

УДК 576.3+58.02+52-423
№ держреєстрації 0118U003742
Інв. №

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» НАН України
вул. Осиповського, 2а, м. Київ, 04123

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заст. директора з наукової роботи
ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України»

_____ С.М. Шульга

«__» _____ 2018р.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**«РОЗРОБКА КОНЦЕПЦІЇ РЕГУЛЯЦІЇ РОЗВИТКУ ТА СТРЕСОСТІЙКОСТІ
РОСЛИН ДЛЯ ЇХ АДАПТАЦІЇ ДО УМОВ КОСМІЧНИХ ПОЛЬОТІВ ШЛЯХОМ
ЗАЛУЧЕННЯ КЛІТИННО-БІОЛОГІЧНИХ РЕСУРСІВ»**

за Договором від 12.02.2018 р. № 12/18 А

**Етап 1 «Дослідження морфогенезу рослин за умов кліностагування та пошук
(скрінінг) регуляторів росту для його модифікації та корекції»**
(проміжний)

Науковий керівник НДР
д.б.н., проф., академік НАН України

_____ Я.Б. Блюм

Київ – 2018

Результати роботи розглянуто Вченою радою ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки», протокол від 03 грудня 2018 р. № 20

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ**КЕРІВНИК НДР:**

Головний науковий співробітник,
д.б.н., проф., акад. НАН України

Я.Б. Блюм

ВІДПОВІДАЛЬНІ ВИКОНАВЦІ:

Зав. відділу клітинної біології та
біотехнології
д.б.н., проф., чл. кор. НАН України

А. І. Ємець

Провідний науковий співробітник
відділу геноміки та молекулярної
біотехнології, д. б. н.

О. А. Кравець

Науковий співробітник відділу клітинної
біології та біотехнології, к.б.н.

І.І. Горюнова

Молодший науковий співробітник
відділу геноміки та молекулярної
біотехнології

С.Г. Плоховська

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 23 с., 7 рис., 29 джерел.

Об'єкт дослідження – Морфогенез рослин за умов мікрогравітації

Мета роботи – моделювання морфогенезу за допомогою впливу регуляторів росту та пошук шляхів збільшення стресостійкості та адаптації рослин до умов мікрогравітації.

Методи дослідження – морфологічні, фізіологічні, молекулярно-генетичні.

У пошуках покращення технології вирощування рослин за умов кліноостатування в роботі рекомендовано такі живильні середовища як агар (МС) – для рослин з коротким онтогенезом, вермикулит – для нетривалих експериментів, крупний перлит та гродан – для тривалих експериментів. В якості об'єктів дослідження придатними для відносно короткотривалих експериментів відібрано рослини пшениці (*Triticum aestivum*) та арабідопсиса (*Arabidopsis thaliana*), а для тривалих – гороху (*Pisum sativum*), квасолі (*Phaseolus vulgaris*) та базиліку (*Ocimum basilicum*). В роботі використано різні регулятори росту. За показниками росту рослин внесення фітогормонів у живильне середовище не призвело до помітного збільшення стресостійкості рослин до кліноостатування. Умови кліноостатування інгібували розвиток рослин в різних варіантах від 15 до 35% та відповідь рослин на обробку фітогормонами. Кращі темпи розвитку рослин спостерігались на безгормональному середовищі та з додаванням суміші 2,4 Д+кінетина. Обробка насіння нітропрусидом натрію мала захисний ефект щодо зростання стійкості рослин до нестачі вологи за умов кліноостатування та збільшувала толерантність до мікрогравітації у мутантних рослин арабідопсису (AtIPS1).

Результати НДР можуть бути упроваджені в розробку технології систем культивування рослин як природного джерела їжі, фітодизайну та екологічно-відновлювальних замкнутих циклів в умовах космічних польотів.

Прогнозні припущення щодо розвитку об'єкта дослідження – пошук оптимальної технології вирощування рослин за умов мікрогравітації

КУЛЬТУРАЛЬНІ (ПОЖИВНІ) СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КЛІНОСТАТУВАННЯ,
ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ, РЕГУЛЯЦІЯ РОЗВИТКУ РОСЛИН,
СТРЕСОСТІЙКІСТЬ, ФІТОГОРМОНИ, НІТРОПРУСІД НАТРІЮ,
КЛІНОСТАТУВАННЯ

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ВИПРОБУВАННЯ РІЗНИХ ТИПІВ КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН В УМОВАХ КЛІНОСТАТУВАННЯ.....	11
1.1 Основні проблеми культивування рослин за умов горизонтального кліностатування та їх подолання.....	11
1.2 Рекомендовані види рослин в якості об'єктів досліджень за умов кліностатування.....	13
1.3 Опробування штучного типу культурального середовища – мінераловатного субстрату гродан (Grodan) – для оптимізації вирощування рослин в умовах кліностатування.....	14
РОЗДІЛ 2. ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА СТРЕСОСТІЙКІСТЬ ТА АДАПТАЦІЮ РОСЛИН ДО КЛІНОСТАТУВАННЯ	17
2.1 Вплив фітогормонів на розвиток рослин та приріст їх фітомаси.....	17
2.2 Вплив оксиду азоту на стресостійкість рослин	18
2.3 Випробування синтетичних фітогормонів нового покоління.....	19
ВИСНОВКИ.....	20
СПИСОК ПОСИЛАНЬ	21

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

PIN	-	група білків-переносників, що транспортують ауксин із цитоплазми в міжклітинний простір
<i>AUX1</i>	-	ген ауксину 1
<i>AUX/LAX</i>		гени родини трансмембранних білків, що транспортують ауксин
PGP		фосфоглікопротеїни
NO		оксид азоту
ІОК		індоліл оцтова кислота
НОК		нафтіл оцтова кислота
2,4-Д		2, 4-дихлорфеноксіоцтова кислота
SNP		нітроприсид натрію

Вступ

Результати космічних і наземних експериментів з кліноостатуванням показали, що реорганізація структури рослинної клітини та її метаболізму залежать від таксономічного положення та фізіологічного стану об'єктів, фази росту і тривалості впливу реальної або модельованої мікрогравітації [1-3]. Встановлено, що кліноостатування як модельована мікрогравітація відтворює значну частину (хоча не всіх) її біологічних ефектів, які можна корегувати за допомогою впливу різних фізіологічних, хімічних та фізичних чинників.

