оризаліном деполімеризація MT активує інші фосфоліпази, зокрема PLD α 1, а деполімеризований G–актин пригнічує активність PLD β 1, вказуючи тим самим на зворотний зв'язок (між фосфоліпазою та MT) у регулюванні активності різних підгруп PLD (Pleskot et al. 2010; Zhang and Zhang 2016).

Таким чином, підсумовуючи дані щодо експресії асоційованих білків, можна припустити, що кліностатування активує у клітині специфічний механізм адаптації за участю білків CLASP та MAP65-1.

5.5.4. Аналіз експресії формінів *FH1* та *FH4* при дії кліностатування, оризаліну та цитохалазину

Відомо, що специфічні для рослин актин–зв'язуючі білки форміни можуть не тільки з'єднувати ЦМ з МТ та АФ (Deeks et al. 2010), але і опосередковувати взаємозв'язок між АФ та МТ (Ho et al. 2009; Deeks et al. 2010; Cvrčkova 2013). Окрім того, форміни задіяні у приєднанні компартментів ендомембран (ЕР або секреторних везикул) до МТ (Cvrčkova et al. 2015). Згідно своєї функціональної активності, не виключено, що такі форміни класу І як AtFH1 та AtFH4 можуть брати участь у механічному сигналінгу і тому цікавим виявляється дослідження експресії генів даних білків під впливом кліностатування.

В наших експериментах аналіз експресії формінів FH4 та FH1 не виявив її значної зміни у проростках Arabidopsis, вирощених на кліностатах (рис. 5.7). Це, свідчить про те, що усереднений мінімізований вплив гравітації безпосередньо не вливає на експресію FH4 та FH1 і, можливо, опосередковано не впливає на функціонування білків FH4 та FH1. Також, наші експерименти показали, що після обробки OR експресія FH1 та FH4 не змінювалася як у контрольних стаціонарних, так і у кліностатованих рослин (рис. 5.10). Це не дивно для FH1, оскільки білок, який кодується даним геном, не має сайтів зв'язування із МТ. Окрім того, відсутність впливу пошкодженої організації МТ на експресію FH1 можна пояснити виключенням AtFH1 з кортикальної ділянки клітини, традиційного місця розташування МТ. Також відомо, що AtFH1 закріплює A Φ через плазмалему на клітинній стінці (Martiniere et al. 2011), що може ефективно обмежувати зв'язування актину i, оскільки FH1 утворює зв'язок між клітинною стінкою і мережею актину, вплив динаміки МТ на його експресію може бути вторинним у порівнянні із впливом мікрофіламентів. Дезорганізація МТ не впливала також і на експресію FH4, що тим самим доводить відсутність зв'язку між організацією МТ і експресією FH4. Проте відомо, що FH4 здатний зв'язуватися із МТ через унікальний для рослин GOE домен (Deeks et al. 2010). Не виключено, що з'єднання FH4 і МТ не є пролонгованим і критичним для організації МТ та їхнього функціонування. Можливо, що FH4 задіяний у специфічних реакціях МТ на стрес і його з'єднання із МТ носить тимчасовий характер. Зміни в експресії FH1, зокрема її пригнічення, відзначали при обробці контрольних проростків A.thaliana цитохалазином D (CD) (рис. 5.10 b). Це свідчить про зворотний зв'язок між полімеризацією мікрофіламентів та експресією FH1. Відомо, що AtFH1 здатний регулювати організацію актину у кортексі клітини і тим самим впливати на цитозольний трафік (Martiniere et al. 2011). Так, блок доменів FH1-FH2 у AtFH1 може одночасно нуклеювати філаменти in vitro, утворюючи пучки АФ, які потовщуються завдяки включенню de novo нуклейованих філаментів. Мутації AtFH1 індукують зв'язування АФ, а отже, сприяють

формуванню менш динамічного актинового цитоскелету, що, у свою чергу, спричиняє зниження темпів видовження клітин (Rosero et al. 2013). Оскільки повідомлялося, що AtFH1 підсилює полімеризацію актину та кепує АФ, сприяючи загальній рухливості актину (Michelot et al. 2005), зниження *FH1* може сприяти зниженню кількості FH1 і тим самим робити свій внесок у пригнічення динаміки актину у кортикальній області клітини, що, у цілому, пригнічує ріст проростків. Таким чином, фунціонування FH1 є певним внеском у регулювання динаміки актину кортикальної області клітини.

На противагу експресії FH1, яка знижувалася, експресія FH4 посилювалася після дії CD, що також свідчить про її залежність від організації АФ (рис. 5.10 b). Незважаючи на приналежність до одного класу формінів I, це може означати різні механізми регулювання білками FH1 та FH4 організації АФ та їхнього з'єднання з ЦМ. Посилення експресії *FH4* може свідчити про ключову роль білка у полімеризації і формуванню кортикальної мережі актину. Наші експерименти не виявили змін у експресії *FH4* після пошкодження МТ або дії кліностатування. Проте, Deeks та інші (2010) припускають, що механічні стимули можуть передаватися за допомогою FH4 – опосередковуючого континууму ЦМ –цитоскелет і, переважно, призводити до змін динаміки актину. Відповідно до запропонованої моделі МТ при цьому діють як структурний каркас, що дозволяє домену FH2 у AtFH4 виконувати свою функцію у нуклеації актину. Відомо, що через існування позаклітинного та трансмембранного домену FH4 здатний передавати механічні сигнали з клітинної стінки через ЦМ на обидві мережі цитоскелету. Також, це підтверджують експерименти із переміщенням похідних форміну AtFH4 без актинозв'язуючих доменів до місць відкладання елементів клітинної стінки після ураження клітин патогеном (Sassman et al. 2018; Oulehlova et al. 2019). Можливо, у такому випадку це необхідно для підтримання континуму клітинна стінка-ЦМ-МТ, у якому AtFH4 бере активну участь.

У кліностатованих проростках ні OR, ні CD не змінювали експресію *HF1/FH4*, що вказує на той факт, що при механічному стресі по-іншому регулюється зв'язок між елементами цитоскелету та експресією формінів *HF1/FH4*. Таким чином, наші експерименти продемонстрували регулювання експресії FH1 та FH4 за рахунок організації $A\Phi$ та здатність зниженого рівня гравітаційного навантаження впливати на таке регулювання. Ми зафіксували зворотній зв'язок між організацією АФ та рівнем експресії FH1/FH4. Протилежний вплив стану АФ на експресію FH1 та FH4, можливо, зумовлений різною роллю даних білків у формуванні мережі АФ. Відомо, що FH1 залучений до організації АФ і їхнього зв'язку з мембраною і експресія його гена зворотньо знижується після деполімеризації АФ і зниження динаміки АФ мережі. У той час, як FH4 бере участь у формуванні континуму клітинна стінка – ЦМ – цитоскелет і є необхідним для його підтримання у разі руйнування АФ, оскільки це забезпечує ріст. З високою ймовірністю, АФ та FH4, відіграють провідну роль у забезпеченні організації сітки кортикального цитоскелета. Оскільки, кліностатування не змінювало експресію FH1/FH4 навіть за умов руйнування обох елементів цитоскелету, можливо, що саме форміни FH1/FH4 і є одним із компонентів стабілізації цитоскелету при даних умовах. Така стійкість їхньої експресії може бути проявом адаптації.

Згідно отриманих даних визначено, що МТ та $A\Phi \epsilon$ первинними елементами клітинної реакції на зовнішній стрес. Між обома елементами цитоскелету існує взаємодія, яка проявляється через руйнування мережі МТ цитохалазином D, а мережі $A\Phi$ – оризаліном, що позначається у частковій появі конгломератів з тубуліну та актину (відповідно) у меристемі та дистальній зоні розтягу кореня *A.thaliana*. При деполімеризації мережі як $A\Phi$, так і МТ, змінюється експресія їхніх структурних генів, таких як *ACT2* та *TUA6*, що свідчить про зворотний зв'язок між пулом вільних мономерів актину і тубуліну і пригніченням *ACT2* та *TUA6*. Часткове руйнування організації $A\Phi$ та МТ може активувати у цитоплазмі специфічні транскрипційні фактори, які запускають сигнальні механізми протидії механічному стресу. Організація кМТ також впливає і на експресію *CLASP*. Взаємодія АФ та МТ у кортикальній області забезпечує ростові та сигнальні процеси клітини. У *B.vulgaris* та *A.thaliana* кліностатування послаблює вплив цитохалазину D на руйнування мережі актинових філаментів у клітинах дистальної зони розтягу, що пояснюється активацією специфічного механізму протидії механічному стресу за даних умов.

У дослідженнях не виявлено зв'язку як між кліностатуванням та/або деполімеризацією обох елементів цитоскелету та експресією гену *PLDδ*. Це доводить відсутність участі білка PLDδ у реакції клітин на кліностатування, а можливо, і про відсутність відокремлення кортикальних мікротрубочок від цитоплазматичної мембрани при дії даного типу механічного стресу.

Часткове руйнування $A\Phi$ регулює експресію *MAP65-1*, який кодує білок, асоційований із мікротрубочками і це свідчить про опосередкований зв'язок між MAP65-1 і $A\Phi$. Порушення організації актинового цитоскелету призводить до зниження експресії форміну *FH1* та збільшення експресії форміну *FH4*, що вказує на регулювання експресії вказаних генів деполімеризацією $A\Phi$. FH1 залучений до функціонування мережі $A\Phi$, а саме, до її з'єднання із ЦМ у кортикальній області клітини і експресія його гена знижується на тлі часткового руйнування та зниження динаміки мережі мікрофіламентів. Підвищення експресії *FH4* при руйнуванні $A\Phi$, можливо, зумовлене ключовою роллю FH4 у опосередкуванні зв'язку між мембраною, KC та обома основними елементами цитоскелету (MT та $A\Phi$), що необхідно для забезпечення росту у даних стресових умовах.

Безпосереднє кліностатування сприяє зниженню рівня транскрипції *TUA6* та *CLASP* у коренях *A.thaliana*, що вказує на чутливість полімеризації тубуліну та просторового розміщення МТ до механічного стресу. Зниження експресії *CLASP* на фоні механічного стресу, ймовірно, пов'язане із порушенням як самої полімеризації, так і стабілізації кінців МТ. Це, у свою чергу, може призводити до відміченого відхилення окремих МТ від поперечної організації, і, загалом, до уповільнення росту коренів кліностатованих рослин.

частковим руйнуванням мережі Зв'язок між цитоскелету та транскрипційною регуляцією генів асоційованих білків при кліностатуванні дещо інший ніж у стаціонарному контролі: взаємозалежність дезорганізації MT та рівня експресії TUA6 та CLASP, та дезорганізації A Φ та рівня експресії як TUA6 та ACT2, так i FH1, FH4 не проявляється за даних умов. При кліностатуванні не відмічали також зв'язку між деполімеризацією АФ та пригніченням експресії МАР65-1, що вказує на різну регуляцію взаємодії АФ та МАР65-1 в умовах даного типу механічного стресу. Відмінний механізм зворотного зв'язку між станом МТ, АФ та експресією генів асоційованих білків в умовах даного типу механічного стресу, ймовірно, пов'язаний із значно меншим навантаженням протопласта на кортикальну область клітини, і, зокрема, на мережу цитоскелета, що відбувається при кліностатуванні. При таких умовах активується адаптаційний механізм, у який залучені такі структурні та асоційовані із цитоскелетом білки як TUA6, CLASP, MAP65-1, FH1 та FH4.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 5:

<u>Shevchenko GV</u>, Krutovsky KV. Mechanical stress effects on transcriptional regulation of genes encoding microtubule- and actin-associated proteins. Physiol Mol Biol Plants. 2022; 28(1): 17–30. Q1

Kordyum E, Borisova T, Krisanova N, Pozdnyakova N, <u>Shevchenko G</u>, Kozeko L, Romanchuk S, Lobachevska O, Charkavtsiv Ya, Kyyak N, Zaimenko N, Ivanytska B, Brykov V, Mischenko L. In: Fedorov O, editor. Space research in Ukraine. 2019-2020. Kyiv: Akademperiodyka; 2020. p. 71–78.

<u>Shevchenko GV.</u> Putative gravisensors among microtubule associated proteins. Cell Biol Int. 2017; 43(9): 983-990. Q3

<u>Shevchenko G.</u> Participation of proteins binding both actin filaments and microtubules in higher plant cell growth. Cytol Genetics. 2015; 49: 270-278.

<u>Shevchenko G.</u> Actin microfilament organization in the transition zone of *Arabidopsis*-ABD2-GFP roots under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2012; 24 (6): 427-433. Q2

Шевченко ГВ, Кордюм ЕЛ. Использование трансгенных растений *A. thaliana*–GFP–ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации. Косм наука техн. 2012; 18(6): 51-56.

Kalinina I, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Tubulin cytoskeleton in *A. thaliana* root cells under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2009; 21(1-2): 187-190. Q2

Шевченко ГВ. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корня *A. thaliana*. Цитол генет. 2009; 43(4): 3-11.

<u>Shevchenko G, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing</u> of the root elongation zone in *A.thaliana* plants. Cell Biol Int. 2008; 32:560-562. Q3

Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. 2008. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The Plant cytoskeleton: a key tool for agrobiotechnology. NATO Science for peace and security series- C: Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196.

<u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. Adv Space Res. 2007; 39: 1171-1175. Q3

<u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ya, Kordyum E. Interrelation between cytoskeleton elements in root cells of *Arabidopsis*-GFP-MAP4 seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2006; 13(1):107-108. Q3

Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YaB. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station. Acta Astronautica. 2005; 56: 613-621. Q2

Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>. Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Grav Physiol. 2003; 10 (1): 15-16. Q3

Thomas S, Osman K, de Graaf BHJ, <u>Shevchenko G</u>, Wheeler M, Franklin Ch, Franklin-Tong V. Investigating mechanisms involved in the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 2003; 358: 1033-1036. Q1

Кордюм ЕЛ, <u>Шевченко ГВ.</u> Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитол генет. 2003; 37 (2): 56-68.

Snowman BN, Kovar DR, <u>Shevchenko G</u>, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. Signal -mediated depolimerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. The Plant Cell. 2002; 14 (10): 2613-2626. Q1

<u>Shevchenko G.</u> Impact of clinorotation on microtubule regulation by tubulinassociated proteins in plants. 26th ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 14th International Conference on "Two-Phase Systems for Space and Ground Applications", European Space Agency Topical Teams meetings, 2019, 24-27 September, Granada, Spain. p. 140.

Шевченко ГВ. Білки, асоційовані із тубуліновим цитоскелетом як можливі гравісенсори рослин. Стратегії збереження рослин у ботанічних садах. Міжнародна наукова конференція, 2019, 25-27 лютого, Київ. с. 197.

Шевченко ГВ. Дослідження росту рослин в умовах мікрогравітації. Укра їнська конференція з космічних досліджень, 2018, 17-20 вересня, Київ. с. 82.

Шевченко ГВ. Изменения цитоскелета растений в условиях симулированной микрогравитации. 2-я Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», 2018, 28-31 мая, Минск, Беларусь. с.31-32.

Шевченко ГВ. Ассоциированные с микротрубочками белки чувствительны к воздействию микрогравитации. 17- та Українська конференція з космічних досліджень, 2017, 21-25 серпня, Одеса. с.69.

<u>Shevchenko G.</u> Microtubule associated proteins might sense gravity changes. 7th International Symposium on Physical Sciences in Space and 25th European Low Gravity Research Association Biennial Symposium and General Assembly, 2017, 2-6 October, Juan-les-Pins, France. p.99-100. Шевченко ГВ. Влияние клиностатирования на организацию цитоскелета растительной клетки. 15 Українська конференція з космічних досліджень, 2015, 24-28 серпня, Одеса. с. 55.

<u>Shevchenko G.</u> Cortical microtubules and phospholipase D are involved in *Arabidopsis* root cell growth under clinorotation. European Low Gravity Association Biennial Symposium and General Assembly, 2013, 11-14 September, Vatican, Italy. p.192.

<u>Шевченко ГВ.</u> Роль цитоскелета в регулировании ростовых процессов клеток корня при клиностатировании. Українська конференція з космічних досліджень, 2013, 2-6 вересня, Євпаторія, Крим. с.95.

Шевченко ГВ. Влияние микрогравитации на цитоскелет в корнях *A. thaliana*.12-та Українська конференція з космічних досліджень, 2012, 3-7 вересня, Євпаторія, Крим. с.84.

<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Developmental rearrangement of microtubules in plant root cells under clinorotation. ELGRA Biennial General Assembly, 2011, 5-9 September, Antwerp, Belgium. p.179.

<u>Shevchenko G.</u> Developmental rearrangement of cortical microtubules in plant root cells. 31st Annual ISGP Meeting, 11th ESA Life Science Symposium, 5th ISSBB Symposium, ELGRA Symposium, 2010, 13-18 June, Trieste, Italy. p117.

<u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Impact of microgravity on plant cell growth.5th EPSO Conference, 2010, 18-22 April, Olos, Finland. p.162.

<u>Shevchenko GV.</u> Impact of clinorotation on the orientation of microtubules in plant root cells. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2009, 1-4 September, Bonn, Germany. p.240.

Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Sensitivity of cortical microtubules in *A. thaliana* root cells under clinorotation. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2007, 23-28 March, Coeur d"Alene, Idaho, USA. p.53.

Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Spatial organization of cytoskeleton in *Arabidopsis* roots under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.68. <u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ia, Kordyum E. Cytoskeleton rearrangements in the distal elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.67.

<u>Шевченко ГВ</u>. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів.2-гий з'їзд Українського Товариства клітинної біології,2007,23-26жовтня,Київ.с.224.

<u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Tubulin cytoskeleton in elongation zone of *Arabidopsis* root is affected by clinorotation. 6-я Украинская конференция по космическим исследованиям, 2006, 3-10 сентября, НЦУІКС, Євпаторія, Крим. с. 189.

Kalinina Ia, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E.Oryzalin sensitivity of cortical microtubules in *A. thaliana* root cells under clinorotation. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for biotechnology and agriculture, 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.47-48.

<u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *A.thaliana* plants. International Symposium The Plant cytoskeleton: genomics and bioinformatics tools for biotechnology and agriculture. 2006, 19-23 September, Yalta, Crimea. p.86-88.

Kordyum E.L., Martyn G.I., <u>Shevchenko G.V.</u>, Kozeko L.E., Artemenko O.A. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.106.

<u>Шевченко ГВ.</u> Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.

<u>Shevchenko G</u>, de Graaf B, Franklin-Tong V. Role of actin-binding proteins in remodeling of actin cytoskeleton during SI response in *Papaver rhoeas* pollen tubes. 14 FESPB Congress, Acta Physiologiae Plantarum 26(3), 2004, 23-27 August, Cracow, Poland. p. 49.

РОЗДІЛ 6

ОРГАНІЗАЦІЯ ЕЛЕМЕНТІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ У КОРЕНЯХ РОСЛИН, ЯКІ ЗАЗНАЮТЬ ГІПОКСІЇ

6.1. Будова аеренхіми у коренях повітряно-водних рослин Alisma plantago–aquatica та Sium latifolium

6.1.1. Формування схизогенного типу аеренхіми

Досліджували аеренхіму у корі апексів коренів повітряно-водних рослин Alisma plantago-aquatica L. (ALISMATACEAE, частуха подорожникова, однодольний вид) та Sium latifolium L. (APIACEAE, вех широколистий, дводольний вид), які ростуть на берегах річок і коренева система яких заглиблена у ґрунті під водою.

У *A. plantago-aquatica* порожнини АР починають з'являтися на рівні апікальної меристеми коренів шляхом розходження клітинних рядів (рис. 6.1 а).



Рис. 6.1. Порожнини аеренхіми (вказано стрілками) в апексах коренів *Alisma plantago–aquatica* (а) та *Sium latifolium* (б). Масштаб 100 µм

Порожнин АР розрізняються за розмірами і у *S. latifolium* їхня загальна площа значно більша за таку у *A. plantago–aquatica* (рис.6.1). Відмічали, що

AP у *A. plantago–aquatica* формується розходженням радіальних рядів через розділення клітин вздовж їхніх сумісних клітинних стінок по серединній пластинці і характеризується як схизогенний тип AP (Seago et al. 2005; Muhlenbock et al. 2007; Шевченко та Кордюм 2012).

Вважають, що схизогенна AP – це завжди комплексний і добре організований процес (Jackson and Armstrong 1999; Evans et al. 2003), але до сьогодні залишається неясною його регуляція в ході онтогенезу рослин. Схизогенна AP утворюється шляхом розділу клітин, без їхньої загибелі, даний тип аеренхіми поширений у багатьох видів, серед яких переважають повітряно-водні (водноболотні) рослини.

6.1.2. Формування лізигенного типу аеренхіми

;

У *S. latifolium* невеликі АР порожнини також починають з'являтися вже на рівні ініціаліїв первинної кори (периблеми) коренів (рис. 6.1 b; 6.2 a, b) на відстані 70 – 120 мкм від центру спокою клітин кореня (рис. 6.1 b). У цього виду аеренхіма представляє собою розгалужену мережу порожнин різного об'єму (рис. 6.1 b; 6.2 a). Ступінь вираженості АР досить сильно варіює у різних коренях. Первинні порожнини являють собою локальні розширення міжклітинників між поздовжніми клітинними рядами, рідше між групами клітин у рядах (рис. 6.1 b; 6.2 a, b, c) і на поздовжніх зрізах порожнини невеликі. Іноді відмічають скупчення як окремих клітин, так і груп з декількох сусідніх (рис. 6.2 d). З просуванням по кореню в акропетальному напрямку у зону середньої та пізньої меристеми первинні пустоти АР зливаються і утворюють збільшенні порожнини, які, як правило, захоплюють площу сусідніх клітинних рядів (рис.6.1 а; 6.2 а). Найбільший об'єм порожнини АР займають у зоні пізньої меристеми і зони розтягу кореня і це відбувається за рахунок злиття множинних дрібних за розмірами порожнин (рис. 6.1 а; 6.2 а).



Рис. 6.2. Поздовжні зрізи адвентивних коренів *Sium latifolium*: а – медіальний зріз; b – первинні порожнини аеренхіми; c – порожнини, сформовані розривами клітинних рядів кори; d – клітини, які зазнають редукції. Масштаб 200 мкм (а); 40 мкм (b-d)

Вже у проксимальній меристемі і на початку зони розтягу кореня в шарах серединної та зовнішньої кори відмічають два різні за формою і розмірами типи аеренхімних порожнин. У зовнішніх шарах кори відносно невеликі і переважно округлі порожнини розміщуються концентрично у 2 - 3 шари, а у серединних шарах — порожнини більшого розміру овальної і краплевидної форми, які розширюються у відцентровому напрямку (рис. 6.3 а). Клітини зовнішніх шарів кори пента — або гексагональної форми і межують з 3 —ма або 4—ма суміжними клітинами. Через таке межування 5–7 сусідніх клітин утворюють у центрі невелику порожнину і вся структура стає подібною до бджолиних сот (рис. 6.3 с, d).



Рис. 6.3. Поперечні зрізи адвентивних коренів *Sium Latifolium:* два типи порожнин аеренхіми у зоні розтягу (а); кора на рівні меристеми, де порожнини представлені міжклітинниками (b); первинні порожнини аеренхіми в проксимальній меристемі, утворені пентагональними клітинами (сотові порожнини внутрішньої кори) і радіальні ряди пентагональних клітин (витягнуті порожнини внутрішньої кори) і сори (с); редуковані клітини, які прилягають до первинних порожнин аеренхіми в меристемі (d). Білі стрілки – діагональні поділи, які призводять до утворення округлих порожнин у зовнішніх шарах кори. Масштаб 40 мкм

Клітини серединних шарів кори в області витягнутих порожнин а також клітини внутрішніх шарів кори, включаючи ендодерму, тетрагональної форми. Вони вигнуті у тангентальному напрямку і утворюють радіальні ряди (рис. 6.3 d). Великі порожнини серединної кори утворені розходженням таких радіальних рядів (рис. 6.3 с, d). Найбільші за розмірами порожнини AP утворюються у центральній зоні розтягу та зоні видовження кореня. У цього
виду відмічають впорядковані і невпорядковані порожнини. Виявлено, що утворенню впорядкованих порожнин передують різні типи клітинного поділу у шарах внутрішньої та зовнішньої кори. Так, на рівні дистальної меристеми відбувається інтенсивний ріст кори в радіальному напрямку і відбувається збільшення кількості клітинних рядів за рахунок периклінальних поділів. Крім того, клітини зовнішніх шарів кори діляться, як правило, діагонально під кутом 45° до радіальної площини (рис. 6.3 b – білі стрілки). Такі діагональні поділи призводять до утворення пента- і гексагональних клітин, ріст яких супроводжується збільшенням міжклітинників (рис 6.3 с, d). Утворення АР в процесі якого міжклітинні порожнини переходять у великі порожнини через ріст і поділ клітин без їхнього руйнування називають експансіогенією (від лат. «expando» – розтяг та грец. «-geny» –походження) (Seago et al. 2005). Порожнини АР, утворені полігональними клітинами, називають аеренхімою типу «бджолині соти» або сотовою експансіогенією. Даний тип АР розповсюджений як серед однодольних Nymphaea, Acorus calamus, Najas, Habenaria, так і дводольних – Rumex і Hydrocotyle (Laan et al. 1991; Seago et al. 2000). Слід відмітити, що, на противагу іншим рослинам, у S. latifolium сотові порожнини займають площину не всієї кори, а лише її зовнішніх шарів.

Наявність і схизогених і експансіогенних порожнин AP відоме і описано у *Neptunia* (*Fabaceae*) (Seago et al. 2005). На відміну від *Neptunia*, у *S. latifolium* експансіогенні і схизогенні порожнини AP розділені просторово у зовнішній і внутрішній корі (відповідно).

Вже в районі виходу клітин із центра спокою у корі коренів *S. latifolium* починають розрізняти три типа клітин – нормальної морфології, вакуолізованні клітини і клітини зменшених розмірів і зміненої морфології, у яких відсутні ядра і вакуолі (спостереження на серійних зрізах) і кількість органел також значно зменшена. Визначено, що саме такі клітини із зміненою морфологією і розмірами знаходяться у зоні розходження клітинних рядів і утворення первинних порожнин АР (рис. 6.2 b, c, d).

З просуванням по кореню клітини з вакуолями підлягають подальшій диференціації і стають вакуолізованішими. У ранній меристемі після виходу із центра спокою такі клітини ізодіаметричні і часто витягнуті в поздовжньому напрямку. Велике округле/овальне ядро знаходиться у центрі клітини. Цитоплазма щільна, пластиди не диференційовані, мітохондрії мілкі та округлі, іноді витягнуті. Матрикс клітини електронно–щільний, в якому іноді знаходяться невеликі електронно – прозорі ділянки (рис. 6.2 b, d).

Меристематичні клітини коренів ормальної морфології з просуванням по кореню також підлягають вакуолізації (рис. 6.2 с, d).

У безядерних клітинах зміненої морфології на внутрішній поверхні ядерної мембрани часто відмічають конденсовані конгломерати хроматину. Цитоплазма таких клітин, як і у типових ядерних меристематичних клітин, зберігає електронну щільність, велику кількість вільних рибосом, але мітохондрії та пластиди присутні у меншій кількості (рис. 6.4). Особливістю таких клітин є практично повна відсутність вакуому. В області серединної меристеми розміри таких клітин суттєво зменшуються, а їхня клітинна стінка починає розпушуватися. Саме ці клітини у подальшому підлягають редукції і вистелюють порожнини аеренхіми. Вже на рівні проксимальної меристеми у середніх шарах кори коренів *S. latifolium* відмічають редукцію цілих клітинних рядів, які прилягають до порожнин аеренхіми. У результаті компресії (зморщування) та поступової редукції клітин утворюється мережа розлогих внутрішньо-кореневих порожнин різного об'єму (рис. 6.1 b; 6.2 а).

Слід відмітити, що клітини, які прилягають або «вистелюють» порожнини аеренхіми, знаходяться на різних стадіях редукції (рис. 6.4).



Рис. 6.4. Клітини у оточенні порожнин аеренхіми (зірочки) на рівні меристеми коренів *Sium latifolium*: потовщення та розриви клітинних стінок, утворення окремих редукованих клітин (РК) (а); проміжні етапи редукції клітин (b); компресія окремих редукованих клітин (c); останні етапи редукції клітин між поздовжніми рядами (d). * – порожнини аеренхіми. Електронна мікроскопія. Масштаб 2 мкм (a, b); 1 мкм (c); 5 мкм (d)

Такі клітини мають спотворену форму та характеризуються значно меншими розмірами порівняно із сусідніми неушкодженими клітинами (табл. 6.1). Серійні зрізи показали, що у клітин, які зазнають редукції, поступово зникають вакуолі та ядра, інші органели наявні у значно меншій кількості. Клітинна стінка часто розшарована (рис. 6.4).

Розміри клітин меристеми та дистальної зони розтягу коренів Alisma plantago-aquatica та Sium latifolium

Ростова	A. plantago-aquatica		S. latifolium		
зона кореня	Параметри клітин, мкм				
	Довжина	Ширина	Довжина	Ширина	
Меристема	$12,13 \pm 0,12$	$18,25 \pm 0,92$	$10,55 \pm 0,68$	$18,\!43 \pm 0,\!64$	
ДЗР	21,99 ± 0,84	$14,23 \pm 0,68$	19,60 ± 0,16	$15,\!50 \pm 0,\!88$	

n= 25 для кожного виду

Ми припускаємо, що наявність таких клітин у *S. latifolium* свідчить про лізигенний тип AP. Як відомо, лізигенна AP є результатом програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) (Jackson and Colmer 2005), яка розвивається під впливом гіпоксії та/або стресу від нестачі поживних речовин, зокрема азоту (N), фосфору (P) або сірки (S) (Bouranis et al. 2006). Лізигенна AP зустрічається у багатьох видів сільськогосподарських культур, включаючи ячмінь, пшеницю, рис та кукурудзу (Justin and Armstrong 1991; He et al. 1996 a; Gunawardena et al. 2001 a).

Програмована клітинна загибіль характерна для певних клітин, нечисленних груп клітин або специфічних тканин і кожний тип клітинної ПКЗ відбувається на специфічній стадії розвитку клітини або завдяки певним умовам зовнішнього середовища. Досліджують роль програмованої загибелі у клітинних процесах, які відбуваються під час екологічної акліматизації (Reape et al. 2008). Дані літератури відносно типів ПКЗ у рослин виявили багато її різних типів, включаючи програмовану клітинну загибель апоптозного типу, аутофагію, аутолізис, некроз тощо.

6.1.3. Редукція клітин при формуванні лізигенної аеренхіми

На поперечних зрізах коренів *S. latifolium* на рівні дистальної меристеми на межі зовнішньої та внутрішньої кори в області первинних порожнин зустрічаються клітини невеликого розміру, які не задіяні у формуванні схизогенних порожнин (рис. 6.2 d; 6.3 d; 6.4). Як правило, це поодинокі клітини, одна сторона яких виступає у порожнину АР, а інша межує з тими клітинними рядами, які вистелюють порожнини AP (рис. 6.4 b, c). Такі клітини втрачають характерну для меристеми тетрагональну форму. Їхні розміри суттєво менше, ніж у клітин в нормі, а клітинна стінка, яка виступає у порожнину АР, потовщена та разпорошена (рис. 6.4 с). Відмічено, що у такому редукованому стані клітини зберігаються до переходу у зону розтягу. Присутність у серединній корі S. latifolium таких редукованих клітин (РК) а також фрагментів клітинних рядів, які не є складовою частиною архітектури кореня, означає, що в процесі утворення порожнин відбувається руйнування (елімінація) окремих клітин шару, що характерно для АР лізигенного типу. Деградацію окремих клітин при утворенні AP спостерігають у деяких видів родини Alismatales (Pistia stratiotes) i Hydrocharitaceae (Seago et al. 1999). У S. latifolium цей процес важко знайти на поперечних зрізах, однак, на повздовжніх цей тип клітин добре ідентифікується. У багатьох роботах відмічають, що у деяких випадках важко визначити яким чином утворені первинні порожнини АР – шляхом клітинного поділу/експансії або через відділення та/або руйнування клітин (Evans et al. 2003; Seago et al. 2005). Окрім того, у видів з конститутивною АР, важко визначити точну хронологію процесів загибелі клітин і утворення порожнин (Evans et al. 2003).

Традиційно вважають, що загибель клітин при формуванні лізигенної АР – це програмований процес (програмована клітинна загибель (ПКЗ)). Через спільні риси окремих етапів з апоптозом тварин цей процес у рослин часто називають ПКЗ – апоптозного типу (Reape et al. 2008). Хоча відомо, що у рослин клітинна загибель може відбуватися в результаті аутофагії, аутолізису або некрозу, у цілому, залишається невизначеним кількість типів ПКЗ, характерних для рослин та взаємовідношення між ними, оскільки більшість робіт з цієї тематики вказує лише на факт загибелі клітин без деталізації і хронології клітинних процесів (Reape et al. 2008). Частково це пов'язано з відсутністю у рослин чітких ознак класифікації ПКЗ, характерних для ссавців, що значно ускладнює дослідження, оскільки багато шляхів мають спільні етапи і відрізняються лише за часовими параметрами (Bassham 2007).

Дослідження ультраструктури РК у *S. latifolium* виявило їхні відмінні ознаки і особливості утворення. Згідно наших спостережень сегрегація таких клітин в корі починається із втрати міжклітинних контактів – відбувається руйнування плазмодесм і локальне потовщення клітинної стінки, потім відділення клітин через відшарування по серединній пластинці (рис. 6.4 a) і, як результат – клітини втрачають форму (деформуються) і зменшуються у размірах (рис. 6.4 b, c).

Складно інтерпретувати події, які відбуваються в процесі деградації цитоплазми РК у *S. latifolium*. Згідно ультраструктурних ознак РК не відрізняються від меристематичних, однак, їхня цитоплазма збідніла на органели. РК характеризуються відсутністю ядер, зменшенням кількості вакуолей (зустрічаються на 25 – 33 % зрізах). Однак, у них присутні (але в значно меншій кількості у порівнянні з нормою) усі інші органели, включаючи пластиди і мітохондрії (табл. 6.2).

Подібні процеси відмічали у рису, у якого в клітинах коренів, які гинуть при утворенні АР, після руйнування КС (разрив серединої пластинки у період від 6-ти до 12-ти годин життя клітини) і втрати тургора, відбувається лізис вакуоль, однак, більшість клітинних органел залишалася без змін. Каwаі та співавтори (1998) вважають, що первинні процеси полягають у втраті цілісності плазмалеми, а Inada та інші (2002) припускають, що спочатку відбувається розірвання тонопласту.

		Редуковані	
Розміри та кількість	Клітини з ядром	клітини	
клітин	92 ± 8,35*	20 ± 5,35*	
	Вакуолі		
Розмір, мкм ²	$0,41 \pm 0,35$	$0,39 \pm 0,52$	
Кількість на 100 мкм ²	12,4 ± 7,70*	4,52 ± 1,34*	
	Мітохондрії		
Розмір, мкм ²	$0,16 \pm 0,089$	$0,\!14 \pm 0,\!072$	
Кількість на 100 мкм ²	41 ± 13,3*	23 ± 7,6*	
	Пластиди		
Розмір, мкм ²	0,66 ± 0,33*	$0,\!40 \pm 0,\!28^*$	
Кількість на 100 мкм ²	7,07 ± 4,23	$7,56 \pm 5,23$	
Вміст крохмальних зерен (% органел)	51%	14%	

Кількісні показники ультраструктури клітин у нормі та редукованих у меристемі адвентивних коренів *Sium latifolium*

Примітка : $M \pm SD$, * – p < 0.05

Однак, ці автори не спостерігали характерної клітинної морфології, яка б вказувала на відмінність редукованих клітин від оточуючих їх сусідніх, як це притаманне *S. latifolium*. Можливо, що і у *S. latifolium* на первинних етапах розвитку AP відбувається значна редукція вакуолярного компартменту, оскільки в подальшому PK майже повністю позбавлені вакуоль. Однак, ми не відмічали послідовних стадій цього процесу. Не виключено, що деградація вакуоль відбувається швидко і її важко виявити ультраструктурними дослідженнями. У цілому ж, для рослин характерна надзвичайно швидка плинність процесів загибелі і елімінації клітин. Так, процеси ПКЗ–апоптозного типу в основному развиваються впродовж 6-ти годин і загибель клітин при старінні відбувається впродовж 3-12-ти годин (Reape et al. 2008).

Слід зазначити, що в коренях *S. latifolium* були відсутні фрагменти ДНК, і цілісність ядерної ДНК підтверджував гель-електрофорез. Тим не менше, відсутність ядер в деградуючих клітинах все ж таки свідчить про руйнування ядерного матеріалу на певному етапі. У *S. latifolium* зрідка спостерігали скупчення вакуоль на периферії ядер, що може доводити лізис ядерного матеріалу. Але, скоріше за все, це просто етап формування центральної вакуолі у процесі дифференціювання тканин кореня.

У цілому ж, незважаючи на труднощі у визначені послідовності подій при елімінації клітин при формуванні AP у *S. latifolium*, можна чітко визначити, що: 1) події у цитоплазмі клітин, які деградують, відбуваються на самих ранніх стадіях розвитку кори; 2) можливо, що одним з перших етапів є втрата ядерного матеріалу, редукція вакуома, а також дезорганізація цитоскелета (MT), в результаті чого змінюється морфологія клітин; 3) майже всі органели (але в значно меншій кількості) а також КС зберігаються до останніх стадій загибелі клітин.

Таким чином, дослідження AP коренів *S. latifolium* свідчить про наявність ознак AP, які класифікують згідно різних типів. Основний тип AP, залучений до утворення архітектури порожнин – це змішана AP (сотова експансіогенія і радіальна схизогенія). Також відбувається лізис окремих клітин, для якого характерні особливості, не описані для інших видів а саме, відсутність ядра і збереження усіх інших органел до зони розтягу (Shevchenko et al. 2016). Слід враховувати, що часто повідомляють про спільне існування лізигенної і схизогенної AP навіть в межах одного органу рослини, причому схизогенна AP часто передує лізигенній (Justin and Armstrong 1987, 1991). Ймовірно, що усі описані типи AP доповнюють одна одну в процесі встановлення постійного газообміну в тканинах рослин в умовах повного водного забезпечення. Згідно класифікації Seago та інших (2005) АР у *S. latifolium* можна віднести до лізигенної аеренхіми «пакетного типу», при якому клітини повторно діляться у меристемі вздовж радіальних рядів а новостворений ряд клітин зазнає лізису, що призводить до утворення порожнин у міжряддях (Seago et al. 2005). Слід відмітити, що різні типи росту клітин у шарах кори кореня і особливості редукції клітин при формуванні повітряних пазух у *S. latifolium*, у цілому, доповнюють і розширюють наші знання про вже відомі типи загибелі клітин в процесі онтогенезу рослин.

6.2. Тубуліновий цитоскелет коренів Alisma plantago–aquatica та Sium latifolium

Клітини периблеми коренів *A. plantago–aquatica* та *S. latifolium* мають характерну прямокутну форму. Вимірювання показали, що довжина клітин меристеми *A. plantago–aquatica* у середньому статистично більша за таку у *S. latifolium* (табл. 6.1; підрозділ 6.1).

Вже у периблемі обох видів рослин відмічали локальні розходження рядів клітин, в результаті чого утворювалися невеликі порожнини (рис. 6.1), що є початком формування аеренхіми. Прилеглі до порожнин клітини не змінювали своєї прямокутної форми у рослин *A. plantago–aquatica* (рис. 6.5 a), а у *S. latifolium* вони часто ставали округлішими і втрачали форму (рис. 6.5 b). Вперше проведене нами порівняльне дослідження організації кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у клітинах різних ростових зон коренів рослин *A. plantago–aquatica* та *S. latifolium* (рис. 6.5) показало їхню подібність до організації елементів цитоскелету у наземних (суходільних) рослин *Z.mays* (Шевченко та Кордюм 2012; Шевченко 2020).



Рис. 6.5. Кортикальні (зірочки) та ендоплазматичні (стрілки) мікротрубочки на початкових етапах формування порожнин аеренхіми у коренях *Alisma plantago–aquatica* (а) та *Sium latifolium* (b), (A – аеренхіма). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

Причому, відмічали також подібність організації мікротрубочок на етапах розвитку лізигенної АР як природного типу (у *S. latifolium*), так і штучно індукованої (у *Z.mays*).

6.2.1. Організація кортикальних мікротрубочок

У обох видів досліджуваних рослин у інтерфазних клітинах кори на рівні меристеми і дистальної зони розтягу кореня розрізняли як кортикальні, так і ендоплазматичні МТ. Клітини в стадії поділу характеризувалися структурами, утвореними різними угрупованнями МТ – препрофазним пучком, мітотичним веретеном поділу, фрагмопластом. Кортикальні МТ щільними поперечними рядами охоплювали протопласт по периметру (рис. 6.6 а).



Рис. 6.6. Кортикальні (зірочки) та ендоплазматичні мікротрубочки (стрілки) у клітинах кори дистальної зони розтягу *Alisma plantago– aquatica* (a) та *Sium latifolium* (b). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

У *А. plantago–aquatica* форма клітин меристеми і ДЗР прямокутна, в рядах, прилеглих до порожнин аеренхіми, форма клітин майже не змінюється. Проте, у клітинах ДЗР коренів спостерігали нещільні, порівняно із меристемою, угруповання кМТ. Окрім того, разом із поперечними пучками кМТ часто зустрічали навскісні, поздовжні, а інколи навіть дезорієнтовані мікротрубочки (рис. 6.5 а; 6.6 а). У клітинах центральної зони розтягу та зони диференціації коренів організація кМТ була поздовжньою (Шевченко та Кордюм 2012; Шевченко 2020).

У тих клітинах коренів *А. plantago–aquatica*, які безпосередньо прилягали до порожнин аеренхіми, часто відмічали звивисті клітинні стінки (рис. 6.7 а). У таких клітинах кортикальні мікротрубочки загалом зберігали свою переважно поперечну орієнтацію. Проте, окрім поперечних пучків кортикальних МТ, інколи розрізняли навскісні, поздовжні і навіть фрагментовані мікротрубочки (рис. 6.7 а). Відомо, що однією з причин

звивистості клітинних стінок є порушення саме організації кортикальних МТ (Шевченко та Кордюм 2012).



Рис. 6.7. Кортикальні (зірочки) та ендоплазматичні (стрілки) мікротрубочки у порожнинах аеренхіми у зоні розтягу коренів *Alisma* plantago–aquatica (А –аеренхіма). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

На поперечних зрізах коренів видно, що у *S. latifolium* деякі клітинні ряди виходили із цитоархітектоніки кори і утворювали щось на зразок окремих стрічок, які вільно розташовувалися у міжряддях. Зазвичай, такі стрічки мали декілька контактів між собою (рис. 6.5 b). Часто руйнування клітинних рядів призводили до частих багатоклітинних з'єднань між протилежними стінками порожнин аеренхіми, які були схожі на містки (рис. 6.10 b).

У клітинах меристеми та зони розтягу коренів *S.latifolium* МТ зберігали свою типову будову і розташовувалися у вигляді пучків або поодиноких МТ впоперек поздовжній осі кореня (рис. 6.5 а; 6.6 b). Вони формували виражену мережу у кортикальній області клітин. Відмічали також ендоплазматичні МТ, які мали характерну будову у вигляді пучків різної щільності або поодиноких МТ у цитоплазмі та/або радіальних променів від області ядра до клітинної периферії (Шевченко та Кордюм 2012; Shevchenko et al. 2016).

Проте, у клітинах області формування аеренхіми мережа МТ виглядала по-іншому. У *S. latifolium* кортикальні МТ клітин, які прилягали до аеренхімних порожнин, змінювали орієнтацію на навскісну, іноді хаотичну (рис. 6.8).

Залишки мережі МТ знаходили у примембранній частині, через що периферійна область клітин у *S. latifolium* виглядала яскравою і це свідчить про скупчення конгломератів зруйнованих МТ у областях, вільних від вакуоль (рис. 6.8). Загалом, у *S. latifolium* в тих клітинах, які безпосередньо прилягали до аеренхімних порожнин, відмічали спотворену та дезорганізовану мережу мікротрубочок (рис. 6.5 b; 6.6 b). МТ мали у загальному фрагментований вигляд, їхні рештки розташовувалися по периметру клітин (рис. 6.8).



