

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

DALIA KORYZNIENĖ

SĖJAMOSIOS PIPIRNĖS GRAVITACIJOS JUTIMO TYRIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, botanika (04 B)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2006 – 2012 metais Gamtos tyrimų centro Botanikos institute, Eksperimentinės augalų ekologijos laboratorijoje.

Mokslinė vadovė:

dr. **Danguolė Švegždienė** (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

Mokslinė konsultantė:

dr. **Danguolė Raklevičienė** (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B)

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju disertacijos vadovei dr. **Danguolei Švegždieni** už pagalbą atliekant eksperimentus, rašant straipsnius, disertaciją, už vertingus patarimus ir pastabas, geranoriškumą, begalinę kantrybę ir nuolatinį rūpinimąsi.

Esu dėkinga disertacijos konsultantei dr. **Danguolei Raklevičienei** už patarimus, vertingas idėjas, pastabas ir konsultacijas.

Už palaikymą nuoširdžiai dėkoju visam Eksperimentinės augalų ekologijos laboratorijos ir Augalų fiziologijos laboratorijos **kolektyvui**.

Taip pat esu dėkinga **savo šeimai** ir artimiausiems **draugams** už supratimą, dėmesingumą, pagalbą ir galimybę parengti šį darbą.

Dėkoju **Valstybiniam mokslo ir studijų fondui** už finansinę paramą atliekant eksperimentus ir ruošiant disertaciją.

SANTRUMPOS

1 g – Žemės gravitacinės (sunkio jėgos) dydis. Ji yra visada tokia pati bet kurioje Žemės paviršiaus vietoje ir laisvai krentantiems kūnams ties Žemės paviršiumi suteikia pagreitį $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

g – gravitacinės jėgos dydžio matavimo vienetas. Objektą veikianti gravitacinė jėga yra proporcinga to objekto masei, taigi galima gravitacijos stiprumą išmatuoti svorio vienetais vienam masės vienetui, t. y. N/kg. Tačiau $1 \text{ N/kg} = 1 \text{ m/s}^2$, o m/s^2 yra SI pagreičio vienetas, todėl dažniausiai gravitacijos dydis matuojamas pagreičio vienetais.

ABR – abscizo rūgštis

ADF – aktiną depolimerizuojantis faktorius

AGML – aukšto gradiento magnetinis laukas

Am – amiloplastai

ARG1, RGH – baltymai turintys J domeną, būtini šaknų ir hipokotilių gravitropizmo procesui

En – endodermio ląstelės

ET – endoplazminis tinklas

HK – imituota mikrogravitacija arba horizontalus klinostatas

IAR – indolil-3-actio rūgštis (auksinas)

INV – inversija

IP₃ – Inozitol -1,4,5-trifosfatas

KC – kosminė centrifuga

KML – silpnas kombinuotas magnetinis laukas

Lat-B – latrunkulinas B (aktino tinklą ardantis agentas)

MF – aktino mikrofilamentai (aktino gijos)

MG – mikrogravitacija

MV – mikrovamzdeliai

ŽK – Žemės kontrolė (1 g)

EGTA – etilenglikol O,O'-bis (2-aminoetil) N,N,N',N' tetraactio rūgštis

KAI KURIŲ SAŲVOKŲ PAAIŠKINIMAI

Stenchema – šaknies gravisensorinis audinys (kūgiškos formos audinys šaknies šalmelio centrinėje dalyje)

Statocitai – šaknies ir stiebo gravisensorinės ląstelės, kuriose yra gravitacijai jautrūs amiloplastai (statolitai)

Statolitai – sutartinis amiloplastų, esančių gravisensorinėse ląstelėse ir atliekančių gravisensorių funkciją (gravitropinio dirginimo metu keičia savo padėtį ląstelėse) pavadinimas.

Endodermis – stiebo gravisensorinis audinys

Inversija – daigo pavertimas 180° kampu (dirginimas)

Morfologinis statocito dugnas – hipokotilio endodermio ląstelės bazalinė (apatinė) sienelė ir šaknies šalmelio statenčimos audinio ląstelės distalinė sienelė.

Mikrogravitacija – sutartinis silpnų gravitacinių jėgų, veikiančių objektus kosminiuose aparatuose skrydžio sąlygomis, pavadinimas. Jų šaltinis – kosminio aparato manevrai erdvėje, įgulos fizinė veikla ir t.t.. Šios jėgos lemia apie 0,000001 g dydžio pagreičius, tačiau trumpalaikiai trikdžiai gali siekti 0,001 g.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
KAI KURIŲ SAŲVOKŲ PAAIŠKINIMAI.....	5
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪRINĖ TYRIMŲ APŽVALGA.....	14
1.1. Gravitacijos poveikio augalams atžvilgiai.....	14
1.2. Augalų gravisensorinio aparato organizacijos anatomiciniai ir funkciniai ypatumai daigo ašiniuose organuose.....	19
1.3. Gravitropizmo procesas.....	27
1.3.1. Gravitacijos signalo percepcija.....	27
1.3.2. Gravitacijos signalo transdukcija.....	39
1.3.3. Gravitropinis atsakas.....	43
2. TYRIMŲ OBJEKTAS, MEDŽIAGOS IR METODAI.....	47
2.1. Įranga daigų auginimui mikrogravitacijos ir pakitusios gravitacijos sąlygomis.....	47
2.2. Bandymų metodikos statolitų lokalizacijos ir judesių gravisensorinėse ląstelėse tyrimams.....	50
2.2.1. Bandymo mikrogravitacijos sąlygomis aprašas.....	50
2.2.2. Bandymų pakitusios gravitacijos sąlygomis (centrifuga – klinostatas) aprašas.....	51
2.2.2.1. Nuolatinis gravitropinis daigų dirginimas veikiant skirtingo dydžio gravitacine jėga.....	52
2.2.2.2. Trumpalaikis gravitropinis daigų dirginimas skirtingos krypties ir dydžio gravitacine jėga.....	52
2.3. Nuolatinių histologinių preparatų paruošimas.....	54
2.4. Gravisensorinių audinių citomorfologinė analizė.....	55
2.5. Duomenų statistinė analizė.....	57
3. TYRIMŲ REZULTATAI.....	59
3.1. Gravitacinės jėgos dydžio įtaka gravisensorinių ląstelių	

formavimuisi sėjamosios pipirnės daigų ašiniuose organuose.....	59
3.1.1. Realios mikrogravitacijos poveikis daigų gravisensorinių ląstelių formavimuisi.....	59
3.1.2. Imituotos mikrogravitacijos poveikis sėjamosios pipirnės daigų gravisensorinio audinio formavimuisi.....	67
3.2. Nuolatinis skirtingo dydžio gravitacijos poveikis amiloplastų išsidėstymui išilgai sėjamosios pipirnės daigų statocitų.....	74
3.3. Trumpalaikis gravitacinės jėgos poveikis amiloplastų judesiams išilgai sėjamosios pipirnės daigų gravisensorinių ląstelių.....	80
3.3.1. Imituotos mikrogravitacijos ir inversijos poveikis statolitų kinetikai išilgai 1 g daigų gravisensorinių ląstelių.....	81
3.3.2. Statolitų judėjimo išilgai HK daigų gravisensorinių ląstelių priklausomybė nuo gravitacijos vektoriaus veikimo krypties.....	91
3.4. Statolitų sedimentacijos 1 g daigų ašinių organų statocituose kinetika gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu.....	100
4. APIBENDRINIMAS.....	107
IŠVADOS.....	119
DISERTACIJOS TEMA SKELBTŲ MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	121
NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	124

IVADAS

Augalų gebėjimas justai gravitaciją bei reaguoti augimo judesiais tiriamas jau daugiau nei 150 metų. Daug dėmesio mokslininkai skyrė išaiškinti gravitacijos pokyčių jutimo mechanizmams, kurie kol kas dar nėra visiškai iširti. Daug klausimų iškyla ir analizuojant tolesnius signalo perdavimo procesus iki atsakomosios reakcijos (diferencijuotas augalo dalių augimas). Svarbus veiksnys, paskatinęs augalų reakcijų į gravitacijos pokyčius tyrimus, buvo kosminiai skrydžiai. Jų metu augalai auga tokiomis sąlygomis, kuriomis Žemės gravitacinė (sunkio) jėga nebeveikia (nesvarumas) arba jos dydis sumažėja iki mikrogravitacijos lygmens. Nors įrodyta, kad augalai skrydžio sąlygomis gali praeiti pilną ontogenezės ciklą (Merkys, Laurinavičius, Švegždienė, 1984; Musgrave et al., 2000), bet sutrinka įprasta erdvinė orientacija, kuri ypač svarbi sėklų dygimo ir daigų vystymosi laikotarpiu. Evoliucijos metu susiformavo sudėtinga gravitacijos jutimo sistema, kuriai veikiant augalas orientuoja savo organus gravitacijos vektoriaus kryptimi (šaknis) arba priešinga jam linkme (antžeminė augalo dalis). Daugelyje pakeisto svarumo sąlygomis atliktų bandymų su augalais registruojami nedideli, bet statistiškai patikimi morfologijos bei metabolizmo pakitimai, liudijantys apie realiai egzistuojančius ląstelės sąveikos su gravitacija mechanizmus (Soga et al., 1999; Hoson et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009; Matía et al., 2010; Manzano et al., 2012). Šiuo aspektu ypač reikšmingi specializuoto gravisensorinio audinio formavimosi ir visos gravisensorinės sistemos funkcionavimo pakitusios gravitacijos sąlygomis tyrimai, nes jie padeda suprasti, kaip funkcionuoja augalų erdvinės orientacijos mechanizmas ir koku būdu šie procesai integruojasi į bendrą augalo augimo ir vystymosi programą.

Specifinę gravisensorinių ląstelių funkciją augalų šaknyse atlieka šalmelio centrinės dalies – statenchimos ląstelės, o antžeminėje augalo dalyje – endodermio ląstelės. Daugelio tyrimų rezultatai patvirtina krakmolo-statolitinę

teoriją (Laurinavičius et al., 2001; Kato et al., 2002; Driss-Ecole et al., 2003; Vitha et al., 2007; Kumar et al., 2008), kuri teigia, jog fizinėje gravitropinio sudirginimo fazėje statolitai, t.y. atitinkamą masę turintys struktūriniai gravisensorinės ląstelės komponentai – amiloplastai, keičia padėtį ir tuo metu potencinė energija virsta kinetine energija, dėl ko sukeliamas biocheminis signalas, perduodamas kitoms ląstelės struktūroms. Kaip gravitacijos indukuotas statolitų padėties kitimas paleidžia pirminį biocheminį signalą apie 100 metų buvo mįslė. Šiuo metu manoma, jog statolitai sąveikauja su aktino mikrofilamentais per mioziną ir su juo susijusiais baltymais, lokalizuotais šių plastidžių paviršiuje (Hou et al., 2003). Pagal vyraujančias statolitines gravipercepcijos (gravitacijos jutimo) hipotezes (Yoder et al., 2001; Hou et al., 2003; Blancaflor, Masson, 2003; Perbal, 2009; Kumar et al., 2008), citoskeleto aktino-miozino sistema vienokiu ar kitokiu būdu atsakinga už šaknies gravisensorinių ląstelių polišką struktūrą, aktyviai dalyvauja gravitacinio signalo priėmimo ir vėlesniuose jo virsmuose.

Šaknies gravisensorinės sistemos tyrimai gana toli pažengę, tačiau kas vyksta antžeminės augalo dalies statocituose pirmųjų gravipercepcijos fazių metu - iki šiol žinoma mažai. Svarstoma prielaida apie tai, kad minėta sąveika tarp statolitų ir gravisensorinės ląstelės aktino-miozino sistemos gali būti universaliu gravitacijos jutimo mechanizmu tiek šaknyje, tiek antžeminėje augalo dalyje. Pastaraisiais metais ši prielaida intensyviai nagrinėjama taikant įvairius metodus, tokius kaip statocitų citoskeleto struktūros ir kontaktų su statolitais vizualizacija (Driss-Ecole et al., 2000; Volkmann, Baluška 2000; Collings et al., 2001; Blancaflor, 2002; Driss-Ecole, 2003; Palmieri et al., 2007; Perbal, 2009; Zhang et al., 2011), aktino mikrofilamentų funkcijų analizė farmakologiniais (Yamamoto, Kiss, 2002; Hou et al., 2003; Palmieri, Kiss, 2005) ir molekulinės genetikos metodais (Vitha et al., 2007; Kumar et al., 2008; Nakamura et al., 2011) ir t.t. Tačiau eksperimentiniai duomenys apie ryšį tarp amiloplastų-statolitų judėjimo ir citoskeleto struktūrinių elementų gravitacinio signalo percepcijos procesuose nėra vienareikšmiai. Be minėtų metodų galimi ir kiti gravisensorinio aparato funkcionavimo tyrimo metodai,

pvz., statolitų kinetikos pakitusio svarumo sąlygomis teorinis modeliavimas. Tačiau šio metodo taikymą labai apsunkina sudėtinga struktūrinių ir mechaninių citoplazmos bei aktino tinklo savybių prigimtis (Perbal et al., 2004) bei žinių apie jų mechanines savybes stoka (Todd, 1994; Driss-Ecole et al., 2008).

Vienas iš netiesioginių metodų eksperimentiškai įvertinti citoskeleto ir amiloplastų sąveiką yra ryšio tarp gravitacinės jėgos ir statolitų judesių analizė keičiant vektorinius jėgos parametrus – dydį ir/ar veikimo kryptį. Žinoma, jog statolito padėtį vertikaliai Žemėje augančios šaknies statocite apsprendžia kelių jėgų balansas. Tai 1 g gravitacinė jėga ir priešingos krypties viduląstelinė jėga (plūdrumo (Archimedo), trinties, citoskeleto generuojamos elastingos jėgos ir t.t.) visuma (Björkman 1988; Todd, 1994; Yoder et al., 2001). Nustatyta, kad sumažinus gravitacinės jėgos dydį nuo 1 g iki realios mikrogravitacijos kosmose ar imituojant ją Žemėje viduląstelinės jėgos traukia amiloplastus link šaknų gravisensorinių ląstelių centro (Volkman et al., 1991; Laurinavičius et al., 2001; Yoder et al., 2001; Driss-Ecole et al., 2008). Tačiau mažai žinoma, kur ir kaip šios jėgos sąveikauja ir reguliuoja statolitų viduląstelinę lokalizaciją įprastoje gravitacinėje aplinkoje ir pakitus gravitacinės jėgos parametrams – dydžiui ir veikimo kryptim. Todėl duomenys apie statolitų judesių statiką ir kinetiką tiksliai dozuojant gravitacinius stimulus gali suteikti informacijos kaip apie reologines pačios citoplazmos savybes atskirose statocito srityse, taip ir apie viduląstelinė jėgų amplitudę bei veikimo kryptį. Taikant šį metodą parodytos kai kurios lęšio, sėjamosios pipirnės, kukurūzo šaknų gravisensorinių ląstelių citoskeleto mechaninės savybės, jo reikšmė ląstelių struktūrinei poliarizacijai ir funkcionavimui tiek kosminio skrydžio, tiek ir Žemės sąlygomis (Volkman et al., 1991; Laurinavičius et al., 2001; Yoder et al., 2001; Driss-Ecole et al., 2008). Dirginant daigus gravitacine jėga išilgine bei skersine kryptimis ar mažinant jos dydį iki nesvarumo galima tikėtis, kad paaiškės viduląstelinė jėgų kryptis ir poveikis atsakomajam statolitų judėjimui atskirose šaknies ir antžeminės augalo dalies gravisensorinių ląstelių srityse.

Manome, kad tai suteiks galimybę išsiaiškinti to paties augalo ašinių organų gravitacijos jutimo panašumus ir skirtumus.

Darbo tikslas – nustatyti amiloplastų (statolitų) viduląstelinio išsidėstymo ir judėjimo sėjamosios pipirinės daigo ašinių organų gravisensorinėse ląstelėse (statocituose) priklausomybę nuo gravitacinės jėgos pokyčių, įvertinti to paties daigo teigiamai ir neigiamai gravitropiškų organų viduląstelinių gravitacijos jutimo mechanizmų savitumus.

Darbo uždaviniai:

- Nustatyti daigų šaknų ir hipokotilių gravisensorinių ląstelių formavimosi ypatumus ir palyginti juos esant realios ir imituotos mikrogravitacijos sąlygoms.
- Nustatyti amiloplastų viduląstelinio išsidėstymo šaknų ir hipokotilių statocituose priklausomybę nuo daigus nuolat veikiančios gravitacinės jėgos dydžio.
- Ištirti amiloplastų judėjimo šaknų ir hipokotilių statocituose priklausomybę nuo išilgine kryptimi daigus veikiančios gravitacinės jėgos pokyčių.
- Nustatyti amiloplastų sedimentacijos savitumus šaknų ir hipokotilių statocituose veikiant daigus skersine kryptimi 1 g gravitacine jėga.

Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė

Pirmą kartą augalų gravitacijos jutimo procesų tyrimui Žemėje pritaikyta amiloplastų judėjimo indukcija skirtingo dydžio gravitaciniais signalais, modeliuojamais unikaliu prietaisu – centrifuga-klinostatu „Neris-7“ su specialia įranga daigų auginimui ir cheminei fiksacijai toje pačioje gravitacinėje aplinkoje.

Pirmą kartą palygintas nuolatinių ir trumpalaikių gravitacinės jėgos dydžio ir krypties pokyčių poveikis amiloplastų viduląsteliniam išsidėstymui ir judėjimui to paties daigo šaknies ir hipokotilio statocituose.

Originalus gravitacinės jėgos signalų formavimo metodas (keičiant jos dydį ir veikimo kryptį) amiloplastų judesiams išprovokuoti leido įvertinti kitų viduląstelinių struktūrų reikšmę šių plastidžių išsidėstymui ir mobilumui priešingos krypties gravitropizmu pasižyminčių organų gravisensorinėse ląstelėse.

Pirmą kartą analizuojant daigus, išaugusius unikaliame aparate „Neris-5“ nepilotuojamo biopalydovo „Bion-10“ skrydžio metu, įvertinta gravitacijos reikšmė gravisensorinio audinio formavimuisi ir struktūrai to paties daigo ašiniuose organuose realios mikrogravitacijos sąlygomis.

Pirmą kartą nustatyta amiloplastų (statolitų) išsidėstymo priklausomybė nuo gravitacinės jėgos dydžio teigiamo gravitropiškumo organų – hipokotilių endodermio ląstelėse.

Gauta nauja informacija apie skirtingo gravitropiškumo augalo ašinių organų gravitacijos jutimo mechanizmus.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- Mikrogravitacija (reali ir imituota) šaknų ir hipokotilių gravisensorinių ląstelių augimą ir jų struktūrą veikia skirtingai.
- Statolitų išsidėstymas šaknų ir hipokotilių statocituose nuolatinio gravitropinio dirginimo metu nėra atsitiktinis ir priklauso nuo gravitacinės jėgos, veikiančios daigus šaknies viršūnės kryptimi, dydžio.
- Vienkryptės gravitacinės jėgos eliminavimas (klinostatuojant), jos veikimo krypties pakeitimas (inversija) išprovokuoja panašų statolitų judėjimą išilgai 1 g daigų ašinių organų gravisensorinių ląstelių. Statolitų judėjimas iš gravisensorinių ląstelių centro, priklauso nuo veikiančios gravitacinės jėgos krypties, o judėjimo intensyvumas šaknų ir hipokotilių statocituose skiriasi.
- Gravitacinis dirginimas skersine augalo ašiai kryptimi sukelia amiloplastų sedimentaciją ir aktyvų jų slinkimą gravisensorinės ląstelės centro link. Amiloplastų judėjimo intensyvumas ir trajektorija šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse skiriasi.

Disertacinio darbo aprobavimas ir publikacijos

Tyrimų rezultatai paskelbti 9 moksliniuose straipsniuose, iš kurių 3 ISI WOS duomenų bazės leidiniuose, trys – leidiniuose įtrauktuose į ISI duomenų bazę ir 8 tezėse bei spausdintuose mokslinių konferencijų pranešimuose.

Pagrindiniai šio darbo rezultatai buvo pristatyti 7 tarptautinėse konferencijose organizuojamose COSPAR/Kosmoso Tyrimų Komiteto (2004); ESA/Europos Kosmoso Agentūros ir ELGRA/Europos Hipogravitacijos Tyrimų Asociacijos (2005, 2008, 2010, 2011) ir 2 konferencijose Lietuvoje.

Darbo apimtis ir struktūra

Disertaciją sudaro: Įvadas, Literatūrinė tyrimų apžvalga, Tyrimų objektas, medžiagos ir metodai, Tyrimų rezultatai, Apibendrinimas, Išvados, Literatūros sąrašas (262 šaltiniai), Mokslinių publikacijų sąrašas. Darbe yra 7 lentelės, 51 paveikslas. Darbo apimtis 147 puslapiai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

1. LITERATŪRINĖ TYRIMŲ APŽVALGA

1.1. Gravitacijos poveikio augalams atžvilgiai

Augalai nuolat veikiami juos supančios aplinkos veiksnių. Gravitacija yra vienas iš pastoviausių aplinkos veiksnių, įtakojančių augalų augimą ir vystymąsi. Iki šiol nėra vienareikšmės nuomonės dėl gravitacijos ir augalo morfogenetinių sistemų integracijos dėsningumą. Eksperimentais, atliktais mikrogravitacijos sąlygomis ar imituojant pakeistą svarumą (centrifuga-klinostatu), įrodyta, kad dėl gravitacijos parametrų pokyčių, keičiasi organų diferenciacija sėklos dygimo ar embriogenezės metu, bei skatinama arba slopinama antžeminės augalo dalies organogenezė (Gray, Edwards, 1968; Conger et al., 1998; Laurinavičius et al., 2001). Nustatyta, kad šiuolaikinių augalų ontogenezės procesai gali vykti be gravitacijos, t.y. mikrogravitacijos sąlygomis, kita vertus pakitęs svarumas modifikuoja augalo funkcijas ir morfogenezę (Merkys, Laurinavičius, 1991; Laurinavičius, Švegždienė, 2000; Link et al., 2001; Stankovič, 2001). Augalo gravimorfogenetinių reakcijų pavyzdžiu gali būti agurkų (*Cucumis sativum* L.) formuojamų ataugų, vadinamųjų pentinų (išaugų tarp šaknies ir hipokotilio) genezė. Įrodyta, kad pakeisto svarumo sąlygomis įvyksta ryškūs agurkų pentinų morfologiniai pokyčiai. Nustatyta, kad vienkryptis lateralinis gravitacijos poveikis slopina vieno pentino genezę. Tiriant somatinių embrionų vystymąsi imituoto nesvarumo sąlygomis, nustatytas mažesnis jų asimetriškumas ir intensyvesnė ląstelių vakuolizacija (Raklevičienė, Švegždienė, 2004).

Geriausias gravitacijos poveikio augalų vystymuisi įrodymas yra gravitropinis linkimas (gravitropizmas). Augalo šaknis auga gravitacijos vektoriaus kryptimi (teigiamas gravitropizmas), o stiebas – priešinga gravitacijos vektoriaus kryptimi (neigiamas gravitropizmas). Pakitus gravitacijos parametrams (dydžiui, kryptčiai), atitinkamai kinta ir augalo ašinių organų orientacija. Mikrogravitacijos sąlygomis įprastinė šaknies ir antžeminės augalo dalies orientacija sutrinka.

Gravitacinės jėgos ir augalinės ląstelės sąveikos galimų pasekmių vertinimui pasitelkiami teoriniai metodai (Audus, 1962; Björkman, 1988; Yoder et al., 2001). Pirmoji grupė gravitacijos efektų siejama su jos poveikiu ląstelei kaip fiziniam kūnui, t.y. kaip visumai (Laurinavičius, 1991). Gravitacija, kaip išcentrinė jėga, yra kiekvieną masės dalelę veikianti jėga ir formuojanti svarbią masės savybę - sunkį. Kitaip tariant, kiekvienas fizinis kūnas yra traukiamas Žemės centro kryptimi. Dėl to kietoje sferoje atsiranda tarpmolekulinių ryšių mechaninis įtempimas, o skystyje atsiranda hidrostatinis spaudimas. Abiem atvejais ląstelė, kaip visuma ar atskiros jos dalys, patiria mechaninį ar hidrostatinį spaudimą. Laisvojo kritimo sąlygomis (mikrogravitacija) minėti procesai nevyksta. Kokie biologiniai procesai ląstelės lygyje gali būti sąlygoti gravitacijos ir kokie struktūriniai ir funkciniai pasikeitimai galimi mikrogravitacijos sąlygomis diskutuojama iki šiol.

Manoma, kad gravitaciniame lauke homeostazės išlaikymui ląstelės, prarasdamos energiją, formuoja stabilumą palaikančias struktūras. Augalų ląstelės formuoja kietą sienelę, kas sumažina gravitacijos sukeltą mechaninį tempimą ir hidrostatinį spaudimą. Mikrogravitacijos sąlygomis, kuomet gravitacinė jėga nebeveikia, stabilių ląstelės struktūrų formavimasis gali keistis. Žinoma apie šiomis sąlygomis susidarančius ląstelės sienelės ir citoskeleto morfologijos pakitimus (Baluška, Hasenstein, 1997). Dėl homeostazės pokyčių mikrogravitacijos sąlygomis gali kisti ir ląstelės medžiagų apykaitos procesas.

Jei ląstelės citoplazmą vertintume kaip supaprastintą hidrodinaminę sistemą, tada išryškėtų kitas gravitacijos poveikis ląstelei, kuris yra susijęs su erdvine viduląstelinių struktūrų lokalizacija ir išsidėstymu. Ląstelės dalelės gali būti stabilioje būsenoje net ir veikiant gravitacijai. Šiuo atveju laisvos, struktūriškai nesurištos ląstelės dalelės, kurių tankis yra didesnis už aplinkos tankį, citoplazmoje juda visiškai netvarkingai (pasireiškia Brauno judėjimas), jų lokalizacija ir judėjimo trajektorija priklauso nuo dalelės krūvio bei aktyvaus citoplazmos sruvenimo, todėl jos pasiskirsto homogeniškai visame ląstelės tūryje. Kitu atveju dalelės judėjimą skystyje sąlygoja gravitacinės jėgos, dėl to

kaip tik ir vyksta sedimentacija, t.y. dalelės pasiskirsto tūryje heterogeniškai. Pollard (1965) atkreipė dėmesį į tai, kad kai ląstelės dalelėms yra priskiriamas gravisensoriaus vaidmuo, minimali kritinė dalelės masė ir minimalūs hidrodinaminės sistemos matmenys, kurioje gravisensoriai funkcionuoja, yra svarbiausi faktoriai.

Gravitacinės jėgos parametrų (dydžio ir veikimo krypties) kitimo poveikis gravisensorinių ląstelių struktūrai tiriamas kosminiuose eksperimentuose realios mikrogravitacijos sąlygomis ar centrifuguojant atitinkamu greičiu kosmoso centrifugoje. Žemės sąlygomis vienkryptis gravitacijos poveikis eliminuojamas klinostatų pagalba, o reikiamos jėgos dydis išgaunamas centrifuguojant. Šių tyrimų metu nustatyta, kad įprasta poliariška šaknies gravisensorinės ląstelės struktūra (branduolys proksimalinėje, t.y. morfologiškai apatinėje srityje, o endoplazminis tinklas ir amiloplastai – distalinėje, t.y. morfologiškai viršūninėje srityje) suardoma, kai šaknis 20 min. dirginamos 50 g akropetaliai, t.y. viršūnės kryptimi (Sievers, Heyder-Caspers, 1983).

Augalams augant hipogravitacijos ($g < 1$) sąlygomis, struktūrinis statocitų poliškumas išlieka, išskyrus amiloplastų lokalizaciją. Kai skirtingų augalų daigai auga realios mikrogravitacijos sąlygomis, ar horizontaliame klinostate dauguma amiloplastų persigrupuoja į proksimalinę statocitų dalį, branduolys paslenka link ląstelės centro (Merkys et al., 1981; 1983; Perbal et al., 1987; 1989; 1994; Volkmann et al., 1986; 1991; Lorenzi et al., 1990; Švegždienė, 1991; Laurinavičius et al., 1996; 2001; Driss-Ecole et al., 2000; Laurinavičius, Švegždienė, 2000; Švegždienė et al., 2001). Kosminiuose eksperimentuose, panaudojus borto centrifugą, nustatyta netiesinė priklausomybė tarp dirbtinės gravitacinės (išcentrinės) jėgos dydžio ir statolitų lokalizacijos sėjamosios pipirinės šaknų gravisensoriuose (Merkys et al., 1981; Laurinavičius et al., 2001).

Kokiu būdu augalas sugeba justti gravitacijos pokyčius? Evoliucijos eigoje, dėl nuolatinio Žemės gravitacinio lauko poveikio, augaluose susiformavo mechanizmas, sugebantis priimti tam tikros krypties išorinės jėgos

stimulą, jį transformuoti į fiziologinį signalą bei adekvačiai reaguoti augimo judesiais. Šis sudėtingas mechanizmas yra vadinamas gravitropine reakcija. Gravitropinė reakcija yra „slenkstinis“ reiškinys, t.y. gravitropinis linkimas vyksta tik dirgikliui pasiekus tam tikrą minimalią slenkstinę vertę, savitą kiekvienam organui (Уоринг, Филипс, 1984). Jei augalas dirginamas didesniu už slenkstinį stimulų, gravitropinis atsakas pirmiausia indukuojamas gravisensorinės ląstelės, o vėliau ašinio organo lygmenyje. Augalo organų jautrumas gravitacijai charakterizuojamas šiais parametrais: gravitacinio signalo percepcijos laikas ir prezentacijos laikas, latentinis gravitropinės reakcijos laikas, minimalus gravitacinės jėgos dydis (*g*-slenkstis) ir slenkstinė stimulo dozė.

Minimali dirginimo intervalų trukmė kintančio dirginimo metu, būtina gravitropinio atsako indukcijai, vadinama percepcijos laiku. Pirmą kartą percepcijos laiką nustatė Fitting (1905), kuris pritaikė specialią klinostatavimo techniką priešingos krypties augalo organų kintančiam gravitropiniam dirginimui. Šių tyrimų metu nustatyta, kad hipokotiliai ir epikotiliai gravitropiškai linko net tada, kai klinostato apsisukimų skaičius buvo vienas kartas per 1 s. Atsižvelgiant į tai padaryta išvada, kad percepcijos laikas turi būti trumpesnis nei 0,25 s. Panašų percepcijos laiką nustatė Pickard (1973) antžeminei augalo daliai (< 0,5 s) ir Hejnowicz et al. (1998) – požeminei (0,5 s). Pastarųjų tyrimų metu paaiškėjo, jog dirginimo intervalų metu statolitų poslinkis yra labai mažas, t.y. mažiau nei pusė jų diametro. Todėl nuspręsta, kad pirminis gravitacijos jutimo procesas įvyksta netoli pradinės statolitų padėties. Manoma, kad realiausiai į tokį mažą statolitų poslinkį gali sureaguoti ir dalyvauti tolimesniame gravitacijos jutimo procese - citoskeletas.

Gravitropinio atsako dydis pagal Volkman, Sievers (1979) priklauso nuo stimulo dozės *d*, kuri yra gravitacinės jėgos dydžio, išreikšto *g* vienetais, ir dirginimo trukmės *t* sandauga: $d = g \times t \times \sin \alpha$, kur α – kampas tarp gravitacinės jėgos krypties ir dirginamo organo išilginės ašies (jei $\alpha = 90^\circ$, $d = g \times t$). Mažiausia dozė, kurią viršijus įvyksta atsakomoji gravitropinė reakcija, vadinama slenkstine. Literatūros duomenimis tokia stimulo dozė yra $0,67 g \times s$

(Driss-Ecole et al., 2008). Mūsų laboratorijos mokslininkų duomenimis nuo $14 g \times s$ iki $22 g \times s$ (Laurinavičius et al., 1998).

Laikas, būtinas gravitropinio atsako indukcijai vadinamas prezentacijos laiku. Žinomas šaknų prezentacijos laikas yra nuo 10 s (Hejnowicz et al., 1998; Laurinavičius et al., 2001) iki 30 s (Larsen, 1962; Caspar, Pickard 1989; Kiss et al., 1989; Perbal, Driss-Ecole 1994), o antžeminės augalo dalies prezentacijos laikas yra kiek ilgesnis – nuo 5–10 s (Pickard, 1973; Hejnowicz et al., 1998) iki 40–60 s (Sack et al., 1984; Audus, 1975).

Jeigu prezentacijos laikas atitinka gravitropinės reakcijos indukcinės fazės trukmę (signalas pajuntamas ir transformuojamas), tai latentinis laikas apjungia ir šio signalo realizacijos laikotarpį (išlinkimą). Literatūros duomenimis, teigiamai gravitropiškų augalo organų latentinis reakcijos laikas varijuoja nuo 6,3–9,8 min. (Larsen, 1957; Laurinavičius et al., 2001) iki 20 min. (Volkman, Sievers, 1979; Perbal et al., 1997). Tuo tarpu neigiamai gravitropiškų augalo organų (koleoptilių) žinomas latentinis reakcijos laikas yra trumpesnis nei požeminės augalo dalies, t.y. 1,5–3 min. (Bandurski et al., 1984), ar 5–10 min. (Pickard, 1985; Hild, Hertel, 1972).

Minimalus gravitacinės jėgos dydis (g -slenkstis) požeminei ir antžeminei augalo dalims taip pat skiriasi. Nustatytas minimalus gravitacinės jėgos dydis įvairių augalų šaknims yra nuo $1,4 \times 10^{-5} g$ (Driss-Ecole et al., 2008), $1,4 \times 10^{-4} g$ (Merkys et al., 1986) iki $2,6 \times 10^{-3} g$ (Laurinavičius et al., 1998; Švegždienė, 2000), o hipokotiliams $2,9 \times 10^{-3} g$, $3,1 \times 10^{-3} g$ (Меркис А, и др., 1985; Merkys, Laurinavičius, 1990; Švegždienė, 2000).

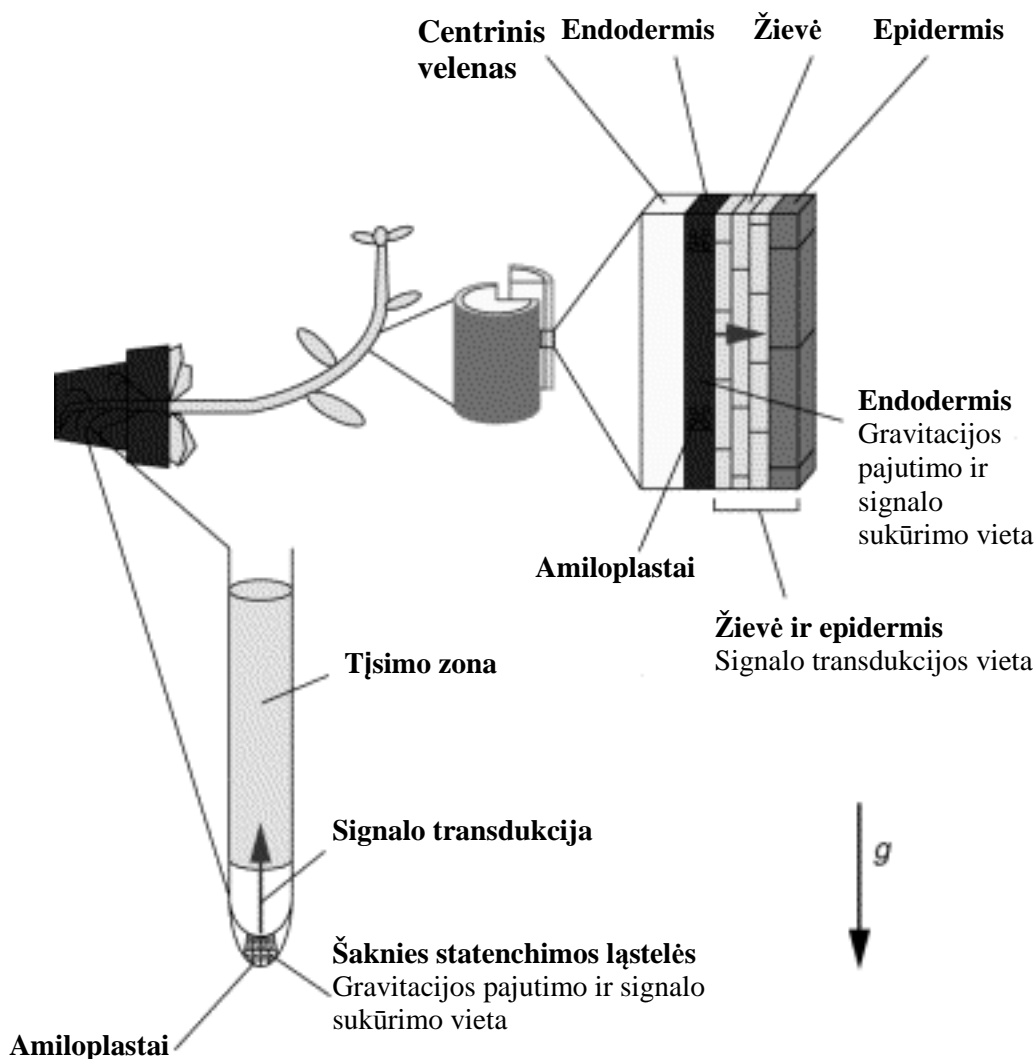
Augalų ašinių organų gravitropinis jautrumas priklauso ne tik nuo augalo rūšies, bet ir nuo gravitacinės aplinkos. Nustatyta, jog horizontaliu klinostatu (HK) imituotos mikrogravitacijos sąlygomis ar realios mikrogravitacijos sąlygomis augančių augalų šaknys jautresnės už įprastinėje gravitacinėje aplinkoje išaugusias augalų šaknis (Volkman, Tewinkel 1996; Švegždienė et al., 2001; Perbal et al., 2004; Driss-Ecole et al., 2008).

1.2. Augalų gravisensorinio aparato organizacijos anatomiciniai ir funkciniai ypatumai daigo ašiniuose organuose

Šaknis yra požeminis, ašinis augalo organas, kuriuo jis įsitvirtina žemėje, kad galėtų išlaikyti nuolatinę stiebo padėtį erdvėje, siurbti iš žemės vandenį su jame ištirpusiomis mitybinėmis medžiagomis. Šaknims būdinga radialinė simetrija. Jos auga savo galiukų viršūnėlėmis, kuriose yra šaknies augimo kūgelio meristema. Ši meristema gamina dviejų tipų ląsteles, kurias dalijasi ir auga dviem kryptimis: į viršų nuo augimo kūgelio, iš kurių formuojasi šaknies „kūnas“, į apačią nuo augimo kūgelio, iš kurių formuojasi šaknies augimo kūgelio meristemos apsauginis audinys - šaknies šalmelis. (Эзай, 1980; Dagys, 1969).

Hipokotilis yra antžeminė augalo daigo dalis nuo šaknies kaklelio iki skilčialapių. Augalui augant hipokotilis tampa stiebo dalimi, kuris kaip ir šaknis yra ašinis augalo organas. Dviskilčių augalų stiebai auga į ilgį ir radialiai. Jų viršūnėje yra pumpuras sudarytas iš augimo kūgelio ir gaubiančių lapų pradmenų. Žiedinių augalų augimo kūgelis yra skirstomas į dvi dalis: tuniką ir korpusą. Tunika duoda pradžią epidermiui, o korpusas kitiems audiniams: endodermiui ir likusiai žievės daliai, bei centriniam velenui (Dagys, 1969; Эзай, 1980).

Aiškinantis gravitacijos jutimo vietą skirtingo gravitropiškumo augalo ašiniuose organuose nustatyta, kad dekapitavus šaknies šalmelį prarandamas šaknies gravitropiškumas, bet normalus šaknies augimas išlieka (Juniper et al., 1966). Augalai, stiebe neturintys endodermio, demonstruoja pakitusį stiebo gravitropiškumą (Tasaka et al., 1999; Morita et al., 2007; Kitazawa et al., 2008). Tai įrodo, kad statenchimos ląstelės (šaknies gravisensorinės ląstelės), formuojančios kūgiškos formos audinį šaknies šalmelio centrinėje dalyje ir stiebo endodermio ląstelės yra augalo gravisensoriniai audiniai (1 pav.). Keletos autorių nuomone, šaknyje gali egzistuoti ir kita gravitacijos jutimo vieta, t.y. šaknies tįsimo zonoje (Wolverton et al., 2002a, b; LaMotte, Pickard, 2004).



1 pav. *Arabidopsis thaliana* šaknies ir žiedstiebio gravitropizmo reguliacijos modelis. Žiedstiebyje gravitacija juntama endodermio ląstelėse ir gravitacinis signalas (pilka rodyklė) perduodamas į išorinius audinius, šaknyse gravitacija juntama šalmelio statenchimos ląstelėse, o gravitacinis signalas (pilka rodyklė) perduodamas iš statenchimos ląstelių į šaknies tįsimo zoną (pagal Tasaka et al., 1999)

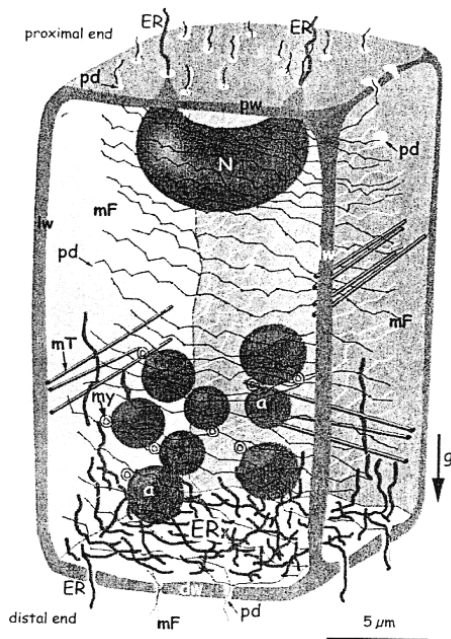
Tyrimų su *Arabidopsis thaliana* mutantais, pasižyminčiais pakitusiu gravitropizmu šaknyje (kai tuo tarpu antžeminės dalies gravitropizmas išlieka normalus, arba atvirkščiai) rezultatai, leidžia manyti, jog šaknies ir stiebo gravisensorinis mechanizmas yra genetiškai skirtingas (Tasaka et al., 2001; Yamamoto, Kiss, 2002). Ir tai nėra netikėta, nes šie organai auga priešingomis kryptimis, skiriasi jų gravisensorinio audinio struktūrinė organizacija. Šaknies gravisensorinės ląstelės (gravitacijos jutimo zona) yra

fiziškai atskirtos (išilgai apikalinės-bazalinės šaknies ašies) nuo gravitacijos signalo realizacijos vietos – šaknies tįsimo zonos. Tuo tarpu stiebe gravitacijos jutimo ir realizacijos zonos fiziškai nėra atskirtos ir gravitacinis signalas keliauja statmenai apikalinei-bazalinei stiebo ašiai (1 pav.). (Tasaka et al., 1999; Masson et al., 2002).

Šaknies gravisensorinių ląstelių struktūra. Šaknies statocitams būdingos krakmolo pilnos, fizinėje gravitropinio sudirginimo fazėje gebančios keisti padėtį ir tokiu būdu perduoti priimtą signalą kitoms ląstelės struktūroms, plastidės - amiloplastai (statolitai) (1 pav.) (Boonsirichai et al., 2002; Blancaflor, Masson, 2003; Perbal et al., 2004). Šios ląstelės nuolat atsinaujina, pereidamos visas ląstelės vystymosi fazes: dalijasi, diferencijuojasi ir tampa funkcionaliais statocitais, vėliau transformuojasi į sekrecines ląsteles, kurios apmiršta ir nusilupa nuo šalmelio.

Išbrinkus gemalinės šaknies šalmelio ląstelėms pirmuose būsimų statocitų sluoksniuose branduoliai užima centrinę ląstelės dalį, kitos organelės išsidėsčiusios aplink. Šioje vystymosi stadijoje, plastidėse krakmolo nebūna. Vykstat statocitų diferenciacijai endoplazminis tinklas (ET) migruoja distalinės ląstelės sienelės link, o branduolys priešinga kryptimi ir galiausiai atsiduria proksimaliame gravisensorinės ląstelės poliuje. Taip šaknies gravisensorinė ląstelė įgauna polišką struktūrą (2 pav.).