Важливими індукторами, модифікаторами та коректорами морфогенезу за умов мікрогравітації виступають фітогормони. Показано, що полярний градієнт ауксинів та цитокінінів у рослині ймовірно є гравізалезним, а втім і розподіл асимілятів та їх метаболітів можна корегувати.

Оскільки регуляція морфогенезу здійснюється взаємодією основних фітогормонів, які синтезуються у верхівкових апексах та рухаються назустріч один одному в базипетальному та акропетальному напрямках, то в основі порушень морфогенезу за умов мікрогравітації можуть лежати зміни у синтезі та розподілі фітогормонів в межах рослинного організму. Вважається, що однією з причин, так званого автоморфогенезу за умов мікрогравітації, може бути редукція полярного транспорту ауксину [2, 3]. Крім того, зміни у фітогормональному градієнті обумовлюють послаблення атрагування апікальних меристем і надходження асимілятів до верхівкових апексів. Однак, за іншими даними, розподіл ауксину в гравісенсорній ділянці коріння може не залежати від сили тяжіння [4]. Так, особливості росту коренів у рослин, що були вивчені у космічних експериментах (Experiments on the International Space Station (ISS)) були пов'язані не з ауксинами, а цитокінінами, розподіл яких виявився гравізалезним [4]. Необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти, як формується гравізалезність, системна та клітинна полярність у рослин в земних умовах та невагомості, і як координуються сигнальні та регуляторні системи із залученням ауксинів та цитокінінів з механізмами відповідей на гравітаційні стимули та у відсутності гравістимуляції.

На сьогоднішня більш детально вивчено саме роль ауксину в регуляції росту рослин під час геотропізму, зокрема, при формуванні латерального градієнту ауксину, ініціюючи згинання органів. Показано, що ауксин виступає посередником для перетворення сигналів гравітропізму, рівень ауксину змінюється під впливом симульованої мікрогравітації [5]. Ауксин базипетально транспортується через судинну мережу від верхівки апексу до кінчику кореня, де він перерозподіляється у периферичні тканини (кори, епідерміс) і транспортується акропетально в сенсорні регіони кореня, регулюючи поділ та видовження

клітин [6]. Транспортування ауксину опосередковується завдяки активності асиметрично локалізованих білків-переносників родини PIN, що транспортують ауксин із цитоплазми в міжклітинний простір, та шляхом дифузії [7]. PIN-білки здійснюють транспорт ауксину як в корені, так і в стеблі рослин. PIN-білки здійснюють відтік ауксина з клітки і тим самим формують напрямок його потоку та градієнтів [8, 9].

Переносники PIN рівномірно розподіляються в цитоплазмі після синтезу *de novo*, однак незабаром набувають асиметричного розподілу завдяки селективному видаленню з певних ділянок мембрани шляхом ендцитозу, що залежить від актинового цитоскелету. В геномі *Arabidopsis* описані гени, які кодують 8 білків родини PIN, що асиметрично розташовані на цитоплазматичній мембрані (PIN1, PIN2, PIN3, PIN7) та мембранах ендоплазматичної сітки (PIN5, PIN6, PIN8) [10,11]; і гени родини AUX/LAX, що є трансмембранними [12]. Зокрема, у коренях транспорт ауксину підтримується AUX1, локалізацію якого виявлено в епідермісі, клітинах центрального циліндру, периферичних клітинах кореневого чохла та в колумелі [13]. Виявлено фосфоглікопротеїни (PGP), які належать до транспортних білків, і приймають участь у стабілізації комплексів білків-переносників та транспорті ауксину [13]. Показано, що фітогормони, зокрема ауксини відіграють ключову роль в сигнальному каскаді реакції рослинної клітини, однак, етап трансдукції гравістимулу, що запускає різні адаптивні процеси в клітині, залишається мало дослідженим [7, 14, 15].

Істотну роль в регуляції транспорту ауксину відіграє актиновий цитоскелет, що відповідає за формування латерального градієнту ауксину ініціюючи згинання органів. За умов мікрогравітації значно модифікується експресія генів, що кодують білки, відповідальні за цитоскелет, метаболізм фітогормонів, ліпідний обмін, клітинний поділ, тощо [1-3,14-15].

Враховуючи, взаємозв'язки ауксинів та цитокінінів, можна очікувати, що в регулюванні геотропічної реакції рослин, беруть участь також і інші класи фітогормонів, зокрема цитокініни. Продемонстровано, що кліностагування призводить до суттєвих змін кількості певних цитокінінів (зеатину, зеатин рибозиду та зеатин-О-глюкозиду) у рослин, а також впливає на перерозподіл цитокінінів між коренем та пагоном. Так, в наземній частині квасолі, вміст зеатину зменшувався у 2 рази, тоді як кількість зеатин рибозиду та зеатин-О-глюкозиду збільшувалась в середньому на 25%. З іншого боку, у кореневій системі вміст зеатину та інших цитокінінів знижувався у 5 разів [17]. Таким, чином, за умов мікрогравітації змінюється розподіл цитокінінів, що може впливати на морфогенез, а також на атрагування та транспорт асимілятів, проте ці питання ще потребують подальшого вивчення.