Рис. 6.8. Типи кортикальних (* зірочки) та ендоплазматичних (стрілки >) мікротрубочок у порожнинах аеренхіми у зоні розтягу коренів *Sium latifolium* (А –аеренхіма). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

Рештки МТ розміщувалися часто у примембранній області, що робило на знімках її більш яскравою. Слід зазначити, що клітини також мали звивисті

клітинні стінки і у них таких клітинах відмічали ознаки плазмолізу (рис. 6.5– 6.9).

Більшість клітин у областях, прилеглих до порожнин аеренхіми, мали нерегулярну форму, що зумовлено руйнуванням кортикального шару МТ (рис. 6.8).

У примембранних ділянках клітин відмічали фрагментовані конгломерати з рештків мікротрубочок (рис. 6.9). Однак, часто мікротрубочки були присутні у місцях збереження плазмодесм між клітинами, які редукуються і клітинами сусідніх цілих рядів, що вказує на збереження зв'язку із тканинами, що є необхідним для загальної трофіки кореня. Загалом, у клітинах дистальної зони розтягу коренів *S. latifolium* відмічали сильнішу дезорганізацію кортикальних мікротрубочок, ніж у *A. plantago–aquatica*.



Рис. 6.9. Клітини зони розтягу кореня *Sium latifolium*, прилеглі до порожнин аеренхіми. Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

Слід відмітити, що мережа кортикальних мікротрубочок у клітинах, прилеглих до порожнин аеренхіми, була дезорієнтованою у *A. plantago– aquatica* та дезорганізованою у *S. latifolium*.

6.2.2. Організація ендоплазматичних мікротрубочок

У клітинах кори на рівні дистальної зони розтягу у *А. plantago–aquatica* ендоплазматичні мікротрубочки визначають як мережу радіальних поодиноких мікротрубочок та їхніх нещільних пучків, спостерігають також і частково фрагментовані еМТ (рис. 6.10 а). Ендоплазматичні мікротрубочки не мають певної орієнтації і їхня кількість у клітині значно менша за кількість кортикальних МТ. У *S. latifolium* ендоплазматичні МТ формували виразну мережу, інколи, угруповання з тубуліну спостерігали навколо ядер (рис. 6.8; 6.10 b). Зазвичай, ендоплазматичні мікротрубочки формують також радіальні промені від ядра до цитоплазматичної мембрани (рис. 6.10 a, b).



Рис. 6.10. Клітини у порожнинах аеренхіми коренів *Alisma plantagoaquatica* (a) та *Sium latifolium* (b). Ендоплазматичні мікротрубочки, імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

Помічено, що у клітинах, які оточують порожнини аеренхіми коренів *S. latifolium* з просуванням від меристеми до дистальної зони розтягу кореня пучки ендоплазматичних мікротрубочок ставали менш щільними (рис. 6.5 b; 6.6 b; 6.9; 6.10 b).

У А. plantago–aquatica, у клітинах тих рядів, які при формуванні аеренхіми розійшлися, ендоплазматичні мікротрубочки загалом зберігали свою цілісну організацію (6.10 а). У *S. latifolium*, у клітинах, прилеглих до порожнин аеренхіми, ендоплазматичні мікротрубочки також зберігалися, проте, їх відмічали і у зруйнованих клітинах (рис. 6,8; 6.9; 6.10 b). Слід відмітити наявність доволі добре збереженної мережі ендоплазматичних мікротрубочок і мережі актинових філаментів (підрозділ 6.4) у клітинах, які формують порожнини аеренхіми. Збереження мережі обох елементів цитоскелету до кінцевих етапів руйнації клітин дозволяє припустити наявність активного екзоцитозу, що, у цілому, сприяє збереженню у клітинах имоластного зв'язку і внутрішньої компартментизації цитоплазми, що, ймовірно, і подтримує їхню життєдіяльність до зони розтягу кореня.

6.3. Організація мікротрубочок у клітинах коренів Zea mays при індукуванні аеренхіми

У відповідь на дефіцит сірки (S) рослини виробили механізми, які забезпечують адаптацію до низького рівня сірковмісних солей (Hawkesford 2005). Так, *Z. mays* реагує на дефіцит сірки шляхом модифікації архітектури кореня, а саме, збільшенням його довжини та маси, посиленим розвитком бічних коренів. Дефіцит сірки у середовищі призводить до формування в адвентивних коренях розетки крони *Z. mays* так званої трофічної аеренхіми, яка не забезпечує газопровідного з'єднання між пагоном та кореням, як це відбувається у випадку гіпоксичної AP (Bouranis et al. 2006). Так само як і гіпоксія, нестача сірки (S) у середовищі призводить до розвитку процесів програмованної клітинної загибелі – ПКЗ, в результаті якого у коренях наземних рослин утворюється лізигенна аеренхіма (Van Doorn 2011). На певних етапах цього процесу відбуваються структурні перебудови кМТ та еМТ. Оскільки цитоскелет задіяний у перебудові клітин при формуванні конститутивної аеренхіми внаслідок гіпоксії (Шевченко та Кордюм 2012; Kordyum et al. 2017), актуальності набуває дослідження його структури, зокрема, організації мікротрубочок, у послідовних процесах індукованої клітинної загибелі, яка розвивається від нестачі сірки у наземних рослин.

У своїх експериментах ми штучно індукували утворення аеренхіми у Z. *mays* шляхом вирощування рослин на середовищі, збіднілому на сірку (S) (Bouranis et al. 2006). Метою дослідження було виявлення відмінності/подібності участі кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у процесах програмованної клітинної загибелі та формуванні аеренхіми порівняно із повітряно-водними рослинами А. plantago-aquatica та S. latifolium, які характеризуються наявністю конститутивної аеренхіми різного типу. Вимірювання ростових показників показало, що в умовах індукованого дефіциту сірки загальна довжина кореневої системи Z. mays не змінюється і складає 33,68 ± 1,33 см у контролі та 33,31 ± 1,52 см на безсірковому середовищі. Те ж саме відмічали і інші дослідники, зокрема, Bouranis та інші (2003) повідомляли про незмінну довжину коренів кукурудзи впродовж 12денного періоду дії дефіциту сульфатів. Поряд з тим, існують повідомлення про посилення приросту коренів кукурудзи при дефіциті фосфору (Р) впродовж перших днів дії, і його помітне зниження згодом (Mollier and Pellerin 1999).

У експериментальних рослин *Z. mays* в умовах нестачі сірки вперше порожнини АР починають утворюватися на відстані приблизно 150–200 мкм від апексу кореня на рівні пізньої апікальної меристеми. З просуванням у проксимальному напрямку порожнини ширшають і досягають найбільших розмірів у зоні розтягу кореня. Утворення АР у коренях *Z. mays* було характерним лише для шарів кори. У S–дефіцитному поживному середовищі аеренхімні порожнини у коренях кукурудзи починають утворюватися на 6– тий день росту і досягають максимального розміру на 12–тий день. Відмічали слабше утворення АР у контрольних (+ S) рослин на 12–тий день росту. Встановлено, що дефіцит P, N або S не спричиняє розвиток AP як у гіподермісі з ендодермісом, так і у головному корені (Siyiannis et al. 2012), що доводить той факт, що трофічна AP адвентивних коренів за умови нестачі поживних речовин забезпечує не лише перенесення кисню зі стебла до кореня, але також знижує рівень дихання сегментів кореня і націлена на мобілізацію поживних речовини для інших цілей (Postma and Lynch 2011; Siyiannis et al. 2012; York et al. 2013). Серед клітин коренів Z. *mays*, які прилягали до порожнин аеренхіми, відмічали різний ступінь руйнації, наприклад, від незначних пошкоджень до розриву клітинної стінки і майже повного руйнування (рис. 6.11).



Рис. 6.11. Зруйновані клітини меристеми адвентивного кореня *Zea mays* у процесі формування аеренхіми за умов нестачі сірки: ендоплазматичні (а) та кортикальні мікротрубочки (b). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 10 мкм

Деякі автори припускають, що утворення АР у коренях при дефіциті поживних речовин є свого роду адаптацією до зменшення метаболічних потреб коренів, внаслідок чого забезпечується ширша розвідка ґрунту і пошук мікроелементів (Hu et al. 2014). Тому трофічна аеренхіма впливає на використання ресурсів коренем (York et al. 2013).

Отже, нестача поживних елементів/гіпоксія призводять до утворення лізигенної АР в коренях кукурудзи шляхом ПКЗ (Hara-Nishimura et al. 2005;

Bouranis et al. 2007; Fagerstedt 2010; Van Doorn 2011), усі процеси якої розвиваються послідовно. Припускається, що при активації початкових процесів ПКЗ відбувається зниження рівня дихання мітохондрій і початок анаеробного метаболізму, під час якого збільшується рівень НАДН та кількість активних форм кисню (АФК), що, у цілому, призводить до загального зниження цитозольного рН (Bouranis et al. 2007).

У неушкоджених клітинах кори кореня – S– рослин на 6–тий день росту виявили присутність аніонів супероксиду та пероксиду водню (Bouranis et al. 2006, 2007), тоді як на 12–тий день активні форми кисню відмічали у стінках клітин ендодермісу, гіподермісу і епідермісу. На 12–тий день росту АФК виявлялися також у дегенеруючих клітинах середини кори кореня +S-рослин (Bouranis et al. 2003, 2006). Відомо, що АФК з'являються, як правило, у ЦМ але також можуть з'являтися позаклітинно в апопласті в результаті ферментативної діяльності НАДФН–залежної оксидази (Neill et al. 2002).

Часто, у клітинах в області аеренхімних порожнин на рівні меристеми і зони розтягу коренів *Z. mays*, організація кМТ ставала невпорядкованою і окремі МТ відхилялися від поперечного розташування (рис. 6.12 b).



Рис. 6.12. Організація кортикальних (b) та ендоплазматичних мікротрубочок у клітинах адвентивних коренів *Zea mays* у нормі (+ S) (a) та в процесі клітинної загибелі (b, c) (– S). Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 5, 10 мкм

Часто кортикальні МТ мали хаотичний вигляд, іноді спостерігали фрагментовані мікротрубочки (рис. 6.12 b; 6.13 а).



Рис. 6.13. Організація кортикальних (а) та ендоплазматичних (b) мікротрубочок при дефіциті сірки у клітинах кори на рівні меристеми коренів *Zea mays*. Імуноцитохімія на тубулін. Масштаб 5 мкм

При цьому ендоплазматичні мікротрубочки зберігали свою характерну будову, охоплювали ядро і у вигляді поодиноких променів відходили від навколоядерної області до периферії клітин (рис. 6.12 с; 6.13 b). Оскільки на різних етапах розвитку ПКЗ ми відмічали різний ступінь руйнації МТ, припускаємо, що кортикальні та ендоплазматичні МТ беруть участь у різних за часом етапах клітинної загибелі. Це твердження є результатом дослідження організації кМТ та еМТ у одних і тих саме клітинах, які зазнають ПКЗ, або знаходяться в області, прилеглій до порожнин АР. Згідно спостережень, дезорганізація та фрагментація кМТ починається вже на початкових етапах ПКЗ, і цьому процесу передує ацидофікація цитоплазми внаслідок розвитку АФК сигналінгу. Руйнування кортикальної мережі МТ позначається на зниженні жорсткості каркасу клітини, яку забезпечував цитоскелет. Порушення кМТ, у свою чергу, призводять до інвагінацій цитоплазматичної мембрани, що вважають маркером ПКЗ реакцій (Gunawardena et al. 2001 b).

Перебіг ПКЗ забезпечується активацією численних літичних ферментів, які руйнують органели клітини. Розрив тонопласту центральної вакуолі призводить до закислення цитоплазми, а гідролітичні ферменти завершують дезорганізацію залишків клітинних органел та ядра (Hara-Nishimura et al. 2005; Van Doorn and Woltering 2005). Згідно спостережень, останні етапи ПКЗ у кукурудзи характеризуються появою конденсованого хроматину, також відбувається охоплення органел, таких як мітохондрії та тіла Гольджі, мембранами ЕР, в результаті чого утворюються структури подібні до апоптозних тілець у ссавців (Gunawardena et al. 2001 a).

На цьому етапі лізису клітин зникали майже всі клітинні органели. Також, зазнавали руйнування ендоплазматичні мікротрубочки, оскільки їхні залишки знаходили у зруйнованих клітинах (рис. 6.13 b). Таким чином еМТ зберігалися у клітинах до останніх етапів ПКЗ. Слід відмітити, що реакції програмованної клітинної загибелі поширюються у шарах кори і певні запрограмовані клітини деградують, що призводить до утворення розлогої системи повітряних внутрішньокореневих порожнин. Однак, порожнини розповсюджуються лише на обмежену область кори і досі невідомим залишається механізм припинення ПКЗ, та що саме призводить до обмеження процесів клітинної загибелі лише певною областю кореня.

6.4. Організація актинових філаментів у клітинах коренів повітряно- водних рослин *A.plantago– aquatica* та *S.latifolium*

Вперше проведене дослідження актинового цитоскелету у клітинах кори коренів A. plantago–aquatica i S. latifolium на рівні меристеми показало, що A Φ характеризуються типовою для вищих рослин будовою, а саме, вони представлені щільною мережею окремих A Φ і їхніх пучків. Актин знаходять у оточенні ядер, органел та у безпосередньому оточенні ендомембран. Пучки A Φ різної щільності радіально простягаються від області навколо ядра до периферії клітини (рис. 6.14), де закріплюються на ЦМ (Шевченко та Кордюм 2012).



Рис. 6.14. Забарвлення актину у клітинах апікальної меристеми *Alisma plantago–aquatica* (a) та *Sium latifolium* (b); цитохімія на актин. Масштаб 10 мкм

Наші дослідження організації $A\Phi$ не виявили істотної різниці у їхньому розташуванні та щільності між клітинами кори коренів *A. plantago–aquatica* і *S. latifolium*. Також, не відмічали відмінностей просторової локалізації $A\Phi$ поміж клітин різних шарів кори у обох рослин. Існують повідомлення, що, наприклад, у коренях *Z.mays*, кількість F-актину більша у зовнішній корі (Baluška et al. 1997 b).

Для коренів *A. plantago–aquatica* характерний схизогенний тип аеренхіми при якому клітини кори не руйнуються а сусідні клітинні ряди розходяться. Мережа АФ у клітинах рядів, які розходяться, не зазнає суттєвого руйнування (рис. 6.15 а).

У коренях *S. latifolium* часто цілісність ряду руйнується, що призводить до «розірваного» вигляду порожнин на зрізах (рис. 6.1 b; 6.2). Загалом, через це корінь на поздовжніх зрізах має вигляд схожий з мереживом. При формуванні аеренхімних порожнин лізигенного типу у клітинах коренів *S. latifolium* АФ руйнуються поступово, разом із клітиною. Зазвичай у клітинах, які руйнуються, АФ виглядають невпорядкованими, рештки зруйнованих АФ утворюють скупчення по всьому периметру (рис. 6.15 b).



Рис. 6.15. Мікрофіламенти при розходженні клітинних рядів у процесі формування аеренхімних порожнин меристеми коренів *Alisma plantago–aquatica* (a) та *Sium latifolium* (b); цитохімія на актин. Масштаб 10 мкм

Збереження організації актинових філаментів дозволяє цитоскелету забезпечувати клітинний метаболізм, позиціонування органел, внутрішньоклітинний транспорт та екзоцитоз, що, у цілому, сприяє росту клітин та трофіці кореня (Baluška et al. 1997 а). Слід додати, що як у *A.plantago–aquatica*, так і у *S.latifolium*, клітини центральної зони розтягу кореня містять більшу кількість вакуоль. Через це усі інші органели зміщуються до периферії клітини. Актинові філаменти утворюють пучки та щільні скупчення по краям клітин, окремі філаменти через посилену вакуолізацію важко розрізнити. Слід зазначити, що для мережі А Φ характерне руйнування або зміна конформації (утворення конгломератів) при інших видах програмованної клітинної загибелі, як, наприклад, точкові скупчення конгломератів з актину, які утворюються при розвитку реакції самонесуміності пилку у *Papaver rhoeas* (Snowman et al. 2002; Thomas et al. 2003).

6.4.1. Перекисне окиснення ліпідів у клітинах коренів A.plantagoaquatica, S.latifolium та S.sisaroideum

У суходільних та повітряно-водних генотипах рослин *A.plantago–aquatica*, а також у *S.latifolium* та *S.sisaroideum* досліжували перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), як окиснювального мембранного процесу, розвиток якого може призводити до реорганізації актинових філаментів (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Вміст ТБК-активних продуктів у коренях Alisma plantago-aquatica, Sium latifolium та Sium sisaroideum

Вид рослин	Концентрація ТБК-ак-	
	тивних продуктів, µМ	
A. plantago-aquatica (пові-		
тряно-водні)	$0,0032 \pm 0,001$	
A. plantago-aquatica (cy-		
ходільні)	$0,075 \pm 0,008$	
S. latifolium (повітряно-		
водні)	$0,0023 \pm 0,001$	
S. sisaroideum (суходільні)	$0,0487 \pm 0,002$	

Як відомо, в результаті ПОЛ цитоплазматичної мембран клітин збільшується кількість вторинних окиснених продуктів, що може порушувати організацію мембрани і вбудованих у мембрану білків та впливати на з'єднання цитоскелету, зокрема, АФ із мембранними білками. Перекисне окиснення ліпідів вважають загальною ознакою оксидативних процесів, що може бути індикатором стресових реакцій у клітині. Інтенсивність ПОЛ досліджували по кількості малонового диальдегіду, одного із продуктів окиснення, який переважає серед активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК–активних продуктів).

Експерименти виявили підвищенний рівень ТБК-активних продуктів (маркер реактивності форм кисню) у наземних рослин A. plantago-aquatica та S. sisaroideum (наземна форма S.latifolium) у порівняно із повітряно-водними (табл. 6.3). Таку ж саму закономірність щодо концентрації ТБК-продуктів у коренях та листках суходільних і повітряно-водних форм рослин відзначали для A. plantago-aquatica і інші дослідники (Kordyum et al. 2003). Слід зазачити, що продукування активних форм кисню (АФК), які і викликають це окиснення, є критичним для розвитку тканин, особливо при утворенні аеренхіми, оскільки АФК виступають в якості вторинного посередника у розвитку клітинної загибелі (Foyer and Noctor 2005). У зв'язку з цим логічно передбачали збільшення кількості активних форм кисню саме у повітряноводних рослинах S. latifolium та A. plantago-aquatica. Інші автори також відмічають підвищення концентрації АФК при індукції утворення штучної аеренхіми у аеренхімних секторах кореня Z. mays порівняно із неаеренхімними секторами (Bouranis et al. 2006). Виявлено, що різниця АФК між наземними та повітряно-водними рослинами A. plantago-aquatica зумовлена різними фазами онтогенезу цих рослин. Так, стадія бутонізації повітряноводної рослини A. plantago-aquatica співпадає у часі із фазою плодоношення її наземної форми. Оскільки, наземні рослини частухи випереджають за розвитком повітряно-водні, не виключено, що для різних стадій онтогенезу даних рослин характерна різна кількість АФК.

6.4.2. Дослідження ступеня пошкодження ДНК у коренях Sium latifolium та Sium sisaroideum

У наших експериментах ядерна ДНК, екстрагована із апексів коренів повітряно-водних рослин *S. latifolium* та наземних *S. sisaroideum*, не мігрувала у агарозному гелі в процесі електрофорезу (рис. 6.16 a, b).



Рис. 6.16. Електрофореграма ДНК: Sium lalifolium та Sium sisaroideum – повітряно-водні та наземні рослини Alisma plantago–aquatica (c, d)

Це свідчить про те, що ДНК досліджуваних видів не була фрагментованою, що є характерною ознакою процесів програмованної загибелі. Те ж саме було характерним для ДНК коренів повітряно-водних рослин та суходільних рослин *A. plantago–aquatica* (рис. 6.16 с, d), у яких, як відомо, не відбувається лізису та редукції клітин при формуванні у коренях аеренхіми схизогенного типу.

ДНК коренів рослин відображала слабкі сліди деградації, однакові для обох видів роду *Sium* та *Alisma*. Оскільки електрофорез не показав фрагментації ДНК, це може означати, що такий етап як фрагментація ядра не характерний для процесу редукції клітин, який відбувається у клітинах коренів *S. latifolium*. Деградація вмісту клітин і ядерного матеріалу у даного виду, ймовірно, відбувається шляхом лізису або аутофагії, через що не вдається виявити ні частини ядра мікроскопічно, ні деградовану ДНК молекулярними методами (Shevchenko et al. 2016).

Взагалі, у *S. latifolium* відмічають досить унікальну ситуацію із руйнуванням ядра. Хоча РК, завдяки яким формуються порожнини аеренхіми завжди безядерні, ми не спостерігали на послідовних зрізах проміжних етапів елімінації ядра – зміни форми або його фрагментації, що вважається одними з явних ознак програмованної загибелі клітин у ссавців і деяких рослин (Gladish

et al. 2006). Відсутність фрагментації ядер відмічали також при формуванні індукованної аеренхіми у таких рослин як O. sativa, Z. mays i P. sativum (Bouranis et al. 2006; Gladish et al. 2006). Однак, у S. latifolium в ядрах клітин ранньої меристеми зустрічали хроматин різного ступеня конденсації, що ϵ типовим для ПКЗ ссавців, але також зустрічається і в клітинах рослин (Evans 2003). Іншою ознакою ПКЗ є розрив ДНК на характерні олігомерні фрагменти 300-50 kb, 180-200 bp (Gavrieli et al. 1992), поява яких завжди співпадає з конденсацією хроматину на периферії ядра. Фрагментацію ДНК не відмічали і у рису, у якого ядра зберігаються до останніх стадій загибелі клітин (Kawai et al. 1998). Тим не менше, відсутність ядер в деградуючих клітинах рослин S. latifolium все ж таки свідчить про руйнування ядерного матеріалу. Безядерні клітини при утворенні аеренхіми відмічають і інші автори, наприклад при розвитку лізигенної аеренхіми у дикоростучого Sagittaria lancifolia (Schussler and Longstreth 2000). У цього виду ядерний матеріал зникав шляхом аутофагії, при якій ядра оточували специфічні вакуолі. Деякі автори взагалі вважають, що ПКЗ у рослин развивається саме як аутофагія (Bozhkov and Jansson 2007). У S. latifolium зрідка спостерігали захоплення ядер вакуолями, але, скоріше за все, це лише один з етапів формування центральної вакуолі в процесі природнього дифференціювання клітин (Kordyum et al. 2017). Не виключено, процес елімінації ядер у S. latifolium також відбувається надзвичайно шо швидко і його важко визначити стандартними цитологічними методиками. Ядра у S. latifolium можуть зникати і в результаті аутолізису, в процесі якого не задіяні специфічні вакуолі, а відбувається поступова деградація усіх органел. В цілому ж, і аутолізис і аутофагію вважають специфічним типом ПКЗ для рослин (Liu and Bassham 2012) та припускають, що обидва ці процеси можуть відбуватися сумісно, як наприклад, при загибелі клітини-суспензора зародка (Kabbage et al. 2013).

Проведене дослідження організації елементів цитоскелету *A. plantagoaquatica* та *S. latifolium* довели типову будову цитоскелету повітряно–водних та наземних рослин. Вказані види не характеризувалися особливостями організації МТ та $A\Phi$ а мали типову організацію мережі кортикальних мікротрубочок та актинових філаментів. Для обох видів характерний розвиток аеренхімних порожнин різного типу – із руйнуванням клітин кори (лізигенна AP y *S. latifolium*) та збереженням цілісності та трофіки клітинних рядів (схизогенна у *A. plantago–aquatica*). У обох видів при формуванні аеренхіми змінювалося просторове розташування МТ саме у тих клітинах, які безпосередньо прилягали до аеренхімних порожнин. Слід зазначити, що у рослин *S. latifolium* спостерігали аеренхіму змішаного типу – схизогенну AP сотового типу та лізигенну AP пакетного типу, наявність якої є свідоцтвом пластичності виду у пристосуванні до змінних умов довкілля.

Визначено, що порушення організації кортикальних МТ є первинним етапом процесів програмованної клітинної загибелі (ПКЗ), які відбуваються при формуванні лізигенної АР внаслідок гіпоксії та/або нестачі сірки у поживному середовищі. Для первинних етапів розвитку цього процесу характерне руйнування мережі кМТ, що призводить до втрати жорсткості послідуючої інвагінації кортикального цитоскелету та появи цитоплазматичної мембрани і, як кінцевий результат, втрати форми клітин. Водночас, ендоплазматичні МТ зберігаються у клітинах до кінцевих етапів ПКЗ та піддаються лізису разом із рештками клітинних органел на останніх етапах редукції клітин. Ймовірно, при цьому еМТ разом із АФ забезпечують екзоцитоз літичних ферментів на первинних етапах ПКЗ для підтримання трофіки усього кореня.

У обох видів не виявили видимих ознак початкового руйнування мережі актинового цитоскелету. Зміни мережі А Φ досліджували опосередковано, вивчаючи рівень окиснення цитоплазматичної мембрани, білки якої, як відомо є місцем прикріплення А Φ . У порівнянні із наземними формами для повітряно– водних форм *S. latifolium* на фоні меншого рівня окиснення ліпідів цитоплазматичної мембрани, була характерною динамічніша мережа А Φ , яка, ймовірно, необхідна для екзоцитозу у процесі формування АР лізигенного типу. Динамічні АФ у коренях повітряно–водних рослин – одна із необхідних складових розвитку аеренхіми.

У процесі розвитку конститутивної аеренхіми схизогенного типу у рлслин *A. plantago-aquatica* кМТ частково втрачають свою поперечну орієнтацію, стають косими та невпорядкованими. Дезорієнтація МТ також призводить до порушення організації клітинної стінки, яка від тиску клітин сусідніх рядів у процесі росту стає хвилястою. Це послаблює міжклітинні зв'язки та сприяє розходженню клітинних рядів. При цьому еМТ та $A\Phi$ не зазнають помітного руйнування, клітини відокремлених рядів не втрачають своєї прямокутної форми, зберігають трофіку і не виключаються із архітектоніки кори кореня. Усі деталі участі цитоскелету у процесах ПКЗ при розвитку аеренхіми у коренях досліджуваних повітряно-водних рослин обговорюються у розділі 7.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 6:

Шевченко ГВ. Мікротрубочки цитоскелету у формуванні індукованої аеренхіми адвентивних коренів *Zea mays* (Poaceae). Укр бот журн. 2020; 77(3): 225–231.

<u>Shevchenko GV</u>, Brykov VA, Ivanenko GF. Specific features of root aerenchyma formation in *Sium latifoliun* L. (Apiaceae). Cytol Genetics. 2016; 50: 293-299.

Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Організація мікрофіламентів цитоскелета в коренях повітряно- водних рослин *Sium latifolium* (APIACEAE) та *Alisma platago-aquatica* (ALISMATACEAE) у процесі формування аеренхіми. Укр бот журн. 2016; 73 (2): 185-193.

Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. Тубуліновий цитоскелет у клітинах кореневих апексів повітряно-водних рослин *Alisma plantago-aquatica* L. (*Alismataceae*) та *Sium latifolium* L. (*Apiaceae*). Укр бот журн. 2012; 69 (4): 568-579.

Thomas S, Osman K, de Graaf BHJ, <u>Shevchenko G</u>, Wheeler M, Franklin Ch, Franklin-Tong V. Investigating mechanisms involved in the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 2003; 358: 1033-1036. Q1

Snowman BN, Kovar DR, <u>Shevchenko G</u>, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. Signal -mediated depolimerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. The Plant Cell. 2002; 14 (10): 2613-2626. Q1

Шевченко ГВ. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів. 2гий з'їзд Українського Товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ. с. 224.

Шевченко ГВ, Овруцька II. Формування бічних коренів у різних екотипів веху широколистого (*Sium latifolium*) як прояв пластичності розвитку рослин. XII з'їзд Українського ботанічного товариства, 2006, 15-18 травня, Одеса. с. 517.

<u>Шевченко ГВ.</u> Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

7.1. Альтернативна гравічутливість у коренях та сприйняття модельованої мікрогравітації

Відомо, що у рослин реагувати на зміну сили тяжіння можуть не лише спеціалізовані клітини (статоцити). Існують докази існування додаткового вторинного механізму гравічутливості, який, як вважають, не залежить від осідання крохмальних статолітів та відбувається поза межами кореневого чохлика, ймовірніше за все, у дистальній зоні розтягу кореня. Експерименти з пристроєм ROTATO, який складається з унікальної автоматизованої камери і моторизованої платформи, дозволили вичленити гравітаційну відповідь і проаналізувати гравітропічну реакцію мутантів pgm Arabidopsis по фосфоглюкомутазі (phosphoglucomutase-pgm) (Wolverton et al. 2011). Пристрій ROTATO утримує попередньо визначені ділянки коренів кукурудзи та Arabidopsis під специфічним кутом до гравітаційного вектора. При цьому у рослин дикого типу відмічають позитивний зв'язок між швидкістю згину кореня та постійним кутом, під яким тримають кінчик кореня; таким чином, чим більший кут нахилу, тим скоріше відбувається формування згину. На відміну від цього, мутанти рдт завжди реагують на гравістимулювання однаково повільно незалежно від вибраного кута нахилу (Wolverton et al. 2011), що свідчить про те, що тип гравісприйняття у мутантів рдт фундаментально відрізняється від дикого типу. Так, pgm мутант Arabidopsis, який є безкрохмальним, демонструє знижену гравітропічну реакцію в гіпокотилях і повільнішу гравіреакцію в коренях і стеблах (Kiss et al. 1997; Weise and Kiss 1999). Слід зазначити, що у мутанта pgm амілопласти майже не містять гранули крохмалю і не локалізуються у нижній частині клітин, як це спостерігається у дикого типу. Втім, мутант рдт при гравістимуляції зрештою переорієнтовує свій корінь донизу, а стебло вгору. І це відмічають також і при гіпергравітації. Дані дослідження вказують на те, що, хоча порушення амілопластів або осідання призводить ДО зменшення уповільнення гравітропічної реакції, крохмальні амілопласти все ще можуть викликати повну гравітропічну відповідь, коли вони примусово рухаються в напрямку дії сили тяжіння завдяки гіпергравітації. Тобто для того щоб мати певну масу і осідати на нижню сторону статоцитів в умовах 1 дамілопласти повинні містити крохмаль, але наявність крохмалю не важлива для гравічутливості (Morita 2010). Ці спостереження також припускають, що за відсутності осідання амілопластів існує вторинний механізм, здатний спрямовувати корінь донизу. Проте інші дослідники виявили, що амілопласти мутантів рдт все ж таки містять деяку кількість крохмалю і, можливо, могли б відповідати на гравітацію використовуючи класичний шлях, хоча і в надзвичайно послабленому виді. Крім того, в гравітаційностимульованому кореневому чохлику мутанта *pgm* не відмічали асиметричну експресію DR5::GFP, репортера, чутливого до ауксину. Він не проявлявся, хоча корінь зазнавав залишкової гравітропічної відповіді. Всі разом ці результати доводять існування принаймні двох гравітропічних шляхів у корені: шляху, залежного від диференційного розподілу ауксину, спричиненого седиментацією статолітів і іншого шляху, який, як вважається, зумовлений відмінними від седиментації механізмами, і до якого не залучена асиметрична експресія DR5::GFP (Wolverton et al. 2000, 2002, 2011).

Інші експерименти також показали, що при видалені кореневого чохлика корінь реагує на силу тяжіння дуже повільно (Mancuso et al. 2006). Залишкова гравітаційна відповідь може бути пов'язана з відростанням нового кореневого чохлика з клітинами колумели. У експериментах на гравітаційне стимулювання на згин інтактних коренів не впливав актин – дестабілізуючий агент, і у коренях з видаленим чохликом гравізгин формувався скоріше. Ці спостереження дозволяють припустити, що поза кореневим чохликом є інший сайт сприйняття гравітації, і що ця чутливість залежить від актину по-іншому, ніж у колумелі. Оскільки клітини кореня поза чохликом не містять седиментуючих амілопластів, їхній механізм відчуття гравітації повинен відрізнятися від крохмально–статолітної моделі. Цікаво відзначити, що дестабілізація актину підсилює гравітаційну відповідь інтактних коренів *Arabidopsis*, як це спостерігали і в коренях кукурудзи із видаленим КЧ (Staves et al. 1997 a; Hou et al. 2003; Mancuso et al. 2006).

Припускають, що, окрім спеціалізованих клітин, сприйняття гравітації може відбуватися і в інших типах клітин (Кордюм та Шевченко 2003; Hoson et al. 2005). Припускають, що 20 % гравітаційної відповіді надходить з дистальної зони розтягу, а не з кінчика кореня (Wolverton et al. 2002). Дослідження з молекулярної біології теж показали, що неспеціалізовані рослинні клітини можуть відчувати зміни гравітаційного вектора, про що свідчать зміни в експресії генів (Paul et al. 2012). Так, Manzano та інші (2012) використовували діамагнітну левітацію для стимулювання ефектів зниженого рівня гравітації у рослин в наземних дослідженнях. Для імітування використовували високоградієнтне магнітне поле, яке мікрогравітації створювало левітацію для культури калусу А. thaliana in vitro. У розробленій системі було можливо також створювати середовище із зменшеним або підсиленим рівнем сили тяжіння. Для вивчення загальної експресії генів культивованих клітин під впливом як зниженої гравітації, так і гіпергравітації після впливу діамагнітної левітації використовували microarray аналіз експресії генів. Даний тип аналізу базувався на кластеризації аналогічно експресованих генів для виявлення у глобальному масштабі основних реакцій, які не виявляються за допомогою індивідуальних методів генної експресії. В результаті була встановлена слабка, але послідовна реакція всього геному на знижений рівень гравітації 0,1 g, і ця реакція була протилежною реакції на гіпергравітацію. Увесь транскрипційний статус геномів зразків під дією 0,1 g був найбільше схожий із зразками при дії мікрогравітації порівняно із стаціонарними 1 д зразками. Типи генів, які зазнавали впливу як мікро-д, так і 0,1 g, включали категорії генів, експресованих у клітинній стінці та гени цитоскелету (Manzano et al. 2012). Вищезгадане свідчить про можливість

існування гравічутливості у неспеціалізованих клітинах. Яким чином може відчуватися гравічутливість поза спеціалізованими клітинами поки що невідомо. Встановлено також, що ті клітини рослин, які не є спеціалізованими для сприйняття гравітації (позбавлені статолітів), можуть мати різну дозо–залежну реакцію на гравітацію у порівнянні із спеціалізованими клітинами (статоцити) (Wolverton et al. 2002).

Вважають, що відчувати силу тяжіння клітина може за допомогою гідростатичного тиску протопласта на клітинну стінку (Wayne at al. 1992). Припускають, що механізм відчуття гравітації без статолітів полягає у незначному зсуві протопласту *Chara* під час гравітаційної стимуляції, який створює силу, що може спричинити деформацію в з'єднаннях клітини у позаклітинному матриксі. Цей процес відчувається механочутливими каналами або через інший невизначений механізм. Чутливість молекулярного апарату, що складається з механочутливих каналів та цитоскелету, буде достатньою для виявлення деформації з'єднань клітина – позаклітинний матрикс. Для неспеціалізованих клітин відчуття гравітації є відчуттям механічних стимулів, оскільки сприйняття сили тяжіння в неспеціалізованих клітинах може відбуватися через розташовані на плазматичній мембрані рецептори, які є механочутливими іонними каналами. Такий тип механочутливості можна порівняти із моделлю гравітаційного тиску, альтернативним механізмом гравітропізму, який, як було показано, діє в міжвузлових клітинах зеленої водорості *Chara*, а також функціонує у коренях вищих рослин (клітини дистальної зони розтягу кореня) (Staves et al. 1997 a). Згідно концепції цієї моделі весь протопласт клітини являє собою гравітаційний рецептор, оскільки загальна вага протопласта діє на його клітинну стінку. Це призводить до диференціальної напруженості і стиснення між плазматичною мембраною і клітинною стінкою у верхній і нижній частині клітини. При цьому активуються механочутливі іонні канали, розташовані в цих положеннях, які визнані як ініціатори клітинного механізму гравісприйняття (Hoson et al. 2005). Отримане в результаті відкриття механочутливих каналів підвищення концентрації цитозольного Са²⁺ у кінцевому випадку викличе видимі зміни полярності руху цитоплазми. Таке припущення підтверджують експерименти на гравістимульованих коренях рису, що піддаються впливу середовища високої щільності (Staves et al. 1997 b). Сигнал від гравітації, що відчувається таким чином, у подальшому передається для генерування клітинної відповіді. На відміну від гравітропізму, трансдукція сигналу при гравісприйнятті не зачіпає різних тканин або органів рослини, а замість цього є внутрішньоклітинною. Одним із перших кроків трансдукції є переорієнтація кортикальних мікротрубочок, які відповідають за структурну стабільність цитоплазми і підтримують функціонування клітинної стінки (Hoson et al. 2010). Ми припускаємо, що саме такий механізм гравісприйняття діє і у клітинах зони розтягу кореня рослин при кліностатуванні, яке змінює полярність клітини і, у цілому, викликає перебудову кортикального континууму клітинна стінка – мембрана – цитоскелет, спрямовану на адаптацію росту до створених умов модельованої мікрогравітації.

Оскільки фізіологічний між існує зв'язок цитоплазматичною кортикальними мікротрубочками i клітинною мембраною, стінкою, трансдукція сигналу призводить до зміни жорсткості клітинної стінки. Ця зміна модулюється величиною вектора тяжіння, оскільки в умовах гіпергравітації жорсткість клітинної стінки збільшується, тоді як в умовах мікрогравітації мутанти по тубуліну, які демонструють низьку здатність до гравітаційного опору і невпорядкований тип росту в умовах Землі, відновлюються і можуть рости і розвиватися нормально. Паралельно з цим, сигнал досягає ядра клітини і індукує експресію генів, які впливають на структуру і функцію різних мембранних компонентів (Hoson et al. 2005, 2010). Таким основні елементи цитоскелету, такі як кортикальні чином, мікротрубочки і актинові філаменти, здатні контролювати активність механочутливих каналів цитоплазматичної мембрани і опосередковувати трансдукцію Са²⁺ сигналінгу при кліностатуванні.

7.2. Дистальна зона розтягу кореня – місце відчуття зміни механічного навантаження при кліностатуванні

Дистальна зона розтягу (зона видовження або перехідна зона) кореня (ДЗР) (рис.7.1) – це область між меристемою і центральною зоною розтягу, у якій ріст клітин змінюється з ізодіаметричного на анізодіаметричий (Baluška et al. 1997 b).



Рис. 7.1. Досліджувані ростові зони кореня вищих рослин

Визначено, що клітини ДЗР реагують на фізичний дотик и підвищення рівня позаклітинного кальцію (Ishikawa and Evans 1992), гравітацію, вплив ауксину та солей алюмінію (Kollmeier et al. 2000), а також водний режим та сольовий стрес (Wu and Cosgrove 2000). Вважають, що саме така чутливість дозволяє апексу кореня ефективно моніторити навколишнє середовище у пошуку поживних речовин і забезпечувати стабільний ріст (Baluška et al. 1997 b, 2001), завдяки чому ДЗР контролює ріст усього кореня. Дані отримані для коренів *Arabidopsis* підтверджують той факт, що приріст кореня визначається швидкістю з якою апікальні райони кореня постачають у ДЗР нові клітини (Beemster and Baskin 2000). Таким чином, видовження кореня може
прискорюватися або затримуватися у залежності від впливу довкілля на ДЗР (Baluška et al. 2001).

Дистальна зона розтягу кореня є унікальним місцем з точки зору сприйняття та реагування на низку (зовнішніх) факторів. Локальне застосування позаклітинного кальцію гальмує ріст клітин саме у межах ДЗР, але виявляє лише слабку реакцію в зоні швидкого видовження (Ishikawa and Evans 1993). Більше того, кальцієві хвилі поширювались через ДЗР кореневих апексів *Arabidopsis* (Fasano et al. 2002). Окрім того, ДЗР – єдина зона кореня, якій притаманна рухливість (згинання у відповідь на дію ряду чинників). Все це робить ДЗР своєрідним динамічним резервуаром розвинених пластичних клітин, що дозволяє кореню регулювати як швидкість, так і напрямок росту кореня відповідно до зміни навколишнього середовища.

Оскільки ріст клітин значною мірою залежить від функціонування цитоскелету, у даній роботі досліджували будову мережі мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах кори коренів *A.thaliana*, трансформованих конструкціями GFP–MAP4 і GFP–ABD2, які, відповідно, є маркерами мікротрубочок (Marc et al. 1998) і мікрофіламентів (Wang et al. 2008). Використання трансформованих рослин дозволяє спостерігати структурну організацію МТ і AФ в умовах кліностатування *in vivo* (Kordyum et al. 2005; Kalinina et al. 2008; Шевченко та Кордюм 2012). Поряд з цим в експериментах застосовували обробку коренів по черзі інгібітором полімеризації мікротрубочок оризаліном (OR) та дестабілізатором та інгібітором полімеризації АФ цитохалазином D (CD). Також досліджували вплив кліностатування на корені оброблених і необроблених рослин. Вимірювали приріст головного кореня та параметри росту (довжину та ширину клітин) у ДЗР коренів.

У досліджуваних проростках *Arabidopsis* екотипу *Columbia 0* меристема простягається до 140-200 мкм від верхівки кореня у проксимальному напрямку кореня (рис. 7.1). Слід відмітити, що розмір меристеми змінюється залежно від факторів, що регулюють розвиток рослин (Hauser and Bauer 2001). Під час росту рослин збільшення швидкості росту коренів супроводжується

розширенням апікальної меристеми (Beemster and Baskin 1998). У дорослих рослин подальша зона росту, довжиною приблизно 320 мкм, відповідає перехідній зоні або ДЗР (рис. 7.1). У коренях екотипу Columbia 0 (при 23° С, світло/темрява 16 год/8год, вирощеному на агарозі впродовж 5 днів) ДЗР займає відстань приблизно від 100 до 200 мкм (до 520 мкм у дорослих рослин) від верхівки кореня. У ДЗР коренів швидкість росту дуже низька, і трансформація від раннього пост-мітотичного до розтягування клітин займає багато годин. Визначено, що впродовж 10 годин збільшення довжини клітин є незначним і сягає лише 9 мкм на відстані 280 мкм від верхівки кореня, хоча ширина клітин збільшується з 14 до 16 мм. У дистальних частинах ДЗР клітини діляться мало, хоча більшість з них зберігає компетенцію для поділу, що виявляється завдяки експресії кінази cdc2, яка регулює клітинний цикл (Verbelen et al. 2006). У проксимальній частині ДЗР клітини розвивають здатність до початку швидкого розтягу. Цитологічні та анатомічні особливості дозволяють легко розпізнати цю зону. Так, ядра у клітинах розташовані так само, як і в меристемі, по центру. Присутні невеликі вакуолі, а форма клітин наближена до ізодіаметричної, оскільки довжина клітин незначно перевищує ширину.

Клітини кори є придатними маркерами для дослідження подальшого збільшення ширини клітин, що виникає у ДЗР. Кінцева ширина клітин кори *Arabidopsis* досягається лише на проксимальному кінці ДЗР, приблизно на відстані 520 мкм від верхівки кореня. Це повністю відповідає ситуації з кореневими апексами у *Z. mays* і може слугувати ще однією ознакою межі ДЗР (Baluška et al. 2001). Деякі автори визначили межу між повільним цитоплазматичним ростом та швидким подовженням клітин як точку, де відносна швидкість стихійного росту досягає 30% від його максимального значення (Wolverton et al. 2000). Таким чином, у ДЗР верхівки кореня розширення клітин відбувається повільно і не лише в поздовжньому (осьовому), але, і певною мірою, у поперечному напрямку. На базальній межі ДЗР у *Arabidopsis* клітини різко вступають у фазу швидкого розтягу і припиняють розширюватися, точно так, як це відбувається у апексах коренів Z. mays. Початок швидкого видовження клітин супроводжується вражаючими змінами структури та функції вакуоль та цитоскелету. У зоні швидкого видовження довжина клітин збільшується на 300% менше ніж за три години. У Arabidopsis швидке видовження клітин починається тоді, коли клітини залишають ДЗР і коли трихобласти ініціюють вирости кореневих волосків. Наступною після ДЗР є зона дуже швидкого розтягу клітин без розширення. Ядра у клітинах цієї зони прилягають до бічних клітинних стінок через дуже швидке утворення великих центральних вакуоль. Форма клітин витягнута, оскільки довжина перевищує ширину і швидко збільшується. Початок швидкого розтягу клітин відзначається також початком росту кореневих волосків. Зона видовження у зрілих рослин знаходиться на відстані приблизно від 520 до 850 мкм від верхівки кореня (рис. 7.1). У зоні диференціації або припинення росту клітини прогресивно сповільнюють своє видовження і, нарешті, зазнають лише незначного видовження до досягнення зрілої довжини. Існує певна мінливість швидкості розтягу, але весь процес завжди закінчується менше ніж за три години. Вздовж осі кореня кінець швидкого подовження клітин розташований приблизно на відстані 900 мкм від верхівки кореня. У нормальних умовах вирощування додаткове збільшення довжини клітин відбувається приблизно до 1500 мм від центра спокою (Le et al. 2004).