Šaknies gravisensorinei ląstelei įgaunant polišką struktūrą, tuo pat metu proplastidėse sintetinamas krakmolas, ir formuojami daugiabranduoliai krakmolo dariniai. Įprastoje gravitacinėje aplinkoje dėl skirtingų tankių (amiloplastų tankis $1,44 \text{ g/cm}^3$, citoplazmos tankis $1,03 \text{ g/cm}^3$) vyksta amiloplastų (statolitų) sedimentacija. Toks gravisensorinių ląstelių struktūrinio poliškumo vystymasis vyksta nepriklausomai nuo gravitacijos ir yra genetiškai determinuotas (Merkys et al., 1981; Sievers, 2000), išskyrus amiloplastų lokalizaciją.



2 pav. Schematinis lęšio šaknies statocito struktūros vaizdas (Perbal et al., 2004). N – branduolys, a – amiloplastai, mT – mikrovamzdeliai, mF – mikrofilamentai (aktino gijos), ER – endoplazminis tinklas

protonų šaltinis, kurių pliūpsnis gravitacinio dirginimo metu sąlygoja viduląstelinio pH pasikeitimą (Masson et al., 2002; Kuya et al., 2006). Be įprastinio, šalia distalinės ląstelės sienelės esančio ET, tabako šaknies šalmelio ląstelėse aptiktas tam tikros formos „nodalinis ET“, esantis ląstelės periferinėje dalyje. Manoma, kad šios formos ET gali atpalaiduoti jonus, reaguojant į amiloplastų smūgius ar aktino indukuotą tamprumo jėgų poveikį (Zheng, Staehelin, 2001). Taip pat teigiama, jog šis tinklas yra šalia plazminės membranos sričių, kuriose išsidėstę tempimui jautrūs receptoriai (Yoder et al., 2001). Tokia specializuota ET forma būdinga tik šaknies gravisensorinei ląstelei, o stiebuose ji nebuvo pastebėta. Kita vertus, kitų augalų pvz. *Arabidopsis thaliana* šaknies gravisensorinėse ląstelėse, tokio tinklo nėra aptikta ir dar diskutuojamas jo dalyvavimas gravitropizmo procese (Leitz et al., 2009). Kitas viduląstelinis protonų šaltinis yra vakuolės. Užslopinus tonoplasto H⁺-ATPazės bafilomicinu A1, padidėja šaknų gravitropinis linkimas, kas įrodo vakuolės vaidmenį šiame procese (Scott, Allen, 1999).

Statolitų judėjimas gravisensorinėje ląstelėje nėra atsitiktinis, bet priklauso nuo gravitacijos vektoriaus krypties (Volkman, Baluška, 2000). Kita vertus gravitacija nėra vienintelis veiksnys, apsprendžiantis amiloplastų viduląstelinę lokalizaciją. Tam turi įtakos ir citoplazmos reologinės savybės bei kitos ląstelės struktūrinės dalys.

Nemažai autorių pabrėžia ET ir judrių amiloplastų sąveikos svarbą šaknies gravipercepcijos procese (Hensel, Sievers, 1981; Perbal et al., 1997; Leitz et al., 2009). Manoma, kad ET yra viduląstelinio Ca²⁺ ir

Šaknies gravisensorinėje ląstelėje citoskeletas yra siūlinių baltymų tinklas, susietas su plazmine membrana ir/ar ET. Jį sudaro mikrovamzdeliai (MV, tubulino polimerai), aktino mikrofilamentai (MF, aktino polimerai) ir juos jungiantys baltymai (Ingber, 2003 a,b). Vieni iš geriausiai charakterizuotų baltymų yra aktino monomerus jungiantis baltymas profilinas, aktiną depolimerizuojantis faktorius (ADF) – kofilinas, bei miozino grupės baltymai (Volkman, Baluška 2000; Gibbon 2001; Blancaflor, 2002; Allwood et al., 2002; Feng et al., 2006). Mikrovamzdeliai, esantys arčiau plazminės membranos, juosia visą ląstelę statmenai išilginei statocito ašiai. Jų įtaka gravitacijos jutimo procesui nėra gerai žinoma (Baluška et al., 1997; Blancaflor, 2002). Pirmųjų tyrimų metu, aiškinantis aktino filamentų tinklo struktūrą ir jo išsidėstymo specifiškumą, statenchimos ląstelėse gerai matomo tankaus aktino tinklo gijų, kokios buvo matomos kitose augalo ląstelėse, nepastebėta (Baluška et al., 1997). Didelis žingsnis augalų ląstelių citoskeleto struktūros tyrimuose buvo padarytas panaudojus žaliai fluorescuojantį baltymą (GFP), kurio pagalba vizualizuoti aktino oligomerai (Kost et al., 1998). Vėlesnių tyrimų metu nustatyta, kad tinklas sudarytas iš trumpų gijų, kurios nėra padrikai išsibarsčiusios, o orientuotos įžambiai, maždaug 45° kampu, plazminės membranos atžvilgiu. Tinklo tankumas visoje ląstelėje vienodas, tik šiek tiek tankesnis branduolio srityje (Driss-Ecole et al. 2000b; 2003; Perbal et al., 2004; Shevchenko, Kordyum, 2005). Yoder et al., (2001) su bendraautorais pateiktame gravipercepcijos modelyje aiškinama, kad aktino filamentų tinklas ląstelės centre yra daug tankesnis nei periferijoje, kur sudaro savotiškus kanalus, kuriais judėdami amiloplastai suardo citoskeletą, aktyvuodami plazminėje membranoje esančius receptorių. Prieštaringi rezultatai gauti konfokalinės mikroskopijos pagalba. Šių tyrimų metu šaknies statenchimos ląstelėse buvo aptiktas tankus, gerai matomų aktino gijų tiklas (Collings et al., 2001; Blancaflor, 2002). Tai gali būti susiję su tuo, kad dinamiškai aktino mikrofilamentai sunkiai matomi užfiksuotose, negyvoje ląstelėse. Atlikus citoskeleto vizualizacijos tyrimus naudojant antikūnus nustatyta, jog šaknies šalmelio statocitai, lyginant juos su kitomis šaknies

ląstelėmis, pasižymi ypatinga aktino tinklo ir jį jungiančių baltymų miozino ir profilino ekspresija (Volkman, Baluška, 2000). Eksperimentų metu, naudojant aktino polimerizaciją veikiančius agentus – citochalazinus bei latrunkuliną, išsiaiškinta, kad amiloplastai vienokiu ar kitokiu būdu sujungti į bendrą tinklą su dinamiškais aktino mikrofilamentais ir ta jungtis gali būti per motorinį baltymą mioziną, ar kitus su juo susijusius baltymus, kurie aptikti ant amiloplastų paviršiaus jų sedimentacijos metu (Buchen et al., 1993; Baluška, Hasenstein, 1997; Staiger et al., 1997; Gibbon, Staiger, 2000; Kiss, 2000; Volkman, Baluška, 2000; Driss-Ecole, 2003). Buvo prieita išvada, kad šaknies statocituose esantys statolitai sedimentacijos metu veikia aktino tinklo įtempimą, o pirminis gravitacinio signalo pajutimas gali būti įgyvendinamas tiesiogiai per aktino citoskeletą minėtos jungties pagalba (Perbal et al., 1997).

Stiebo gravisensorinių ląstelių struktūra. Stiebo endodermio ląstelėse, kaip ir šaknies statocituose, yra krakmolo pilnos plastidės - amiloplastai, dirginimo metu gebančios judėti gravitacijos vektoriaus kryptimi (1 pav.). Mutantų, neturinčių arba turinčių sumažėjusį krakmolo kiekį endodermio ląstelėse tyrimai įrodo, kad amiloplastai atlieka statolitų vaidmenį ir jų judėjimas ląstelėje siejamas su stiebo reakcija į gravitaciją (Kiss, Sack, 1989; Kiss et al., 1999; Sack, 1997; Kiss, 2000; Fujihira et al., 2000; Yamamoto et al., 2002).

Stiebo gravisensorinė ląstelė taip pat kaip ir šaknies yra poliška. Tačiau čia skirtingai, nei šaknies statocite, branduolys gali nusėsti kartu su amiloplastais. Pastarieji, stiebui esant vertikaloje padėtyje, išsidėstę ląstelės apačioje, t.y. šalia morfologinio ląstelės dugno, labai ploname citoplazmos sluoksnyje apsupti vakuolės membranos. Kai kurie iš jų įsiterpę tarpvakuolinėse gijose (Volkman et al., 1993; Kato et al., 2002). Skirtingai nei šaknies statocite, kur apstu citoplazmos ir smulkių vakuolių, stiebo statocite centrinė vakuolė yra labai didelė ir užima didžiąją ląstelės dalį. Tai yra esminis šaknies ir stiebo statocitų skirtumas (Kato et al., 2002). Kai kurių tyrėjų nuomone centrinė vakuolė atlieka pagrindinį vaidmenį stiebo gravitacijos jutimo procese įtakodama amiloplastų judėjimą endodermio ląstelėse.

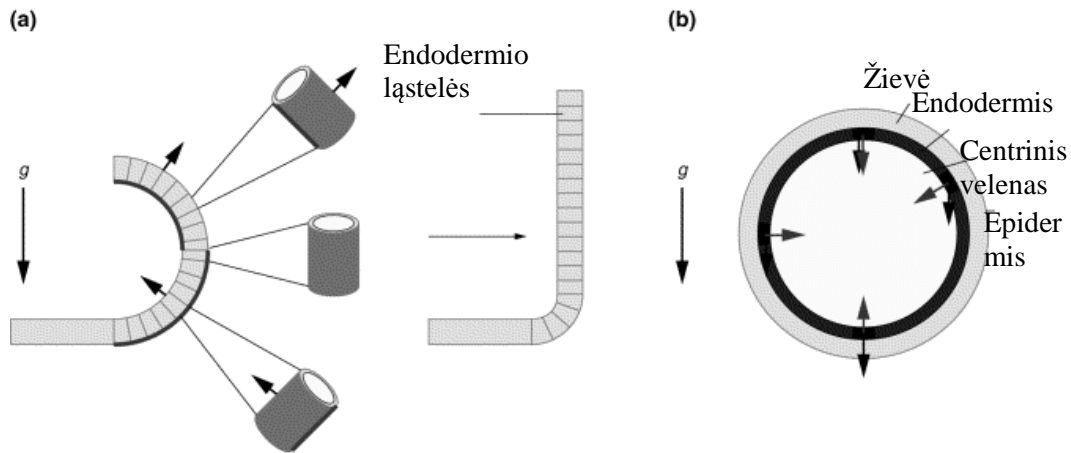
Manoma, kad amiloplastų sedimentacijos metu šiems sąveikaujant su tonoplastu gali būti išmetami jonai, būtini gravitacinio signalo perdavimui (Volkman et al., 1993; Morita et al., 2002). Taip pat gali būti, jog amiloplastų membranos baltymai sąveikauja su vakuolės tonoplasto baltymais, ko pasekoje įvyksta graviatsakas. Judėdami amiloplastai veikia ne tik tonoplastą, bet dar ir keliauja siaurais citoplazmos raiščiais, vagojančiais centrinę vakuolę. Manoma, jog amiloplastų/tonoplasto sąveika ir/arba jų sedimentacija per centrinę vakuolę yra neatsiejama gravitacijos signalo transdukcijos dalis stiebo statocite. Tiriant augalus mutantus su vakuolės formavimosi, transporto per ją pakitimais (Kato et al., 2002; Morita et al., 2002; Yano et al., 2003), ar endocitozės defektais (Silady et al., 2004), nustatyta susilpnėjusi amiloplastų sedimentacija ir sumažėjęs stiebo, bet ne šaknies gravitropizmas.

Endoplazminis tinklas endodermio ląstelėje nėra labai išreikštas, skirtingai nei šaknies statocituose.

Palyginti mažai tirtas stiebo gravisensorinės ląstelės citoskeletas. Ankstesniųjų tyrimų metu nustatyta, jog stiebo gravisensorinėse ląstelėse esantis aktino tinklas yra padrikas ir paprastesnės struktūrinės organizacijos nei šaknies statocituose (Volkman et al., 1993; Baltuška, Hasenstein, 1997; Collings et al., 2001). Tik prieš keletą metų panaudojus Alexa Fluor-phalloidina paaiškėjo, jog stiebo endodermio ląstelėse yra taip pat gerai išsivystęs, tankus, skersai ir išilgai ląstelės orientuotas aktino filamentų tinklas (Yamamoto, Kiss, 2002; Palmieri, Kiss, 2005). Dėl citoskeleto vaidmens stiebo gravitacijos jutimo procese diskutuojama iki šiol. Farmakologiniais tyrimais nustatyta, jog citoskeleto suardymas apriboja statolitų judėjimą stiebo statocituose, kas leidžia manyti, kad jų sedimentacija priklauso nuo aktino filamentų tinklo. Teigiama, kad aktino mikrofilamentai moduliuoja graviatsakus, aktyviai dalyvaudami statolitų dislokacijos procese endodermio statocituose (Palmieri, Kiss, 2005). Kita vertus, tais pačiais tyrimais nustatyta, kad citoskeleto suardymas hipokotilio ir šaknies statocituose padidina šių augalo ašinių organų gravilinkimą (Volkman et al., 1993; Yamamoto et al., 2002; Hou et al., 2003; 2004; Ma, Hasenstein, 2006). Atsižvelgiant į tai peršasi

nuomonė, kad amiloplastų sedimentacija ir aktino tinklas kaip ir nėra būtini gravipercepcijos vyksmui daigų endodermio ląstelėse.

Svarbi gravitacijos jutimo stiebe charakteristika yra tai, kad stiebai gali justti gravitaciją visoje tįsimo zonoje, t.y. per visą hipokotilį. Cilindriškas endodermio ląstelių išsidėstymas puikiai pritaikytas šiai funkcijai (3 pav.).



3 pav. Gravitacijos pajutimo modelis *Arabidopsis thaliana* žiedstiebyje. (a) - gravitropinio linkimo metu žiedstiebis įgauna „U“ formą. Apikalinė dalis linksta į viršų, o vėliau nuo vertikalės į kairę pusę. Trumpos juodos rodyklės nurodo linkimo į viršų kryptį. Tamsiai pilka linija nurodo apatinę stiebo pusę, kuri tįsta labiau lyginant ją su tos pačios atkarpos viršutine puse. Stiebą padalijus į atkarpas kiekviena jų gali atpažinti gravitacijos vektoriaus kryptį nepriklausomai viena nuo kitos, todėl stiebo atsakas į gravitropinį dirginimą yra suma visų stiebą sudarančių atkarpų atsakų. (b) - horizontaliai orientuoto stiebo skersinis pjūvis. Juodos rodyklės nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį, o pilkos rodyklės nurodo radialinę kiekvienos endodermio ląstelės kryptį (pagal Tasaka et al., 1999)

Kita vertus, atskiroms stiebo dalims būdingas skirtingas tįsimo greitis (apikalinė dalis tįsta greičiau nei bazalinė). Dėl šios priežasties, gravitropinio linkimo metu, stiebas įgauna „U“ formą ir tuo pačiu metu atskiros jo dalys demonstruoja skirtingą gravitropinį atsaką (3a pav.). Šie judesiai įrodo, kad gravitropinio dirginimo metu stiebo apikalinė ir bazalinė dalys gali atpažinti gravitacijos vektoriaus kryptį nepriklausomai viena nuo kitos.

Kita svarbi stiebo gravitropizmo charakteristika yra ta, kad endodermio ląstelių radialinė simetrija suteikia galimybę jam pajusti gravitacijos pasikeitimą bet kuria kryptimi (3b pav.). Tačiau kaip endodermio ląstelės, būdamos skirtingose pusėse, stiebui nukrypus nuo vertikalės, atpažįsta gravivektorių, ir kaip formuoja signalus tiksliai nėra žinoma (Fukaki et al., 1996; Tasaka et al., 1999; Weise et al., 2000).

1.3. Gravitropizmo procesas

Gravitropinė reakcija gali būti skirstoma į indukcinę ir atsakomąją fazes (Меркис, 1973). Arba pagal kitus autorius į 3 fazes: percepciją (gravitacijos signalo pajutimą), transdukciją ir atsaką (Sack, 1991; Kiss, 2000; Blancaflor, Masson, 2003).

1.3.1. Gravitacijos signalo percepcija

Kas vyksta gravitacijos jutimo metu diskutuojama iki šiol. Pastaruoju metu vyrauja dvi gravitacinio signalo jutimo teorijos: protoplasto slėgio hipotezė ir krakmolo statolitinė hipotezė, kuri remiasi anksčiau, nei prieš 100 metų Nemeco ir Haberlando suformuluotais teiginiais (Sievers et al., 1991). Pirmoji hipotezė aiškina, kad gravipercepcijos mechanizme dalyvauja visas ląstelės protoplastas, o ne atskiros jo organelės (Wayne et al., 1992; Staves et al., 1997a; Staves, 1997; Sack, 1997). Veikiant gravitacijai, ląstelėje vienu metu vyksta tempimo ir spaudimo procesas. Atsiranda slėgių skirtumas. Tempimo ir spaudimo metu aktyvuojasi tempimui jautrūs kanalai, ko pasekoje įvyksta signalo transdukcijos ir galutinio atsako dirginimui procesai (Staves, 1997; Rosen et al., 1999). Pagal šią teoriją statolitai dalyvauja gravitropizmo procese didindami bendrą ląstelės svorį ir tuo pačiu didindami ląstelės tempimo/spaudimo procesą išorinei aplinkai (Rosen et al., 1999). Ši teorija paaiškina gravitacijos jutimo procesą didelėse tarpubamblinėse *Chara* dumblių ląstelėse (Staves, 1997) ir ląstelėse neturinčiose galinčių nusėsti statolitu (tokios kaip *Euglena*) (Konings, 1995). Šios teorijos pritaikymas aukštesniųjų augalų statocituose diskutuotinas, nors kai kurie tyrimai pagrindžia ją. Vienas

iš pagrindinių argumentų palaikančių protoplasto slėgio teoriją yra augalų, neturinčių krakmolo, jautrumas gravitacijai (Kiss et al., 1996; Kiss, Sack, 1989; 1990).

Kai kurie autoriai svarsto gravipercepcijos augaluose modelių bioenergetinę pusę. Esminis klausimas - ar potencialaus gravijutimo mechanizmo generuojamas signalas gali viršyti/nustelbti foninį termodinaminį triukšmą? Ieškant atsakymo iškyla problema, nes apskaičiuojant energiją daroma daug prielaidų, todėl abiejų percepcijos modelių termodinaminis pagrindimas vis dar diskutuojamas. Galima teigti, kad ir statolitai, ir visa protoplasto masė gali stimuliuoti atitinkamus plazminės membranos receptorių ir taip dalyvauti gravitacijos jutimo procese.

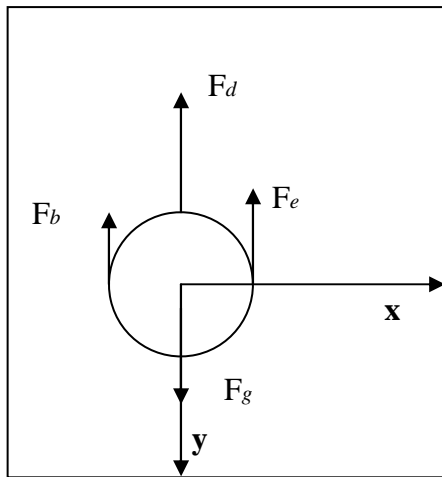
Nepaisant įvairių samprotavimų dauguma tyrėjų palaiko antrąją, t.y. krakmolo statolitinę hipotezę, kuri teigia, kad gravitropinė indukcija įvyksta tada, kai reaguodamos į augalo organo orientacijos pakitimą, laisvai ląstelėje judančios sunkesnės už citoplazmą organelės (statolitai) slenka statocitu sąveikaudamos su kitomis protoplasto struktūromis. Manoma, kad amiloplastams judant sudirginami kol kas nežinomi receptoriai. Tuomet mechaninis viduląstelinio amiloplastų pasiskirstymo stimulus transformuojamas į biocheminį signalą, kuris indukuoja diferencijuotą auksino gradientą skersai augalo organo. Tai įvyksta statolitams kontaktuojant su kitais ląstelės komponentais (plazmine membrana, endoplazminiu tinklu ir/arba citoskeleto tinklu) (Sievers et al., 1984; 1989; Volkmann, Baluška 2000; Braun, 2002; Muday, Murphy, 2002; Blancaflor, Masson 2003; Perbal, Driss-Ecole, 2003; Lefranc et al., 2005; Leitz 2009). Nemaža dalis tyrėjų, tarp jų ir mūsų laboratorijos mokslininkai, gravitacijos jutimo procese didžiausią dėmesį skiria citoskeletui (Yoder et al., 2001; Gaina et al., 2003; Saito et al., 2005; Kumar et al., 2008; Driss-Ecole et al., 2008). Manoma, kad amiloplastams kontaktuojant su aktino mikrofilamentais vyksta gravitacinio signalo perdavimas. Siekiant įrodyti citoskeleto reikšmę gravitropizmo procesui, atlikta eilė tyrimų naudojant aktino tinklą ardančius agentus, tokius kaip citochalaziniai ir latrunkulinai. Eksperimentai atlikti mikrogravitacijos

sąlygomis naudojant kosmoso centrifugas parodo, jog panaikinus vienkryptį gravitacijos poveikį stebimas akivaizdus kryptingas statolitų poslinkis priešinga gravitacijos vektoriui kryptimi, t.y link ląstelės centro (Volkman et al., 1991; Perbal, Driss-Ecole, 1994; Laurinavičius et al, 1996; Smith et al., 1997; Driss Ecole et al., 2000 a,b; Gaina et al., 2003). Paveikus aktino tinklą ardančiu agentu cytochalazinu D, šio poslinkio nepastebėta (Buchen et al., 1993; Sievers, Braun, 1996). Iš to galima daryti prielaidą, kad aktino-miozino sistema neabejotinai dalyvauja gravitacijos jutimo procese (Volkman, Baluška, 1999; 2000; Blancaflor, 2002; Driss-Ecole, 2003; Lefranc, 2005; Palmieri et al., 2007; Driss-Ecole et al., 2008). Kita vertus, tokių eksperimentų rezultatai prieštaringi. Jie priklauso nuo eksperimento sąlygų, nuo augalo rūšies, organo ar nuo agento dozės. Pvz., Lat-B slopina didžiojo žioveinio žiedstiebio gravilinkimą (Friedman et al., 2003). Tuo tarpu *Arabidopsis thaliana* ir kitų augalų žiedstiebių, hipokotilių ir šaknų gravilinkimas Lat-B ir citochalazino D poveikyje stiprėja arba išlieka toks pat nors amiloplastų judesiai suvaržomi (Blancaflor, Hasenstein 1997; Staves et al., 1997; Yamamoto, Kiss, 2002; Hou et al., 2004; Palmieri, Kiss, 2005; Perbal, Driss-Ecole 2007).

Aiškinantis citoskeleto svarbą gravitacijos jutimo procese yra sukurta keletas modelių. Pagal vieną iš jų – „aktino-saitų“ modelį – teigiama, kad amiloplastai yra tvirtai surišti su citoskeleto mikrofilamentais, kurie tampriai jungiasi su plazminėje membranoje esančiais receptoriais ir kitais integraliniais baltymais (jonų kanalais). Gravitropinio dirginimo metu, amiloplastai judėdami pakeičia citoskeleto aktino tinklo įtempimą, aktyvuodami jautrius jonų kanalus plazminėje membranoje (Baluška, Hasenstein, 1997; Sievers et al, 1991; Blancaflor , 2002). Kitas modelis aiškina, jog citoskeleto tinklas nėra pakankamai stiprus. Gravitacinio dirginimo metu, vykstant sedimentacijai, statolitai laisvai juda gravitacijos vektoriaus kryptimi, kontaktuoja su ląstelės organelių membranomis ir sužadina jose esančius receptorius, paleisdami signalų kaskadą, ko pasekoje įvyksta gravitropinis atsakas (linkimas) (Sievers et al., 1991; Baluška, Hasenstein, 1997; Sack 1997). Šio modelio šalininkai

gravitacijos signalo priėmimo ir perdavimo pirmenybę teikia ET. Jie teigia, jog ET vaidina didelį vaidmenį gravitropinės reakcijos pirmųjų fazių metu. Nusėdami amiloplastai spaudžia ET membranas, kurios yra labai jautrios slėgio pokyčiams, ir moduliuoja gravisensorinį signalą (Volkman, Sievers, 1979; Zheng, Staehelin, 2001; Leitz 2009).

Pastarąjį dešimtmetį teigiama, kad amiloplastai nėra tamptariai surišti su citoskeleto tinklu. 2001 metais Yoder su bendraautoriais ir kiek anksčiau (Staehelin et al., 2000) pateiktas šaknies gravisensorinio aparato „tamprumo“ modelis aiškina, kad citoskeleto aktino filamentų tinklas ląstelės centre yra tankesnis, o periferijoje sudaro savotiškus kanalus. Sedimentacijos metu, statolitai judėdami tais kanalais vietoje suardo citoskeleto tinklą, sutrikdo jungtis tarp tinklo ir plazminės membranos receptorių, tokiu būdu juos aktyvuodami. Pagal Yoder et al., (2001), gravitacijos poveikyje statolitą šaknies gravisensorinės ląstelės citoplazmoje veikiančios jėgos yra šios: (žr. 4 pav.).



4 pav. Statolitą šaknies gravisensorinės ląstelės citoplazmoje veikiančių jėgų schema (pagal Yoder et al., 2001). $\sum F_y = ma_y$, $F_g - F_d - F_b - F_e = ma_y$, kur $F_g = m_{amil} \times g$ – sunkio (gravitacinė jėga), $F_d = 6\pi r_{amil} \times \eta v$ – klamos jėga, $F_b = V_{ami} \times \rho_{cito} \times g$ – Archimedo jėga, $F_e =$ citoskeleto generuojamos elastingės jėgos

Sunkio jėga veikia bet kokios masės kūną, t.y. suteikia jam $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ pagreitį Žemės sunkio jėgos veikimo kryptimi. Klamos jėga atsiranda dėl judančio kūno sąveikos su aplinka. Ji tiesiogiai proporcinga dalelės spinduliui r , dalelės judėjimo greičiui v ir klamos koeficientui η . Archimedo jėga yra tiesiog proporcinga kūno, panardinto į skystį, išstumto skysčio kiekio tūriui V , padaugintam iš laisvojo kritimo pagreičio. Paslaptlingiausias yra

citoskeleto išsvystomos elastingos jėgos, kurios sąveikaudamos su dalele, bando sustabdyti sedimentaciją. Gravitacinio dirginimo metu, pakitus gravitacinės jėgos dydžiui ar krypti, balansas tarp šių jėgų sutrikdomas (Yoder et al, 2001; Ingber, 2003 a; Kumar et al, 2008). To pasekoje atsiveria jonų kanalai, duodami pradžių tolimesniems biocheminiams virsmams, vedantiems prie gravitropinio atsako (išlinkimo) (Ingber, 2003 b). Taip mechaninis signalas yra paverčiamas biocheminiu signalu. Signalo kryptis gali būti koreguojama unikalios šaknies gravisensorinėms ląstelėms būdingo „nodalinio ET“, kuris apsaugo tam tikras plazmolemos sritis nuo statolitų sudirginimo (Zheng, Staehelin, 2001).

Kaip alternatyva pastarajai hipotezei buvo pasiūlytas „ligando-receptoriaus“ modelis, kuris paaiškina gravipercepciją *Chara* rizoiduose (Limbach et al., 2005). Autorių nuomone, statolite esantys ligandai fiziškai sąveikauja su statocito šonuose išsidėsčiusių jautrių membranų receptoriais, taip paleisdami gravisignalą transdukcijos procesą.

Statolitinė gravitacijos jutimo teorija yra grindžiama daugybės tyrimų rezultatais (Blancaflor et al., 1998; Fukaki et al., 1998; Hasenstein, Kuznetsov, 1999; Kiss, 2000; Fujihira et al., 2000; Kordyum et al., 2007; Scherp, Hasenstein 2007; Yamamoto et al., 2002; Vitha et al., 2007 ir t.t.). Teigiama, kad amiloplastų (statolitų) sedimentacija šaknies ir stiebo statocituose yra neatsiejama gravipercepcijos dalis ir yra būtina gravitropinio atsako indukcijai.

Gravipercepcijos mechanizmo tyrimui naudojama daug įvairiausių metodų. Iš dažniausiai naudojamų galime išskirti šiuos: 1) tyrimai gravitropinių mutantų pagalba; 2) tikslios manipuliacijos magnetais ar lazeriais; 3) proceso tyrimai keičiant gravitacinės jėgos parametrus (kryptis, dydis); 4) gravitropinės reakcijos matematinis modeliavimas.

Gravitropinių mutantų tyrimai - vieni iš naudingiausių aiškinantis augalų gravitropizmo procesą. Siekiant patvirtinti statolitinę percepcijos teoriją buvo atlikti tyrimai su javų (Hertel et al., 1969), pomidorų (Muday et al., 1995; Hasenstein, Kuznetsov, 1999), ryžių (Godbole et al., 1999) mutantiniais augalais.

Šaknies gravitropizmo tyrimai gana toli pažengę pradėjus *Arabidopsis thaliana* augalus naudoti genetiniams tyrimams. Išskirti mutantai su krakmolo sintezės pakitimais, turintys pakitimų fosfogliukomutazės gamyboje (pgm), buvo sėkmingai pritaikyti percepcijos proceso tyrimui. Vienas iš tokių augalų mutantų yra ACG 21, turintis krakmolo trūkumą visuose šaknies audiniuose (Caspar, Pickard, 1989; Kiss et al., 1989).

Tyrimų metu nustatyti mutantinių ir laukinio tipo augalų gravitropinio jautrumo skirtumai, vertinant percepcijos ir prezentacijos laikus (Kiss et al., 1996; 1997; 1998; 1999; 2002).

Atliktų tyrimų rezultatai liudija, kad šaknies šalmelio statenchimos ląstelės yra gravisensorinis šaknies audinys. Gauti duomenys patvirtina krakmolo-statolitinę percepcijos teoriją.

Stiebo gravitropizmo ankstyvųjų fazių procesų tyrimams, sukurta nemažai gravitropinių *Arabidopsis thaliana* mutantų. **1. Mutantai, su endodermio formavimosi pakitimais.** Sukurti mutantai *eal1*, *we2*, *sgr1- sgr7*, neturintys endodermio ląstelių ar kito audinio, kuris turėtų mobilius amiloplastus. Tokių augalų žiedstiebiai ir hipokotiliai agravitropiškai, tuo tarpu šaknų gravitropinė reakcija normali (Fukaki et al., 1996; 1998; Yamauchi et al., 1997; Morita et al., 2007; Kitazawa et al., 2008). Nustatyta, kad *sgr 3*, *5* ir *6* mutantiniai augalai pasižymi tik žiedstiebio silpnesne gravitropine reakcija, o *sgr1*, *2*, *4*, *7* mutantinių augalų ir hipokotilių ir žiedstiebių gravitropizmo procesas yra pakitęs. Tai rodo, jog gravitropizmo genetinė reguliacija abiejuose antžeminiuose organuose gali kiek skirtis, nors gravitropizme dalyvaujantis audinys ir ląstelinės struktūros panašios (Tasaka et al., 1999, 2001). Atlikti mutantinių augalų tyrimai įrodo, jog endodermis yra stiebo gravisensorinis audinys (Fukaki et al., 1996; 1998; Yamauchi et al., 1997; Tasaka et al., 2001; Kitazawa et al., 2008). **2. Mutantai su amiloplastų pakitimais** – *ACG20*, *ACG21*, *ACG27* – sumažėjęs krakmolo kiekis endodermyje ir kituose audiniuose; *less1 (eal1)*, *axr1*, *nph4* – nėra amiloplastų endodermyje, pakitusi gravitropinė kompetencija; *arc6*, *arc12* – pakitusi endodermio ląstelių plastidžių morfologija (jos padidėjusios), sumažėjusi gravitropinė reakcija

hipokotiliuose ir žiedstiebiuose, bet ne šaknyse. Šios grupės mutantų gravitropinės elgsenos tyrimai patvirtina nuostatą, jog endodermio ląstelėse esantys amiloplastai funkcionuoja kaip statolitai, jų judėjimas ar lokalizacija gali būti esminis gravipercepcijos procesas neigiamai gravitropiškuose organuose (Kiss et al., 1989; 1999; Sack, 1997; Kiss, 2000; Fujihira et al., 2000; Fitzelle, Kiss, 2001; Yamamoto et al., 2002). **3. Mutantai su pakitusiu vakuolės formavimusi.** Sukurti augalai mutantai - *sgr-1*, *sgr2*, *sgr3*, *zig(zigzag)/sgr4*, turintys genų mutacijas, dėl to yra pakitęs vakuolės formavimasis hipokotilio endodermio ląstelėse. Tyrimų metu pastebėta, kad šių augalų žiedstiebio ir hipokotilio gravitropinis atsakas silpnesnis nei laukinio tipo augalų. Taip pat nustatyta, jog *sgr-1* ir *zig-1* mutantų endodermio ląstelėse yra sutrikusi amiloplastų sedimentacija (Fukaki et al., 1996; Zheng et al., 1999; Kato et al., 2002; Morita et al., 2002; Yano et al., 2003). Šių tyrimų duomenų visuma patvirtina, kad vakuolės formavimasis ir jos funkcija endodermio ląstelėse yra svarbi stiebo gravitropizmo ankstyvojo proceso dalis (Morita et al., 2002; Yano et al., 2003).

Augalai mutantai, turintys genų mutaciją, lemiančią tik šaknies ar tik stiebo gravitropizmo pakitimus, tyrėjams leidžia susiformuoti nuomonę, kad genetiškai antžeminės ir požeminės augalo dalies gravitropizmo procesas yra skirtingas (Bullen et al., 1990; Fukaki et al., 1997). Kita vertus, sukurta daug mutantų, turinčių tiek teigiamai, tiek neigiamai gravitropiškų augalo organų gravitropinės reakcijos pakitimus. Iš to galime spręsti, kad kai kurie gravitropizmo genetinio mechanizmo komponentai būdingi abiem augalo organams (Masson et al., 2002). Pvz., *sex 1* daigų šaknyse ir antžeminėje augalo dalyje yra padidėjęs krakmolo kiekis. Nustatyta, kad šių mutantų šaknų ir hipokotilių prezentacijos laikas trumpesnis nei laukinio tipo augalų (Vitha et al., 2007). Atliktų tyrimų rezultatai parodo, jog kiekvieno mutanto gravitropinis atsakas koreliuoja su amiloplastuose esančiu krakmolo grūdelių kiekiu tiek požeminėje, tiek antžeminėje augalo dalyse (Kiss et al., 1996; 1997; Weise, Kiss, 1999; Kiss, 2000). Gautieji rezultatai atkreipia dėmesį į tai, kad

abiejuose augalo organuose pilnam gravitropizmo proceso vyksmui reikalingos vienodos sąlygos.

Percepcijos/transdukcijos tyrimui augaluose plačiai naudojama ir magnetoforezės technika, pritaikant aukšto gradiento magnetinį lauką (AGML) ar silpną kombinuotą magnetinį lauką (KML) manipuliacijai su statolitais gravitacijai jautriose ląstelėse (Kuznetsov, Hasenstein, 1996; 1997; Kuznetsov et al., 1999; Weise et al., 2000; Kondrachuk, Hasenstein, 2001; Hasenstein, Scherp, 2005; Kordyum et al., 2005; 2007; Scherp, Hasenstein, 2007). AGML naudojamas norint imituoti gravitacijos poveikį lokalizuotoje augalo vietoje (labai trumpose distancijose) ir identifikuoti amiloplastų pasiskirstymo zonas (Kuznetsov, Hasenstein, 1996; Weise et al., 2000). Kosminių tyrimų metu atliktais eksperimentais nustatyta, jog mikrogravitacijos sąlygomis augusios šaknys yra jautresnės AGML (didesnis jų linkimo kampas) nei tos, kurios yra išaugę Žemės sąlygomis. Manoma, jog toks šaknų gravisensorinės sistemos jautrumas yra susijęs su amiloplastų išsidėstymu ląstelėje (Hasenstein, Scherp, 2005). Minėta metodika taikyta siekiant išsiaiškinti gravitacijos jutimo procesą antžeminėse augalo dalyse. Nustatyta, jog gravitacijos signalas žiedstiebyje nepersiduoda iš bazalinės dalies į apeksą. Atsižvelgiant į tai, iškelta prielaida, kad gravitacijos signalo erdvinio paplitimo zona žiedstiebyje yra maža (Weise et al., 2000), skirtingai nei šaknies (Sack, 1991). Taikant silpną kombinuotą magnetinį lauką nustatyta, jog šiuo lauku galima pakeisti šaknies teigiamą gravitropizmą į neigiamą. Autorių atlikti tyrimai patvirtina hipotezę, kad tiek amiloplastai, esantys šaknies šalmelio statocituose, tiek Ca^{2+} jonai atlieka didžiulį vaidmenį augalų gravitropizmo procese (Kordyum et al., 2007).

Vienas didžiausių magnetoforezės metodo pasiekimų yra statolitinės gravitacijos jutimo teorijos pagrindimas, nes daugelis tyrimų rezultatų demonstruoja ryšį tarp amiloplastų poslinkio ir gravitropinio linkimo (Kuznetsov, Hasenstein, 1996; 1999; Kuznetsov, et al., 1999; Weise et al., 2000; Kiss, 2000; Kordyum et al., 2005). Šią teoriją patvirtina ir tyrimai su augalais mutantais. Pvz., *Arabidopsis thaliana* mutantų šaknys, turinčios mažesnę krakmolo kiekį šalmelyje į AGML nereguoja, gravitropinio atsako

(linkimo) nėra. Taip pat nustatyta, kad AGML gali atstoti gravitacijos jėgą. Veikiant AGML, hipokotilių ir žiedstiebių linkimo kryptis yra priešinga amiloplastų išsidėstymo kryptčiai (Kuznetsov, Hasenstein, 1997).

Vienas iš retesnių percepcijos tyrimo metodų augaluose yra dalies gravisensorinio audinio ląstelių pašalinimas lazerio pagalba (Blancaflor et al., 1998, 1999; Fukaki et al., 1998). Ši technologija leidžia eliminuoti atskiras ląsteles ir tuo pačiu tirti gravitropizmo procesus individualiose ląstelėse. Blancaflor et al. (1999) nustatė, jog lazerio pagalba pašalinus antrą šaknies statenchimos ląstelių sluoksnį, stebimas didžiulis efektas *Arabidopsis thaliana* šaknų prezentacijos laikui, kuomet 3-io sluoksnio pašalinimas tokio efekto nesukelia. Kita vertus, pastarojo pašalinimas inhibuoja šaknies gravitropinį linkimą. Atsižvelgiant į tai nustatyta, kad gravitropinis signalas pernešamas iš šaknies šalmelio. Stebint statolitu elgseną, didžiausias jų judėjimo greitis konstatuotas taip pat centrinėse kolumelės ląstelėse. Šie tyrimai įrodo, jog ląstelės su mobilesniais amiloplastais generuoja didesnę gravitropinį signalą ir tuo pačiu patvirtina krakmolo-statolitinę percepcijos teoriją.

Infraraudonasis lazeris (optiniai pincetai) naudojamas statolitu išjudinimui *Chara* rizoiduose, *Arabidopsis thaliana* šaknų šalmelyje imituojant gravitacijos poveikį jiems (Leitz et al., 1995; 2009; Braun, 2002). „Optinių pincetų“ pagalba atsirado galimybė atlikti tikslias manipuliacijas intaktinėje ląstelėje. Skirtingai nei magnetoforezės būdu, šis metodas leido pajudinti keletą ar net vieną plastidę. Naudojant minėtą metodiką prieita išvada, jog pasipriešinimas statolitus stumiančiai optinei jėgai priklauso nuo aktino tinklo. Tai nustatyta, panaudojus aktino inhibitorių cytochalazina B. Naudojant „optinius pincetus“, nustatyta, kad *Chara* rizoidų gravisensorinių ląstelių aktino tinklo generuojamos jėgos bazipetalia kryptimi slenkančius statolitus veikia stipriau, nei slenkančius akropetalia kryptimi. Visi šie tyrimai patvirtina hipotezę apie aktino tinklo įtaką gravitropizmui.

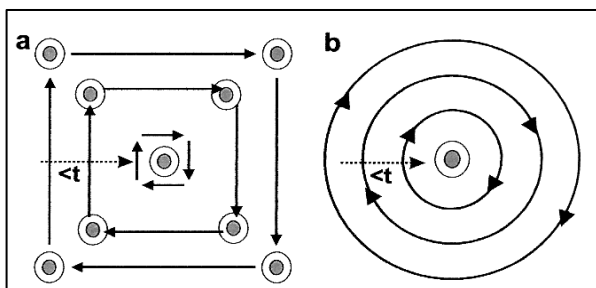
Norint kuo tiksliau išsiaiškinti gravipercepcijos mechanizmą svarbu žinoti kiek augalai yra jautrūs gravitacijai. Keičiant gravitacinės jėgos dydį ir kryptį yra puiki galimybė įvertinti slenkstinius gravitacinio jautrumo

parametrus. Nemažai gravitacijos jautrumo tyrimų atlikta ir dar šiuo metu atliekama realios mikrogravitacijos sąlygomis (kosminio skrydžio metu). Nepaisant įvairių trukdžių (skrydžio trukmė, perkrovos pakilimo ir nusileidimo metu ir t.t.), kas gali įnešti paklaidas, nemažai daliai tyrėjų pavyko sėkmingai atlikti tyrimus, kurie davė daug naudos gravipercepcijos proceso aiškinimuisi žemesniuose (Sievers, Braun, 1996; Braun, 1997; Braun et al., 2002), bei aukštesniuose augaluose (Perbal et al., 1987; 1997; Perbal, Driss-Ecole, 1994; Volkmann et al., 1996; Tewinkel, Volkmann, 1994; Laurinavičius et al., 1996; 1997; Perbal, 1999; Hasenstein, Scherp, 2005; Driss-Ecole et al., 2008; Kiss et al., 2009 ir kt.). Eilė kosminių gravipercepcijos eksperimentų atlikta su *Arabidopsis thaliana* mutantais, turinčiais pakitimų krakmolo gamyboje, ir laukinio tipo augalais. Nustatyta, kad laukinio tipo augalų atsakomoji reakcija į vienkryptį g -jėgos poveikį buvo žymiai didesnė nei mutantinių augalų (Kiss et al., 1998, 1999b). Siekiant detaliai išsiaiškinti jautrumo parametrus, skrydžio metu, kosminių centrifugų pagalba, sukuriama dirbtinė gravitacijos sąlyga. Pagrindinis tokių bandymų principas yra išcentrinė jėgų panaudojimas, kurios fiziologine prasme augalams atstoja Žemės traukos jėgą (Merkys et al., 1981). Vertinant Žemės sąlygomis ir mikrogravitacijos sąlygomis išaugusių šaknų prezentacijos laiką, nustatyta, jog šaknys augusios MG yra jautresnės gravistimului nei augusios 1 g (Perbal et al., 1987; 2004; Perbal, Driss-Ecole, 1994; Volkmann, Tewinkel 1996).

Kaip minėta anksčiau, Žemėje gravitacijos percepcijos tyrimus sunku atlikti dėl nuolat veikiančio Žemės gravitacinio lauko. Norint panaikinti vienkryptį gravitacijos poveikį ir sukurti dirbtines MG sąlygas buvo sukonstruoti klinostatai. Beveik po šimtmečio nuo pirmojo Knight klinostato (Knight, 1806) Julijus von Sachs sukonstravo klinostatą – gravitacijos efektus panaikinančią mašiną. Šiuolaikiniai klinostatai yra patikimos konstrukcijos ir daugelis iš jų pripažinti kaip įrenginiai, sukuriantys dirbtines MG sąlygas. Klinostatai gali būti: 1) vienos ašies lėtai besisukantis nuo 1 iki 4 aps./min; 2) vienos ašies greitas klinostatas, besisukantis 50–120 aps./min; 3) dviejų ašių (centrifuga-klinostatas); 4) trijų dimensijų klinostatai (sukimas vyksta trimis

kryptimis, apsisukimo greitis reguliuojamas dviem varikliais atsitiktine tvarka);
5) laisvo kritimo mašinos.

Lėti klinostatai plačiai naudojami gravitacijos efektų augalams tyrimui (Kiss, Sack, 1989; Kiss et al., 1996). Tačiau yra duomenų, kad šio tipo klinostatai duoda nepageidaujamų efektų. Pvz., etileno produkcijos sumažėjimas ar ląstelės poliškumo suardymas (Hoson et al., 1997; Hensel, Sievers, 1981). Taip pat nesvarumo imitavimo atžvilgiu jie yra mažiau patikimesni, nei greiti klinostatai. Elementarus greito klinostato pranašumas gali būti apibūdinamas schema, pavaizduota 5 paveiksle.