Зважаючи на вказане, досить перспективним є стимулювання стресостійкості рослин до умов мікрогравітації за допомогою певного співвідношення різних фітогормонів. Крім ауксинів та цитокінінів, інші фітогормони та регулятори росту, в тому числі речовини, що за своєю дією подібні до фітогормонів (брасиностероїди, жасмонова кислота, саліцилова кислота, олігосахарини, пептиди, поліаміни та ін.) також можуть модифікувати ріст та розвиток рослин за умов мікрогравітації. Показано, що додавання в середовище МС культивування суспензійної культури *Glycine max* за умов кліноостатування нафталін оцтової кислоти (НОК) (1 мг/мл) та бензил-аміно пурину (БАП) (0,25 мг/л) призводить до інтенсифікації нарощення калюсу *in vitro* [18]. Вирощування рослин *Glycine max* (L.) з насіння в торф'яному субстраті з додавання в нього 1 мг/л брасиностероїдів (брасинолідів) призводила до стимулювання росту пагона, збільшення діаметру стовбуру в прикореневій частині та на верхівці (приблизно, вдвічі), а також видовженню листків та суттєвому зростанню вмісту хлорофілу в їх паренхімі як в контролі, так і в кліноостаті [19]. Додавання 0,1% гіберелевої кислоти в торф'яний субстрат стимулювало ріст пагона у рослин в кліноостаті, але не контролі [19]. При цьому, рослини, які росли за умов кліноостатування, суттєво відставали за розвитком від контрольних. Отже, враховуючи проаналізовані дані, фітогормони, що відіграють ключову роль в сигнальному каскаді реакції рослинної клітини на умов мікрогравітації, можуть бути використані для збільшення їх стресостійкості та стимулювання морфогенезу рослин за умов мікрогравітації.

Поряд з природними регуляторами росту, за останні роки набувають популярності синтетичні органічні регулятори росту, які в низьких концентраціях впливають на життєві процеси рослин, не маючи значної токсичної дії, та не ставлять джерело живлення. Більшість синтетичних регуляторів відносяться до аналогів гетероауксину, гіберелінів, цитокінінів, активаторів або інгібіторів метаболізму та ін. Численні експериментальні дані свідчать про їхню здатність індукувати процеси диференціації клітин з неспецифічних клітин (калюсогенез) та стимулювати морфогенетичні процеси [20].

Для стимуляції нарощування рослинної біомаси в умовах симульованої мікрогравітації було відібрано один з перспективних синтетичних замінників ІОК нового покоління - 8(Метансульфоніл)-2,6-дигідроімідазо[1,2-с]піримідин-5(3Н)-он (Рис.1), що був синтезований та наданий співробітниками Інституту біорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

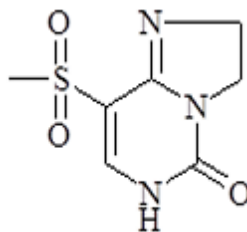


Рисунок 1 – (Метансульфоніл)-2,6-дигідроімідазо[1,2-с]піримідин-5(3Н)-он

Раніше було показано, що зазначений регулятор росту може бути ефективним заміником природних фітогормонів, таких як ауксини та цитокініни; встановлено механізм їх дії через підвищення ендogenous вмісту фітогормонів [21]. Хімічна формула сполуки подібна до хімічної формули ІОК (похідна триптофану). Оскільки рецептори до індолілоцтової кислоти та її похідних не мають сильної специфічності, припускається, що ця сполука може взаємодіяти з сайтами рецепторів до ІОК в цитозолі та на мембранах рослинних клітин.

Серед потенційних модифікаторів морфогенезу за умов мікрогравітації важливе місце посідає оксид азоту (NO) як універсальна сигнальна молекула, що взаємодіє з гормонами і задіяна у сигналінгу за участю реактивних форм кисню, регуляції процесів диференціації, морфогенезу, адаптації, транскрипції (зокрема, генів, тощо. що кодують біосинтез та деградацію ферментів), тощо [22-24]. NO здатний регулювати відповідь рослин до різноманітних абіотичних стресів і усувати наслідки деяких з них (наприклад, сприяти зниженню або запобіганню оксидативного стресу) [25]. Показано, що NO як сигнальна молекула, опосередковує розподіл ауксину при гравістимуляції в первинному корені сої [26]. Так, горизонтальна орієнтація кореня викликає накопичення в кореновому чохлаку ендogenous NO та цГМФ. Зниження рівня NO послаблює гравітаційний згин, що вказує на те, що синтез NO необхідний для гравітропних реакцій. Ауксин стимулює накопичення NO в протопластах коренів та асиметричне накопичення в кореновому чохлаку сої [26]. Показано, що при гравістимуляції в коренях *A. thaliana* відбувається перерозподіл та накопичення ендogenous NO з нижнього боку кореня [26]. Раніше також було показано, що динаміка переміщення NO співпадала із латеральним градієнтом ауксину в коренях *A. thaliana* після гравістимуляції [28]. Динамічна та асиметрична локалізація NO є критичною для регулювання полярного транспорту ауксину під час гравітропізму [27]. Отже, NO задіяний на ранніх етапах регулювання полярного транспорту ауксину під час гравістимуляції. Припускається, що NO є позитивним регулятором гравітропізму, ймовірно, виступаючим в ролі тонкого інтегратора рівня ауксину в коренях

[27, 29]. Однак, загальний механізм цього процесу ще залишається не розкритим. Вважають, що різноманітність ефектів дії оксиду азоту обумовлена утворенням його фізіологічно активних метаболітів і його взаємодією з різними молекулярними мішенями. Отже, використання в пошуках посилювачів стійкості рослин до стресу донорів та сканеджерів NO, який задіяний у регуляції відповіді рослин на стрес і здатний усунути наслідки деяких з них, є, на нашу думку, також перспективним. Дослідження такого роду мають як загальнобіологічне, так і практичне значення для пошуку шляхів збільшення стресостійкості та адаптивного потенціалу рослин, а також для розробки найбільш сприятливих умов культивування рослин як природного джерела їжі, для створення фітодизайну, а також екологічно замкнутих відновлювальних циклів життєзабезпечення для довготривалих космічних польотів.

1 ВИПРОБУВАННЯ РІЗНИХ ТИПІВ КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН В УМОВАХ КЛІНОСТАТУВАННЯ

1.1. Основні проблеми культивування рослин за умов горизонтального кліностатування та їх подолання

Для імітування умов мікрогравітації ми використовували горизонтальний кліностат зі швидкістю обертів 4 оберта на хвилину. Одною з основних проблем вирощування рослин за умов горизонтального кліностатування є, з одного боку, забезпечення оптимальних умов живлення та освітлення для нормального розвитку, з другого боку, – мінімізація впливу центробіжної сили та механічних ушкоджень на рослину та структуру і властивості культурального середовища. Тому, при постановці дослідів, правильний вибір середовища культивування, яке не змінює своїх фізичних властивостей та відповідає вимогам розвитку рослин за умов кліностатування, є важливою складовою успішного завдання.