Слід додати, що диференціальний прохід клітин через протилежні сторони ДЗР дозволяє зростаючим кореневим апексам ініціювати свою кривизну, що закінчується розвитком кореневих тропізмів у відповідь на градієнти зовнішніх факторів, таких як гравітація, температура, вологість, солоність, доступність кисню, електричні поля та важкі метали (Baluška et al. 2001; Fasano et al. 2002; Wolverton et al. 2002). Клітини ДЗР також чутливі до механічних подразників (Ishikawa and Evans 1992).

Встановлено, що екзогенний ауксин гальмує ріст коренів, але індукує швидкий ріст клітин у ДЗР верхівки гравістимульованих коренів, внаслідок чого у таких коренях швидко формується гравізгин при гравістимуляції.

Припускають, що саме дистальна зона розтягу коренів відіграє ключову роль у адаптації до високого вмісту фітогормона ауксину (Bouchard et al. 2006; Schlicht et al. 2006). Це спостереження узгоджується із даними щодо верхівки кореня кукурудзи, де дистальна частина ДЗР також поглинає зовнішній ауксин найбільше. Відомо, що ауксинові потоки регулюються щонайменше п'ятьма PIN-білками, включаючи PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 та PIN7, специфічними для кореневого апексу (Blilou et al. 2005; Bouchard et al. 2006). Більше того, чотири з п'яти PIN-білків, які експресуються у кореневих апексах (PIN1, PIN2, PIN4 та PIN7), локалізуються полярно на периферії клітин, збагачених актином, переважно у дистальній зоні розтягу коренів (Blilou et al. 2005; Abas et al. 2006).

Оскільки майже всі процеси плазматичної мембрани, що досліджуються в дистальній зоні розтягу, мають коливальний характер, пропонується, що коливання, які генеруються на ЦМ переносяться до ядра за допомогою динамічного цитоскелету, який, у свою чергу, локалізує ядро у центрі та зв'язує його поверхню із ЦМ, що є важливим для передачі інформації (Baluška et al. 2004). Існує уявлення про те, що всі клітини ДЗР утворюють симпластичний домен. Така висока симпластична властивість має вирішальне значення для визначення топографії бічних коренів, і може бути актуальною також для синхронних коливань, характерних для цієї верхівкової зони кореня (Benitez-Alfonso et al. 2013).

Ми досліджували клітини ДЗР, оскільки саме у цій зоні формується гравізгин кореня при гравістимуляції і клітини цієї зони відображають альтернативну гравічутливість. Окрім того, дана зона кореня є чутливою до багатьох зовнішніх чинників.

Аналізуючи вплив кліностатування на клітинні параметри цікавим є спостереження збільшення довжини та ширини клітин у ДЗР кореня *Arabidopsis* при дії інгібіторів оризаліну та цитохалазину D. З цього виходить, що 1–D кліностатування є причиною реакції на зміну механічного тиску протопласта на кортикальний цитоскелет, ЦМ та клітинну стінку. Часткове

почергове руйнування обох елементів цитоскелету веде до зменшення жорсткості клітинної стінки і усе це разом із усередненим рівнем гравітаційного навантаження цілком вірогідно спричиняє збільшення клітинних параметрів, що є одним із доказів сумісної дії МТ та АФ у регуляції континууму КС–ЦМ – цитоскелет, а також доказом впливу механічного стресу на сторони клітини при даному типі кліностатування.

Слід зазначити, що застосування фармакологічного підходу виявило деякі протиріччя щодо дії інгібіторів, зокрема таксолу на кліностатовані рослини. Так кліностатування пригнічувало ріст коренів *B. vulgaris* і незначним чином посилювало ріст коренів *Z. mays.* Застосування таксолу при кліностатуванні призводило до протилежних результатів. Таку ж саму ситуацію ми відмічали і при дії інгібітора полімеризації актину – цитохалазину D. Це свідчить про залучення поряд із елементами цитоскелету багатьох інших факторів до регулювання росту коренів у стресових умовах. При цьому не виключено, що підсилення росту при сумісній дії стабілізатора актинових філаментів – цитохалазину D та кліностатування викликане активацією специфічного механізму протидії даному виду стресу.

Таким чином, наші результати довели чутливість цитоскелету клітин ДЗР коренів до зміни механічного навантаження на клітину, яке відбувається при одноосьовому кліностатуванні і може призводити як до зміни параметрів клітин ДЗР, так і темпів росту усього кореня. Доведена сумісна дія кортикальних мікротрубочок та актинових філаментів у цьому процесі. Проте, цитоскелет не є єдиним компонентом, який задіяний у регулюванні росту клітин в стресових умовах, що є багатостапним комплексним процесом і спричиняє розбіжності серед видів рослин щодо темпів росту при дії як кліностатування, так і інгібіторів елементів цитоскелету.

7.2.1. Механочутливість клітин рослин

Повільне обертання на кліностаті мінімізує спрямовуючий вплив гравітації і рівномірно розподіляє його (у випадку 1– D кліностатування здебільшого на латеральні сторони клітини) (рис.7.2).

Як відмічалося, це зменшує навантаження від протопласта, викликане тургором, на кортикальну область клітини і є причиною механічного стресу, зокрема, у клітинах дистальної зони розтягу кореня. У відповідь на даний вид стресу залучений цитоскелет, доказом чого може бути збільшення параметрів (довжини та ширини) клітин при одночасній дії кліностатування і дестабілізаторів мікротрубочок та актинових філаментів. Часткове руйнування циоскелету при цьому знижує жорсткість КС, чим сприяє прискоренню росту.

Слід зазначити, що механічні сили є розповсюдженими та фундаментальними силами природи і багато зовнішніх стресових сигналів можна звести до механічних.



Рис. 7.2. Механічний стрес у клітинах коренів: напрямок тургорного тиску на кортикальну область клітини у стаціонарному контролі (а) і при кліностатуванні (b)

Всі організми на Землі через власну вагу зазнають механічного стресу, проте молекулярні складові механічної реакції все ще далекі від розуміння. Так, для компенсації значного механічного стресу від сили гравітації, несучі конструкції рослин (деревні судини та волокна) розташовуються паралельно напряму механічної деформації. Такий самонавідний механізм дозволяє рослинам гнучко підлаштовувати свою архітектуру до механічного навантаження і з мінімальними витратами використовувати енергію та біоматеріал. Вважають, що мікротрубочки завдяки своїй відносній жорсткості у поєднанні з вродженою нелінійною динамікою преадаптовані виконувати функцію механосенсорів. При цьому вони разом з еластичними актиновими філаментами та анізотропною клітинною стінкою утворюють пружну систему, що дозволяє рослині відчувати геометрію та реагувати на механічні деформації у такий спосіб, який мінімізує навантаження. Мікротрубочки при цьому розглядають як елементи сенсорного вузла, який декодує сигнали, пов'язані зі стресом (Nick 2013).

У біомеханіці існує термін самонапруга (tensegrity) від tense «напруженість» та integrity «цілісності» (Robby 1996). Принцип самонапруги використовують мобільні клітини тварин (Ingber 2003), у яких АФ виконують роль пружних елементів, оскільки вони розтягуються і в той же час здатні передавати значні сили завдяки модулю Юнга (як це відбувається у шовку) (Gittes et al. 1993). Натомість, сила міцності передається мікротрубочками, які, як порожнисті циліндри, набагато жорсткіші і за механікою подібні до ніжних скляних волокон. Оскільки АФ у клітинах тварин пов'язані з позаклітинним матриксом за допомогою білків інтегринів, які підтримують риштування, то отримана напружена структура може зберігати форму навіть за динамічно мінливих змін мігруючих клітин. В таких клітинах рушійна сила на передньому краї залежить від збірки актину (Pollard and Borisy 2003), що призводить до локомотивного руху. До цієї сили існує і протидія, яка забезпечується сайтами адгезії, в яких актиновий цитоскелет за допомогою трансмембранних інтегринів тісно пов'язаний з позаклітинним матриксом. Принципово відмінна ситуація з рослинними клітинами, оскільки вони не рухливі і їхню форму підтримує клітина стінка, де подовжені несучі конструкції (мікрофібрили целюлози) вбудовані в аморфну матрицю (геміцелюлози, пектини, білки). У таких клітинах інтерфазний цитоскелет безпосередньо не потрібен для підтримки форми клітини, і тому він може виконувати додаткові функції. Принцип самонапруженості забезпечує максимальну механічну стабільність при мінімальному використанні ресурсів, і, крім того, він забезпечує безперервну адаптацію росту і розвитку до змін. Самонапружені структури безперервно перебудовуються і вирівнюються згідно напрямку полів стресу та напруги, встановлюючи мінімальний рівень потенційної енергії (стиснення деревини) (Funada 2008). Самонапруженість вимагає зворотного зв'язку між механічними силами та напругою та організацією цитоскелету. Таким чином, самонапружений цитоскелет може не тільки забезпечувати стабільність архітектури, але і брати участь у сприйнятті та передачі стресу і напруги.

Під час клітинного циклу мікротрубочки рослин динамічно реорганізуються у різні структури, які виконують різноманітні клітинні функції. У інтерфазі МТ утворюють паралельні пучки, орієнтовані перпендикулярно до осі переважного розширення клітин і при цьому кортикальні МТ контролюють напрямок розміщення целюлози та посилюють розширення клітини (Geitmann and Ortega 2009). Пошук механізму, який «підсилює» поздовжнє розширення через анізотропний розтяг клітинної стінки змусив Поля Гріна (Paul Green) у 1962 передбачити існування «мікротрубочок» ще до фактичного їхнього виявлення (Ledbetter and Porter 1963). Кортикальні МТ змінюють свою орієнтацію у відповідь на широкий спектр сигналів. Скероване мікротрубочками розміщення целюлози є основою універсального механізму налаштування морфогенезу рослин до навколишнього середовища (Nick 2012). При цьому вважають, що МТ виконують роль доріжок, що керують рухом двигунів, які тягнуть комплекси целюлозо–синтази через рідину

мембрани і залишають за собою кристалізовану целюлозу у вигляді мікрофібрил. Протягом останніх десятиліть класична «монорейкова» модель знову дістала підтримку завдяки виявленню центральної ролі кінезинів та асоційованих з МТ білків у побудові клітинної стінки (Cai and Cresti 2012). Так, показано, що целюлозо-синтаза з флуоресцентною міткою рухається по треках, створених прилеглими кМТ (Paredez et al. 2006). Більше того, виявлено, що білок CSI1, який взаємодіє з целюлозо-синтазою, може безпосередньо зв'язуватися і з кМТ (Li et al. 2012). Інші молекулярні компоненти комплексу «монорейкових» МТ були ідентифіковані за допомогою скринінгу зниженої механічної стійкості у A.thaliana. Так, у крихітних мутантів по структурі фібрил целюлози була особливо вражена текстура стін. У одного з цих мутантів – fragile fiber 2, з однаковими алелями до мутанту botero, був зміненим катанін, білок, який розщеплює МТ, що призводило до набряклості клітин і посилення бічного розширення (Burk and Ye 2002). У іншого мутанта - fragile fiber 1, мутував білок, пов'язаний з кінезином, що належить до KIF4 родини МТ моторів. Фенотип цього мутанту настійно доводив, що мотор FRA1/KIF4 є компонентом комплексу «монорейки» (Zhong et al. 2002). Також, існують чіткі докази впливу клітинної стінки на організацію кМТ і загалом, модель «монорейки» передбачає, що: 1) осадження целюлозних мікрофібрил залежать не тільки від МТ, але також від геометричного внеску вже існуючих мікрофібрил; 2) зв'язок між МТ і целюлозою є не одностороннім, а двостороннім, тобто орієнтацією і динаміка МТ залежать також і від клітинної стінки.

Мікротрубочки характеризуються сенсорними властивостями, що доведено дослідами із зростання напруги у місцях появи нових органів у процесі філотаксису (Green 1980). Так, пом'якшенням клітинної стінки білком експансином ініціювало появу примордіїв і першою подією при цьому була переорієнтація кМТ, які ставали перпендикулярними відносно МТ нестимульованих сусідніх клітин (Fleming et al. 1997). Різниця між орієнтацією МТ у сусідніх клітинах вирівнювалася у клітинах ДЗР (перехідної зони) коренів, де кМТ набували проміжної косої орієнтації. Поступова прогресуюча переорієнтація МТ поширювалася на кілька ярусів клітин. Таким чином, кМТ вирівнювалися у напрямку максимального механічного напруження між клітинами (Hamant et al. 2008). Переорієнтацію МТ відповідно до зміни напруги спостерігали також і інші у дослідженнях МТ при знятті шарів меристеми, що призводило до компенсаторного випинання верхівки кореня. Роль кМТ у цьому підтверджується задіяністю катаніну (Uyttewaal et al. 2012). Однак не тільки кМТ можуть реагувати на механічне навантаження, але і пучки мікротрубочок. Було продемонстровано, що нові клітинні пластинки у калусі, який зазнавав стиснення, також узгоджуються з вектором сили (Lintilhac and Vesecky 1984).

Механочутливість МТ також вже була продемонстрована за допомогою підлаштування поділів клітин паралельно вектору сили після легкого центрифугування (Wymer et al. 1996; Nick 2011). Архітектурна інтеграція дозволяє рослинам оптимізувати розташування несучих елементів у просторі таким чином, щоб вони забезпечували оптимальну механічну підтримку, але одночасно залучали мінімальну біомасу і були настільки легкими, наскільки це можливо. Це завдання вимагає просторової орієнтації всіх органів згідно гравітації і розвиток нових органів коригується щодо сили тяжіння (гравіморфоз). Щоб відчути напрямок сили тяжіння потрібна висока чутливість. Тоді як напрямок світла у фототропізмі відчувається шляхом вимірювання градієнту світла чутливим органом, різниця в гравітаційному полі між двома боками нахиленого рослинного органу, безумовно, є дуже слабкою для того, щоб викликати сприйняття. У зв'язку з цим припускають, що гравітація повинна відчуватися індивідуальними клітинами. Таким чином, максимальна енергія, доступна для стимуляції – потенційна енергія самої чутливої клітини. Якби вона не була зосереджена на малих площах, ця енергія ледве б перевищувала рівень теплового шуму. Отже, не виключено, що для сприйняття необхідне підсилення гравітропного сприйняття і МТ можуть виконувати у цьому потенційну роль. Про це свідчить блокування

гравітропізму антимікротрубочковими препаратами (в концентраціях, які не шкодять росту) в ризоїдах водорості *Chara*, а також у протонемі моху (Walker and Sack 1990) або колеоптилях *Z. mays* та *O. sativa* (Godbole 2000; Gutjahr and Nick 2006). Спостерігали також і протилежну реакцію кМТ. Так, зниження динаміки МТ внаслідок мутації (Nick et al. 1994) або обробки таксолом також призводить до сильного гальмування гравітропної відповіді (Godbole 2000; Gutjahr and Nick 2006).

Як відомо, МТ беруть участь у формуванні згину коренів у відповідь на дію сили тяжіння: на верхньому боці гравітропно стимульованого органу поперечні кМТ замінюються поздовжніми масивами, тоді як МТ залишаються поперечними на нижньому боці згину і, таким чином, підтримують ефективне видовження клітин (Himmelspach et al. 1999). Тому важливо розрізняти функцію «сприймання» МТ від їхньої ролі в наступних реакціях на гравітацію. Цього можна досягти за допомогою дозо-залежної серії відповідей на антитубулінові Шi сполуки. сполуки діють шляхом секвестрування тубулінових гетеродимерів, які інтегруються у конструкції МТ, що MT. усунення При низьких концентраціях призводить до таких антитубулінових агентів блокується гравітропне сприйняття, тоді як ріст (який контролюється, наприклад, здатністю реагувати на фототропний стимул) все ще триває (Gutjahr and Nick 2006). Більше того, латеральний транспорт ауксину, який передує формуванню блокується згину, також антимікротубулярними сполуками і таксолом – препаратом, який блокує їх розбирання і, таким чином, погіршує переорієнтацію (Godbole et al. 2000). У зв'язку з цим припускають існування специфічної субпопуляції МТ, що є високочутливою до антимікротубулярних сполук (що вказує на високий оборот цих МТ) і яка бере участь у сприйнятті механічних сил і може бути чітко розмежована з МТ, залученими до подальших реакцій росту. Така функція кМТ у механосенсориці сприяє архітектурній інтеграції, мінімізуючи механічну напругу, яка або виробляється виростанням нових органів (як у випадку філотаксису) або залежить від гравітації (гравітропізм та гравіморфоз). Аналогію можна провести із реакцією МТ на гіперосмотичний стрес: при ньому МТ спочатку зникають, але незабаром їх замінюють масивні пучки, які називали макротрубочками (Komis et al. 2002).

Таким чином, оскільки самонапружений цитоскелет пов'язаний з клітинною стінкою інтегративними білками – лінкерами, механічна напруга, що створюється целюлозними мікрофібрилами, може вирівнювати кМТ, тим самим закриваючи самоспрямований ланцюг між клітинною стінкою і цитоскелетом. Розширення клітин посилюється в напрямку, перпендикулярному орієнтації МТ і мікрофібрил, і результуючі сили генеруються паралельно з основною віссю деформації (Fischer and Schopfer 1998). Ці сили потім будуть діяти зворотно через цитоплазматичну мембрану на кМТ, які вирівнюються згідно цієї напруги. Оскільки окремі МТ взаємно змагаються за гетеродимери тубуліну, кількість мікрофібрил обмежена відповідно до кількості розеток целюлозо–синтази, і ця регуляторна схема повинна відповідати правилам реакційно–дифузійної системи і тому повинна бути здатною до самоорганізації.

Таким чином, дезорієнтація окремих МТ, яку спостерігали у нашій роботі при кліностатуванні, є реакцією на механічний стрес і свідчить про переорієнтацію кортикальної мережі МТ, спрямовану на пристосування (адаптацію) до зміни як положення клітини, так і зменшенного гравітаційного навантаження. Переорієнтації МТ сприяє також і стан клітинної стінки.

7.2.2. Біофізика росту рослинних клітин

Ріст рослинних клітин відбувається шляхом збільшення об'єму, що контролюється двома антагоністичними параметрами: тургорним тиском і жорсткістю клітинної стінки. Тургорний тиск (Р) відповідає гідростатичному тиску, який чинить цитоплазма на КС. Це є результатом різниці осмотичного потенціалу р між апопластом і симпластом (Schopfer 2006). У області нижче так званого порогового тиску текучості (плинності) (Y) клітинної стінки, тургорний тиск не призводить до пластичної деформації клітини (Cosgrove et al. 1993; Nick 2011), однак, за межами цього порогу може відбуватися ріст. Окрім асоційованих з мікротрубочками білків, на динаміку МТ впливає також і механічний стрес. Зокрема, компресійні сили викликають вкорочення мікротрубочок, тоді як сили розтягу сприяють їхньому видовженню (Janson and Dogterom 2004; Nick 2011).

Таким чином, в принципі, напрямок максимального натягу може надавати самоорганізації МТ певної орієнтації. Окрім того, дослідження мігруючих клітин тварин показали, що динаміка МТ залежить від жорсткості позаклітинного матриксу, при цьому м'якіший матрикс пов'язують з їхньою підвищеною динамікою (Myers et al. 2011). Припускають, що механічний вплив може забезпечувати рослинні клітини позиційним сигналом, який вирівнює мікрофібрили целюлози та генерує анізотропний ріст. Існує гіпотеза, що напруга може контролювати орієнтацію масивів МТ, завдяки чому відбувається орієнтоване осадження целюлози (Williamson 1990). Пізніше цю гіпотезу додатково протестували і встановили, що, наприклад, при центрифугуванні протопластів МТ переорієнтовуються паралельно вектору відцентрової сили. Така переорієнтація у подальшому впливала на ріст, коли максимальна сила натягу ставала в основному перпендикулярною до цієї осі у відновлених клітинах (Wymer et al. 1996). Ці дані переконливо свідчать про те, що мікротрубочки здатні переорієнтуватися у відповідь на механічний вплив целюлози. Удосконалення методів зображення та моделювання процесів у живих клітинах підтвердили цей висновок у клітинах рослин. За трансмембранними сенсорами далі по сигнальному шляху цілий ряд асоційованих з МТ білків може брати участь в їхній організації відповідно до спрямовуючого сигналу (Sedbrook and Kaloriti 2008; Buschmann et al. 2010). Наприклад, два асоційованих з мікротрубочки білки, MAP65 і CLASP, залучені до переорієнтації мікротрубочок, що призводить до периклінальних поділів у коренях Arabidopsis (Dhonukshe et al. 2012). Вважають, що CLASP

полегшує та стабілізує згин мікротрубочок по краям клітин (Ambrose et al. 2011). Самоорганізація МТ є важливою для просторової організації мікротрубочок у клітинах і це робить CLASP потенційною мішенню механотрансдукції, при якій мікротрубочки вирівнюються паралельно напрямку максимального напруження. Подібним чином регулятори динаміки мікротрубочок, наприклад, білки, які розривають мікротрубочки, можуть також контролюватися механічним впливом, для того, щоб збільшувалася кількість вільних мікротрубочок, здатних до самоорганізації відповідно до напрямків стресу (Uyttewaal et al. 2012)

Зображення трансмісійної електронної мікроскопії а також дані живих зображень продемонстрували, що мікротрубочки та актинові філаменти асоціюються і їхні організація і функціонування є взаємозалежними (Traas et al. 1987; Takesue and Shibaoka 1998; Collings et al. 2006; Sampathkumar et al. 2011). Acoціація та взаємодія елементів цитоскелету зберігаються у відповідь на механічний стрес – АФ переорієнтовуються по краям раньової поверхні, як це спостерігалося для кортикальних МТ (Goodbody and Lloyd 1990). Таким чином, актинові філаменти можуть сприяти реакції кортикальних мікротрубочок на механічний стрес (Nick 2011).

7.2.3. Механочутливі канали цитоплазматичної мембрани рослин

Для розуміння клітинних реакцій, викликаних механічними стимулами важливим є визначення молекулярних та біофізичних сенсорів які запускають реакції сприйняття та відповіді на зовнішні чинники. Відомо, що механочутливі іонні канали (МЧК) цитоплазматичної мембрани можуть реагувати на механічні стимули безпосередньо всередині ліпідного шару. Такі канали відкриваються, коли плазматична мембрана деформується або коли на канал діє певна сила (Kung 2005). Відомо, що вплив від механічного навантаження може передаватися за допомогою Ca²⁺ сигналінгу, оскільки Ca²⁺ є розповсюдженим клітинним регулятором великої кількості реакцій рослин, включаючи pict, розвиток та морфогенез (White and Broadley 2003; Hepler 2005; Dodd et al. 2010). Механочутливість у цьому випадку полягає у зміні конформації білка каналу, що дозволяє вихід/вхід іонів кальцію. МЧ канали, вперше виявлені методом patch-clamp у спеціалізованих сейсмонастичних листках Mimosa pudica та гігантських міжвузлових клітинах водорості Chara (Jaffe et al. 2002), опосередковують вхід кальцію (Knight et al. 1993). Наявність потоків Ca²⁺ підтверджує активація генів кальмодуліну у чутливого до дотику мутанта Arabidopsis (Braam and Davis 1990). МЧ кальцієві канали виявлені також в епідермальних клітинах Allium cepa (Ding and Pickard 1993). Один із механізмів гравічутливості полягає в тому, що для активації МЧ каналу потрібний позаклітинний матрикс і тубуліновий цитоскелет, тобто напруга в цитоскелеті активує МЧ канали (Tatsumi et al. 2014). Другий ступінь сигналінгу полягає у зміненій іонній композиції, яка викликає сигналінг. Слід пам'ятати, що механочутливість може передавати сигнали на значні відстані, тобто фактичне сприйняття відбувається не обов'язково на ділянці клітини, де діє механічний стимул. Окрім того, окрім філаментних білкових структур, до сигналінгу можуть долучатися ліпіди самої деформованої мембрани: під час механічного стресу вони можуть ставати доступнішими для дії ліпаз. Загалом вважають, що у рослин існують механізми, здатні відчувати самонапругу. Так званий континуум цитоскелет – цитоплазматична мембрана –клітинна стінка (Wyatt and Carpita 1993; Baluška et al. 2003) пов'язаний із сітчастою структурою плазматичної мембрани – ретикулумом плазмалеми, інтегративною структурою, що включає як адгезивні компоненти (такі як білки арабіногалактани та пов'язані із клітинними стінками кінази) та функціональні аналоги інтегринів, а також механочутливі кальцієві канали. Докази існування такої функціональної одиниці продемонстровані у клітинах BY-2 Nicotiana tabacum (Pickard and Fujiki 2005). Запропоновано, що певні рослинні аналоги інтегрину з'єднують МТ, цитоплазматичну мембрану, АФ і мембранні канали, що активуються розтягом (stretch-activated membrane channels) (Telewski 2006). За нашими припущеннями роль подібну до інтегринів можуть виконувати білки,

асоційовані із елементами цитоскелету і, водночас, є вбудованими у цитоплазматичні мембрану. Така мережа може передати та фокусувати механічні сили на розтяг– активованих МЧ каналах. Але вона також може викликати конформаційні зміни, що призводять до того, що МТ асоційовані білки стають тригерами подальшої біохімічної сигналізації. Про необхідність фокусування стресу можна зробити висновок з енергій активації: для активації МЧ потрібно близько 1mN m¹, що майже співпадає із напруженістю рослинних мембран, яка становить приблизно 4 mN m¹ (Kell and Glaser 1993). Таким чином, завдяки взаємодії як з клітинною стінкою, так і з цитоплазматичною мембраною, цитоскелет рослини може бути ідеальною структурою для сприйняття, інтеграції та обробки механічних сигналів.

Відомо, що механочутливі канали відіграють первинну роль у процесах відчуття стресу у рослин, наприклад МЧ канали впливають на регулювання об'єму та регулювання захисних клітин (guard cells) (Furuichi et al. 2008; Найбільш дослідженими є іонні потоки Tatsumi al. 2014). et V цитоплазматичній мембрані клітини при гравістимуляції та дії зміненої сили тяжіння. І, хоча відомо, що гравічутливі реакції рослин тісно пов'язані з іонними потоками, особливо Ca²⁺, до тепер ні один механочутливий канал безпосередньо не пов'язують з молекулярним механізмом гравітаційного сприйняття. Вважають, що активність МЧ каналів відображає загальні реакції на механічний стимул. Визначено, що МЧ канали активуються згідно двох механізмів. Один з них полягає в тому, що розвиток напруги в ліпідному бішарі мембрани безпосередньо активує МЧ канали, як це відбувається з механочутливими каналами високої провідності MscL у бактерій (Sukharev et al. 2001) та механочутливими каналами малих провідностей MscS (Machiyama et al. 2009), відновлених у вільних від цитоскелету штучних мембранних ліпосомах. Другий механізм полягає в тому, що для активації каналу потрібний позаклітинний матрикс і цитоскелет (Tatsumi et al. 2014), при цьому напруга цитоскелету активує МЧ канали.

Найбільшу задіяність МЧ каналів припускають у опосередкуванні сигналінгу від крохмально – статолітної реакції, під час якої седиментація збільшує напругу на актинових філаментах, які можуть амілопластів активувати Ca² + -проникні МЧ канали (MCA1 і 2, MSLs або інші). Експерименти доводять, що осадження пластид викликає стрес у мережі актину. Показано, що пластиди можуть брати участь у гравітропізмі кореня не лише тільки через седиментацію, але також, ймовірно, вони відіграють певну роль у передачі сигналу через комплекс зовнішньої оболонки хлоропласту Translocon (TOC). Ці висновки вказують на функціональну взаємодію пластид та актинового цитоскелету, можливо, через функціонування ТОС і це свідчить про те, що елементи цитоскелету працюють як ефективні силові перетворюючі структури, що забезпечують вищу механічну чутливість каналів МЧ в еукаріотичних клітинах. Так само, дослідження поведінки пластид у стеблах чітко демонструє їхню роль у гравісприйнятті (Morita and Nakamura 2012). Рух пластид в стеблах зазнає впливу великої та центральної вакуолей ендодермальних клітин. Більше того, генетичний скринінг мутантів Arabidopsis з модифікованою гравітаційною відповіддю стебла показав, що вакуоля теж є важливою для сприйняття гравітації (Morita 2010).

Величина сили, з якою амілопласти діють на актинові філаменти, оцінюється в межах 0,1 pN, відповідно до щільності амілопластів і цитоплазми, яка становить 1500 і 1014 кг/ м3, відповідно, при об'ємі амілопласту (1,9 x 10 -17 м3; (Wayne and Staves 1996)). Таким чином, седиментація сукупності кількох амілопластів могла б активувати МЧК у всіх мембранних органелах клітини (Perbal and Driss-Ecole 2003). Застосування лантану та гадолінію гальмує гравітропізм у проростках і величина ефекту різних лантанідів корелює з їхнім впливом на іонні канали плазматичної мембрани (Ding and Pickard 1993; Caldwell et al. 1998). Ці висновки підтверджують роль лантанід—чутливих каналів у гравітропізмі. Участь катіон-селективних механочутливих іонних каналів у передачі гравітаційного сигналу може означати також зміну концентрації цитозольного Ca^{2+} у статоцитах на ранніх етапах гравістимуляції. Локалізований Ca²⁺ може ініціювати реполяризацію статоцитів, що призводить до переміщення білків PIN та змін транспорту ауксину. Так, у статоцитах колумели не виявлено ранніх цитозольних реакцій Ca²⁺ на гравістимуляцію (Legue et al. 1997). Проте, зміни Са²⁺ при гравістимуляції відмічали в інших частинах рослини, що свідчить про те, що Ca²⁺ відіграє певну роль у передачі гравітаційного стимулу. Експерименти з використанням трансгенного AEQUORIN (чутливий до Са²⁺ біолюмінесцентний білок) який при додаванні коелентеразину (coelenterazine) формує in situ чутливий до кальцію люмінесцентний комплекс, виявили двофазну реакцію Ca²⁺ на гравістимуляцію у проростків Arabidopsis під час дослідження люмінометром та у камері підрахунку фотонів (Toyota et al. 2008). Перший пік, який досягав максимуму протягом 4 с гравістимуляції, був нечутливий до кута повороту, тоді як другий, більш тривалий пік, який досягав свого максимуму після 40-60 с, був чутливий до кута стимуляції рослини. На основі цього висловили припущення, що тільки другий пік може бути специфічно модульованим гравістимуляцією, тоді як перший може бути просто результатом механостимуляції, що супроводжує переорієнтацією проростка у гравітаційному полі. Цей висновок доводять експерименти в умовах мікрогравітації і гіпергравітації (Toyota at al. 2007). Фармакологічні дослідження свідчать про те, що друге збільшення [Ca²⁺] індукується виходом через механочутливі канали на плазматичній мембрані та виходом Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо.

У відповідь на гравістимуляцію зміни цитоплазматичного [Ca²⁺] були виявлені як в коренях, так і в пагонах *Z.mays* (Fasano et al. 2002; Pickard 2007). [Ca²⁺] збільшувалася у нижній частині горизонтально орієнтованих колеоптилів *Z. mays* через кілька хвилин після гравістимуляції. Нижня сторона колеоптилів – це місце стимуляції росту через накопичення ауксину, що потенційно пов' язує збільшення [Ca²⁺] зі шляхом ауксину. Візуалізація Ca²⁺ із використанням флуоресцентних сенсорів (Yellow Cameleon (YC)) виявила індуковану гравістимуляцією хвилю Ca²⁺ на нижній стороні кореня, що рухається з кореневого чохлика у напрямку зони розтягу з тією ж кінетикою, яка передбачається для ауксину (Monshausen et al. 2011), що потенційно пов 'язує збільшення [Ca²⁺] із потоком ауксину. Припускають, що Ca²⁺ у сигнальному ланцюзі діє після сигналу ауксину і бере участь у його перетворенні у зміни позаклітинного pH. Таким чином, роль Ca²⁺ на ранніх етапах гравітропізму поки що залишається непоясненою, проте немає сумнівів у його ролі у сприйнятті механічних сигналів (Peyronnet et al. 2014). Взаємозв'язок з ауксином передбачає що апопластні потоки Ca²⁺ можуть бути частиною трансмісії/системи реагування на змінену силу тяжіння. Не виключено, що такий зв'язок проявляється у коренях рослин і при кліностатуванні.

Багато інших механічних стимулів також здатні викликати Ca^{2+} сигналінг. Так, у *Nicotiana* і проростках *Arabidopsis* вітер індукує тимчасовий пік [Ca²⁺] стимуляції (Plieth and Trewavas 2002; Toyota and Gilroy 2013) в залежності від інтенсивності. Ці результати свідчать про те, що фізична сила перетворюється на іонні потоки як можливе початкове сприйняття і, таким чином, не лише спеціалізовані гравічутливі клітини ендодермісу і колумели, але і неспеціалізовані клітини всієї рослини можуть реагувати на такий механічний стрес.

Механічно індуковані цитоплазматичні піки $[Ca^{2+}]$ від збудження спостерігали у котиледонах тютюну (Knight et al. 1993; Toyota and Gilroy 2013), мезофілі протопластів, листкових епідермальних смужках і guard клітинах, у моху *Physcomitrella patens* і у коренях *Arabidopsis* (Legue et al. 1997; Monshausen et al. 2009; Richter et al. 2009). Збільшення $[Ca^{2+}]$ у цитозолі повідомляли при впливі механічного стимулювання, а саме, нахилі рослин від вітру (Knight et al. 1992). Амплітуда піку $[Ca^{2+}]$ залежить від інтенсивності стимулу та його частоти (Legue et al. 1997).

Слід зазначити, що молекулярна структура МЧ каналів рослин малодосліджена. Відомо, що пік індукованого сенсорним [Ca²⁺] блокується рутенієм червоним, інгібітором ендомембранного Ca²⁺ проникного каналу, який, як відомо, інгібує Ca²⁺ проникні канали в ЕР рослини і SV канал у вакуолі (Pottosin et al. 1999). Ранні роботи також припускали, що ці зміни, викликані дотиком, не вплинули на дію інгібіторів Ca²⁺ каналів плазматичної мембрани Gd³⁺ або La³⁺ (які є інгібіторами катіон-селективних стреч-активованих іонних каналів) (Haley et al. 1995; Legue et al. 1997). Однак, інші роботи показують, що висока концентрація позаклітинного Ca²⁺ може пригнічувати дію інгібіторів і що за умови низького рівня Ca²⁺ в середовищі, механічно індуковані збільшення Ca²⁺ блокуються за рахунок їхньої дії, принаймні у коренях (Monshausen et al. 2009; Richter et al. 2009). Ці результати припускають активність механочутливих каналів як на цитоплазматичній мембрані, так і на внутрішніх мембранах або що [Ca²⁺] потоки всередину клітини через канали в плазматичній мембрані індукують вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо, феномену, відомого як Ca²⁺ індуковане вивільнення Ca²⁺ (CICR) (Bewell et al. 1999).

Взагалі про механочутливі канали у рослин відомо відносно мало. Так, прокаріотичних MscS-MSL-подібних каналів у гомолог Arabidopsis відноситься до родини з десяти генів; серед них MSL3, який здатний регулювати об'єм клітин, а MSL2 і MSL3 локалізовані в оболонці пластид, де регулюють їх розмір і форму (Haswell and Mayerowitz 2006). MSL10 і MSL9 ϵ кандидатами для ролі МЧ аніонних каналів (Maksaev and Haswell 2012). Інша група генів, які кодують можливі механочутливі канали в Arabidopsis, це MCA1 (mid1- complementing activity1) та його паралог MCA2. Існує суперечливість щодо часу активності механочутливих каналів у порівнянні з часом, необхідним для довгострокової ростової відповіді, такої як гравітропізм. Відомо, що до гравісприйняття, окрім механочутливих іонних каналів, можуть бути залучені також рецептор-подібні кінази (receptor like kinases (RLK), трансмембранні білки, що складаються з одного або декількох позаклітинних г-доменів, одного трансмембранного домену та внутрішньоклітинного домену кінази (Gish and Clark 2011). RLK можуть діяти як сенсори клітинної стінки та відновлювати свій стан у КС шляхом фосфорилювання домену кінази. Було запропоновано, що серед RLK є кінази, асоційовані з клітинною стінкою (WAK) та RLK1– подібні субродини, які можна вважати сенсорами стану КС (Gish and Clark 2011; Lopez et al. 2014; Peyronnet et al. 2014). Вони можуть бути залучені до гравічутливості через сприйняття деформації між клітинною стінкою та плазматичною мембраною. Gens та інші (2000) висунули гіпотезу про існування архітектурної організації на межі цитоплазми та клітинної стінки, що включає WAK та арабіногалактани. Декілька досліджень також виявили підвищення експресії арабіногалактанів у відповідь на гравістимуляцію (Azri et al. 2014). Цей «ретикулум плазмалеми» може відігравати вирішальну роль у механочутливості та, можливо, гравічутливості (Gens et al. 2000; Lopez et al. 2014). Було показано, що механочутливі канали, включаючи MCA2, також можуть бути залучені у гравічутливість (Monshausen and Haswell 2013; Iida et al. 2014).

В наших попередніх дослідженнях проводилися експерименти із застосуванням блокаторів механочутливих Ca^{2+} каналів ЦМ – іонами гадолінію (Gd³⁺) (Haley et al. 1995) для блокування кальцієвого сигналінгу у кореневих волосках *B. vulgaris* при кліностатуванні (Шевченко та Кордюм 2007). Так, у кореневих волосках виявляли градієнт концентрації іонів Ca^{2+} , який збільшувався при кліностатуванні та додаванні позаклітинного Ca^{2+} (з 240,8 ± 12,6 нМ до 461,8 ± 31,4 нМ у верхівці волоска). Одночаєне застосування гадолінію і позаклітинного кальцію призводило до відсутності реакції у вигляді певного кута нахилу волоска до основного кореня та відсутності апікально – базального градієнту іонів Ca^2 . Отримані дані свідчать про залучення механочутливих Ca^{2+} каналів у реакції клітин з верхівковим ростом на зміну положення кореня та сили тяжіння (Шевченко та Кордюм 2007). Активацію кальцієвого сигналінгу при кліностатуванні відмічали також і у клітинах меристеми і ДЗР коренів *Pisum sativum* (Belyavskaya 1996).

Оскільки механочутливі канали цитоплазматичної мембрани широко задіяні у стресових реакціях клітин рослин від фізичних стимулів, ми припускаємо також їхнє залучення і у реакції клітин кори ДЗР на кліностатування. У наших дослідженнях вони можуть активуватися зміною тиску протопласта на кортикальну область клітини при зміні положення рослини.

7.2.4. Зв'язок механочутливих каналів плазмалеми із цитоскелетом

Відомо, що мікротрубочки можуть також діяти як допоміжні ланки під час функціонування інших механочутливих механізмів. Наприклад МТ здатні зосереджувати механічний вплив на іонні канали, як було з'ясовано в результаті аналізу нечутливих до дотику мутантів у Caenorhabditis i дослідженнях інгібіторів активованих розтягом або холодом кальцієвих каналів (Ding and Pickard 1993). У цьому контексті МТ діють як класичні рецептори, перетворюючи фізичний вхід (силу) у хімічне зчитування (прилив кальцію); однак у поєднанні з фосфоліпазою цитоплазматичної мембрани вони також можуть діяти в справжньому сприйнятті сигналу. Через їх вроджене механічне напруження, яке має постійно врівноважуватися +TIP білками, очікується, що мікротрубочки здатні розбиратися після осмотичного дисбалансу, що діє на мембрану (Wang et al. 2011 a). Це вивільняє фосфоліпазу D і запускає передачу сигналів, залежну від фосфатної кислоти (РА). Ця модель узгоджується з відкриттям того, що РА може зв'язуватися з НАДФНоксидазою, таким чином підвищуючи рівень пероксиду водню, який потім трансдукується зміненою активністю гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназ під час адаптації до стресу від посухи (Toyota and Gilroy 2013). Чутливість молекулярного механізму, що складається з МЧ каналів і цитоскелету, буде достатньо високою, щоб виявити деформацію на з'єднаннях між клітиною та позаклітинним матриксом.

Згідно класичної гіпотези гравісприйняття передача сигналу через МЧ іонні канали та седиментуючі амілопласти збуджують цитоплазматичну мембрану або мембрани ER шляхом безпосереднього тиску або натягу актинових філаментів, що з'єднуються з мембранами. Це спричиняє відкриття стреч-активованих механочутливих іонних каналів (підрозділ 7.2.3). За допомогою оптичних пінцетів, які надають можливість безпосередньо застосовувати силу до актинових філаментів та електрофізіологічно виявляти активність МЧ каналів у культурі ендотеліальних клітин пупкової вени людини (HUVEC), продемонстровано, що АФ активують МЧ канали з надзвичайно малою величиною сили (Hayakawa et al. 2008) в діапазоні рушійної сили осідання амілопластів. Відповідно до нестатолітних механізмів відчуття гравітації незначний зсув цілого протопласта Chara при гравістимуляції створює великі потенційні зміни енергії, які можуть викликати деформацію в міжклітинних матриксних стиках і що відчуваються за допомогою МЧ каналів або іншими поки що невизначеними механізмами (Wayne et al. 1992).

Чутливість, яку забезпечують МЧ канали та цитоскелет, є достатньо високою для виявлення деформації на стиках клітина-позаклітинний матрикс. Зокрема АФ можуть регулювати активацію Ca²⁺ каналів при механічному стресі. Так, зміни Са²⁺ частково порушувалися застосуванням латрункуліна В (аналог цитохалазину), що передбачає роль АФ у його стимуляції. Показано, що АФ відіграють роль у активації МЧ каналів при механічному стресі (Zhang et al. 2007; Hayakawa et al. 2008; Kiyoshima et al. 2011) а також можуть бути потенційним інгібітором гравітропічної реакції (Hou et al. 2003; Blancaflor 2013). Ca²⁺ також може викликати зміни наступних компонентів по сигнальному шляху, наприклад, зміни у рН КС, пов'язані з модуляцією видовження клітин через кислотність цитоплазми при рості (Monshausen et al. 2011). Відомо, що рН також відіграє важливу роль, модулюючи діяльність як цитоплазми, так і КС. Використання флуоресцентних індикаторів рН виявляли його зміни при гравітаційній стимуляції у клітинах колумели кореневого чохлика, колеоптилях і пульвіні кукурудзи (Johannes et al. 2001; Fasano et al. 2002). Однак тільки в пульвіні кукурудзи рН змінювався асиметрично і тому був здатним направляти інформацію щодо спрямованості дії гравітаційного вектора (Johannes et al. 2001).

Таким чином, не виключено, що будь-яка клітина здатна відчувати зміну сили тяжіння при цьому зміни позаклітинного Ca^{2+} можуть відігравати безпосередню роль у регуляції властивостей клітинної стінки а внутрішньоклітинний Ca^{2+} сигналінг опосередковує реакцію на змінену силу тяжіння. Елементи цитоскелету здатні регулювати активність механочутливих каналів і, отже, здатні опосередковувати трансдукцію Ca^{2+} сигналінгу. На основі результатів власних досліджень і аналізу даних щодо активації сигналів від сприйняття мінімізованого впливу гравітації, запропоновано схему участі елементів цитоскелету у реакції клітин дистальної зони розтягу на кліностатування (підрозділ 7.6).

Дослідження *in vitro* показало, що філаменти актину самі по собі також можуть функціонувати як механосенсори (Науакаwa et al. 2008). Седиментація амілопластів збільшує напругу на актинових філаментах, що може модулювати взаємодію між АФ та білками, що зв'язують актин (Uribe and Jay 2009). Слід згадати, що сам термін «цитоскелет» передбачає функцію підтримуючої решітки як для мікротрубочок, так і для актинових філаментів. Слід відмітити, що на сучасному етапі цитоскелет розглядають не як структуру, а скоріше, як процес у динамічній рівновазі, який націлений до виконання функцій, що вимагають динамічних змін. Таким чином, завдяки своїй вродженій нелінійності та різнобічній взаємодії з іншими компонентами цитоскелет цілком відповідає вимогам декодера механічних сигналів.