5 pav. Greito klinostato veikimo schema. Sukant skystą terpę su kietomis dalelėmis 90° kampu, jos juda gravitacijos vektoriaus kryptimi (a). Didinant apsisukimų greitį, kietų dalelių judėjimo trajektorija įgauna apskritimo formą (b). Didėjant greičiui, mažėja apskritimo perimetras. Kuomet dalelės sukimosi perimetras pasidaro mažesnis už jos dydį, ši pradeda sukintis apie savo ašį (Pagal van Loon, 2007)

Greito klinostato pranašumą įrodo ir gravisensorinių ląstelių struktūros pakeisto svarumo sąlygomis tyrimai.

Mikrogravitacijos sąlygomis dauguma amiloplastų grupuojasi statocito centre.

Horizontalus klinostatavimas 10, 50 ir 100 aps./min. greičiu, statolitų išsidėstymui sukelia panašų efektą. Tuo tarpu klinostatuojant 4

aps./min. greičiu amiloplastų komplekso nuotolis nuo distalinės ląstelės sienelės yra žymiai mažesnis, nors ir viršija kontrolinį (1 g) variantą (Laurinavičius et al., 2001). Nustatyta, kad naudojant greitą klinostatą amiloplastų pozicija *Arabidopsis thaliana* augalų šaknies statenchimos ląstelėse yra labai panaši į MG sąlygomis augusių augalų, ko negalima pasakyti apie vienos ašies lėtą klinostatą (Kraft et al., 2000). Tai patvirtina greitų klinostatų pranašumą bandant sukurti imituotos mikrogravitacijos sąlygas Žemėje.

Hipogravitacijos sąlygų ($0 < g < 1$) imitacijai Žemėje yra naudojamas dviejų ašių klinostatas, dar kitaip vadinamas centrifuga-klinostatu (Shen-Miller et al., 1968; Меркис, Лауринавичюс, 1980; Лауринавичюс и др., 1984; Laurinavičius et al., 1998; 2001; Galland et al., 2004). Šis prietaisas gali veikti klinostatavimo režimu. Augalus sukant ant horizontaliųjų ašių eliminuojamas vienkryptis gravitacinės jėgos poveikis. Tuo pačiu metu sukantis šioms ašims apie vertikalią ašį, priklausomai nuo centrifugavimo greičio, gali būti generuojama atitinkamo dydžio išcentrinė jėga.

Lyginant kosminių ir Žemėje atliktų tyrimų rezultatus būta ir iki šiol esama prieštaringų nuomonių, ar greito dviejų ašių, ar trijų dimensijų klinostato poveikis augalams yra labiausiai panašus į realios MG poveikį. Galutinės nuomonės nėra, tačiau gaunami rezultatai leidžia teigti, jog tiek vienas, tiek kitas būdas yra efektyvus ir gali būti naudojamas dirbtinių kosmoso sąlygų sukūrimui Žemėje (Buchen et al., 1993; Yamaha et al., 1993; Hoson et al., 1997; Kraft et al., 2000; Laurinavičius et al., 2001; Klaus, 2001; Russomano et al., 2005; Hemmersbach et al., 2006; van Loon, 2007).

Keičiant gravitacinės jėgos dydį ir kryptį galime išsiaiškinti ne tik augalų ašinių organų gravitropinį jautrumą, bet tai yra vienas iš augalų gravisensorinio aparato struktūros, jo mechanizmo tyrimo būdų. Mažinant gravitacinės jėgos dydį, pvz., kosminių eksperimentų metu daigus perkeliant iš 1 g kosminės centrifugos į mikrogravitaciją ar klinostatuojant centrifugoje-klinostate, statolitai juda išilgai statocito, nuo distalinės sienelės link proksimalinės (Laurinavičius et al., 2001; Driss-Ecole et al., 2000a). Manoma, kad šaknų statocituose tokios krypties statolitų judesius neabejotinai sąlygoja citoskeleto generuojamos elastingos jėgos. Nustatyta, kad šaknies statocituose šių proksimalios krypties jėgų dydis yra apie 0,3 g (Driss-Ecole et al., 2000a; Laurinavičius et al., 2001). Atsižvelgiant į grupės mokslininkų atliktus tyrimus su lęšio šaknimis, buvo padaryta prielaida, kad, pakitus gravitacijos parametrams, amiloplastų judėjimą išilgai šaknies statenchimos ląstelių veikiančią jėgą generuoja aktino-miozino sistema (Perbal et al., 1997; Perbal, 1999; Driss-Ecole et al., 2000a). Pagal pastaruosiu metu vyraujančias

statolines gravitacijos jutimo hipotezes (Sievers et al., 1991; Yoder et al., 2001; Limbach, et al., 2005), citoskeleto aktino-miozino sistema vienokiu ar kitokiu būdu aktyviai dalyvauja gravitacinio signalo priėmimo ir vėlesniuose jo virsmuose (Kiss, 2000; Perbal, Driss-Ecole, 2003). Kosminių tyrimų rezultatai taip pat pabrėžia citoskeleto svarbą gravitacijos jutimui šaknyse. Manoma, kad dėl amiloplastų padėties ląstelėje ir jų sąveikos su citoskeleto elementais, gali būti padidėjęs MG sąlygomis augančių šaknų jautrumas. Taip pat manoma, kad aktino-miozino sistema atlieka didžiulį vaidmenį nugalint terminį triukšmą (Braun et. al., 2002; Driss-Ecole et al., 2008).

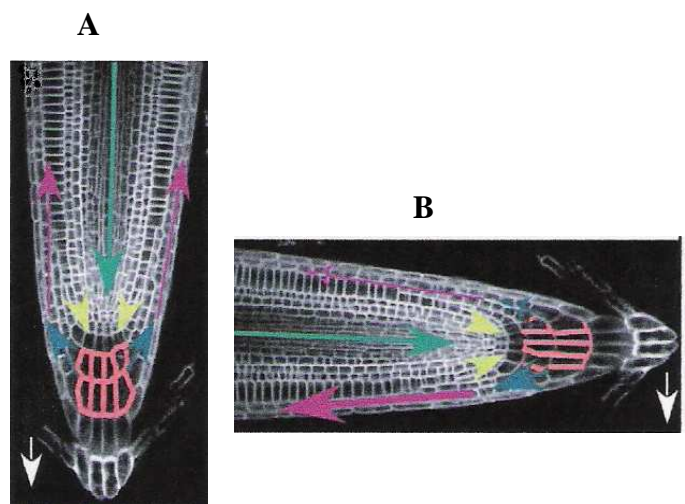
Be minėtų metodų gravitacijos jutimo proceso tyrimas atliekamas ir matematinio modeliavimo pagalba. Šį metodą sėkmingai pritaikė ir mūsų laboratorijos mokslininkai, kurie gravipercepcijos mechanizmą tyrė aiškindamiesi sąveiką tarp atskirų reakcijos fazių, sudarydami viso sudėtinio proceso matematinį modelį (Stočkus, 1993; Stočkus, 1994a; Meškauskas, Jurkonienė et al., 1999).

1.3.2. Gravitacijos signalo transdukcija

Kaip ir gravitacijos signalo pajutimas, taip ir šio signalo transdukcijos procesas iki šiol nėra galutinai aiškus. Žinoma, kad transdukcijos metu informacija apie naują augalo organo orientaciją keliauja iš jutimo vietos į vietą, kur pasireiškia atsakomoji reakcija (1 pav.). Transdukcija dažniausiai aiškinama remiantis Cholodny-Went hipoteze, kuri teigia, jog šiame gravitropinės reakcijos etape pagrindinis vaidmuo tenka augimo hormonui auksinui (IAR-indolil-3-acto rūgštis).

Auksinas sintetinamas jaunuose antžeminės augalo dalies audiniuose. Jo transportas vyksta dviem pagrindiniais keliais: 1) nekryptingas, greitas tekėjimas floema; 2) lėtesnis, kryptingas poliarinis auksino transportas (Friml, Palme, 2002). Poliarinio transporto metu antžeminėje augalo dalyje auksinas perduodamas viena kryptimi bazipetaliai. Šaknyje iš pradžių juda akropetaliai nuo pagrindo link šaknies viršūnės (6A pav.), vėliau iš šaknies šalmelio paskirstomas į periferinius audinius ir transportuojamas atgal į tįsimo zoną

(Muday, DeLong, 2001; Perrin et al., 2005). Poliarinis auksino transportas augalo ląstelėse skirstomas į įtekėjimo ir ištekėjimo procesus ir vyksta pernešėjų pagalba. Pvz., *Arabidopsis thaliana* šaknyse IAR įtekėjimas į ląstelę vyksta AUX1 ar kitų LAX šeimos pernešėjų pagalba (6 pav.), o ištekėjimas vyksta dalyvaujant PIN šeimos ir kitiems transmembraniniams baltymams (Noh et al., 2003; Vicente-Agullo et al., 2004; Blilou et al., 2005). Horizontaliai paverstuose augaluose, gravitropinio dirginimo metu, stebimas auksino transporto persiskirstymas lateraline kryptimi (6B pav.) (Muday, 2001; Perrin et al., 2005). Cholodny-Went hipotezė teigia, kad gravitacija sukelia lateralinį auksino persiskirstymą augalo organuose. Manoma, kad tokį IAR pasiskirstymą gravitropinio dirginimo metu sukelia auksino pernešėjo PIN3 padėties kitimas gravisensorinėje ląstelėje. Paprastai šis baltymas lokalizuotas simetriškai išilgai šaknies statocito plazmolemos (6A pav.).



6 pav. Auksino transporto modelis *Arabidopsis thaliana* šaknyje. Rodyklės nurodo auksino transporto kryptį skirtinguose audiniuose. Jų storis apibūdina transporto intensyvumą, o spalva – šiuose audiniuose esančius PIN grupės baltymus (Blilou et al., 2005): žalia = PIN1, 3, 7; geltona = PIN1, 2, 4; mėlyna = PIN1, 3, 4, 7; purpurinė = PIN1, 2. Raudona spalva apibrėžianti centrinės šaknies šalmelio ląsteles nusako PIN3 paplitimą prie šių ląstelių plazmolemos. Vertikalioje šaknyje (A) PIN3 paplitęs simetriškai, o gravitropinio dirginimo metu (B) greitai akumuliuojasi prie apatinių membranų. Baltos spalvos rodyklės nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį (pagal Perrin et al., 2005)

Gravitropinio dirginimo metu stebima staigi jo akumuliacija prie naujos apatinės statocito sienelės (Fasano et al., 2001; Friml, Palme, 2002; Blancaflor,

Masson, 2003; Young et al., 2006; Perrin et al., 2005), todėl ląstelėse susidaro didelė IAR koncentracija. Susidaręs lateralinis auksino gradientas provokuoja diferencijuotą ląstelių augimą (Masson et al, 2002).

Kad gravitropinio dirginimo metu vyktų auksino persiskirstymas lateraline kryptimi, didžiulę įtaką turi gravitacijos signalo pernešėjai. Šiuo metu identifikuota keletas galimų gravitacijos signalo pernešėjų (pvz., Ca^{2+} , IP_3 , pH, flavonoidai ir baltymai, priklausantys ARG1/RHG ir ARL2 grupei) (Sedbrook et al., 1999; Masson et al, 2002; Friml, Palme, 2002; Guan et al., 2003; Kordyum, 2003; Salinas-Mondragon et al., 2005; Plieth, 2005; Perera et al., 2006; Poovaiah et al., 2006; Kumar et al., 2008). Tačiau jų veikla nėra iki galo iširta. Jau seniai manoma, kad Ca^{2+} atlieka antrinio tarpininko vaidmenį transdukcijos metu. Viduląstelinio Ca^{2+} koncentracijos kitimas yra įtakojamas daugumos stimulų, įskaitant mechaninius stimulus, tokius kaip gravitacija (Fasano et al., 2001; Yang, Poovaiah, 2003; Plieth, 2005). Nustatyta, kad horizontaliai paverstuose *Arabidopsis thaliana* daiguose gravitropinio dirginimo metu yra stebimas citozolinio Ca^{2+} padidėjimas (Plieth, Trewavas, 2002; Toyota et al., 2008). Tačiau tiesioginio Ca^{2+} dalyvavimo gravitropizmo procese mechanizmo aiškinimo nėra iki šiol. Viena iš teorijų teigia, kad tai gali įvykti statolitų sedimentacijos metu. Manoma, kad statolitai, kontaktuodami su aktino filamentais per baltymą mioziną, tempimo būdu aktyvuoja jonų kanalus ir provokuoja citozolinio Ca^{2+} padidėjimą. Citozolinio Ca^{2+} padidėjimas tuo metu gali būti atsakingas už lateralinį auksino transportą (Sievers, Braun, 1996; Perbal, Driss-Ecole D, 2002). Ca^{2+} pakitimai nustatomi baltymo kalmodulino pagalba, nes netgi maži viduląstelinio Ca^{2+} koncentracijos pasikeitimai gali aktyvuoti šio baltymo veiklą. Kalmodulinas jungiasi su Ca^{2+} sudarydamas naują kalcio/kalmodulino molekulę, kuri duoda pradžią tolimesnei signalų kaskadai. Dauguma tyrimų, aiškinančių galimą Ca^{2+} dalyvavimą gravitropizmo procese atlikti naudojant inhibitorius. EGTA – agentas, įtakojantis Ca^{2+} kiekio reguliacijos procesą, blokuoja gravitacijos sukeltą auksino persiskirstymą (Young, Evans, 1994). Kita vertus, auksino transporto inhibitoriai blokuoja poliarinį Ca^{2+} transportą kukurūzų ir žirnių šaknyse (Lee et al., 1984; Plieth,

Trewavas, 2002). Kiti Ca^{2+} ir auksino sąveiką aiškinantys rezultatai gauti tiriant pastarojo reguliuojamų genų *SAURs* grupę. Šie genai generuoja baltymus, kurie, kaip manoma, turi įtakos augalo augimo krypties pasikeitimui gravitropinio dirginimo metu. SAUR baltymai, jungdamiesi su kalcio/kalmodulino molekule, sužadina tolimesnius molekulinis ir biocheminius virsmus, vedančius prie gravitropinio atsako (Yang, Poovaiah, 2000). Tų pačių tyrėjų nuomone, kalcio/kalmodulino kompleksas dalyvauja ir vandenilio peroksido lygio ląstelėje palaikyme. Vandenilio peroksidas yra reaktyvi molekulė. Šių molekulių kiekio padidėjimas gali sukelti ląstelės sunykimą. Be to, ši molekulė dalyvauja ir augalo adaptacijos procesuose, kintant aplinkos veiksniams, įskaitant ir gravitaciją (Yang, Poovaiah, 2002). Fermentas katalazė kontroliuoja vandenilio peroksido lygį ląstelėje, suskaldydamas jį iki deguonies ir vandens. Manoma, kad šio proceso metu prie katalazės jungiasi kalcio/kalmodulino molekulė, o vandenilio peroksido lygio sumažėjimas įtakoja gravitropinio atsako kitimą.

Ca^{2+} , kaip antrinio tarpininko vaidmuo nagrinėjamas bene plačiausiai, tačiau konstatuojami faktai, jog gravitropinio dirginimo metu pakinta ir šaknies šalmelio statenchimos ląstelių citoplazmos ir apoplasto pH (Scott, Allen 1999; Fasano et al., 2001; 2002; Masson et al., 2002). Protonų pliūpsnis šaknies šalmelio paviršiuje stebimas praėjus kelioms minutėms nuo gravistimuliacijos pradžios. Manoma, jog pH gradientas gravisensorinėse ląstelėse yra išorinio gravitacinio signalo sukeltų vidinių signalų kaskados dalis (Perbal, Driss-Ecole, 2002).

Inozitol -1,4,5-trifosfato (IP_3) vaidmuo augalų gravitropizmo procesui nėra iki galo iširtas. Manoma, kad IP_3 gali reguliuoti Ca^{2+} kiekį ląstelėje, bei moduluoti auksino transportą gravitropinio dirginimo metu (Salinas-Mondragon et al., 2005; Perrin et al., 2005; Perera et al., 2006).

Auksino transporto reguliacijoje dalyvauja ir mažos endogeninės molekulės – flavonoidai. Manoma, kad jos reguliuoja auksino transportą vykdančių baltymų veiklą (Buer, Muday, 2004).

Be minėtų, gravitacinio signalo pernešėjais dar gali būti ir kai kurie periferiniai membranų baltymai. Tyrimų su *Arabidopsis thaliana* mutantais rezultatai atskleidė, kad baltymai ARG1/RGH dalyvauja signalo transdukcijoje reguliuodami H⁺-ATPazės ar kitų baltymų antiporto/simporto sistemoje veiklą, taip įtakodami gravisensorinių ląstelių pH pasikeitimą. Teigiama, jog ARG1 gali tiesiogiai sąveikauti su citoskeleto elementais ar nešti su savim kompleksą baltymų, dalyvaujančių gravitacinio signalo perdavimo procese (Sedbrook et al., 1999; Masson et al., 2002; Kumar et al., 2008). Gali būti, jog ARG1 ir ARL2 baltymai turi įtakos augsino pasiskirstymui, gravitropinio dirginimo metu, reguliuodami PIN3 ir kitų baltymų, dalyvaujančių augsino lateraliniam transporte vietą ir/ar veiklą. (Boonsirichai et al., 2003; Perrin et al., 2005; Harrison, Masson 2008).

1.3.3. Gravitropinis atsakas

Šaknyse atsakas į gravitaciją (gravitropinis linkimas) pasireiškia 2–4 mm nuo šaknies šalmelio, tįsimo zonoje. Antžeminės augalo dalies ląstelių tįsimas ir atsakas į gravitaciją vyksta išilgai organo visoje tįsimo zonoje (1 pav), o ne mažame plotelyje (Tasaka et al., 1999).

Gravitropinis linkimas yra skirtingo ląstelių tįsimo, priešingose augalo organo (šaknies ar stiebo) pusėse, rezultatas. Žinoma, jog ląstelių tįsimą skatina auginas, moduliudamas plazminės membranos protonų pompos aktyvumą, dėl ko įvyksta ląstelės sienelės tempimasis („rūgštus augimas“), bei reguliuodamas eilės genų ekspresiją (Jones, 1994; Chen et al., 1999; del Pozo, Estelle, 1999b). Gravitropinio dirginimo metu susidaręs lateralinis augsino gradientas įtakoja tįstamąjį ląstelių augimą. Padidėjusi augsino koncentracija, gravitropiškai dirgintų organų apatinėje pusėje, skatina stiebo ląstelių tįsimą ir inhibuoja ląstelių tįsimą šaknyse (Masson et al, 2002). Dėl koncentracijos skirtumo ir nevienodo ląstelių jautrumo jai, stebima skirtinga antžeminės ir požeminės augalo dalių reakcija (stiebas linksta į viršų, o šaknis - į apačią).

Augalų organų linkimas, linkimo judesiai taip pat priklauso ir nuo Ca²⁺ pasiskirstymo ląstelėse, jo transporto per membraną aktyvumo. Norint gauti

pilną gravitropinį linkimą yra būtinas kontroliuojamas viduląstelinio Ca^{2+} kiekis (Jurkonienė, 1993; Frazer, Moore, 1993; Merkys, Darginavičienė 1997). Neginčytinas įrodymas Ca^{2+} dalyvavimo gravitropinio atsako reakcijose yra augalų gravitropizmo tyrimų rezultatai, gauti taikant magnetines manipuliacijas (Kordyum et al., 2007). Jie patvirtina hipotezę, kad didelė Ca^{2+} koncentracija audiniuose inhibuoja jų augimą įtakodama atitinkamą organo linkimo kryptį (Hasenstein, Evans, 1986).

Gravitropinio dirginimo metu, šaknies tįsimo zonoje, taip pat stebimas ir žymus protonų pliūpsnis bei apoplasto rūgštėjimas (Versel, Pilet 1986; Monshausen et al., 1996; Taylor et al., 1996; Fasano et al., 2001; 2002). Po gravistimuliacijos, kelių sekundžių laikotarpiu, kinta jonų srautas dėl ko skersai šaknų susidaro pH gradientas (Fasano et al., 2001; Monshausen, Sievers 2002). Toks asimetrinis pH pasiskirstymas pirmiausia pastebėtas šaknies šalmelyje, o vėliau šaknies tįsimo zonoje. Iš to galime spręsti, kad pH pokytis būtinas gravitacinio signalo transdukcijos ir galbūt realizacijos procesų metu (Morita, Tasaka 2004).

Manoma, kad šaknies ir stiebo gravitropinėje reakcijoje dalyvauja ne tik auksinas, bet ir kiti hormonai. Pavyzdžiui, teigiama, jog etilenas ir citokininai veikia lygiagrečiai su auksinu, arba reguliuoja auksino signalinę grandinę (Chen et al., 1998; Aloni et al., 2004; Buer et al., 2006). Pilet ir Rivier (1981) nuomone, pavertus šaknis abscizo rūgštis (ABR) veikia kaip inhibitorius, stabdydama ląstelių augimą. Tačiau daugiau įrodymų, jog abscizo rūgštis dalyvauja gravitropizmo procese taip ir neatsirado. Todėl Moore (1990) paskelbė, jog ABR nėra būtina kukurūzo pirminių šaknų gravitropizmo procesui. Kai kurie autoriai mini giberelinų (El-Antably, Larsen, 1974 a; 1974 b) ir etileno (Bucher, Pilet, 1982; Lee et al., 1990; Edelman et al., 2005) dalyvavimą gravitropizmo procesuose. Hu su kolegomis (2005) aiškino, jog azoto monoksidas (NO), plačiai paplitusi dujų signalinė molekulė, dalyvauja gravitacinio signalo pernešimo procese, nes stebėjo jo asimetrinį išsidėstymą sojos šaknyse.

Gravitropinio atsako eigą gali įtakoti ir kiti aplinkos veiksniai. Pavyzdžiui, ilgalaikis raudonos šviesos poveikis pakeičia *Arabidopsis thaliana* hipokotilių gravitropinį linkimą (Golan et al., 1996).

Nepaisant šaknies ir stiebo statocitų struktūrinės organizacijos skirtumų, manoma, kad abiejų ašinių organų gravitropizmo procesas turėtų būti universalus. Molekuliniiais ankstyvųjų gravitropizmo fazių tyrimų metodais nustatyta, jog augaluose neturinčiuose baltymo ARG1, kuris kaip manoma jungiasi su citoskeletu ir dalyvauja ankstyvosiose gravitacijos signalo perdavimo fazėse, būdingas uždelstas gravitropizmo procesas abiejuose ašiniuose organuose (Sedbrook et al. 1999; Fukaki et al., 1997; Baluška, Hasenstein, 1997; Guan et al., 2003). Manoma, kad ARG1 jungdamasis su citoskeletu kontroliuoja gravitacijos apspręstą amiloplastų judėjimą (Kumar et al., 2008). Tai byloja apie citoskeleto svarbą tiek šaknies, tiek hipokotilio gravitacijos jutimui. Tokį samprotavimą patvirtina ir kiti augalų mutantų tyrimų rezultatai. Pvz., baltymo PIN3, kuris transdukcijos metu aktyviai juda tarp plazminės membranos, vidinių membranų ir aktino tinklo šaknies gravisensorinėse ląstelėse, mutacija turi įtakos ir hipokotilio gravitropizmui (Friml, Palme, 2002).

Nors šaknies gravisensorinio aparato tyrimai toli pažengę, apie antžeminės augalo dalies gravisensorinių ląstelių funkcionavimą ir citoskeleto vaidmenį gravipercepcijos procese žinoma labai mažai. Turėdami originalios konstrukcijos aparatą centrifugą-klinostatą ir galimybę savo duomenis patikslinti anksčiau atliktais kosminiais eksperimentais, atlikome palyginamąjį statolitų judesių statikos ir kinetikos analizės tyrimą to pačio augalo ašinių organų gravisensorinėse ląstelėse. Duomenys apie statolitų judesių kinetiką tiksliai dozuojant gravitacinius stimulus gali suteikti informacijos kaip apie reologines pačios citoplazmos savybes atskirose gravisensorinės ląstelės srityse, taip ir apie citoskeleto generuojamų elastinių jėgų įtaką amiloplastų judėjimui.

Tikėtina, kad šie tyrimai leis įvertinti viduląstelinius gravitacijos jutimo mechanizmus teigiamu ir neigiamu gravitropizmu pasižyminčiuose augalų organuose.

2. TYRIMŲ OBJEKTAS, MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimų objektas – sėjamosios pipirnės (*Lepidium sativum* L., veislė ‘Paprastoji’) daigai. Šis augalas pasirinktas dėl greito ir nereikalaujančio ypatingų sąlygų augimo bei gerai žinomos anatomicinės-morfologinės sandaros (Эзай, 1980). Patogi tyrimams daigų ašinių organų erdvinė orientacija suteikė galimybę sėjamosios pipirnės augalus plačiai naudoti gravitropinės reakcijos procesų tyrimuose, kuriuos vykdė užsienio (Sievers et al., 1991; Volkmann et al., 1993; Volkmann, Tewinkel, 1996; Tewinkel, Volkmann, 1994; Stankovič, 2001) ir Lietuvos mokslininkai (Merkys et al., 1981; 1984; Меркис и др., 1985; Laurinavičius et al., 1996; 1998; 2001).

2.1. Įranga daigų auginimui mikrogravitacijos ir pakitusios gravitacijos sąlygomis

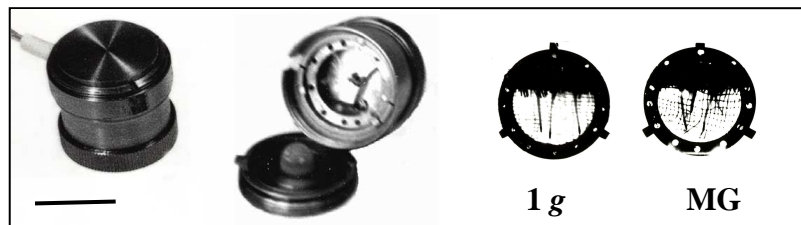
Eksperimentai su sėjamosios pipirnės daigais buvo atlikti nepilotuojamo biopalydovo „Bion-10“ skrydžio metu ir Žemėje, laboratorinėmis sąlygomis pakitusios gravitacijos sąlygų modeliavimui naudojant Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Gravitacinės fiziologijos sektoriuje esančią unikalią įrangą. Kosminė centrifuga „Neris 5“. Realios mikrogravitacijos poveikis sėjamosios pipirnės daigų gravisensorinėms ląstelėms tirtas panaudojant pilnai automatizuotą borto centrifugą „Neris-5“ (7A pav.) kosminio skrydžio (biopalydovas „Bion-10“) metu bei Žemės sąlygomis (kontrolė). Borto centrifuga sudaryta iš dviejų dalių: stacionari dalis, kurioje daigai auga mikrogravitacijos sąlygomis, ir besisukanti dalis - centrifuga, kurioje augančius daigus nuolat veikia 1 g dydžio išcentrinė jėga šaknies viršūnės kryptimi. Daigai auginami specialiuose metaliniuose konteineriuose (7B pav.), sudarytuose iš trijų kamerų, kurių didžiausia skirta daigams, o kitos prieš skrydį pripildytos vandens sėklų drėkinimui ir tirpalo daigų cheminiam užfiksavimui kaip stacionarioje dalyje, taip ir besisukančioje centrifugoje (Laurinavičius et al., 1996). Visos eksperimento procedūros – sėklų

sudrėkinimas, centrifugos įjungimas/išjungimas, fiksatoriaus išpylimas į kamerą su daigais, atliekamos automatiškai, pagal iš anksto sudarytą programą.

A



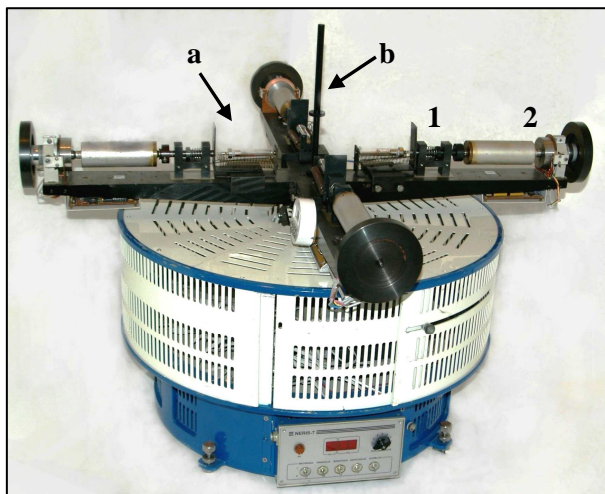
B



7 pav. Kosminės borto centrifugos „Neris-5“ bendras vaizdas (A). Ją sudaro stacionaris dalis, kurioje daigai auga mikrogravitacijos sąlygomis, ir besisukanti dalis – centrifuga, kurioje daigai nuolat veikiami 1 g dydžio išcentrine jėga šaknies viršūnės kryptimi. Daigai (po 3 vnt.) auga specialiuose metaliniuose konteineriuose (B) ant specialių laikiklių. Konteineris sudarytas iš atskirų kamerų vandeniui, auginimui ir fiksatoriui. Daigų, išaugusių skrydžio metu veikiant 1 g dydžio išcentrinei jėgai (1 g) ir mikrogravitacijos sąlygomis (MG) vaizdas (B). Mastelis - 2cm

Centrifuga-klinostatas. Gravisensorinių ląstelių formavimosi ir funkcionavimo priklausomybės nuo gravitacinės jėgos (amplitudės dydžio ir veikimo krypties) tyrimams Žemės sąlygomis buvo naudota centrifuga-klinostatas „Neris-7“ su specialia įranga daigų auginimui ir cheminei fiksacijai toje pačioje gravitacinėje aplinkoje (8 pav.). Tai Botanikos instituto Gravitacinės fiziologijos sektoriaus mokslininkų sukurtas originalus dviejų ortogonalų ašių prietaisas, kurį sudaro keturios horizontalios ašys, galinčios sukis apie vieną vertikalią ašį. Centrifuga-klinostatas gali veikti klinostatavimo režimu, t.y.,

augalus sukant ant horizontaliųjų ašių eliminuojamas vienkryptis gravitacinės jėgos poveikis. Horizontaliųjų ašių sukimosi greitis gali būti keičiamas nuo 3 iki 100 aps./min. Tuo pačiu metu sukantis šioms ašims apie vertikalią ašį, priklausomai nuo centrifugavimo greičio, gali būti generuojama nuo 0,003 g

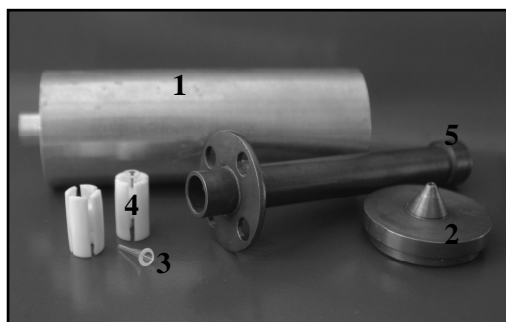


8 pav. Centrifuga-klinostatas „Neris-7“, turinti dvi ortogonalias ašis (a- horizontali ašis, b- vertikali ašis), bei cheminės fiksacijos sistemą (1), kurios pagalba pasibaigus dirginimo laikui išlaikant tokias pat gravitacines sąlygas fiksatorius sušvirškščiamas į daigų kultivavimo konteinerį (2)

(Laurinavičius et al., 1998). Didelis prietaiso privalumas – papildomai prijungiama cheminės fiksacijos sistema, leidžianti išvengti trukdžių gravitropinio dirginimo fiksacijos laikotarpiu, nes fiksuojama besisukančiuose augalų kultivavimo konteineriuose.

Daigai auginami metaliniuose centrifugos-klinostato kultivavimo konteineriuose su specialia vidine įranga sėklų ir daigų organų erdvinės orientacijos palaikymui augimo ir fiksacijos metu. Ją sudaro cilindrinis centruojantis įdėklas, į jį sudedami 5 fluoroplasto laikikliai su stikliniais daigų kultivavimo piltuvėliais (9 pav.).

iki 1 g dydžio išcentrinė jėga. Centrifugos-klinostato ašys sukamos precizinėmis pavaromis, sukimasis valdomas mikroprocesoriais. Prietaiso konstrukcija leidžia ne tik preciziškai kontroliuoti ir registruoti pavarų sukimosi greitį ir tolygumą, bet ir iki priimtino lygio sumažinti vibracijas, trukdančias atlikti metodiškai nepriekaištingus gravitacinės fiziologijos eksperimentus



9 pav. Centrifugos-klinostato augalų kultivavimo konteineris (1) ir vidinė įranga daigų erdvinės orientacijos palaikymui augimo ir fiksacijos metu: dangtelis (2), stiklinis piltuvėlis (3), fluoroplasto laikikliai (4) ir centruojantis įdėklas (5)

2.2. Bandymų metodikos statolitų lokalizacijos ir judesių gravisensorinėse ląstelėse tyrimams

Bandymai, skirti amiloplastų statikos ir kinetikos sėjamosios pipirinės hipokotilių ir šaknų gravisensorinėse ląstelėse priklausomybės nuo gravitacinės jėgos tyrimams, atlikti kosminio skrydžio sąlygomis, panaudojant borto centrifugą „Neris-5“ (7 pav.), ir Žemės sąlygomis, gravitacinius signalus modeliuojant centrifugos-klinostato (8 pav.) pagalba. Norimų parametrų gravitaciniai signalai buvo gaunami tam tikram laikotarpiui keičiant gravitacinės jėgos veikimo kryptį ir/ar jėgos dydį nuo 1 g iki mikrogravitacijos ar imituotos mikrogravitacijos (klinostatavimas).

2.2.1. Bandymo mikrogravitacijos sąlygomis aprašas

Realios mikrogravitacijos poveikio sėjamosios pipirinės daigų gravisensorinėms ląstelėms tyrimui naudojome eksperimentų, kurie buvo atlikti biopalydovo „Bion-10“ skrydžio metu pilnai automatizuotoje borto centrifugoje „Neris-5“ bei Žemės sąlygomis (kontrolė) medžiagą. Eksperimentų metu sėklos sėtos į cilindrinis konteinerius, kuriuos sudarė 3 hermetiškos kameros, t.y. vandens rezervuaras (0,3 ml talpos), daigų augimo kamera (4,5 ml talpos) ir rezervuaras fiksatoriui (2,2 ml talpos). Sėklos daigų augimo kameroje buvo pritvirtintos ant filtrinio popieriaus skrituliukų, kur augimo metu, daigų ašiniai organai galėjo laisvai keisti augimo kryptį. Centrifugavimo metu išcentrinės jėgos kryptis buvo lygiagreti daigo išilginiai

ašiai. Po 28 val. augimo MG ir KC sąlygomis sėjamosios pipirnės daigai skrydžio metu automatiškai užfiksuoti 4 % gliutaro aldehido 0,1M fosfatiniame buferyje (pH 7,2) tirpalu. Tiek Kosmose tiek Žemėje eksperimentas vyko esant vidutinei temperatūrai $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, tamsoje.

2.2.2. Bandymų pakitusios gravitacijos sąlygomis (centrifuga-klinostatas) aprašas

Eksperimentai sėjamosios pipirnės daigų gravisensorinių sistemų tyrimams Žemėje atlikti su centrifuga-klinostatu, veikusia greito klinostatavimo režimu, kai horizontalios prietaiso ašys sukosi 50 aps./min. greičiu. Siekiant visapusiškai įvertinti gravisensorinių ląstelių viduląstelių struktūrų ir gravitacinės jėgos poveikį statolitų išsidėstymui ir jos pokyčiais sukeliams judesiams, atlikti dviejų tipų eksperimentai. Pirmojo tipo bandymuose daigai buvo auginami nuolat veikiant skirtingo dydžio išilgai daigų veikiančia gravitacine jėga, antrojo tipo bandymuose daigai buvo gravitropiškai dirginami 24 minučių laikotarpiu keičiant jėgos veikimo kryptį ir dydį nuo imituotos mikrogravitacijos (klinostatavimas) iki 1 g.

Visuose bandymuose sėjamosios pipirnės sėklos, brinkintos 2 val. ant filtrinio popieriaus sudrėkinto krano vandeniui. Po to sėklos buvo lipdomos ant filtro popieriaus trikampių, sudedamų į stiklinius (10 μm) piltuvėlius taip, kad išilginė sėklos gemalinės šaknelė įaugtų į piltuvėlio kapiliarinę dalį (9 pav.). Piltuvėliai su sėklomis sustatomi į fluoroplasto laikiklius ir uždengiami 10 mm \times 3,5 mm dydžio marlės juostelėmis, sudrėkintomis 30 μl krano vandens, drėgmės palaikymui. Surinkti centruojantys įdėklai su sėklomis sustatomi į konteinerius, kurie uždengiami dangteliais su fluoroplasto tarpinėmis ir nukreipiamosiomis įvorėmis, ir užsandarinami parafilmo juostelėmis.

Pasibaigus eksperimentams, į konteinerius su daigais sušvirksčiama po 2 ml 4 % gliutaro aldehido tirpalo 0,1 M fosfatiniame buferyje (pH 7,2) ir išlaikoma toje pačioje gravitacinėje aplinkoje 45 min. pirminei fiksacijai. Po to daigai išimami ir pakartotinai fiksuojami tuo pačiu fiksatoriumi 12 val., esant $+4^{\circ} \text{C}$ temperatūrai.

2.2.2.1. Nuolatinis gravitropinis daigų dirginimas veikiant skirtingo dydžio gravitacine jėga

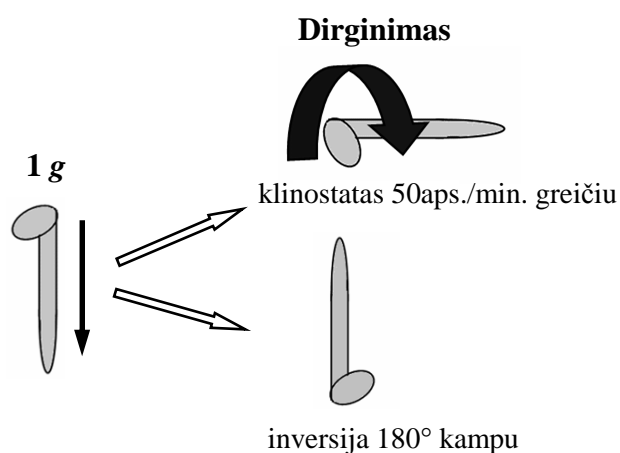
32 val. trukmės nuolatinis gravitropinis, sėjamosios pipirnės daigų dirginimas buvo atliekamas centrifugos-klinostato (8 pav.) pagalba. Žemės gravitacinės jėgos vienkrypčio poveikio neutralizavimui, t.y. mikrogravitacijos imitacijai, daigai augo sukami ant horizontaliųjų centrifugos-klinostato ašių 50 aps./min. greičiu (klinostatuojami), papildomai sukant apie vertikalią ašį (centrifuga) 3,63; 5,31; 7,72; 17,61; 23,72 ir 47,85 aps./min. greičiu. Priklausomai nuo centrifugavimo greičio, centrifugos-klinostato konteineriuose augančius daigus šaknies viršūnės kryptimi veikė vidutiniškai 0,004; 0,008; 0,02; 0,1; 0,5 ir 1 g dydžio išcentrinė jėga, kurios poveikis fiziologiškai atitinka gravitacinės jėgos poveikį (Merkys et al., 1981).

2.2.2.2. Trumpalaikis gravitropinis daigų dirginimas skirtingos krypties ir dydžio gravitacine jėga

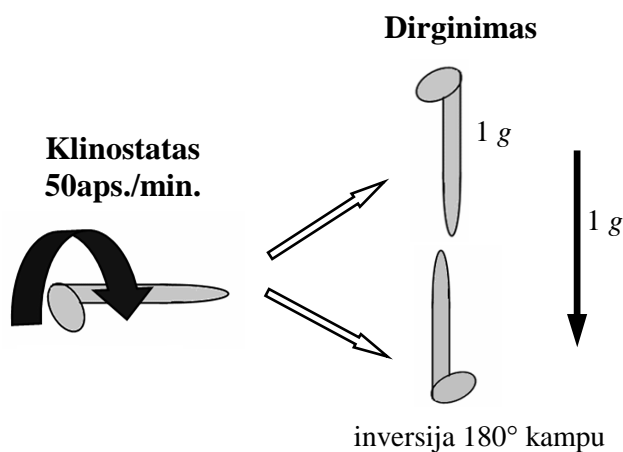
Gravitacinės jėgos pokyčiais sukeltų amiloplastų judesių kinetikos tyrimams sėjamosios pipirnės daigai buvo gravitropiškai dirginami periodu, trumpesniu už žinomą latentinį šaknų ar hipokotilių gravitropinės reakcijos laiką dviem būdais.

Daigų gravitropinis dirginimas išilgine kryptimi atliktas 24 minutėms keičiant 1 g dydžio gravitacinės jėgos veikimo kryptį 180° ir/ar keičiant jos dydį nuo 1 g iki imituotos mikrogravitacijos arba atvirkščiai tiksliai dozuojant gravitacinius stimulus. Daigų gravitropinio dirginimo procedūros buvo atliekamos pagal sekančias schemas:

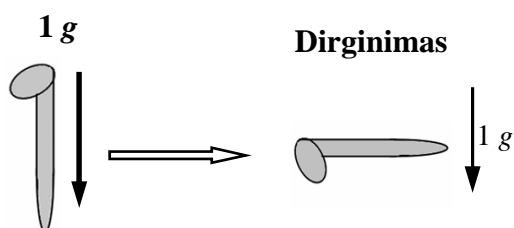
- 1) 32 valandas 1 g sąlygomis augę daigai 1–24 minutėms buvo perkelti į imituotą greitą klinostatavimą mikrogravitaciją arba apverčiami 180° (inversija);



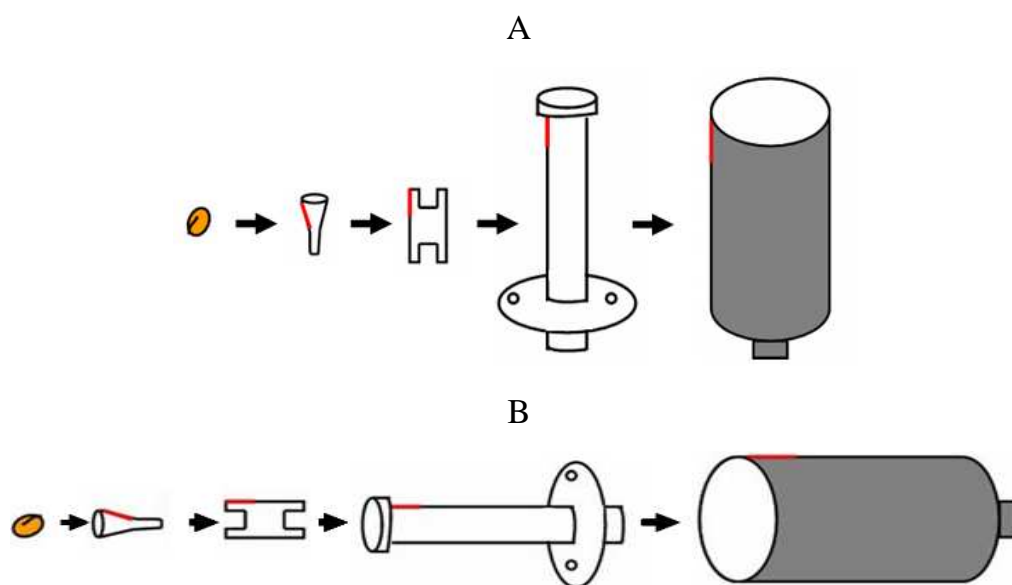
2) 32 valandas imituotos mikrogravitacijos sąlygomis augę daigai 1–24 minutes buvo veikiami 1 g jėga šaknies viršūnės ir šaknies pagrindo kryptimi.



Gravitropinis dirginimas lateraline kryptimi atliktas 30 valandų vertikalčiai normalios gravitacijos sąlygomis augusius sėjamosios pipirnės daigus paguldžius horizontaliai, t.y. 90° kampu 1, 2, 4 ir 6 min.



Siekiant pažymėti daigų orientaciją dirginimo, fiksacijos ir vėlesnių histologinių procedūrų metu, auginimui skirti įrankiai buvo pažymimi ir dedami vienas į kitą taip, kad žymė sutaptų (10 pav.). Sėklos į stiklinį piltuvėlį buvo sodinamos orientuotai viena kryptimi taip, kad išaugusio daigo hipokotilio linkis sutaptų su žyme ir būtų atskaitos tašku ruošiant histologinius preparatus statolitų judesių kinetikos analizei.