Ми випробували декілька типів штучного ґрунту/середовища та суміші з натуральних субстратів: агар, перлит, вермикулит, суміш перлиту з вермикулітом, торф, торфосуміш (з мохом та корою) та гродан.

За отриманими результатами агар є найбільш зручним для вирощування рослин малих розмірів та з коротким онтогенезом для короткотривалих дослідів. Так, рослини *Arabidopsis thaliana* за умов кліностатування добре розвивались і навіть мали перевагу у розвитку та просторовому розміщенні вегетативних органів, порівняно з контролем (рис. 1.1). Однак, недоліком агару є необхідність дотримання асептичних умов вирощування та неможливість отримання значної фітомаси рослинами. Тому, для тривалих експериментів більш зручним виявився перлит, причому з фракціями середнього розміру (0,5-0,6 мм), який, на жаль, є рідкістю. Протягом експерименту перлит необхідно періодично зволожувати живильним розчином, наприклад, Хогленда-Арнона. Недоліком перлиту є сипучість субстрату та, пов'язана з нею, проблема механічної фіксації рослин у цьому субстраті під час кліностатування. Розроблялися різні способи подолання цих проблем. Застосування перлиту має сенс у випадку культивування таких видів рослин як квасоля, яка швидко росте, має досить короткий онтогенез, утворює пряме та міцне стебло та розвинену кореневу систему, що фіксує рослину у субстраті (рис. 2.1).

Вермикулит – інший субстрат, який ми використовували в дослідах з кліностакуванням. Його недоліком була поступова зміна фізичних властивостей протягом експерименту, а саме – злипання часток з утворенням повітряних пробок у центрі пластикових ємностей. Для подолання цих недоліків ми спробували різні способи, розробляючи суміші субстратів. Більш зручною, але для випадку короткочасного вирощування рослин виявилась суміш вермикулита з перлитом. За умов нівелювання впливу інших негативних чинників, кліностакування терміном до двох тижнів, з використанням суміші вермикулита з перлитом, не чинило помітного негативного впливу на розвиток рослин (рис. 1.3).

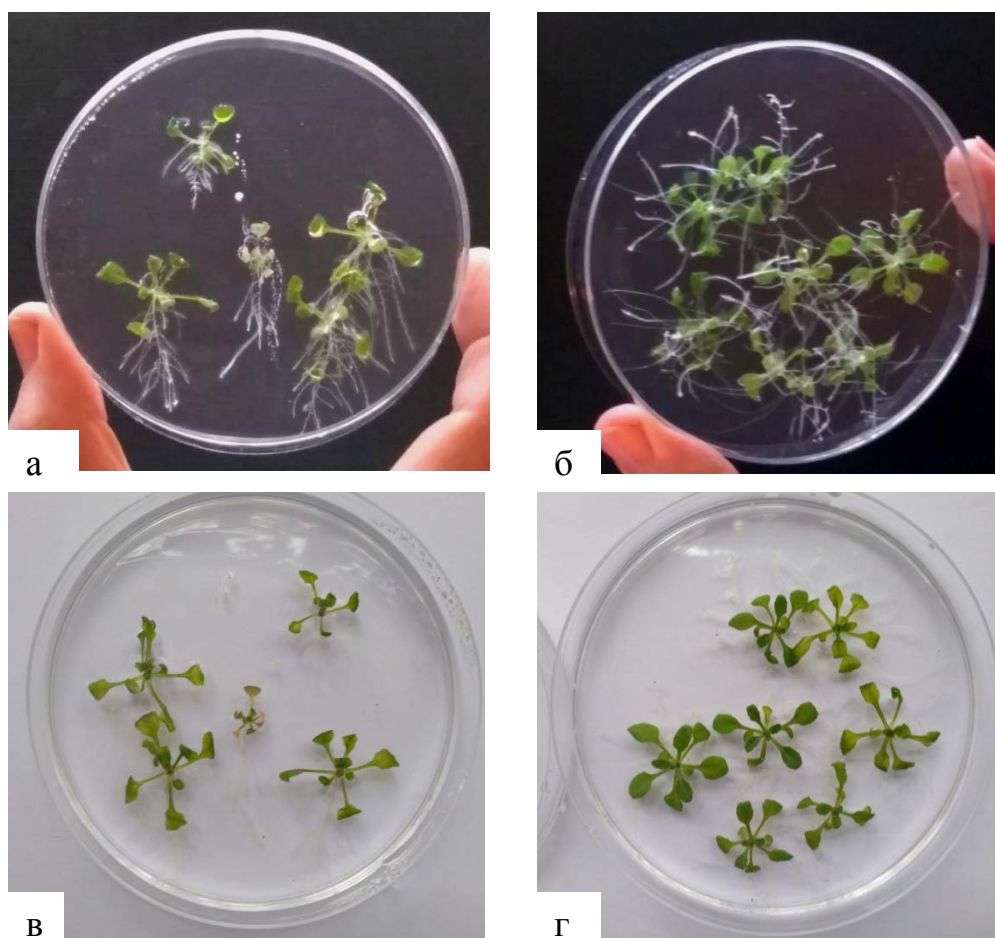
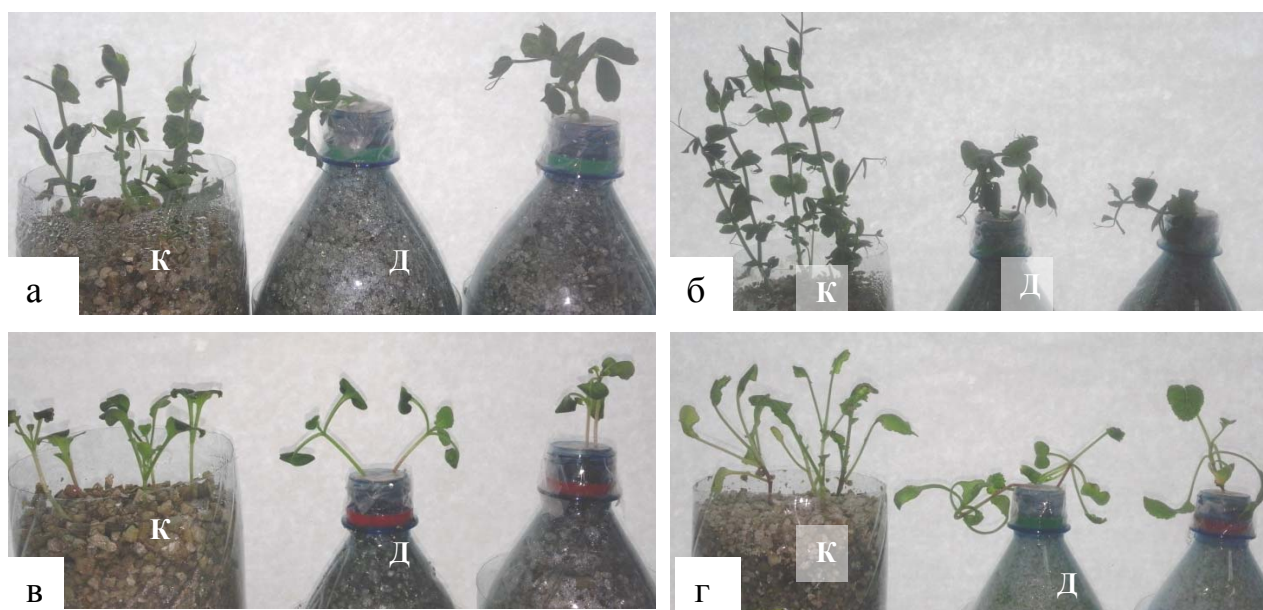