Таким чином, зміни організації елементів цитоскелету у кортикальній площині клітини при зміні механічного навантаження від кліностатування можуть активувати мембранні механочутливі канали і спричиняти Ca²⁺ сигналінг. При цьому, викликані механічним навантаженням конформаційні зміни білка, та активовані натягом мембранні канали діють узгоджено з цитоскелетом, який діє або як стрес-активований приймач механічної сили, що фокусує стрес на механочутливий канал, або як основний сенсор, який перетворює механічний сигнал у диференційний ріст мікротрубочок на плюс – кінці. Такий самонапружений сенсор як цитоскелет використовується для

інтеграції росту окремих клітин згідно механічного навантаження на тканини та органи та як внутрішньоклітинний сенсорний контроль властивостей клітини, таких як розташування органел (Nick 2011). Виражена нелінійність мікротрубочок робить їх ідеальним інструментом для самоорганізації у відповідь на механічні впливи ззовні.

7.3.Організація та взаємодія елементів цитоскелету у клітинах коренів вищих рослин

7.3.1. Кортикальні мікротрубочки

У наших експериментах вперше досліджено організацію кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок у таких видів як *S. latifolium, A. plantago–aquatica* та *B.vulgaris* і порівняно її з організацією тубулінового цитоскелету у *Z.mays*, повною мірою описаного раніше (Baluška et al. 1997 a, b; 2001). В усіх ростових зонах кореня *S. latifolium, A. plantago-aquatica* та *B.vulgaris* виявили типову організацію як кортикальних, так і ендоплазматичних мікротрубочок. Починаючи із меристеми кМТ залягають впоперек поздовжній осі кореня впорядкованими смугами паралельних MT (рис. 7.3 а).

Така ж самі щільні смуги кортикальних МТ, розміщені перпендикулярно поздовжній осі головного кореня характерні і для дистальної зони розтягу (додаток А). У клітинах зони видовження коренів означених видів кортикальні МТ витягнуті у поздовжньому напрямку.

Відомо, що у більшості випадків орієнтація кМТ співпадає із орієнтацією мікрофібрил целюлози, оскільки кМТ здійснюють спрямований контроль за розширенням (анізотропним) рослинних клітин (Baskin 2001). А саме, кМТ регулюють рух вбудованих у цитоплазматичну мембрану целюлозо-синтазних комплексів, які синтезують ланцюги b–1,4–глюкану (Paredez et al. 2006; Crowell et al. 2009; Gutierrez et al. 2009).



Рис. 7.3. Схема типової організації кортикальних (а) та ендоплазматичних мікротрубочок (b) у клітинах меристеми та зони розтягу коренів вищих рослин

Кортикальні МТ також асоціюються з дрібними субклітинними компартментами, які опосередковують перенесення комплексів целюлозо– синтази з везикул Гольджі на цитоплазматичну мембрану (Crowell et al. 2009; Gutierrez et al. 2009). Сусідні паралельні ланцюги глюканів, які формують кристалічні целюлозні мікрофібрили, забезпечують основну механічну стійкість клітинної стінки до зовнішнього стресу та внутрішнього тиску тургору.

Відомо, що у інтерфазних клітинах рослин кМТ розповсюджуються у вигляді квазі–2D аркушу, у яких переважає взаємодія між зростаючим плюскінцем однієї МТ і бічною стінкою розміщеної попереду іншої МТ (Alushin et al. 2014; Hashimoto 2015). Після нуклеації на попередній (материнській) МТ, новоутворена кМТ вивільняється і два результуючі полімери проявляють чітку динамічну поведінку на своїх кінцях. Плюс–кінець МТ показує типову динамічну нестабільність, яка полягає у чергуванні періодів росту та вкорочення, тоді як вільний мінус кінець МТ зазнає повільної деполімеризації (Shaw et al. 2003; Ehrhardt and Shaw 2006). Такий сіткоподібний ріст на одному кінці та стійке скорочення на іншому разом із бічним зв'язуванням МТ із цитоплазматичною мембраною, дозволяє кМТ мігрувати вздовж кортикальної області клітини (Alushin et al. 2014). Часто мігруючі МТ взаємодіють із іншими МТ, розташованими попереду. Результат зустрічі МТ-МТ залежить від кута, під яким вона відбулася: зіткнення під гострим кутом швидше призводять до деполімеризації додаткового плюс-кінця, тоді як результатом стикання під кутом, як правило, є сумісне розміщення двох МТ та наступне тупим галуження (Dixit and Cyr 2004; Fishel and Dixit 2013). Ця залежна від кута, модифікаційна поведінки МТ призводить до поперечної переорієнтації кМТ. Зазвичай спонтанне впорядкування МТ в поперечні масиви спостерігали у одиничних клітинах ізольованих протопластів тютюну, які видовжувалися (Hasezawa et al. 1988). В епідермальних клітинах верхівки стебла Arabidopsis кМТ розміщені у напрямку передбачуваного максимального основного напруження. Коли декілька епідермальних клітин меристеми пагона були видалені лазером, МТ в навколишніх клітинах реорганізовувалися вздовж контурів видалених клітин, тоді як дія прямої зовнішньої сили на меристему змушувала МТ вирівнюватися паралельно максимальному напрямку напруги (Hamant et al. 2008). У зв'язку з цим був запропонований цикл зворотного зв'язку, в якому геометрична форма тканини генерує стресові структури, які вирівнюють кМТ, що диктує напрямок росту клітин і допомагає формувати меристему (Hamant et al. 2008).

Новостворені після цитокінезу поперечні стінки клітин мають гострі поперечні краї, які індукують деполімеризацію МТ або згинання, таким чином, виступаючи перешкодою на шляху проникнення МТ, тоді як поздовжні краї поперечних стінок, що сформувалися раніше, є більш округлими і збагаченими на МТ–стабілізуючі фактори, що дозволяє проходження новоутворених МТ (Ambrose et al. 2011; Fishel and Dixit 2013). Тому внутрішня геометрія клітин, що випливає з історії розвитку запрограмованого поділу клітин, полегшує впорядкування кМТ. На відміну від переважної більшості рослинних клітин, які розширюються при рості шляхом розпушування клітинних стінок та осадження нового матеріалу КС по всій довжині клітинних поверхонь, деякі спеціалізовані клітини, наприклад, кореневі волоски та пилкові трубки, ростуть виключно верхівкою. Так, кМТ

виявляються на усіх стадіях росту кореневих волосків та пилкових трубок, але в субапікальному районі цих верхівкових клітин присутня велика кількість лише ендоплазматичних MT (Sieberer et al. 2005; Cheung et al. 2010).

Окрім того, інтерфазні кМТ, які щільно прикріплені до цитоплазматичної мембрани, спрямовують ріст рослин та їхній морфогенез, впливаючи на поділ клітин, їхню полярність і відповідь на абіотичні стреси (Chan et al. 2009; Lindeboom et al. 2013; Pleskot et al. 2014). Так, наприклад, у швидко ростучих клітинах гіпокотиля і коренів МТ розміщуються поряд одна з одною і їхні пучки загалом орієнтовані перпендикулярно до лінії видовження. Коли видовження клітини уповільнюється або припиняється МТ залишаються сумісно розміщеними але їхні пучки змінюють орієнтацію і стають паралельними лінії видовження клітини. Порушення або зміна організації МТ призводить до анормального росту і розвитку клітин, що вказує на критичну роль кМТ в онтогенезі клітини (Wasteneys and Ambrose 2009). Як вважають, поперечна орієнтація МТ у меристемі забезпечує прямокутну форму клітини. У проксимальному напрямку від меристеми МТ змінюють свою організацію і в дистальній зоні розтягу кореня чітко розрізняють навскісні MT (Hepler et al. 2001). Форма клітин цієї зони кореня починає змінюватися на квадратну. Із просуванням по зонам росту пучки МТ реорієнтуються з навскісних на поздовжні, паралельні головній осі кореня, чим забезпечується швидкий ріст клітин, а самі клітини з просуванням по зоні розтягу видовжуються (Baluška et al. 1997 b; Shevchenko et al. 2007, 2008).

Ендоплазматичні МТ у клітинах коренів означених видів представлені як окремими МТ, так і пучками різної щільності, які оточують ядро і радіально розходяться від навколоядерної області до клітинної периферії, де частина з них закріплюється на цитоплазматичній мембрані (рис.7.3 b). Не відмічали суттєвої різниці у будові еМТ між однодольними (*Z.mays, A. plantago–aquatica*) та дводольними (*B.vulgaris, S. latifolium*). Проте, у *B.vulgaris* еМТ виражені чіткіше. Подібна організація кМТ та еМТ описана для таких рослин як *A. thaliana, N. tabacum* (BY cell culture), *Lepidium sativum, Daucus* *carota, Medicago trunculata* та багатьох інших (Kutsuna and Hasezawa 2002; Wasteneys and Ambrose 2009).

Встановлено, що такі зовнішні фактори як механічний тиск, дія електричного поля, гравітації (Himmelspach et al. 1999), патогени (Kobayashi et al. 1994), гормони (Shibaoka 1994) та сольовий стрес (Shoji et al. 2006) здатні викликати переорієнтацію МТ. Таким чином, окрім вираженості структур тубулінового цитоскелету, що, ймовірно, пов'язане із афінністю антитіл до тубуліну у різних рослинних тканинах, організація кМТ та еМТ є типовою для вищих як однодольних, так і дводольних рослин.

7.3.2. Актинові філаменти

Вперше досліджена організація актинових філаментів у клітинах ростових зон апексів кореня *S. latifolium, A. plantago aquatica* та *B.vulgaris* і проведено її порівняння із організацією мережі $A\Phi$ у *Z.mays* (Baluška et al. 1997 а, 2001). Виявлено, що у меристемі і ДЗР коренів $A\Phi$ формують переплетену мережу без переважної орієнтації (рис 7.4 а).



Рис. 7.4. Схема типової організації мережі актинових філаментів у *Beta* vulgaris, Sium latifolium та Alisma plantago–aquatica та Zea mays (a), позначкою* відмічені тонші кортикальні мікрофіламенти. Специфічна структура з актинових філаментів у клітинах дистальної зони розтягу Zea mays (b)

Актинові філаменти присутні у оточенні ядер і вакуоль, деякі АФ закріплені на ЦМ. Саме така організація дозволяє АФ виконують свою основну функцію забезпечення певної функціональної позиції органел у цитоплазмі.

Подібну організацію актинового цитоскелету описали для багатьох інших різних видів рослин (Clayton and Lloyd 1985; Liu et al. 2011).

У досліджуваних рослин у примембранній області клітин відмічали щільні угруповання з актину. Відомо, що АФ у примембранній області залучені до формування екзоцитозної мережі, збільшення поверхні ЦМ (Wang and Hussey 2015), забезпечення росту (Baluška et al. 1997 a) та реакції клітин на зовнішні стимули (Lanza et al. 2012; Li et al. 2014). Припускають, що основу такої мережі для екзоцитозу складають щільні пучки АФ, які поступово переходять у тонші на периферії клітини (Ketelaar and Emons 2001; Collings et al. 2001). У спеціалізованих мембранних комплексах АФ асоціюються із численними білками, задіяними у передачі сигналів (Gilroy and Trewavas 2001). Філаментний актин (F-актин) здатний регулювати розтягнення мембрани завдяки переходу від екзоцитозу до ендоцитозу. Як вважають, Fактин сприяє стабілізації секреторних компартментів при вбудовуванні везикул у шари ЦМ та забезпеченні компенсаторного ендоцитозу (Ayscough et al. 2000; Lancetti et al. 2004). Згідно даних бази NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) у рослин наявні білки, які регулюють ендо/екзоцитоз (Shevchenko 2015). До них належить родина білків WAVE, яка контролює активність комплексу білків Arp2/3, який, у свою чергу, регулює процес розгалуження АФ. Також у цьому процесі задіяні і інші білки, які забезпечують полімеризацію АФ і таким чином відбувається зв'язок полімеризації актину з процесами ендоцитозу (Suetsugu et al. 2003). Такий білок як Exo70 (At5g03540) приєднується до комплексу Arp2/3 (регулює з'єднання АФ одне з одним при відгалуженні) і сприяє накопиченню везикул у примембранній області клітини, а також, забезпечує їхнє злиття із мембраною під час екзоцитозу (Basu and Chang 2007). Слід відмітити, що у ДЗР коренів досліджених видів розрізняють так звані кортикальні АФ, які у

клітинах епідермісу і шарів кори формують тонку мережу поперечних АФ (рис.7.4 а). Виразні пучки кортикальних АФ характерні для *Z.mays*. Тонку мережу кортикальних АФ у клітинах кори описували і інші (Liu and Palevitz 1992; Kojo et al. 2013) використовуючи методи імунофлуоресценції, фарбування фаллоідином, мікроін'єкції та використання конструкції GFP– талін (Blancaflor 2002; Shevchenko et al. 2007). Оскільки розташування кортикальних АФ і МТ співпадає, функція актину полягає у взаємодії із МТ і сумісному опосередкуванні процесів екзоцитозу в процесі росту клітин (Collings et al. 2008).

На противагу до *B.vulgaris, S. latifolium* та *A. plantago–aquatica,* для *Z.mays* характерні специфічна організація $A\Phi$ у клітинах ДЗР коренів, яка полягала у формуванні щільних тяжів із $A\Phi$, які облямовують ядро і ніби закріплюють його на двох протилежних полюсах клітин (рис. 7.4 b) вздовж напрямку росту. Вважають, що такі пучки сприяють розтягу і забезпечують ріст клітин (Baluška et al. 2001). Ми визначили, що, на відміну від *Z.mays*, для *B.vulgaris, S. latifolium* та *A. plantago– aquatica* не характерні подібні специфічні утворення із $A\Phi$.

Згідно припущень, АФ полімеризуються у цитоплазмі випадковим чином, вони можуть зв'язуватися із подібними мікрофіламентами, в результаті чого утворюються густіші і довші пучки, що складаються з мікрофіламентів випадкової довжини, розміщених у шахматному порядку. Такий тип з'єднання призводить до створення еластичної мережі, здатної на незначні перебудови за допомогою розшарування мікрофіламенту або ковзання. Коротші фрагменти мережі мігрують у цитоплазмі шляхом дифузії або з током цитоплазми і можуть деполімеризуватися або приєднувати інші мікрофіламенти. Деякі довші АФ не рухаються, але можуть з'єднуватись із сусідніми довгими мікрофіламентами або рухомими коротшими фрагментами. Неможливо визначити частку АФ, які зазнають деполімеризації або приєднання до існуючих АФ, але відомо, що залежно від фізіологічного стану клітини цей баланс може змінюватися (Smertenko et al. 2010; Cvrčkova and Oulehlova 2017). Таким чином, вперше проведене дослідження організації елементів цитоскелету у *B.vulgaris*, *S. latifolium* та *A. plantago–aquatica* довели подібність організації як МТ, так і $A\Phi$ у вищих наземних та повітряно-водних рослин. Незначні відмінності є видоспецифічними (*Z.mays*) або пов'язаними зі специфікою методичного виявлення структур цитоскелету (афінність антитіл до тканини) (*B.vulgaris*).

Швидкі перебудови мережі АФ призводять до зміни клітинного метаболізму та розвитку адаптивних реакцій. Дослідження доводять, що динамічний актиновий цитоскелет тісно пов'язаний із каскадом сигнальних реакцій, які ініціюються на цитоплазматичній мембрані, зокрема, під час функціонування континууму – клітинна стінка – цитоплазматична мембрана – цитоскелет.

7.3.3. Взаємозалежна організація мікротрубочок та актинових філаментів у кортикальній площині клітин коренів

Згідно наших експериментів з дослідження клітин зони розтягу Z.mays та A.thaliana (підрозділи 5.1; 5.2), різні концентрації B.vulgaris, інгібіторів полімеризації тубуліну – гербіциду оризаліну позначалися на організації мережі АФ, а саме, сприяли її частковому руйнуванню і появі фрагментованих АФ. У кортикальній площині клітин відмічали точкові угруповання з актину. При цьому до формуванні таких угруповань з актину можуть бути долучені багато актин-асоційованих білків (Poulter et. al. 2010) У свою чергу, різні концентрації цитохалазину D також призводили до появи точкових угруповань з тубуліну у клітинах ДЗР коренів і це свідчить про часткове порушення організації мережі МТ. Такий перехресний вплив інгібіторів полімеризації актину і тубуліну як на МТ, так і АФ, доводить взаємозалежне функціонування мережі АФ та МТ. Про взаємозв'язок між двома основними елементами цитоскелету у рослин свідчить їхня сумісна локалізація, фармакологічні дослідження та існуванням білків, що зв'язують MT та A Φ одне з одним (Blancaflor 2000; Collings and Wasteney 2005; Collings 2008; Petrashek and Schwarzerova 2009; Barton and Overall 2010; Kordyum et al. 2020). Показано, що руйнування одного елемента цитоскелета може змінити розміщення іншого. Так, у *A. thaliana* і клітинах *D. carota* деполімеризація МТ призводила до часткової втрати організації тонких поперечних кортикальних $A\Phi$ (Traas et al. 1987; Collings and Wasteney 2005; Collings 2008). Крім того, продемонстровано, що зовнішні чинники та/або певні стадії розвитку індукували зміни в МТ та $A\Phi$, підтверджуючи їхню координовану взаємодію. Наприклад, переорієнтація масивів МТ спричиняла одночасні зміни в організації $A\Phi$ у трахеарних елементах молодих клітини *Zinnia elegans* (Kobayashi et al. 1988). Руйнування $A\Phi$ затримувало реорганізацію МТ у клітинах бобових (*Vigna angularis*) (Takesue and Shibaoka 1998).

Sampathkumar із співавторами (2011) на живих клітинах *Arabidopsis* довели, що кортикальні АФ та МТ взаємодіють, і що кМТ необхідні для відновлення кортикального актину після його деполімеризації. Виявлено також, що МТ впливають на орієнтацію новоутворених АФ (Hussey et al. 1998), підтверджуючи можливість того, що кМТ можуть визначати сайт нуклеації актину. Deeks та інші (2010) описали у *Arabidopsis* білок FORMIN4 (FH4), який локалізується сумісно із МТ і може взаємодіяти як із АФ, так і МТ через домен зв'язування з МТ. У дріжджів та тварин деякі білки плюс кінців МТ асоціюються із іншими формінами (Wen et al. 2004; Martin and Chang 2005), і, як показано, на плюс кінцях МТ форміни є одним із регуляторних факторів процесу нуклеації актину (Basu and Chang 2007). Водночас, візуалізація комплексів нуклеації мікротрубочок у живих клітинах *Arabidopsis* не виявили жодних змін у асоціації МТ та АФ у кортексі клітин або будь-яких змін динаміки нуклеації МТ після деполімеризації актинових філаментів (Nakamura et al. 2010).

У наших дослідженнях сумісна організація мікротрубочок і актинових філаментів підтверджується не тільки руйнуванням мережі АФ інгібітором полімеризації МТ, а руйнування МТ – інгібітором полімеризації АФ, але також і в експериментах із транскрипційної регуляції експресії *TUA6* та *ACT2* організацією мікротрубочок та актинових філаментів у A.thaliana. Так, часткове руйнування оризаліном мережі мікротрубочок інгібувало експресію як TUA6 так і ACT2. Таку ж саму закономірність спостерігали і при порушенні мережі актинових філаментів цитохалазином D. Це доводить зв'язок між організацією МТ та АФ та транскрипційною регуляцією їхніх генів і, окрім того, організаційну взаємодію між основними елементами знову свідчить про цитоскелету. Не виключено, що руйнування мережі мікротрубочок та актинових філаментів здатні активувати певні сигнальні шляхи, які призводять до зупинки формування нових полімерів у цитоплазмі. Можливо, що це є частиною так званої «ауторегуляції тубуліну», при якій концентрація тубуліну автоматично регулюється зворотним контролем кількості його мРНК через невідомий механізм (Lin et al. 2020; Gasic 2022). Також відомо, що і актиновий цитоскелет здатний зв'язувати певні транскрипційні фактори і визначати їхню субклітинну локалізацію (Olson and Nordheim 2011). Так, показано, що руйнування мережі АФ цитохалазинами а мережі МТ колхіцином або нокодазолом призводило до активації транскрипційного фактора NF-kB та послідуючої експресії залежних від нього генів у клітинах епітелію шлунка людини (Nèmeth et al. 2004). Окрім того, доведено, що р65 - компонент транскрипційного фактора NF-kB, здатний безпосередньо комплексу взаємодіяти з $A\Phi$ (Nèmeth et al. 2004).

Концептуально, зміни динаміки актину можуть передавалися у геном трьома способами. По-перше, зміни концентрації мономерного G- актину може викликати відповідні зміни у рівні ядерного G- актину. По-друге, зміни рівня цитоплазматичного мономерного G- актину можуть відчуватися білками, які з'єднуються із G- актином, у той час як полімеризація G-актину (у F-актин) може призводити до вивільнення білків, які з'єднуються із Gактином, їхнього переміщення у ядро і послідуючої модуляції ядерних транскрипційних факторів. Також, статус динаміки цитоплазматичного актину може безпосередньо зчитуватися клітинними сенсорами структури та товщини F-актину. Таким чином, архітектурні перебудови цитоплазматичних $A\Phi$ можуть призводити до вивільнення білків або комплексів білків, які зв'язуються із актином і їхнього послідуючого попадання у ядро (Olson and Nordheim 2011).

Можливо, що точкові скупчення актину/тубуліну, які спостерігали у A.thaliana при дії різних концентрацій оризаліну і цитохалазину (5, 10 мкМ), є наслідком руйнування з'єднань актинових філаментів та мікротрубочок у кортикальній площині клітини. Перехресну взаємодію АФ та МТ виявляли у багатьох дослідженнях (підсумовано у Takeuchi et al. 2017). З цієї точки зору цікавою виявляється регуляція експресії МАР65-1 дією цитохалазина D, адже це свідчить про вплив кількості G-актину на регуляцію МАР65-1, білка, який відомий як один із ключових координаторів мережі кортикальних МТ. Такий факт доводить участь МАР65-1 у взаємодії МТ та АФ, можливо, не безпосередьо, а опосередковано через інші білки. Про здатність МАР65-1 взаємодіяти із іншими білками свідчить його зв'язок із CLASP. Так, моделювання присутність CLASP показало. шо v гострому верхньому/нижньому куті клітини сприяє обходу мікротрубочками цих країв і поступовій зміні орієнтації мікротрубочок з бокових на верхні/нижні сторони клітини. Це призводить до зміни площини поділу клітини з антиклінальної на периклінальную. Дослідження показують, що CLASP керує орієнтацією мікротрубочок, кількість МАР65 регулює локалізацію CLASP, а PLT (транскрипційний фактор PLETHORA) регулює кількість MAP65. Разом модуль PLT-auxin-MAP65-CLASP відіграє ключову роль у формуванні клітинних поділів (Dhonukshe et al. 2012). Окрім того моторний кінезин взаємодіє із білками родини МАР65 і контролює динаміку і розміри пучків мікротрубочок.

Слід згадати і про те, що МАР65-1 має дев'ять потенційних сайтів фосфорилювання, всі з яких можуть бути фосфорильовані екстрактами з рослинних клітин із затримкою метафази. Сайти фосфорилювання включають сайти циклін-залежної кінази, сайти кінази aurora B, сайти протеїн-кінази, що активуються мітогеном, і сайти казеїн-кінази. Сайти фосфорилювання зберігаються в межах кожної філогенетичної групи, але не між ними. Це підвищує ймовірність того, що кожна група може контролюватися унікальним механізмом, який залежить від комбінованої активності різноманітних протеїнкіназних шляхів. Величина фосфорилювання визначає здатність MAP65-1 зв'язувати мікротрубочки (Smertenko et al. 2008, 2010) і у зв'язку з цим можливо припустити існування шляхів фосфорилювання, які контролюють з'єднання MAP65-1 також і з актиновими філаментами.

Про взаємодію між мікротрубочками та актиновими філаментами може свідчити і активація експресії гена форміну *FH4* при частковому руйнуванні мережі актинових філаментів, що можна пов'язати із важливістю залучення даного білка до функціонування як актинових філаментів, так і мікротрубочок при створених стресових умовах.

Підсумовуючи, можна стверджувати, що кортикальні мікротрубочки та актинові філаменти рослинних клітин функціонально взаємодіють і що ця взаємодія змінюється під час узгодженої реорганізації масивів елементів цитоскелету в результаті впливу певних стимулів. Водночас, для поглибленого дослідження взаємодії між мікротрубочками та актиновими філаментами у кортикальній площині клітин рослин необхідно застосовувати нові підходи а також продовжувати досліджувати численні регуляторні білки, які опосередковують взаємодію як між елементами цитоскелету, так і їхній зв'язок із цитоплазматичною мембраною клітини та клітинною стінкою.

7.4. Участь цитоскелету у специфічній реакції клітини на кліностатування

7.4.1. Організація мікротрубочок та актинових філаментів клітин коренів при кліностатуванні

Експерименти із кліностатуванням показали, що у клітинах ростових зон досліджуваних коренів *B. vulgaris, Z. mays* та *A. thaliana* ендоплазматичні
мікротрубочки у цілому не змінювали своєї організації у вигляді пучків та поодиноких МТ а мали типову будову – оточували ядро і у вигляді радіальних променів відходили до периферії клітини, де закріплювалися на ЦМ. Окрім цього, спостерігали також пучки еМТ різної щільності, які розміщувалися по периметру клітини. Кортикальні МТ, загалом, розташовувалися пучками впоперек поздовжньому напрямку росту кореня. Однак, на відміну від контрольних рослин, у кліностатованих *B. vulgaris, Z. mays* та *A. thaliana* відмічено збільшення дезорієнтованих кМТ у клітинах дистальної зони розтягу коренів а саме, їхню певну хаотизацію та відхилення від поперечної організації на кут більший за 45^0 (рис. 7.5).



Рис. 7.5. Схематичне розташування дезорганізованих мікротрубочок у клітинах кори пізньої меристеми та зони розтягу проростків *Beta vulgaris, Zea mays* та *Arabidopsis thaliana* у стаціонарному контролі (а) та під час кліностатування (b)

Деколи навіть спостерігали повну дезорієнтацію кортикальних МТ (рис.7.5 b). Зміну організації тубулінового цитоскелету в умовах невагомості відмічали і у клітинах тварин, що показано на культурі клітин ссавців, у якій МТ дезорганізовувалися в умовах реальної або симульованої невагомості (експерименти на орбітальній станції, параболічні польоти, кліностати різного типу) (Vassy et al. 2001; Lewis 2002; Hoson et al. 2010). Ймовірно, що порушення організації мережі МТ у ДЗР є внеском у зміну темпів росту коренів під час кліностатування, а саме, пригнічення у *B.vulgaris* та *A. thaliana* та прискорення у *Z.mays*. Розбіжності щодо темпів росту коренів рослин в умовах реальної та імітованої мікрогравітації відмічали у багатьох дослідженнях. Таким чином, вперше на прикладі однодольних (Z.mays) та дводольних (B.vulgaris, A.thaliana) рослин показані однакові закономірності щодо організації кМТ та еМТ під час розвитку клітин та впливу кліностатування на організацію кМТ у зоні розтягу коренів та протилежні щодо росту головного кореня. Реакція на кліностатування, яка проявляється у різних видів рослин протилежними значеннями темпів росту, можливо, є видоспецифічною особливістю рослин. Також вона може бути пов'язана із товщиною коренів, а саме кількістю клітинних рядів у корі, через що сприйняття даного стимулу відчувається багатьма клітинами і скоординована реакція проявляється через певний час. Тому не виключено, що складна біохімічна і молекулярна регуляція ростових процесів і товщина кори коренів є саме тими факторами, які зумовлюють різницю у реакції на кліностатування ростових процесів у коренях різних видів рослин. Протилежні результати щодо росту коренів отримували і при дії оризаліну на кліностатовані рослини. Так, застосування оризаліну при кліностатуванні пригнічувало ріст коренів Z. mays, а у В. vulgaris, навпаки, посилювало. Така різниця зумовлена тим фактом, що, окрім цитоскелету, ріст клітин коренів при кліностатуванні рослин регулюється ще багатьма іншими факторами.

Стимулювання видовження і росту клітин відмічали у гіпокотилях *Arabidopsis* в умовах реальної мікрогравітації космічних польотів, що автори також пов'язують із інгібуванням функціонування МТ (зміни орієнтації МТ з поперечної на поздовжню) (Kato et al. 2022). Зміну росту рослин, пов'язану із функціонуванням МТ в умовах реальної мікрогравітації відмічали також Matia та інші (2010).

У наших експериментах кліностатування помітно не змінювало організацію мережі $A\Phi$ у всіх ростових зонах коренів рослин *B.vulgaris*, *Z.mays* та *A. thaliana*. У *B.vulgaris* при кліностатуванні і дії цитохалазину D ріст коренів навіть прискорювався. Таку ж саму закономірність спостерігали і для *A.thaliana*, що можливо, пов'язане із критичною роллю $A\Phi$ у регулюванні ростових процесів дводольних під час стресу. Однак, слід зазначити, що часткове руйнування елементів цитоскелету не є єдиною умовою дискоординації росту коренів проростків, оскільки ріст – це складний процес, який регулюється багатьма молекулярними та біохімічними механізмами. Водночас, оскільки МТ та АФ, як елементи цитоскелету, є складовими комплексу сприйняття зовнішніх стимулів (континуум клітинна стінка – цитоплазматична мембрана – цитоскелет) (Lloyd 2011) вони є первинними елементами клітинної реакції на зовнішній стрес, а саме, зміну механічного навантаження.

Можна констатувати, що у наших експериментах при кліностатуванні послаблювалася руйнівна дія інгібіторів як цитохалазину D, так і оризаліну з таксолом на мережу АФ та МТ. Це випливає із незначного збільшення довжини і ширини клітин ДЗР. Окрім того, візуальні дослідження показали зменшену кількість точкових угруповань з тубуліну при дії цитохалазину D та зменшену кількість угруповань з актину при дії оризаліну на кліностатовані рослини. Це може свідчити про те, що взаємозалежність між обома елементами цитоскелету при кліностатуванні проявляється не так виразно, як у стаціонарному контролі. Ми не беремо останній показник за основний, оскільки, незважаючи на отримані достовірні дані при порівнянні кількості точкових угруповань, статистичні вибірки, на наш погляд, мають бути більшими і охоплювати більше шарів кори. Зниження рівня взаємодії між елементами цитоскелета також може свідчити про певну протидію зміні механічного навантаження і доводить активацію певного адаптаційного механізму за участю елементів цитоскелету, який і забезпечує ріст кореня при даних стресових умовах.

7.4.2. Зміна транскрипції генів асоційованих із цитоскелетом білків при кліностатуванні

У клітинах кори ДЗР коренів рослин специфічні рецептори можуть відчувати коливання ЦМ та опосередковувати передачу механічного сигналу, що генерується під час кліностатування в результаті збурення протопласта клітини (Kiss et al. 2019). Вирішальну роль у сприйнятті зовнішніх стимулів клітинами кореня відводять континууму – клітинна стінка – ЦМ – кортикальні MT (Wyatt and Carpita 1993; Baluška et al. 2003). Мережа кортикальних МТ зв'язана із ЦМ за допомогою асоційованих білків, які є кандидатами для передачі усередину клітини сигналів, включаючи механічні. Оскільки у клітинному кортексі актинові філаменти розташовані сумісно із кМТ, вони також можуть брати участь у передачі сигналу через асоційовані білки, які з'єднують АФ із ЦМ і сприяють перехресній взаємодії із МТ. Для визначення механізму функціонування цитоскелету при передачі сигналів актуальним дослідження регуляції асоційованими виявляється білками стану мікротрубочок та мікрофіламентів після впливу різноманітних стимулів. У зв'язку з цим досліджували експресію генів ACT2, TUA6, CLASP, MAP65-1, $PLD\delta$, FH1 i FH4 в кліностатованих рослинах A. thaliana, оброблених або інгібітором полімеризації тубуліну (OR) або інгібітором полімеризації актину (CD). Вибір досліджуваних генів, які кодують структурні (ACT2, TUA6) та асоційовані білки цитоскелету, базувався на їхній експресії у вегетативних тканинах, здатності регулювати організацію кортикальної мережі МТ (CLASP, *MAP65-1*) та $A\Phi$ (*PLD* δ , *FH1* i *FH4*) а також взаємозалежну взаємодію цитоскелетних елементів (PLDS і FH4). Слід зазначити, що кліностатування гомогенізує дію гравітації (усуває її спрямовуючий вплив і сприяє рівномірному розподілу навантаження тургорного тиску від протопласта на клітинну стінку) (рис.7.2).

У свою чергу, ми довели, що зміна навантаження на кортикальну область клітини є причиною механічного стресу (Shevchenko and Krutovsky 2022), що припускають і інші (Ferranti et al. 2021)

У наших експериментах кліностатування безпосередньо знижувало експресію генів *TUA6* та *CLASP*. Слід зазначити, що гени, пов'язані з організацією та функціями MT, відносяться до тих, чия експресія змінюється при різних умовах сили тяжіння. Так, виявлено, що експресія більшості генів α - і β -тубуліну в гіпокотилях *Arabidopsis* підвищувалася в умовах гіпергравітації (Yoshioka et al. 2003; Matsumoto et al. 2007). У нашому випадку безпосередній вплив кліностатування на експресію *TUA6* та *CLASP* вказує на певний взаємозв'язок між TUA6 та CLASP. Можна припустити, що, оскільки CLASP стабілізує кінці МТ, порушення полімеризації останніх здатне зворотно впливати на його експресію і знижувати її. Не виключено, що це деякою мірою сприяло зміні динаміки та порушенню організації кМТ (Pellegrini et al. 2017). Спостереження у ДЗР *B.vulgaris* та *A. thaliana* 10 % відхилених від поперечної організації кМТ, а у *Z.mays* 13 % підтверджує цю ідею. Пригнічення експресії *TUA6* характерне також і для коренів *Arabidopsis* в умовах реальної мікрогравітації (Kato et al. 2022).

Слід зазначити, що МТ здатні виконувати сенсорну функцію, а сам тубулін зазнає спонтанної полімеризації завдяки динамічній природі полімера МТ. Полімер МТ швидко подовжується або вкорочується (процес тредміллінгу) завдяки полярній структурі гетеродимерного білка, що складається з альфасубодиниці на повільно зростаючому мінус-кінці та бета-тубуліну на швидкозростаючому плюсовому кінці полімера (Wade and Hyman 1997). Цей процес чітко скоординований і МТ можуть збиратися та розбиратися у відповідь на різноманітні внутрішньоклітинні та позаклітинні сигнали (Murphy and Stearns 1996). Знижена експресія генів TUA6 і CLASP під час кліностатування може вказувати на порушення полімеризації тубуліну та послідуючого формування мережі кМТ. Це доводять дослідження самоорганізації тубуліну у паралельні пучки кМТ in vitro i відсутність цього процесу у стані близькому до невагомості (вільне падіння, кліностатування або магнітна левітація) (Papaseit et al. 2000; Tabony et al. 2006; Hoson et al. 2010). Відомо, що CLASP здатний впливати на динамічну нестабільність мікротрубочок, стабілізувати їх через сприяння формуванню трансфасціальних пучків, що загалом координує організацію МТ усієї клітини (Branzzinni and Wasteneys 2013). Посилаючись на функціонування білка CLASP, ймовірно, що зниження експресії його гена призведе до зменшення його кількості, а також до порушення стабільності МТ та дезорганізації масивів кортикальних МТ.

Безпосереднє залучення білка CLASP у реакції на кліностатування можна припустити також виходячи із того факту, що CLASP пов'язує МТ з ендомембранами та регулює транспорт ауксину, взаємодіючи із сортуючим білком нексином 1 (SNX1) (компонентом білкового комплексу, відповідального за рециркуляцію носія ауксину PIN2 у цитоплазматичній мембрані) (Kirik et al. 2007; Ambrose et al. 2013), сприяючи таким чином формуванню полярності рослинних клітин. Це може бути суттєвим при зміні механічного навантаження та переорієнтації рослини при кліностатуванні і зумовлювати інший механізм регулювання зв'язку між деполімеризацією МТ та експресією CLASP. Згідно останніх повідомлень, CLASP являється головним регулятором проліферації меристеми, процесу, у якому він інтегрує гормональні сигнали (ауксин, цитокінін та брасиностероїди) із організацією МТ (Halat et al. 2022). Тому можливо, що зниження експресії *CLASP* у ДЗР зумовлене також зниженням потреби у такій інтеграції. У Arabidopsis CLASP опосередковує також приєднання МТ до цитоплазматичної мембрани (Ambrose et al. 2011). Слід додати, що CLASP задіяний у згинанні МТ, які досягають країв клітини і взагалі, комплекс «CLASP-край клітини» можна розглядати як «тюнінговий» організатор мікротрубочок з властивою гнучкістю для створення численних моделей кортикальних MT, що спостерігаються в природі (Fishel and Dixit Struk and Dhonukshe 2014). Таким чином, завдяки своїй полі-2013: функціональності, CLASP регулює організацію мережі кМТ та їхню реакцію на зовнішній стрес. Оскільки усі вищезгадані процеси зазнають певних змін при кліностатуванні, вірогідно, що нечутливість експресії CLASP ЛО руйнування МТ забезпечує стабільність організації мережі МТ, ріст та клітинний метаболізм при даному типі стресу.

Слід додати, що мережа МТ формується через зв'язування цитозольних *γ*–тубулінових комплексів зі стороною вже існуючих кортикальних мікротрубочок, і шляхом залучення молекул α - і β -тубуліну зароджуються нові відгалуження МТ у вигляді бічних гілок. В результаті цього змінюється орієнтація масивів кортикальних мікротрубочок (Murata et al. 2005; Kato et al. 2022). Доведено, що в умовах мікрогравітації такий процес реорганізації МТ пригнічується. Окрім того, фосфопротеомні дослідження показали пригнічення фосфорилювання α -тубуліну, що в умовах реальної мікрогравітації стимулює деполімеризацію мікротрубочок (Kruse et al. 2020). Ці результати свідчать про те, що в умовах реальної мікрогравітації знижується експресія генів, пов'язаних з утворенням мікротрубочок, що може призвести до пригнічення переорієнтації мікротрубочок з поперечної на поздовжню, тим самим стимулюючи подовження клітин у гіпокотилях *Arabidopsis* (Kruse et al. 2020). Оскільки кліностатування відтворює ефекти мікрогравітації, не виключено, що даний процес відбувається і у наших експериментах.

Nick (2012) припускає існування специфічної субпопуляції МТ, задіяних у сприйнятті механічних сил. Така механосенсорна функція кМТ сприяє архітектурній інтеграції, яка мінімізує механічне напруження, створене гравітацією. Ми помітили, що навіть мінімальне спотворення кМТ при кліностатуванні призводило до зміни росту коренів Arabidopsis і це може статися, коли рослинна клітина не відчуває повною мірою вектор сили тяжіння, що знімає спрямоване навантаження з кортикальних МТ, впливаючи на їхнє функціонування. У свою чергу, відомо, що вільні МТ мають тенденцію зв'язуватися у вирівняні масиви, необхідні для встановлення нового балансу кМТ (Dixit and Cyr 2004; Deinum et al. 2011), що продемонстровано спостереженнями за розривами МТ та їхньою переорієнтацією після механічної стимуляції (Uyetterwal et al. 2012), а також експериментами in vitro, які демонструють стабілізацію МТ під натягом (Hamant et al. 2019). У культивованих клітинах ссавців мікротрубочки змінюють організацію при реальній або модельованій невагомості (вільне падіння ракети-зонда, параболічні польоти, космічні апарати, кліностат і рандомізоване позиціонування) (Vassy et al. 2001; Hoson et al. 2010; Soga et al. 2018).

Дослідження інших відмічають зниження в умовах мікрогравітації експресії генів, які кодують білки, пов'язані із клітинною стінкою (Kwon et al. 2015). Це також підтверджує зменшення механічного навантаження на континуум КС–ЦМ –МТ. Слід відмітити, що в умовах одночасного руйнування МТ і кліностатування експресія *CLASP* не зазнавала змін. Це свідчить про залежність взаємозв'язку між організацією МТ і експресією *CLASP* від зниженого гравітаційного навантаження і його відмінне регулювання від такого у некліностатованих стаціонарних рослин.

В наших експериментах аналіз експресії формінів *FH4* та *FH1* не виявив її значної зміни у проростках *Arabidopsis*, вирощених на кліностатах і це означає, що кліностатування безпосередньо не вливає на експресію *FH4* та *FH1* і, можливо, безпосередньо не впливає на функціонування білків FH4 та FH1. Оскільки, кліностатування не змінювало також експресії *FH1/FH4* навіть за умов руйнування обох елементів цитоскелету (на відміну від дії CD у стаціонарному контролі), можливо, що залежність експресії генів формінів *FH1/FH4* від деполімеризації елементів цитоскелету також регулюється поіншому в умовах зниженого гравітаційного навантаження.

Припускають, що FH1, як правило, контролює складність форми клітин (Rosero et al. 2016). Дивно, хоча FH1-GFP перебуває головним чином на ЦМ у повністю диференційованих епідермальних клітинах і присутній на ЦМ також у тканинах кореня аж до зони розтягу, цей білок переміщується декількома мембранними компартментами у клітинах обкладки і у незрілих тканинах кореня. У таких клітинах FH1–GFP знаходять у рухливих мембранних відділах всередині цитоплазми, а також у клітинах ДЗР кореня. Він також тимчасово присутній на мембрані тонопласта, на стадії коли маленькі вакуолі зливаються утворюючи велику центральну вакуоль (Kolb et al. 2015). Відомо, що надмірна експресія *FH1* в пилкових трубках *Nicotiana* та *Arabidopsis* призводила до утворення масивних пучків актину (Cheung and Wu 2004). Не виключено, що руйнування $A\Phi$ і поява у цитоплазмі G-актину знімає потребу у формуванні кортикальних АФ, що і пригнічує експресію *ACT2*. Хоча порушення функціонування FH1 повинно призвести до зменшення зв'язування актину, мікрофіламенти, здається, насправді є більш зв'язаними та менш динамічними у ризодермі та епідермі сім'ядолей у мутантів втрати функції *fh1*, тоді як рухливість мікротрубочок, навпаки, при цьому збільшується (Rosero et al. 2013, 2016; Cvrčkova and Oulehlova 2017). Це припускає більш складний взаємозв'язок і, можливо, баланс між FH1 та іншими паралогами.

Deeks та інші (2010) припускають, що механічні стимули все ж таки можуть передаватися за допомогою формінів класу І, зокрема FH4опосередковуючого континууму ЦМ-цитоскелет і, переважно, призводити до змін динаміки актину. Відповідно до запропонованої моделі МТ при цьому діють як структурний каркас, що дозволяє домену FH2 у AtFH4 виконувати свою функцію у процесі нуклеації актину. Відомо, що завдяки існуванню позаклітинного та трансмембранного домену GOE FH4 здатний передавати механічні сигнали з клітинної стінки через ЦМ на обидві мережі цитоскелету (MT ta $A\Phi$) (Blanchoin and Staiger 2008). Також, це підтверджують переміщенням похідних форміну AtFH4 без експерименти iз актинозв'язуючих доменів до місць відкладання елементів клітинної стінки після ураження клітин патогеном (Sassman et al. 2018; Oulehlová et al. 2019). Можливо, у такому випадку це необхідно для підтримання континууму клітинна стінка – ЦМ – МТ, процесу, у якому AtFH4 бере активну участь.

Під час механічного стресу, спричиненого кліностатуванням, не відмічали зворотного зв'язку між деполімеризованим тубуліном і актином і експресією гена TUA6 а також між деполімеризованим актином і експресією гена ACT2 (на відміну від контролю). Можливо, регуляція гена ACT2 організацією AФ та гена TUA6 через організацію як кМТ, так і AФ під час механічного стресу від кліностатування, здійснювалася інакше, ніж у стаціонарних рослин, оброблених OR/CD. Оскільки під час кліностатування експресія гена TUA6 не реагувала на деполімеризацію як кМТ, так і AФ, можна припустити, що даний регуляторний зв'язок між кількістю вільних мономерів тубуліну і експерсією *TUA6* не діє при зменшеному механічному навантаженні на цитоскелет. Це може означати свого роду адаптаційну реакцію і суттєву роль взаємодії МТ – АФ у протидії зниженню механічного навантаження. Усе вищезгадане сприяє стабільному функціонуванню цитоскелета та забезпечує сталий ріст кореня у стресових умовах.