10 pav. Sėjamosios pipirnės sėklų orientacija ir laikiklių padėtis lateraliniam gravitropiniam dirginimui. A - daigui augant vertikalčiai, B - dirginimo metu. Raudona linija – žymės seka eksperimento metu

2.3. Nuolatinių histologinių preparatų paruošimas

Pasibaigus fiksacijai, daigai perplaunami 4 kartus po 15 min. 0,1 M fosfatinu buferiu (pH 7,2). Nupjautos 2 mm ilgio šaknų viršūnėlės ir 4 mm hipokotilių bazalinės atkarpos post-fiksuojamos po 1 val. 1 % OsO₄ ir 1 % tanino tirpaluose tos pačios sudėties buferyje. Po to medžiaga perplaunama 3 kartus po 15 min. buferiu ir nuvandeninama didėjančios koncentracijos (10, 30, 50, 70, 96 ir 100 %) etilo alkoholiu. Procedūros atliekamos +4° C temperatūroje. Naudojant absoliutaus etilo alkoholio ir acetono, bei acetono ir Epono dervos mišinius atkarpos impregnuojamos Epono derva (Epoxy

Embedding Medium, Epon Hardener MNA, Epon Hardener DDSA) (Luft, 1961). Impregnavimo procedūrų ir sąlygų schema:

100 % etilo alkoholis I, II	1 val;
100 % etilo alkoholio ir acetono mišiniai 3:1, 1:1 ir 1:3	45 min;
Acetono ir dervos mišiniai 3:1	1 val;
1:1	1 val;
1:3	12 val;
100 % Epono derva	24 val., +37° C;
	12 val., +47° C;
	24 val., +64° C.

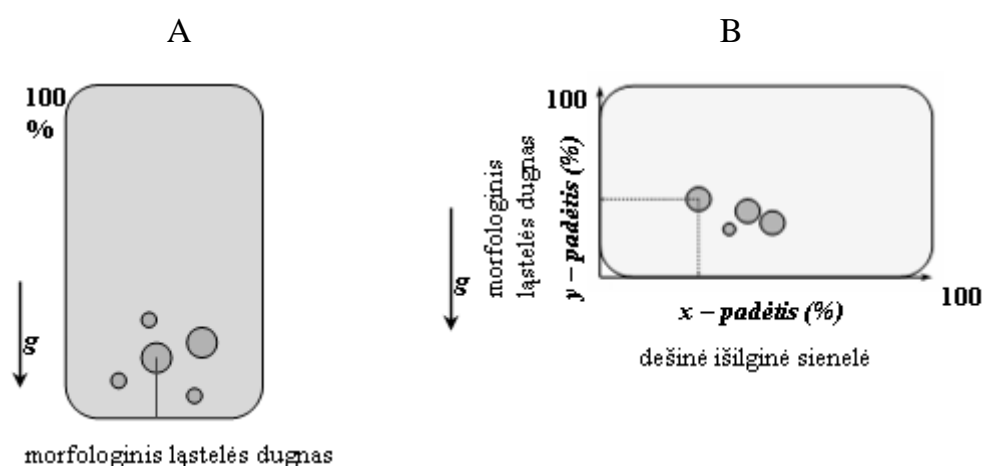
Impregnuotos derva sėjamosios pipirinės daigų atkarpos buvo pjaustomos išilgai stikliniais peiliais ultramikrotomu III8800LKB (Švedija) apie 1 µm storio pjūviais, griežtai išlaikant pjūvio plokštumos lygiagretumą išilginei organų ašiai. Analizuojant statolitų sedimentaciją lateralia kryptimi, pjūvio plokštuma atitiko gravitacinio dirginimo kryptį.

Atrinkti centriniai ir artimi jiems šaknų apeksų ir hipokotilių pjūviai buvo klijuojami ant objektyvinių stiklelių ir dažomi 1 % metileno melsvės vandeniniu, 1 % fuksino acetone ir 1 % toluidino 0,1 % Na₂B₄O₇ tirpalais (Jensen, 1962). Išdžiovinus pjūvius, paruošti pastovūs histologiniai preparatai šviesinei mikroskopijai, panaudojant Kanados balzamą pjūvių nuskaidrinimui ir dengiamųjų stiklelių montavimui.

2.4. Gravisensorinių audinių citomorfologinė analizė

Citomorfologinis šaknų ir hipokotilių gravisensorinių audinių tyrimas atliktas šviesinės mikroskopijos metodu, naudojant šviesinį mikroskopą SMP 03 (Opton, Vokietija), sukomplektuotą su skaitmeninėmis kameromis MOTIC (Japonija) bei PENTAX ist*D. Centrinę išilginių šaknų ir hipokotilių pjūviai buvo fotografuojami. Pjūvių skaitmeniniai vaizdai analizuoti vaizdų analizės programų SIGMA SCAN5 bei MOTIC pagalba. Vidutiniškai išanalizuota

kiekvieno bandyminio varianto trijų daigų šaknų ir hipokotilių po 2–3 centrinius pjūvius. Gravitacijos reikšmės sėjamosios pipirnės daigų ašinių organų gravisensorinio audinio formavimosi įvertinimui buvo išmatuoti atskirų šaknų šalmelio statenchimos funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių sluoksnių bei hipokotilių gravisensorinio audinio – endodermio funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių matmenys. Kiekybinis amiloplastų viduląstelinio išsidėstymo ir atsakomųjų judesių vertinimas atliktas išmatavus nuotolį(-ius) nuo kiekvienos plastidės centro iki atitinkamos statocito sienelės, priklausomai nuo daigų gravitropinio dirginimo pobūdžio. Amiloplastų judesių analizei naudotos santykinės šių, statolito padėtį ląstelėje apibūdinančių, parametrų reikšmės, t.y. išreikštos % nuo realių konkrečios ląstelės matmenų. Statolito lokalizacijos vertinimo schema daigų išilginio dirginimo atveju. Siekiant kiekybiškai įvertinti statolito judėjimo pobūdį išilgai šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse esant skirtingiems gravitacijos pokyčiams, išmatuotas atstumas tarp kiekvieno statolito centro ir ląstelės morfologinio dugno (šaknyse – distalinė sienelė, hipokotiliuose – bazalinė sienelė) ir išreikštas % nuo konkrečios ląstelės ilgio (11A pav.).



11 pav. Statolito padėties gravisensorinėse ląstelėse nustatymas gravitropiškai dirginant daigus išilgine (A) ir lateraline kryptimi (B). 100 % – santykinis ląstelės ilgis (plotis)

Statolity lokalizacijos vertinimo schema daigų lateralinio dirginimo atveju. Gravitacinės jėgos sukeltos statolity sedimentacijos skersine ląstelės kryptimi, t.y., po daigų pavertimo 90° kampu, analizei kiekviena ląstelė laikoma dviejų koordinačių sistema (abscisė – dešinė arba apatinė išilginė sienelė; ordinatė – šaknies arba hipokotilio statocito ląstelės morfologinis dugnas (11B pav.). Todėl kiekvieno statolito padėtis ląstelėje buvo įvertinama dviejų koordinačių reikšmėmis. x-padėtis apibūdina kiekvieno statolito centro nuotolį nuo morfologinio ląstelės dugno, y-padėtis – nuo dešinės išilginės sienelės vertikaliai orientuotuose daiguose arba nuo apatinės ląstelės sienelės horizontaliai paverstuose daiguose. Analizuojant statolity judėjimą, šios reikšmės buvo išreikštos procentais nuo bendro atitinkamos ląstelės sienelės ilgio.

2.5. Duomenų statistinė analizė

Matematiškai duomenys apdoroti standartine statistinės analizės programa MS EXEL7.

Vidutinė kvadratinė matuojamo dydžio paklaida skaičiuojama pagal (1) formulę:

$$\Delta a = \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2 + \left(\frac{\Delta z}{z}\right)^2}, \quad (1)$$

x, y ir z yra matuojamo dydžio parametrai, Δx, Δy ir Δz parametų vidutinės paklaidos.

Imties vidurkis apskaičiuojamas pagal (2) formulę:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2)$$

n – pakartojimų skaičius, x_i – i-tojo pakartojimo rezultatai, i – pakartojimo numeris.

Imties vidutinis kvadratinis nuokrypis (δ) buvo apskaičiuotas pagal (3) formulę:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (3)$$

$\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2$ – kvadratinės sumos nuokrypis nuo aritmetinio vidurkio, n – pakartojimų skaičius (Владимирский, 1983).

Skirtumo patikimumą tarp aritmetinių vidurkių ir jo reikšmingumo lygį nustatėme pagal faktinį Stjudento kriterijų (t_f) po išankstinio duomenų pasiskirstymo patikrinimo:

$$t_f = \left| \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)\delta_1^2 + (n_2 - 1)\delta_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \right|, \quad (4)$$

kur \bar{x} , δ ir n – dviejų aibių lyginamųjų parametrų statistiniai rodikliai.

Paveiksluose pateikta analizuotų rodiklių aritmetinis vidurkis \pm vid.st.paklaida
Vidurkio standartinė paklaida skaičiuojama pagal formulę:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

S – standartinis nuokrypis, n – analizuojamų rodiklių skaičius

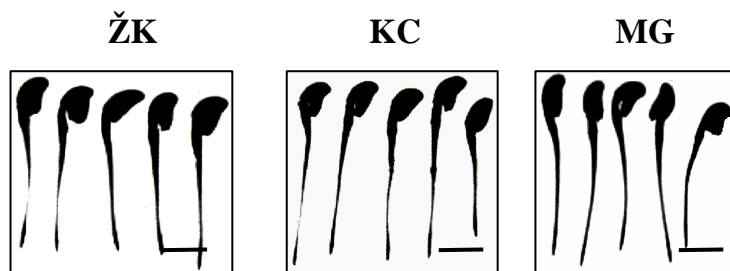
3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Gravitacinės jėgos dydžio įtaka gravisensorinių ląstelių formavimuisi sėjamosios pipirnės daigų ašiniuose organuose

Gravitacinės jėgos pokyčių jutimo procesų detalizavimui teigiamai ir neigiamai gravitropiškuose organuose pirmiausia buvo įvertinta, kaip šaknų ir hipokotilių gravisensorinių ląstelių formavimasis ir struktūrinė poliarizacija, neatsiejama nuo jų tapimo funkcionuojančiais statocitais, priklauso nuo gravitacinės jėgos, veikiančios daigus įprastine šaknies viršūnės kryptimi dydžio. Tuo tikslu kosminio skrydžio (biopalydovas „Bion-10“) sąlygomis daigai buvo išauginti pastoviai veikiant realiai mikrogravitacijai ir išcentrinei 1 g dydžio jėgai. Žemėje skirtingo svarumo sąlygos (imituota mikrogravitacija ir 1 g) daigams buvo modeliuojamos centrifugos-klinostato pagalba.

3.1.1. Realios mikrogravitacijos poveikis daigų gravisensorinių ląstelių formavimuisi

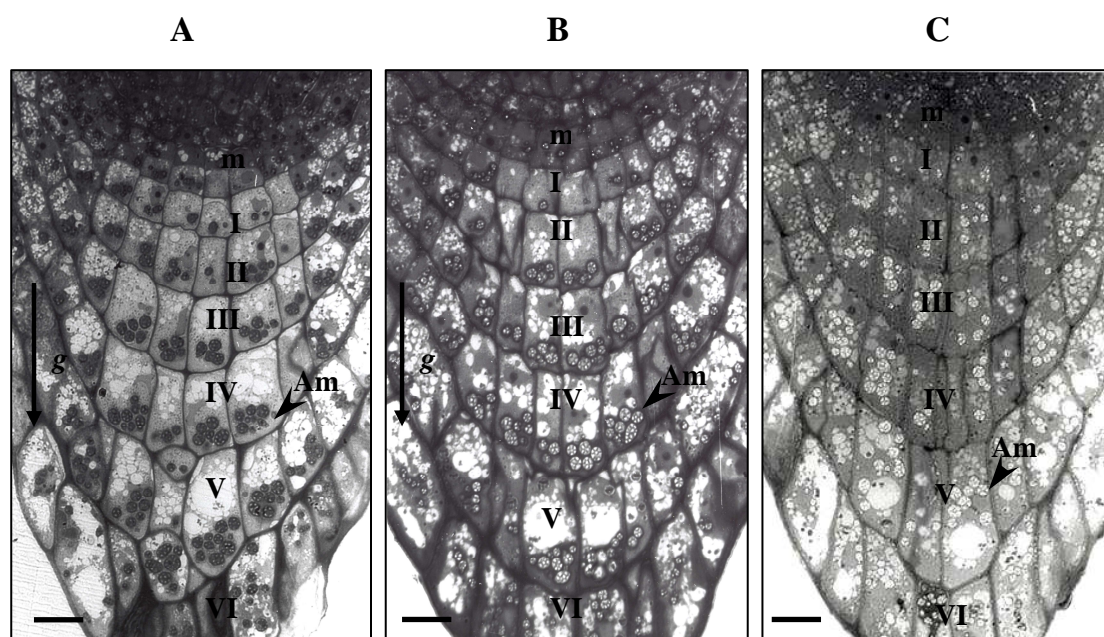
Realios mikrogravitacijos (MG) poveikis šaknų ir hipokotilių gravisensorinių ląstelių formavimuisi įvertintas lyginant sėjamosios pipirnės daigų, augusių kosminėje centrifugoje ir 1g sąlygomis Žemėje (12 pav.), šaknų šalmelio statenchimos ir hipokotilių endodermio citomorfologinius rodiklius.



12 pav. Sėjamosios pipirnės daigai, išaugę 1 g sąlygomis Žemėje (ŽK) ir kosminėje centrifugoje (KC), bei realios mikrogravitacijos sąlygomis (MG). Mastelis – 4 mm

Tirtų daigų, išaugusių realios mikrogravitacijos sąlygomis šaknų ilgis vidutiniškai siekė $11,3 \pm 0,2$ mm, kosminėje centrifugoje – $11,8 \pm 0,6$ mm, 1 g sąlygomis Žemėje – $11,6 \pm 0,3$ mm. Tų pačių daigų hipokotilių ilgis mikrogravitacijos sąlygomis siekė $4,8 \pm 0,1$ mm, kosminėje centrifugoje – $5,2 \pm 0,2$ mm, 1 g sąlygomis Žemėje – $4,9 \pm 0,2$ mm.

Šaknų šalmelis. Šių daigų šaknų šalmelio centrinės dalies – statenchimos mikrofotografijos pateiktos 13 pav. Visų variantų statenchimą sudaro aštuoni ląstelių sluoksniai, iš kurių 2 viršutiniai sluoksniai yra meristemines ląstelės, o šeši apatiniai sluoksniai yra funkcionuojančios gravisensorinės ląstelės, kuriose matomi mobilūs amiloplastai. 1 g sąlygomis kosmose ir Žemėje jie susigrupavę arti distalinės ląstelių sienelės, t.y. morfologinio jų „dugno“, o mikrogravitacijoje – vidurinėje ląstelių srityje.

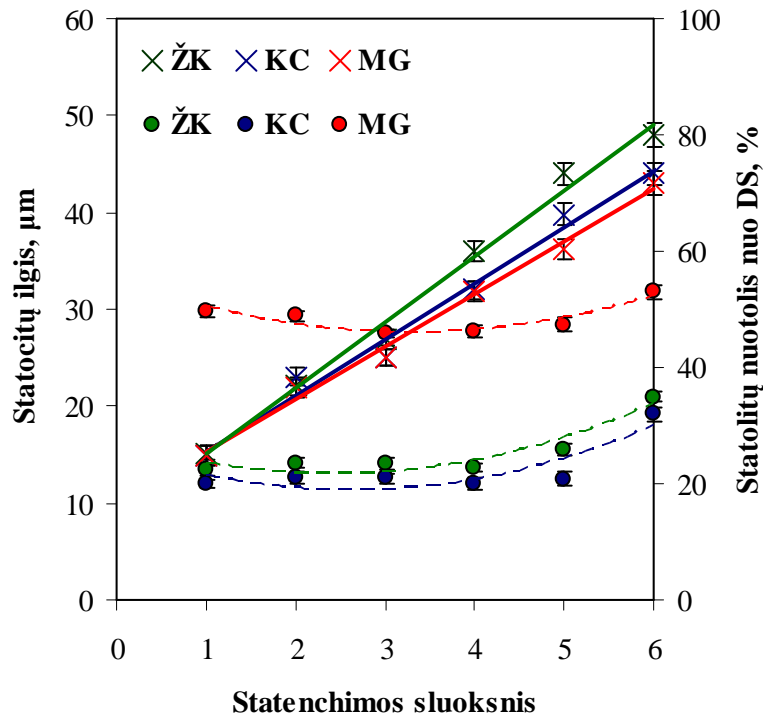


13 pav. Sėjamosios pipirinės šaknų, išaugusių 1 g sąlygomis Žemėje (A) ir kosminėje centrifugoje (B) bei realios mikrogravitacijos sąlygomis (C), šalmelių fragmentai. Rodyklės nurodo gravitacinės jėgos veikimo kryptį. m - meristeminių ląstelių sluoksniai. I, II, III, IV, V, VI – statenchimos funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių sluoksniai. Mastelis – 15 μ m

Atlikus citomorfologinę šalmelių analizę nustatyta, kad vidutinis 6 apatinių statenchimos sluoksnių funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių plotis mikrogravitacijos ir 1 g sąlygomis Žemėje buvo panašus ($15,2 \pm 0,3$ μ m

ir $14,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$, atitinkamai), nors kiek mažesnis, nei esant $1 g$ kosminėje centrifugoje ($16,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$). Kadangi šis skirtumas nėra statistiškai patikimas, galima teigti, jog realios mikrogravitacijos poveikis šaknų statocitų radialiniam augimui nebuvo esminis. Statocitų ilgio priklausomybės nuo augimo sąlygų duomenys pateikti 14 pav. Matyti, kad Žemės kontrolinio ir abiejų kosminių variantų statocitų ilgis tiesiogiai priklauso nuo jų padėties statenchimoje, nes duomenys patenkinamai aproksimuojami linijine funkcija (koreliacijos koeficientas 0,89; 0,93 ir 0,95 atitinkamai). Kita vertus, Žemės varianto šaknų statenchimos 4–6 sluoksnio funkcionuojančios gravisensorinės ląstelės statistiškai patikimai ilgesnės už abiejų kosminių variantų šaknų analogiškas ląsteles. Pažymėtina, kad nėra esminio skirtumo tarp statocitų ilgio kosminėje $1 g$ centrifugoje ir realios mikrogravitacijos sąlygomis augusių šaknų statenchimoje. Todėl galima teigti, kad realios mikrogravitacijos poveikis linijiniam statocitų augimui nebuvo reikšmingas, o abiem atvejais pasireiškė neigiama kitų kosminio skrydžio veiksnių įtaka.

Gravisensorinių ląstelių struktūrinė poliarizacija yra esminis jų tapsmo funkcionuojančiais statocitais požymis. Gravitacijos jutimui svarbių plastidžių – amiloplastų kiekis, būklė ir pasiskirstymas išilgai gravisensorinių ląstelių glaudžiai susijęs su šiuo procesu, tuo pačiu atspindi ir pilnaverčio gravisensorinio aparato susiformavimą. Lyginant vidutinį nuotolį nuo amiloplastų iki distalinių ląstelių sienelių dėl skirtingų ląstelių ilgių skirtinguose statenchimos sluoksniuose negalima tiksliai įvertinti ir palyginti amiloplastų išsidėstymo. Sprendžiant šią problemą, eliminuojamas vienas kintamasis, t.y. realusis ląstelės ilgis, ir pereinama prie santykinio amiloplastų nuotolio nuo morfologinio ląstelės dugno, t.y. distalinės ląstelės sienelės, kuri sudaro realaus jo nuotolio ir ląstelės ilgio santykis, išreikštas procentais. Taip išreikštas amiloplastų išsidėstymo išilgai funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių apatiniuose 6 statenchimos sluoksniuose grafinis vaizdas esant skirtingo svarumo sąlygoms pateiktas 14 pav.

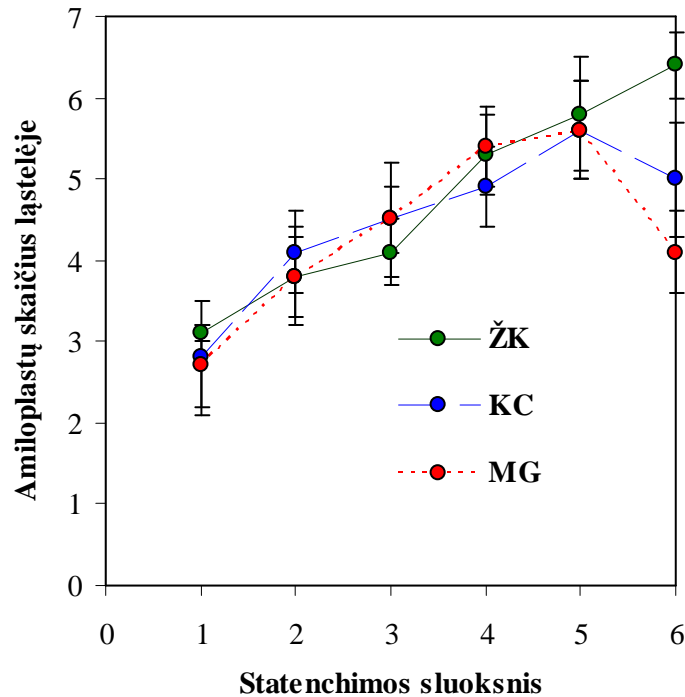


14 pav. Realios mikrogravitacijos poveikis šaknų statocitų ilgiui (×) ir statolitų nuotoliui (o) nuo distalinės statocitų sienelės (DS) sėjamosios pipirinės šaknyse, kurios augo Žemėje (ŽK), kosminėje 1 g centrifugoje (KC) ir realios mikrogravitacijos sąlygomis (MG)

Matyti, kad 1 g sąlygomis Žemėje ir kosmose amiloplastai užima juostą, kurios apatinis kraštas nutolęs nuo distalinės ląstelių sienelės apie 20 %, o viršutinis – 36 % nuo vidutinio atitinkamos ląstelės ilgio visuose funkcionalių statocitų sluoksniuose, t.y. grupuojasi arti morfologinio ląstelių dugno. Realios mikrogravitacijos sąlygomis statolitų juosta siauresnė, jos viršutinis ir apatinis kraštas nutolęs nuo distalinių sienelių apie 48 % ir 56 %, atitinkamai. Taigi, išcentrinės 1 g dydžio jėga ir Žemės gravitacinė jėga lygiaverčiai paveikė viduląstelinę amiloplastų sedimentaciją link distalinės šaknų statocitų sienelės. Realios mikrogravitacijos sąlygomis, kai gravitacinė jėga nebeveikia, amiloplastai užima centrinę funkcionalių statocitų dalį.

Nustatyta, kad amiloplastų skaičius penkiuose iš šešių statenchimos funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių sluoksnių yra determinuotas, nesikeičia nei 1 g sąlygomis Žemėje ir kosmose, nei realios mikrogravitacijos

poveikyje. Statolitų skaičiaus priklausomybės nuo skirtingo svarumo sąlygų duomenys pateikti 15 pav.

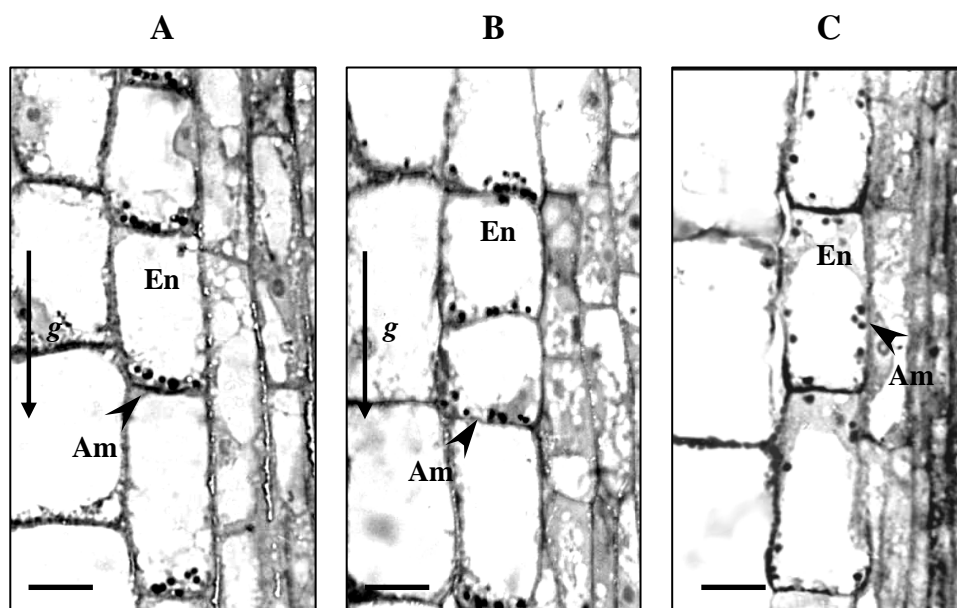


15 pav. Realios mikrogravitacijos poveikis amiloplastų skaičiui sėjamosios pipirnės šaknų statocituose, kurios augo Žemėje (ŽK), kosminėje 1 g centrifugoje (KC) ir realios mikrogravitacijos sąlygomis (MG)

Matyti, kad 1–5 sluoksniuose (skaičiuojant nuo meristeminių ląstelių), visais atvejais amiloplastų skaičius didėja nuo 3 iki 5. Skirtumas nustatytas tik šeštame funkcionuojančių ląstelių sluoksnyje, kuris yra apmirštantis. Žinoma, kad mikrogravitacija spartina natūralų statocitų senėjimo ir plastidžių destrukcijos procesus. Atsižvelgiant į tai galime teigti, kad statolitų skaičiui augimo sąlygos įtakos neturi.

Hipokotilių endodermis. Endodermio – gravisensorinio audinio morfologija buvo panaši tiek abiejų kosminių variantų, tiek ir Žemės sąlygomis augusių daigų hipokotiliuose. Centrinuose išilginiuose hipokotilių pjūviuose endodermį sudaro dvi ląstelių eilės, kurias vieną nuo kitos skiria centrinis velenas (16 pav). Endodermio ląstelėse matomi amiloplastai, kurių išsidėstymas, kaip ir šaknų statocituose, priklauso nuo gravitacinės jėgos

buvimo. Veikiant 1g dydžio jėgai Žemėje ir kosmose, jie buvo susigrupavę bazalinėje ląstelių dalyje, arti morfologinio ląstelių dugno. Tačiau realios mikrogravitacijos sąlygomis amiloplastai pasklidę po visą endodermio ląstelių periferiją. Detalesnį ląstelių struktūros tyrimą riboja šviesinės mikroskopijos skyros galimybės, bet pateiktose mikrofotografijose matomi kontūrai centrinių vakuolių, kurių buvimas, be abejo, turi reikšmės amiloplastų mobilumui.



16 pav. Vertikaliai Žemėje (A), kosminėje centrifugoje (B) ir mikrogravitacijos sąlygomis (C) išaugusių hipokotilių gravisensorinio audinio fragmentai. En - endodermio ląstelės, Am – amiloplastai. Vertikali rodyklė nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį, mažos rodyklės – ląstelėje esančius amiloplastus. Mastelis – 20 μm

Morfometrinei analizei hipokotiliai buvo padalinti į dvi dalis: viršutinę – apikalinę ir apatinę – bazalinę atkarpas. Analizuojant endodermio ląsteles konstatuota statistiškai reikšminga jų matmenų priklausomybė kaip nuo gravitacinių sąlygų, taip ir nuo jų priklausomybės apikalinei ar bazalinei hipokotilių atkarpoms (1 lentelė). Veikiant žemės gravitacijai bazalinės atkarpos endodermio ląstelės buvo ilgesnės daugiau nei 3,5 karto, platesnės apie 2 kartus už apikalines. Veikiant analogiško dydžio išcentrinei jėgai kosmose endodermio ląstelių parametrai mažesni: bazalinėje hipokotilių dalyje ląstelių ilgis didesnis tik 3 kartus, o plotis 1,5 karto už apikalines. Lyginant abu kosminius variantus nustatyta, kad gravisensorinės ląstelės

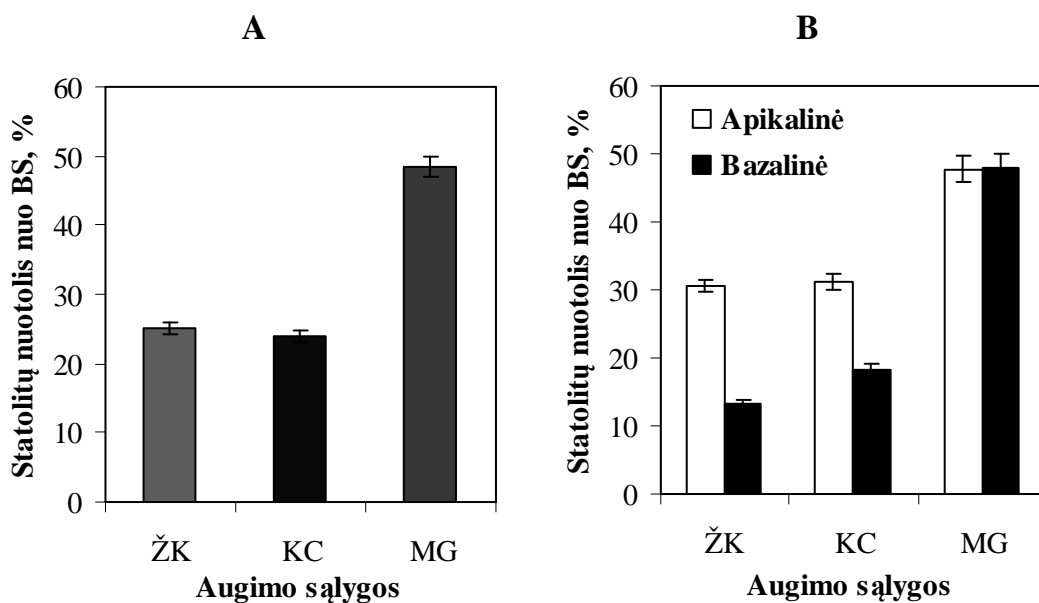
šiomis sąlygomis augo skirtingai, ypač į ilgį. Apikalinės hipokotilių dalies ląstelės mikrogravitacijos sąlygomis 1,5 karto ilgesnės nei kosminėje centrifugoje. Tuo tarpu bazalinės dalies ląstelių ilgis apie 2 kartus didesnis kosminėje centrifugoje, lyginant jas su mikrogravitacijos sąlygomis išaugusių hipokotilių atitinkamos dalies ląstelėmis (1 lentelė).

1 lentelė. Gravitacijos įtaka hipokotilių endodermio ląstelių formavimuisi

Augimo sąlygos	Hipokotilio atkarpa					
	apikalinė			bazalinė		
	Ląstelės			Ląstelės		
	N	ilgis, μm	plotis, μm	N	ilgis, μm	plotis, μm
Žemės kontrolė	110	24,3 ± 0,6	16,8 ± 0,4	47	86,4 ± 7,0*	34,3 ± 1,9*
Kosminė centrifuga	80	26,1 ± 0,8 [^]	19,4 ± 0,5 [^]	100	79,9 ± 1,7* [^]	28,3 ± 1,5*
Realioji mikrogravitacija	53	40,1 ± 3,3	22,7 ± 1,2	79	46,6 ± 3,4	27,9 ± 1,9

* - skirtumas tarp apikaliųjų ir bazaliųjų hipokotilio atkarpų statistiškai patikimas $p \leq 0,01$; [^] - skirtumas tarp kosminių variantų statistiškai patikimas $p \leq 0,01$; N- nagrinėtų ląstelių skaičius

Hipokotilių gravisensorinėms ląstelėms būdingų mobilių amiloplastų viduląstelinio pasiskirstymo tyrimas parodė statistiškai patikimą jų lokalizacijos skirtumą tarp mikrogravitacijos ir kontrolinių variantų Žemėje ir kosminėje centrifugoje (17A pav.). 1 g sąlygomis kosmose ir Žemėje išaugusių hipokotilių statocituose vidutinis amiloplastų nuotolis nuo bazalinės ląstelių sienelės lygus 24 % vidutinio ląstelės ilgio. Mikrogravitacijos (MG) sąlygomis vidutinio amiloplasto lokalizacija - ląstelės viduryje (48 % nuo vidutinio ląstelės ilgio) (17 pav.). Įvertinus statolitų padėtį atskirose hipokotilių atkarpose, išryškėja jų išsidėstymo skirtumas. Jei MG atveju tiek apikalinėje, tiek bazalinėje hipokotilių atkarpose amiloplastų padėtis yra vienoda, tai 1 g sąlygomis Žemėje ir kosmose bazalinėje atkarpoje jie išsidėstę žymiai arčiau morfologinio ląstelės dugno nei apikalinėje atkarpoje (17B pav).



17 pav. Statolity nuotolis nuo bazalinių gravisensorinių ląstelių sienelių (BS) išilgai viso endodermio eilės (A) bei apikalinėje ir bazalinėje hipokotilių dalyse atskirai (B), veikiant 1 g Žemėje (ŽK) bei kosminėje centrifugoje (KC) ir mikrogravitacijos sąlygomis (MG)

Literatūros duomenimis (Volkman et al., 1993) hipokotilio apikalinės dalies ląstelės, yra meristemines, o pilnai funkcionuojančios gravisensorinės ląstelės yra bazalinėje hipokotilių dalyje.

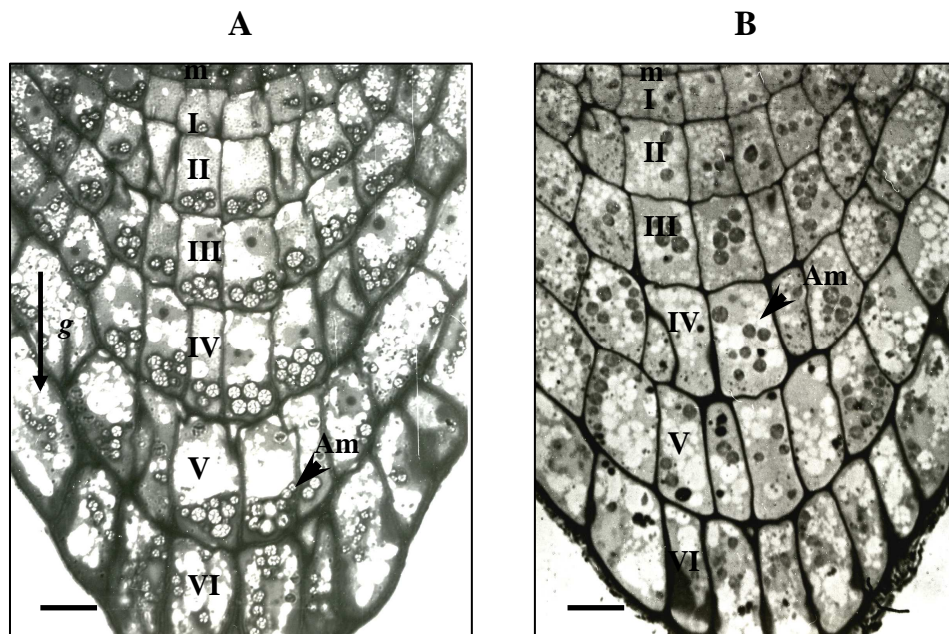
Nustatyta, kad statolity skaičius endodermio ląstelėse nepriklauso nuo gravitacinės aplinkos. Mikrogravitacijos ir 1 g sąlygomis Žemėje jis vienodas vidutiniškai $7,5 \pm 0,3$. Tik kosminėje centrifugoje statolity skaičius šiek tiek mažesnis $5,1 \pm 0,2$.

Apibendrinant pateiktus duomenis galima teigti, kad reali mikrogravitacija neturėjo esminės reikšmės šaknų ir hipokotilių statocitų formavimuisi. Augimo sąlygos neturėjo esminio poveikio šaknų radialiniam ir linijiniam augimui, tačiau mikrogravitacijos įtaka hipokotilių augimui buvo gana ženkli. Mikrogravitacija iš esmės pakeitė ir statolity erdvinį išsidėstymą abiejų ašinių organų funkcionuojančių statocitų citoplazmoje. Užuoat susitelkę šalia morfologinio ląstelių dugno, kaip 1 g variantuose, mikrogravitacijos sąlygomis statolitai susikaupia centrinėje šaknų ir hipokotilių statocitų dalyje.

3.1.2. Imituotos mikrogravitacijos poveikis sėjamosios pipirnės daigų gravisensorinio audinio formavimuisi

Horizontaliu klinostatu imituotos mikrogravitacijos (HK) poveikis daigų ašinių organų gravisensorinio audinio struktūrai, įvertintas lyginant 1 g šaknų statenchimos funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių ir hipokotilių endodermio ląstelių citomorfologinius rodiklius.

Šaknų šalmelis. Palyginus abiejų variantų šaknų šalmelių struktūrą matyti, kad neutralizavus vienkryptį gravitacinės jėgos poveikį šalmelis formuojasi normaliai. Kaip vertikaliai, taip ir horizontaliame klinostate išaugusių šaknų šalmelio centrinės dalies-statenchimos morfologija panaši (18 pav.).

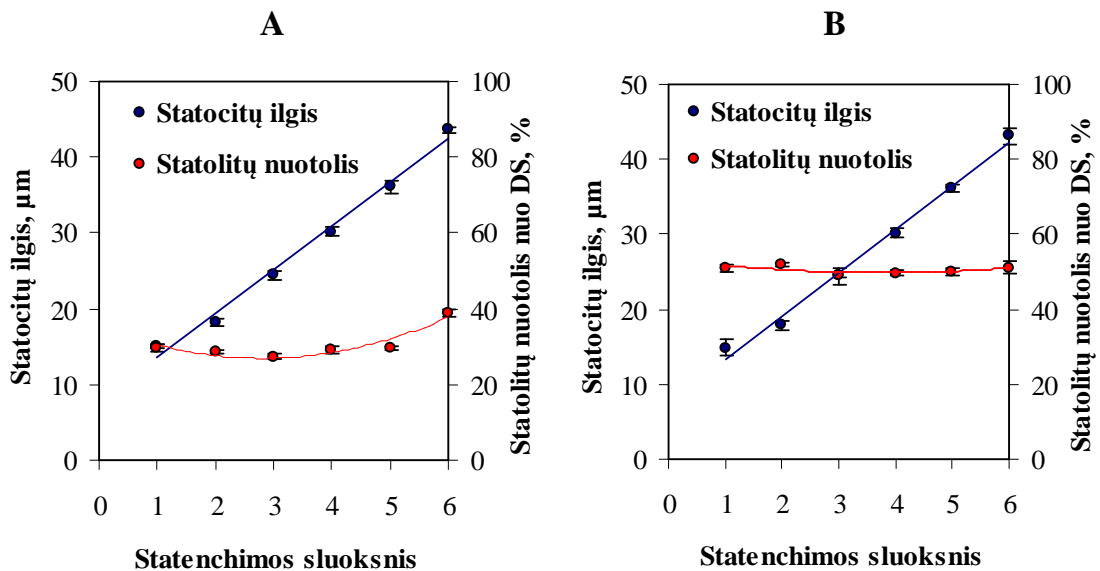


18 pav. Vertikaliai 1 g (A) ir imituotos mikrogravitacijos (B) sąlygomis išaugusių sėjamosios pipirnės šaknų šalmelių fragmentai. Rodyklė nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. m – meristemines ląstelės. I, II, III, IV, V, VI – statenchimos funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių sluoksniai. Mastelis – 15 μm

Abiem atvejais ją sudaro 8 ląstelių sluoksniai, iš kurių 2 viršutiniai yra meristemines ląstelės, o apatiniai 6 – funkcionuojančios gravisensorinės ląstelės. Funkcionuojančių statocitų citoplazmoje abiem atvejais randami stambūs amiloplastai bei kitos šviesiniu mikroskopu matomos organelės.

Citomorfoliginės funkcionuojančių statocitų analizės rezultatai pateikti 19 pav. Matyti, kad ląstelių ilgis buvo panašus 1 g ir klinostatavimo sąlygomis augusių daigų šaknų atskiruose statenchimos sluoksniuose ($p > 0,05$). Iš to galime spręsti, kad gravisensorinių ląstelių linijiniam augimui gravitacinio lauko įtaka nėra didelė, nes abiem atvejais (1 g ir HK) priklausomybė tarp ląstelės vidutinio ilgio ir ląstelės sluoksnio beveik tiesinė.

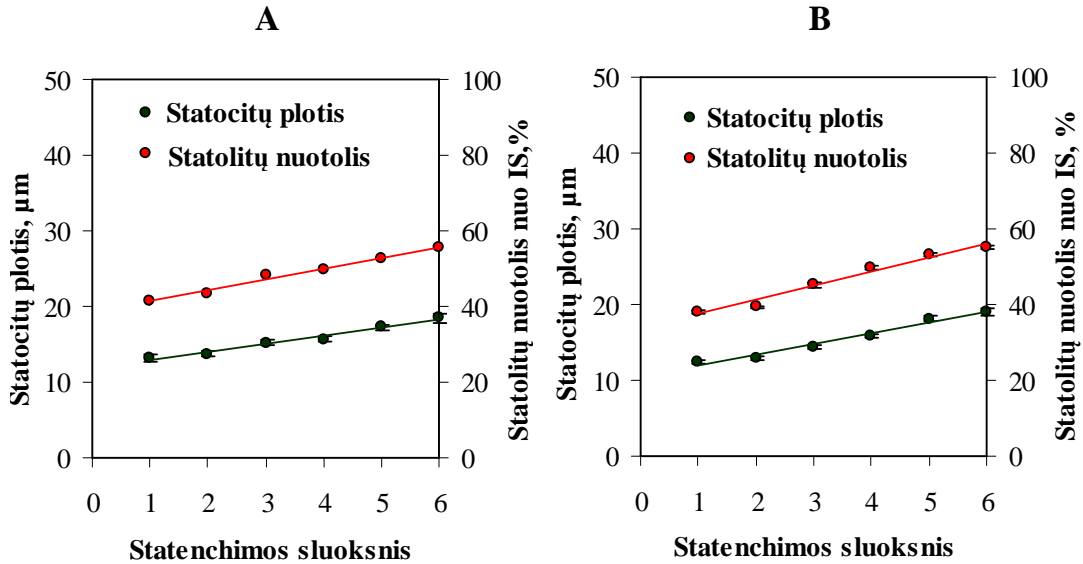
Vertinant vidutinį amiloplastų nuotolį nuo distalinių ląstelių sienelių matyti, kad horizontaliame klinostate augusių šaknų statocituose amiloplastai susitelkę ląstelės viduryje, o 1 g sąlygomis amiloplastai laikosi arti distalinės ląstelių sienelės (19 pav.).



19 pav. Statocitų ilgis • ir statolitų nuotolis • nuo distalinės ląstelių sienelės 1 g (A) ir HK (B) sąlygomis išaugusių šaknų statocituose. DS – distalinė ląstelės sienelė

Nustatyta, kad radialiniam šaknų funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių augimui imituotos mikrogravitacijos įtaka taip pat nėra didelė. Duomenys apie statocitų pločio priklausomybę nuo augimo sąlygų pateikti 20 pav. Matyti, kad 1 g ir HK sąlygomis statenchimos ląstelių plotis labai panašus. Abiem atvejais nustatyta tiesinė priklausomybė tarp vidutinio ląstelių pločio ir ląstelių sluoksnio. Akivaizdaus skirtumo nepastebėta ir vertinant šiose ląstelėse esančių statolitų nuotolį nuo dešinės išilginės ląstelės sienelės. Amiloplastų išsidėstymo skersai funkcionuojančių gravisensorinių ląstelių

visuose 6 statenchimos sluoksniuose grafinis vaizdas esant skirtingo svarumo sąlygoms pateiktas 20 pav. Nustatyta, kad 1 g ir HK sąlygomis amiloplastai užima juostą, kurios apatinis kraštas nutolęs nuo dešinės išilginės ląstelių sienelės apie 43 %, o viršutinis – 58 % nuo vidutinio atitinkamos ląstelės pločio visuose funkcionalių statocitų sluoksniuose.