Рисунок 1.1 – Вплив кліностакування протягом 4-х тижнів на розвиток рослин *Arabidopsis thaliana*: а, в – контроль, б, г – дослід.



Рисунок 1.2 – Рослин квасолі звичайної, що ростуть в перліті за умов кліностаування: а – двомісячні рослини, б – 10-денні рослини після промивання від перліту в контролі та досліді.

Однак, більш тривале кліностаування (30 діб та більше) гальмувало розвиток та викликало передчасне старіння рослин (рис. 1.3). Для довготривалих дослідів більш перспективним є перліт, який краще тримає форму та фізичні властивості середовища, а також утримує воду. Разом з тим, повністю так і не вдавалося подолати такий його недолік як сипучість.



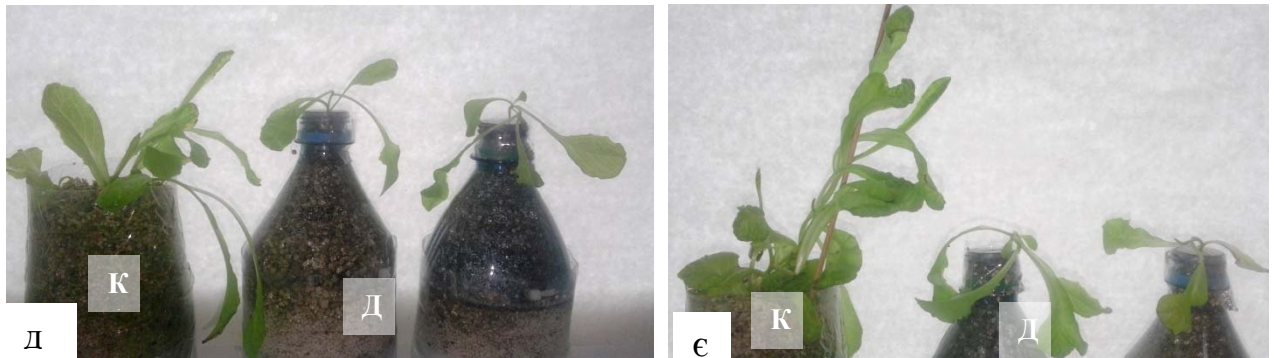


Рисунок 1.3 – Порівняння розвитку рослин за різних умов вирощування, зліва – контроль (К), справа – дослід (Д): а, б – *Pisum sativum*, 12 діб (а), 20 діб (б), в, г – *Raphanus sativus*, 10 діб (б), 30 діб (г), *Lactuca sativa*, 12 діб (д), 20 діб (є). Суміш вермикулита з перлитом.

1.2 Рекомендовані види рослин в якості об'єктів досліджень за умов клінонстатування

В якості об'єктів дослідження ми випробували, т.з. їстівні види: рослини гороху (*Pisum sativum*), квасолі посівної (*Phaseolus vulgaris*), редьки посівної (*Raphanus sativus*), салату посівного (*Lactuca sativa*), петрушки посівної (*Petroselinum vulgare*), пшениці озимої (*Triticum aestivum*) та базиліка пахучого (*Ocimum basilicum*). З класичних об'єктів була обрана різущка Таля (*Arabidopsis thaliana*). Придатними для відносно короткотривалих експериментів виявилися рослини пшениці (до 2 тижнів), арабідопсиса та гороху (до 4-6 тижнів), а для тривалих (до 2 місяців) – квасолі та базиліку. Редис посівний, петрушка посівна та салат посівний за умов клінонстатування виглядають пригніченими з деформованим та слабким стеблом і видовженою та тонкою перехідною, від кореня до стебла, зоною.