При кліностатуванні зберігалася залежність експресії *ACT2* від деполімеризації МТ, що свідчить про нечутливість такого регуляторного зв'язку до механічного стресу даного типу. Не виключено, що це пов'язано із комплексною реакцією взаємодії АФ та МТ при стресі.

Знову ж таки Sampathkumar та інші (2011) продемонстрували, що повторна збірка актинових філаментів залежить від МТ та формінів. Раніше повідомлялося, що АФ і кМТ взаємодіють під час реакції клітини на збурення протопластів, і актинова мережа стає більш нерегулярною при деполімеризації МТ. Існують і інші повідомлення, що організація актину залежить від мережі МТ (Durant-Smet et al. 2020). Загалом, деталі взаємодії між МТ і АФ в кортикальній області клітини через свою багатофакторність все ще залишаються не до кінця вивченими. Було помічено, що у клітинах тварин механічні сили викликають утворення перинуклеарного актинового обідка, якому сприяє асоційований з ядерною мембраною білок формін INF2 (інвертований формін форми -2) (Shao et al. 2015). Таким чином, не виключено, що під час кліностатування мережа АФ все ж таки зазнає певних перебудов, не виявлених поточним методом.

Одним із білків, що регулюють динаміку кМТ і здатні брати участь у механічній передачі сигналу, є **MAP65-1**. МАР65-1 має високу специфічність до утворення перехресних містків по всій довжині антипаралельних МТ, що перекриваються і це свідчить про його роль в організації та стабілізації масивів МТ (Но 2009; Tulin et al. 2012). Хоча обидва домени зв'язування МТ можуть зв'язувати МТ незалежно один від одного, для успішного зв'язування МТ необхідна їхня димеризація (Smertenko et al. 2004). Мономерні субодиниці

МАР65-1, пов'язані з окремими МТ, утворюють антипаралельні димери та створюють поперечний міст між сусідніми МТ (Tulin et al. 2012). Димеризація відбувається в межах N-кінцевої області білка на стрижневих доменах (rod domain). Довжина стрижневого домена визначає як відстань між зшитими МТ, так і діапазон кутів стикання, що призводить до утворення пучків МТ. МАР65-1 зв'язує антипаралельні МТ під тупим кутом (Tulin et al. 2012). Мутація lossof function генів *тар65-1* або *тар65-2* не викликає явних дефектів поділу клітин (Lucas et al. 2011; Sasabe et al. 2011). Однак подвійний нокаут *map65-1-Ітар65-2-2* спричиняє значні дефекти видовження та проліферації клітин кореня. Коріння етиольованих мутантів мають зменшену (на один ряд) кількість клітин, порівняно з диким типом. У *N. tabaccum* показано, що білок МАР65-1 може з'єднуватися і від'єднуватися від МТ швидше, ніж відбувається ріст клітини (Chang et al. 2005), що незвично для білку, який стабілізує масиви МТ. Визначено, що МАР65-1 та МАР65-2 відіграють важливу роль у рості коренів Arabidopsis, сприяючи проліферації клітин та їхньому аксіальному розширенню (Lucas et al. 2011; Struk and Dhonukshe 2014). У епікотилях бобових рівень білків МАР65 позитивно корелює із темпами розтягування, що передбачає його потенційну роль у видовженні клітини. У клітинах суспензії моркви, рівень експресії певного МАР65 білка підвищується коли клітини зазнають швидкого подовження (Chan et al. 2003; Mao et al. 2005). Також, відомо, що MAP65-1 та MAP65-2 беруть участь у регулюванні площини поділу клітин (Dhonukshe et al. 2012). Обидва білка сприяють змінам орієнтації площини клітинного поділу, впливаючи при цьому на локалізацію асоційованого білка CLASP (Dhonukshe et al. 2012).

У наших експериментах ні саме лише кліностатування, ні застосування інгібіторів актину/тубуліну під час кліностатування не виявили значних змін у експресії гена *MAP65-1*. Можливо, функціонування MAP65-1 в організації мережі кортикальних МТ є досить стабільним і не піддається впливу даного стимулу. Однак, існують повідомлення про зниження експресії *MAP65-1* в умовах мікрогравітації, і, за припущенням авторів, це позначається на прискоренні росту гіпокотилів *Arabidopsis* у зв'язку із порушенням кортикальних МТ та послідуючого порушення організації клітинної стінки, що призводить до зниження її жорсткості (Murakami et al. 2016; Kato et al. 2022). Встановлено також, що і при сольовому стресі МАР65-1 необхідний для швидкої деполімеризації кортикальних МТ і регулює реорганізацію кМТ, забезпечуючи стійкість до сольового стресу (Ma 2019).

Серед вибраних для даного дослідження білків, ми протестували біфункціональний ген білку PLDδ, який регулює «перехресні зв'язки» між актиновими філаментами та мікротрубочками (Petrašek and Schwarzerova 2009). Однак, незважаючи на виявлену активацію під час сольового стресу та обробки ксиланазою або мастопараном (Pleskot et al. 2014), ні саме лише кліностатування, ні інгібітори полімеризації МТ або АФ не викликали будьяких змін у експресії гена *PLDδ*.

Таким чином, у наших експериментах з кліностатуванням на відміну від стаціонарного контролю не спостерігався зворотний зв'язок між порушенням організації кортикальних МТ та мікрофіламентів та експресією генів АСТ2, TUA6, між організацією МТ та експресією гена CLASP, організацією мікрофіламентів та експресією генів *МАР65-1* та *FH1/FH4*. І це свідчить про активацію специфічного механізму, який регулює динаміку цитоскелета під час кліностатування і активація якого може бути викликана усередненим мінімізованим рівнем навантаження протопласта на клітинну стінку та відповідним збуренням континууму клітинна стінка – цитоплазматична мембрана – цитоскелет. Оскільки при кліностатуванні відбувається фактичне зняття гравітаційного навантаження із кортикальних структур цитоскелету, це усуває необхідність у жорсткому цитоскелеті і впливає на транскрипційну регуляцію генів його структурних білків, пригнічуючи її. У такий спосіб кліностатування чинить механічний стрес. Поряд з цим відбувається адаптація цитоскелету до даного стимулу. Можна припустити, що кортикальні МТ відіграють провідну роль у механочутливості рослинних клітин поряд з МАР65-1 і CLASP. До цього процесу також залучені і форміни FH1/FH4.

Представлене дослідження сприяє розумінню фундаментальних принципів організації кортикальних МТ і АФ та їхньої ролі в регуляції росту рослинних клітин в умовах стресу.

7.5. Роль цитоскелету в адаптації рослин до гіпоксії

7.5.1. Формування аеренхіми коренів у повітряно-водних рослин

Завдяки несприятливим факторам середовища, серед яких значне місце займає затоплення, у рослин порушується газообмін. Це відбувається через розчинність усього 1% кисню у воді, на відміну від наявності 21% O_2 у атмосфері (на противагу, CO_2 у 200 разів більше розчиняється у воді, ніж кисень). На відміну від тварин, рослини, не мають механічних систем сприяння газообміну та транспорту рідини. У надземній частині рослини обмежений дифузією транспорт та газообмін можуть впливати на транспірацію, фотосинтетичний газообмін та метаболізм O_2 при розмноженні та розсіювання тепла під час фотосинтезу. Так само, у кореневій зоні порушуються газообмін, транспорт мінеральних речовин та ексудація ризосфери, а також розсіювання тепла.

Як у повітряно-водних рослин *A.plantago–aquatica*, так і у *S. latifolium* аеренхімні порожнини вперше відмічають у периблемі (кора на рівні меристеми). Формування аеренхіми на рівні апікальної меристеми є характерною рисою окремих видів *Rumex*, родини Pontederiaceae (*Eichhornia* Kunth, Pontederia L.) та Onagraceae (Jackson and Colmer 2005; Seago et al. 2005). Формування аеренхіми знижує потребу в кисні, що відбувається за рахунок видалення деяких клітини кори, проте, це не єдине її значення. Аеренхіма доставляє кисень до кінчика кореня та ризосфери та виводить гази (вуглекислий газ, етилен, метан) з коренів та ґрунту (Shannon et al. 1996; Colmer 2003; Fagerstedt 2010).

У A.plantago-aquatica порожнини аеренхіми сформовані розділеними рядами клітин, які відокремилися від сусідніх. Утворення порожнин аеренхіми шляхом лізису пектинової серединної пластинки клітинної оболонки та наступної реорганізації клітинної стінки в результаті чого порушуються зв'язки між клітинами і відбувається розходження рядів клітин, відносять до так званого схизогенного типу (Muhlenbock et al. 2007). Первинними етапами розвитку схизогенної аеренхіми є порушення міжклітинних зв'язків завдяки потраплянню на цитоплазматичну мембрану по треках з актинових філаментів різного роду літичних ферментів, включаючи пектинази, целюлази і геміцелюлази, які руйнують полісахаридні фібрили клітинної стінки (Voragen et al. 2009). Зруйновані клітинні стінки послаблюють міжклітинні зв'язки, чим сприяють розходженню сусідніх рядів клітин і формуванню внутрішньокореневих порожнин між клітинними рядами (Aschi-Smiti et al. 2003). Схизогенний тип аеренхіми описано для представників родин Brassicaceae (Brassicales) і Typhaceae (Poales) (Jackson and Colmer 2005; Seago et al. 2005).

У *S. latifolium* поряд із розходженням клітинних рядів відмічають деградацію частини клітин, через що аеренхіма цього виду на поперечних зрізах коренів має вигляд мережива. Деградація клітин відбувається внаслідок розвитку програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) і призводить до формування лізигенної аеренхіми (Jackson and Colmer 2005). Як відомо, програмована клітинна загибель розвивається під впливом гіпоксії та/або стресу від нестачі поживних речовин, зокрема азоту (N), фосфору (P) або сірки (S) (Bouranis et al. 2006). Такий тип характерний для певних видів родів *Glyceria R.Br., Phragmites Adans*, родини Araceae, Cyperaceae та Hydrocharitaceae. Згідно класифікації Seago та інших (2005) тип елімінації клітин у коренях *S. latifolium* можна віднести до лізигенної аеренхіми «пакетного типу» (рис. 7.6).

При такому типі аеренхіми у меристемі клітини повторно діляться вздовж радіальних рядів а новостворений ряд клітин зазнає лізису, спричиняючи формування порожнин у міжряддях (рис. 7.6).



Рис. 7.6. Формування лізигенної аеренхіми «пакетного типу» у коренях Sium latifolium (Seago et al., 2005)

Цей тип аеренхіми зустрічається і у інших однодольних, особливо у межах родини Alismatales, у *Pistia stratiotes* (Araceae) та деяких видів родини Hydrocharitaceae (Seago et al. 1999).

Оскільки, у іншого досліджуваного виду - *S. latifolium*, окрім зруйнованих клітин, спостерігається також розходження клітинних рядів, аеренхіму даного виду можна вважати схизогенно-лізигенною або змішаного типу, виявленого також у видів родин Fabaceae та Nympheaceae. Відмічається, що схизогенна аеренхіма часто передує лізигенній навіть у межах одного і того самого органу (Jackson and Colmer 2005; Seago et al. 2005). Слід відмітити, що обидва типи аеренхіми доповнюють один одного у процесі забезпечення газообміну у корені, що свідчить про пластичність рослин у пристосуванні до змін навколишнього середовища.

У *S. latifolium* загальна площа аеренхімних порожнин значно більша за таку у *A. plantago–aquatica*. Не виключено, що це зумовлено меншою товщиною кореня *A. plantago–aquatica*, кора якого містить 8 рядів клітин, у той час, як у *S. latifolium* кора складається у середньому із 20–ти рядів. Можливо, для тоншого кореня *A. plantago– aquatica* достатнім є газобмін, який не потребує таких великих порожнин, які притаманні виду *S. latifolium*.

Вважають, що через суттєву різницю у формуванні аеренхіми між генотипами рослин а також залучення аеренхіми до протидії ряду стресів, ця

ознака є перспективною для розведення сільськогосподарських культур з посиленою експлуатацією ґрунтових ресурсів (Postma and Lynch 2011).

7.5.2. Процеси програмованої клітинної загибелі при формуванні аеренхіми

Чимало факторів стресу можуть призводити до розвитку програмованої загибелі клітин. До таких абіотичних факторів відносять гіпоксію, температуру, дефіцит поживних речовин і механічний тиск. Як відомо, гіпоксія спричиняє формування у коренях схизогенної та лізигенної аеренхіми.

Вважають, що головним внутрішнім ініціатором лізигенії при гіпоксії є етилен, який при затоплені швидко накопичується всередині тканини (Jackson 1985), як це показано для пшениці (Yamauchi et al. 2014), кукурудзи (He et al. 1996 a; Gunawardena et al. 2001a) та рису (Steffens et al. 2011; Yamauchi et al. 2015). Є дані, що пов'язують етилен, АФК та низький рівень кисню і в інших рослинних системах. Так, при рості суспензії моркви на збіднілому середовищі появу етилену спостерігали через 1 день, високий рівень АФК був помітним через 4-ри дні, а інгібітори продукування АФК гальмували загибель клітин (Chae and Lee 2001). Дійсно, активні форми кисню, пероксид водню (H_2O_2) і супероксид-аніонний радикал (О.⁻²), які продукуються NAD(P)Н оксидазою цитоплазматичної мембрани та/або мітохондріями, відіграють роль сигнальних молекул та сприяють адаптації до біотичного та абіотичного стресу (Baxter et al. 2014; Ni 2018). На формування етилен-чутливої аеренхіми, впливають хімічні інгібітори або стимулятори програмованої загибелі клітин та інші сигнальні шляхи, наприклад за участю гетеротримерного G-білка, фосфоліпази С, інозитол 1,4,5-трифосфату і Са²⁺ (Не et al. 1996 b). Так, Subbaiah та Sachs (2003) припускають, що при дефіциті кисню із мітохондрій вивільняється Ca²⁺ і переходить у цитоплазму. Підвищений цитозольний Ca²⁺ провокує подальшу активацію кіназ і фосфатаз під час утворення аеренхіми (Subbaiah and Sachs 2003). Окрім того, Ca^{2+} -залежні сигнальні шляхи можуть індукувати експресію генів, відповідальних за утворення аеренхіми (Drew et al. 2000; Subbaiah and Sachs 2003).

Зовнішні умови, в результаті яких відбувається закиснення цитоплазми і активуються певні гени розпочинають процеси деградації клітин, тобто програмовану клітинну загибель. Етапи цього процесу у клітинах рослин різного типу різні автори класифікують і розподіляють у часі по-різному. Наші дослідження редукованих клітин аеренхімних порожнин у коренях S.latifolium показали, що одним із перших етапів клітинної загибелі є утворення мембранних інвагінацій і розшарування клітинної стінки. Логічно припустити, що цьому процесу передує пошкодження цитоскелетної мережі (підрозділ 6.2, 6.4). Gunawardena із співавторами (2001 а) також спостерігали, що початковими етапами загибелі клітин у коренях Z.mays, оброблених 1 ppm етиленом або 3% киснем, були інвагінації цитоплазматичної мембрани та утворення численних маленьких везикул. Відбувається також часткове руйнування клітинної стінки. Органели, такі як мітохондрії та тіла Гольджі, залишилися неушкодженими та зберігали свою чисельність до пізніх стадій розвитку ПКЗ. У нашому випадку більшість органел, але у редукованій кількості, відмічали у клітинах на кінцевих етапах їхнього руйнування.

Слід зазначити, що одним із етапів ПКЗ є елімінація ядра і це, зазвичай, відбувається шляхом руйнування ядерної мембрани та конденсації або деградації ДНК. Так, у *Z.mays* хроматин, який знаходиться в контрольних клітинах рівномірно диспергованим по всьому ядру, концентрувався на його периферії, в межах ядерної оболонки (Gunawardena et al. 2001 a). Конденсація хроматину не передувала змінам цитоплазми, описаним вище, оскільки спостереження показали, що у клітинах із конденсованим хроматином також спостерігали цитоплазматичні зміни. В той же час, у деяких клітинах із зміненою цитоплазмою не відбувалася конденсація хроматину. Gunawardena та інші (2001 a) спостерігали утворення мембранних тіл, що оточують органели, такі як мітохондрії, ЕР, апарат Гольджі та матеріал, що нагадує хроматин. Це передувало остаточній втраті вмісту клітини. Конденсація хроматину на периферії ядер є типовою для ПКЗ клітин тварин і спостерігається також при загибелі клітин рослин. Однією із ознак руйнування ядра при ПКЗ є олігонуклеосомальне розщеплення ДНК, при якому ДНК подрібнюється на олігомерні фрагменти, які при розділенні електрофорезом у агарному гелі мають характерний вигляд ДНК сходинок (DNA ladder). Kawai та інші (1998) відмічали той факт, що ядра клітини залишалися неушкодженими до пізньої стадії ПКЗ. Однак, Gunawardena із колегами (2001 а) спостерігали зміни морфології ядер, як частину (хоча і не як ранню стадію) загибелі клітин у одного і того самого виду кукурудзи і визначили, що ПКЗ у кукурудзи має особливості, характерні як для апоптозу ссавців, так і для цитоплазматичної загибелі клітин рослин. Подібність полягає у тому, що під час ініціації утворення аеренхіми зміни мембрани можуть відбуватися раніше за зміни ультраструктури ядра.

Слід відмітити, що деякі автори визначили, що міграція хроматину до ядерної периферії супроводжувалася дезорганізацією ядерної мембрани (Pedroso and Durzan 2000), при цьому TUNEL – позитивний матеріал спостерігали у тільцях, що оточували ядро. Встановлено, що апоптозоподібну деградацію ядер може спонукати також оксид азоту (NO), оскільки відомо, що гравітаційне стимулювання призводило до синтезу NO і до фрагментації ДНК. При цьому загибель клітин стимулювалася при додаванні донора NO (нітропрусиду натрію) та інгібувалася при додаванні N^G – монометил – L – аргініну (інгібітора синтезу NO) (Garces et al. 2001).

Аналіз електрофореграм показав, що у *S.latifolium* ДНК не фрагментувалася і це свідчить про цілісність ядер. Аналогічно, фрагментацію ДНК не відмічали і у рису, у якого, на відміну від *S. latifolium*, ядра зберігалися до останніх етапів клітинної загибелі (Kawai et al. 1998). Однак, відсутність ядер у редукованих клітинах у *S. latifolium* на досить ранніх стадіях все ж таки припускає руйнування ядерного вмісту. Найповніше процес зникнення ядер описано при розвитку лізигенної АР у дикоростучого *Sagittaria lancifolia* (Schussler and Longstreth 2000). У цього виду ядра зникають через аутофагію, в процесі якої специфічні вакуолі оточують і захоплюють ядра. Оскільки у рослин *S. latifolium* зрідка спостерігали скупчення вакуолей на периферії ядер, припускаємо, що це все ж таки не аутофагія, а процес формування центральної вакуолі при диференціюванні клітин. Не виключено, що у *S. latifolium* ядра зникають в результаті аутолізису, у якому не задіяні специфічні вакуолі, а відбувається поступова деградація органел, включаючи ядро. У цілому, вважають, що аутолізис і аутофагія являються специфічним типом ПКЗ для рослин (Reape and McCabe 2008; Liu and Bassham 2012) і навіть можуть відбуватися одночасно (Kabbage et al. 2013).

Деякі автори намагаються описати хронологію ПКЗ у коренях рослин, як, наприклад, для рису, хоча це складно з огляду на той факт, що загибель клітин при формуванні АР у рису є конститутивною і газові порожнини формуються в тканинах вже на перший день розвитку рослини. Kawai та інші (1998) відзначали, що у рису загибелі клітин передує закиснення цитоплазми та втрата цілісності плазматичної мембрани, при цьому газовий простір поширюється радіально. Дослідження відмічають велику швидкість початкових етапів загибелі клітин при розвитку АР в коренях як у колеоптилях, так і в коренях рису (Inada et al. 2002). У своєму дослідженні Webb та Jackson (1986) описали перші етапи руйнування клітинної стінки, а саме, початок розриву серединної пластинки вже у 6-ти годинних клітинах кори коренів рису. Також відмічали інтенсивну вакуолізацію цитоплазми. Розрив клітинної стінки ставав помітним на 12-ту годину втрати тургору; цьому передував лізис вакуолі. Попри твердження, що розрив тонопласту визначає початковий етап ПКЗ, Inada із співавторами (2002) не спостерігали жодної характерної морфології клітин, яка б відрізняла клітини, які мають загинути від тих, які зберігалися живими. Розрив тонопласту супроводжувався набряком цитоплазми, розривом цитоплазматичної мембрани, втратою клітинного вмісту та деградацією клітинної стінки, при цьому всі вищеозначені процеси відбувалися послідовно з дуже великою швидкістю.

Відомо, що після розриву вакуолі кислий рН та численні гідролітичні ферменти діють на рештки клітинних органел та ядерну ДНК, завершуючи загибель протопласта (Hara-Nishimura et al. 2005; Van Doorn and Woltering 2005). Загальна елімінація клітин, необхідна для утворення великих повітряних просторів досягається завдяки активності багатьох ферментів, що руйнують клітинну стінку. А саме, для пізніших стадій ПКЗ характерні зміни естерифікованих активація та та деестерифікованих пектинів (Gunawardena et al. 2001 b), експансинів, целюлаз, ксилоглюкан ендотрансглікозилаз (XET) та пектиназ (Jackson and Armstrong 1999). Згодом клітинна стінка деградує завдяки комбінованій дії пектолітичних, ксиланолітичних та целюлозолітичних ферментів (Jackson and Armstrong 1999; Evans 2003). Активність целюлази підвищується обробкою етиленом, окадаєвою кислотою або реагентами, які підвищують внутрішньоклітинний Ca^{2+} і знижується при дії інгібіторів виходу Ca^{2+} (He et al. 1996 b). Встановлено також, що зміни клітинних стінок ініціюються на ранніх стадіях розвитку ПКЗ, у той час, як остаточна деградація клітинних стінок виявлялася на пізніх етапах ПКЗ. Так, дослідження виявили, що у кукурудзи впродовж 3-х днів гіпоксії при утворенні АР активність целюлази посилювалася після посилення активності 1-аміноциклопропан – 1– карбоксилаз синтетази (ACC synthase) (He et al. 1994; Drew et al. 2000), ензиму, який бере участь у продукуванні етилену. Campbell та Drew (1983) також визнавали повну деструкцію клітинної стінки як пізню подію процесу клітинної загибелі у клітинах кукурудзи.

Ми вважаємо, що часткова деградація клітинної стінки у S.latifolium є однією із первинних ознак ПКЗ, при цьому рештки КС можуть зберігатися до її останніх етапів, що, у цілому, зберігає життєздатність кореня. У рису, у якого AP розвивається конститутивно, деградація клітинної стінки також є першою видимою ознакою загибелі клітин, яка при цьому не стимулюється гіпоксією або етиленом. У S.latifolium менше відомо про деградацію інших клітинних компонентів, хоча здається ймовірною участь у цьому процесі протеаз, ліпаз та інших гідролаз, які є у вакуолях, або синтезуються під час

загибелі клітин. У *S.latifolium* руйнування кМТ, яке також відбувається на первинних етапах ПКЗ, є певним внеском у розпушення КС (підрозділ 7.6.3).

Небагато відомо про припинення поширення ПКЗ і зупинку формування просторів AP у коренях рослин. Відомо, що пакування клітин також має значення і AP розвивається рідше і менш екстенсивно у тканинах, де клітини упаковані гексагонально, ніж там, де вони упаковані кубічно (Justin and Armstrong 1987; Drew et al. 2000). Іншими словами, здається ймовірним існування відмінностей щодо чутливості клітин різної морфології до подразників, що ініціюють загибель клітин – гіпоксії та етилену – або в ініційованих шляхах відповідей. Той факт, що у *S.latifolium* ПКЗ починається у певної лінії клітин кори і зникнення ядра відбувається на ранніх етапах ПКЗ, говорить про специфічне регулювання розвитку цього процесу. Однією із таких специфічних ознак може бути існування у корі кореня даного виду багатьох ділянок виникнення аеренхімних порожнин.

7.5.3. Участь мікротрубочок та актинових філаментів у реакції клітин коренів на гіпоксію

Відомо, що під час космічних польотів через низьку доступність кисню у клітинах рослин розвивається гіпоксія (Liao et al. 2004), в результаті чого порушується газообмін між підземними та наземними частинами рослин, АФК, продукуються відбувається ацидофікація середовища i започатковуються катаболічні шляхи. Оскільки все це, у кінцевому випадку, призводить до втрати врожайності рослин, набуває актуальності дослідження механізмів клітинної реакції та протидії гіпоксії. Через обмеженість доступу до експериментів із вивчення впливу гіпоксії на ріст та врожайність рослин на орбітальних космічних станціях, постає завдання розробити наземні експерименти та знайти модельні об'єкти для такого роду досліджень. Одним із таких підходів є вивчення рослин у яких гіпоксія розвивається у природних умовах. Серед таких моделей – водні та повітряно-водні рослини, частини яких занурені у водне середовище, збідніле на кисень. Як протидія гіпоксії, у коренях таких рослин утворюється аеренхіма (AP) – порожнини для сприяння газообміну між коренем та стеблом. Формування AP – комплексний процес, однією із складових якого є програмована клітинна загибель, яка веде до елімінації масивів клітин та розходження клітинних рядів. Програмована клітинна загибель розвивається поетапно, і кожний етап цього процесу характеризується певними структурними та молекулярними маркерами. Метою нашого дослідження було виявлення організації та обговорення ролі МТ та A Φ у послідовних процесах, які призводять до формування AP у коренях повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica* і *S. latifolium*. Дослідження виявили відмінності участі еМТ та кМТ у етапах формування A Φ у цих двох видів рослин (Шевченко 2021).

У *А. plantago–aquatica* при формуванні аеренхіми схизогенного типу еМТ у клітинах рядів, які відокремлюються, не зазнають дезорганізації. Кортикальні МТ частково дезорганізуються лише у клітинах тих рядів, які відокремлюються від сусідніх у процесі утворення АР: вони втрачають свою поперечну орієнтацію, стають навскісними, а подекуди, і хаотичними. У цілому, у коренях *А. plantago–aquatica* при формуванні АР схизогенного типу клітини відокремлених рядів зберігають свою прямокутну форму та трофіку, і не виключаються із архітектоніки кори. У цього виду порожнини АР утворюються між клітинними рядами, які розійшлися.

У *S. latifolium* на первинних етапах деструкції клітин еМТ також видимо не змінювали своєї організації. Типова організація еМТ зберігається до кінцевих етапів руйнуванні клітин. При цьому не відмічали різниці, чи викликаний процес ПКЗ природною гіпоксією коренів повітряно-водних рослин, чи індукований у *Z.mays* нестачею сірки у середовищі (Шевченко 2020).

На відміну від eMT, кMT у *S. latifolium*, навпаки, зазнають реорганізації у тих клітинах, які підлягають деградації під час утворення AP. Це клітини, які

прилягали до порожнин аеренхіми, де спостерігали різний ступінь дезорганізації кМТ. Як вважають, щільна мережа поперечних кМТ забезпечує форму клітини шляхом контролю за розміщення фібрил целюлози клітинної стінки (Wasteneys and Galway 2003). Впорядковані поперечні МТ необхідні руху ферментних комплексів трансмембранної целюлозо-синтетази лля (Dhonukshe and Gadella 2003), яка опосередковує відкладання і орієнтацію новосинтезованих фібрил клітинної стінки згідно напрямку орієнтації кМТ. Порушення орієнтації МТ спричиняє, у свою чергу, переорієнтування мікрофібрил целюлози, що, кінець кінцем призводить до зміни як напрямку видовження клітин так і їхньої форми (Lloyd and Chan 2004). Наші дослідження відмічали певне співвідношення ступеня поширення АР та тих клітинах, які прилягають до аеренхімних організації кМТ саме в порожнин. Мікротрубочки як меристеми, так і зони розтягу зазнавали сильнішої дезорганізації у *S. latifolium*, що, не виключає слабшу регуляцію клітинної форми. Зміна організації кМТ з упорядкованої поперечної на невпорядковану хаотичну, тобто руйнація, є одним із перших етапів лізису клітин в процесі ПКЗ, завдяки чому і формується АР лізигенного типу (Schussler and Longstreth 2000). Аналогічні спостереження були зроблені для листків Arabidopsis, у яких на ранніх етапах процесу старіння відмічали дезорганізацію МТ (Keech et al. 2010). Зміну орієнтації МТ помітили також у трахеарних елементах Zinnia, основного структурного компоненту ксилеми, необхідного для води та забезпечення провідності поживних речовин, а також, надання тканинам механічної міцності. Диференціація трахеарних елементів потребує локалізованого відкладання олігосахаридного матеріалу (вторинна клітинна стінка). Після завершення відкладання стінки, вміст клітини елімінується шляхом ПКЗ (Oda and Hasezawa 2006). У модельній системі Zinnia перед диференціюванням трахеарних елементів кортикальні МТ орієнтовані поперечно і розташовані хаотично (Kobayashi 1988). Після диференціації клітин MT утворюють товсті пучки. Із MT також пов'язане локалізоване відкладання матеріалу вторинної клітинної стінки (Oda et al.

2005). У цьому процесі $A\Phi$ і MT задіяна сумісно, оскільки для орієнтації мікротрубочок необхідний F–актин (Oda and Hasezawa 2006). Під час відкладання вторинної КС організація F–актину змінюється від поздовжньої мережі до поперечних MT пучків. Після завершення потовщення вторинних стінок A Φ та MT фрагментуються та тонопласт розривається.

Слід відмітити, що у *S. latifolium* руйнування організації кортикальних та ендоплазматичних МТ відбувається на різних етапах розвитку ПКЗ. Кортикальні МТ першими зазнають дезорганізації, оскільки розпушення КС і від'єднання МТ від ЦМ відбувається ще за функціонування екзоцитозної мережі АФ, яка забезпечує попадання ферментів лізису на мембрану та послідуючу руйнацію компонентів клітинної стінки. У свою чергу, еМТ, які упорядковують ядро та інші органели, зазнають деградації на останніх етапах ПКЗ, водночас із залишками клітинних органел. Формування АР кореня регулюється певними сигнальними шляхами, оскільки реорієнтація кМТ неможлива без їхнього від'єднанням від ЦМ. Фосфатидил-інозитольний сигнальний шлях може регулювати цей процес, оскільки одним із основних його компонентів є фосфоліпаза D, активація якої стресовим сигналом, як, наприклад, затопленням, веде до реорганізації рослинних МТ і спричиняє їхнє роз'єднання із ЦМ (Munnik et al. 2000; Sang et al. 2001). Відомо, що стрес від нестачі кисню в разі затоплення регулюється також етиленом й активними формами кисню (Muhlenbock et al. 2007). Рівень активних форм кисню, який виникає в умовах стресу та в процесах розвитку ПКЗ, веде до розпушення КС і спричиняє нерівномірність росту кореня у цілому (Shimazaki et al. 2005). Можливо, саме розпушення КС є причиною розділення рядів клітин вже на рівні меристеми у водних рослин A. plantago-aquatica i S. latifolium. Окрім того, серединна пластинка зазнає руйнування літичними ферментами, зокрема, пектиназами (Voragen et al. 2009), транспорт яких до ЦМ у меристемі може забезпечувати стала організація еМТ та АФ. Згідно наших спостережень кортикальні та еМТ задіяні у різних етапах процесів ПКЗ, яка є причиною утворення аеренхіми коренів.

Таким чином, у *A. plantago-aquatica* при формуванні схизогенної аеренхіми кортикальні МТ зазнають дезорієнтації, а ендоплазматичні – майже не змінюють своєї топографії. У *S. latifolium* при формуванні аеренхіми лізигенного типу клітини зазнають руйнування. У *S. latifolium* кМТ задіяні у первинних етапах ПКЗ і їхнє відокремлення від ЦМ призводить до дезорієнтації, а руйнування – до розпушення КС та їхньої звивистості, що кінець кінцем, є причиною втрати форми клітин. Це спричиняє вихід клітин із цитоархітектоніки ряду. Ендоплазматичні МТ зберігаються у нативному стані до пізніх етапів ПКЗ і руйнуються одночасно із рештою клітинних органел (рис. 7.7; 7.9 с).

Зовнішні чинники

Затоплення/Нестача кисню та/або поживних елементів (N, S, P)

Ļ

Початкові етапи ПКЗ: активація фосфатидил-інозитольного сигнального шляху: від'єднання кМТ від цитоплазматичної мембрани; початок анаеробного метаболізму, поява АФК, ацидофікація цитоплазми

Ļ

Дезорієнтація та дезорганізація кМТ; розпушення клітинної стінки, поява звивистих клітинних стінок, інвагінації цитоплазматичної мембрани, зміна форми клітини тощо

Ļ

Розвиток літичних процесів, деградація клітинних органел, дезорганізація еМТ

L

Елімінація клітин та руйнування міжклітинних зв'язків, формування аеренхімних порожнин

Рис. 7.7. Етапи участі мікротрубочок у формуванні аеренхіми коренів рослин

Відмітимо, що перебудова кМТ у процесі ПКЗ – це досить складний процес, який регулюється багатьма факторами. Так, вважають, що у такому процесі задіяні деякі із асоційованих із тубуліном білків, зокрема, МАР65-1, який забезпечує відстань 25 нм між мікротрубочками у деяких пучках. Докази того, що зв'язування мікротрубочок у пучки може бути важливим для ініціації ПКЗ, надають дефектні по ембріогенезу мутанти Picea, які позбавлені асоційованого з кортикальними мікротрубочками МАР65, і не піддаються ПКЗ (Smertenko et al. 2003). Під час ранньої диференціації у суспензорі зародку мікротрубочки декоровані МАР65 і початок ПКЗ супроводжується зменшенням транскрипції генів МАР65 та дисоціацією МАР65 віл мікротрубочок (Smertenko et al. 2003; Keech 2010). Далі відбувається фрагментація та деполімеризація мережі МТ. Транскрипція білка МАР18, який забезпечує розрив МТ, збільшується при активації старіння, що натякає на рушійну силу розбирання мікротрубочок при ПКЗ (Keech 2010). Деполімеризація мікротрубочок під час ПКЗ, здається, контролюється зменшенням нуклеації полімерів, пригніченням утворення пучків та посиленням розриву МТ. Про деструкцію тубулінового цитоскелету при деградаційних процесах у клітині свідчить пригнічення експресії генів тубуліну у старіючих клітинах культури тканин Arabidopsis та Petunia (Swidzinski et al. 2002; Bai 2010).

Наші дослідження не виявили видимих змін у організації актинових філаментів у клітинах при формуванні AP коренів A. plantago-aquatica i S. latifolium. Водночас, ми намагалися виявити механізми, які б опосередковано свідчили про вплив гіпоксії на актиновий цитоскелет (Шевченко та Кордюм 2016). Так, дослідження організації активного цитоскелету у клітинах коренів рослин, які зазнавали гіпоксії, виявили поступову деградацію мережі АФ, яке співвідносилося із загальним руйнуванням клітин при формуванні аеренхіми. Відомо, що ПКЗ, яка супроводжує утворення лізигенної АР, починає розвиватися із підвищеного рівня активних форм кисню у клітині. У зв'язку з цим логічно припустити збільшення кількості окиснених продуктів саме у повітряно-водних рослин *S. latifolium*, на відміну від суходільних. Аналогічну залежність зростання вмісту АФК у секторах формування аеренхіми, порівняно з тканинами, у яких не утворювалася АР, спостерігали і у коренях Z. mays при індукуванні аеренхіми (Bouranis et al. 2006). Проте, наші дослідження не виявили підвищеного вмісту окиснених продуктів у повітряно-водного S. latifolium (на відміну від його близького суходільного виду S. sisaroideum), що, однак, не виключає коливання рівня АФК, яке зумовлене тим фактом, що ПКЗ розвивається не в усіх клітинах одночасно і його загальний рівень не відображає різниці між секторами кореня, у яких формується/відсутня аеренхіма. Інша причина зумовлена коливанням рівня АФК, який важко виявити. Поряд з тим, нами виявлена на кілька порядків вища концентрація ТБК-продуктів саме у наземного представника Sium – S.sisaroideum. Слід додати, що для А. plantago-aquatica визначена така сама закономірність: збільшення кількості окиснених продуктів мембрани (концентрації ТБК-продуктів (малонового діальдегіду)) у наземної форми, порівняно із повітряно-водною (див. табл. 6. 2; підрозділ 6.4.1.).

Водночас, дослідження перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) на етапі утворення пероксидних радикалів ліпідів шляхом реєстрації інтенсивності спонтанної хемілюмінесценції виявило її збільшення у повітряно-водних форм на всіх етапах онтогенезу *A. plantago–aquatica*, у той час, як у наземної форми цей показник спочатку підвищувався, а потім знижувався. Це свідчить про різний рівень утворення радикалів LOO' у коренях частухи. Окрім того, у коренях *A. plantago-aquatica* підвищувався рівень загальної антиоксидантної активності на всіх етапах розвитку рослин. Також, підвищувалася активність супероксиддисмутази (СОД). Поряд з тим, відмічено, що інтенсивність ПОЛ зазнавала значно більших коливань у наземних рослин *A. plantago–aquatica* (Кордюм та ін. 2003). У зв'язку з цим припускають, що вищий рівень утворення АФК та ПОЛ у наземної *A.plantago-aquatica* супроводжується вищою активністю як низькомолекулярних антиоксидантів, так і СОД, що є суттєвим для адаптації наземних рослин до помірного водного дефіциту.

Підвищений рівень утворення АФК та ПОЛ у частухи може бути наслідком інтенсивніших метаболічних процесів у клітинах коренів а також впливати на інтенсивність метаболізму. Згідно припущень, активація окиснення вільними радикалами призводить до зміни відносного складу ліпідів мембран, її проникності та в'язкості. Склад ліпідів мембран визначає ліпід-білкову взаємодію і активність мембранно-зв'язанних ферментів, а також ДНК– та РНК–полімераз, що впливає на інтенсивність метаболізму, ріст та розмноження клітин. Тому не виключено, що підвищенний рівень вільнорадикального окиснення у наземної *А. plantago–aquatica* порівняно із повітряно-водними рослинами зумовлює прискорення онтогенезу (Кордюм та ін. 2003).

Можливо припустити, що підвищений вміст АФК не є критичним фактором для процесу утворення порожнин конститутивної аеренхіми повітряноводних рослин. Водночас, оскільки мікрофіламенти беруть участь у багатьох сигнальних шляхах, не виключено, що вони є складовою механізму перетворення сигналів зовнішнього середовища у ПКЗ (Leadsham et al. 2010). Про це може свідчити також виявлене посилення транскрипції гена актину у старіючих клітинах культури тканин *Arabidopsis* та *Petunia* (Swidzinski et al. 2002; Bai 2010). Участь актинового цитоскелету у розвитку процесів ПКЗ підтверджують і дослідження інших. Так, Тіап та інші (2009) навіть припускає можливість зміни актинового цитоскелету рослин як безпосередньої ланки процесу ПКЗ. Показано, що актиновий цитоскелет є водночас і ефектором і мішенню ПКЗ (Gourlay and Ayscough 2005). Це ґрунтувалося на висновках Нао та August (2005), які показали, що деполімеризація актину може активувати клітинний сигналінг, посилювати активацію фактора транскрипції і подовжувати вивільнення Ca²⁺ в лімфоцитах крові. Подібний сценарій може відбуватися і у клітинах рослин.

Фармакологічний підхід також продемонстрував, що зміни динаміки актину можуть спричинити ПКЗ у тварин, дріжджах, і клітинах рослин (Franklin-Tong and Gourlay 2008; Smertenko and Franklin-Tong 2011).

Оскільки стабілізація або деполімеризація актину можуть стимулювати ПКЗ, було запропоновано, що стійкі зміни активної динаміки $A\Phi$ в будь-якому напрямку відіграють функціональну роль у ініціації ПКЗ. Реорганізація F–актину під час ПКЗ може відбуватися за декількома сценаріями. Для першого характерне утворення пучків товстих кабелів актину, яке спостерігали на кількох прикладах гіперчутливої реакції-відповіді на патоген та розвитку ПКЗ (Smertenko et al. 2003; Shimada 2006; Higaki 2007; Schwarzerova et al. 2010). Це, ймовірно, пов'язане зі зниженою активністю білків, які розщеплюють та кепують «колючий» кінець філаменту та активністю зв'язуючих білків, які пучкують актинові філаменти. У другому сценарії, який спостерігали при реакції самонесумісності пилку, спочатку відбувається деполімеризація F–актину з подальшим утворенням точкових актинових скупчень, які є маркером ПКЗ (Snowman et al. 2002; Franklin-Tong and Gourlay 2008).

Відомо, що у багатьох моделях розвитку ПКЗ мікротрубочки постійно деполімеризуються (гіпервідповідь на патоген та реакція самонесумісності пилку, суспензор зародку). Мікротрубочки послаблюють динаміку F–актину за рахунок уповільнення швидкості полімеризації та деполімеризації (Smertenko et al. 2010), тому деполімеризація МТ може спричинити швидку реструктуризацію мережі F–актину під час ПКЗ (Barton 2008).

Динаміка актину, а саме, швидкість розбирання/збирання полімера мікрофіламента, безпосередньо впливає на участь $A\Phi$ у різноманітних клітинних реакціях і забезпечує ефективність сигнальних та метаболічних клітинних процесів. Відомо, що підвищена концентрація $A\Phi$ K регулює динаміку мікрофіламентів, знижуючи її (Leadsham et al. 2010; Wilkins et al. 2011; Liu et al. 2012), оскільки відмічають руйнування $A\Phi$ підвищеною концентрацією $A\Phi$ K (Liu et al. 2012). Встановлено також, що низька концентрація $A\Phi$ K, навпаки, посилює динаміку $A\Phi$ (швидкість розбирання та збирання полімера) у тваринних клітинах, а також у дріжджів і рослин (Leadsham et al. 2010; Wilkins et al. 2011).

Загалом припускають, що динамічний стан АФ (у нашому випадку інтактні АФ) свідчить про «здоровий стан клітини», у той час, як знижена динаміка актину (частково зруйновані філаменти АФК) є індикатором деградаційних процесів у клітині. У зв'язку з цим не виключене існування чутливого механізму, який реагує на пошкодження АФ. Провідну роль у регуляції актиновим цитоскелетом рівня АФК відводять з'єднанню АФ із мітохондріями. Актин може асоціюватися із каналами у мембрані мітохондрій і регулювати їхнє закриття або відкриття. Часткове порушення організації актину призводить до відкриття каналів впродовж довгого часу, що редукує мембранний потенціал та збільшує викид АФК у цитоплазму. На противагу, нативні АФ можуть зменшувати час відкриття каналів, що, у свою чергу, зменшує вихід АФК, призупиняючи поширення деструктивних процесів ПКЗ (Gourlay et al. 2004). У експериментах на клітинах тварин підтверджений зв'язок між актин-асоційованим білком гельзоліном і регуляцією аніонних каналів мітохондрій і індукуванням апоптозу (Kusano et al. 2000). Це може відбуватися через те, що АФК посилюють актинстабілізуючу функцію білка гельзоліну через утворення S-S зв'язків між амінокислотами. Результатом є вивільнення «загострених» кінців» у мікрофіламентів і посилення їхньої полімеризації (Moldovan et al. 2006).

Слід нагадати, що на рівні світлової мікроскопії важко виявити перебудови АФ у клітинах тканин і зон коренів *S. latifolium*, що, однак, не виключає зміну динаміки АФ під час утворення АР за умов зниженої концентрації АФК (у порівняні із наземними рослинами).