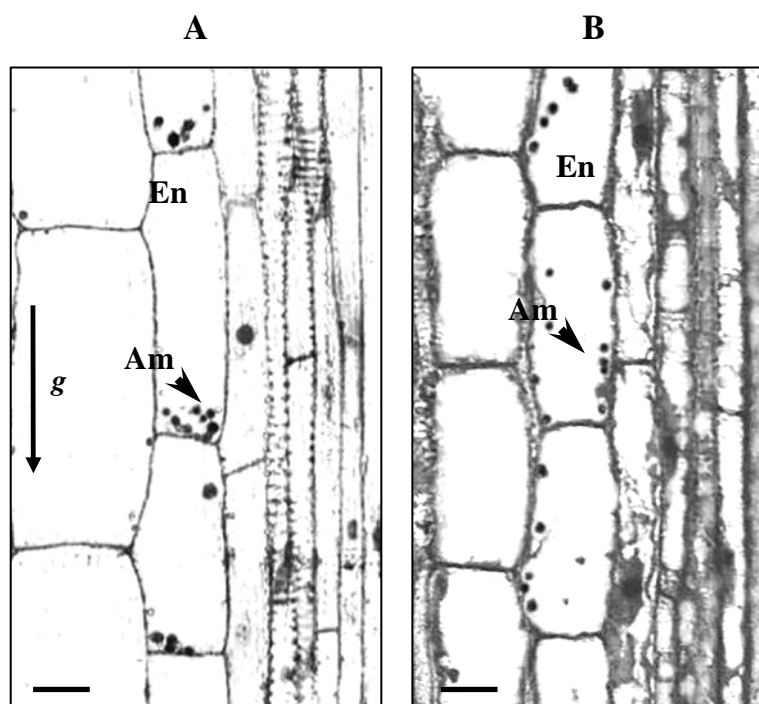


20 pav. Statocitų plotis • ir statolitų nuotolis • nuo išilginės ląstelių sienelės 1 g (A) ir HK (B) sąlygomis išaugusių šaknų statocituose. IS – dešinė išilginė ląstelės sienelė

Vertinant imituotos mikrogravitacijos įtaką amiloplastų skaičiui ląstelėje, nustatyta, kad skirtinga gravitacinė aplinka tam įtakos neturėjo. 1 g sąlygomis vidutinis visų nagrinėtų statenchimos sluoksnių ląstelėse esančių statolitų skaičius $4,7 \pm 0,6$, o HK atveju – $4,6 \pm 0,9$.

Atsižvelgiant į gautus rezultatus galima teigti, kad gravitacija neturi esminės reikšmės sėjamosios pipirinės šaknų gravisensorinių ląstelių augimui, bet įtakoja statolitų išsidėstymą. Kadangi lyginti galima tik panašiomis pradinėmis sąlygomis esančius objektus, gravisensorinių ląstelių funkcionavimo tyrimui buvo pasirinkti 3, 4 ir 5 sluoksnių statocitai, nes šiuose sluoksniuose geriausiai išlaikomas tiesiškumas tarp ląstelių morfometrinių matmenų ir amiloplastų išsidėstymo (19 ir 20 pav.). Be to, šių sluoksnių ląstelėse santykinis amiloplastų nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno beveik nekinta. Šių dviejų sąlygų užtenka lyginamajai analizei.

Hipokotilių endodermis. Esant skirtingai gravitacinei aplinkai hipokotilių anatomicinė sandara nesiskyrė. Centrinuose išilginiuose pjūviuose hipokotilio gravisensorinį audinį – endodermį sudaro 2 ląstelių eilės, tarp kurių yra centrinis velenas. Endodermio ląstelėse matomi stambūs amiloplastai, kurių išsidėstymas priklauso nuo gravitacinių sąlygų (21 pav.).

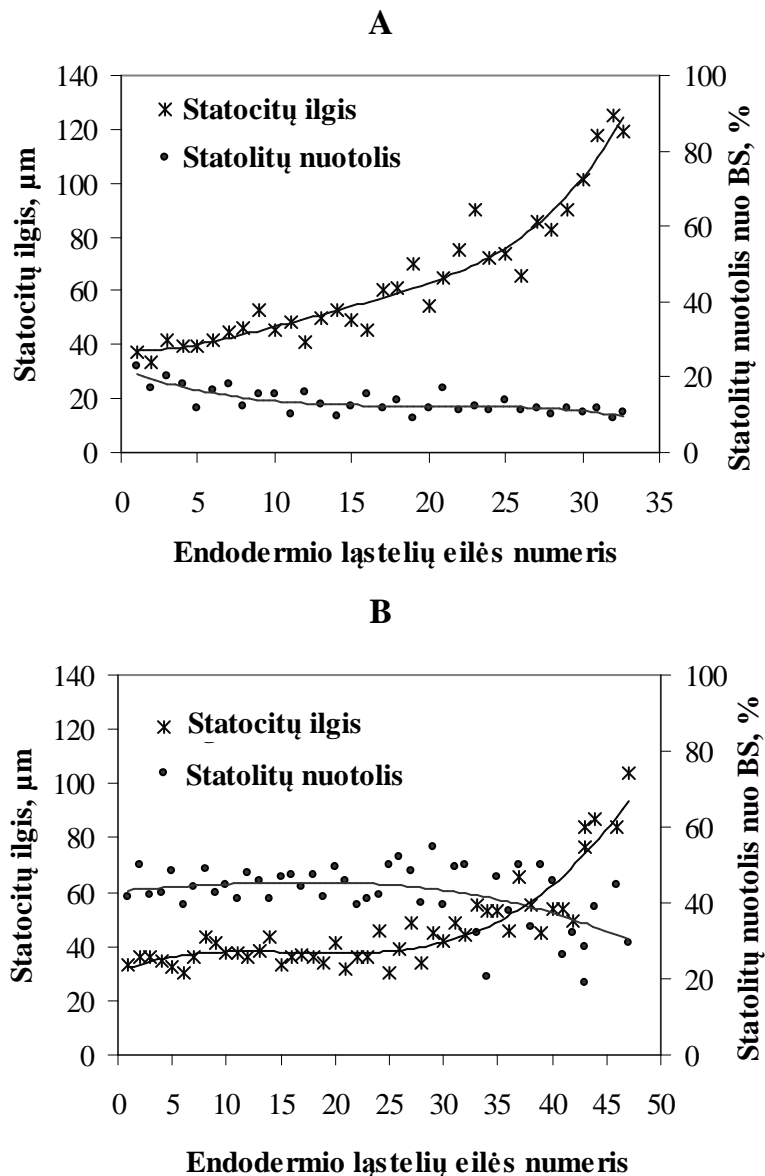


21 pav. Vertikaliai 1 g (A) ir horizontalaus klinostatavimo sąlygomis (B) išaugusių hipokotilių gravisensorinio audinio fragmentai. En - endodermio ląstelės, Am – amiloplastai. Vertikali rodyklė nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. Mastelis – 20 μm

Morfometrinė hipokotilių atkarpų analizė parodė, kad pjūvyje endodermio sluoksnį sudaro 33–35 ląstelės. Ląstelių ilgis išilgai pjūvio varijuoja nuo 38 μm iki 120 μm (221 A,B pav.), o plotis – nuo 21 μm iki 26 μm (23A,B pav.). Vidutinis hipokotilio atkarpoje esančių endodermio ląstelių ilgis ir plotis yra $57,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ir $24,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$.

Vertinant imituotos mikrogravitacijos poveikį hipokotilių statocitų augimui nustatyta, kad HK atveju ląstelės ilgesnį laiką išlieka meristemines, o 1 g sąlygomis greičiau pereina į tįsimo ir diferenciacijos fazes. Pastaruoju atveju

ląstelių linijinis augimas yra daug spartesnis nei imituotos mikrogravitacijos sąlygomis (22A,B pav.).



22 pav. Statocitų ilgis \times ir statolitų nuotolis nuo bazalinės ląstelės sienelės \bullet 1 g (A) ir HK (B) sąlygomis augusių hipokotilių statocituose. BS – bazalinė ląstelės sienelė

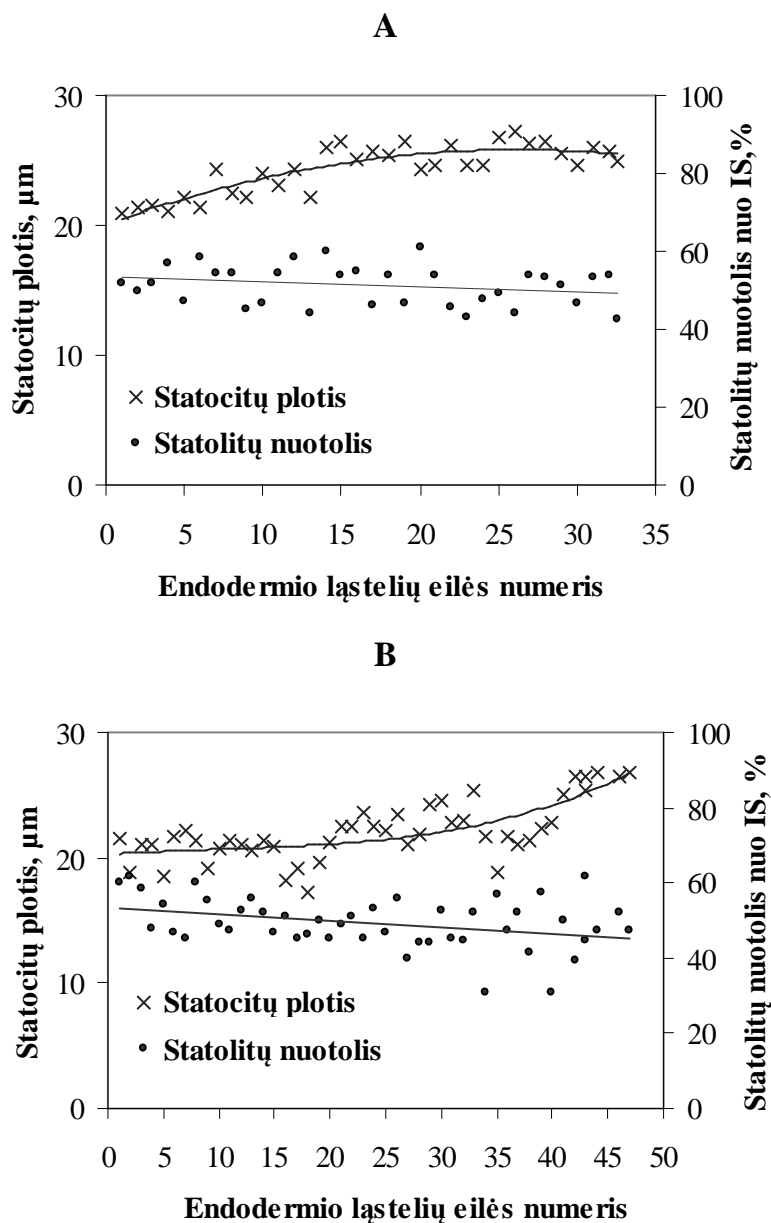
Kaip šaknų, taip ir hipokotilių gravisensoriniame audinyje, dėl skirtingų ląstelių ilgių, vertintas santykinis statolitų nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno, t.y. bazalinių hipokotilių ląstelių sienelių, išreikštas procentais. Duomenys apie statolitų viduląstelinės padėties priklausomybę nuo gravitacinės aplinkos pateikti 22 pav. Matyti, kad 1 g sąlygomis augusių hipokotilių statocituose statolitai susitelkę arti ląstelių morfologinio dugno.

Klinostatuotų hipokotilių statocituose dauguma statolitų grupuojasi centrinėje gravisensorinių ląstelių dalyje, arba išsibarstę ląstelių periferijoje.

Vertinant imituotos mikrogravitacijos poveikį hipokotilių gravisensorinių ląstelių radialiniam augimui matyti, kad čia kartojasi ta pati tendencija kaip ir linijinio augimo atveju. 1 g sąlygomis ląstelės sparčiai platėja, o imituotos mikrogravitacijos atveju jų augimas į plotį sulėtėjęs (23A,B pav.). Nustatyta, kad 1 g ir HK sąlygomis vidutinis statolitų nuotolis nuo dešinės išilginės sienelės ląstelių, esančių išilginėse endodermio eilėse buvo panašus ir sudarė apie 50 % vidutinio ląstelių pločio (23A,B pav.). Statolitų skaičius endodermio ląstelėse, abiem svarumo sąlygomis, buvo taip pat panašus (1 g hipokotiliuose – $5,9 \pm 0,4$, HK – $5,4 \pm 0,2$).

Aukščiau pateiktų duomenų apie hipokotilių endodermio formavimąsi visuma leidžia manyti, kad imituotos mikrogravitacijos sąlygos modifikavo šio audinio ląstelių augimą. Klinostate augusių daigų hipokotilių išilginėse endodermio eilėse (22B ir 23B pav.) buvo žymiai daugiau ląstelių, esančių dalijimosi ir tįsimo fazėse, nei kontrolinių 1 g daigų hipokotilių (22A ir 23A pav.). Daigams augant klinostate endodermio ląstelių matmenys buvo mažesni, jie didėjo lėčiau ląstelėms augant, ląstelės žymiai vėliau perėjo į tįsimo fazę. Šie faktai byloja, kad imituotos mikrogravitacijos poveikis buvo neigiamas ir linijiniam, ir radialiniam hipokotilių ląstelių augimui.

Atsižvelgiant į tai, kad ląstelių matmenys ir diferenciacijos į funkcionuojančius statocitus laipsnis priklauso nuo padėties išilginėse endodermio eilėse, amiloplastų išsidėstymas ir judesiai gravitropinio dirginimo metu buvo tiriami hipokotilių bazalinės dalies ląstelėse, kurių ilgis 2–4 kartus didesnis už plotį. Literatūros duomenimis, būtent tokio tipo endodermio ląstelės baltažiedžio vairo žiedstiebiuose jau laikytos funkcionuojančiais statocitais (Kumar, et al., 2008).



23 pav. Statocitų plotis × ir statolity nuotolis nuo dešinės išilginės ląstelių sienelės • 1 g (A) ir HK (B) sąlygomis augusių hipokotilių statocituose. IS- dešinė išilginė sienelė

Gravitacinės jėgos dydžio įtakos gravisensorinių ląstelių formavimuisi daigų ašiniuose organuose tyrimo rezultatų visuma neprieštaruja bendrai nuostatai, kad morfogenetinis gravitacinės jėgos poveikis augalų gravisensorinių audinių formavimuisi, jo struktūrai yra minimalus. Tačiau gravitacinės jėgos dydžio įtaka daigų ašinių organų gravisensorinių ląstelių

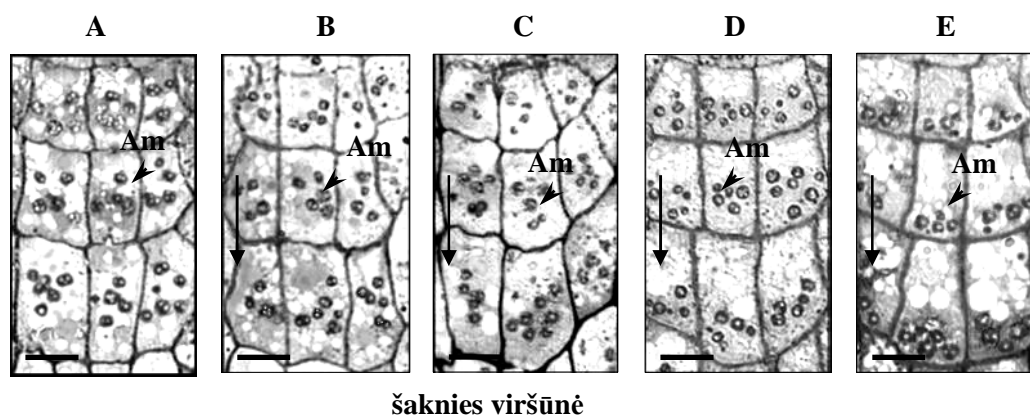
linijiniam ir radialiniam augimui yra skirtinga. Šaknų gravisensorinių ląstelių linijinis ir radialinis augimas mažai priklauso nuo gravitacinės jėgos buvimo. Nežymūs ląstelių matmenų skirtumai, gauti lyginant Žemės kontrolės ir kosminių variantų šaknų šalmelius, eksperimentiškai patvirtina nuostatą, kad kosminiuose bandymuose be nesvarumo veikia ir kiti skridimo faktoriai. Skysčių ir dujų apykaitos, temperatūrų skirtumas, perkrovos pakilimo ir nusileidimo metu, vibracija ir t.t. gali duoti neigiamą efektą ląstelių augimui ir diferenciacijai. Kita vertus, nustatyta, kad gravitacinės sąlygos ženkliai įtakoja hipokotilių ląstelių augimą. Atsižvelgiant į tyrimo rezultatus galime teigti, kad realios mikrogravitacijos sąlygomis ar panaikinus vienkryptį gravitacijos poveikį Žemės imitaciniuose eksperimentuose hipokotilių statocitų linijinis ir radialinis augimas yra slopinamas.

Statolitų išsidėstymo sėjamosios pipirinės šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse tyrimai parodė, kad sumažėjus gravitacinės jėgos dydžiui iki realios ar imituotos mikrogravitacijos, stebimas statistiškai patikimas jų padėties pasikeitimas abiejų ašinių organų gravisensorinių ląstelių morfologinio dugno atžvilgiu. Šaknų statocituose jie persigrupuoja į centrinę ląstelių dalį, o hipokotilių statocituose – pasklinda po visą ląstelių tūrį. Vertinant santykiniais vienetais vidutinis amiloplastų nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno yra apie 48 % vidutinio analizuotų ląstelių ilgio.

3.2. Nuolatinis skirtingo dydžio gravitacijos poveikis amiloplastų išsidėstymui išilgai sėjamosios pipirinės daigų statocitų

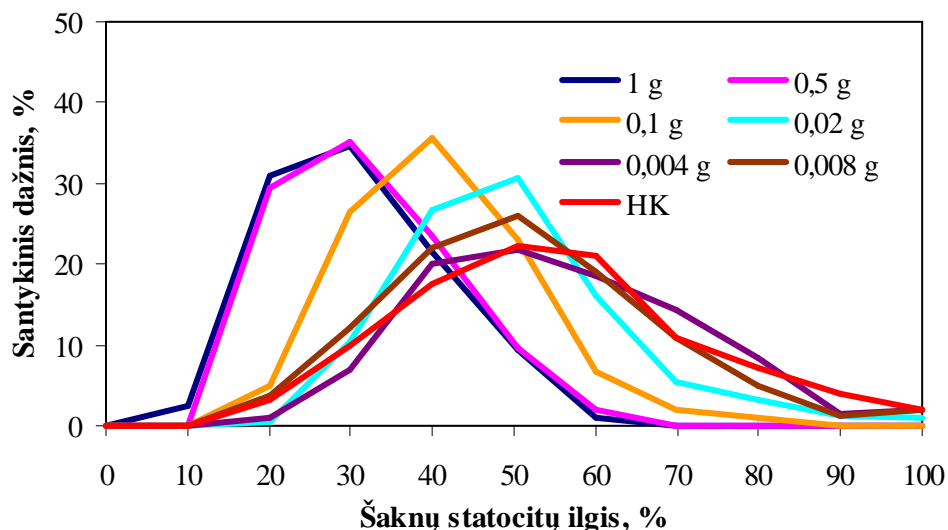
Amiloplastų statikos priklausomybė nuo išilgine kryptimi veikiančios gravitacinės jėgos dydžio tirta šaknų ir hipokotilių statocituose daigų, kurie užaugo Žemėje imituotos mikrogravitacijos sąlygomis arba veikiant 0,004; 0,008; 0,02; 0,1; 0,5 ir 1 g gravitacija (klinostatavimas + atitinkamo dydžio išcentrine jėga generuojamas masės pagreitis) šaknies viršūnės kryptimi. Pakeisto svarumo sąlygos buvo modeliuojamos centrifugos-klinostato pagalba (49 psl.).

Šaknų statocitai. Citomorfologinė šaknų šalmelių analizė atskleidė amiloplastų viduląstelinio išsidėstymo priklausomybę nuo masės pagreičio dydžio. (24 pav.) pateiktose mikrofotografijose statenchimos 2–4 sluoksnių ląstelėse matyti, kad statolitų viduląstelinis išsidėstymas imituotos mikrogravitacijos ir 0,004 g sąlygomis beveik nesiskyrė. Abiem atvejais plastidės susigrupavę centrinėje ląstelių dalyje (24A,B pav.). 0,02 g svarumo sąlygomis stebėtas amiloplastų poslinkis link distalinės sienelės (24C pav.), kuris vis ženkliau išreikštas 0,1 g ir 1 g sąlygomis (24D ir 24E pav.).



24 pav. Skirtingo svarumo sąlygomis augusių šaknų statenchimos fragmentų mikrofotografijos. (A) – imituota mikrogravitacija, (B) – 0,004 g, (C) – 0,02 g, (D) – 0,1 g ir (E) – 1 g masės pagreitis. Rodyklės nurodo masės pagreičio kryptį. Am – amiloplastai. Mastelis – 10µm

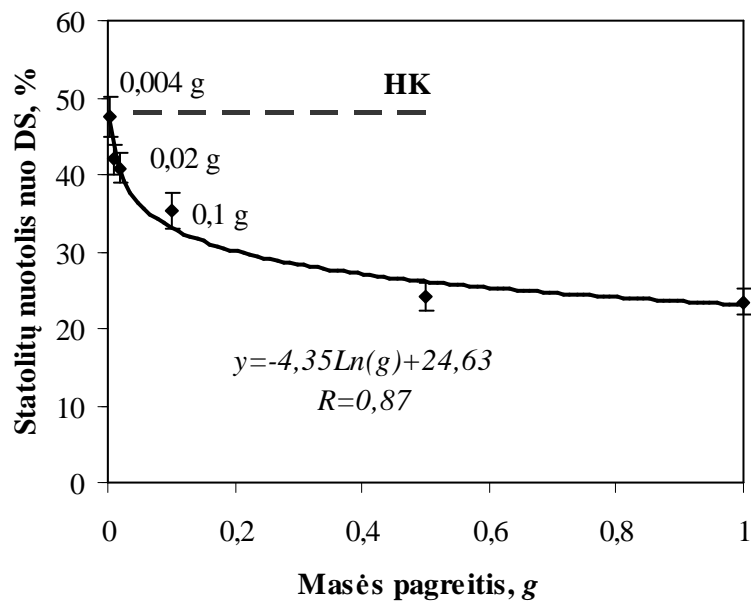
Kiekybinį amiloplastų pasiskirstymą išilgai sėjamosios pipirinės šaknų gravisensorinių ląstelių vaizduojantys dažnių daugiakampiai pateikti 25 paveiksle. Veikiant 1 g ir 0,5 g dydžio pagreičiui, statolitų išsidėstymas išilgai ląstelių nesiskyrė. Abiem atvejais didžioji jų dalis (apie 65 %) buvo susitelkę šalia distalinių ląstelių sienelių, t.y. užėmė juostą, kurios apatinis kraštas atitinka 15 %, viršutinis – 28 % vidutinio šaknies statocito ilgio. Ryškus amiloplastų komplekso poslinkis ląstelės centro kryptimi stebėtas veikiant 0,1 g dydžio masės pagreičiui. Šiuo atveju dauguma (apie 60 % amiloplastų) užėmė juostą, kurios apatinės ribos nuotolis nuo distalinės statocitų sienelės sudaro apie 28 %, o viršutinės – 40 % vidutinio ląstelės ilgio. 0,02 g dydžio svarumas sukėlė esminį daugumos statolitų persikėlimą ne tik į centrinę ląstelių sritį, bet ir tam tikros jų dalies – į proksimalinę.



25 pav. Statolitų kiekybinio pasiskirstymo išilgai šaknies gravisensorinių ląstelių priklausomybė nuo masės pagreičio dydžio

Esant 0,004 g svarumui statolitų išsidėstymas panašus į klinostatuojant augusių daigų šaknų statocitų amiloplastams būdingą išsidėstymą. Kaip imituotos mikrogravitacijos, taip ir 0,004 g sąlygomis dauguma amiloplastų grupavosi centrinėje gravisensorinių ląstelių dalyje. Taigi, statolitai nebuvo pasklidai išsibarstę ir imituotos mikrogravitacijos sąlygomis, ir skirtingo dydžio gravitacijos poveikyje, o sudarė kompleksą, kuriam visais atvejais būdingas unimodinis pasiskirstymas.

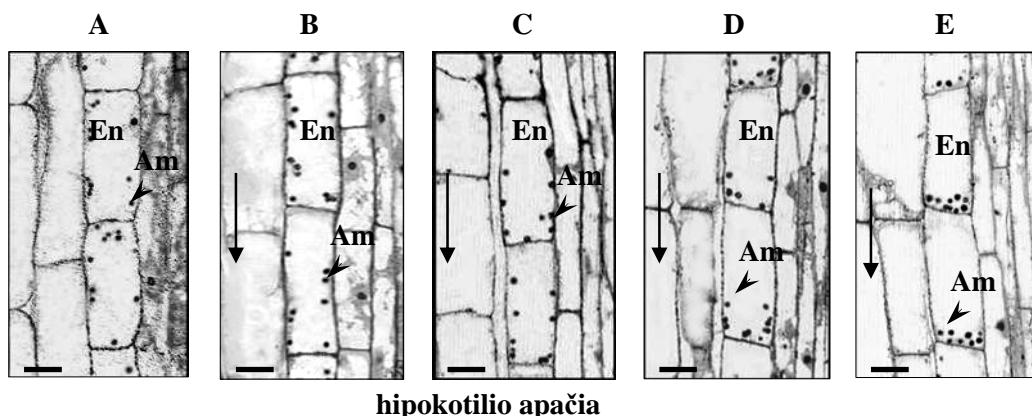
Atlikus duomenų regresinę analizę, nustatyta, kad priklausomybė tarp gravitacinės jėgos dydžio ir statolitų viduląstelinės padėties aritmetinio vidurkio aproksimuojama logaritmine funkcija (26 pav.), kur koreliacijos koeficientas $R = 0,99$. Esant įprastiniam 1 g ir 0,5 g svarumui, vidutinis amiloplastų nuotolis nuo distalinės šaknų statocitų sienelės, t.y. morfologinio ląstelių dugno, statistiškai nesiskiria.



26 pav. Statolity išsidėstymo šaknų gravisensorinėse ląstelėse priklausomybė nuo masės pagreičio dydžio. DS – distalinė ląstelės sienelė, HK - imituotos mikrogravitacijos sąlygos

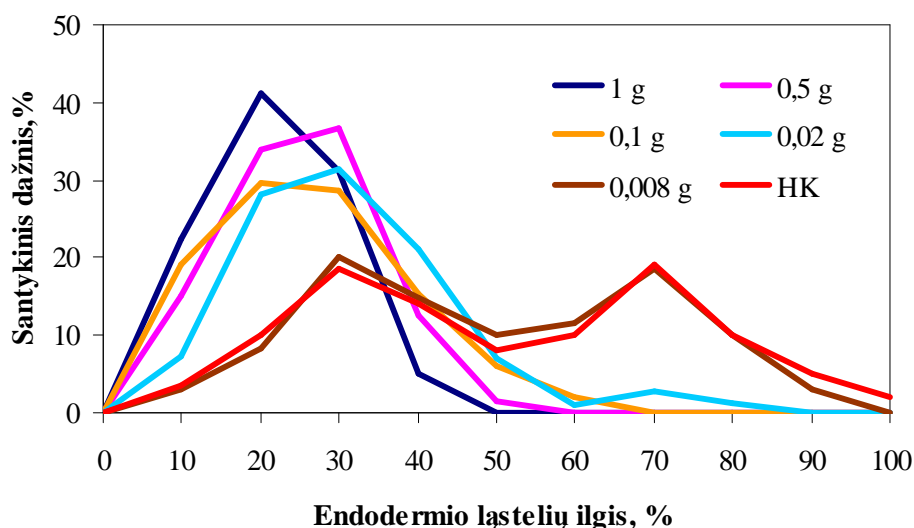
Esant 0,1 g dydžio svarumui stebėtas jau akivaizdus ~ 13 % ir statistiškai patikimas ($p \leq 0,01$) statolity pasislinkimas ląstelių centro link. 0,004 g ir HK sąlygomis amiloplastai vidutiniškai nutolę nuo morfologinio ląstelių dugno ~ 47,6 % vidutinio ląstelių ilgio.

Hipokotilių statocitai. Atlikus citomorfologinę hipokotilių endodermio analizę išaiškėjo, jog statolity išsidėstymas priklausė nuo masės pagreičio dydžio. Kaip matyti 27 pav. pateiktų mikrofotografijų, ku mažesnis masės pagreitis, tuo statolity išsibarstymas ląstelėje didesnis. Skirtingai nuo šaknų statocitų (24 pav.), endodermio ląstelėse statolitai nesudarė sambūrio ląstelių centrinėje srityje, o pasiskirstė po visą ląstelę. 0,004 g ir 0,008 g poveikis statolity persiskirstymui išilgai endodermio ląstelių beveik nesiskyrė nuo esamo imituotos mikrogravitacijos sąlygomis išaugusių hipokotilių statocituose (27 AB pav.)



27 pav. Daigų, augusių skirtingo svarumo sąlygomis, hipokotilių endodermio (En) fragmentų mikrofotografijos. (A) – imituota mikrogravitacija, (B) – 0,008 g, (C) – 0,02 g, (D) – 0,1 g ir (E) – 1 g masės pagreitis. Rodyklės nurodo masės pagreičio kryptį. Am – amiloplastai. Mastelis -10 μ m

Atlikus statolitų kiekybinio pasiskirstymo hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse analizę (28 pav.) nustatyta, kad 1 g sąlygomis statolitai buvo susitelkę arti bazalinės ląstelių sienelės: maždaug pusė jų (43 %) užėmė juostą, kurios apatinio krašto nuotolis sudarė apie 10 %, o viršutinis – 25 % vidutinio statocitų ilgio.

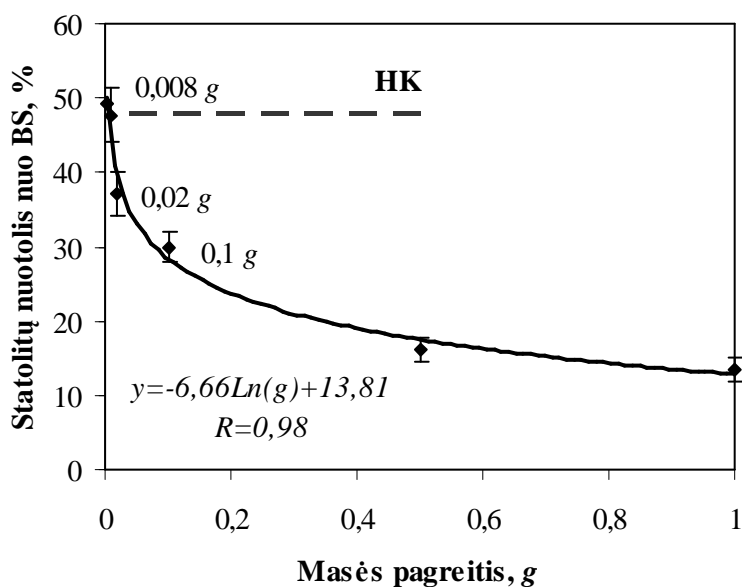


28 pav. Statolitų kiekybinio pasiskirstymo išilgai hipokotilių endodermio ląstelių priklausomybė nuo masės pagreičio dydžio

Veikiant 0,5 g masės pagreičiui matomas nežymus amiloplastų poslinkis ląstelių centro link, tačiau dauguma jų (apie 70 %) užėmė panašaus pločio juostą, kaip ir 1 g sąlygomis. Kuo pagreičio dydis mažesnis, tuo

didesnis statolitų išsibarstymas, tačiau didžioji jų dalis išliko pradinėje padėtyje, t.y. arti morfologinio ląstelių dugno. Akivaizdu, jog visais minėtais atvejais statolitai sudarė kompleksą, kuriam būdingas unimodinis pasiskirstymas. Veikiant mažesnio nei 0,1 g dydžio masės pagreičiui, situacija keitėsi. 0,008 g ir imituotos mikrogravitacijos (HK) sąlygomis amiloplastų išilginio pasiskirstymo kreivės panašios. Abiem minėtais atvejais statolitai tolygiai pasiskirstė bazalinėje ir distalinėje gravisensorinių ląstelių srityse, t.y. būdingas bimodinis pasiskirstymas: maždaug 20 % amiloplastų vidutinis nuotolis nuo bazalinės ląstelių sienelės buvo lygus 30 %, kitų 20 % plastidžių – 70 % vidutinio ląstelių ilgio.

Amiloplastų išsibarstymo hipokotilių endodermio ląstelėse, kai sėjamosios pipirinės daigai augo skirtingo svarumo sąlygomis regresinės analizės duomenys pateikti 29 pav. Nustatyta, kad priklausomybė tarp veikiančios jėgos dydžio ir statolitų viduląstelinės padėties aproksimuojama logaritmine funkcija, kur koreliacijos koeficientas $R = 0,98$.



29 pav. Statolitų išsidėstymo hipokotilių endodermio ląstelėse priklausomybė nuo masės pagreičio dydžio. BS – bazalinė ląstelės sienelė, HK – imituotos mikrogravitacijos sąlygos

1 g sąlygomis amiloplastai nuo morfologinio ląstelių dugno vidutiniškai nutolę 13,4 % vidutinio ląstelių ilgio. Veikiant 0,1 g dydžio pagreičiui, nustatytas

ženklus ir statistiškai patikimas statolitų vidutinio nuotolio poslinkis ląstelių centro link nuo buvusio 1 g sąlygomis ($p \leq 0,01$). Kuo mažesnio dydžio pagreitis veikė daigus, tuo didesnis vidutinis statolitų nuotolis nuo bazalinės endodermio ląstelių sienelės. Amiloplastų padėtis, būdinga imituotos mikrogravitacijos sąlygomis augusių daigų hipokotilių statocitams, nustatyta esant 0,008 g dydžio svarumui.

Apibendrinant išdėstytus tyrimo duomenis, galima teigti, jog nustatyta logaritminė priklausomybė tarp gravitacinės jėgos, veikiančios daigus šaknies viršūnės kryptimi, dydžio ir amiloplastų vidutinio nuotolio nuo morfologinio ląstelių dugno šaknų statenchimoje ir hipokotilių endodermyje.

0,02 g gravitacijos užteko, kad statistiškai patikimai pasikeistų amiloplastų padėtis jos veikimo kryptimi ir šaknų, ir hipokotilių statocituose. Pažymėtina, kad mažesnio už 0,02 g svarumo sąlygomis statolitų dažnuminio pasiskirstymo išilgai ląstelių daugiakampių forma šaknų statocituose išliko nepakitusi, bet hipokotilių statocituose keitėsi.

Amiloplastų kiekybinio pasiskirstymo išilgai ląstelių duomenys, veikiant skirtingo dydžio gravitacijai, leidžia teigti, kad šaknų statocituose statolitai sudaro kompleksą, nes jiems būdingas unimodinis pasiskirstymas. Hipokotilių endodermio ląstelėse amiloplastų unimodinis pasiskirstymas mažesnio už 0,02 g svarumo sąlygomis keičiasi į bimodinį. Nors amiloplastų pasiskirstymo išilgai minėtų ląstelių dėsningumas pasikeitus svarumui ir keičiasi, bet nėra atsitiktinis, todėl galima manyti, jog jie taip pat išlieka tarpusavyje susiję, t.y. sudaro kompleksus.

3.3. Trumpalaikis gravitacinės jėgos poveikis amiloplastų judesiams išilgai sėjamosios pipirinės daigų gravisensorinių ląstelių

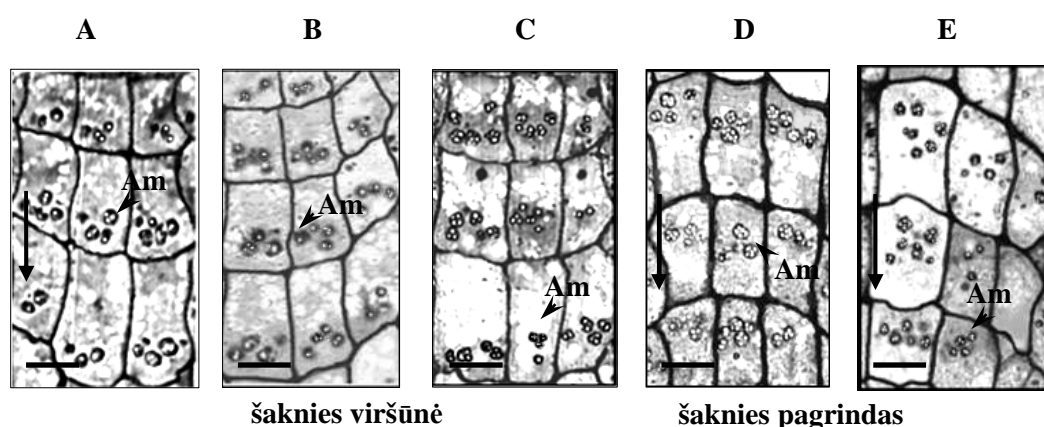
Amiloplastų judėjimo išilgai sėjamosios pipirinės daigų statocitų tyrimui taikyti du gravitacinio dirginimo metodai. Pirmuoju atveju natūralioje gravitacinėje (1 g) aplinkoje augę daigai buvo dirginami skirtingo dydžio

(imituota mikrogravitacija ir 1 g) gravitacine jėga. Antruoju atveju daigai, augę imituotos mikrogravitacijos sąlygomis, buvo dirginami keičiant gravitacinės jėgos (1 g) veikimo kryptį 180° kampu.

3.3.1. Imituotos mikrogravitacijos ir inversijos poveikis statolitų kinetikai išilgai 1 g daigų gravisensorinių ląstelių

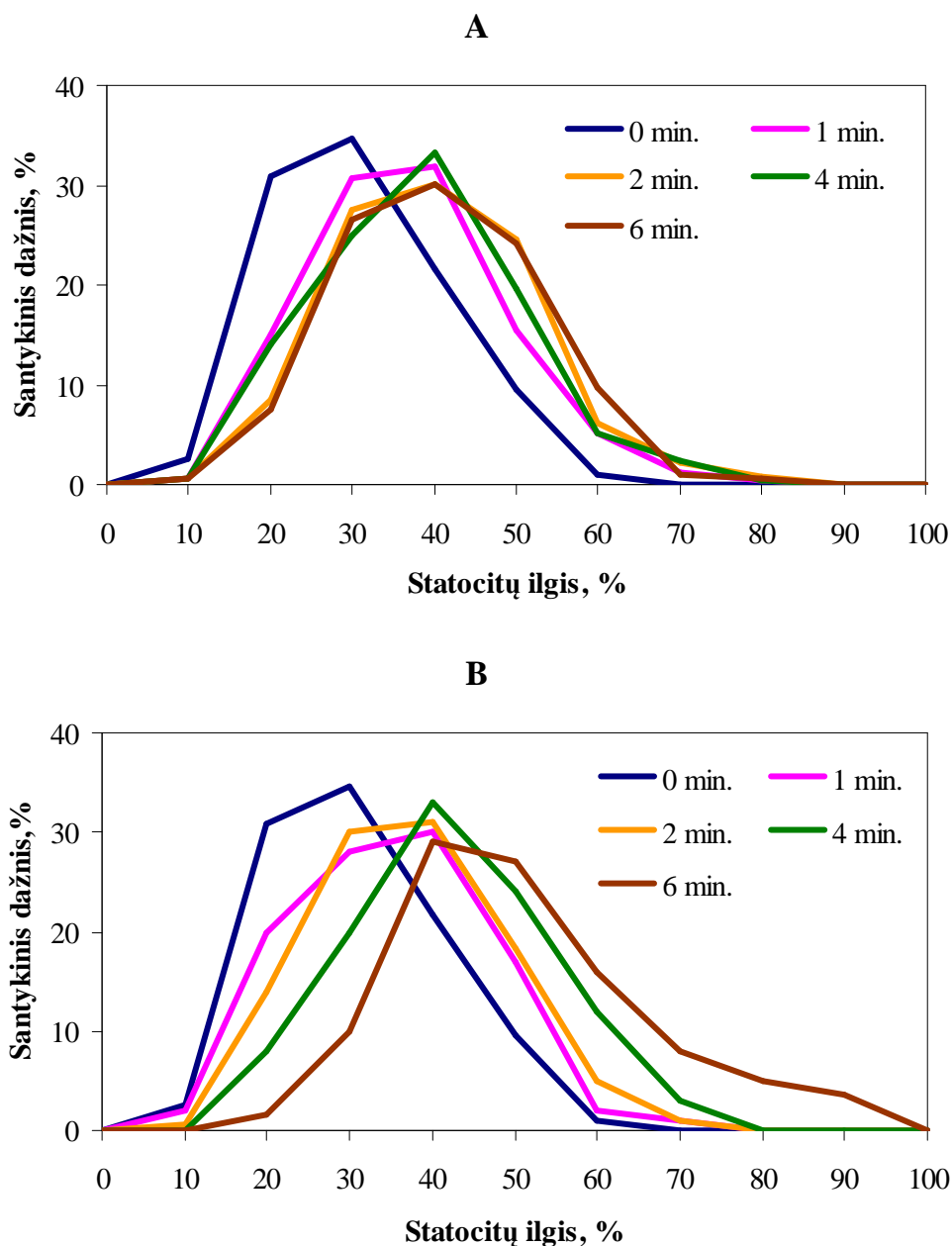
Gravitacinės jėgos poveikis amiloplastų judesių kinetikai, kai šie susitelkę šalia morfologinio gravisensorinių ląstelių dugno, buvo tirtas 1 g daigus greitai (per 5 s) perkėlus į imituotą mikrogravitaciją (HK) arba apvertus 180° kampu (INV). Statolitų išsidėstymo išilgai šaknų statenchimos ir hipokotilių endodermio ląstelių vertinti po 1, 2, 4, 6, 12 ir 24 atitinkamo dirginimo minučių.

Šaknų statocitai. Kaip matyti iš pateiktų šaknų statocitų mikrofotografijų, amiloplastai iki gravitacinės jėgos pokyčių buvo susitelkę distalinėje ląstelių srityje (30A pav.). Sumažinus gravitacinės jėgos dydį nuo 1 g iki imituotos mikrogravitacijos arba po inversijos, kai daigus veikė 1 g dydžio jėga priešinga nei įprasta kryptimi, jau po 2 min. stebimas akivaizdus statolitų poslinkis ląstelės centro link (30B ir 30D pav., atitinkamai). Po šešių minučių abiem gravitacinio dirginimo atvejais amiloplastai buvo susitelkę ląstelių centrinėje srityje (30C ir 30E pav.).



30 pav. Šaknų statenchimos fragmentų mikrofotografijos 1 g sąlygomis (A) po perkėlimo į imituotą mikrogravitaciją 2 min. (B) ir 6 min. (C), arba po 2 min. (D) ir 6 min. (E) inversijos. Vertikalios rodyklės nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. Am – amiloplastai. Mastelis - 10µm

Atlikus kiekybinę amiloplastų pasiskirstymo išilgai šaknų statocitų analizę, ženklus dažnių daugiakampių poslinkis nuo distalinės statocitų sienelės link proksimalinės abiem atvejais nustatytas pirmųjų dviejų minučių laikotarpiu (31 pav.).

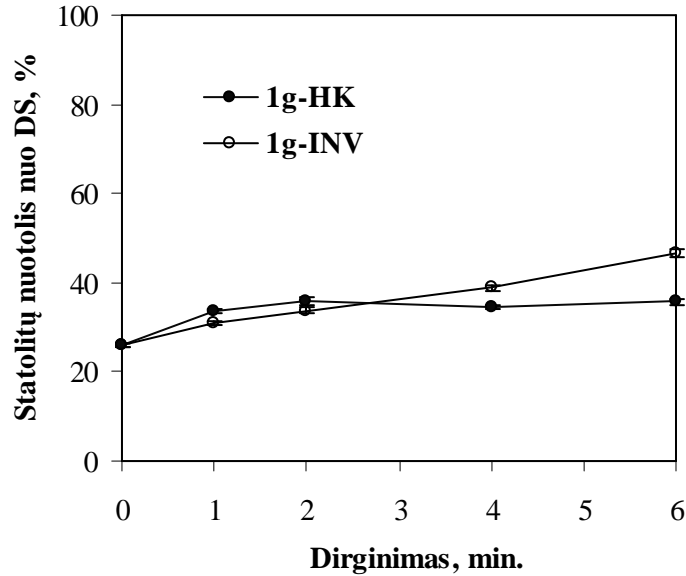


31 pav. Amiloplastų kiekybinis persiskirstymas išilgai šaknų gravisensorinių ląstelių perkėlus 1 g daigus į klinostatą imituotą mikrogravitaciją (A) arba po 180° inversijos (B)

Imituotos klinostatu mikrogravitacijos sąlygomis per pirmąją minutę savo padėtį distalinės sienelės atžvilgiu pakeitė apie 21 % amiloplastų, per

antrąją – apie 13 % (31A pav.). Inversijos metu amiloplastų išsidėstymas išilgai statocitų kito panašiai: per pirmąją minutę persiskirstė apie 20 % amiloplastų, per antrąją – apie 10 % (31B pav.). Vėliau plastidžių išilginiai judesiai vyko skirtingai. Per sekančias dvi minutes imituotos mikrogravitacijos sąlygomis apie 10 % statolitų pradėjo grįžti link distalinės statocitų sienelės, o vėliau persiskirstymas buvo nežymūs. Inversijos atveju amiloplastų judėjimas proksimalinės ląstelių sienelės kryptimi vyko pastoviai per sekančių keturių minučių laikotarpį (31B pav.).