1.3 Опробування штучного типу культурального середовища – мінераловатного субстрату гродан (Grodan) – для оптимізації вирощування рослин в умовах клінонстатування

В наступних експериментах для опробування нових типів культурального середовища з метою оптимізації умов адаптації рослин до клінонстатування використовували новий для нас субстрат – мінераловатний Grodan (виробник Данія). Як відомо, до складу гродану входить більше, ніж 20 природних компонентів (кам'яне вугілля, вапно, доломіт, кварц та ін.), головним з яких є базальт. Мінеральна вата, яким є гродан, має такі переваги як висока вологоємність, пористість, стерильність, довговічність, лужне Ph. Однак, основна перевага цього субстрату над тими, що вже були

використані – це несипучість. Розташування волокон в цьому субстраті забезпечує оптимальний розподіл коренів в середовищі та води (рис. 4в), а також співвідношення вода/повітря (<http://greenstore.com.ua/Substraty/Rockwool-Grodan-Classic.html>). Серед недоліків гродану слід відмітити неможливість повторного використання або переробки та проблема з вологістю/перезволоженням.

Використання гродану проводили в два етапи. Спочатку розсаду пророщували в гроданових пробках, загорнутих в поліетиленову плівку. Посів проводили насінням, яке зверху присипали вермикулитом або гроданом та зволожували. Після появи сходів плівку прибирали та пробки переносили в отвір кубиків гродану (10см x 4см). Зволоження проводили шляхом занурення кубиків у розчин поживного середовища (хогленда-Арнона) або воду. Насичування кубиків водою проводили протягом 30 хвилин. Але треба зауважити, що при роботі з гроданом, використання води у досліді та контролі суттєво різнилося, саме: рослини у контролі могли зазнавати перезволоження, а при кліноостатуванні – нестачу вологи. Періодичне зволоження гродану проводили за умови його підсихання: у контролі – через 14 днів, у досліді – через 10-12 днів. В якості об'єктів використовували рослини гороху редьки, салату, пшениці та базилику. Кліноостатування за цих умов не вказувало значного негативного впливу на розвиток рослин (рис. 1.4). Кращий фізіологічний стан демонстрували рослини гороху (рис. 1.4а, б).

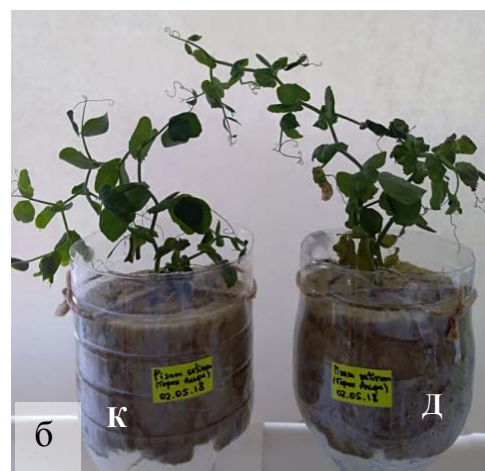




Рисунок 1.4 – Розвиток рослин гороху та пшениці у мінераловатному Grodan: а – рослини гороху 16 діб, б – рослини гороху 4 тижня, зліва – контроль (К), справа – дослід (Д); в, г – рослини пшениці, 2 тижні, в – дослід, г – контроль

2. ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА СТРЕСОСТІЙКІСТЬ ТА АДАПТАЦІЮ РОСЛИН ДО КЛІНОСТАТУВАННЯ

2.1 Вплив фітогормонів на розвиток рослин та приріст їх фітомаси

Розроблялись різні схеми експериментів для вивчення впливу регуляторів росту, та адаптерів морфогенезу рослин з метою його корекції. Для вивчення впливу регуляторів росту на стресостійкість рослин використовували наступні фітогормони у концентраціях, які були попередньо протестовані на контрольних рослинах: ІОК в концентрації 0,1, 1 та 2 мг/л, 2,4-Д (2, 4-дихлорфеноксіоцтова кислота), 0,1 мг/л, кінетин, 0,1 та 1 мг/л, суміш 2,4 Д 0,1 мг/л та кінетину, 1 мг/л. Насіння після стерилізації пророщували на агаровому середовищі (МС), простому та з додаванням фітогормонів. Випробували різні способи стерилізації насіння для подальшого його культивування за асептичних умов. Насіння арабідопсису, шпинату, базиліку, салату, петрушки, пшениці проросло в усіх варіантах з різною інтенсивністю. Кращі темпи розвитку демонстрували проростки на безгормональному середовищі та в контролі з додаванням ІОК в концентрації 0,1 та 1 мг/л. Умови кліностакування інгібували не тільки розвиток рослин, але й їхню відповідь на обробку фітогормонами.

В іншому експерименті вплив фітогормонів вивчали на рослинах базиліку, який виявився найбільш зручним для культивування та обробок. Використовували 2,4-Д, 0,1 мг/л, кінетин, 1 мг/л та суміш 2,4 Д, 0,1 мг/л та кінетину, 1 мг/л. Насіння після стерилізації пророщували на агаровому середовищі (МС), простому (без гормонів) та з додаванням фітогормонів. Кращі темпи розвитку демонстрували проростки на безгормональному середовищі та з додаванням 2,4-Д. Результати впливу фітогормонів в контролі та кліностаковому варіанті різнилися (рис. 5, 6). В контролі кращі темпи розвитку рослин спостерігались на безгормональному середовищі. Умови кліностакування інгібували розвиток рослин в різних варіантах від 15 до 35% до стаціонарного контролю. Найменша різниця між контролем та дослідом спостерігалась у варіанті з обробкою кінетином. Крім варіанту з безгормональним середовищем, кращі темпи розвитку контрольних та дослідних рослин спостерігались у варіанті з додаванням суміші фігормонів 2,4 Д і кінетина, яка стимулювала не тільки розгалуження та утворення бічних коренів, але й збільшення розмірів листків. У дослідних рослин такий ефект був менший, а варіювання розмірів та форми рослин і кореневої системи – більшими. Кінетин інгібував розвиток коренів, але дещо стимулював ріст листків та епикотилію, особливо у контрольних рослин (рис. 2.1в, г, 6). В цілому, за темпами розвитку рослин протягом

одного місяця, внесення фітогормонів у живильне середовище не призвело до значного збільшення стресостійкості рослин до клінонстатування.