Згідно наших експериментів щодо вимірювання перекисного окиснення, знижена динаміка актину, а отже, часткова деполімеризація (руйнування) мережі $A\Phi$, притаманна суходільним генотипам рослин A. plantago-aquatica та S. latifolium, а інтактні динамічніші $A\Phi$ – їхнім повітряно-водним формам та близьким видам. З одного боку, такий феномен можна пояснити видовою особливістю рослин. З іншого боку, знижений рівень АФК у повітряно-водних A. plantago-aquatica та S. latifolium, на відміну від суходільних рослин, може бути пов'язаним із двома факторами. По-перше – динамічні інтактні АФ сприяють екзоцитозу, попаданню на мембрану та у позаклітинний простір літичних ферментів. Це, у свою чергу, призводить до розшарування клітинної стінки, руйнування міжклітинних зв'язків та розділення рядів й утворення порожнин, як це відбувається у випадку формування схизогенної АР у A. plantago-aquatica та на перших етапах ПКЗ при формуванні лізигенної АР у S. latifolium. На противагу до A. plantago-aquatica, руйнування клітин у рослин S. latifolium – тривалий процес і АФ, можливо, беруть участь у екзоцитозі та постачанні літичних ферментів у зовнішньоклітинний простір, процесах, які супроводжують ПКЗ та забезпечують ріст кореня. По-друге, регулювання АФ через АФК є необхідним також і для розвитку та росту клітин коренів. У свою чергу, частково деполімеризовані, менш динамічні АФ суходільних форм (у яких концентрація АФК загалом більша за таку у повітряно-водних рослин) задіяні у інтенсивних метаболічних процесах, які забезпечують клітинний ріст у той час, як у повітряно-водних рослин АФ задіяні у екзоцитозі та клітинному трафіку, а АФК є причиною деградаційних процесів. Не виключено, що значне підвищення рівня АФК відбувається перед запуском процесів ПКЗ. Схема участі АФ у деградаційних процесах ПКЗ із підвищеним та зниженим рівнем ПОЛ (відносно одне одного) представлена на рис.7.8.

Повітряно-водні рослини	Наземні рослини
ŧ	↓ I
знижений рівень ПОЛ	підвищений рівень ПОЛ
ţ	ŧ
підвищена динаміка (полі-	знижена динаміка (деполі-
меризація) актину	меризація) актину
Ļ	ţ
ростові процеси коренів	ростові процеси коренів
ţ	
забезпечення екзоцитозу,	
клітинного трафіку та	
збереження ростової	
функції при розвитку	
деструктивних процесів	
ПКЗ; ріст кореня	

Рис.7.8. Етапи формування аеренхіми коренів у повітряно-водних та наземних рослинах із залученням актинових філаментів

Таким чином, наші дослідження довели участь МТ та АФ у реакціях, які відбуваються у коренях рослин при формуванні аеренхіми як внаслідок розходження клітинних рядів, так і в результаті розвитку процесів клітинної загибелі. Серед таких реакцій – швидка дезорганізація кМТ та руйнування при утворенні АР лізигенного типу та дезорієнтація кМТ при формуванні АР схизогенного типу (рис. 7.9).



Рис. 7.9. Організація кортикальних мікротрубочок у коренях повітряноводних рослин *A. plantago–aquatica* та *S. latifolium* у нормі (а) та на перших етапах розвитку схизогенної (b) та лізигенної аеренхіми (c)

Вказані процеси є первинними етапами ПКЗ, які передують численним деградаційним процесам. Ендоплазматичні МТ разом з АФ руйнуються поступово, чим зберігають трофіку кори та дозволяють ріст кореня і життєдіяльність рослини.

7.6. Цитоскелет – первинний компонент динамічної системи реагування рослин на зовнішні подразники

Сумісне розміщення мікротрубочок і актинових філаментів у кортикальній області клітини а також механічні властивості їхньої структури, які узгоджуються із навантаженням від сили тяжіння, робить цитоскелет ідеальною структурою для сприйняття та реалізації відповіді на зовнішні сигнали, у якій елементи цитоскелету відіграють як кожний свою окрему, так і взаємозалежну роль. У рослин, як у організмів, позбавлених рухливості, одна із характерних рис цитоскелету – його надзвичайна динамічність (у 10 разів більша швидкість вкорочення (195 мкм/хв у порівнянні із 21 мкм/хв у мікротрубочок тварин) (Elliott and Shaw 2018), що сприяє швидкій перебудові клітинного метаболізму і, як наслідок, швидкій реакції на зміну навколишнього середовища. У рослин обидва комплекси нуклеації мікротрубочок – γ-TuRC розташовані на ядерній оболонці і цитоплазматичній мембрані і ЦМ є, зазвичай, домінуючим місцем зародження МТ під час інтерфази (Nakamura et al. 2010), що вказує на важливість швидкої побудови МТ саме у місцях сприйняття та проходження клітинного сигналінгу.

Змінена сила тяжіння і нестача кисню у середовищі – одні з найменше вивчених факторів впливу на рослини, дослідження яких має значення для покращення врожайності не лише під час космічних польотів але і для наземних умов. Визначення прикладів адаптації до нестачі кисню/поживних речовин серед рослин у природі та дослідження рослин в умовах модельованої мікрогравітації (факторів, які являють собою біохімічний та фізичний типи стали основою експериментальної бази нашого дослідження. crpecy) Застосування кліностатування та інгібіторного аналізу надало змогу не лише мінімізувати спрямовуючу дію гравітації та викликати механічний стрес але також шляхом елімінації визначити деталі механізму регуляції кожного елемента цитоскелету у ростових реакціях коренів та їхньої реакції на стрес. Окрім того, застосування інгібіторів актину і тубуліну – цитохалазину і частково моделювати зміну динаміки полімерів дозволяє оризаліну цитоскелету (переважання деполімеризації над полімеризацією).

Дія кліностатування на клітини, позбавлені статолітів відбувається згідно протопластної моделі тиску, яка передбачає диференційний тиск та напруженість цитоплазматичної мембрани як результат відчуття гравітації, і була запропонована Wayne та Staves (1996), які частково пов'язували її з конкретним класом безкрахмальних мутантів, що реагують на гравітацію майже так само, як і дикий тип. Відповідно до нестатолітних механізмів, незначний зсув цілого протопласта водорості *Chara* (близько 1 нм) через гравітаційну стимуляцію створює великі потенційні зміни енергії, що здатне спричинити деформацію в позаклітинних з'єднаннях матриксу і відчувається, ймовірніше за все, МЧ каналами (Wayne et al.1992). Чутливість молекулярного механізму, створеного МЧ каналами та цитоскелетом, буде досить високою для виявлення деформації у з'єднаннях клітина-позаклітинний матрикс. Існує також робоча модель функціонування МТ у розшифровці стресових сигналів. Мікротрубочки з підвищеною стійкістю можуть діяти як (механо–) рецептори та МТ з підвищеною динамікою можуть безпосередньо сприймати механічну напругу. Прогнозується, що осмотичний стрес, дотик або поранення і холодний стрес по-різному взаємодіють із рецепторними та перцепторними популяціями МТ.

Наші експерименти показали, що кліностатування позначається на частковій дезорганізації кМТ і це відбувається на тлі зниження експресії генів, які кодують тубулін (TUA6) і асоційований білок CLASP- регулятор динаміки плюс–кінців МТ (Nakamura et al. 2018). Мікротрубочки динамічні як на плюс–, так і на мінус–кінцях, на яких постійно відбувається (де)полімеризація, що веде до динамічної нестабільності. Короткі бігові доріжки (тредміллінг) мікротрубочки (0,5 – 2 мкм) становлять близько 90% бігової доріжки всієї мікротрубочки і є значним внеском у остаточну організацію і динаміку кортикальних МТ (Chomicki et al. 2016). Оскільки напруга виникає від клітинних стінок, то примембранна локалізація кМТ є ідеальною для відчуття сигналів у кортикальній області клітини. Однак, якщо МТ зазнають напруження, розтягування або стиснення, вони відповідно подрібнюються і згинаються (Kabir et al. 2014). Таким чином, зниження рівня полімеризації МТ та недостатності білка CLASP може призвести до зміщення динамічної нестабільності і переважаючого стану розбирання полімера. У свою чергу, це позначиться на змінах у організації мережі кМТ. Таким чином, зменшене спрямоване механічне навантаження, у цілому, може послаблювати жорсткість масивів кМТ. Показано, що, окрім нуклеації, кМТ утворюють організовані масиви спонтанно шляхом (де)полімеризації, зв'язування та розбирання (Wasteneys and Ambrose 2009) і, логічно припустити, що У випадку механічного стресу МТ після часткової дезорганізації мережі знову реорганізовуються у вирівнянні масиви згідно напрямку максимального розтягування (Hamant et al. 2019). У цілому, це забезпечує стабільність росту кореня за даних умов.

Доведено також, що в умовах мікрогравітації пригнічується переорієнтування масивів МТ шляхом порушення формування їхнього галуження (Kruse et al. 2020). Слід зазначити, що механічний супротив гравітаційному прискоренню є основною реакцією рослин на силу тяжіння, рівною гравітропізму. Цю реакцію називають «опір гравітації» і його природа та механізм досліджують у наземних експериментах з використанням відцентрової гіпергравітації (Hoson et al. 2005, 2010). Результати показали, що модифікація анізотропії росту, а саме пригнічення елонгації і стимуляція латерального розширення шляхом переорієнтації кортикальних МТ з поперечних на поздовжні сприяє стійкості рослин до гіпергравітації. Також припускають, що кМТ відіграють певну роль у реакції клітин на 1 g (Kato et al. 2022).

Інший елемент цитоскелету еукаріот – *актинові філаменти*, організація якого подібна у всіх еукаріот, є важливою молекулярною машиною, яка створює структури і генерує сили, які підтримують різноманітні клітинні функції, включаючи морфогенез, клітинну полярність і моторику. У рослинних клітинах реакції на дію гормонів або на атаку мікроорганізмів разом із шляхами клітинного морфогенезу індукують передачу сигналів, до яких залучені перегруповання або зміна актинового цитоскелету (Blanchoin et al. 2010).

У клітинах коренів вищих рослин, як суходільних (на прикладі *B.vulgaris, Z.mays* та *A.thaliana*), так і повітряно– водних (*A. plantago–aquatica* та *S. latifolium*) актиновий цитоскелет являє собою мережу поодиноких, перехрещених та/або пучкових філаментних конструкцій. Ці масиви постійно перебудовуються і забезпечують внутрішньоклітинний рух різноманітного вантажу, включаючи мітохондрії, ER, везикули Гольджі (Sparkes et al. 2008), пероксисоми (Collings et al. 2002) та хлоропласти (Takagi et al. 2009). АФ також причетні до транспортування везикул між ендомембранними компартментами до та від цитоплазматичної мембрани (Gutierrez et al. 2009). Структури АФ відповідають і за підтримку архітектури клітин, регулюючи
динаміку вакуолярного та трансвакуолярного компартментів (Sheahan et al. 2007). Актин бере участь у регуляції як дифузного росту соматичних клітин, так і спрямованого верхівкового росту пилкових трубок і кореневих волосків (Szymanski and Cosgrove 2009). Так, у клітинах із верхівковим типом росту АФ формують видиму структуру – ущільнену апікальну мережу (комірець), яка сприяє розтягуванню верхівки клітин шляхом спрямування секреторних везикул, регулювання їхньої вбудови і злиття із ЦМ (Snowman et al. 2002; Thomas et al. 2003).

Наші дослідження кліностатованих *Arabidopsis* не виявили видимих змін мережі АФ у клітинах коренів від даного стресу. Проте, відомо, що організація масиву кортикальних актинових філаментів у клітинах коренів є складною і філаменти, в основному, розташовані у вигляді переплетеної мережі, за винятком деяких масивних кабелів актину, які мають сітчасту осьову орієнтацію, і їхній зовнішній вигляд/поширення постійно змінюється (Staiger et al. 2009). У мережі окремі актинові філаменти постійно нуклеюються і розпадаються. Такий механізм обороту актину з передбачуваним і швидким ростом філамента, який збалансований випадковими розривами, називають «стохастичною динамікою».

В результаті досліджень виявилося, що у стаціонарному контролі організація $A\Phi$ впливає на експресію формінів – білків, які регулюють з'єднання актинової мережі із цитоплазматичною мембраною. Так, часткове руйнування $A\Phi$ призводить до пригнічення експресії форміну *FH1* та посилення експресії форміну *FH4*, що доводить різну роль вказаних білків одного класу (I) у регулюванні організації мережі $A\Phi$. Не виключено, що різниця зумовлена тим, що FH1 задіяний у стабілізації масивів $A\Phi$ а FH4 бере участь у сумісній активності $A\Phi$ та MT, і така його функція підсилюється під час руйнування $A\Phi$. Відомо також, що обидва FH1 та FH4 опосередковують зв'язок $A\Phi$ із ЦМ. Оскільки експресія *FH4* посилюється при руйнуванні $A\Phi$ у стаціонарних рослин, можна припустити, що це має певне суттєве значення для підтримання зв'язку КС–ЦМ–цитоскелет при стресі, особливо, коли цей зв'язок частково порушений зменшеною експресією *FH1*.

Цікавим надбанням роботи є виявлений вплив організації АФ на експресію *MAP65-1*, широко дослідженого білка–регулятора організації кМТ. Слід відмітити, що MAP65-1 може зв'язуватися із АФ через інші асоційовані білки а також завдяки численним сайтам фосфорилювання кіназами різного типу (не повністю дослідженими), може набувати нових функціональних ознак, серед яких – здатність зв'язуватися і з АФ, що відкриває перспективи для виявлення його ролі у комплексній регуляції взаємозалежного функціонування елементів цитоскелету.

Широко відомо, що $A\Phi$ організаційно взаємодіють із кМТ і разом беруть участь у сигнальних реакціях на зовнішні стимули, що також є внеском у динамічність цитоскелету. Про це свідчить перехресна реакція МТ на дію цитохалазину та реакція $A\Phi$ на дію оризаліну а також вплив організації МТ на експресію *ACT2* та вплив організації $A\Phi$ на експресію *TUA6*.

При кліностатуванні зберігалася залежність експресії ACT2 від деполімеризації МТ, а саме, її зниження при дії ОR. Вищевказане свідчить про нечутливість такого регуляторного зв'язку до механічного стресу даного типу. Не виключено, що це пов'язано із загальною комплексною реакцією взаємодії $A\Phi$ та МТ при стресі. Проведені експерименти виявили, що вплив організації МТ/ $A\Phi$ на експресію їхніх генів (*TUA6*) і генів асоційованих білків (*CLASP*, *MAP65-1, FH1* та *FH4*) також не проявляється при кліностатуванні і це доводить можливість існування специфічного механізму регуляції взаємодії елементів цитоскелету при зниженні механічного навантаження від 1–D кліностатування. У такий спосіб кліностатування, як механічний стрес, траскрипційно регулює гени-регулятори білків мережі кортикального цитоскелету і впливає на полімеризацію елементів цитоскелету (рис.7.10).



Рис. 7.10. Схематичне зображення впливу мехнічних сил при кліностатуванні на експресію генів та полімеризацію елементів цитоскелету

Щодо механочутливості рослин, то припускають, що вона відбувається згідно двох механізмів. Один з них полягає у існуванні механорецепторів на цитоплазматичній мембрані (MSL9 та MSL10) (підрозділ 7.2.3), а іншій – у клітинної стінки опосередкуванні механочутливості за допомогою (Monshausen and Gilroy 2009). Хоча цитоплазматична мембрана ϵ проміжною між протопластом і зовнішнім середовищем і сприяє перетворенню багатьох сигналів навколишнього середовища у фізичні, зовнішній механічний стрес спочатку буде діяти на клітинну стінку рослини, що оточує протопласт і викликати її деформацію. Оскільки великий гідро-статичний тиск у 2-50 атмосфер, що створюється протопластом (тургором) притискає ЦМ до клітинної стінки, ця деформація буде негайно відчуватися цитоплазматичною мембраною. Така система спостереження за допомогою клітинної стінки може безпосередньо контролювати стан полімерів КС або діяти через супутню вторинну деформацію ЦМ та пов'язаний з нею цитоскелет (Roberts et al. 2004; Monshausen and Gilroy 2009).

У цілому ж, процес реакції та адаптації цитоскелету до мінімізованого гравітаційного навантаження можна представити наступним чином. Так, при дії кліностатування кортикальний цитоскелет, цитоплазматична мембрана та клітина стінка зазнають рівномірного тиску протопласта (в результаті тургора), що є проявом механічного стресу, оскільки цей тиск менший, що, на відміну від стаціонарних умов, викликане зміною положення рослини (рис.7.11 а). В результаті активуються механочутливі мембранні канали, серед Са^{2+ -} чутливі, які, у свою чергу, яких – розтяг – та пов'язані із мікротрубочками та актиновими філаментами (рис.7.12 а). Сприйняття механічного сигналу веде до його передачі у ядро, скоріше за все, за допомогою Ca²⁺ та фосфатидилінозитольного сигнального шляху. B peзультаті змінюється експресія гену структурного білка MT (TUA6) та пов'язаного із організацією мережі МТ – гену, який кодує білок *CLASP*. Зниження експресії *TUA6* та *CLASP* призводить до зменшення кількості вказаних неполімеризованих мономерів тубуліну та білка CLASP у цитоплазмі та позначається на стані кортикального цитоскелету, а саме, сприяє розрідженню кМТ, послабленню жорсткості їхньої мережі і веде до послідуючого зниження жорсткості клітинної стінки, що, у кінцевому випадку, є причиною дискоординації росту клітин і усього кореня (рис.7.12).

Другий механізм реагування на модельовану мікрогравітацію полягає у тому, що КС може впливати на жорсткість кортикальних МТ і при цьому мікротрубочки і КС самі можуть виступати сенсорами механічних сигналів, що, ймовірно, результує у порушенні їхньої полімеризації і появі деполімеризованого тубуліну. Можливо, що при цьому збільшення кількості мономерних субодиниць тубуліну зворотно пригнічує експресію гена як структурного (TUA6), так і асоційованого білка мікротрубочок (CLASP) (7.11 а). Це може відбуватися як через активацію специфічних транскрипційних факторів (пертурбації мережі МТ та АФ здатні активувати певні транскрипційні фактори, що обговорювалося вище), так і через досі невизначений механізм.

Водночас, навіть часткове руйнування елементів цитоскелету при кліностатуванні не зменшує експресію *ACT2* та генів асоційованих із цитоскелетом білків FH4, FH1 та MAP65-1 (рис.7.11 b).



Рис.7.11. Схема адаптаційних механізмів за участю цитоскелету при кліностатуванні: безпосередня реакція на кліностатування тубулінового цитоскелету (а); механізм адаптації до зменшеного механічного навантаження за участі елементів цитоскелету (b)

Така реакція, на наш погляд, є проявом пристосування цитоскелету до нових умов навантаження, однією із складових якої є незмінна активність вказаних білків, необхідна для взаємодії елементів цитоскелету, його з'єднання із ЦМ та забезпечення ростової функції. Це твердження підтримується нашими експериментами щодо дослідження експресії генів після 1-2 днів кліностатування, адже у такому випадку йдеться не про початкову реакцію, а про адаптацію та стабільний ріст клітин при кліностатуванні. Дослідження експресії на більш ранніх термінах (впродовж 1-6 годин) могло б надати точнішу інформацію про початкові перебудови цитоскелету, але на таких термінах ще не видно різниці серед ростових показників коренів. Окрім того, попередньо проведені дослідження експресії вказаних генів після 6 – 12 год дії стимулу не відображали сталих результатів і експресія вищеозначених генів стабілізувалася лише після 1 доби впливу інгібіторів.

Таким чином, організація елементів цитоскелету, а саме, його полімеризація та деполімеризація, здатні транскрипційно регулювати гени, які кодують його структурні і асоційовані білки-регулятори. Ймовірно, це відбувається впродовж реакцій клітини на зовнішній стрес і включає взаємодію елементів цитоскелету із ЦМ і КС. Усі компоненти вказаного континууму функціонально пов'язані, що забезпечує швидку реакцію і пристосування до змінних умов довкілля.

Відомо, що також цитоскелет задіяний і у внутрішньоклітинних сигнальних реакціях, зокрема, ПКЗ внаслідок нестачі кисню або поживних речовин. Динамічна зміна організації цитоскелету, так само, як і у випадку реакції на механічний (фізичний) стрес є також складовою розвитку внутрішньоклітинних процесів, сигналінг яких опосередковують АФК та інші фактори катаболізму. У цьому випадку у перебудові мережі кортикального цитоскелету також задіяні асоційовані із цитоскелетом білки, виявлення яких стає перспективним напрямком дослідження.

Нами встановлено, що на послідовних стадіях ПКЗ цитоскелет виконує різні ролі – від участі у пом'якшенні клітинної стінки до зберігання трофіки клітини і можливого упередження розповсюдження руйнування на сусідні клітинні ряди. Кортикальні МТ, як у випадку реакції на механічний стрес, задіяні у первинних етапах розвитку ПКЗ, на яких відбувається руйнування жорсткого каркасу МТ, що призводить до пом'якшення та порушенні цілісності КС, втрати клітинної форми та появи інвагінацій ЦМ. Це характерно як для клітин рослин, у яких ПКЗ розвивається як закономірний процес онтогенезу (при формуванні АР коренів повітряно-водних рослин), так і для клітин коренів тих рослин, у яких розвиток ПКЗ індукували штучно (*Z.mays*). Ендоплазматичні МТ разом із АФ зазнавали руйнування на кінцевих етапах ПКЗ, тим самим підтримуючи трофіку тканин коренів і запобігаючи розповсюдженню процесів ПКЗ на більшу площу кореня, що зберігало його життєдіяльність.

Наголошуємо, що спільним же у реакції цитоскелету коренів на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію є перебудови кортикальної мережі MT. У випадку кліностатування та утворення схизогенної аеренхіми у клітинах коренів порушується організація кортикальних MT, відбувається їхнє розшарування та відхилення від поперечної орієнтації. Це, у свою чергу, позначається на пом'якшенні клітинної стінки та послідуючих змінах темпів росту коренів та/або відокремленні клітинних рядів внаслідок послаблення міжклітинних з'єднань. Тому не виключено, що цей процес регулюється динамікою MT (полімеризацією/деполімеризацією). АФ помітно не реагували на кліностатування навіть при частковій деполімеризації та руйнуванні їхньої кортикальної мережі. Проте, у такій реакції можуть брати участь інші численні асоційовані із АФ білки, які регулюють галуження і організацію мережі АФ і які досі лишаються не вивченими всебічно.

Загалом, наші дослідження підтверджують, що увесь комплекс білків цитоскелету є одним із первинних ключових елементів клітинного сигналінгу, завдяки якому рослини реагують і швидко пристосовуються до мінливих

навколишніх умов. Саме у кортикальній області клітини мережа МТ та АФ разом із асоційованими білками формує складну чутливу структуру, здатну сприймати і реагувати на зміну механічного навантаження а також брати участь у реакції–відповіді клітин на гіпоксію.

Аналіз результатів роботи складає підгрунття для широкої перспективи розгляду таких малодосліджених питань як адаптація цитоскелету до механічного стресу та гіпоксії, а саме: 1) регуляція динаміки МТ та АФ численними асоційованими білками; 2) транскрипційна регуляція структурних генів цитоскелету та асоційованих білків, які забезпечують динамічне функціонування континууму КС–ЦМ–цитоскелет; 3) сигналінг за участі цитоскелету при реакції на механічний стрес та гіпоксію та багатьох інших. У свою чергу, це окреслює чітку перспективу для напрямків, розробка яких сприятиме розвитку фундаментальних та прикладних досліджень космічної біології та біології стресу рослин. Представлені у роботі дані є внеском у розвиток біотехнологій стійкості, націлених на розвиток рослинництва, здатного давати високі врожаї під час довготривалих космічних місій а також при швидких несприятливих змінах екологічних умов.

ВИСНОВКИ

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

- 1. Повільне одноосьове кліностатування спричиняє часткову дезорганізацію мережі кортикального тубулінового цитоскелету, що проявляється у відхиленні окремих мікротрубочок від поперечної орієнтації у клітинах зони розтягу коренів проростків B. vulgaris, A. thaliana та Z. mays (10-13% клітин). При кліностатуванні відбувається зниження рівня експресії генів TUA6 та CLASP у коренях, що вказує на чутливість процесу полімеризації мікротрубочок та просторової організації їхньої кортикальної мережі ДО зміни механічного навантаження. Дезорієнтація мікротрубочок у клітинах зони розтягу є внеском у зміну темпів росту коренів.
- 2. Показана залежність між деполімеризацією мікротрубочок та *ТUA6* та зниженням експресії генів CLASP. a також між деполімеризацією мікро-філаментів та зниженням експресії генів АСТ2, MAP65-1, FH1 та FH4. Це свідчить про регуляторний зв'язок між динамікою цитоскелету та транс-крипцією генів, які регулюють його

структурну організацію та взаємодію елементів, функціонування мережі, а також опосередковують з'єднання цитоскелету із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою.

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

- мікротрубочки 6. Вперше визначено, ЩО кортикальні клітин конститутивної аеренхіми схизогенного типу у повітряно-водних рослин A. plantago-aquatica характеризуються частковою втратою поперечної орієнтації, натомість вони стають навскісними та невпорядкованими, що призводить до порушення організації клітинної стінки, послаблює міжклітинні зв'язки та сприяє розходженню клітинних рядів. Однак, при такій реорганізації мікротрубочок клітини зберігають свою форму і трофіку і не виключаються із архітектоніки кори кореня.
- 7. Вперше визначено, що для S.latifolium характерна змішана аеренхіма схизогенна сотового типу та лізигенна пакетного типу, що значно розши-рює адаптаційні можливості рослини у протидії гіпоксії. Специфічні ознака утворення лізигенної аеренхіми зникнення ядра та вакуому на первинних етапах клітинної загибелі і збереження зменшеної кількості інших клітинних органел до останніх етапів руйнування.
- 8. Руйнування мережі кортикальних мікротрубочок відбувається вже на первинних стадіях формування лізигенної аеренхіми коренів природним шляхом у *S.latifolium* та індукованим у *Z. mays*, що призводить до розпушення клітинних стінок і втрати характерної форми клітини. Ендоплазма-тичні мікротрубочки дезорганізуються на останніх етапах редукції клітин.
- 9. Мережа актинових філаментів при формуванні аеренхіми лізигенного типу руйнується поступово згідно з етапами програмованої клітинної загибелі у коренях рослин. У повітряно–водних *S. latifolium* актинові філаменти опосередковують екзоцитоз до кінцевих етапів редукції клітин, завдяки чому процес загибелі проходить поступово, що сприяє збереженню клітинних рядів і трофіки кореня.
- 10. Зв'язок між динамікою цитоскелету та експресією генів його структурних та регуляторних білків складова реакцій континууму

цитоскелет –цитоплазматична мебрана–клітинна стінка на модельовану мікрогравітацію. Зміна динаміки та реорганізація цитоскелету у кортикальній площині клітини – спільний механізм при реакції коренів рослин як на зменшення механічного навантаження, так і на дію гіпоксії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C. 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. Nat Cell Biol. 8:249-56.
- Abe T, Thitamadee S, Hashimoto T. 2004. Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45: 211–220.
- Aboul-Maaty NAF, Oraby HAS. 2019. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bull Natl Res Cent. 43 (25). doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1
- Akhmanova A, Steinmetz MO. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nature Rev Mol Cell Biol. 9: 309–22.
- Al-Bassam J, Kim H, Brouhard G, van Oijen A, Harrison SC, Chang F. 2010. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. Dev Cell. 19: 245-258.
- Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, and Nogales E. 2014. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in ab-tubulin upon GTP hydrolysis. Cell. 157: 1117-1129.
- Ambrose C, Allard JF, Cytrynbaum EN, and Wasteneys GO. 2011. A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell wide cortical microtubule organization in *Arabidopsis*. Nature Commun. 2: 430.
- Ambrose C, Ruan Y, Gardiner J, Tamblyn LM, Catching A, Kirik V, et al. 2013. CLASP interacts with sorting nexin1 to link microtubules and auxin transport via PIN2 recycling in *Arabidopsis thaliana*. Dev Cell. 24: 649–659. doi: 10.1016/j.devcel.2013.02.007

- Ambrose JC, Shoji T, Kotzer AM, Pighin JA. and Wasteneys GO. 2007. The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. Plant Cell. 19: 2763–2775.
- 10. Ambrose C. and Wasteneys GO. 2014. Microtubule initiation from the nuclear surface controls cortical microtubule growth polarity and orientation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 55: 1636-1645.
- 11.Andreeva Z, Ho AYY, Barthet MM, Potocky M, Bezvoda R, Žarsky V, Marc J. 2009. Phospholipase D family interactions with the cytoskeleton: Isoform d promotes plasma membrane anchoring of cortical microtubules. Funct Plant Biol. 36:600–612.
- 12. Anthony RG. and Hussey PJ. 1999 a. Dinitroaniline herbicide-resistance and the microtubule cytoskeleton. Trends Plant Sci. 4: 112-116.
- 13.Aschi-Smiti S, Chaibi W, Brouquisse R, Ricard B, Saglio P. 2003. Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Trifolium subterraneum* 'Park'. Ann Bot. 91:195– 204.
- 14. Ayscough KR. 2000. Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. Curr Biol. 10(24): 1587–1590.
- 15.Azri W, Ennajah A, Nasr Z, Woo S-Y, and Khaldi A. 2014.Transcriptome profiling the basal region of poplar stems during the early gravitropic response. Biol Plant. 58, 55–63. doi:10.1007/s10535-013-0364-7
- 16.Bai SY, Willard B, Chapin LJ, Kinter MT, Francis DM, Stead AD. et al. 2010.Proteomic analysis of pollination-induced corolla senescence in petunia. JExp Bot. 61: 1089–1109.
- 17.Baluška F, Mancuso S. 2013. Root apex transition zone as oscillatory zone.Front Plant Sci. 4 (354): 1-15.
- 18.Baluška F, Samaj J, Volkmann D, Barlow P. 1997 a. Impact of taxolmediated stabilization of microtubules on nuclear morphology, ploidy levels and cell growth in maize roots. Biol Cell. 89(3):221-31.

- 19.Baluška F, Šamaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, and Menzel D. 2003. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. Plant Physiol. 133: 482–491. doi/10.1104/pp.103.027250.
- 20.Baluška F, Vitha S, Barlow PW, Volkmann D. 1997 b. Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: A major developmental switch occurs in the postmitotic transition region. Eur J Cell Biol. 72:113-21.
- 21.Baluška F, Volkmann D, Barlow PW. 2001. A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: Cytoskeletal and developmental implications. J Plant Growth Regul. 20:170-81.
- 22.Baluška F,Volkmann D, and Barlow PW. 2004. Cell bodies in a cage. Nature428: 371. doi: 10.1038/428371a
- 23.Ban Y, Kobayashi Y, Hara T, Hamada T, Hashimoto T, Takeda S, and Hattori T. 2013. a-tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 54:848-858.
- 24.Barton DA, and Overall RL. 2010. Cryofixation rapidly preserves cytoskeletal arrays of leaf epidermal cells revealing microtubule co-alignments between neighbouring cells and adjacent actin and microtubule bundles in the cortex. J Microsc. 237: 79–88.
- 25.Barton DA, Vantard M, Overall RL. 2008. Analysis of cortical arrays from *Tradescantia virginiana* at high resolution reveals discrete microtubule subpopulations and demonstrates that confocal images of arrays can be misleading. Plant Cell. 20: 982–994.
- 26.Baskin TI. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. Protoplasma 215: 150-171.
- 27.Bassham DC. 2007. Plant autophagy: more than a starvation response. Curr Opin Plant Biol. 10: 587–593.
- 28.Basu R, Chang F. 2011. Characterization of dip1p reveals a switch in Arp2/3dependent actin assembly for fission yeast endocytosis. Curr Biol. 21(11): 905–916.

- 29.Basu R, and Chang F. 2007. Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. Curr Opin Cell Biol. 19: 88–94.
- 30.Baxter A, Mittler R, and Suzuki N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. J Exp Bot. 65: 1229–1240. doi: 10.1093/jxb/ert375
- 31.Beemster GTS, Baskin TI. 2000. Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 124:1718-27.
- 32.Belyavskaya NA. 1996. Calcium and graviperception in plants: inhibitor analysis. Int Rev Cytol. 168: 123-185.
- 33.Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Pendle A, Miyashima S, Helariutta Y, and Maule A. 2013. Symplastic intercellular connectivity regulates lateral root patterning. Dev Cell 26: 136–147. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.010
- 34.Bera A and Gupta ML. 2022. Microtubules in microorganisms: how tubulin isotypes contribute to diverse cytoskeletal functions. Front Cell Dev Biol. 10:913809. doi: 10.3389/fcell.2022.913809
- 35.Bewell M A, Maathuis FJ, Allen GJ and Anders DS. 1999. Calcium-induced calcium release mediated by a voltage-activated cation channel in vacuolar vesicles from red beet. FEBS Letters. 458 : 41 44 .
- 36.Bibikova TN, Blancaflor EB, and Gilroy S. 1999. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 17: 657-665.
- 37.Blancaflor EB. 2000. Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polarity of cell expansion in primary roots of maize (*Zea mays* L.). J Plant Growth Regul. 19: 406–414.
- 38.Blancaflor EB. 2013. Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton. Am J Bot. 100: 143-152.
- 39.Blancaflor E. 2002. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants. J Plant Growth Regul. 21(2):120-36. doi: 10.1007/s003440010041
- 40.Blancaflor EB, Wang YS, Motes CM. 2006. Organization and function of the actin cytoskeleton in developing root cells. Int Rev Cytol. 252:219-64.

- 41.Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Henty JL, Khurana P. and Staiger ChJ. 2010. Actin dynamics in plant cells: a team effort from multiple proteins orchestrates this very fast-paced game. Curr Opin Plant Biol. 13:714–723.
- 42.Blanchoin L, Staiger CJ. 2008. Plant formins: diverse isoforms and unique molecular mechanism. Biochimica et Biophysica Acta. doi: org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.015
- 43.Blilou I, Xu J, Wildwater M., Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. Nature. 433: 39-44.
- 44.Blume Y, Lloyd CW, and Yemets A. 2008 b. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In: Blume YB, Baird WV, Yemets AI, Breviario D, editors. The plant cytoskeleton: a key tool for agrobiotechnology Dordrecht, (DE): Springer. p. 145–159.
- 45.Blume YB, Nyporko AY, Yemets AI, and Baird WV. 2003. Structural modeling of the interaction of plant a-tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides. Cell Biol Int. 27: 71–74.
- 46.Blume Y, Yemets A, Sulimenko V, Sulimenko T, Chan J, Lloyd C, and Draber P. 2008 a. Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. Planta 229: 143– 150.
- 47.Bouchard R, Bailly A, Blakeslee JJ, Vincenzetti V, Paponov I, Palme K, Mancuso S, Murphy AS, Schulz B, Geisler M. 2006. Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis p-glycoproteins. J Biol Chem. 281: 30603-12.
- 48.Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Kollias Ch, Maniou P, Protonotarious VE, Siyiannis VF, Hawkesford MJ. 2006. Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. Ann Bot. 97: 695–704.
- 49.Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF, Protonotarios VE, and Hawkesford MJ. 2007. Lysigenous aerenchyma development in roots -

triggers and cross-talks for a cell elimination program. Int J Plant Dev Biol. 1: 127–140.

- 50.Bozhkov P, Jansson C. 2007. Autophagy and cell-death proteases in plants. Two wheels of a funeral cart. Autophagy. 3: 136–138.
- 51.Braam J. and Davis RW. 1990. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. Cell. 60: 357– 361.
- 52.Brandizzi F, Wasteneys GO. 2013. Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. Plant J. 75:339– 349.
- 53.Breitsprecher D, Goode BL. 2013. Formins at a glance. J Cell Sci. 126: 1-7.
- 54.Breviario D, Giani S, and Morello L. 2013. Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. Plant J. 75: 202-218.
- 55.Brouhard GJ, Rice LM. 2018. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics Nat Rev Mol Cell Biol. 19(7): 451-463. doi: 10.1038/s41580-018-0009-y
- 56.Brungs S, Egli M, Wuest SL, Christianen PC, Van Loon JJ, Anh TJN, et al. 2016. Facilities for simulation of microgravity in the ESA ground-based facility programme. Micrograv Sci Tech. 28: 191–203. doi: 10.1007/s12217-015-9471-8
- 57.Burk DH. and Ye ZH. 2002. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule severing protein. Plant Cell. 11: 2145–2160.
- 58.Buschmann H, Sambade A, Pesquet E, Calder G. and Lloyd CW. 2010.Microtubule dynamics in plant cells. Methods Cell Biol. 97: 373–400.
- 59.Cai G. and Cresti M. 2012. Are kinesins required for organelle trafficking in plant cells? Frontiers Plant Sci. 3: 170.
- 60.Caldwell RA, Clemo HF, and Baumgarten CM. 1998. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: Technical considerations. Am J Physiol. 275: C619 – C621.

- 61.Campbell R, Drew MC. 1983. Electron-microscopy of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to oxygen shortage. Planta. 157: 350–357.
- 62.Chae H, Lee W. 2001. Ethylene- and enzyme-mediated superoxide production and cell death in carrot cells grown under carbon starvation. Plant Cell Reports. 20: 256–261.
- 63.Chan J, Mao G, Smertenko A, Hussey PJ, Naldrett M, Bottrill A, Lloyd CW. 2003. Identification of a MAP65 isoform involved in directional expansion of plant cells. FEBS Lett. 534: 161–163.
- 64.Chan J, Sambade A, Calder G, and Lloyd C. 2009. *Arabidopsis* cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. Plant Cell. 21: 2298–2306. doi:10.1105/tpc.109.069716
- 65.Chang H-Y, Smertenko AP, Igarashi H, Dixon DP, and Hussey PJ. 2005. Dynamic interaction of NtMAP65-1a with microtubules in vivo. J Cell Sci. 118: 3195–3201.
- 66.Chen X, Grandont L, Li H, Hauschild R, Paque S, Abuzeineh A, Rakusová H, Benkova E, Perrot-Rechenmann C, and Friml J. 2014. Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. Nature. 516: 90-93.
- 67.Cheng ZG, Snustad DP, Carter JV. 2001. Temporal and spatial expression patterns of TUB9, a beta-tubulin gene of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol. 47: 389–398.
- 68.Cheung AY, Niroomand S, Zou Y, Wu HM. 2010. A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. Proc Natl Acad Sci USA. 107:16390-16395.
- 69.Cheung A. and Wu H. 2004. Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. Plant Cell. 16: 257–269.

- 70.Chomicki G, Wightman R. & Turner SR. 2016. A specific class of short treadmilling microtubules enhances cortical microtubule alignment. Mol Plant. 9: 1214–1216.
- 71.Clayton L, Lloyd CW. 1985. Actin organization during the cell cycle in meristematic plant cells. Actin is present in the cytokinetic phragmoplast. Exp Cell Res. 156(1):231-8. doi: 10.1016/0014-4827(85)90277-0
- 72.Collings DA. 2008. Crossed wires: Interactions and cross-talk between the microtubule and microfilament networks in plants. In: Nick P, editor. Plant cell monographs: plant microtubules, development, and flexibility. Berlin (DE): Springer. p. 47–82.
- 73.Collings DA, Harper JDI, Marc J, Overall RL, Mullen RT. 2002. Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes. Can J Bot. 80: 430–441.
- 74.Collings DA, Lill AW, Himmelspach R, Wasteneys GO. 2006. Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubulemicrofilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol. 170:275–290.
- 75.Collings DA, and Wasteneys GO. 2005. Actin microfilament and microtubule distribution patterns in the expanding root of *Arabidopsis thaliana*. Can J Bot. 83: 579–590.
- 76.Collings D, Zsuppan G, Alien N, Blancaflor E. 2001. Demonstation of prominent actin filaments in the root columella. Planta. 212: 392–403.
- 77.Colmer TD. 2003. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. Plant Cell Env. 26: 17–36.
- 78.Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J Cell Biol. 105 (4): 1473–8. doi:10.1083/jcb.105.4.1473. PMC 2114638
- 79.Cosgrove DJ. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. Int J Plant Sci. 154:10–21.
- 80.Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof Y-D, Schumacher

K, Gonneau M, Höfte H, and Vernhettes S. 2009. Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. Plant Cell. 21: 1141-1154.

- 81.Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus* media. Biotechnol Prog. 18:418–423.
- 82.Cvrčkova F. 2013. Formins and membranes: anchoring cortical actin to the cell wall and beyond. Front Plant Sci. 4:436.
- 83.Cvrčkova F, Oulehlova D, Žarsky V. 2015. Formins: linking cytoskeleton and endomembranes in plant cells. Int J Mol Sci. 16: 1-18. dx.doi.org/10.3390/ijms16010001
- 84.Cvrčkova F, Oulehlova D. 2017. A new kymogram-based method reveals unexpected effects of marker protein expression and spatial anisotropy of cytoskeletal dynamics in plant cell cortex. Plant Methods. 13:19.
- 85.Dalous J, Burghardt E, Müller-Taubenberger A, Bruckert F, Gerisch G, Bretschneider T. 2008. Reversal of cell polarity and actin-myosin cytoskeleton reorganization under mechanical and chemical stimulation. Biophys J. 94:1063–1074.
- 86.Davies E, Stankovic B. 2006. Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In: Baluška F, Mancuso S. and Volkmann D, editors. Communication in plants neuronal aspects of plant life. Berlin and Heidelberg (Germany): Springer-Verlag. p. 309–320.
- 87.Dedolph RR, and Dipert MH. 1971. The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. Plant Physiol. 47: 756–764. doi: 10.1104/ pp.47.6.756
- 88.Deeks MJ, Cvrčkova F, Machesky LM, Mikitova V, Ketelaar T, Žarsky V. et al. 2005. *Arabidopsis* group I formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. New Phytol. 168: 529-540.

- 89.Deeks MJ, Fendrych M, Smertenko A, Bell KS, Oparka K, Cvrčkova F. et al. 2010. The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. J Cell Sci. 123:1209-1215.
- 90.Deinum EE, Tindemans SH, Mulder BM. 2011. Taking directions: the role of microtubule-bound nucleation in the self-organization of the plant cortical array. Phys Biol. 8(5):056002. doi: 10.1088/1478-3975/8/5/056002
- 91.De Micco V, Aronne G. 2008 a. Biometric anatomy of seedlings developed onboard of Foton-M2 in an automatic system supporting growth. Acta austronautica. 62: 505-513.
- 92.De Micco V, Aronne G, Joseleau JP, Ruel K. 2008 b. Xylem development and cell wall changes in soy seedlings grown in a microgravity environment. Ann Bot. 101: 661-669.
- 93.De Micco V, Ruel K, Joseleau JP, Aronne G. 2010. Building and degradation of secondary cell walls: are there common patterns of lamellar assembly of cellulose microfibrils and cell wall delamination? Planta. 232: 621-627.
- 94.Demkiv OT, Khorkavtsiv OYa, Pundiak OI. 2003. Changes of protonemal cell growth related to cytoskeleton organization. Cell Biol Intern. 187–189.
- 95.Dhindsa RS, Matowe W. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. J Exp Bot. 32: 79-91.
- 96.Dhonukshe P, Gadella TW. 2003. Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. Plant Cell. 15: 597—611.
- 97.Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TWJ, Munnik T. 2003 a. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. Plant Cell. 15: 2666–2679.
- 98.Dhonukshe P, Weits DA, Cruz-Ramirez A, Deinum EE, Tindemans SH, Kakar K, Prasad K, Mahonen AP, Ambrose C, Sasabe M, Wachsmann G, Luijten M, Bennett T, Machida Y, Heidstra R, Wasteneys G, Mulder BM, Scheres B. 2012. A PLETHORA auxin transcription module controls cell

division plane rotation through MAP65 and CLASP. Cell. 149: 383–396. doi:10.1016/j.cell.2012.02.051

- 100.Ding JP. and Pickard BG. 1993. Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. Plant J. 3: 83–110.
- 101. Distefano AM, Valinas MA, Scuffi D, Lamattina L, Garcia-Mata C, Laxalt AM. 2015. Phospholipase δ knock-out mutants are tolerant to severe drought stress. Plant Sign Behav. 10:11.
- 102. Dixit R, and Cyr R. 2004. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. Plant Cell. 16: 3274-3284.
- 103. Dodd AN, Kudla J. and Sanders D. 2010. The language of calcium signaling. Ann Rev Plant Biol. 61: 593–620.
- 104. Dolan L, Davies J. 2003. Cell expansion in roots. Curr Opin Plant Biol. 7:1-7.
- 105. Drew MC. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Ann Rew Plant Physiol Plant Mol Biol. 48: 223-250.
- 106. Drew MC, He CJ, Morgan PW. 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. Trends Plant Sci. 5: 123–127.
- 107. Durand-Smet P, Spelman TA, Meyerowitz EM, Jönsson H. 2020. Cytoskeletal organization in isolated plant cells under geometry control. Proc Natl Acad Sci USA. 117(29):17399-17408. doi: 10.1073/pnas.2003184117
- 108. Dutcher SK . 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. Curr Opin Cell Biol.13: 49–54.
- 109. Elliott A. and Shaw SL. 2018. Update: plant cortical microtubule arrays. Plant Physiol. 176: 94–105.
- 110. England LS, Gorzelak M, and Trevors JT. 2003. Growth and membrane polarization in *Pseudomonas aeruginosa* UG2 grown in randomized

microgravity in a high aspect ratio vessel. Biochim Biophys Acta. 1624:76–80.