Iš pateiktų amiloplastų kiekybinio pasiskirstymo išilgai šaknų statocitų analizės rezultatų matyti, kad visą šešių minučių gravitropinio dirginimo laikotarpį išlieka unimodinis reikšmių masyvų pasiskirstymas. Šis faktas leidžia teigti, kad amiloplastai nėra paskirai išsidėstę citoplazmoje, o sudaro labilius kompleksus. Kuomet sumažinamas gravitacinės jėgos dydis iki imituotos mikrogravitacijos arba 180° pakeičiama jos veikimo kryptis, šie kompleksai kaip vientisi struktūriniai dariniai slenka proksimalinės statocitų sienelės kryptimi. Todėl amiloplastų judėjimo trajektorijos bei kinetikos įvertinimui atskirais gravitropinio dirginimo atvejais buvo naudojamos viso jų komplekso vidutinio nuotolio nuo distalinės statocitų sienelės reikšmės. 32 pav. pateikti duomenys statistiškai patvirtina esminį statolitų komplekso poslinkį iš pradinės padėties proksimaline kryptimi per pirmąją minutę, po perkėlimo į imituotą mikrogravitaciją arba po 180° inversijos ($p \leq 0,001$). Per antrąją minutę komplekso poslinkis taip pat buvo statistiškai patikimas: pirmuoju atveju esant $p \leq 0,05$, antruoju – $p \leq 0,01$. Vėliau amiloplastų komplekso poslinkiai šia kryptimi invertuotų šaknų statocituose išliko esminiai ($p \leq 0,05$). Imituotos mikrogravitacijos sąlygomis vidutinis komplekso nuotolis nuo distalinės ląstelių sienelės 2–4 min. laikotarpiu keitėsi nereikšmingai.



32 pav. Statolity kinetika išilgai 1 g sėjamosios pipirinės šaknų statocitų po perkėlimo į imituotą MG (1 g-HK) ar po 180° inversijos (1 g-INV)

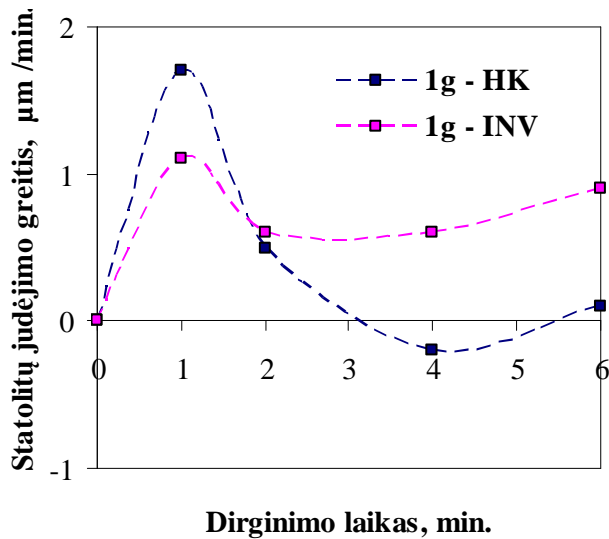
Siekiant palyginti amiloplastų judėjimo greitį, esant skirtingam gravitaciniam dirginimui, buvo apskaičiuotos realios nueito atstumo atskirais laiko tarpniais reikšmės. Kaip matyti iš 2 lentelėje pateiktų duomenų, didžiausi statolity poslinkiai įvyko per pirmąją ir antrąją dirginimo abiem metodais minutę.

2 lentelė. Amiloplastų nuotolis (μm) nuo distalinės šaknų statocitų sienelės 1 g daigus perkėlus į imituotą mikrogravitaciją arba po inversijos

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Imituota mikrogravitacija	Inversija
0	$6,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,2$
1	$7,7 \pm 0,3$ *	$7,1 \pm 0,4$ *
2	$8,2 \pm 0,3$ ^	$8,0 \pm 0,6$ ^
4	$7,8 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,4$ ^
6	$8,0 \pm 0,5$	$10,7 \pm 0,9$ *

* – skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas prie $p \leq 0,001$, ^ – prie $p \leq 0,05$

Per pirmąją minutę imituotos mikrogravitacijos sąlygomis vidutinis amiloplastų judėjimo greitis siekė 1,7 $\mu\text{m}/\text{min.}$, o po inversijos - 1,1 $\mu\text{m}/\text{min.}$ (33 pav.).

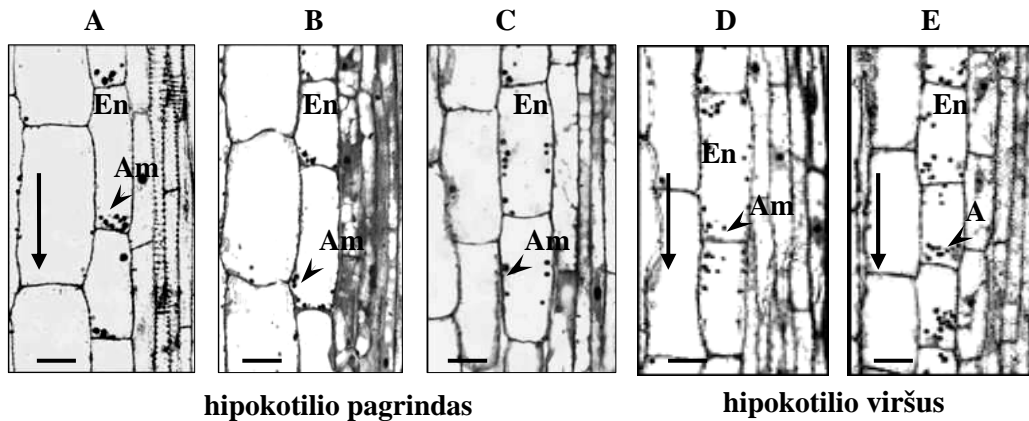


33 pav. Statolitų judėjimo greičio kaita 1 g šaknų statocituose po perkėlimo į imituotą mikrogravitaciją (1 g-HK) ar po inversijos (1 g-INV)

mikrogravitacijos sąlygomis minėtu laikotarpiu amiloplastų judėjimo greitis ir toliau mažėjo (0,1 $\mu\text{m}/\text{min.}$).

Hipokotilių statocitai. Prieš gravitacinio dirginimo procedūras, daigų hipokotilių endodermio ląstelėse statolitai buvo susitelkę arti bazalinės ląstelių sienelės, t.y. šalia morfologinio ląstelių dugno (34A pav.). Po perkėlimo į klinostatą ar po inversijos amiloplastų išsidėstymas išilgai endodermio ląstelių keitėsi, tačiau lėčiau, nei šaknų statocituose. Kaip matyti 34 pav., per 6-min. laikotarpį imituotos mikrogravitacijos sąlygomis tik nedidelė dalis amiloplastų pakilo nuo ląstelių bazalinės sienelės, o inversijos atveju pakito daugumos plastidžių lokalizacija. Po 24 minučių didžioji dauguma statolitų abiem atvejais nutolo nuo morfologinio ląstelių dugno ir išsidėstė dažniausiai ląstelių centrinės srities periferijoje (34C ir 34E pav.). Inversijos atveju kai kurie jų pasiekė ir distalines endodermio ląstelių sienes (34E pav.).

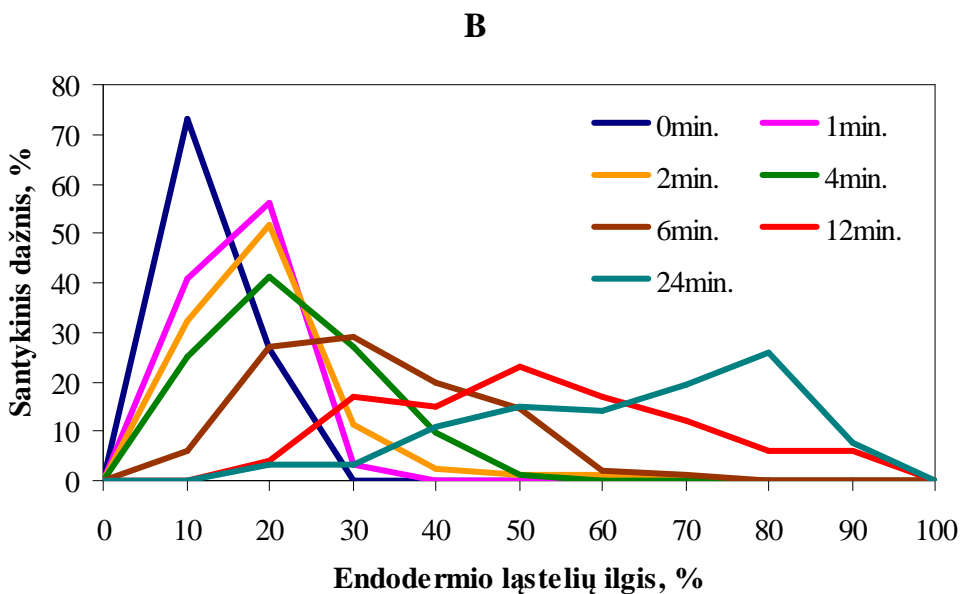
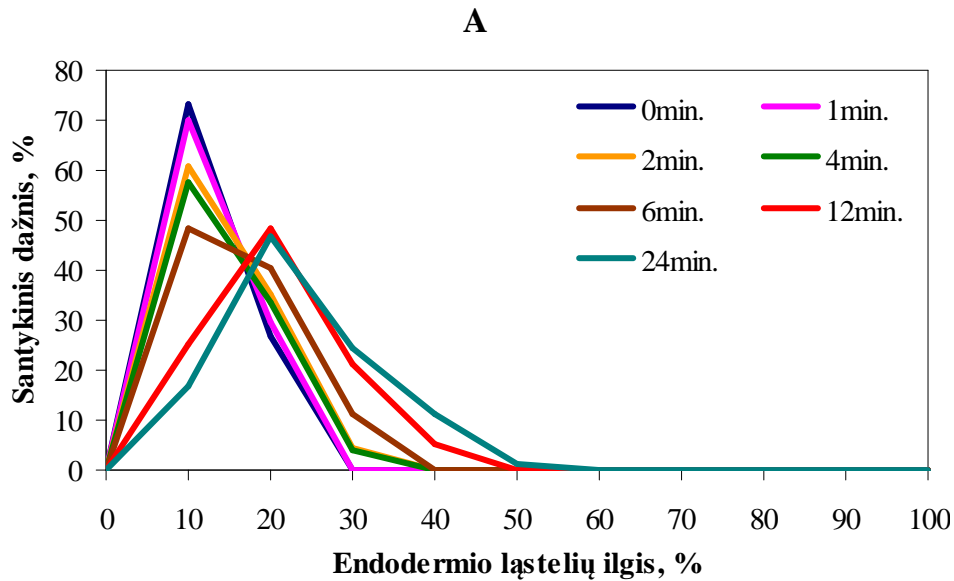
Dirginant toliau, abiem svarumo sąlygomis amiloplastų judėjimo greitis ėmė mažėti. Tačiau po inversijos mažėjimas nebuvo toks akivaizdus kaip HK sąlygomis. 2-ąją dirginimo minutę amiloplastų judėjimo greitis buvo 0,6 $\mu\text{m}/\text{min.}$ ir 0,5 $\mu\text{m}/\text{min.}$ atitinkamai. Po inversijos 6 dirginimo minutę amiloplastai judėjo jau 0,9 $\mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu, o imituotos



34 pav. Hipokotilių gravisensorinio audinio fragmentų mikrofotografijos 1 g sąlygomis (A) po perkėlimo į imituotos mikrogravitacijos sąlygas 6 min. (B) ir 24 min. (C), po 6 min. (D) ir 24 min. (E) inversijos. Vertikalios rodyklės nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. En - endodermio ląstelės, Am - amiloplastai. Mastelis – 12 μ m

Atlikus statolitų kiekybinio pasiskirstymo išilgai endodermio ląstelių analizę nustatyta, kad 1 g sąlygomis visi amiloplastai išsidėstę bazalinėje ląstelių srityje siaura juosta, kurios plotis sudaro apie 20 % vidutinio endodermio ląstelių ilgio (35 pav). Daigų perkėlimas į imituotos MG sąlygas ir inversija sukėlė skirtingą statolitų judėjimą hipokotilių statocitų distalinės sienelės kryptimi. Kuomet buvo eliminuotas vienkryptis gravitacijos poveikis, daugiakampių, vaizduojančių amiloplastų pasiskirstymą, forma ir padėtis išilgai ląstelių po pirmosios minutės liko nepakitę (35A pav). Antrosios ir sekančių dviejų minučių laikotarpiu padėtį pakeitė 11 % ir 6 % amiloplastų, atitinkamai. Po šešių mikrogravitacijos poveikio minučių dar 14 % plastidžių buvo persikėlę arčiau ląstelių centro. Panašaus masto amiloplastų persiskirstymas išilgai klinostatuojamų hipokotilių endodermio ląstelių vyko ir vėliau.

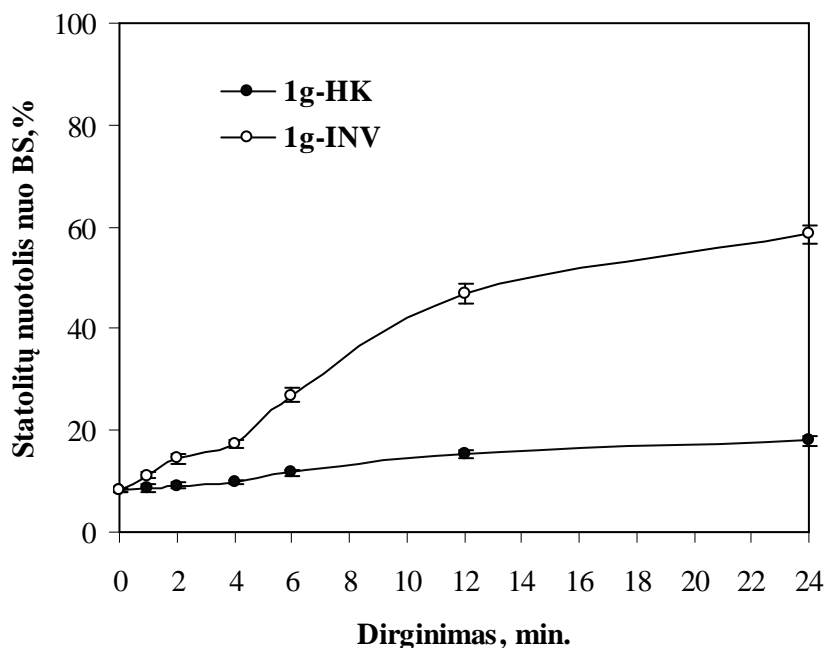
Jau pirmąją minutę po inversijos apie 33 % amiloplastų iš pradinės padėties endodermio ląstelėse pajudėjo distalinės sienelės kryptimi (35B pav.). Kaip matyti iš dažnių pasiskirstymų formos ir padėties, per antrąją minutę pakeitusių padėtį statolitų kiekis buvo žymiai mažesnis, bet vėliau vyko intensyvus jų persikėlimas į distalinę ląstelių sritį.



35 pav. Statolیتų kiekybinis pasiskirstymas išilgai hipokotilių endodermio ląstelių po perkėlimo į imituotą mikrogravitaciją (A) ir po inversijos (B)

Taigi, imituotos mikrogravitacijos poveikis statolیتų persiskirstymui hipokotilių endodermio ląstelėse distalinės sienelės kryptimi pasireiškė nuo ketvirtos minutės, gravitacinės jėgos poveikis – nuo pirmosios minutės. Perkeltų į imituotą mikrogravitaciją hipokotilių statolیتų centrinėje srityje amiloplastų dar nebuvo praėjus 6 minutėms, o po 24 minučių – tik apie 12 %. Po 6 inversijos minučių statolیتų centrinėje srityje buvo jau apie 37 % plastidžių, po 24 min – apie 38 %, o apie 31 % jų persislinko į distalinę ląstelių sritį.

Amiloplastų kiekybinio pasiskirstymo analizės duomenys parodo, kad statolitams būdingas unimodinis pasiskirstymas išilgai hipokotilių endodermio ląstelių kaip 1 g daiguose, taip ir po jų perkėlimo į imituotą mikrogravitaciją ar inversijos. Šio tipo statolitų pasiskirstymas išliko visą 24 minučių ekspozicijos mikrogravitacijoje laikotarpį, bet pasikeitė į bimodinį nuo 12-tos inversijos minutės. Šią pasiskirstymų kaitą galėjo sąlygoti kaip atsakomųjų į skirtingą dirginimą statolitų judesių savitumai, taip ir pačių endodermio ląstelių struktūrinė organizacija. Tačiau akivaizdu, kad ir hipokotilių statocituose, kai pakinta gravitacinės jėgos dydis ar veikimo kryptis, amiloplastai keliauja ne pavieniui, bet kaip struktūrinis kompleksas. Todėl kiekybinė statolitų judesių kinetikos analizė, kaip ir šaknų statocituose, buvo atlikta įvertinus viso jų komplekso vidutinį nuotolį nuo morfologinio ląstelių dugno ir išreikštą procentais nuo ląstelių ilgio (36 pav.). Prieš dirginimo procedūras vidutinis statolitų nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno buvo 8,3 % vidutinio ląstelių ilgio. Perkėlus daigus į klinostatą, statolitų nuotolis per 2 minutes padidėjo tik apie 1,5 % ir augo panašiai iki šeštos minutės.



36 pav. Statolitų kinetika išilgai sėjamosios pipirnės 1 g hipokotilių statocitų po perkėlimo į imituotą MG (1 g-HK) ar po inversijos (1 g-INV)

Statolitų vidutinis nuotolis nuo bazalinės endodermio ląstelių sienelės po 6 minučių klinostate buvo jau statistiškai patikimai didesnis už buvusį iki dirginimo ($p \leq 0,000001$) ir per sekančias 6-min. dar išaugo ($p \leq 0,0001$). Po 24 minučių buvimo imituotos MG sąlygomis vidutinis amiloplastų nuotolis nuo bazalinės hipokotilių statocitų sienelės buvo lygus 18 % vidutinio ląstelių ilgio. Inversijos atveju (36 pav.) amiloplastų vidutinės padėties poslinkis iš pradinės buvo statistiškai patikimas jau per pirmąją ir antrąją minutę ($p \leq 0,001$ ir $p \leq 0,01$, atitinkamai). Vėliau statolitų nuotolis nuo bazalinės ląstelių sienelės didėjo sparčiau ir po 6 minučių pasiekė 28 % vidutinio ląstelių ilgio, o per 6–12 min. laikotarpį – ląstelių vidurį.

Amiloplastų judėjimo greičių palyginimui buvo apskaičiuotos realios nueito atstumo atskirais gravitropinio dirginimo tarpniais reikšmės. Kaip matyti iš 3-oje lentelėje pateiktų duomenų, imituotos mikrogravitacijos atveju statolitų poslinkis per pirmąsias dvi minutes nebuvo esminis ($0,6 \mu\text{m}$) ir padidėjo tik praėjus 6 minučių laikotarpiui. Tuo tarpu inversijos atveju jau po 1 minutės nustatytas ženklus statolitų pasistumėjimas ląstelės centro link per $6,8 \mu\text{m}$.

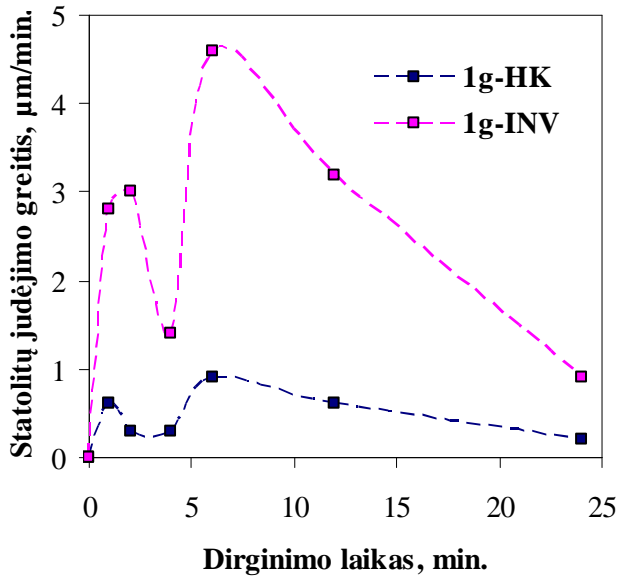
3 lentelė. Statolitų nuotolis (μm) nuo bazalinės endodermio ląstelių sienelės po daigų perkėlimo į imituotą klinostatą mikrogravitaciją ir po inversijos

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Imituota mikrogravitacija	Inversija
0 (kontrolė)	$7,9 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,3$
1	$8,5 \pm 0,5$	$10,6 \pm 0,7^*$
2	$8,7 \pm 0,7$	$13,7 \pm 0,9^{\wedge}$
4	$9,3 \pm 0,5$	$16,5 \pm 0,9$
6	$11,1 \pm 0,6^*$	$25,7 \pm 1,3^{\wedge}$
12	$14,7 \pm 0,8^{\wedge}$	$44,6 \pm 1,8^{\wedge}$
24	$17,1 \pm 0,9$	$55,7 \pm 1,7$

* – skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas prie $p \leq 0,001$,

\wedge – prie $p \leq 0,01$

Po inversijos statolitų judėjimas distaline kryptimi vyko žymiai sparčiau nei klinostatavimo atveju. Jei pirmosiomis minutėmis imituotos mikrogravitacijos sąlygomis amiloplastai judėjo vidutiniškai $0,5 \mu\text{m}/\text{min}$. greičiu, inversijos atveju jų greitis siekė iki $2,8\text{--}3,0 \mu\text{m}/\text{min}$. (37 pav.).



37 pav. Statolitų judėjimo greičio kaita $1 g$ hipokotilių statocituose perkėlus į imituotą mikrogravitaciją ($1g\text{-HK}$) ir po inversijos ($1g\text{-INV}$)

6 dirginimo minutę, statolitų judėjimo greitis imituotos mikrogravitacijos sąlygomis buvo didžiausias, t.y. apie $0,9 \mu\text{m}/\text{min}$., inversijos metu minėtu laikotarpiu statolitai judėjo $4,6 \mu\text{m}/\text{min}$. greičiu.

Išdėstytų duomenų visuma leidžia teigti, jog $1 g$ sąlygomis išaugusiems daigams sumažinus

gravitacinės jėgos dydį iki imituotos mikrogravitacijos (klinostatavimas), ar pakeitus gravitacijos vektoriaus veikimo kryptį 180° (inversija), amiloplastai priverčiami judėti ir šaknų, ir hipokotilių gravisorinėse ląstelėse. Abiem gravitacinės jėgos pokyčių atvejais amiloplastai kyla iš pradinės padėties nuo morfologinio ląstelių dugno, tačiau jų judėjimo greitis šaknų ir hipokotilių statocituose skiriasi iš esmės.

Perkėlus $1 g$ daigus į imituotos MG sąlygas, amiloplastai hipokotilių statocituose 2 min . judėjo lėčiau, negu po daigų inversijos. Šaknų statocituose per šį laikotarpį abiem gravitropinio dirginimo atvejais amiloplastai judėjo panašiu greičiu.

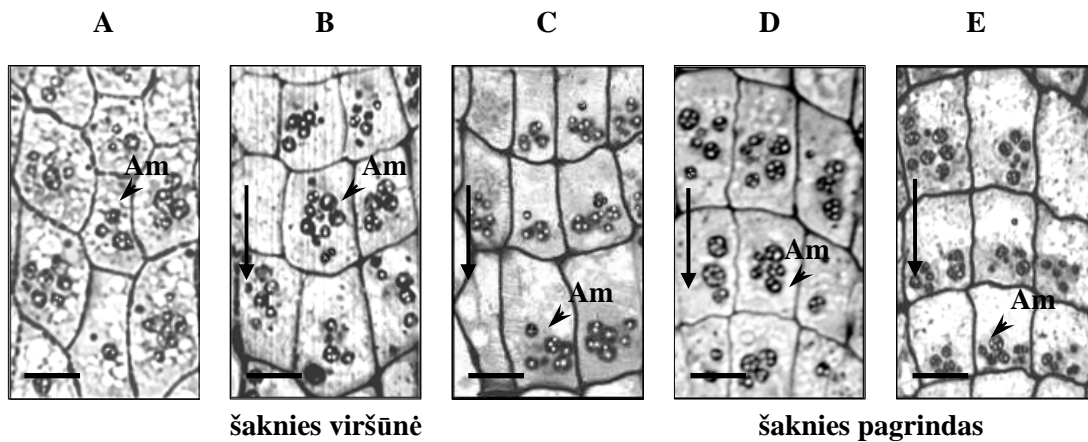
Pažymėtina, kad po inversijos praėjus 1 minutei statolitų judėjimas ląstelės centro link hipokotilio statocituose buvo 3 kartus spartesnis, nei

šaknies statocituose. Imituotos mikrogravitacijos sąlygomis atvirksčiai, minėtu laikotarpiu didesnis statolitų judėjimo greitis nustatytas šaknų nei hipokotilių statocituose.

3.3.2. Statolitų judėjimo išilgai HK daigų gravisensorinių ląstelių priklausomybė nuo gravitacijos vektoriaus veikimo krypties

Gravitacinės jėgos krypties poveikis amiloplastų išilginiams judesiams hipokotilių ir šaknų gravisensorinėse ląstelėse buvo vertinamas pagal jų sedimentacijos kinetikas. Sėjamosios pipirinės daigai, išaugę imituotos klinostatu mikrogravitacijos sąlygomis, buvo dirginami 1, 2, 4, 6, 12 ir 24 min. 1 g dydžio jėga šaknies viršūnės ir šaknies pagrindo kryptimi.

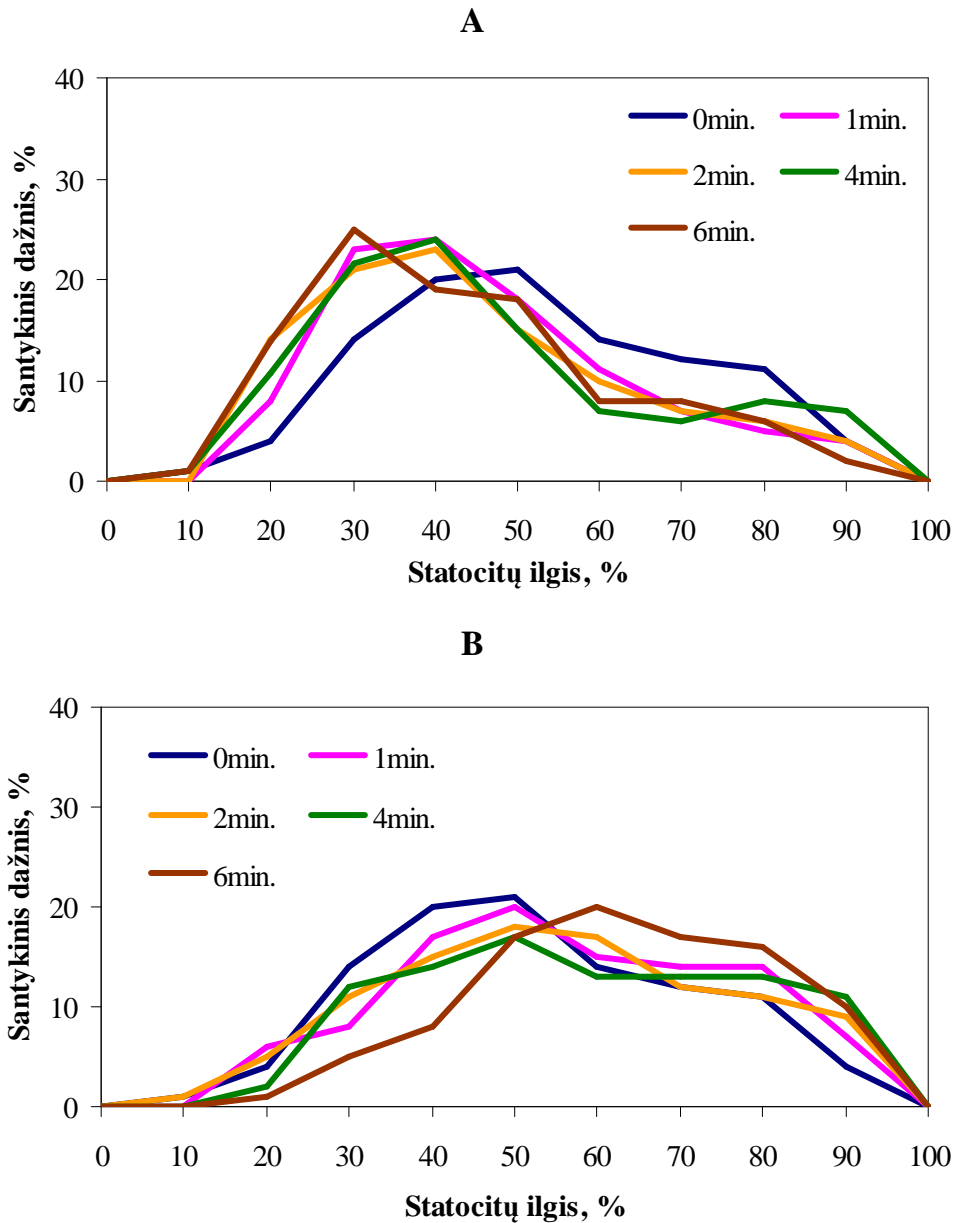
Šaknų statocitai. Kaip matyti iš pateiktų šaknų statocitų mikrofotografijų (38 pav.) statolitai imituotos mikrogravitacijos sąlygomis buvo susigrupavę centrinėje gravisensorinių ląstelių dalyje (38A pav.), ir dirginimo metu judėjo išilgai statocitų, priklausomai nuo gravitacijos vektoriaus veikimo krypties ir dirginimo laiko (38B,C ir 38D,E pav.).



38 pav. Šaknų statenchimos fragmentų mikrofotografijos imituotos mikrogravitacijos sąlygomis (A), gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi 1min. (B) ir 6 min. (C), ir šaknies pagrindo kryptimi 1 min. (D) ir 6 min. (E). Vertikalios rodyklės nurodo gravitacijos veikimo kryptį. Am - amiloplastai. Mastelis – 10 μm

Atlikus amiloplastų kiekybinę pasiskirstymo išilgai šaknų statocitų analizę nustatyta, kad imituotos MG sąlygomis apie 50 % statolitų grupuojasi

centrinėje ląstelių dalyje, t.y. jų užimamos juostos ribos atitinka 40 % - 60 % vidutinio ląstelių ilgio (39 pav.).

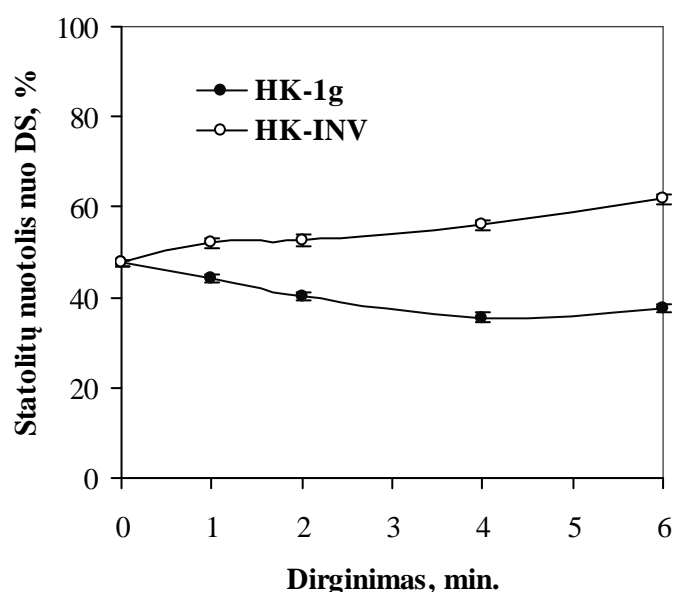


39 pav. Statolیتų kiekybinis išsidėstymas išilgai HK šaknų statolیتų gravitacijai veikiant šaknies viršūnės (A) ir šaknies pagrindo kryptimi (B)

Pirmomis dirginimo minutėmis panašus statolیتų kiekis judėjo morfologinio ląstelių dugno, arba proksimalinės ląstelių sienelės kryptimi (apie 17 % ir apie 10 %, atitinkamai) (39A ir 39B pav.). Per antrąją abiejų dirginimų minutę savo padėtį pakeitė dar apie 10 % statolیتų. Vėliau situacija pasikeitė. Amiloplastų judėjimas šaknies viršūnės link lėtėjo, tuo tarpu priešinga kryptimi

išliko toks pat intensyvus. Gravitacijai veikiant daigus šaknies pagrindo kryptimi, po 6 minučių apie 30 % plastidžių pasiekė proksimalinį gravisensorinių ląstelių polių. Tuo tarpu dirginant priešinga linkme, praėjus minėtam laiko tarpui tik apie 14 % amiloplastų persislinko į distalinę ląstelių sritį. Amiloplastų kiekybinio pasiskirstymo išilgai šaknų gravisensorinių ląstelių tyrimo rezultatai rodo, kad imituotos mikrogravitacijos, kaip ir įprastos gravitacijos sąlygomis statolitai sudaro kompleksą, kuriam būdingas unimodinis pasiskirstymas. Nepriklausomai nuo gravitacinės jėgos veikimo krypties, iš gravisensorinių ląstelių centro jos polių link statolitai juda ne padrikai, o kaip vientisas kompleksas ir visais atvejais išlieka unimodinis reikšmių masyvų pasiskirstymas.

Amiloplastų judėjimo trajektorijos ir kinetikos centrinėje šaknų gravisensorinių ląstelių srityje įvertinimui buvo apskaičiuotos viso jų komplekso vidutinio nuotolio nuo distalinės statocitų sienelės reikšmės (40 pav.).



40 pav. Statolitų kinetika išilgai HK sėjamosios pipirnės daigų šaknų statocitų gravitacijai veikiant šaknies viršūnės (HK-1 g) ir šaknies pagrindo (HK-INV) kryptimi. DS – distalinė ląstelės sienelė

Apskaičiavus vidutinį statolitų nuotolį nuo morfologinio ląstelių dugno nustatyta, kad imituotos mikrogravitacijos sąlygomis jis yra apie 47,6 %

vidutinio ląstelių ilgio (40 pav). Statistiškai patikimas statolity poslinkis ($p \leq 0,05$) distalinės ir proksimalinės ląstelių sienelės link jau pirmąją minutę nustatytas abiem gravitropinio dirginimo atvejais, t.y. gravitacijai daigus veikiant šaknies viršūnės bei šaknies pagrindo (inversija) kryptimis. Antrąją inversijos minutę statolity poslinkis proksimalinės ląstelių sienelės link (HK-INV) nebuvo esminis, o gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi (HK-1 g) statolity judėjimas liko intensyvus ($p \leq 0,05$). Vėliau, po 4 minučių statolity judėjimas distalinių ląstelių sienelių kryptimi (HK-1 g) sustojo, o proksimalinių ląstelių sienelių kryptimi paspartėjo ir išlaikė savo judėjimo intensyvumą iki pat 6 minutės. Galiausiai po 6 minučių vidutinis amiloplastų nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno buvo lygus 37 % ir 62 % vidutinio ląstelių ilgio atitinkamai (40 pav.).

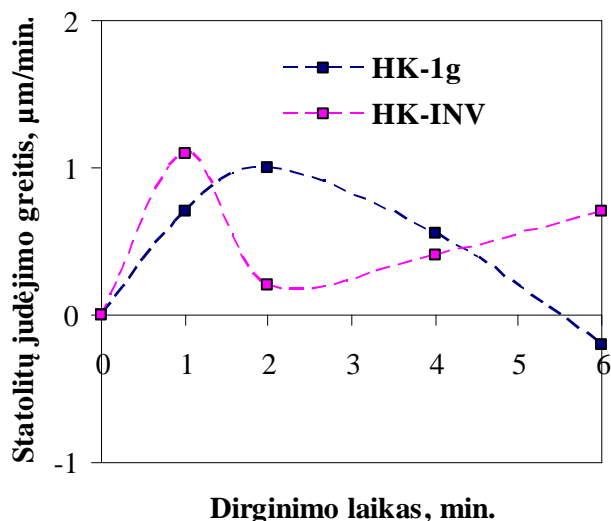
Amiloplastų judėjimo greičių palyginimui buvo apskaičiuotos realios nueito atstumo atskirais gravitropinio dirginimo tarpsniais reikšmės. Kaip matyti iš 4 lentelėje pateiktų duomenų, statistiškai patikimas statolity nueito atstumo pokytis morfologinio ląstelių dugno link ir priešinga kryptimi buvo nustatytas jau po pirmos minutės.

4 lentelė. Amiloplastų nuotolis (μm) nuo šaknų statocitų distalinės sienelės (DS) dirginant HK daigus gravitacine 1 g jėga šaknies viršūnės ir šaknies pagrindo kryptimis

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Dirginimas šaknies viršūnės kryptimi	Dirginimas šaknies pagrindo kryptimi
0 (kontrolė)	11,4 \pm 0,6	11,4 \pm 0,6
1	10,6 \pm 0,3 [^]	12,5 \pm 0,5 [^]
2	9,6 \pm 0,4 [^]	12,6 \pm 0,3
4	8,5 \pm 0,2 [^]	13,4 \pm 0,5 [^]
6	9,0 \pm 0,3	14,8 \pm 0,8 [^]

[^] – skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas $p \leq 0,05$

Minėtu laikotarpiu amiloplastų judėjimo greitis abiem kryptimis buvo apie 1,0 $\mu\text{m}/\text{min}$. (41 pav.). Vėliau statolitų judėjimas distalinės ląstelių sienelės kryptimi lėtėjo, o proksimalinės sienelės link - greitėjo.

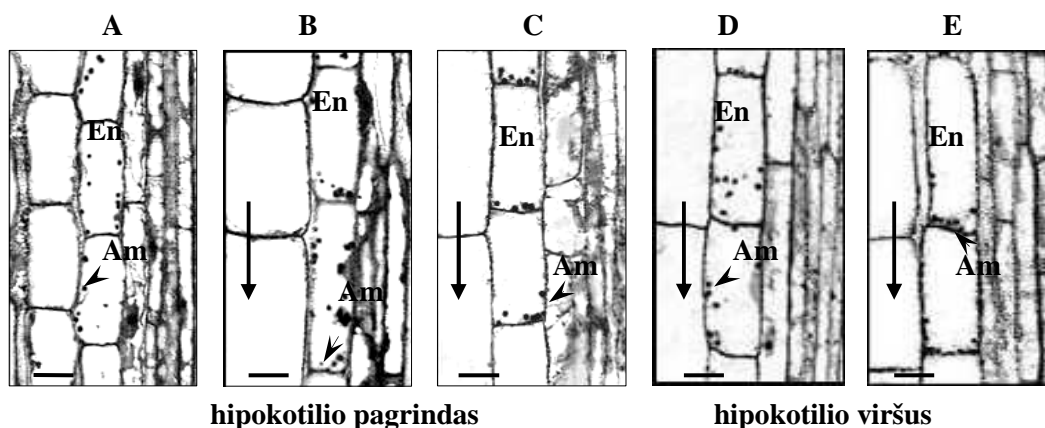


41 pav. Statolitų judėjimo greičio kaita HK šaknų statocituose gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi (HK-1 g) ir šaknies pagrindo kryptimi (HK-INV)

Šeštą dirginimo minutę gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi statolitų judėjimas sustojo, o dirginant priešinga linkme intensyviai judėjo apie 1,0 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu. Po 6 min. amiloplastų poslinkis iš pradinės padėties morfologinio ląstelių dugno link prilygo 2,4 μm , o proksimalinės sienelės link - 3,4 μm (4 lentelė).

Hipokotilių statocitai.

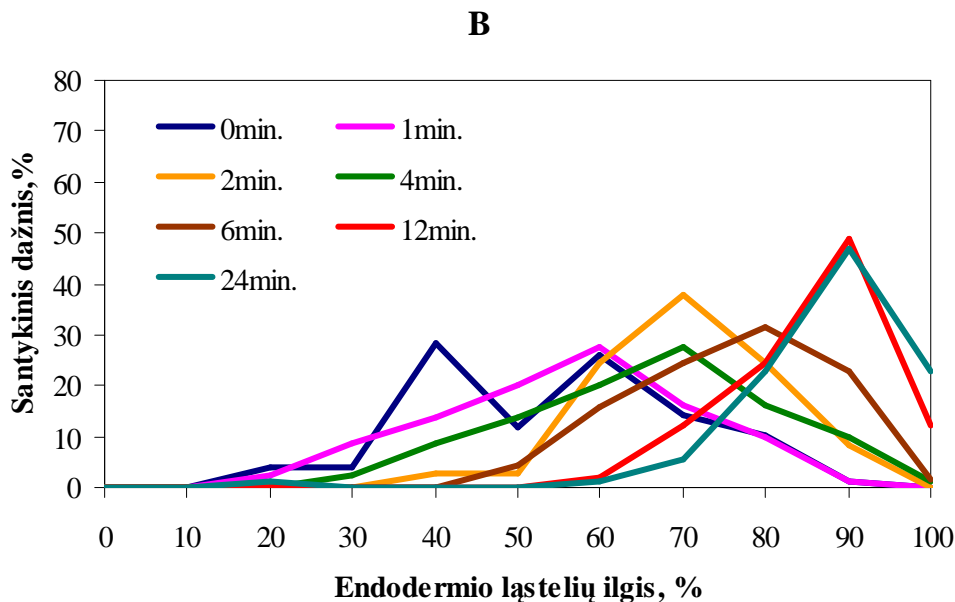
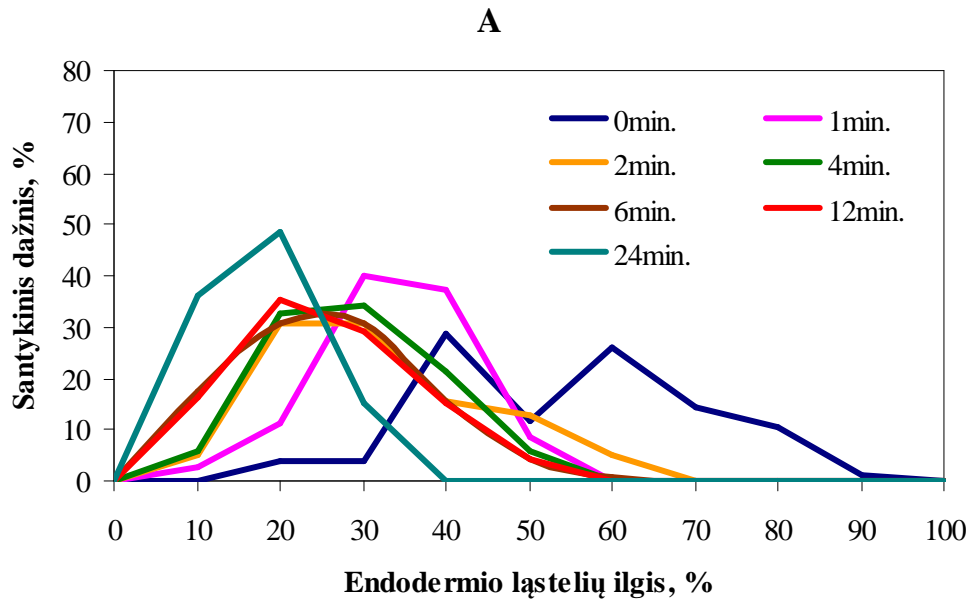
Imituotos mikrogravitacijos sąlygomis statolitai buvo išsibarstę po visą hipokotilių gravisensorinių ląstelių plotą ir daugiausia jų susitelkę ląstelių periferijoje (42A pav.).