2.2 Вплив оксиду азоту на стресостійкість рослин

Оскільки оксид азота (NO) як універсальна сигнальна молекула, задіяна у сигналінгу за участю фітогормонів, для стимуляції адаптації до клінонстатування можна використовувати нітропрурид натрію (SNP) як донор NO. Проведено ряд експериментів з використанням *Arabidopsis thaliana* (Колумбія 0) дикого типу та мутанта за міо-інозитол-1-фосфатсинтазою (AtIPS1), трансформованого геном, що кодує химерний ген глутарадоксину та гоGFP2. Рослини *Arabidopsis* попередньо обробляли нітропруридом натрію в різних концентраціях (від 10 до 100 мкМ). У мутантних рослин цей захисний ефект SNP, як правило, був більш виражений і проявлявся у толерантності до мікрогравітації.

В іншому експерименті використовували пшеницю та базилік. Обробляли SNP сухе насіння у концентрації 100 мкМ протягом 60 хв., після чого насіння саджали у гродан та вирощували протягом 4 тижнів за умов клінонстатування та контролю. Обробка не вплинула на темпи розвитку рослин, але мала захисний ефект щодо збільшення стійкості рослин до нестачі вологи за умов клінонстатування (рис. 2.2).



Рисунок 2.1 – Вплив фітогормонів на розвиток рослин *Ocimum basilicum*, що зростали за умов клінонстатування та горизонтального контролю протягом одного місяця: а – контроль, б-г – з додаванням у живильне середовище MS 2,4-Д (б), 2,4 Д + кінетин (в) та кінетину (г).

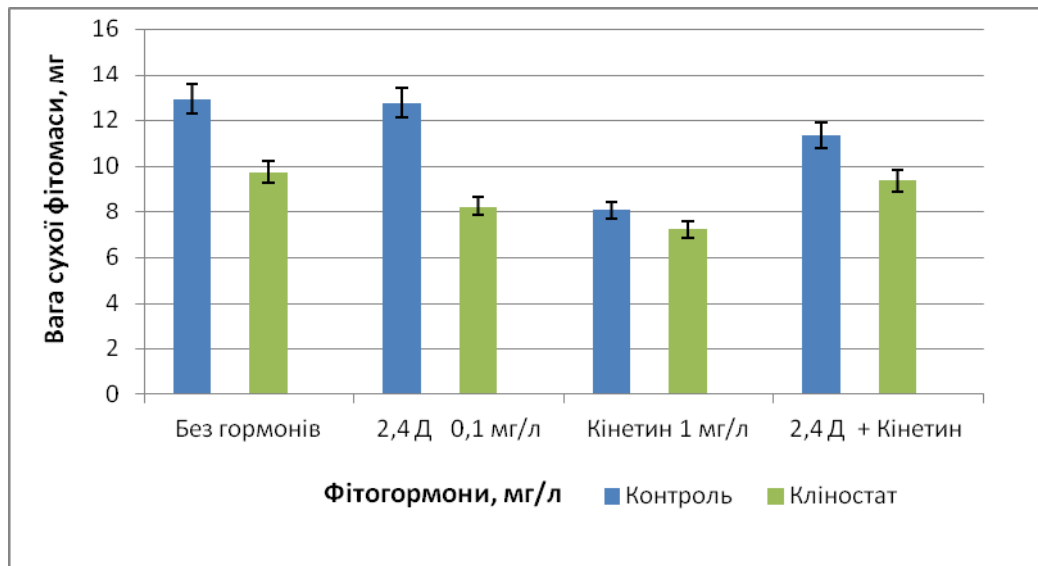


Рисунок 2.2 – Вплив фітогормонів на вагу сухої фітомаси рослин базилику в контролі та за умов клінолатування

2.3 Випробування синтетичних фітогормонів нового покоління

Для стимуляції росту рослин в умовах клінолатування було опробовано перспективний замітник фітогормонів нового покоління – 8(Метансульфоніл)-2,6-дигідроімідазо[1,2-с]піримідин-5(3Н)-он. Попередньо проведені дослідження *in vivo* та *in vitro* показали, що ефективною концентрацією речовини для інтенсивного нарощення біомаси рослин є 10^{-9} молярний водний розчин цієї сполуки (неопубл.). На основі цих даних вказана концентрація була обрана нами для стимулювання росту рослин в умовах модельованої мікрогравітації. Однак обробка двотижневих проростків базилику та пшениці цим фітогормоном у концентрації 10^{-9} М виявила токсичний ефект (рис. 2.3).





Рисунок 2.3 – Вплив нітропрусиду натрію на стресостійкість проростків (а) та синтетичного замітника ІОК (б) на розвиток рослин базилика за умов кліноостатування та контролю.

Висновки

За умов кліноостатування для короткотривалих дослідів та рослин з коротким онтогенезом рекомендовано агарове середовище (МС), хоча його недоліком є асептичність та неможливість отримання значної фітомаси рослинами.

Для нетривалих експериментів зручною є суміш вермикулиту з перлитом або вермикулит, який характеризується адгезією часток та високою вологоємністю.

Для тривалих експериментів доцільно використовувати перлит з фракціями середнього розміру, хоча його недоліком є сипучість та проблема механічної фіксації рослин.

Мінераловатний гродан має декілька переваг – несипучість, високу вологоємність, пористість, стерильність, тому його доцільно використати для довготривалих дослідів.

В якості об'єктів дослідження для відносно короткотривалих експериментів рекомендовано рослини пшениці (*Triticum aestivum*) та арабідопсиса (*Arabidopsis thaliana*), а для тривалих – гороху (*Pisum sativum*), квасолі (*Phaseolus vulgaris*) та базилику (*Ocimum basilicum*).

Умови кліноостатування інгібували розвиток рослин від 15 до 35% та відповідь рослин на обробку фітогормонами. Кращі темпи розвитку рослин спостерігались на безгормональному середовищі та з додаванням суміші 2,4 Д+кінетина. В цілому, за показниками росту внесення фітогормонів у живильне середовище не призвело до значного збільшення стресостійкості рослин до кліноостатування.

Обробка насіння нітропрусидом натрію мала захисний ефект щодо зростання стійкості рослин до нестачі вологи за умов кліностатування та збільшувала толерантність до мікрогравітації у мутантних рослин арабідопсису (AtIPS1).