- 111. Era A, Tominaga M, Ebine K, Awai C, Saito C, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Nakano A. and Ueda T. 2009. Application of lifeact reveals F-Actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. Plant Cell Physiol. 50: 1041-1048.
- 112. Ehrhardt DW, Shaw SL. 2006. Microtubule dynamics and organization of the plant cortical array. Annu Rev Plant Biol. 57: 859–875.
- 113. Evans D. 2003. Aerenchyma formation. New Phytologist. 161: 35–49. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00907.x
- 114. Fagerstedt KV. 2010. Programmed cell death and aerenchyma formation under hypoxia. In: Mancuso S, Shabala S, editors. Waterlogging signalling and tolerance in plants. Berlin Heidelberg (DE): Springer-Verlag. p. 45-96. doi: 10.1007/978-3-642-10305-6
- 115. Fan M, Zhu J, Richards C, Brown KM, and Lynch JP. 2003. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. Funct Plant Biol. 30: 493–506. doi:10.1071/FP03046
- 116. Fasano JM, Massa GD, Gilroy S. 2002. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. J Plant Growth Regul. 1:71-88.
- 117. Ferranti F, DelBianco M, and Pacelli C. 2021. Advantages and limitations of current microgravity platforms for space biology research. Appl Sci. 11(1): 68. doi: 10.3390/app11010068
- 118. Fishel E.A., Dixit R. (2013) Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. Plant J. 75: 270–277.
- 119. Fischer K. and Schopfer P. 1998. Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. Plant J. 15: 119–123.
- 120. Fleming AJ, McQueen-Mason S. and Mandel T. 1997. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. Science. 276: 1415–1418.

- 121. Foissner I, Wasteneys GO. 2000. Microtubule disassembly enhances reversible cytochalasin-dependent disruption of actin bundles in characean internodes. Protoplasma. 214: 33-44.
- 122. Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiol Plant. 119: 335–364.
- 123. Franklin-Tong VE, Gourlay CW. 2008. A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. Biochem J. 413: 389–404.
- 124. Fujita S, Pytela J, Hotta T, Kato T, Hamada T, Akamatsu R, Ishida Y, Kutsuna N, Hasezawa S, Nomura Y, Nakagami H, and Hashimoto T. 2013.
 An atypical tubulin kinase mediates stress induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*. Curr Biol. 23:1969-1978.
- 125. Funada R. 2008. Microtubules and the control of wood formation. Plant Cell Monogr. 11: 83–119.
- 126. Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M. 2008. Mechanosensitive channels regulate the stomatal aperture in *Vicia faba*. Bioch Biophys Res Commun. 366: 758–762.
- 127. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. 2017. The tubulin code at a glance. J Cell Sci. 130: 1347–1353.
- 128. Gardiner J, Collings DA, Harper JD, Marc J. 2003. The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organisation in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 44:687–696.
- 129. Gardiner JC, Harper JD, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, and Marc J. 2001. A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. Plant Cell. 13: 2143–2145.
- 130. Gardner MK, Zanic M, and Howard J. 2012. Microtubule catastrophe and rescue. Curr Opin Cell Biol. 25: 14-22.

- 131. Garces H, Durzan D, Pedroso MC. 2001. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. Ann Bot. 87: 567–574.
- 132. Gasic I. 2022. Regulation of tubulin gene expression: from isotype identity to functional specialization. Front Cell Dev Biol. Sec. Cellular Biochemistry. 10.
- 133. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of DNA fragmentation. J Cell Biol. 119: 493–501.
- 134. Geitmann A. and Ortega JK. 2009. Mechanics and modeling of plant cell growth. Trends Plant Sci. 14: 467–478.
- 135. Gens JG, Fujiki M, and Pickard BG. 2000. Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. Protoplasma. 212: 115–134. doi:10.1007/BF01279353
- 136. Gish LA, and Clark SE. 2011. The RLK/Pelle family of kinases. Plant J. 66: 117–127. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04518.x
- 137. Gilroy S, Trewavas AJ. 2001. Signal processing and transduction in plant cells: The end of the beginning? Nat Rev Mol Cell Biol. 2: 307–314.
- 138. Gittes F, Mickey B, Nettleton J. and Howard J. 1993. Flexual rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. J Cell Biol. 120: 923–934.
- 139. Gladish DK, Xu JP, and Niki T. 2006. Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. Ann Bot. 97: 895–902. doi: 10.1093/aob/mcl040
- 140. Godbole R, Michalke W, Nick P. and Hertel R. 2000. Cytoskeletal drugs and gravity-induced lateral auxin transport in rice coleoptiles. Plant Biol. 2: 176–181.
- 141. Goddette DW, Frieden C. 1987. Actin polymerization the mechanism of action of cytochalasin D. J Biol Chem. 261 (34): 15974–15980.

- 142. Goodbody KC. and Lloyd CW. 1990. Actin-filaments line up across tradescantia epidermal-cells, anticipating wound-induced division planes. Protoplasma. 157: 92–101.
- 143. Goshima G, Mayer M, Zhang N, Stuurman N, and Vale RD. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. J Cell Biol. 181: 421-429.
- 144. Gourlay CW, Ayscough KR. 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and aging? Nat Rev Mol Cell Biol. 6: 583–589.
- 145. Gourlay CW, Carpp LN, Timpson P, Winder S, Ayscough KR. 2004. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. J Cell Biol. 164(6): 803–809.
- 146. Green PB. 1980. Organogenesis a biophysical view. Annu Rev Plant Physiol. 3: 51–82.
- 147. Grolig F, Moch J, Schneider A, Galland P. 2014. Actin cytoskeleton and organelle movement in the sporangiophore of the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. Plant Biol. 16 (Suppl. 1): 167-178.
- 148. Grunt M, Žarsky V, Cvrčkova F. 2008. Roots of angiosperm formins: The evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. BMC Evol Biol. 8:115.
- 149. Guglielminetti L, Yamaguchi J, Perata P, Alpi A. 1995. Amylolitic activities in cereal grains under aerobic and anaerobic conditions. Plant Physiol. 109: 1069-1076.
- 150. Guisinger MM. and Kiss JZ. 1999. The influence of microgravity and space flight on columella cell ultrastructure in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. Am Journal Bot. 86: 1357-1366.
- 151. Gunawardena AH, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001 a. Characterisation of programmed cell death during aerenhyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays L.*). Planta. 212: 205–214. doi: 10.1007/s004250000381

- 152. Gunawardena AH, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001 b. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. Plant Cell Environ. 24:1369–1375. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00774.x
- 153. Gutierrez R, Lindeboom JJ, Paredez AR, Emons AM, and Ehrhardt DW. 2009. *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. Nat Cell Biol. 11: 797–806. doi:10.1038/ncb1886
- 154. Gutjahr C. and Nick P. 2006. Acrylamide inhibits gravitropism and destroys microtubules in rice coleoptiles. Protoplasma. 227: 211–222.
- 155. Halat LS, Bali B. and Wasteneys G. 2022. Cytoplasmic linker proteinassociating protein at the nexus of hormone signaling, microtubule organization, and the transition from division to differentiation in primary roots. Front. Plant Sci. 13, article 883363.
- 156. Haley A, Russell AJ, Wood NA, Allan C, Knight M, Campbell AK. and Trewavas AJ. 1995. Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium. Proc Nat Acad Sci USA. 92: 4124 – 4128.
- 157. Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaat M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, and Traas J. 2008. Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. Science. 322: 1650-1655.
- 158. Hamant O, Inoue D, Bouchez D, Dumais J, Mjolsness E. 2019. Are microtubules tension sensors? Nature Communications. 10: 2360. doi: 10.1038/s41467-019-10207-y
- 159. Hao S, August A. 2005. Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. Mol Biol Cell. 16: 2275–2284.

- 160. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M.
 2005. Vacuolar processing enzyme, an executor of plant cell death. Curr
 Opin Plant Biol. 8: 404–408. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.016
- 161. Hardham AR, Takemoto D, and White RG. 2008. Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. BMC Plant Biol. 8:63. doi:10.1186/1471-2229-8-63
- 162. Hashimoto T. 2011. Microtubule and cell shape determination. Chapter 11.In: Liu B, editor. The plant cytoskeleton. New York (USA): Springer. p. 245-257.
- 163. Hashimoto T. 2015. Microtubules in plants. Am Soc Plant Biologists. e0179. doi: 10.1199/tab.0179
- 164. Hasezawa S, Hogetsu T, and Syono K. 1988. Rearrangement of cortical microtubules in elongating cells derived from tobacco protoplasts. J Plant Physiol. 133: 46-51.
- 165. Hasezawa S, Hogetsu T, Syono K. 1989. Changes of actin filaments and cellulose fibrils in elongating cells derived from tobacco protoplasts. J Plant Physiol. 134: 115-119.
- 166. Haswell ES, Meyerowitz EM. 2006. MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology. 16: 1–11.
- 167. Hauser MTH, Bauer E. 2000. Histochemical analysis of root meristem activity in *Arabidopsisthaliana* using a cyclin: GUS (b-glucuronidase) marker line. Plant And Soil. 226:1-10.
- 168. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. 2008. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. J Cell Sci. 121: 496–503.
- 169. Hawes C. 2005. Cell biology of the plant Golgi apparatus. New Phytol. 165: 29–44. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01218.x
- 170. Hawkesford MJ. 2005. Sulphur. In: Broadley MR, White P, editors. Nutritional genomics. Oxford (GB): Blackwell Publishers. p. 87–111.

- 171. He CJ, Finlayson SA, Drew MC, Jordan WR, Morgan PW. 1996 a. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. Plant Physiol. 112: 1679–1685.
- 172. He CJ, Drew MC, Morgan PW. 1994. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea-mays* during hypoxia or nitrogen starvation. Plant Physiol. 105: 861–865.
- 173. He CJ, Morgan PW, Drew MC. 1996 b. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. Plant Physiol. 112: 463–472.
- 174. Hemmersbach R, Von der Wiesche M, Seibt D. 2006. Ground-based experimental platforms in gravitational biology and human physiology. Signal Transduct. 6: 381–387.
- 175. Henty-Ridilla JL, Li J, Blanchoin L, and Staiger CJ. 2013. Actin dynamics in the cortical array of plant cells. Curr Opin Plant Biol. 16: 678–687. doi: 10.1016/j.pbi.2013.10.012
- 176. Hepler PK. 2005. Calcium: A central regulator of plant growth and development. Plant Cell. 17: 2142–2155.
- 177. Hepler PK, Vidali L. and Cheung AY. 2001. Polarized cell growth in higher plants. Annu Rev Cell Dev Biol. 17: 159-187.
- 178. Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PCM, de Geest M, Hauslage J, Hilbig R, Hill RJA, Lebert M, Medina FJ, Vagt N, Ullrich O, van Loon J, Hemmersbach R. 2013. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. Astrobiology. 13 (1). doi: 10.1089/ast.2012.0876
- 179. Higaki T, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Kadota Y, Hasezawa S. et al. 2007. Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. Plant Cell Phys. 48: 1414–1425.

- 180. Himmelspach R, Wymer C, Lloyd C, Nick P. 1999. Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed *in vivo*. Plant J. 18: 449-453.
- 181. Hirase A, Hamada T, Itoh TJ, Shimmen T, Sonobe S. 2006. n- Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro. Plant Cell Physiol. 47: 1004–1009.
- 182. Ho AYY, Day DA, Brown MH, and Marc J. 2009. Arabidopsis phospholipase D delta as an initiator of cytoskeleton-mediated signalling to fundamental cellular processes. Funct Plant Biol. 36: 190–198. doi: 10.1071/FP08222
- 183. Ho CMK, Lee YRJ, Kiyama LD, Dinesh-Kumar SP, Liu B. 2012. *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 crosslinks antiparallel microtubules toward their plus ends in the phragmoplast via its distinct C-terminal microtubule binding domain. Plant Cell. 24:2071–2085. doi: 10.1105/tpc.111.092569
- 184. Holzinger A, and Blaas K. 2016. Actin-dynamics in plant cells: the function of actin perturbing substances jasplakinolide, chondramides, phalloidin, cytochalasins, and latrunculins. Methods Mol Biol. 1365: 243–261. doi:10.1007/978-1-4939-3124-8_13
- 185. Horn A, Ullrich O, Huber K, and Hemmersbach R. 2011. PMT photomultiplier clinostat. Microgravity Sci Technol. 23: 67–71.
- 186. Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K. 2010. Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants. Plant Sign Behav. 5: 752-754.
- 187. Hoson T, Saito Y, Soga K, Wakabayashi K. 2005. Signal perception , transduction and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants. Adv Space Res. 36: 1196-1202.
- 188. Hou G, Mohamalawari DR, and Blancaflor EB. 2003. Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. Plant Physiol. 131:1360 – 1373.

- 189. Hsiao A-S, Huang J-Y. 2023. Microtubule regulation in plants: from morphological development to stress adaptation. Biomolecules. n13: 627. doi:10.3390
- 190. Hu B, Henry A, Brown KM, and Lynch JP. 2014. Root cortical aerenchyma inhibits radial nutrient transport in maize (*Zea mays*). Ann Bot. 113: 181–189. doi: 10.1093/aob/mct259
- 191. Huang S, Gao L, Blanchoin L, Staiger CJ. 2006. Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid. Mol Biol Cell. 17: 1946–1958.
- 192. Hush JM, Overall RL. 1992. Re-orientation of cortical F-actin is not necessary for wound-induced microtubule re-orientation and cell polarity establishment. Protoplasma. 169: 97-106.
- 193. Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A. 2002. The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. Plant Mol Biol. 50:915–924.
- 194. Hussey PJ, Ketelaar T. and Deeks MJ. 2006. Control of actin cytoskeleton in plant cell growth. Ann Rev Plant Biol. 57: 109-126.
- 195. Hussey PJ, Yuan M, Calder G, Khan S, and Lloyd CW. 1998. Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, reorientates F-actin strands in *Tradescantia* stamen hair cells. Plant J. 14: 353–357.
- 196. Iida H, Furuichi T, Nakano M, Toyota M, Sokabe M, andTatsumi H. 2014. New candidates for mechano-sensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol. 16: 39–42. doi:10.1111/plb.12044
- 197. Inada N, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T. 2002. Three-dimensional progression of programmed death in the rice coleoptile. Int Rev Cyt. (Survey of Cell Biology) 218.
- 198. Ingber DE. 2003. Tensegrity II: how structural networks influence cellular information processing networks. J Cell Sci. 116: 1397–1403.

- 199. Ingouff M, Fitz Gerald JN, Guerin C, Robert H, Sorensen MB, Van Damme D. et al. 2005. Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. Nat Cell Biol. 7: 374-380.
- 200. Illéš P, Schlicht M, Pavlovkin J, Lichtscheid I, Baluška F, Ovecka M. 2006. Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminum into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. J Exp Bot. 57 (15): 4201-13.
- 201. Ishikawa H, Evans ML. 1992. Induction of curvature in maize roots by calcium or by thigmos timulation. Role of the postmitotic isodiametric growth zone. Plant Physiol. 100:762-8.
- 202. Ishikawa H, Evans ML. 1993. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. Plant Physiol. 102:1203-10.
- 203. Jackson M, Armstrong W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. Plant Biol. 1: 274–287.
- 204. Jackson MB, Colmer TD. 2005. Response and adaptation by plants to stress. Ann Bot. 96: 501–505.
- 205. Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miege C, Rollin C, and Gaude T. 2006. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. Nature. 443: 106–109. doi:10.1038/nature05046
- 206. Jaffe MJ, Leopold AC. and Staples RA. 2002. Thigmo responses in plants and fungi. Am J Bot. 89: 375–382.
- 207. Janson ME. and Dogterom M. 2004. Scaling of microtubule force-velocity curves obtained at different tubulin concentrations. Phys Rev Lett. 92: 248101.
- 208. Jedd G, Chua NH. 2002. Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto- myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. Plant Cell Physiol. 43(4): 384-392.

- 209. Johannes E, Collings DA, Rink JC. and Allen NS. 2001. Cytoplasmic pH dynamics in maize pulvinal cells induced by gravity vector changes. Plant Physiol. 127: 119–130.
- 210. Jules K, McPherson K, Hrovat K, Kelly E, and Reckart T. 2004. A status report on the characterization of the microgravity environment of the International Space Station. Acta Astronaut. 55:335–364.
- 211. Justin S, Armstrong W. 1991. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa*). New Phytologist 118: 49–62.
- 212. Justin S, Armstrong W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant responses to soil flooding. New Phytologist 105: 465–495.
- 213. Kabbage M, Williams B, Dickman MB. 2013. Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. PLoS Pathog. 9(4): e 1003287.
- 214. Kabir AMR, et al. 2014. Biomolecular motor modulates mechanical property of microtubule. Biomacromolecules. 15: 1797–1805.
- 215. Kalinina Ia, Shevchenko GV, Kordyum EL. 2008. Microtubules spatial alterations in root cells of *Brassica rapa* under clinorotation. J Cell Biol. 32(5):581-3. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.11.003.
- 216. Kalinina Ia, Shevchenko G, Kordyum EL. 2008. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. Cell Biol Int. 32: 560-562.
- 217. Kalinina Ia, Shevchenko GV, Kordyum EL. 2009. Tubulin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 21(1-2): 187-190.
- 218. Kato S, Murakami M, Saika R, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yano S, Matsumoto S, Kasahara H, Kamada M, Shimazu N, Hashimoto T, Hoson T. 2022. Suppression of cortical microtubule reorientation and stimulation of cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls under microgravity conditions in space. Plants. 11(465): 1-12. doi: 10.3390/plants11030465

- 219. Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. 1998. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. Planta. 204: 277–287.
- 220. Keech O, Pesquet E, Gutierrez L, Ahad A, Bellini C, Smith S. et al. 2010. Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis*. Plant Phys. 154: 1710–1720.
- 221. Kell A. and Glaser RW. 1993. On the mechanical and dynamic properties of plant-cell membranes: their role in growth, direct gene transfer and protoplast fusion. J Theor Biol. 160: 41–62.
- 222. Kengen HMP, Derksen J. 1991. Organization of microtubules and microfilaments in protoplasts from suspension cells of *Nicotiana plumbaginifolia* - a quantitative-analysis. Acta Bot Neerl. 40:29–40.
- 223. Kern VD, Schwuchow JM, Reed DW, Nadaeu JA, Lucas J, Skripnikow A, Sack FD. 2005. Gravitropic moss cells default to spiral growth on the clinostat and in microgravity spaceflight. Planta. 221: 149-157.
- 224. Ketelaar T, Emons AMC. 2001. The cytoskeleton in plant cell growth: lessons from root hairs. New Phytol. 152: 409–418.
- 225. Kirik V, Herrmann U, Parupalli Ch, Sedbrook J, Ehrhardt D, Hulskamp M 2007. CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in *Arabidopsis*. J Cell Sci. 120: 4416–4425.
- 226. Kiss JZ. 2000. Mechanisms of the early phases of plant gravitropism. Crit Rev Plant Sci. 19: 551–573. doi: 10.1080/07352680091139295
- 227. Kiss JZ, Guisinger MM, Miller AJ. and Stackhouse KS. 1997. Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 38: 518 – 525.
- 228. Kiss JZ, Wolverton Ch, Wyatt SE, Hasenstein KH, and van Loon JWA.
 2019. Comparison of microgravity analogs to spaceflight in studies of plant growth and development. Front Plant Sci. 10: 1577. doi: 10.3389/fpls.2019.01577

- 229. Kiyoshima D, Kawakami K, Hayakawa K, Tatsumi H, and Sokabe M.
 2011. Force- and Ca²⁺-dependent internalization of integrins in cultured endothelial cells. J Cell Sci. 124: 3859–3870.
- 230. Klaus DM. 2001. Clinostats and bioreactors. Gravit Space Biol Bull. 14:55– 64.
- 231. Knight MR, Read ND, Campbell AK. and Trewavas AJ. 1993. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. J Cell Biol. 121:83 90.
- 232. Knight MR, Smith SM. and Trewavas AJ. 1992. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. Proc Nat Acad Sci USA. 89: 4967 – 4971.
- 233. Kobayashi H, Fukuda H, Shibaoka H. 1988. Interrelation between the spatial disposition of actin-filaments and microtubules during the differentiation of tracheary elements in cultured *Zinnia* cells. Protoplasma. 143:29–37.
- 234. Kobayashi I, Kobayashi Y, Hardham AR. 1994. Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during resistance response to flax rust infection. Planta. 195: 237-247.
- 235. Kojo KH, Higaki T, Katsuna N, Yoshida Yu, Yasuhara H, Hasezawa S.
 2013. Roles of cortical actin microfilament patterning in division plane orientation in plants. Plant Cell Physiol. 54(9): 1491–1503. doi: 10.1093/pcp/pct093
- 236. Kolb C, Nagel MK, Kalinowska K, Hagmann J, Ichikawa M, Anzenberger F. et al. 2015. FYVE1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 167:1361-1373.
- 237. Kollmeier M, Felle HH, Horst WJ. 2000. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum. Plant Physiol. 122: 945-56.
- 238. Komarova YA, Akhmanova A, Kojima SI, Galjart N, Borisy GG. 2002. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue *in vivo*. J Cell Biol. 159: 589–599.
- 239. Komis G, Apostolakos P. and Galatis B. 2002. Hyperosmotic stress induces formation of tubulin macrotubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: their probable involvement in protoplast volume corrtrol. Plant Cell Physiol. 43: 911–922.
- 240. Kopczak SD, Haas NA, Hussey PJ, Silflow CD, Snustad DP. 1992. The small genome of *Arabidopsis* contains at least 6 expressed alpha-tubulin genes. Plant Cell. 4: 539–547.
- 241.Kordyum EL. 1997. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. Int Rev Cytol. 171: 1—78.
- 242. Kordyum EL.1994. Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostat experiments. Adv Space Res. 14: 77-85.
- 243. Kordyum E, Shevchenko G. 2003. Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Gravit Physiol.10: 15-16.
- 244. Kordyum EL, Shevchenko GV, Brykov VO. 2019. Cytoskeleton during aerenchyma formation in plants. Cell Biol Int. 43(9): 991-998. doi: 10.1002/cbin.10814
- 245. Kordyum EL, Shevchenko GV, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YaB. 2005.Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard.International Space Station. Acta Astronautica. 56: 613-621.
- 246. Kordyum E, Borisova T, Krisanova N, Pozdnyakova N, Shevchenko G, Kozeko L, Romanchuk S, Lobachevska O, Charkavtsiv Ya, Kyyak N, Zaimenko N, Ivanytska B, Brykov V, Mischenko L. 2020. Space biology: results and prospects. In: Space research in Ukraine 2019-2020. Kyiv (UA): Akademperiodyka. p. 71–78.
- 247. Kordyum EL, Shevchenko GV, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. 2008. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The plant

cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. NATO Science for peace and security series- C: Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196.

- 248. Kotzer AM. and Wasteneys GO. 2006. Mechanisms behind the puzzle: microtubule microfilament cross-talk in pavement cell formation. Can J Bot. 84: 594-603.
- 249. Kozeko LYe, Shevchenko GV, Artemenko OA, Martyn GG, Kordyum EL. 2005. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 12 (1): 187-188.
- 250. Krtková J, Benáková M, and Schwarzerová K. 2016. Multifunctional microtubule-associated proteins in plants. Front Plant Sci. 7(474). doi: 10.3389/fpls.2016.00474
- 251. Krtková J, Havelková L, Křepelová A, Fišer R, Vosolsobě S, Novotná Z, Martinec J, and Schwarzerová K. 2012. Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem. 60: 88-97.
- 252. Kruse CPS, Meyers AD, Basu P, Hutchinson S, Luesse DR, Wyatt SE. 2020. Spaceflight induces novel regulatory responses in *Arabidopsis* seedling as revealed by combined proteomic and transcriptomic analyses. BMC Plant Biol. 20: 237.
- 253. Kumar P, Lyle KS, Gierke S, Matov A, Danuser G, and Wittmann T. 2009. GSK3 beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. J Cell Biol. 184: 895–908.
- 254. Kumar P, and Wittmann T. 2012. +TIPs:SxIPping along microtubule ends. Trends Cell Biol. 22: 418–428. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.005
- 255. Kung C. 2005. A possible unifying principle for mechanosensation. Nature.436: 647–654.
- 256. Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, Tsujimoto Y. 2000. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting

apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. Oncogene. 19: 4807-4814.

- 257. Kutsuna N, Hazegawa S. 2002. Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. Plant Cell Physiol. 43: 965-973.
- 258. Kwon T, Sparks JA, Nikashima J, Allen SN, Tang Yu. and Blancaflor E. 2015. Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development. Am J Bot. 102(1):21-35. doi: 10.3732/ajb.140045
- 259. Laan P, Clement J, Blom C. 1991. Growth and development of *Rumex* roots as affected by hypoxic and anoxic conditions. Plant and soil. 136: 145–151.
- 260. Lancelle SA, Hepler PK. 1991. Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. Protoplasma. 165:167–172.
- 261. Lancetti L, Palamidessi A, Areces L, Scita G, Di Fiore P. 2004. Rab5 is a signaling GTP-ase involved in actin remodeling by receptor tyrosine kinase. Nature. 429: 309–314.
- 262. Lanza M, Garcia-Ponce B, Castrillo G, Catarecha P, Sauer M, Rodriguez-Serrano M, et al. 2012. Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. Dev Cell. 22: 1275–1285. doi:10.1016/j.devcel.2012.04.008
- 263. Le J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbelen JP. 2001. In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up-and down-regulated and uncoupled from differentiation. Plant Physiol. 125:519-22.
- 264. Le J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbelen JP. 2004. Position and cell type-dependent microtubule reorientation characterizes the early response of the *Arabidopsis* root epidermis to ethylene. Physiol Plant. 121:513-9.

- 265. Leadsham JE, Kotiadis VN, Tarrant DJ. and Gourlay CW. 2010. Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. Cell Death and Different. 17: 754–762.
- 266. Ledbetter MC, Porter KR. 1963. A "microtubule" in plant cell fine structure. J Cell Biol. 19: 239–250.
- 267. Legue V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D. and Gilroy S. 1997.
 Cytoplasmic free Ca 2+ in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. Plant Physiol. 114 : 789 800 .
- 268. Levine HG, Piastuch WC. 2005. Growth patterns for etiolated soybean germinated under space-flight conditions. Adv Space Res. 36: 1237-1243.
- 269. Lewis ML. 2002. The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. Adv Space Biol Med. 8: 77–128.
- 270. Li X, Anken R, Wang G, Hilbig R, and Liu Y. 2011. Effects of wall vessel rotation on the growth of larval zebrafish inner ear otoliths. Micrograv Sci Technol. 23:13–18.
- 271. Li S, Lei L, Somerville CR. and Gua Y. 2012. Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. Proc Natl Acad Sci USA. 109: 185–190.
- 272. Li G, Liang W, Zhang X, Ren H, Hu J, Bennett MJ, et al. 2014. Rice actinbinding protein RMD is A key link in the auxin-actin regulatory loop that controls cell growth. Proc Natl Acad Sci USA. 111: 10377–10382. doi: 10.1073/pnas.1401680111
- 273. Liao J, Liu G, Monje O, Stutte GW, Porterfield DM. 2004. Induction of hypoxic root metabolism results from physical limitations in O2 bioavailability in microgravity Adv Space Res. 34: 1579–1584.
- 274. Lin D, Cao L, Zhou Z, Zhu L, Ehrhardt D, Yang Z, et al. 2013. Rho GTPase signaling activates microtubule severing to promote microtubule ordering in *Arabidopsis*. Curr Biol. 23: 290–297. doi:10.1016/j.cub.2013.01.022

- 275. Lin Z, Gasic I, Chandrasekaran V, Peters N, Shao S, Mitchison TJ, Hegde RS. 2020. TTC5 mediates autoregulation of tubulin via mRNA degradation. Science. 367(6473):100-104. doi: 10.1126/science.aaz4352
- 276. Lindeboom JJ, Nakamura M, Hibbel A, Shundyak K, Guierrez R, Ketelaar T, Emons AMC, Mulder BM, Kirik V, and Ehrhardt DW. 2013. A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. Science. 342: 1245533.
- 277. Lintilhac PM. and Vesecky TB. 1984. Stress-induced alignment of division plane in plant tissues grown in vitro. Nature. 307: 363–364.
- 278. Liu Y, Bassham DC. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. Annu Rev Plant Biol. 63: 215–237.
- 279. Liu P, Qi M, Xue X, Ren H. 2011. Dynamics and functions of the actin cytoskeleton during the plant cell cycle. Chinese Science Bulletin. 56: 3504–3510.
- 280. Liu B, Palevitz BA. 1992. Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. Cell Motil Cytoskeleton. 23: 252-264.
- 281. Liu Z, Persson S, Zhang Y. 2015. The connection of cytoskeletal network with plasma membrane and the cell wall. J Integrative Plant Biol. 57(4): 330–340.
- 282. Livak KJ, and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 22DDCT method. Methods 25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 283. Lloyd C. 2011. Dynamic microtubules and the texture of plant cell walls. Int Rev Cell Mol Biol. 287: 287–329.
- 284. Lloyd C, Chan J. 2004. Microtubules and the shape of plants to come. Nat Rev Mol Cell Biol. 5: 13—23.
- 285. Locascio A, Blázquez MA, and Alabadí D. 2013. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin- DELLA interaction. Curr Biol. 23: 804–809. doi:10.1016/j.cub.2013.03.053

- 286. Lopez D, Tocquard K, Venisse J-S, Legué V. and Roeckel-Drevet P. 2014. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. Front plant sci. doi: 10.3389/fpls.2014.00610
- 287. Lord CEN, Dauphinee AN, Watts RL, Gunawardena AHLAN. 2013. Unveiling Interactions among mitochondria, caspase-like proteases, and the actin cytoskeleton during plant programmed cell death (PCD). PLoS ONE 8(3): e57110. doi:10.1371/journal.pone.0057110
- 288. Lucas JR, Courtney S, Hassfurder M, Dhingra S, Bryant A, Shaw SL. 2011. Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. Plant Cell. 23:1889–1903. doi:10.1105/tpc.111.084970
- 289. Ma H, Liu M. 2019. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. Mol Biol Rep. doi: 10.1007/s11033-019-04872-x
- 290. Machiyama H, Tatsumi H, Sokabe M. 2009. Structural changes in the cytoplasmic domain of the mechanosensitive channel MscS during opening. Biophys J. 97: 1048–1057.
- 291. Maksaev G, Haswell ES. 2012. MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from Arabidopsis thaliana with a preference for anions. Proceed Nat Acad Sci USA. 109: 19015–19020.
- 292. Mancuso S, Barlow PW, Folkmann D, Baluska F. 2006. Actin turnovermediated gravity response in maize root apices gravitropism of decapped roots implicates gravisensing outside of the root cap. Plant Signal Behav. 1(2): 52–58. doi: 10.4161/psb.1.2.2432
- 293. Mancuso S, Marras AM, Mugnai S, Schlicht M, Žarsky V, Li G, et al. 2007. Phospholipase Dζ2 drives vesicular secretion of auxin for its polar cell–cell transport in the transition zone of the root apex. Plant Signal Behav. 2: 240– 244. doi: 10.4161/psb.2.4.4566
- 294. Manzano AI, Carnero-Diaz E, Herranz R, Medina F-J. 2022. Recent transcriptomic studies to elucidate the plant adaptive response to spaceflight

and to simulated space environments. iScience. 25: 1046872022.104687 doi: 10.1016/j.isci

- 295. Manzano AI, Matía I, Gonzalez-Camacho F, Carnero-Diaz E, van Loon JJ WA, Dijkstra C, et al. 2009. Germination of *Arabidopsis* seed in space and in simulated microgravity: alterations in root cell growth and proliferation. Micrograv Sci Tech. 21: 293–297. doi: 10.1007/s12217-008-9099-z
- 296. Manzano AI, van Loon, Christianen PC, Gonzales-Rubio JM, Medina FJ, Herranz R. 2012. Gravitational and magnetic field variations synergize to cause subtle variations in the global transcriptional state of *Arabidopsis* in vitro callus cultures. BMC Genomics. 13:105.
- 297. Mao T, Jin L, Li H, Liu B, Yuan M. 2005. Two microtubule associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. Plant Physiol. 138:654–662. doi:10.1104/pp.104.052456
- 298. Marc J, Granger CL, Brincat J, Fisher DD, Kao TH, McCubbin AG, Cyr RJ. 1998. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. Plant Cell. 10: 1927–1940.
- 299. Marc J, Sharkey DE, Durso NA, Zhang M, and Cyr RJ. 1996. Isolation of a 90-kD microtubule-associated protein from tobacco membranes. Plant Cell. 8: 2127–2138. doi:10.1105/tpc.8.11.2127
- 300. Martin SG, and Chang F. 2005. New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. Cell Cycle. 4: 1046–1049.
- 301. Martiniere A, Gayral P, Hawes C, Runions J. 2011. Building bridges: formin1 of *Arabidopsis* forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. Plant J. 66: 354-365.
- 302. Masuda H, Mori R, Yukawa M, and Toda T. 2013. Fission yeast MOZART/Mzt1 is an essential g-tubulin complex component required for complex recruitment to the microtubule organizing center, but not its assembly. Mol Biol Cell. 24: 2894-2906.

- 303. Matía I, González-Camacho F, Herranz R, Kiss JZ, Gasset G, van Loon JJ, Marco R, Medina FJ. 2010. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. J Plant Physiol. 167: 184–193.
- 304. Matsumoto S, Saito Y, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T. 2007. Up-regulation of tubulin genes and roles of microtubules in hypergravity –induced growth modifications in *Arabidopsis* hypocotyls. Adv Space Res. 39: 1176-1181.
- 305. McCurdy DW, Sammut M, Gunning BES. 1988. Immunofluorescent visualization of arrays of transverse cortical actin microfilaments in wheat root tip cells. Protoplasma. 147: 204-206.
- 306. McLamore ES, Diggs A, Calvo Marzal P, Shi J, Blakeslee JJ, Peer WA, et al. 2010. Non-invasive quantification of endogenous root auxin transport usingan integrated flux microsensor technique. Plant J. 63: 1004–1016. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04300.x
- 307. Michelot A, Berro J, Guerin C, Boujemaa-Paterski R, Staiger CJ, Martiel JL. and Blanchoin L. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. Curr Biol. 17: 825-833.
- 308. Michelot A, Derivery E, Paterski-Boujemaa R, Guerin C, Huang SJ, Parcy F, Staiger CJ. and Blanchoin L. 2006. A novel mechanism for the formation of actin filament bundles by a nonprocessive forming. Curr Biol. 16: 1924-1930.
- 309. Michelot A, Guerin C, Huang S, Ingouff M, Richard S, Rodiuc N. et al. 2005. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of *Arabidopsis* FORMIN1. Plant Cell. 17: 2296-2313.
- 310. Moldovan L, Mythreye K, Goldschmidt-Clermont PJ, Satterwhite LL. 2006. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. Cardiovasc Res. 71: 236–246.
- 311. Mollier A. and Pellerin S. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. J Exp Bot. 50 (333): 487-497. doi: 10.1093/jxb/50.333.487

- 312. Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, and Gilroy S. 2009. Ca2+ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. Plant Cell. 21: 2341–2356. doi:10.1105/tpc.109.0 68395
- 313. Monshausen G. and Gilroy S. 2009. Feeling green: mechanosensing in plants. Trends Cell Biol. 19(5): 288-235. doi:10.1016/j.tcb.2009.02.005
- 314. Monshausen GB, and Haswell ES. 2013. A force of nature: molecular mechanisms of mechano perception in plants. J Exp Bot. 64: 4663–4680.doi: 10.1093/jxb/ert204
- 315. Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, and Gilroy S. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. Plant J. 65: 309–318.
- 316. Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer J, Bajer AS, Fosket DE. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. Planta. 172(2): 252-64. doi: 10.1007/BF00394595
- 317. Morita MT. 2010. Directional gravity sensing in gravitropism. Ann Rev Plant Biol. 61: 705–720.
- 318. Morita MT, and Nakamura M. 2012. Dynamic behavior of plastids related to environmental response. Curr Opin Plant Biol. 15: 722–728. doi: 10.1016/j.pbi.2012.08.003
- 319. Muhlenbock P, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpinski S. 2007. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by lesion simulating disease 1. Plant Cell. 19: 3819–3830.
- 320. Munnik T, Meijer HJ, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, and Musgrave
 A. 2000. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. Plant J. 22: 147—154.

- 321. Murakami M, Soga K, Kotake T, Kato T, Hashimoto T, Wakabayashi K, Hoson T. 2016. Roles of MAP65-1 and BPP1 in gravity resistance of *Arabidopsis* hypocotyls. Biol Sci Space. 30: 1–7.
- 322. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15(3): 473–497.
- 323. Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T, Hasebe M. 2005. Microtubule –dependent nucleation based on recruitment of γ-tubulin in higher plants. Nature Cell Biol. doi: 10: 961-968. doi:10.1038/ ncb1306
- 324. Muroyama A. and Lechler T. 2017. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. Development. 144: 3012-3021. doi:10.1242/dev.153171
- 325. Murphy S, Stearns T. 1996. Cytoskeleton: Microtubule nucleation takes shape. Curr Biol. 6:642-644.
- 326. Musgrave ME, Kuang A, Brown CS, Matthews SW. 1998. Changes in *Arabidopsis* leaf ultrastructure, chlorophyll and carbohydrate contentduring space flight depend on ventilation. Ann Bot. 81: 503-512.
- 327. Myers KA, Applegate KT, Danuser G, Fischer RS. and Waterman CM. 2011. Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis. J Cell Biol. 192: 321–334.
- 328. Nakamura M, Ehrhardt DW. and HashimotoT. 2010. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. Nat Cell Biol. 12: 1064–1070. doi: 10.1038/ncb2110
- 329. Nakamura M, Lindeboom JJ, Saltini M, Mulder BM. & Ehrhardt DW. 2018. SPR2 protects minus ends to promote severing and reorientation of plant cortical microtubule arrays. J Cell Biol. 217: 915–927.

- 330. Nakamura M, Naoi K, Shoji T, and Hashimoto T. 2004. Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in *Arabidopsis* epidermal cells. Plant Cell Physiol. 45: 1330-1334.
- 331. Nakashima J, Liao F, Sparks JA, Tang Y, Blancaflor EB. 2014. The actin cytoskeleton is a suppressor of the endogenous skewing behaviour of *Arabidopsis* primary roots in microgravity. Plant Biol. 16 (Suppl. 1): 142-150.
- 332. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol. 128(1):13-6. doi: 10.1104/pp.010707
- 333. Nèmeth ZH, Deitch EA, Davidson MT, Szabo Ch, Vizi SE, Haskŏ G. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton results in nuclear factor-kB activation and inflammatory mediator production in cultured human intestinal epithelial cells. J Cell Physiol. 200:71–81.
- 334. Neumann E, Damme DV, Stoppin-mellet V, Ebel C, Barbier E, Geelen D, Vantard M, Fourier J, Biologie ID, Ebel SJ. 2008. Two microtubuleassociated proteins of *Arabidopsis* MAP65spromote antiparallel microtubule bundling. Mol Biol Cell. 19:4534–4544. doi:10.1091/mbc.E08
- 335. Ni X-L, Gui M-Y, Tan L-L, Zhu Q, Liu W-Z, Li Ch-X. 2018. Programmed cell death and aerenchyma formation in water-logged sunflower stems and its promotion by ethylene and ROS. Front Plant Sci. 9: 1928. doi: 10.3389/fpls.2018.01928
- 336. Nick P. 2011. Mechanics of the cytoskeleton. In: Wojtaszek P, editor. Mechanical integration of plant cells and plants, signaling and communication in plants. Berlin, Heidelberg (DE): Springer-Verlag. p. 9. doi: 10.1 007/918-3-642-19091-9*3 e 2 01I
- 337. Nick P. 2012. Microtubules and the tax payer. Protoplasma 249 (Suppl. 2): S81–S94.
- 338. Nick P. 2013. Microtubules, signalling and abiotic stress. Plant J. 75: 309– 323. doi: 10.1111/tpj.12102

- 339. Nick P, Yatou O, Furuya M. and Lambert AM. 1994. Auxin-dependent microtubule responses and seedling development are affected in a rice mutant resistant to EPC. Plant J. 6: 651–663.
- 340. Nickerson CA, Ott CM, Wilson JW, Ramamurthy R, and Pierson DL. 2004. Microbial responses to microgravity and other low-shear environments. Microbiol Mol Biol Rev. 68:345–361.
- 341. Nsamba ET, Mohan L. and Gupta Jr. 2022. Tubulin isotypes functional insights from model organisms. J Cell Sci. 135. jcs259539. doi:10.1242/jcs.259539 1-14.
- 342. Oda Y, Hasezawa S. 2006. Cytoskeletal organization during xylem cell differentiation. J Plant Res. 119: 167–177.
- 343. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A. 2009. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. Nature. 457: 441–445.
- 344. Oda Y, Mimura T, Hasezawa S. 2005. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. Plant Physiol. 137: 1027– 1036.
- 345. Olson EN, Nordheim A. (2010) Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 11(5): 353–365. doi:10.1038/nrm2890.
- 346. Oulehlová D, Kollárová E, Cifrová P, Pejchar P, Žárský V, Cvrčková F. 2019. Arabidopsis class I formin FH1 relocates between membrane compartments during root cell ontogeny and associates with plasmodesmata. Plant Cell Physiol. 60(8):1855-1870. doi: 10.1093/pcp/pcz102
- 347. Palma-Jiménez M, Ureña YC, Villalobos-Bermúdez C, Vega- Baudrit JR.
 2017. Microgravity and nanomaterials. Int J Biophysics. 7(4): 60-68 doi: 10.5923/j.biophysics.20170704.02
- 348. Panteris E, Adamakis I-DS, Daras G, Hatzopoulos P, Rigas S. 2013. Differential responsiveness of cortical microtubule orientation to

suppression of cell expansion among the developmental zones of *Arabidopsis thaliana* root apex. PLoS ONE. 8: e82442

- 349. Papaseit C, Pochon N, Tabony J. 2000. Microtubule self-organization is gravity-dependent. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 8364–8368.
- 350. Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. Science. 312: 1491–1495.
- 351. Paul AL, Daugherty CJ, Bihn EA, Chapman DK, Norwood KLL, Ferl RJ.
 2001. Transgene expression patterns indicate that spaceflight affects stress signal perception and transduction in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126: 613–621.
- 352. Paul AL, Zupanska AK, Ostrow DT, Zhang Y, Sun Y, Li JL, Shanker S, Farmerie WG, Amalfitano CE, Ferl RJ. 2012. Spaceflight transcriptomes: unique responses to a novel environment. Astrobiology. 12: 40-56.
- 353. Pedroso MC, Durzan DJ. 2000. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. Ann Bot. 86: 983–994.
- 354. Pellegrini L, Wetzel A, Granno S, Heaton G, Harvey K. 2017. Back to the tubule: microtubule dynamics in Parkinson's disease. Cell Mol Life Sci. doi: 10.1007/s00018-016-2351-6
- 355. Penley NJ, Schafer CP, and Bartoe J-DF. 2002. The International Space Station as microgravity research platform. Acta Astronaut. 50: 691–696.
- 356. Perbal G, Driss-Ecole D. 2003. Mechanotransduction in gravisensing cells. Trends in Plant Science. 8: 498–504.
- 357. Petrasek J, Schwarzerova K. 2009. Actin and microtubule cytoskeleton interactions. Curr Opin Plant Biol. 12: 728–734. doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.010
- 358. Peyronnet R, Tran D, Girault T, and Frachisse J-M. 2014. Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. doi: 10.3389/fpls.2014.00558

- 359. Pickard BG. 2007. Delivering force and amplifying signals in plant mechanosensing. In: Owen PH, editor. Current topics in membranes. London (UK): Academic Press. p. 361–392.
- 360. Pickard BG. and Fujiki M. 2005. Ca2+ pulsation in BY-2 cells and evidence for control of mechanosensory Ca2+-selective channels by the plasmalemmal reticulum. Funct Plant Biol. 32: 863–879.
- 361. Pierik R, van AJM, and Voesenek LA. 2009. Is elongation-induced leaf emergence beneficial for submerged *Rumex* species? Ann Bot. 103: 353– 357. doi: 10.1093/aob/mcn143
- 362. Pleith C. and Trewavas AJ. 2002. Reorientation of seedlings in the Earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiol. 129: 786 796.
- 363. Pleskot R, Pejchar P, Bezvoda R, Lichtscheidl IK, Wolters-Arts M, Marc J, Žarsky V, Potocky M. 2012. Turnover of phosphatidic acid through distinct signaling pathways affects multiple aspects of pollen tube growth in tobacco. Front Plant Sci. 3: 54.
- 364. Pleskot R, Pejchar P, Staiger CJ, and Potocký M. 2014. When fat is not bad: the regulation of actin dynamics by phospholipid signaling molecules. Front Plant Sci. 5:5. doi:10.3389/fpls.2014.00005
- 365. Pleskot R, Potocky M, Pejchar P, Linek J, Bezvoda R, Martinec J, Valentova O, Novotna Z, Žarsky V. 2010. Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. Plant J. 62: 494–507.
- 366. Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM. and Orschell CM. 2004. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol. 32:773–781.
- 367. Pollard T. and Borisy G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell. 112: 453–465.
- 368. Porterfield DM. 2002. The biophysical limitations in physiological transport and exchange in plants grown in microgravity. J Plant Growth Regul. 21: 177–190.