42 pav. Hipokotilių gravisensorinio audinio fragmentai imituotos mikrogravitacijos sąlygomis (A), gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi 1 min. (B), ir 24 min. (C), bei šaknies pagrindo kryptimi 1 min. (D), ir 24 min. (E). Vertikalios rodyklės nurodo gravitacijos veikimo kryptį, En - endodermio ląstelės, Am - amiloplastai. Mastelis - 12 μm

Gravitropinio dirginimo metu statolitų padėtis priklausė nuo veikiančios gravitacinės jėgos krypties (42B ir C, 42D ir E pav.).

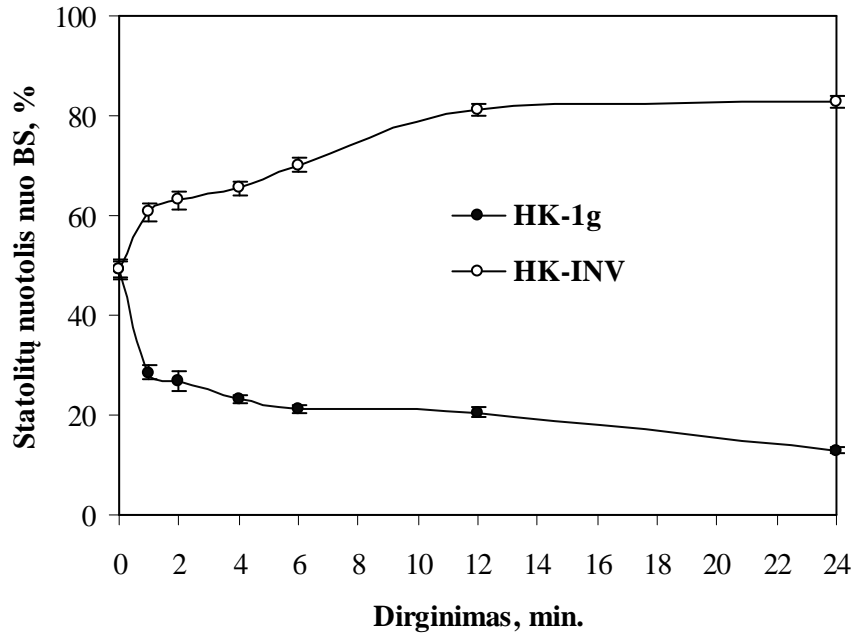
Jau per pirmąją dirginimo minutę statolitų judėjimas centrinėje endodermio ląstelių dalyje vyko ganėtinai intensyviai abiem kryptimis, t.y. link morfologinio ląstelių dugno (bazalinės hipokotilių ląstelių sienelės) ir priešinga linkme, link distalinės ląstelių sienelės. Tai patvirtina atliktos amiloplastų kiekybinio pasiskirstymo išilgai endodermio ląstelių analizės duomenys. Imituotos MG sąlygomis augusių daigų hipokotilių statocituose statolitai buvo išsibarstę per visą ląstelių ilgį. Apie 65 % jų užėmė juostą, kurios ribos yra 40 % ir 60 % vidutinio ląstelių ilgio, atitinkamai (43 pav). Jau po pirmosios dirginimo minutės nustatytas ženklus amiloplastų pasiskirstymo dažnių daugiakampių poslinkis gravitacijos veikimo kryptimi. Veikiant šaknies viršūnės kryptimi, apie 42 % statolitų pasislinko link morfologinio gravisensorinių ląstelių dugno (43A pav), veikiant šaknies pagrindo kryptimi – apie 24 % amiloplastų pajudėjo link distalinės ląstelių sienelės (43B pav). Per antrąją minutę padėtį pakeitė 30 % ir 32 % amiloplastų, atitinkamai. Vėliau statolitų judėjimo intensyvumas abiem kryptimis silpnėjo. Ypač tai pasireiškė gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi. Nepaisant to, po 24 minučių statolitai abiem dirginimo atvejais pasiekė bazalinę ir distalinę ląstelės polių. Gauti duomenys parodo, kad imituotos MG sąlygomis augusių hipokotilių statocituose esantiems amiloplastams būdingas bimodinis reikšmių masių pasiskirstymas, kurį nulemia centrinėje endodermio ląstelių dalyje esanti centrinė vakuolė. Amiloplastams judant bazalinės ir distalinės ląstelių sienelės kryptimi, jau po pirmosios minutės pasikeitė amiloplastų dažnių pasiskirstymo daugiakampių forma ir padėtis. Nepaisant to visais atvejais amiloplastai judėjo ne pavieniui, o kaip struktūrinis kompleksas. Jei slinkimas vyko bazalinės ląstelių sienelės kryptimi, bimodinis pasiskirstymas keitėsi į unimodinį, būdingą statolitų pasiskirstymui 1 g daigų hipokotilių endodermio ląstelėse (35 pav.).



43 pav. Statolیتų kiekybinis pasiskirstymas HK daigų hipokotilių statocituose gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi (A) ir šaknies pagrindo kryptimi (B)

Kiekybiniam amiloplastų judėjimo kinetikos įvertinimui buvo apskaičiuotos viso jų komplekso vidutinio nuotolio nuo bazalinės statocitų sienelės reikšmės. 44 pav. pateikti duomenys statistiškai patvirtino esminį statolیتų komplekso poslinkį iš pradinės padėties bazalinės ir distalinės ląstelių sienelės link, per pirmąją minutę, gravitacijai veikiant šaknies viršūnės ir šaknies pagrindo kryptimis ($p \leq 0,0001$). Vėliau amiloplastų komplekso poslinkiai abiem kryptimis nebuvo esminiai. 6–12 minučių laikotarpiu,

gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi, amiloplastų sedimentacija vyko lėčiau, nei inversijos atveju. Po 24 minučių vidutinis statolity nuotolis nuo bazalinių sienelių buvo lygus 13 % vidutinio analizuotų ląstelių ilgio, t.y. amiloplastai išsidėstė netoli morfologinio ląstelių dugno, bet nesugrįžo į padėtį, būdingą 1 g sąlygomis augusių hipokotilių statocitams.



44 pav. Statolity kinetika išilgai HK sėjamosios pipirnės daigų hipokotilių statocitų gravitacijai veikiant šaknies viršūnės kryptimi (HK-1 g) ir šaknies pagrindo kryptimi (HK-INV). BS-bazalinės hipokotilių gravisensorinių ląstelių sienelės

Praėjus tokiam pat dirginimo laikui šaknies pagrindo kryptimi, statolity nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno buvo lygus 83 % vidutinio analizuotų ląstelių ilgio.

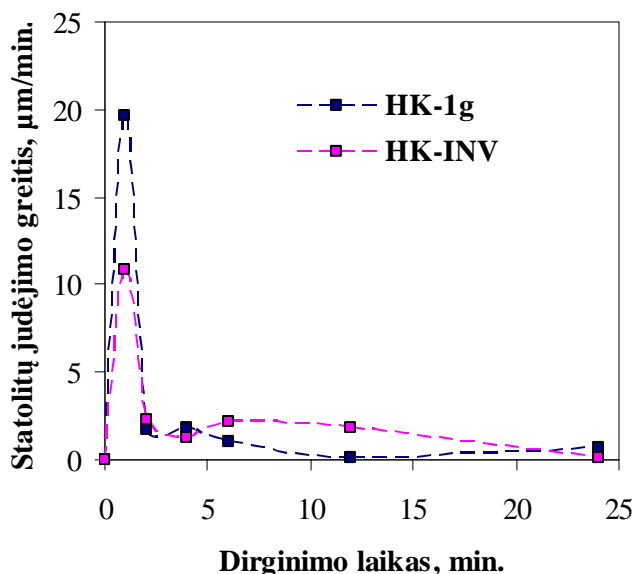
Amiloplastų judėjimo greičių palyginimui apskaičiuotos realios nueito atstumo skirtingais dirginimo laiko tarpsniais reikšmės (5 lentelė). Kaip matyti, abiem gravitropinio dirginimo atvejais, ženklus amiloplastų nueito atstumo pokytis morfologinio ląstelės dugno ir distalinės ląstelės sienelės kryptimi nustatytas jau po pirmosios minutės (~19,5 μm ir 11,1 μm atitinkamai).

5 lentelė. Amiloplastų nuotolis (μm) nuo bazalinės hipokotilių endodermio ląstelių sienelės gravitacijai veikiant HK daigus šaknies viršūnės ir šaknies pagrindo kryptimis

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Dirginimas šaknies viršūnės kryptimi	Dirginimas šaknies pagrindo kryptimi
0 (kontrolė)	$46,7 \pm 1,8$	$46,7 \pm 1,8$
1	$27,2 \pm 1,5^*$	$57,7 \pm 1,7^*$
2	$25,5 \pm 2,1$	$59,9 \pm 1,8$
4	$21,9 \pm 0,8$	$62,3 \pm 1,4$
6	$20,0 \pm 0,8$	$66,7 \pm 1,4$
12	$19,6 \pm 1$	$77,2 \pm 1,2^\wedge$
24	$12,4 \pm 0,6$	$78,7 \pm 1,2$

*– skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas prie $p \leq 0,0001$, $^\wedge$ - $p \leq 0,001$

Apskaičiavus statolیتų vidutinį judėjimo greitį nustatyta, kad pirmą minutę statolیتų judėjimas bazalinių ląstelių sienelių kryptimi vyko apytikriai $19,6 \mu\text{m}/\text{min}$. greičiu, o į priešingą pusę - $10,9 \mu\text{m}/\text{min}$. (45 pav).



45 pav. Statolیتų judėjimo greičio kaita HK daigų hipokotilių statocituose gravitacijai veikiant šaknies viršūnės (HK-1 g) ir šaknies pagrindo (HK-INV) kryptimis

Vėliau amiloplastų judėjimas sulėtėjo abiem kryptimis iki $1,7 \mu\text{m}/\text{min}$. (HK-INV) ir $2,3 \mu\text{m}/\text{min}$. (HK-1 g) atitinkamai. 6–12 minučių laikotarpiu, kai morfologinio ląstelių dugno kryptimi statolیتai ir toliau judėjo mažėjančiu greičiu, distalinių sienelių link statolیتų judėjimo greitis išliko nepakitęs.

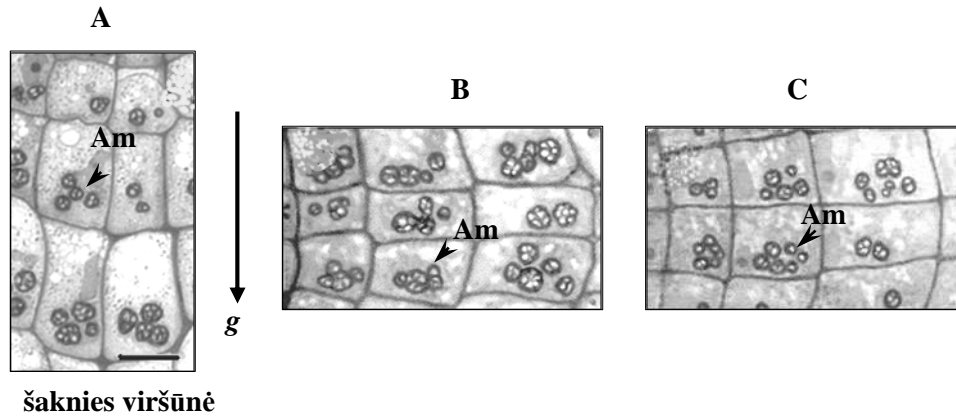
Išdėstyti duomenys rodo, jog abiejuose sėjamosios pipirnės HK daigų ašiniuose organuose statolitų judėjimas iš gravisensorinių ląstelių centro jų polių link priklausė nuo veikiančios gravitacinės 1 g jėgos krypties. Didžiausias amiloplastų poslinkis abiem kryptimis įvyko per pirmąją dirginimo minutę tiek šaknų, tiek hipokotilių statocituose, tačiau jų judėjimo greitis skyrėsi. Minėtu laikotarpiu amiloplastai, hipokotilių statocituose, judėdami apie 19,6 $\mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu, pasislinko morfologinio dugno link per 20 % vidutinio ląstelių ilgio, o priešinga kryptimi - per 12 % vidutinio ląstelių ilgio (judėjimo greitis apie 10,9 $\mu\text{m}/\text{min.}$). Šaknų statocituose jie judėjo abiem kryptimis vidutiniškai 1,0 $\mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu (poslinkis per 3,2 % ir 4,5 % vidutinio ląstelių ilgio, atitinkamai).

Įvertinus statolitų judėjimo pobūdį išilgai sėjamosios pipirnės ašinių organų gravisensorinių ląstelių, kintant gravitacinės jėgos parametrams, toliau buvo tęsiami tyrimai analizuojant gravitacijos indukuotą statolitų sedimentaciją šaknies ir hipokotilio statocituose, gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu.

3.4. Statolitų sedimentacijos 1 g daigų ašinių organų statocituose kinetika gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu

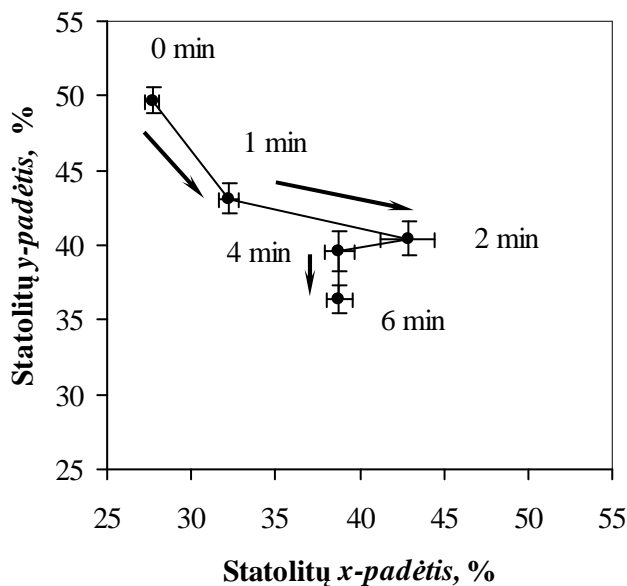
.Amiloplastų judėjimas šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse analizuotas 1 g sėjamosios pipirnės daigus paverčiant 90° kampu. Pasibaigus dirginimo laikui po 1, 2, 4, 6 minučių daigai fiksuoti išlaikant tą pačią orientaciją.

Šaknų statocitai. Vertikaliai augančių šaknų statocituose amiloplastai buvo susitelkę šalia morfologinio ląstelių dugno (46A pav.). Pateiktose mikrofotografijose (46B,C pav.) matyti, kad daigų pavertimas 90° kampu gravitacijos vektoriaus atžvilgiu įtakojo šių organelių padėties pasikeitimą šaknų statocituose.



46 pav. 1 g daigų šaknų prieš dirginimą (A), pavertus 90° kampu po 2 min. (B), ir po 6 min. (C) gravisensorinio audinio fragmentų mikrofotografijos. Vertikali rodyklė nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. Am – amiloplastai. Mastelis – 10 μm

Statistinei statolitų judėjimo analizei kiekviena ląstelė laikyta dviejų koordinačių sistema (abscisė – dešinė arba apatinė išilginė sienelė; ordinatė – šaknies statocito morfologinis dugnas. Jau per pirmąsias dirginimo minutes nustatytas akivaizdus statolitų padėties pasikeitimas abiejų ląstelės sienelių atžvilgiu (47 pav.).



47 pav. Statolitų viduląstelinė padėtis šaknų statocituose per 6-ias gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi minutes

tokia pačia trajektorija. Po 2 minučių atstumas nuo dešinės išilginės sienelės sumažėjo iki 40,5 % (y), o nuo morfologinio ląstelės dugno padidėjo iki 42,9 %

Statolitų padėtis ląstelės dešinės išilginės sienelės atžvilgiu (y), sumažėjo nuo 49,7 % iki 43,1 % ($p \leq 0,01$) nuo vidutinio ląstelės pločio, o statolitų padėtis išilgai ląstelės distalinės sienelės atžvilgiu (x) kito nuo 27,7 % iki 32,3 % ($p \leq 0,05$), atitinkamai. Sekančią dirginimo minutę, statolitai toliau judėjo

(x). Vėliau statolitų judėjimas iš esmės pakito. 2–6 minučių laikotarpiu stebimas žymus 38,8 % ($p \leq 0,05$) (x), grįžtamasis statolitų poslinkis distalinės sienelės kryptimi ir tuo pačiu sedimentacija žemyn - 36,4 % ($p \leq 0,05$) (y).

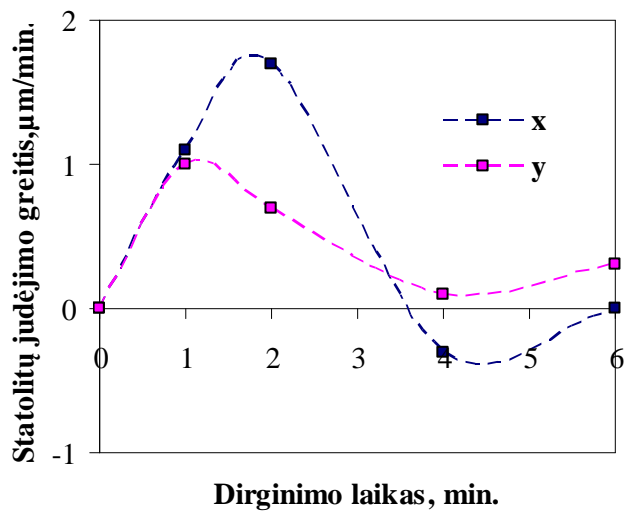
Amiloplastų judėjimo greičių palyginimui apskaičiuotos realios nueito kelio skirtingais laiko tarpniais reikšmės (6 lentelė). Kaip matyti iš 6 lentelėje pateiktų duomenų, pirmąją minutę ženklus ir abiem atvejais panašus statolitų nueito atstumo pokytis ($\sim 1 \mu\text{m}$) nustatytas tiek dešinės išilginės sienelės, tiek morfologinio ląstelės dugno atžvilgiu.

6 lentelė. Amiloplastų nuotolis (μm) nuo ląstelių morfologinio dugno ir dešinės išilginės sienelės gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Nuo ląstelės morfologinio dugno	Nuo dešinės išilginės sienelės
0	$6,6 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,8$
1	$7,7 \pm 0,6^*$	$6,9 \pm 1,0^{\wedge}$
2	$9,4 \pm 1,6$	$6,2 \pm 1,1$
4	$8,8 \pm 0,9$	$6,1 \pm 1,3$
6	$8,8 \pm 0,8^*$	$5,6 \pm 0,9^*$

*– skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas prie $p \leq 0,05$, \wedge - $p \leq 0,01$

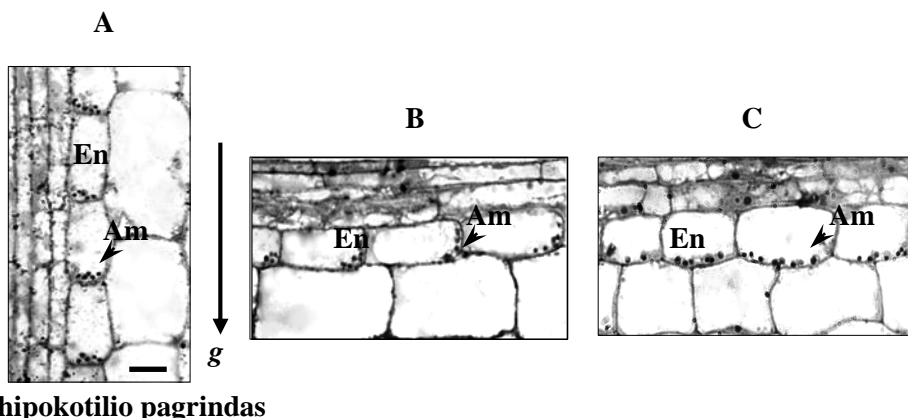
Antrą dirginimo minutę didesnis statolitų poslinkis buvo nustatytas išilgine nei lateraline ląstelės kryptimi ($1,7 \mu\text{m}$ ir $0,7 \mu\text{m}$ atitinkamai). Minėtų pirmųjų dviejų minučių laikotarpiu, dešinės išilginės sienelės link, statolitai judėjo apie $1 \mu\text{m}/\text{min.}$ ir $0,7 \mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu, o nuo morfologinio ląstelės dugno tolo apie $1 \mu\text{m}/\text{min.}$ ir $1,7 \mu\text{m}/\text{min}$ greičiu atitinkamai (48 pav). Vėliau statolitų judėjimo intensyvumas abiem kryptimis mažėjo.



48 pav. Statolitų judėjimo išilgai (x) ir skersai (y) šaknų gravisensorinių ląstelių greičio kaita gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu

poslinkis išilgine ląstelės kryptimi. Po 6 minučių dauguma amiloplastų išsibarstė išilgai dešinės išilginės ląstelių sienelės (49B, C pav.).

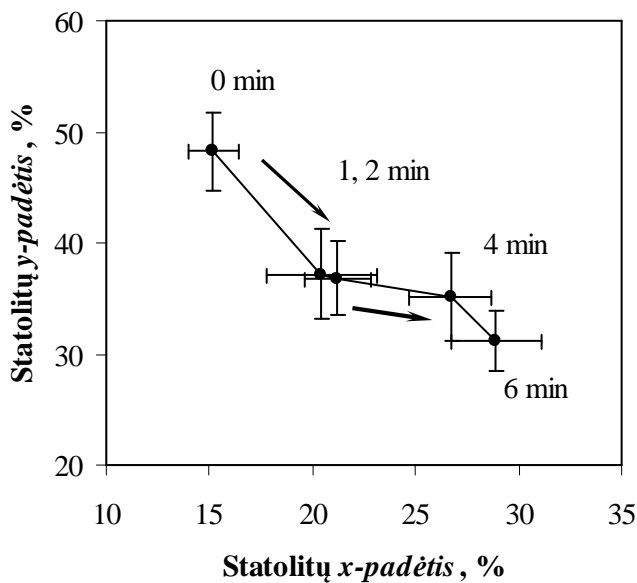
Hipokotilių statocitai. 1 g sąlygomis augusių hipokotilių statocituose amiloplastai, kaip ir šaknų statocituose, buvo išsibarstę šalia gravisensorinių ląstelių morfologinio dugno (49A pav.). Gravitacinio dirginimo lateraline



49 pav. 1 g daigų hipokotilių prieš dirginimą (A), pavertus 90° kampu po 1 min. (B), ir po 6 min. (C) gravisensorinio audinio fragmentų mikrofotografijos. Vertikali rodyklė nurodo gravitacijos vektoriaus kryptį. Mastelis – 20 µm

Statolitų judėjimo trajektorijos hipokotilių endodermio ląstelėse, kai sėjamosios pipirinės daigai buvo paversti 90° kampu, statistinės analizės duomenys pateikti 50 pav. Jau per pirmą dirginimo minutę nustatytas

statistiškai reikšmingas ir labai išreikštas statolityų poslinkis žemyn, link dešinės išilginės sienelės (y), iš pradinės 48,5 % į 37,2 % padėtį ($p \leq 0,01$) (50 pav.).



50 pav. Statolityų viduląstelinė padėtis hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse per 6-ias gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi minutes

Tuo pačiu metu amiloplastai pasistūmėjo nuo morfologinio ląstelės dugno ir išilgine kryptimi (x), iš 15,2 % į 20,4 % padėtį ($p \leq 0,05$). Sekančią dirginimo minutę žybaus statolityų poslinkio nepastebėta. Vėliau amiloplastų judėjimas atsinaujino, ir po 4 minučių judėdami išilgine kryptimi pasiekė 26,7 % (x) – padėtį ($p \leq 0,05$). Tuo metu

amiloplastų judėjimas skersai ląstelės (y) buvo labai nežymus. Po 6 minučių periodo amiloplastai pasislinko gravitacijos vektoriaus kryptimi (y) iki 31,1 % , o išilgine kryptimi (x) pasiekė 28,9 % padėtį.

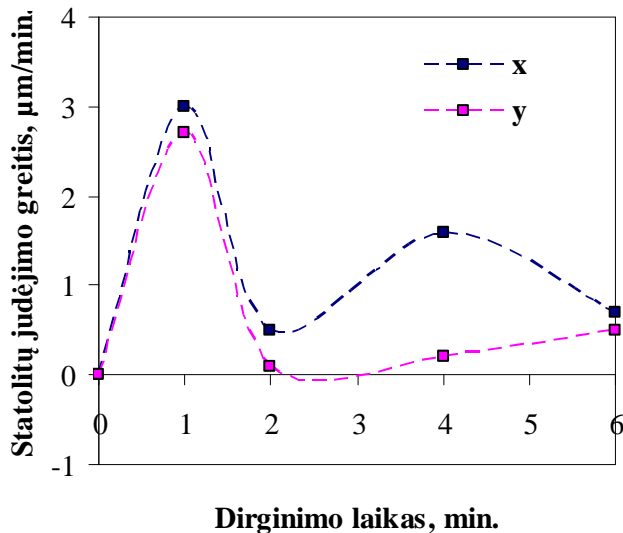
Statolityų judėjimo, skersai ir išilgai ląstelės, greičių palyginimui buvo apskaičiuotos realios nueito atstumo atskirais laiko tarpniais reikšmės (7 lentelė). Akivaizdus statolityų nueito atstumo pokytis ($\sim 3 \mu\text{m}$) abiem kryptimis nustatytas jau po pirmos dirginimo minutės. Sekančią minutę, esminio pokyčio nenustatyta. Tik po 4 minučių matomas ženklus poslinkis ($\sim 3,1 \mu\text{m}$) išilgine ląstelės kryptimi.

7 lentelė. Statolitų nuotolis (μm) nuo ląstelių morfologinio dugno ir išilginės sienelės gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu

Dirginimas, min.	Atstumas (nuotolis), μm	
	Nuo morfologinio ląstelės dugno	Nuo dešinės išilginės sienelės
0	$8,8 \pm 3,6$	$11,7 \pm 1,2$
1	$11,8 \pm 4,1^*$	$9,0 \pm 2,7^{\wedge}$
2	$12,3 \pm 3,3$	$8,9 \pm 1,6$
4	$15,4 \pm 4^*$	$8,5 \pm 2$
6	$16,7 \pm 2,7$	$7,5 \pm 2,2$

*– skirtumas nuo ankstesnio varianto statistiškai patikimas prie $p \leq 0,05$, \wedge - $p \leq 0,01$

Nustatyta, kad pirmą ir antrą dirginimo minutę, dešinės išilginės sienelės link, t.y. gravitacijos veikimo kryptimi, amiloplastai judėjo $2,7 \mu\text{m}/\text{min.}$ ir $0,1 \mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu, tuo pat metu judėdami išilgai ląstelių atitinkamai $3,0 \mu\text{m}/\text{min.}$ ir $0,4 \mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu (51 pav).



51 pav. Statolitų judėjimo išilgai (x) ir skersai (y) hipokotilių gravisensorinių ląstelių greičio kaita gravitacinio dirginimo metu

Sekančių dviejų minučių laikotarpiu amiloplastų sedimentacija buvo gana lėta ($0,2 \mu\text{m}/\text{min.}$), tuo tarpu išilgine kryptimi statolitai slinko gana intensyviai, t.y. $1,6 \mu\text{m}/\text{min.}$ greičiu. 4–6 minutę amiloplastų judėjimo greitis abiem kryptimis buvo labai panašus, t.y. $0,5\text{--}0,6 \mu\text{m}/\text{min.}$, atitinkamai.

Gautų duomenų visuma parodo, kad šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse, gravitacinio dirginimo lateraline kryptimi metu, vyko amiloplastų sedimentacija ir tuo pačiu slinkimas ląstelių centro link, tačiau judėjimo trajektorijos skyrėsi. Šaknies gravisensorinėse ląstelėse amiloplastų judėjimo intensyvumas, abiem pirmosiomis minutėmis, buvo gana aukštas abiem kryptimis, o ypač ląstelių centro link (apie 1 $\mu\text{m}/\text{min.}$ ir 1,7 $\mu\text{m}/\text{min.}$ atitinkamai). Tuo tarpu hipokotilių statocituose, pirmąją dirginimo minutę nustatytas dar spartesnis statolitų judėjimas abiem kryptimis (apie 3 $\mu\text{m}/\text{min.}$), tačiau antrą minutę statolitų judėjimas gravitacijos vektoriaus veikimo kryptimi ir išilgine kryptimi sustojo. Pažymėtina, kad 4 dirginimo minutę šaknų statocituose amiloplastams sustojus, hipokotilių statocituose jie ėmė sparčiai judėti ypač išilgine ląstelės kryptimi.

4. APIBENDRINIMAS

Gravitacinė jėga, pastovaus dydžio ir visur esantis fizinis ekologinis veiksnys Žemės augalų evoliucijos istorijoje, neabejotinai svarbi ir šiuolaikinių augalų augimui bei vystymuisi. Augalai orientuoja savo organų augimą integruodami gravitacinės jėgos atžvilgiu visus kitus kryptingus aplinkos veiksmus, tokių kaip šviesa, vanduo, mineralinės medžiagos ir t.t., signalus. Dėl nuolatinio ir vienkrypčio Žemės gravitacinės jėgos poveikio augaluose susiformavo mechanizmai, kurių pagalba atskiri augalo organai sugeba pajusti ir reaguoti į gravitacinius signalus, t.y. informaciją apie nuokrypį vertikalės (gravitacinės jėgos veikimo krypties) atžvilgiu ir/ar gravitacinės jėgos dydžio ($1 < g <$) pokyčius. Nors žinios apie tuos gravitropinės reakcijos procesus, kurie susiję su hormonų veikla, sparčiai gausėja (apžv.: Lewis et al., 2007; Overvoorde et al., 2011), ankstyvųjų, ir esminių gravitacijos jutimo fazių ląsteliniai ir molekuliniai mechanizmai dar lieka neaiškūs. Pasitelkus genetinius metodus ir naujausias mikroskopijos technologijas tikrinami ir plėtojami pagrindiniai statolitinės percepcijos hipotezės (Nemec (1900) ir Haberlandt (1900)), teiginiai apie amiloplastų ir kitų gravisensorinės ląstelės komponentų, visų pirma – citoskeleto, vaidmenį gravitacinių signalų jutimo ir viduląstelinės vektorinės informacijos formavime.

Eksperimentiniai duomenys liudija, kad amiloplastų judesiai gravisensorinėse ląstelėse pakitus gravitacijos parametrams yra pirminis jutimo aktas, suteikiantis galimybę tolimesniems gravitacinės potencinės energijos virsmams į kinetinę (van Loon, 2008), o vėliau į kryptingą biocheminį signalą nepriklausomai nuo to, kokio ženklo gravitropinius judesius realizuoja tiriamas augalo organas (Merkys et al., 1981, 1983; Saito et al., 2005; Vitha et al., 2007; Leitz et al., 2009; Kiss et al., 2009). Neabejojama citoskeleto aktinomiozino sistemos dalyvavimu amiloplastų lokalizacijos palaikyme ir judėjime šaknų statocituose (Volkman, Baluška, 2000; Laurinavičius et al., 2001; Driss-Ecole et al., 2003; Perbal et al., 2004; Lefranc et al., 2005; Perbal, 2009). Tuo tarpu duomenys apie amiloplastų ir citoskeleto elementų sąveiką

neigiamai gravitropiškų organų (hipokotilių, stiebų, žiedstiebių) statocitų veikloje yra kontraversiški (Volkman et al., 1993; Hou et al., 2003; Palmieri et al., 2007; Kumar et al., 2008; Kiss, 2009). Taigi, klausimas apie gravitacijos jutimo teigiamai ir neigiamai gravitropiškuose daigo organuose universalumą, vis dar diskutuojamas. Atlikto tyrimo metu pirmą kartą buvo palyginti to paties daigo šaknies ir hipokotilio gravitacijos jutimo savitumai skirtingomis gravitacinio dirginimo sąlygomis. Netiesioginiu eksperimentiniu metodu, t.y. kiekybiškai analizuojant amiloplastų statikos ir kinetikos priklausomybę nuo gravitacinės jėgos veikimo krypties ir dydžio, buvo įvertinta citoskeleto reikšmė poliarizuotos šaknų ir hipokotilių statocitų struktūros palaikymui ir viduląsteliniais amiloplastų judesiams daigų gravitacinio dirginimo metu. Eksperimentai atlikti su sėjamosios pipirnės (*Lepidium sativum* L.) daigais kosminiame biopalydove „Bion-10“ (borto centrifuga „Neris-5“) ir laboratorinėmis sąlygomis, tamsoje, keičiant gravitacinės jėgos dydį nuo mikrogravitacijos (reali kosmose arba imituota horizontaliu klinostatu) iki 1 g (imituota centrifugavimu arba natūrali Žemės gravitacija) ir/ar keičiant jos veikimo kryptį 90° arba 180° kampu daigo išilginės ašies atžvilgiu.

Gravisensorinių audinių augimas ir išsivystymas užtikrina augalų gebėjimą justi ir priimti gravitacinius signalus. Šaknų šalmelių statenchima ir hipokotilių endodermis – tai kompaktiški audiniai, bet jų pradmenys, ląstelių augimo kryptis ir struktūrinė organizacija skiriasi iš esmės. Todėl buvo galima tikėtis jų ląstelių skirtingų augimo reakcijų daiguose, kurie augo be natūralios gravitacijos ir jai veikiant įprastine kryptimi, t.y. išilgai daigo šaknies viršūnės kryptimi. Sėjamosios pipirnės daigai kosminiame eksperimente buvo 28 val. amžiaus (12 pav.). Tai toks sėjamosios pipirnės daigo vystymosi laikotarpis, kuomet šaknyse jau vyksta intensyvus atskirų audinių, tuo pačiu ir gravisensorinio audinio, ląstelių tįstamasis augimas ir diferencijacija (Merkys et al., 1983), o hipokotiliuose – dar tik prasideda (Volkman et al., 1993). Imitaciniuose bandymuose daigai buvo 32 val. amžiaus, kuomet ne tik šaknų statocitų, bet ir hipokotilių endodermio audinio ląstelės, sprendžiant pagal jų ilgio kitimą išilginėje eilėse (22 pav.), augo intensyviai.

Nepriklausomai nuo augimo laiko ir gravitacinės aplinkos, visų variantų daigų šaknyse susiformavo šalmeliai su 8 ląstelių sluoksnių statenchima (13 ir 18 pav.), kurios šešių apatinių sluoksnių ląstelėse – funkcionuojančiuose statocituose rastas panašus mobilių amiloplastų skaičius (15 pav.). Esminio skirtumo tarp statocitų matmenų šiuose statenchimos sluoksniuose nebuvimas rodo, kad realios (14 pav.) ir imituotos mikrogravitacijos poveikis (19 ir 20 pav.) šaknies gravisensorinių ląstelių linijiniam ir radialiniam augimui buvo minimalus. Taigi, galima teigti, kad gravitacinės jėgos buvimas nėra būtina sąlyga šaknies gravisensorinio audinio formavimuisi. Gauti duomenys neprieštarauja bendrai nuostatai, kad gravitacijos reikšmė augalų šaknų statenchimos augimui ir vystymuisi nėra esminė (Merkys et al., 1981; Perbal, Driss-Ecole, 1989; Laurinavičius et al., 1996; Sievers, 2000; Kiss, 2000; Laurinavičius, Švegždienė, 2000; Driss-Ecole, 2000; Driss-Ecole et al., 2003).

Daigų hipokotiliuose gravisensorinis – endodermio audinys, žiedu supantis centrinį veleną, taip pat formavosi ir diferencijavosi į funkcionuojančius statocitus ir mikrogravitacijos, ir 1 g sąlygomis (16 ir 21 pav.), bet skirtingai. Ženkliai smulkesnių endodermio ląstelių buvimas apikalinėse, o didesnių – bazalinėse hipokotilių atkarpose leidžia manyti, kad veikiant imituotai ar natūraliai gravitacijai (1 g) tam tikras šių, kaip ir kitų audinių ląstelių, skaičius buvo dalijimosi, tįsimo ir diferenciacijos fazėse (1 lentelė). Realios mikrogravitacijos sąlygomis hipokotilių endodermio ląstelių augimas buvo ženkliai lėtesnis, vyravo tįstamasis ir radialinis augimas. Neatmestina prielaida, kad panašaus ilgio hipokotiliuose endodermio ląstelių skirtingo augimo priežastimi galėjo būti techniniai automatinės borto centrifugos sistemų darbo nesklaidumai, sunkiai sukontroliuojami kosminiuose bandymuose. Kita vertus, panaši hipokotilių endodermio ląstelių augimo priklausomybė nuo gravitacijos buvo stebima ir 32 val. amžiaus daiguose (22 pav.). Palyginus su imituota mikrogravitacija, natūralios gravitacijos sąlygomis endodermio ląstelės, esančios dalijimosi fazėje, ženkliai anksčiau perėjo į tįsimo fazę, o pats tįstamasis augimas vyko daug intensyviau.

Panašus teigiamas gravitacijos poveikis buvo ir radialiniam endodermio ląstelių augimui (23 pav.).

Panašūs imituotos (Merkys et al., 1983) ir realios mikrogravitacijos sąlygų (Merkys et al., 1989) efektai buvo nustatyti ir salotų šaknų epidermio ląstelių augimui. Pastarųjų metų kosminiai ir modeliniai baltažiedžio vairo tyrimai taip pat pateikė visą eilę faktų apie pakitusios gravitacijos poveikį augalų metaboliniams procesams, vidinių signalų sklaidai, genų ekspresija reguliuojamai struktūrinei ląstelinių organizacijai bei stresinėms reakcijoms (Moseyko et al., 2002; Kimbrough et al., 2004; Martizivanou et al., 2006; Barjaktarovic et al., 2009). Hipokotilių endodermio citomorfometrijos rezultatai, kaip ir minėti faktai, liudija, kad gravitacijos pokyčiai gali modifikuoti augalinio organizmo funkcijas atskiruose struktūriniuose lygmenyse. Ne išimtis ir gravisensorinė funkcija. Žinoma, kad lęšio ir sėjamosios pipirinės daigų, augančių mikrogravitacijos sąlygomis, šaknys ženkliai jautresnės ir reaguoja greičiau už šaknis daigų, augančių veikiant natūraliai gravitacijai (Driss-Ecole et al., 2000; Laurinavičius et al., 2001). Viena šio reiškinių priežasčių galėtų būti amiloplastų viduląstelinio išsidėstymo ir mobilumo pokyčiai, kai gravisensorinių ląstelių struktūra formuojasi be gravitacijos.

Veikiant imituotai ar natūraliai gravitacijai, gravitacijos jutikliai – amiloplastai sėjamosios pipirinės daigų šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse buvo susigrupavę arti morfologinio ląstelių „dugno“ (13A,B, 16A,B, 18A ir 21A pav.), todėl buvo akivaizdi ląstelių struktūros išilginė poliarizacija. Šiuo atveju amiloplastų lokalizacijai ir neigiamai, ir teigiamai gravitropiškų organų statocituose didžiausią poveikį turėjo 1 g dydžio gravitacinė jėga, atsverianti viduląstelinį jėgų (plūdrumo, trinties, citoskeleto elementų generuojamos elastinės jėgos ir t.t.) visumą (Todd, 1994; Björkman, 1988; Yoder et al., 2001). Realios ar imituotos mikrogravitacijos sąlygomis amiloplastai šaknų statocituose buvo susigrupavę centrinėje ląstelių srityje (13C ir 18B pav.), o hipokotilių endodermio ląstelėse pasklidę po citoplazmą (16C ir 21B pav.). Tačiau jų vidutinis nuotolis nuo morfologinio ląstelių dugno

santykiniais vienetais buvo apie 48 % ląstelių ilgio (14, 17, 19B ir 22B pav.) ir šaknų, ir hipokotilių funkcionuojančiuose statocituose. Taigi, galima manyti, kad, augant sėjamosios pipirnės daigams be gravitacijos, amiloplastų išsidėstymą, nors ir skirtingą, lėmė aukščiau minėtų viduląstelinių jėgų veikla. Statolitų pasiskirstymo išilgai statocitų, kuomet daigai augo skirtingo dydžio gravitacijos sąlygomis, tyrimų rezultatai patvirtino šią prielaidą. Formos panašumas tarp pasiskirstymo linijinių diagramų (25 ir 28 pav.) parodo, kad amiloplastų padėtis abiejų organų statocituose keitėsi ne kaip pavienių struktūrinių elementų, o kaip paslankiai organizuotų struktūrų. Kaip buvo minėta, pastaraisiais metais intensyviai nagrinėjama aktino filamentų ir motorinio baltymo – miozino struktūrinė būklė ir galimi kontaktai su amiloplastais keičiant gravitacinės jėgos veikimo kryptį (Palmieri et al., 2007; Kiss et al., 2009; Morita, 2010). Tačiau nėra žinoma, ar hipogravitacijos sąlygomis jų reikšmė amiloplastų lokalizacijai šaknų ir hipokotilių statocituose tokia pati. Mūsų duomenys, nors ir netiesiogiai, demonstruoja citoskeleto elementų tinklo poveikį statolitų išsidėstymui išilgai šaknų statocitų ir hipokotilių endodermio ląstelių.

Statolitų statikos priklausomybės nuo daigus įprastine kryptimi pastoviai veikiančios 0,004; 0,008; 0,02; 0,01; 0,5 ar 1 g dydžio gravitacinės jėgos tyrimas leido įvertinti viduląstelinių jėgų dydžio ribines reikšmes. Nustatyta, kad ši priklausomybė ir šaknų, ir hipokotilių statocituose patenkinamai aprašoma logaritmine funkcija (26 ir 29 pav.). Amiloplastų lokalizacija šaknų statocituose veikiant 0,004 g (24A,B ir 25 pav.), o hipokotilių endodermio ląstelėse ir esant du kartus didesniai svarumui buvo panaši, kaip ir imituotos mikrogravitacijos sąlygomis (27A,B ir 28 pav.). Esminė amiloplastų sedimentacija šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse įvyko daigams augant 0,02 g sąlygomis (24C, 25 pav. ir 27C, 28 pav., atitinkamai). Taigi, statolitus iš nesvarumui būdingos būsenos šaknų statocituose priverčia nusėsti gravitacinė jėga, didesnė už 0,004 g ir hipokotilių statocituose – didesnė už 0,008 g.

Kaip minėta, 1 g dydžio gravitacinė jėga laiko prispaudusi statolitus prie morfologinio statocitų dugno abiejuose sėjamosios pipirnės daigų ašiniuose organuose (24E ir 27E pav.). Kokio dydžio gravitacinė jėga jau nebeužtikrina tokio amiloplastų išsidėstymo, t.y. nebekompensuoja priešingos krypties viduląstelinių jėgų? Mūsų duomenimis, statistiškai patikimas plastidžių pakilimas nuo morfologinio ląstelių dugno šaknų statocituose įvyko veikiant dešimt kartų mažesnei už 1 g jėgai (24D, 25 ir 26 pav.). Analogiškas amiloplastų pakilimas hipokotilių endodermio ląstelėse įvyko veikiant per pusę mažesnei už 1 g, t.y. 0,5 g dydžio jėgai (28 ir 29 pav.). Aukščiau išdėstyti faktai leidžia manyti, kad priešingo gravitropiškumo organų statocituose viduląstelinių jėgų, susijusių su amiloplastų išsidėstymu, dydis yra skirtingas. Šaknų statocituose statolitus aukštyn tempia jėga, kurios dydis yra tarp 0,1 g ir 1 g, hipokotilių endodermio ląstelėse ji penkis kartus stipresnė, t.y. tarp 0,5 g ir 1 g. Literatūros duomenų apie viduląstelinių jėgų poveikį amiloplastų statikai antžeminių organų statocituose neradome, tačiau žinomi keli šios krypties tyrimai, atlikti su šaknimis: lęšio šaknų statocituose amiloplastai nuo „morfologinio dugno“ pakyla esant 0,14 g dydžio svarumui (Driss-Ecole et al., 2000), sėjamosios pipirnės šaknų statocituose – esant 0,3–0,4 g (Laurinavičius et al., 2001).