Обробка проростків базиліку та пшениці синтетичним фітогормоном – заміником ІОК – у концентрації 10^{-9} М виявила лише токсичний ефект.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

1. Kordyum E.L. Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostatic experiments // *Adv Space Res.* – 1994. – Vol.14. – N 8. – P. 77–85.
2. Ueda J., Miyamoto K., Yuda T., Hoshino T., Fujii S., Mukai C., Kamigaichi S., Aizawa S., Yoshizaki I., Shimazu T., Fukui K. Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment // *J. Plant Res.* – 1999. – Vol. 112. – P. 487–492.
3. Hoson T., Soga, K., Wakabayashi K., Hashimoto T., Karahara I., Yano S., Tanigaki F., Shimazu, T., Kasahara H., Masuda D. Growth stimulation in inflorescences of an Arabidopsis tubulin mutant under microgravity conditions in space // *Plant Biol.* – 2014. – Vol. 16. – P.91–96.
4. Ferl R.J., Paul A-L. The effect of spaceflight on the gravity-sensing auxin gradient of roots: GFP reporter gene microscopy on orbit// *npj Microgravity.* – 2016. Vol. 2, 15023; doi:10.1038/npjmgrav.2015.23.
5. Medina F.J., Herranz R. Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells: the mediator role of auxin // *Plant Signal Behav.* – 2010. – V.5(2). – P.176-179.
6. Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth // *Plant J.* – 2002. – Vol. 28(4). – P. 465–474.
7. Grunewald W., Friml J. The march of the PINs: Developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29. – P. 2700–2714.
8. Petrasek J., Mravec J., Bouchard R. *et al.* PIN proteins perform rate-limiting function in cellular auxin efflux // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – P. 914–918.
9. Wisniewska J., Xu J., Seifertová D. *et al.* Polar PIN localization directs auxin flow in plants // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – P. 883–92.

10. Friml J., Jones A.R. Endoplasmic reticulum: the rising compartment in auxin // *Plant Physiol.* – 2010. – V.154. – P. 458–462.
11. Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Krecek P., Bielach A., Petrásek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.D, Dobrev P.I, Schwarzerová K., Rolcík J., Seifertová D., Luschnig C., Benková E., Zazimalová E., Geisler M., Friml J. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter // *Nature.* – 2009. – 459. – P. 1136–1140.
12. Swarup R., Péret B. AUX/LAX family of auxin influx carriers // *Front. Plant Sci.* – 2012. – 3. – P. 225.
13. Swarup R., Kramer E.M, Perry P., Knox K., Leyser H.M., Haseloff J., Beemster G.T., Bhalerao R., Bennett M.J. Root gravitropism requires lateral root cap and or transport and response to a mobile auxin signal // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – V.7. – P. 1057–1065.
14. Kolesnikov Y.S., Kretynin S.V., Volotovskiy I.D., Kordyum E.L., Ruelland E., Kravets V.S. Molecular mechanisms of gravity perception and signal transduction in plants // *Protoplasma* – 2016. – Vol. 253. – N 4. – P. 987–1004.
15. Zheng H.Q., Han F., Le J. Higher plants in space: microgravity perception, response and adaptation // *Microgravity Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 27. – N 6. – P.377–386. doi 10.1007/s12217-015-9428-y.
16. Paul A.L., Zupanska A.K., Schultz E.R., Ferl R.J. Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight // *BMC Plant Biol.* – 2013. – Vol.13. – P. 1–11.
17. Вединичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокініни, як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. – Київ: Наш формат. – 2017. – 200 с.
18. Downey P.J., Levine L.H., Musgrave M.E., McKeon-Bennett M., Moane S. Effect of hypergravity and phytohormones on isoflavonoid accumulation in soybean (*Glycine max.* L.) Callus // *Microgravity Sci. Technol.* – 2013. – V.25. – P.9–15.
19. Sass A.C. Future Plants: Effects of Gibberellic Acid and Brassinolide on Plants in a Simulated Microgravity Environment // A Biology Paper presented to junior science, engineering and humanities symposium. – University of Missouri-St. Louis. – 2017. –

20. Циганкова В.А., Пономаренко С.П., Галкін А.П., Ємець А.І. Регулятор росту «Чаркор» як індуктор накопичення біомаси в культурах «бородатих» коренів цикорію – продуцентів поліфруктанів // Біотехнологія. – 2012. – Т.5 (4). – с.65-73.
21. Матвєєва Н.А., Циганкова В.А., Чапкевич С.О., Кучук М.В. Пономаренко С.П. Використання регуляторів росту рослин для інтенсифікації росту біомаси та підвищення вмісту поліфруктанів у культурах «бородатих» коренів цикорію // Вісн. Укр. тов.-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т.10 (2). – С. 269-278.
22. Freschi L. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives // *Frontiers Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – P. 398.
23. Baudouin E, Hancock JT. Nitric oxide signaling in plants. // *Front Plant Sci.* –2014. – 4. – P.553. doi: 10.3389/fpls.2013.00553. eCollection 2013.
24. Domingos P, Prado AM, Wong A, Gehring C, Feijo JA. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. // *Mol Plant.* – 2015. – 8(4) –P. 506-20.
25. Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T., Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 515-523.
26. Hu X., Neill S.J., Tang Z., Cai W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean root // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 137. – P. 663-670.
27. Paris R., Vazquez M.M., Graziano M., Terrile M.C., Miller N.D., Spalding E.P., Otegui M.S., Casalongue1 C.A. Distribution of endogenous NO regulates early gravitropic response and PIN2 localization in Arabidopsis roots // *Frontiers Plant Sci.* – 2018. – doi: 10.3389/fpls.2018.00495.
28. Band L. R., Wells D. M., Larrieu A., Sun J., Middleton A. M., French A. P., et al. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*– 2012. – 109. – P.4668–4673. 10.1073/pnas.1201498109
29. Fernandez-Marcos M., Sanz L., Lewis D.R., Muday G.K., Lorenzo O. 2011. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – V. 108. – P. 18506–18511.