- 369. Porterfield DM, Matthews SW, Daugherty CJ, Musgrave ME. 1997. Spaceflight exposure effects on transcription, activity, and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 113: 685–693.
- 370. Porterfield DM. and Musgrave ME. 1998. The tropic response of plant roots to oxygen: oxytropism in *Pisum sativum* L. Planta. 206: 1-6.
- 371. Postma JA, and Lynch JP. 2011. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. Plant Physiol. 156: 1190–1201. doi:10.1104/pp.111.175489
- 372. Pottosin II, Dobrovinskaya OR. and Muniz J. 1999. Cooperative block of the plant endomembrane ion channel by ruthenium red. Biophys J. 77: 1973 1979.
- 373. Poulter NS, Staiger CJ, Rappoport JZ, Franklin-Tong VE. 2010. Actinbinding proteins implicated in the formation of the punctate actin foci stimulated by the self-incompatibility response in *Papaver*. Plant Physiol. 152: 1274–1283.
- 374. Pozhvanov G, Sharova E, Medvedev S. 2021. Microgravity modelling by two-axial clinorotation leads to scattered organisation of cytoskeleton in *Arabidopsis* seedlings. Functional Plant Biol. 48(10):1062-1073. doi: 10.1071/FP20225
- 375. Qiao F, Chang Xi-Li and Nick P. 2010. The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine. J Exp Bot. 61(14): 4021–4031. doi:10.1093/jxb/erq221
- 376. Qin C, Wang X. 2002. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholineselective PLDz1 with distinct regulatory domains. Plant Physiol. 128:1057– 1068.
- 377.Rao MV, Davis KR. 2001. The physiology of ozone induced cell death. Planta. 213: 682–690.

- 378. Rayevsky AV, Sharifi M., Samofalova DA, Karpov PA, Blume YB. 2019. Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins. Cell Biol Int. 43: 1040–1048.
- 379. Reape T, McCabe PF. 2008. Apoptotic-like programmed cell death in plants. New Phytol. 180(1):13–26.
- 380. Richter GL, Monshausen GB, Krol A. and Gilroy S. 2009. Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. Plant Physiol. 151 : 1855 1866
- 381. Roberts A. W., Frost A.O., Roberts E.M., Haigler C.H. (2004) Roles of microtubules and cellulose microfibril assembly in the localization of secondary cell wall deposition in developing tracheary elements. Protoplasma 224: 217-229.
- 382. Robby T. 1996. A new Architecture. New Haven: Yale Academic Press.
- 383. Roostalu J, Surrey T. 2017. Microtubule nucleation: Beyond the template. Nat Rev Mol Cell Biol. 18: 702–710.
- 384. Rosero A, Žarsky V, Cvrčkova F. 2013. AtFH1 formin mutation affects actin filament and microtubule dynamics in *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot. 64: 585-597.
- 385. Rosero A, Oulehlova D, Stillerova L, Schiebertova P, Grunt M, Žarsky V, Cvrčkova F. 2016. *Arabidopsis* FH1 formin affects cotyledon pavement cell shape by modulating cytoskeleton dynamics. Plant Cell Physiol. 57: 488-504.
- 386. Russell DA, Sachs MM. 1992. Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. Plant Physiol. 99: 615–620.
- 387. Sachs JA. 1882. A text book of botany. Oxford (UK): Oxford University Press.
- 388. Sang Y, Cui D, Wang X. 2001. Phospholipase D- and phosphatidic acidmediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126: 1449—1458.
- 389. Sampathkumar A, Lindeboom JJ, Debolt S, Gutierrez R, Ehrhardt DW, Ketelaar T, Perssona S. 2011. Live cell imaging reveals structural

associations between the actin and microtubule cytoskeleton in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 23: 2302–2313. doi: 10.1105/tpc.111.087940

- 390. Sarkar D, Nagaya T, Koga K, Nomura Y, Gruener R, and Seo H. 2000. Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/ 2.8 cells. J Bone Miner Res. 15:489–498.
- 391. Sasabe M, Kosetsu K, Hidaka M, Murase A, Machida Y. 2011. Arabidopsis thaliana MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. Plant Signal Behav. 6(5): 743–747.
- 392. Sasabe M, Machida Y. 2006. MAP65: a bridge linking a MAP kinase to microtubule turnover. Curr Opin Plant Biol. 9:563–570. doi:10.1016/j.pbi.2006.09.010
- 393. Sassi M, Ali O, Boudon F, Cloarec G, Abad U, Cellier C, Chen X, Gilles B, Milani P, Friml J, Vernoux T, Godin C, Hamant O, and Traas J. 2014. An auxin-mediated shift toward growth isotropy promotes organ formation at the shoot meristem in *Arabidopsis*. Curr Biol. 24: 2335-2342.
- 394. Sassmann S, Rodrigues C, Milne SW, Nenninger A, Allwood E, Littlejohn GR. et al. 2018. An immunoresponsive cytoskeletal-plasma membrane feedback loop in plants. Curr Biol. 28:2136-2144.
- 395. Schlicht M, Strnad M, Scanlon MJ, Mancuso S, Hochholdinger F, Palme K, Volkmann D, Menzel D, Baluška F. 2006. Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. Plant Signal Behav. 1:122-33.
- 396. Schneider R. and Persson S. 2015. Connecting two arrays: the emerging role of actin-microtubule cross-linking motor proteins. Fron Plant Sci 6: (217). doi: 10.3389/fpls.2015.00415
- 397. Schopfer P. 2006. Biomechanics of plant growth. Am J Bot. 93: 1415–1425.
- 398. Schussler EE, Borkhsenious ON, Longstreth DJ. 1997. Formation of root aerenchyma involves programmed cell death in *Saggittaria lancifolia*. Plant Physiol. 114: 456–456.

- 399. Schussler EE, Longstreth DJ. 2000. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). Am J Bot. 87: 12—19.
- 400. Schwarzerova K, Vondrakova Z, Fischer L, Borikova P, Bellinvia E, Eliasova K. et al. 2010. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. BMC Plant Biol. 10: 89.
- 401. Seago JL, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubova O, Enstone DE. 2005. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. Ann Bot. 96: 565–579.
- 402. Seago JL. Jr, Peterson CA, Enstone DE. 1999. Cortical ontogeny in roots of the aquatic plant *Hydrocharis morsus-ranae* L. Canad. J Bot. 77: 113–121.
- 403. Seago JLJr, Peterson CA, Kinsley LJ, Broderick J. 2000. Development and structure of the root cortex in *Caltha palustris* L. and *Nymphaea odorata* Ait. Ann Bot. 86(3): 631–640.
- 404. Seagull RW, Falconer MM, Weerdenburg CA. 1987. Microfilaments: dynamic arrays in higher plants. J Cell Biol. 4: 995-1004.
- 405. Sedbrook JC. and Kaloriti D. 2008. Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. Trends Plant Sci. 13: 303–310.
- 406. Shabala S, Shabala L, Gradmann D, Chen Z, Newman I. and Mancuso S. 2006. Oscillations in plant membrane transport: model predictions, experimental validation, and physiological implications. J Exp Bot. 57: 171-184. doi:10.1093/jxb/erj022
- 407. Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J. et al. 2013.
 Gibberellin saccumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. Proc Natl Acad Sci USA. 110: 4834–4839.doi: 10.1073/pnas.1300436110
- 408. Shannon RD, White JR, Lawson JE, Gilmour BS. 1996. Methane efflux from emergent vegetation in peatlands. J Ecol. 84: 239–246.
- 409. Shao X, Li Q, Mogilner A, Bershadsky AD, Shivashankar GV. 2015. Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear

actin rim. Proc Natl Acad Sci USA. 112(20): E2595-E2601. doi:10.1073/pnas.1504837112

- 410. Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004. Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. J Exp Bot. 54:813-24.
- 411. Shaw SL, Kamyar R, and Ehrhardt DW. 2003. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. Science. 300: 1715–1718.doi: 10.1126/science.1083529
- 412. Sheahan MB, Rose RJ, McCurdy DW. 2007. Actin-filament dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts. Protoplasma. 230: 141–152.
- 413. Shevchenko GV. 2012. Actin microfilament organization in the transition zone of *Arabidopsis*-ABD2-GFP roots under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 24 (6): 427-433. doi: 10.1007/s12217-012-9318-5
- 414. Shevchenko GV, Brykov VA, Ivanenko GF. 2016. Specific features of root aerenchyma formation in *Sium latifoliun* L. (Apiaceae). Cyt Genetics. 50: 293-299.
- 415. Shevchenko G, Kalinina YaM, Kordyum EL. 2006. Interrelation between cytoskeleton elements in root cells of *Arabidopsis*-GFP-MAP4 seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 13:107-108.
- 416. Shevchenko G, Kalinina YaM, Kordyum EL. 2007. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. Adv Space Res. 39: 1171-1175.
- 417. Shevchenko G, Kalinina YaM, Kordyum EL. 2008. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. Cell Biol Int. 32: 560—562.
- 418. Shevchenko G, Kordyum EL, Martyn GG, Kozeko LYe, Artemenko OA. 2005 a. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. J Grav Physiol. 12 (1): 189-190.

- 419. Shevchenko G. and Krutovsky K. 2022. Mechanical stress effects on transcriptional regulation of genes encoding microtubule- and actin-associated proteins. Physiol Mol Biol Plants. 28(1):17–30. doi: 10.1007/s12298-021-01123-x
- 420. Shevchenko G, Kordyum EL. 2005 b. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. Adv Space Res. 35: 289-295.
- 421. Shevchenko G. 2015. Participation of proteins binding both actin filaments and microtubules in higher plant cell growth. Cytol Genetics.49: 270-278.
- 422. Shevchenko G. 2019. Putative gravisensors among microtubule associated proteins. Cell Biol Int. 43(9): 983-990. doi: 10.1002/cbin.10811
- 423. Shibaoka H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 45: 527-544.
- 424. Shimada C, Lipka V, O'Connell R, Okuno T, Schulze-Lefert P, Takano Y. 2006. Nonhost resistance in *Arabidopsis-Colletotrichum* interactions acts at the cell periphery and requires actin filament function. Mol Plant Microbe Inter. 19: 270–279.
- 425. Shimazaki Y, Ookowa T, Hirosawa T. 2005. The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress. Plant Physiol. 139: 458—465.
- 426. Shoji T, Suzuki K, Abe T, Kaneko Y, Shi H, Zhu JK, Rus A, Hasegawa PM, and Hashimoto T. 2006. Salt stress affect cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 47: 1158-1168.
- 427. Sieberer BJ, Ketelaar T, Esseling JJ, and Emons AMC. 2005. Microtubules guide root hair tip growth. New Phytol. 167: 711-719.
- 428. Siyiannis VF, Protonotarios VE, Zechmann B, Chorianopoulou SN, Müller M, Hawkesford MJ. 2012. Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or

phosphate deprivation. Protoplasma. 249: 671–686. doi:10.1007/s00709-011-0309-y

- 429. Skagen EB, Iversen TH. 1999. Simulated weightlessness and hyper-g results in opposite effects on the regeneration of the cortical MT array in protoplasts from *Brassica napus* hypocotyls. Physiologia Plantarum. 106: 318-325.
- 430. Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ. 2004. The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. Plant Cell. 16(8): 2035–2047. doi:10.1105/tpc.104.023937
- 431. Smertenko AP, Deeks MJ, Hussey PJ. 2010. Strategies of actin reorganisation in plant cells. J Cell Sci. 123: 3019–3029.
- 432. Smertenko AP, Kaloriti D, Chang H-Y, Fiserova J, Opatrny Z, Hussey PJ.
 2008. The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isotypes. Plant Cell. 20: 3346–3358. doi:10.1105/tpc.108.063362
- 433. Smertenko AP, Bozhkov V, Filonova LH, von Arnold S, Hussey PJ. 2003.
 Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. Plant J. 33: 813–824.
- 434. Smertenko A. and Franklin-Tong VE. 2011. Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death cell death and differentiation Plant Cell. 18:1263–1270.
- 435. Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ.
 2002. Signal -mediated depolimerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. The Plant Cell. 14: 2613-2626. doi: 10.1105/tpc.002998
- 436. Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T. 2006. Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epocotyls. Planta. 224: 1485-1494.
- 437. Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T. 2008. Transient increase in the transcript levels of γ-tubulin complex genes during

reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epocotyls. J Plant Res. 121: 493-498.

- 438. Soga K, Yamazaki Ch, Kamada M, Tanigawa N, Kasahara H, Yano S, Kojo KH, Kutsuna N, Kato H, Hashimoto T, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson H. 2018. Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in *Arabidopsis* hypocotyls grown under microgravity conditions in space. Physiologia Plantarum. 162(1): 135-144. doi: 10.1111/ppl.12640
- 439. Soh H, Auh C, Soh WY, Han K, Kim D, Lee S, Rhee Y. 2011. Gene expression changes in *Arabidopsis* seedlings during short- to longterm exposure to 3-D clinorotation. Planta. 234: 255–270.
- 440. Sparkes I. 2011. Recent advances in understanding plant myosin function: life in the last lane. Molecular Plant. 4: 805-812.
- 441. Sparkes IA, Teanby NA, Hawes C. 2008. Truncated myosin XI tail fusions inhibit peroxisome, Golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. J Exp Bot. 59: 2499– 2512.
- 442. Staiger CJ. and Blanchoin L.2006. Actin dynamics:old friends with new stories. Curr Opin Plant Biol. 9: 554–562. doi:10.1016/j.pbi.2006.09.013
- 443. Staiger CJ, Sheahan MB, Khurana P, Wang X, McCurdy DW. and Blanchoin L. 2009. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. J Cell Biol. 184: 269–280.
- 444. Stankovic B. 2018. Plants in Space. Into Space: A journey of how humans adapt and live in microgravity. Intech Open. dx.doi.org/10.5772/intechopen.74230161
- 445. Staves MP, Wayne R, and Leopold AC. 1997 a. Cytochalasin D does not inhibit gravitropism in roots. Am J Bot. 84: 1530 1535.
- 446. Staves MP, Wayne R. and Leopold AC. 1997 b. The effect of the external medium on the gravitropic curvature of rice (*Oryza sativa*, Poaceae) roots.
 Am J Bot. 84: 1522 1529.

- 447. Steffens B, Geske T, and Sauter M. 2011. Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H2O2. New Phytol. 190: 369–378. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03496.x
- 448. Steffens B, Kovalev A, Gorb SN, and Sauter M. 2012. Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. Plant Cell. 24: 3296–3306. doi: 10.1105/tpc.112.101790
- 449. Stout SC, Porterfield DM, Briarty LG, Kuang A, Musgrave ME. 2001.
 Evidence of root zone hypoxia in *Brassica rapa* L. grown in microgravity.
 Int J Plant Sci. 162: 249–255.
- 450. Struk S. and Dhonukshe P. 2014. MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. Plant Cell Rep. 33:1–21. doi: 10.1007/s00299-013-1486-2
- 451. Subbaiah CC, Sachs MM. 2003. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. Ann Bot. 90: 119–127.
- 452. Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S. and Takenawa T. 2003. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. Dev Cell. 5: 595–609.
- 453. Sukharev S. 2002. Purification of the small mechanosensitive channel of Escherichia coli (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. Biophys J. 83: 290–298.
- 454. Swidzinski JA, Sweetlove LJ, Leaver CJ. 2002. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 30: 431–446.
- 455. Szymanski DB, Cosgrove DJ. 2009. Dynamic co-ordination of cytoskeletal and cell wall systems during plant cell morphogenesis. Curr Biol. 19: R800– R811.
- 456. Tabony J. 2006. Microtubules viewed as molecular ant colonies. Biol Cell.98: 603–617. doi:10.1042/BC20050087

- 457. Takagi S, Takamatsu H, Sakurai-Ozato N. 2009. Chloroplast anchoring: its implication for the regulation of intracellular chloroplast distribution. J Exp Bot. 60: 3301–3310.
- 458. Takahashi H, Hirota K, Kawahara A, Hayakawa E, and Inoue Y. 2003. Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. Plant Cell Physiol. 44: 350-359.
- 459. Takesue K, Shibaoka H. 1998. The cyclic reorientation of cortical microtubules in epidermal cells of azuki bean epicotyls: The role of actin filaments in the progression of the cycle. Planta. 205: 539–546.
- 460. Takeuchi M, Staehelin L. and Mineyuki Y. 2017. Actin-microtubule interaction in plants. Cytoskeleton structure, dynamics, function and disease. Intech Open. doi: 10.5772/66930
- 461. TapkenW. and Murphy AS. 2015. Membrane nanodomains in plants: capturing g-form, function, and movement. J Exp Bot. 66: 1573–1586. doi: 10.1093/jxb/erv054
- 462. Tatsumi H, Furuichi T, Nakano M, Toyota M, Hayakawa K, Sokabe M, Iida H. 2014. Mechanosensitive channels are activated by stress in the actin stress fibres, and could be involved in gravity sensing in plants. Plant Biol. 16 (1): 18-22.
- 463. Telewski FW. 2006. A unified hypothesis for mechanoperception in plants. Am J Bot. 93: 1466–1470.
- 464. Thomas C. and Staiger C. 2014. A dynamic interplay between membranes and the cytoskeleton critical for cell development and signaling. Front Plant Sci. 5 (335). doi:10.3389/fpls.2014.00335
- 465. Thomas S, Osman K, Shevchenko G, Graaf B, Wheeler M, Franklin-Tong V. 2003. Investigating mechanisms involved in the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 358:1033-1036.
- 466. Tian M, Chaudhry F, Ruzicka DR, Meagher RB, Staiger CJ, Day B. 2009. *Arabidopsis* actin depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal

transduction triggered by the *Pseudomonas* syringae effector AvrPphB. Plant Physiol. 150: 815–824.

- 467. Tominaga M, Yokota E, Vidali L, Sonobe S, Hepler PK, and Shimmen T. 2000. The role of plant villin in the organization of the actin cytoskeleton, cytoplasmic streaming and the architecture of the transvacuolar strand in root hair cells of *Hydrocharis*. Planta. 210: 836–843.
- 468. Toyota M. and Gilroy S. 2013. Gravitropism and mechanical signaling in plant. Am J Bot. 100(1): 111–125.
- 469. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, and Sokabe M. 2008. Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiol. 146: 505–514.
- 470. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, and Sokabe M. 2007. Hypergravity stimulation induces changes in intracellular calcium concentration in *Arabidopsis* seedlings. Adv Space Res. 39: 1190–1197.
- 471. Traas JA, Doonan JH, Rawlins DJ, Shaw PJ, Watts J, Lloyd CW. 1987. An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. J Cell Biol. 105: 387-395.
- 472. Tulin A, McClerklin S, Huang Y, Dixit R. 2012. Single-molecule analysis of the microtubule cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. Biophys J. 102:802–809. doi:10.1016/j.bpj.2012.01.008
- 473. Uribe R, Jay D. 2009. A review of actin binding proteins: new perspectives. Mol Biol Rep. 36: 121–125.
- 474. Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykret D, Dedieu A, Peaucelle A, Ludynia M, Traas J, Boudaoud A, Kwiatkowska D, Hamat O. 2012. Mechanical stress acts *via* katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. Cell. 149:439–451.
- 475. Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, Ritzenthaler C, Inze´ D, Geelen D. 2004. In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. Plant Physiol. 136: 3956–3967.

- 476. Van Doorn WG. 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. J Exp Bot. 62(14): 4749-61. doi: 10.1093/jxb/err196
- 477. Van Doorn WG, Woltering EJ. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci. 10:117–122.
- 478. Van Gestel K, Kohler RH, Verbelen JP. 2001. Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in ther cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. J Exp Bot. 53: 659-667.
- 479. Van Gisbergen PA, Bezanilla M. 2013. Plant formins: Membrane anchors for actin polymerization. Trends Cell Biol. 23: 227–233.
- 480. Vanstraelen M, and Benková E. 2012. Hormonal interactions in the regulation of plant development. Annu Rev Cell Dev Biol. 28: 463–487. doi:10.1146/annurev-cellbio- 101011-155741
- 481. Vassy J, Portet S, Beil M, Millot G, Fauvel-Lafeve F, Karniguian A, Gasset G, Irinopoulou T, Calvo F, Rigaut JP.and Schoevaert D. 2001. The effect of weightlessness oncytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancercell line MCF-7. FASEB J.15: 1104–1106.
- 482. Vaughan MA, Vaughn KC. 1987. Effects of microfilament disrupters on microfilament distribution and morphology in maize root cells. Histochemistry. 87: 129-137.
- 483. Verbelen J-P, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluška F. 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities. Plant Sign Behav. 1(6): 296-304.
- 484. Vineyard L, Elliott A, Dhingra S, Lucas JR, and Shaw SL. 2013. Progressive transverse microtubule array organization in hormone-induced *Arabidopsis* hypocotyl cells. Plant Cell. 25: 622-676.
- 485. Visser EJW, and Voesenek LACJ. 2004. Acclimation to soil flooding– sensing and signal-transduction. Plant Soil. 254: 197–214. doi: 10.1007/s11104-004-1650-0

- 486. Visser EJW, Voesenek L, Vartapetian BB, Jackson MB. 2003. Flooding and plant growth. Ann Bot. 91: 107–109.
- 487. Voigt B, Timmers ACJ, Śamaj J, Műller J, Baluśka F. 2005. GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. Eur J Cell Biol. 84(6): 595-608. doi: 10.1016/j.ejcb.2004.11.011
- 488. Voragen AGJ, Coenen GJ, Verhoef RP. et al. 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. Struct Chem. 20: 263. doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- 489. Wade RH, Hyman AA. 1997. Microtubule structure and dynamics. Curr Opin Cell Biol. 9:12–17.
- 490. Walker LM. and Sack FD. 1990. Amyloplasts as possible statoliths in gravitropic protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. Planta. 181: 71–77.
- 491. Wang XM. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. Curr Opin Plant Biol. 5: 408–414. doi:10.1016/S1369-5266(02) 00283-2
- 492. Wang P. and Hussey P. 2015. Interactions between plant endomembrane systems and the actin cytoskeleton. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00422
- 493. Wang S, Kurepa J, Hashimoto T, and Smalle JA. 2011 a. Salt stress-induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. Plant Cell. 23: 3412-3427.
- 494. Wang H, Li X, Krause L, Gorog M, Schuler O, Hauslage J, Hemmersbach R, Kircher S, Lasok H, Haser T, Rapp K, Schmidt J, Yu X, Pasternak T, Aubry-Hivet D, Tietz O, Dovzhenko A, Palme K, Ditengou FA. 2015. 2-D clinostat for simulated microgravity experiments with *Arabidopsis* seedlings. Micrograv Sci Tech. doi: 10.1007/s12217-015-9478-1
- 495. Wang G, Ryu S, Wang X. 2012 a. Plant Phospholipases: An Overview. In: Sandoval G, editor. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York (USA): Springer

Science+Business Media. 861. p. 123-137. doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_8

- 496. Wang YC, Wang BC, Gilroy S, Chehab EW. and Braam J. 2011 b.
 a. CML24 is involved in root mechanoresponses and cortical microtubule
 b. orientation in *Arabidopsis*. J Plant Growth Regul. 30 : 467 479.
- 497. Wang J, Xue X, Ren H. 2012 b. New insights into the role of plant formins: regulating the organization of the actin and microtubule cytoskeleton. Protoplasma. 249 (Suppl 2): S101–107.
- 498. Wang YS, Yoo CM, Blancaflor EB. 2008. Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C-and N- termini of the fimbrin actin_binding domain 2. New Phytol. 177: 525–536.
- 499. Wang J, Zhang Y, Wu J, Meng L, Ren H. 2013. AtFH16, an *Arabidopsis* type II formin, binds and bundles both microfilaments and microtubules, and preferentially binds to microtubules. J Integr Plant Biol. 55: 1002–1015.
- 500. Wasteneys GO. and Ambrose JC. 2009. Spatial organization of plant cortical microtubules:close encounters of the 2D kind. Trends Cell Biol. 19: 62– 71.doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.004
- 501. Wasteneys GO, Yang Z. 2004. New views on the plant cytoskeleton. Plant Physiol. 136: 3884–3891.
- 502. Wayne R, Staves MP. 1996. A down to earth model of gravisensing or Newton's law of gravitation from the apple's perspective. Physiologia Plantarum. 98: 917–921.
- 503. Wayne R, Staves MP, Leopold AC. 1992. The contribution of the extracellular matrix to gravisensing in characean cells. J Cell Sci. 101: 611– 623.
- 504. Webb J, Jackson MB. 1986. A transmission and cryo-scanning electron microscopy study of the formation of aerenchyma (cortical gas filled space) in adventitious roots of rice. J Exp Bot. 37: 832–841.

- 505. Weise SE, and Kiss JZ. 1999. Gravitropism of inflorescence stems in starchdefi cient mutants of *Arabidopsis*. Int J Plant Sci. 160: 521 – 527.
- 506. Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, and Gundersen GG. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. Nat Cell Biol. 6: 820–830.
- 507. White PJ, and Broadley MR. 2003. Calcium in plants. Ann Bot. 92: 487–511.
- 508. Wilkins K, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnoff N, Franklin-Tong VE. 2011. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of *Papaver*. Plant Physiol. 156: 404–416.
- 509. Williamson RE. 1990. Alignment of cortical microtubules by anisotropic wall stresses. Aust J Plant Physiol. 17: 601–613.
- 510. Wolverton C, Paya AM. and Toska J. 2011. Root cap angle and gravitropic response rate are uncoupled in the *Arabidopsis pgm-1* mutant. Physiologia Plantarum. 141: 373 382.
- 511. Wolverton C, Mullen JL, Ishikawa H, and Evans ML. 2002. Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. Planta. 215: 153 – 157.
- 512. Wolverton C, Mullen JL, Ishikawa H, Evans ML. 2000. Two distinct regions of response drive differential growth in *Vigna* root electrotropism. Plant Cell Environm. 23: 1275-80.
- 513. Wu Y, Cosgrove DJ. 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. J Exp Bot. 51(350): 1543–1553.
- 514. Wu Shuang et al. 2013. Intact microtubules are required for the intercellular movement of the SHORT-ROOT transcription factor. Plant J. 74(1):148-59. doi: 10.1111/tpj.12112

- 515. Wyatt SE, Carpita NC. 1993. The plant cytoskeleton-cell wall continuum. Trends Cell Biol. 3:413 - 417.
- 516. Wymer C, Wymer SA, Cosgrove DJ. and Cyr RJ. 1996. Plant cell growth responds to external forces and the response requires intact microtubules. Plant Physiol. 110: 425–430.
- 517. Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, and Yang Z. 2010. Cell surface-and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. Cell. 143: 99-110.
- 518. Yamauchi T, Watanabe K, Fukazawa A, Mori H, Abe F, and Kawaguchi K, et al. 2014. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. J Exp Bot. 65: 261–273. doi: 10.1093/jxb/ert371
- 519. Yamauchi T, Shiono K, Nagano M, Fukazawa A, Ando M, Takamure I, et al. 2015. Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. Plant Physiol. 169: 180–193. doi: 10.1104/pp.15.00106
- 520. Yamauchi T, Yoshioka M, Fukazawa A, Mori H, Nishizawa NK, Tsutsumi N., et al. 2017. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. Plant Cell. 29: 775–790. doi: 10.1105/tpc.16.00976
- 521. York LM, Nord EA, and Lynch JP. 2013. Integration of root phenes for soil resource acquisition. Front Plant Sci. 4:355. doi:10.3389/fpls.2013.00355
- 522. Yoshikawa M, Yang GX, Kawaguchi K, Komatsu S. 2003. Expression analyses of beta-tubulin isotype genes in rice. Plant Cell Physiol. 44: 1202– 1207.
- 523. Yoshioka R, Soga K, Wakabayashi K, Takeda G., Hoson T. 2003. Hypergravity-induced changes in gene expression in *Arabidopsis* hypocotyls. Adv Space Res. 31: 2187-2193.

- 524. Zayzafoon M, Gathings WE. and McDonald JM. 2004. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis endocrinology. (USA): The Endocrine Society. 145(5): 2421–2432. doi: 10.1210/en.2003-1156
- 525. Zhang W, Fan LM., and Wu WH. 2007. Osmo-sensitive and stretchactivated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. Plant Physiol. 143: 1140–1151.
- 526. Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, and Zhang W. 2012. Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response salt stress in *Arabidopsis*. Plant Cell. 24: 4555-4576.
- 527. Zhang Q. and Zhang W. 2016. Regulation of developmental and environmental signaling by interaction between microtubules and membranes in plant cells. Protein Cell. 7(2):81–88. doi: 10.1007/s13238-015-0233-6
- 528. Zhong R, Burk DH, Morrison WH, Ye ZH. 2002. A kinesin-like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength. Plant Cell. 14: 3101–3117.
- 529. Кордюм ЕЛ, Сытник КМ, Бараненко ВВ. 2003. Клеточные механизмы адаптации растений. Киев: Наук. думка. 229 с.
- 530. Кордюм ЕЛ, Шевченко ГВ. 2003. Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитология и генетика 37 (2): 56-68.
- 531. Шевченко ГВ, Кордюм ЕЛ. 2007. Влияние клиностатирования на рост корневых волосков *Beta vulgaris*. Космічна наука і технологія 13(1): 1-4.
- 532. Шевченко ГВ, Кордюм ЕЛ. 2012. Использование трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* GFP–ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации. Космічна наука і технологія 18(6): 51-56.

- 533. Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. 2016. Організація мікрофіламентів цитоскелета в коренях повітряно-водних рослин *Sium latifolium* (APIACEAE) та *Alisma platago-aquatica* (ALISMATACEAE) у процесі формування аеренхіми. Укр бот журн. 73 (2): 185-193.
- 534. Шевченко ГВ, Кордюм ЄЛ. 2012. Тубуліновий цитоскелет у клітинах кореневих апексів повітряно–водних рослин Alisma plantago-aquatica L. (Alismataceae) та Sium latifolium L. (Apiaceae). Укр бот журн. 69 (4): 568-579.
- 535. Шевченко ГВ. 2009. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корней *Arabidopsis thaliana*. Цитология и генетика. 43: 3-11.
- 536. Шевченко Г. (2020) Мікротрубочки цитоскелету у формуванні індукованої аеренхіми адвентивних коренів *Zea mays* (Poaceae). Укр бот журн.77(3): 225–231. doi: 10.15407/ukrbotj77.03.225
- ΓВ. 537. Шевченко 2021. Порівняльна тубулінових організація мікротрубочок у клітинах коренів Zea mays (Poaceae) та Beta vulgaris (Chenopodiaceae Amaranthaceae 1.) під s. str. s. впливом кліностатування. Укр бот журн. 78(6): 426-433. doi.org/10.15407/ukrbotj78.06.426

додаток а

Організація мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах кори ростових зон кореня *Zea mays* та *Beta vulgaris*

	Організація мікротрубочок		
Ростові зони	Види рослин		
кореня	Z. mays	B.vulgaris	
Меристема	Кортикальні МТ залягають щільними смугами впоперек		
Меристема	до поздовжньої осі кореня. Ендоплазматичні МТ		
кліностатованих	представлені окремими МТ та їхніми пучками у		
рослин	цитоплазмі. ЕМТ важко розрізнити через високу		
	щільність цитоплазми.		
	Щільні пучки кМТ простягаються впоперек поздовжньої		
Дистальна зона	осі клітини. ЕМТ оточують ядро і радіальними		
розтягу	променями як з окремих, так і декількох МТ,		
(ДЗР) коренів	простягаються до ЦМ. Також розрізняють поодинокі		
	еМТ різної довжини без переважної орієнтації.		
	МТ оточують ядро і	Виразніші пучки МТ	
	з'єднують його із ЦМ.	оточують ядро і з'єднують	
		його із ЦМ.	
ДЗР	Підвищується частота	навскісно орієнтованих та	
кліностатованих	хаотичних кМТ. ЕМТ не	змінюють своєї організації та	
рослин	орієнтації.		

Центральна зона			
розтягу (ЦЗР)	кМТ не формують вир	оазних пучків, зустрічаються	
ЦЗР коренів	хаотичні і МТ, які орієнтовані навскісно до поздовжньої		
кліностатованих	осі клітини.		
рослин			
	Організація актинових філаментів		
	Z. mays	B.vulgaris	
Меристема	Переплетені АФ утворюють щільну мережу без переважної орієнтації. АФ оточують ядра, закріплюються на ЦМ.		
ДЗР	Мережа АФ менш щільна, ніж у меристемі. АФ		
	оточують ядра і вакуолі. З'єднують ядра із ЦМ. Наявний		
	не полімеризований актин. Кортикальні АФ утворюють		
	скупчення у при мембранній зоні клітини.		
	Мережа АФ виразніша,	Мережа АФ менш виразна,	
	ніж у <i>B.vulgaris</i> .	ніж у <i>Z. mays.</i>	
	Поздовжні щільні пучки		
	оточують ядро.		
ЦЗР	Мережа АФ розріджена. Зустрічаються фрагменти АФ різної довжини. АФ фрагментарно оточують вакуолі та		
	ядра.		

Продовження таблиці додатку А

додаток б

Організація мікротрубочок та актинових філаментів у клітинах кори різних ростових зон кореня Zea mays та Beta vulgaris після дії інгібіторів: таксолу та цитохалазину D

	Дія таксолу		
Ростові зони	Організація мікротрубочок		
кореня	Z. mays	B.vulgaris	
Меристема	Руйнування кМТ важко розрізнити, через щільність		
	цитоплазми. По всій клітині - залишки мікротрубочок та точкові скупчення тубуліну.		
ДЗР	Видимі руйнування кМТ. Залишки окремих МТ, зруйновані		
	поперечні пучки МТ. Деполімеризований тубулін у вигляді		
	точок і конгломератів.		
ЦЗР	кМТ відсутні. Залишки МТ. Точкові скупчення тубуліну.		
	Організація актинових філаментів		
	Z.mays	B.vulgaris	
Меристема	Часткове руйнування м	ережі АФ. Фрагменти АФ різної	
	довжини хаотичні	по периметру клітин.	
	Деполімеризований актин у вигляді розмитих областей.		
		Мережа АФ фрагментованіша	
ДЗР, ЦЗР	Сильне руйнування ме	режі АФ. Фрагменти АФ і не	
	полімеризований актин по периметру клітин.		

ДОДАТОК В

СПИСОК ОПРИЛЮДНЕНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- <u>Shevchenko GV</u>, Krutovsky KV. Mechanical stress effects on transcriptional regulation of genes encoding microtubule- and actin-associated proteins. Physiol Mol Biol Plants. 2022; 28(1): 17–30. doi:10.1007/s12298-021-01123-x. Q1.
- Шевченко ГВ. Порівняльна організація тубулінових мікротрубочок у клітинах коренів Zea mays (Poaceae) та Beta vulgaris (Chenopodiaceae s. str. Amaranthaceae s. l.) під впливом кліностатування. Укр бот журн. 2021; 78(6): 426-433. doi:10.15407/ukrbotj78.06.426
- Kordyum E, Borisova T, Krisanova N, Pozdnyakova N, <u>Shevchenko G</u>, Kozeko L, Romanchuk S, Lobachevska O, Charkavtsiv Ya, Kyyak N, Zaimenko N, Ivanytska B, Brykov V, Mischenko L. In: Fedorov O, editor. Space research in Ukraine. 2019-2020. Kyiv: Akademperiodyka; 2020. p. 71–78.
- <u>Шевченко ГВ.</u> Мікротрубочки цитоскелету у формуванні індукованої аеренхіми адвентивних коренів *Zea mays* (Poaceae). Укр бот журн. 2020; 77(3): 225–231. doi: 10.15407/ukrbotj77.03.225
- <u>Shevchenko GV.</u> Putative gravisensors among microtubule associated proteins. Cell Biol Int. 2017; 43(9): 983-990. doi: 10.1002/cbin.10811. Q3.
- Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Brykov VO. Cytoskeleton during aerenchyma formation in plants. Cell Biol Int. 2017; 43(9): 991-998. doi:10.1002/cbin.10814.
 Q3.
- <u>Shevchenko GV</u>, Brykov VA, Ivanenko GF. Specific features of root aerenchyma formation in *Sium latifoliun* L. (Apiaceae). Cytol Genetics. 2016; 50: 293-299.doi: 10.3103/S0095452716050121
- 8. <u>Шевченко ГВ</u>, Кордюм ЄЛ. Організація мікрофіламентів цитоскелета в коренях повітряно- водних рослин *Sium latifolium* (APIACEAE) та *Alisma*
platago-aquatica (ALISMATACEAE) у процесі формування аеренхіми. Укр бот журн. 2016; 73 (2): 185-193. doi: 10.15407/ukrbotj73.02.185

- <u>Shevchenko G.</u> Participation of proteins binding both actin filaments and microtubules in higher plant cell growth. Cytol Genetics. 2015; 49: 270-278.doi: 10.3103/S009545271504009X
- <u>Shevchenko G.</u> Actin microfilament organization in the transition zone of *Arabidopsis*-ABD2-GFP roots under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2012; 24 (6): 427-433. doi: 10.1007/s12217-012-9318-5. Q2.
- 11.<u>Шевченко ГВ</u>, Кордюм ЕЛ. Использование трансгенных растений Arabidopsis thaliana – GFP– ABD2 в экспериментах по изучению цитоскелета в условиях моделированной микрогравитации. Косм наука техн. 2012; 18(6): 51-56.
- 12.<u>Шевченко ГВ</u>, Кордюм ЄЛ. Тубуліновий цитоскелет у клітинах кореневих апексів повітряно-водних рослин *Alisma plantago-aquatica* L. (*Alismataceae*) та *Sium latifolium* L. (*Apiaceae*). Укр бот журн. 2012; 69 (4): 568-579.
- 13.Kalinina I, <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Tubulin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* root cells under clinorotation. Micrograv Sci Technol. 2009; 21(1-2): 187-190. doi: 10.1007/s12217-008-9047-y. Q2.
- 14.<u>Шевченко ГВ</u>. Взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корня Arabidopsis thaliana. Цитол генет. 2009; 43(4): 3-11.
- 15.<u>Shevchenko G,</u> Kalinina Ya, Kordyum E. Role of cytoskeleton in gravisensing of the root elongation zone in *Arabidopsis thaliana* plants. Cell Biol Int. 2008; 32: 560-562. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.11.010. Q3.
- 16.Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Kalinina IaM, Demkiv OT, Khorhavtsiv YaD. The role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. 2008. In: Blume YB, Baird WV, Emets AI, Breviario D, editors. The Plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. NATO Science for peace and security series- C: Environmental security. The Netherlands: Springer. p. 173–196.

- 17.<u>Shevchenko GV</u>, Kalinina YaM, Kordyum EL. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. Adv Space Res. 2007; 39: 1171-1175. doi: 10.1016/j.asr.2007.02.072. Q3.
- <u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ya, Kordyum E. Interrelation between cytoskeleton elements in root cells of *Arabidopsis*-GFP-MAP4 seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2006; 13(1):107-108. Q3.
- 19.Kordyum EL, <u>Shevchenko GV</u>, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YaB. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station. Acta Astronautica. 2005; 56: 613-621. doi: 10.1016/j.actaastro.2004.10.006. Q2.
- 20.Kozeko LYe, <u>Shevchenko GV</u>, Artemenko OA, Martyn GG, Kordyum EL. Actin organization and gene expression in *Beta vulgaris* seedlings under clinorotation. J Grav Physiol. 2005; 12(1): 187-188.
- 21.Kordyum EL, Martyn GG, <u>Shevchenko G</u>, Kozeko LYe, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. J Grav Physiol. 2005; 12 (1): 189-190.
- 22.<u>Shevchenko GV</u>, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. Adv Space Res. 2005; 35: 289-295. doi: 10.1016/j.asr.2005.02.021. Q3.
- 23.Kordyum EL, <u>Shevchenko GV.</u> Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. J Grav Physiol. 2003; 10 (1): 15-16. **Q3.**
- 24.Thomas S, Osman K, de Graaf BHJ, <u>Shevchenko G</u>, Wheeler M, Franklin Ch, Franklin-Tong V. Investigating mechanisms involved in the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. Phil Trans R Soc London. 2003; 358: 1033-1036. doi: 10.1098/rstb.2003.1288. **Q1**.
- 25.Кордюм ЕЛ, <u>Шевченко ГВ.</u> Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы. Цитол генет. 2003; 37 (2): 56-68.

- 26.Snowman BN, Kovar DR, <u>Shevchenko G</u>, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. Signal -mediated depolimerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. The Plant Cell. 2002; 14 (10): 2613-2626. doi.org/10.1105/tpc.002998.
 Q1.
- 27. <u>Shevchenko G.</u> Impact of clinorotation on microtubule regulation by tubulinassociated proteins in plants. 26th ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 14th International Conference on "Two-Phase Systems for Space and Ground Applications", European Space Agency Topical Teams meetings, 2019, 24-27 September, Granada, Spain. p. 140.
- 28.<u>Шевченко ГВ.</u> Білки, асоційовані із тубуліновим цитоскелетом як можливі гравісенсори рослин. Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках. Міжнародна наукова конференція, 2019, 25-27 лютого, Київ. с. 197.
- 29. <u>Шевченко ГВ.</u> Дослідження росту рослин в умовах мікрогравітації. Українська конференція з космічних досліджень, 2018, 17-20 вересня, Київ. с. 82.
- 30. Шевченко ГВ. Изменения цитоскелета растений в условиях симулированной микрогравитации. 2-я Международная научнопрактическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», 2018, 28-31 мая, Минск, Беларусь. с.31-32.
- <u>Шевченко ГВ.</u> Ассоциированные с микротрубочками белки чувствительны к воздействию микрогравитации. 17- та Українська конференція з космічних досліджень, 2017, 21-25 серпня, Одеса. с.69.
- 32. <u>Shevchenko G.</u> Microtubule associated proteins might sense gravity changes. 7th International Symposium on Physical Sciences in Space and 25th European Low Gravity Research Association Biennial Symposium and General Assembly, 2017, 2-6 October, Juan-les-Pins, France. p.99-100.
- <u>Шевченко ГВ.</u> Влияние клиностатирования на организацию цитоскелета растительной клетки. 15 Українська конференція з космічних досліджень, 2015, 24-28 серпня, Одеса. с. 55.

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

- 43. <u>Shevchenko G</u>, Kalinina Ia, Kordyum E. Cytoskeleton rearrangements in the distal elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly, 2007, 4-7 September, Florence, Italy. p.67.
- 44. <u>Шевченко ГВ</u>. Цитоскелет рослин під впливом зовнішніх факторів. 2-гий з'їзд

Українського Товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ. с. 224.

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

- 50.Kordyum EL, Martyn GI, <u>Shevchenko GV</u>, Kozeko LE, Artemenko OA. Differentiation of plant graviperceiving and graviresponding cells in altered gravity. 9th European Symposium on Life Sciences Research in Space, 26th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2005, 26 June- 1 July, Cologne, Germany. p.106.
- 51. <u>Shevchenko G</u>, Kordyum E. Actin cytoskeleton in the transition zone of *Beta vulgaris* roots is sensitive to clinorotation. Society Experimental Biology Meeting, Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, 11-15 July, Barcelona, Spain. p. 327.
- 52. <u>Шевченко ГВ.</u> Функції актинового цитоскелету рослин. Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2004, 25-28 квітня, Львів. с. 182.
- 53. <u>Shevchenko G</u>, de Graaf B, Franklin-Tong V. Role of actin-binding proteins in remodeling of actin cytoskeleton during SI response in *Papaver rhoeas* pollen tubes. 14 FESPB Congress, Acta Physiologiae Plantarum 26(3), 2004, 23-27 August, Cracow, Poland. p. 49.