Neabejotina, kad aptariamą statolitų viduląstelinį pasiskirstymą ir jo pokyčius išilgai ląstelių sąlygojo ne tik struktūriškai su jais siejamų citoskeleto elementų veikla, bet ir gravisensorinių ląstelių struktūrinės organizacijos specifika. Kaip minėta anksčiau, didžiąją hipokotilių ar žiedstiebių endodermio ląstelių dalį užima centrinės vakuolės (Volkman et al., 1993; Kiss, 2000; Kato et al., 2002; Morita, Tasaka, 2004), čia vyksta aktyvus citoplazmos sruvenimas, siejamas su aktino-miozino sistemos veikla (Groling, Pierson, 2000). Jei funkcionuojančiuose sėjamosios pipirnės šaknų statocituose randama daug smulkių po citoplazmą pasiskirsčiusių vakuolių (13 ir 18 pav.), tai didžiąją dalį hipokotilių endodermio ląstelės užima centrinė vakuolė, kuri spaudžia citoplazmą ir organeles, tarp jų ir amiloplastus bei citoskeleto elementus, į ląstelių periferiją ar ją vagojančius transvakuolinius raiščius (16 ir

27 pav.). Statolitų ir citoskeleto elementų sąveikos raiška šaknų ir antžeminių organų statocituose pakitus gravitacijai galėtų skirtis ir dėl šios priežasties.

Visuma aukščiau išdėstytų duomenų apie amiloplastų statikos priklausomybę nuo gravitacinės jėgos dydžio patvirtina viduląstelinių jėgų, visų pirma citoskeleto generuojamų elastingų jėgų, dalyvavimą amiloplastų lokalizacijos išilgai statocitų palaikyme ir teigiamai, ir neigiamai gravitropiškuose sėjamosios pipirinės daigų organuose. Ar šios jėgos veikia amiloplastų judesius abiejų organų statocituose ankstyvųjų gravitacinio signalo jutimo fazių metu, o jei veikia, tai kaip? Ar sąlygos statolitų judesiams atskirose abiejų organų statocitų srityse panašios? Atsakymų į šiuos klausimus buvo ieškoma lyginant statolitų kinetiką statocituose daigų, augusių veikiant natūraliai gravitacijai arba be jos, kuomet keitėme gravitacinės jėgos veikimo kryptį 180° arba 90° kampu, o jos dydį – nuo imituotos mikrogravitacijos į 1 g ir atvirkščiai. Pirmasis gravitacinio dirginimo metodas leido įvertinti amiloplastų atsakomųjų judesių išilgai statocitų savitumus, antrasis – judesių skersai statocitų ypatumus. Sėjamosios pipirinės daigų gravitacinio dirginimo procedūros buvo tęsiamos iki 24 minučių. Nors šaknų gravitropinės reakcijos latentinis laikas yra beveik dvigubai trumpesnis (Laurinavičius et al., 2001), hipokotilių reakcija į pavertimą 90° kampu gravitacijos atžvilgiu pasireiškia po 24 minučių (duomenys neskelbti).

Sėjamosios pipirinės daigų, augusių natūralios gravitacijos sąlygomis, hipokotiliuose amiloplastai buvo nusėdę arčiau morfologinio statocitų dugno (34A pav.), nei šaknyse (30A pav.). Tokius daigus perkėlus į horizontaliu klinostatu imituojamą mikrogravitaciją arba juos apvertus 180° kampu natūralios gravitacijos vektoriaus atžvilgiu, statolitai judėjo statocitų centro kryptimi ir hipokotiliuose, ir šaknyse (34 ir 30 pav.). Vyrauja nuostata, kad šaknų statocituose statolitų kilimą į ląstelės centrinę sritį provokuoja viduląstelinės, citoskeleto generuojamos jėgos, kuomet kosmose eliminuojamas išilginis 1 g dirginimas borto centrifuga arba Žemėje augantys daigai perkeliama į klinostatą (Volkman et al., 1991; Laurinavičius et al., 1997; Driss-Ecole et al., 2000; 2001; Gaina et al., 2003; Perbal et al., 2004).

Mūsų duomenys leidžia taikyti aukščiau minėtą nuostatą ir 1 g hipokotilių endodermio ląstelėms, nes statolitų judėjimo kryptis ir greitis, kaip ir šaknų statocituose, priklausė nuo dirginančios gravitacinės jėgos pokyčių (36 ir 32 pav., atitinkamai).

Kita vertus, matoma ir keletas esminių skirtumų tarp statolitų judesių išilgai šaknų ir hipokotilių statocitų. Šaknyse abiem dirginimo atvejais per pirmąsias dvi minutes amiloplastų poslinkis buvo panašus (31 pav. ir 2 lent.). Galima buvo tikėtis, kad šaknyse daigų, apverstų 180° kampu, statolitų judėjimas pirmosiomis dirginimo minutėmis bus intensyvesni, negu perkeltų į klinostatą, nes statocitų centro kryptimi veikiančios viduląstelinės jėgos turėjo sumuotis su 1 g dydžio gravitacine jėga. Vienas iš paaiškinimų galėtų būti grindžiamas kitų autorių duomenų aptarimu. Pagal Stokso dėsnį (Audus, 1962) dalelės judėjimas klampia aplinka priklauso nuo jos spindulio, dalelės ir aplinkos tankių skirtumo, citoplazmos klampumo ir veikiančios jėgos dydžio. Pastaraisiais metais nemažai dėmesio aiškinantis gravitacijos jutimo procesus skiriama citoplazmos klampumui (Scherp, Hasenstein, 2007; Leitz et al., 2009). Taip pat ne visada pasitvirtina nuostata apie tiesioginę priklausomybę tarp gravitacinio stimulo dozės, statolitų judesių ir reakcijos intensyvumo (Braun, Sievers, 1993; Laurinavičius et al., 2001; Braun et al., 2002; Braun, Limbach, 2006). Sack ir kolegų (1984) teigimu, statolitų sedimentacija gravitropiškai dirginamų šaknų statocituose lėtėja netgi palaikant tokį patį veikiančios jėgos dydį. Atsižvelgiant į šiuos faktus galima teigti, kad statolitų judėjimas išilgai ląstelės ir jų greitis priklauso ne tik nuo dirginančios jėgos, bet ir nuo reologinių citoplazmos savybių, kurios gali šalia judančių statolitų keistis labai greitai (Björkman, 1988; Leitz et al., 2009). Taigi, mūsų nuomone, pirmųjų dviejų minučių daigų inversijos laikotarpiu statolitų judėjimas išilgai šaknų statocitų galėjo silpti dėl intensyviai gravitacijos ir viduląstelinių jėgų kryptimi judančių statolitų ir juos supančios citoplazmos sąveikos.

Apvertus 1 g daigus 180° kampu, per pirmąsias dvi minutes amiloplastai hipokotiliuose nuo morfologinio endodermio ląstelių dugno kilo žymiai sparčiau, nei po perkėlimo į klinostatą (35 pav. ir 3 lent.), kuomet buvo

panaikintas vienkryptis gravitacijos poveikis. Akivaizdu, jog hipokotilių statocituose gravitacinė jėga veikė statolitų judėjimą daug stipriau už viduląstelines jėgas ir priešingai, nei šaknų statocituose, sustiprino jų poveikį. Gali būti, kad reologinės citoplazmos savybės morfologiškai „apatinėse“ šaknų ir hipokotilių statocitų srityse skiriasi, todėl gravitacijos poveikis amiloplastų judėjimui nėra panašus. Kita vertus, akivaizdūs šių ląstelių struktūrinės organizacijos skirtumai. Šaknų statocituose smulkios vakuolės pasiskirsčiusios po visą ląstelės tūrį (30 pav.) ir statolitų judėjimas išilgai ląstelės vyko tolygiai (31 pav.). Hipokotilių statocituose amiloplastai, nepriklausomai nuo gravitacinės situacijos, buvo išsidėstę ir judėjo daugiausiai ląstelių periferija (34 pav.), aplenkdami centrinės vakuolės sritį (35 pav.). Todėl tikėtina, kad hipokotilių statocituose centrinės vakuolės trikdo viduląstelinių jėgų veikiamą amiloplastų judėjimą.

Palyginus realias amiloplastų judesio reikšmes nustatyti akivaizdūs laikiniai jų judėjimo skirtumai šaknų ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse. 1 g šaknų statocituose kaip po perkėlimo į klinostatą, taip ir po inversijos, ženklus statolitų poslinkis išilgai ląstelės įvyko per pirmąsias dvi minutes (2 lentelė). Per šį laikotarpį abiem atvejais vidutinis plastidžių judėjimo greitis buvo apie 1,1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Panašias reikšmes sėjamosios pipirinės šaknų statocituose nustatė Iversen (1968) ir Volkmann (1991) su kolegomis, analizuodami statolitų judesius 6 minučių inversijos laikotarpiu (1,1 $\mu\text{m}/\text{min}$. ir 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$., atitinkamai).

1 g hipokotilių endodermio ląstelėse statistiškai patikimas amiloplastų pakilimas nuo morfologinio ląstelių dugno nustatytas tik po 6 klinostatavimo minučių (3 lentelė), o jis vyko maždaug 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu. Kosmose, po perkėlimo iš imituotos 1 g gravitacijos į realią mikrogravitaciją 0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu amiloplastai judėjo 6 minučių laikotarpiu sėjamosios pipirinės šaknų statocituose (Gaina et al., 2003) ir 0,15 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu 29 min. laikotarpiu 1 g lęšio šaknų statocituose (Driss Ecole et al., 2000). Taigi, perkėlus 1 g daigus į imituotą ar realią mikrogravitaciją, amiloplastai 6 minučių laikotarpiu gravisensorinėse ląstelėse kyla nuo morfologinio ląstelių dugno panašiu

greičiu. Be to, pakeitus gravitacijos veikimo kryptį 180° kampu (inversija), statolitur kilimas nuo morfologinio ląstelių dugno hipokotilių statocituose vyko žymiai greičiau (33 ir 37 pav.), nei šaknų statocituose ($3,0 \mu\text{m}/\text{min.}$ ir $1,1 \mu\text{m}/\text{min.}$, atitinkamai). Perkėlus daigus į imituotą mikrogravitaciją, priešingai, statolitur judėjimas šia kryptimi buvo intensyvesnis šaknų, nei hipokotilių statocituose.

Sėjamosios pipirnės daigų, augusių klinostatu imituotos mikrogravitacijos, kaip ir realios, sąlygomis, šaknų statocituose amiloplastai buvo susigrupavę centrinėje ląstelės dalyje (38A pav.), hipokotilių endodermio ląstelėse išsibarstę po visą ląstelę ir dauguma jų, dėl centrinės vakuolės spaudimo susitelkė ląstelės periferijoje (42A pav.). Paveikus tokius daigus natūralia gravitacine jėga šaknies viršūnės arba priešinga kryptimi, jau po pirmos minutės abiejų organų gravisensorinėse ląstelėse stebimas akivaizdus statolitur poslinkis jėgos kryptimi (38B,D, 42B,D pav.). Taigi, plastidės nekliudomai judėjo link abiejų statocito polių veikiant gravitacijai ir, gali būti, aktino mikrofilamentams. Be to, šis faktas leidžia teigti, kad ir šaknų, ir hipokotilių statocitų centrinės srities citoplazma yra beveik homogeniška. Vėliau hipokotilio endodermio ląstelėse statolitur sedimentacija morfologinio ląstelės dugno kryptimi sulėtėjo, tačiau priešinga kryptimi vyko panašiu greičiu iki 12-tos dirginimo minutės (43 pav.). Šaknų statocituose panašūs statolitur judėjimo pokyčiai prasidėjo vėliau, t.y. nuo 4-tos dirginimo minutės. Taigi, galima teigti, kad sąlygos statolitur judėjimui išilgai šaknų ir hipokotilių statocitų artėjant prie jų polių yra skirtingos.

Kuomet sėjamosios pipirnės daigai buvo veikiami natūralia gravitacija šaknies viršūnės kryptimi, statolitur sedimentacijos lėtėjimą abiejų organų gravisensorinėse ląstelėse, mūsų nuomone, sąlygojo priešingos krypties viduląstelinės jėgos, t.y. citoskeleto elementų generuojamos elastingos jėgos, kurios tempia plastides link ląstelės centro, bei trinties jėga, kuri atsiranda sąveikaujant judantiems amiloplastams su aplinka. Kadangi šaknų statocitų ilgis apie penkis kartus mažesnis už hipokotilių endodermio ląstelių ilgį,

galima prielaida, kad šių viduląstelinių jėgų visuma panašiai veikia gravitacija indukuotą statolitų sedimentaciją ir hipokotilių endodermio ląstelėse.

Augalų jautrumo gravitropiniam dirginimui tyrimų duomenimis, daigų šaknys yra apie dešimt kartų jautresnės už antžemines augalo dalis (Shen-Miller et al., 1968; Merkys et al., 1984; Merkys et al., 1986). Gali būti, kad šis skirtumas susijęs su skirtingomis sąlygomis statolitų sedimentacijai teigiamai ir neigiamai gravitropiškų organų statocituose ankstyvosiomis gravitacijos jutimo fazėmis. Gravitacijos jutimo procesų šaknyse tyrimai atskleidė, jog statolitai juda ne tik gravitacijos vektoriaus kryptimi, bet vyksta jų judėjimas ir išilgine kryptimi (Iversen, Larsen, 1971; Volkmann et al., 1991; Laurinavičius et al., 2001; Driss-Ecole et al., 2003; Gaina et al., 2003; Perbal, 2004; Leitz et al., 2009). Atsižvelgiant į *Chara* rizoidų citoplazmos klampumo analizės duomenis (Scherp, Hasenstein, 2007) ar statolitų judesių gyvoje *Arabidopsis thaliana* šaknų kolumelės ląstelėse gravitropinio dirginimo skersine kryptimi metu tyrimo duomenis (Leitz et al., 2009) manoma, jog augalų gravitacijos jutimo procesuose svarbus aktino-miozino vaidmuo bei citozolio mechaninės savybės. Leitz ir kt. (2009) nustatė, kad staigus amiloplastų poslinkis link statocito centro gravitropiškai dirgintose gyvoje *Arabidopsis* šaknų gravisensorinėse ląstelėse vyksta tuoj po daigų reorientacijos 90° kampu ir pirminis atsakas užfiksuotas maždaug po vienos sekundės.

Atlikto amiloplastų sedimentacijos kinetikos, kuomet 1 g sėjamosios pipirnės daigai buvo dirginami natūralia gravitacija lateraline kryptimi, tyrimų duomenys taip pat leidžia teigti, jog abiejų ašinių organų gravisensorinėse ląstelėse kartu su gravitacija veikia viduląstelinės jėgos, visų pirma citoskeleto generuojamos elastinės jėgos, aktyviai tempiančios amiloplastus išilgine kryptimi (47 ir 50 pav.). Kita vertus, per šešių minučių dirginimo laikotarpį išryškėjo kai kurie statolitų judėjimo trajektorijų ir greičio skirtumai hipokotilių ir šaknų statocituose. Pirmąją minutę amiloplastai hipokotilių endodermio ląstelėse judėjo ženkliai greičiau gravitacijos vektoriaus kryptimi ir tuo pat metu slydo link ląstelės centro apie 3 μm/min. greičiu (51 pav). Tačiau per sekančią minutę hipokotilių statocituose amiloplastai beveik nekeitė

savo padėties, o šaknų statocituose jie ir toliau intensyviai slinko išilgai ląstelės apie 1,7 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu, lėtai judėdami žemyn 0,7 $\mu\text{m}/\text{min}$. greičiu (48 ir 51 pav.). Tokie ir vėlesni amiloplastų judesiai, kuomet nuo 4-tos dirginimo minutės statolitų slinkimas išilgai šaknų statocitų sulėtėjo, o išilgai hipokotilių statocitų – pagreitėjo, atitinka tyrimų rezultatus, ir patvirtina mūsų hipotezę, kad endodermio ląstelių morfologinio dugno srities struktūra ir citoplazmos reologinės savybės yra kitokios, nei atitinkamoje šaknų statocitų srityje.

Nepaisant prieštaringų nuomonių dėl citoskeleto įtakos antžeminės augalo dalies gravitacijos jutimo procesui, mūsų gauti rezultatai patvirtina nuostatą, kad, nepriklausomai nuo gravisensorinio audinio organizacijos ir statocitų struktūros, citoskeletas aktyviai dalyvauja gravitacijos pokyčiais indukuotame amiloplastų judėjime sėjamosios pipirinės hipokotilio endodermio ląstelėse taip pat, kaip ir šaknies statocituose.

Atlikto tyrimo rezultatai suteikia pagrindą tolimesniems priešingai gravitropiškų augalo organų jautrumo gravitacijai procesų tyrimams.

IŠVADOS

1. Gravitacinės jėgos buvimas nėra būtina sąlyga sėjamosios pipirinės daigų šaknų ir hipokotilių gravisensorinio audinio formavimuisi, bet jai neveikiant (reali ir imituota mikrogravitacija) sulėtėjo hipokotilių endodermio ląstelių augimas, keitėsi šių audinių ląstelių (statocitų) poliškumas dėl esminio amiloplastų pakilimo ląstelių centro kryptimi.

2. Nustatyta logaritminė priklausomybė tarp gravitacinės jėgos, nuolat veikiančios daigus įprastine šaknies viršūnės kryptimi, dydžio ir amiloplastų išsidėstymo išilgai šaknų ir hipokotilių statocitų. Amiloplastų išsidėstymui šaknų statocituose būdingas unimodinis pasiskirstymas nepriklausomai nuo gravitacijos dydžio. Hipokotilių statocituose unimodinis amiloplastų pasiskirstymas pasikeitė į bimodinį, kuomet gravitacinė jėga sumažėjo nuo 1 g iki 0,02 g.

3. Šaknų statocituose viduląstelinis jėgų, kurios pakelia amiloplastus priešinga gravitacijos vektoriui kryptimi iš apatinės ląstelių srities, dydis yra nuo 0,1 g iki 1 g, hipokotilių endodermio ląstelėse – nuo 0,5 g iki 1 g. Viduląstelinis jėgų, palaikančių mikrogravitacijos sąlygoms būdingą amiloplastų išsidėstymą šaknų statocituose, dydis yra nuo 0,004 g iki 0,02 g, o hipokotilių – nuo 0,008 g iki 0,02 g.

4. Pakeitus gravitacinės jėgos dydį nuo 1 g į imituotą mikrogravitaciją arba pakeitus įprastinę veikimo kryptį 180° (inversija), amiloplastai kyla nuo morfologinio gravisensorinių ląstelių dugno. Šaknų statocituose pirmąsias dvi minutes amiloplastai kilo panašiu greičiu daigus dirginant abiem metodais, vėliau judėjimas tęsėsi inversijos atveju, bet sulėtėjo mikrogravitacijos sąlygomis. Hipokotilių statocituose pirmųjų dviejų minučių laikotarpiu amiloplastai kilo ženkliai intensyviau daigų inversijos metu nei imituotos mikrogravitacijos sąlygomis.

5. Pakeitus gravitacinės jėgos dydį nuo imituotos mikrogravitacijos į 1 g ir keičiant jos kryptį link šaknies arba hipokotilio (inversija) apeksų, amiloplastai ir šaknų, ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse juda iš mikrogravitacijai būdingos padėties gravitacijos veikimo kryptimi, tačiau skirtingu greičiu. Šaknų statocituose amiloplastų judėjimas vyko abiem kryptimis panašiu greičiu pirmąsias keturias minutes. Hipokotilių statocituose jie judėjo pirmąją minutę apie du kartus greičiau link morfologinio ląstelių dugno, nei priešinga kryptimi.

6. Dirginant daigus skersine kryptim natūralia (1 g) gravitacine jėga, vyksta amiloplastų sedimentacija, bet jos trajektorija ir greitis hipokotilių ir šaknų gravisensorinėse ląstelėse skiriasi. Šaknų statocituose amiloplastai pirmąją minutę judėjo ir gravitacijos veikimo, ir ląstelės centro kryptimi panašiu greičiu, o antrąją minutę – ženkliai greičiau ląstelės centro kryptimi. Hipokotilių statocituose amiloplastai pirmąją minutę žymiai greičiau judėjo gravitacijos veikimo kryptimi nei ląstelės centro link, o antrąją minutę – panašiu greičiu abiem kryptimis.

7. Gravitacinės jėgos ir viduląstelių jėgų sąveikos įtaka amiloplastų kinetikai priklauso nuo šaknų ir hipokotilių statocitų struktūros savitumų, bei realių jų dydžio reikšmių.

8. Amiloplastų statikos ir kinetikos tyrimo duomenų visuma patvirtina, kad viduląstelinės jėgos, visų pirma generuojamos citoskeleto, moduluoja nuo gravitacinės jėgos priklausomą amiloplastų išsidėstymą ir judėjimą ir šaknų, ir hipokotilių gravisensorinėse ląstelėse.

DISERTACIJOS TEMA SKELBTŲ MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

STRAIPSNIAI

leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje „ISI Web of Sciences“

1. Švegždienė D., **Koryznieė D.**, Raklevičienė D. Comparison study on gravity-dependent longwise positioning of amyloplasts in statocytes of cress roots and hypocotyls. – *Microgravity Sci. Technology* 2011; 23: 235–241.
2. Švegždienė D., **Koryznieė D.**, Raklevičienė D. Structural polarity of gravisensing cells in garden cress seedlings under varying gravity conditions. – *Acta Physiologiae Plantarum* 2009; 3(Supl.1*): 112–113.
3. Gaina V., Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.**, Stanevičienė R., Laurinavičius R. Kinetics of amyloplast movement in cress root statocytes under different gravitational loads. – *Advances in Space Res* 2003; 31(10): 2275–2281.

leidiniuose įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą

1. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.** Gravity-dependent movement of amyloplasts along gravisensing cells of *Lepidium sativum* hypocotyls. – *Botanica Lithuanica* 2009; 15(3): 189–195.
2. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.** Grav sensing in hypocotyls and roots of garden cress seedlings. – *Biologija* 2007; 53(2): 63–66.
3. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.** Gravity-related longitudinal motion of amyloplasts in root statocytes. – *Botanica Lithuanica* 2007; 13(2): 131–136.

kituose recenzuojamuose tarptautiniuose, užsienio ir Lietuvos leidiniuose

1. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.** Gravity-induced amyloplast motion in hypocotyl and root statocytes of cress seedlings. – *Journal of Gravitational Physiology* 2008; 15(1): 181–182.

2. Švegždienė D., **Koryznieņ D.**, Raklevičienė D. Gravisensing of garden cress roots under varying g - magnitude. – Sodininkystė ir Daržininkystė 2008; 27(2): 75–82.
3. **Коризне Д.**, Швягжде Д. Изучение функционирования грависенсорных клеток корней кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). – Молодежь в науке - 2009. Приложение к журналу «Известия Национальной академии наук Беларуси» 2010; 4: 147–151.

TEZĖS IR SPAUSDINTI MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ PRANEŠIMAI:

1. **Koryznieņ D.**, Švegždienė D., Raklevičienė D. Statolith localization along statocytes of cress seedlings in hypogravity (from 0.004 g to 1 g). – “Gravity from μ to x ”. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly. Program and abstracts. University of Antwerp, Belgium. 5–9 September 2011. 169–170.
2. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieņ D.** Positioning of amyloplasts along hypocotyl and root statocytes of cress seedlings under different gravitational loads. – “Life in space for life on earth”. 31st Annual ISGP Meeting. 11th ESA Life Sciences Symposium. 5th ISSBB Symposium. ELGRA Symposium. Abstracts. Trieste, Italy. 13–18 June 2010. 117.
3. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieņ D.** Comparison study on gravity-dependent longwise positioning of amyloplasts in statocytes of cress roots and hypocotyls. – “In the Footsteps of Columbus”. ELGRA Biennial Symposium and General Assembly. Programme and Abstracts. Bonn, Germany. 1st– 4th September 2009. 26: 241.
4. Švegždienė D., Raklevičienė D., **Koryznieņ D.** Gravity-induced amyloplast motion in statocytes of hypocotyls and roots of cress. – “Life in space for life on earth”. 29th Annual ISGP Meeting. 10th ESA Life Sciences Symposium. 24th Annual asgsb Meeting. ELGRA Symposium. Abstracts. Angers, France. 22–27 June 2008. 98.

5. **Koryznieė D.**, Švegėdienė D. Gravity sensing in seedlings of *Lepidium sativum* L.–Fundamental and applied research in biology. Abstracts of the 1st international conference of young scientists. Donetsk, Ukraine. 23–26 February 2009. 2: 341–342.
6. Švegėdienė D., **Koryznieė D.**, Raklevičienė D. Gravisensing of garden cress roots under varying g-loads. – “Actualities in plant physiology”. Abstracts of international scientific conference. Lithuanian Institute of Horticulture. Kaunas. 12–13 June 2008. 119.
7. Švegėdienė D., Raklevičienė D., **Koryznieė D.** Changes in cress root gravisensing after growth in altered gravity. – Genetic and physiological fundamentals of plant growth and productivity. International scientific conference designed to 100th anniversary of prof. Jonas Dagys. Abstracts. Vilnius. 2007. 83–84.
8. **Koryznieė D.**, Švegėdienė D. Comparison of gravity-induced amyloplast motion in statocytes of cress roots grown in simulated weightlessness and at 1 g. **Koryznieė D.**, Raklevičienė D., Novickovas A. Responses of cress seedlings and root-gravisensing cells to unidirectional red and blue light under clinorotation. – Proceedings I (IX) Conference of Young Botanists in Saint Petersburg. Saint Petersburg, 21–26 May 2006. 226.

NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Allwood EG, Anthony RG, Smertenko AP, Reichelt S, Drodak BK, Doonan JH, Weeds AG, Hussey PJ. Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. – *Plant Cell* 2002; 14: 291–527.
- Aloni R, Langhans M, Aloni E, Ullrich CI. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. – *Planta* 2004; 220: 177–182.
- Audus L. The mechanism of the perception of gravity by plants. – *Symp Soc Exp Biol* 1962; 16: 197–226.
- Audus LJ. Geotropism in roots. – In *The development and function of roots*. Torrey G, Clarkson DT. (Ed.), Acad. Press, London 1975; 327–363.
- Baluška F, Hasenstein KH. Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity. – *Planta* 1997; 203: 69–78.
- Bandurski RS, Sculze A, Dayanandan P, Kaufman PB. Response to gravity by *Zea mays* seedlings.1. Time course of the response. – *J Plant Physiol* 1984; 74: 284–288.
- Barjaktarovic Z, Babbick M, Nordheim A, Lamkemeyer T, Magel E & Hampp R. Alterations in protein expression of *Arabidopsis thaliana* cell cultures during hyper- and simulated microgravity. – *Micrograv Sci Technol* 2009; 21: 191–196.
- Björkman T. Perception of gravity by plants. – *Adv Bot Res* 1988; 15: 1–14.
- Blancaflor EB, Fasano J, Gilroy S. Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. – *J Plant Physiol* 1998; 116: 213–222.
- Blancaflor EB, Fasano JM, Gilroy S. Laser ablation of root cap cells: implications for models of graviperception. – *Adv Space Res* 1999; 24(6): 731–738.

- Blancaflor EB, Hasenstein KH. The Organization of the Actin Cytoskeleton in Vertical and Gravitroping Primary Roots of Maize. – *J Plant Physiol* 1997; 113: 1447–1455.
- Blancaflor EB, Masson PH. Plant gravitropism: Unraveling the ups and downs of a complex process. – *J Plant Physiol* 2003; 133: 1677–1690.
- Blancaflor EB. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants. – *J Plant Growth Regul* 2002; 21: 120–136.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. – *Nature* 2005; 433: 39–44.
- Boonsirichai K, Guan C, Chen R, Masson PH. Root gravitropism: An experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. – *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53: 421–447.
- Boonsirichai K, Sedbrook J, Chen R, Gilroy S, Masson PH. ARG1 is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalinization and lateral auxin transport in plant statocytes. – *Plant Cell* 2003; 15: 2612–2625.
- Braun M, Limbach C. Rhizoids and protonemata of characean algae: model cells for research on polarized growth and plant gravity sensing. – *Protoplasma* 2006; 229: 133–142.
- Braun M, Sievers A. Centrifugation causes adaptation of microfilaments: studies on the transport of statoliths in gravity sensing *Chara* rhizoids. – *Protoplasma* 1993; 174: 50–61.
- Braun M. Gravity perception requires statoliths settled on specific plasma membrane areas in characean rhizoids and protonemata. – *Protoplasma* 2002; 219: 150–159.
- Braun M. Gravitropism in tip - growing cells. – *Planta* 1997; 203: 11–19.
- Buchen B, Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Sievers A. Development of Statocytes polarity under simulated Microgravity on a 3-D Clinostat. – *Biol Sci in Space* 1993; 7(2): 111–115.

- Bucher D, Pilet PE. Ethylene effects on growing and gravireacting maize root segments. – *Physiol Plantarum* 1982; 55: 1–4.
- Buer CS, Muday GK. The transparent testa 4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters Auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. – *The Plant Cell* 2004; 16: 1191–1205.
- Buer CS, Sukumar P, Muday GK. Ethylene induced flavonoid synthesis modulates root gravitropism. – *J Plant Physiol* 2006; 140: 1384–1396.
- Bullen BB, Best TR, Gregg MM, Barsel SE, Poff KL. A direct screening procedure for gravitropism mutants in *Arabidopsis thaliana* L. – *J Plant Physiol* 1990; 93: 525–531.
- Caspar T, Pickard BG. Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*. – *Planta* 1989; 177: 185–197.
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH. The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15112–15117.
- Chen R, Rosen E, Masson PH. Gravitropism in higher plants. – *J Plant Physiol* 1999; 120: 343–350.
- Collings DA, Zsuppan G, Allen NS, Blancaflor EB. Demonstration of prominent actin filaments in the root columella. – *Planta* 2001; 212: 392–403.
- Conger BV, Tomaszewski Z Jr, Mcdaniel JK. Spaceflight reduces somatic embryogenesis in orchardgrass (*Poa* sp.). – *Plant Cell Environ* 1998; 21(11): 1197–1203.
- Dagys J. Augalų anatomija ir morfologija. 1969.
- del Pozo JC, Estelle M. Function of the ubiquitin – proteasome pathway in auxin response. – *Trends Plant Sci* 1999b; 4: 107–112.
- Driss-Ecole D, Jeune B, Prouteau M, Julianus P, Perbal G. Lentil root statoliths reach a stable state in microgravity. – *Planta* 2000a; 211: 396–405.
- Driss-Ecole D, Lefranc A, Perbal G. A polarized cell: the root statocyte. – *Physiol Plantarum* 2003; 118: 305–312.

- Driss-Ecole D, Legue V, Carnero-Diaz E, Perbal G. Gravisensitivity and automorphogenesis of lentil seedling root grown on board the International Space Station. – *Physiol Plantarum* 2008; 134: 191–201.
- Driss-Ecole D, Vassy J, Rembur J, Guivarc'h A, Prouteau M, Dewitte W, Perbal G. Immunolocalization of actin in root statocytes of *Lens culinaris* L. – *J Exp Bot* 2000b; 51: 521–528.
- Edelmann HG, Sabovljevic A, Njio G, Roth U. The role of auxin and ethylene for gravitropic differential growth of coleoptiles and roots of rye – and maize seedlings. – *Adv Space Res* 2005; 36(7): 1167–1174.
- El-Antably HMM, Larsen P. Distribution of gibberelins and abscisic acid in geotropically stimulated *Vicia faba* roots. – *Physiol Plantarum* 1974a; 32: 322–329.
- El-Antably HMM, Larsen P. Redistribution of endogenous gibberellins in geotropically stimulated roots. – *Nature* 1974b; 250: 76–77.
- Fasano JM, Massa GD, Gilroy S. Ionic signaling in plant responses to gravity and touch. – *J Plant Growth Regul* 2002; 21: 71–88.
- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao TH and Gilroy S. Changes in root cap Ph are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. – *Plant Cell* 2001; 13: 907–921.
- Feng Y, Liu Q, Xue Q. Comparative study of rise and *Arabidopsis* Actin-depolymerizing factors gene families. – *J Plant Physiol* 2006; 163: 69–79.
- Fitting H. Untersuchungen über der geotropischen Reizvorgang Teil. 1. Die geotropische Empfindlichkeit der Pflanzen. – *Jehrb Wiss Botanik* 1905; 41: 221–330.
- Fitzelle KJ, Kiss JZ. Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* by hypergravity. – *J Exp Bot* 2001; 52: 265–275.
- Frazer LN, Moore D. Antagonists and inhibitors of calcium accumulation do not impair gravity perception though they adversely affect the

- gravitropic responses of *Coprinus cinereus* stipes. – Mycol Res 1993; 97: 113–118.
- Friedman H, Vos JW, Hepler PK, Meir S, Halevy AH, Philosoph-Hadas S. The role of actin filaments in the gravitropic response of snapdragon flowering shoots. – Planta 2003; 216(6): 1034–1042.
- Friml M, Palme K. Polar auxin transport – old questions and new concepts? – Plant Mol Biol 2002; 49: 273–284.
- Fujihira K, Kurata T, Watahiki MK et al. An agravitropic mutant of *Arabidopsis*, endodermal-amyloplast less 1, that lacks amyloplasts in hypocotyl endodermal cell layer. – Plant Cell Physiol 2000; 41: 1193–1199.
- Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. – J Plant Physiol 1996; 110: 933–943.
- Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. The *RHG* gene is involved in root and hypocotyl gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. – Plant Cell Physiol 1997; 38: 804–810.
- Fukaki H, Wysocka-Diller J, Kato T, Fujisawa H, Benfey PN, Tasaka M. Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. – Plant J 1998; 14: 425–430.
- Gaina V, Švegždienė D, Raklevičienė D, Koryznienė D, Stanevičienė R, Laurinavičius R. Kinetics of amyloplasts movement in cress root statocytes under different gravitational loads. – Adv Space Res 2003; 31(10): 2275–2281.
- Galland P, Finger H, Wallacher Y. Gravitropism in *Phycomyces*: threshold determination on clinostat centrifuge. – J Plant Physiol 2004; 161(6): 733–739.
- Gibbon BC, Staiger CJ. Profilin. – In Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions. Staiger CJ, Baluška F, Volkmann D and Barlow PW. (Ed.), Kluwer ACADEMIC Publishers Dordrech, The Netherlands 2000; 45–65.

- Gibbon BC. Actin monomer-binding proteins and the regulation of actin dynamics in plants. – *J Plant Growth Regul* 2001; 20: 103–112.
- Godbole R, Takahashi H, Hertel R. The lazy mutation in rice affects a step between statoliths and gravity-induced lateral auxin transport. – *Plant Biol* 1999; 1: 379–381.
- Golan A, Tepper M, Soundry E, Benjamin AH, Gepstien Sh. Cytokinin, Acting through Ethylene, Restores Gravitropism to *Arabidopsis* Seedlings Grown under Red Light. – *J Plant Physiol* 1996; 112: 901–904.
- Gray SW, Edwards BF. The effect of weightlessness on wheat seedlings morphogenesis and histochemistry. – *Bioscience* 1968; 18: 63–8645.
- Grolig F, Pierson ES. Cytoplasmic streaming: from flow to track. – In *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Cell Functions*. Staiger CJ, Baluška F, Volkmann D. (Ed.), Kluwer, Norwell, 2000; 557–571.
- Guan C, Rosen E, Boonsirichai K, Poff K, Masson PH. The *ARG1-LIKE2* (*ARL2*) gene of *Arabidopsis thaliana* function in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* pathway. – *J Plant Physiol* 2003; 133: 100–112.
- Haberlandt G. Ueber die perzeption des geotropischen reizes. – *Ber Dtsch Bot Ges* 1900; 18: 261–272.
- Harrison BR, Masson PH. *ARL2*, *ARG1* and *PIN3* define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. – *Plant J* 2008; 53: 380–392.
- Hasenstein KH, Evans ML. Calcium dependence of rapid auxin action in maize roots. – *J Plant Physiol* 1986; 81: 439–443.
- Hasenstein KH, Kuznetsov OA. The response of lazy-2 tomato seedlings to curvature-inducing magnetic gradients is modulated by light. – *Planta* 1999; 208: 59–65.
- Hasenstein KH, Scherp P, Ma Z. Gravisensing in flax roots – results from STS – 107. – *Adv Space Res* 2005; 36: 1189–1195.
- Hejnowicz Z, Sondag C, Alt W, Sievers A. Temporal course of graviperception in intermittently stimulated cress roots. – *Plant Cell Environ* 1998; 21: 1293–1300.

- Hemmersbach R, Strauch SM, Seibt D, Schuber M. Comparative studies on gravisensitive protists on ground (2D and 3D clinostats) and in microgravity. – *Microgravity Sci Technol* 2006; 18 (3-4): 257–259.
- Hensel W, Sievers A. Induction of gravity-dependent plasmatic responses in root statocytes by short time contact between amyloplasts and the distal endoplasmic reticulum complex. – *Planta* 1981; 153: 303–307.
- Hertel R, de la Fuente RK, Leopold AC. Geotropism and the lateral transport of auxin in the corn mutant amylo maize. – *Planta* 1969; 88: 204–214.
- Hild V, Hertel R. Initial phases of gravity - induced lateral auxin transport and geotropic curvature of corn coleoptiles. – *Planta* 1972; 108: 245–258.
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M. Evaluation of the three-dimensional clinostat as Simulator of weightlessness. – *Planta* 1997; 203: 187–197.
- Hoson T, Soga K, Wakabayashi K. Role of the cell wall-sustaining system in gravity resistance in plants. – *Biol Sci Space* 2009; 23: 131–136.
- Hou G, Kramer VL, Wang YS, Shen R, Perbal G, Gilroy S and Blancaflor EB. The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and persistent lateral auxin gradient. – *Plant J* 2004; 39: 113–125.
- Hou G, Mohamalawari DR, Blancaflor EB. Enhanced gravitropism of roots with disrupted cap actin cytoskeleton. – *J Plant Physiol* 2003; 133: 1360–1373.
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. – *J Plant Physiol* 2005; 137: 663–670.
- Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. – *J Cell Sci* 2003a; 116: 1157–1173.
- Ingber DE. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. – *J Cell Sci* 2003b; 116: 1397–1408.
- Iversen TH, Larsen P. The Starch Statolith Hypothesis and the Optimum Angle of Geotropic Stimulation. – *Physiol Plantarum* 1971; 25: 23–27.

- Iversen TH, Pedersen K, Larsen P. Movement of amyloplasts in the root cap cells of geotropically sensitive roots. – *Physiol Plantarum* 1968; 21: 811–819.
- Yamaha M, Takeuchi Y, Kasahara H, Murakami S, Yamashita M. Plant growth under Clinostat-Microgravity condition. – *Biol Sci Space* 1993; 7(2): 116–119.
- Yamamoto K, Kiss JZ. Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. – *J Plant Physiol* 2002; 128: 669–681.
- Yamauchi Y, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Mutations in the *SGR4*, *SGR5*, and *SGR6* loci of *Arabidopsis thaliana* alter the shoot gravitropism. – *Plant Cell Physiol* 1997; 38: 530–535.
- Yang T, Poovaiah BW. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. – *Trends Plant Sci* 2003; 10: 505–512.
- Yang T, Poovaiah BW. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. – *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(6): 4097–4102.
- Yang T, Poovaiah BW. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. – *J Biol Chem* 2000; 275(5): 3137–3143.
- Yano D, Sato M, Saito Ch, Sato MH, Morita MT, Tasaka M. A SNARE complex containing *SGR3/AtVAM3* and *ZIG/VTI11* in gravity-sensing cells is important for *Arabidopsis* shoot gravitropism. – *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8589–8594.
- Yoder TL, Zheng Hui-giong, Todd P, Staehelin LA. Amyloplast Sedimentation Dynamics in Maize Columella Cells Support a New Model for the Gravity – Sensing Apparatus of Roots. – *J Plant Physiol* 2001; 125: 1045–1060.
- Young LS, Harrison BR, Narayana Murthy UM, Moffatt BA, Gilroy S, Masson PH. Adenosine kinase modulates root gravitropism and cap morphogenesis in *Arabidopsis*. – *J Plant Physiol* 2006; 142: 564–573.

- Young LM, Evans ML. Calcium-dependent asymmetric movement of 3H-indole-3-acetic acid across gravistimulated isolated root caps of maize. – *J Plant Growth Regul* 1994; 14: 235–242.
- Jensen W. *Botanical Histochemistry*. Freeman WH and Co. (Eds.), San Francisco, London, 1962.
- Jones AM. Auxin-binding proteins. – *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; 45: 393–420.
- Juniper BE, Groves S, Landau-Schachar B, Audus LJ. Root cap and the perception of gravity. – *Nature* 1966; 209: 93–94.
- Jurkonienė S. Indolilacto rūgšties ir jonų transporto sistemų vaidmuo audinių gravitropinės poliarizacijos procesuose. Disertacija biologijos mokslų daktaro laipsniui įgyti, Vilnius, 1993.
- Kato T, Morita M, Fukaki H, Yamauchi Y, Uehara M, Niihama M, Tasaka M. SGR, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in the Shoot Gravitropism of *Arabidopsis*. – *Plant Cell* 2002; 14: 33–46.
- Kato T, Morita M, Tasaka M. Role of endodermal cell vacuoles in shoot gravitropism. – *J Plant Growth Regul* 2002; 21: 113–119.
- Kimbrought J, Mondragon R, Boss W, Brown C, Sederoff H. The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. – *Plant Physiol* 2004; 136: 2790–2805.
- Kiss J. Mechanizm of the early phases of plant gravitropizm. – *Critical Reviews in plant sciences* 2000; 19 (6): 551–573.
- Kiss JZ, Edelmann RE, Guisinger MM, Katembe WJ A and Wood PC. Gravi-perception studies in Biorack with wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. – In *Biorack on Spacehab*, European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands, 1999b; 205–219.
- Kiss JZ, Edelmann RE, Wood PCh. Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient *Arabidopsis* seedlings in spaceflight studies. – *Planta* 1999; 209: 96–103.

- Kiss JZ, Guisinger MA, Miller AJ, Stackhouse KS. Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. – *Plant Cell Physiol* 1997; 38: 518–525.
- Kiss JZ, Katembe WJ, Edelmann RE. Gravitropism and development of wild-type and starch deficient mutants of *Arabidopsis* during spaceflight. – *Physiol Plantarum* 1998; 102: 493–502.
- Kiss JZ, Kumar P, Millar KDL, Edelmann RE, Correll MJ. Operations of a spaceflight experiment to investigate plant tropisms. – *Adv Space Res* 2009; 44: 879–886.
- Kiss JZ, Miller KM, Ogden LA, Roth KK. Phototropism and gravitropism in lateral roots of *Arabidopsis*. – *Plant Cell Physiol* 2002; 43: 35–43.
- Kiss JZ, Sack FD. Reduced gravitropic sensitivity in root of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. – *Planta* 1989; 180: 123–130.
- Kiss JZ, Sack FD. Severely reduced gravitropism in dark-grown hypocotyls of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. – *J Plant Physiol* 1990; 94: 1867–1873.
- Kiss JZ, Wright JB, Caspar T. Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. – *Physiol Plantarum* 1996; 97: 237–244.
- Kitazawa D, Miyazawa Y, Fujii N, Nitasaka E, Takahashi H. Characterization of a novel gravitropic mutant of morning glory, *weeping 2*. – *Adv Space Res* 2008; 42: 1050–1059.
- Klaus DM. Clinostats and bioreactors. – *Gravitational and Space Biology Bulletin* 2001; 14(2): 55–64.
- Knight TA. On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. – In *Philos Trans Roy Soc London* 1806; 96.
- Kondrachuk A, Hasenstein KH. The effects of HGMFs on the plant gravisensing system. – *Adv Space Res* 2001; 27(5): 1001–1005.
- Konings H. Gravitropism of roots: an evaluation of progress during the last three decades. – *Acta Bot Neerl* 1995; 44: 195–223.

- Kordyum EL, Bogadina NI, Kalinina YaM. A weak combined magnetic field changes root gravitropism. – *Adv Space Res* 2005; 36: 1229–1236.
- Kordyum EL, Sobol M, Kalinina I, Bogadina N, Kondrachuk A. Cyclotron – based effect on plant gravitropism. – *Adv Space Res* 2007; 39: 1210–1217.
- Kordyum EL. Calcium signaling in plants cells in altered gravity. – *Adv Space Res* 2003; 32(8): 1621–1630.
- Kost B, Spielhofer P, Chua N-H. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and vizualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. – *Plant J* 1998; 16: 393–401.
- Kraft TF, van Loon JJ, Kiss JZ. Plastid position in *Arabidopsis* columella cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine. – *Planta* 2000; 211: 415–422.
- Kuya N, Kato M, Sato Y, Kaneta T, Sato S. Comparative study of cellular structures implicated in gravisensing in statocytes of primary and lateral roots of *Vigna angularis*. – *Protoplasma* 2006; 229: 83–91.
- Kumar NS, Stekens MHH, Kiss JZ. Plastid movement in statocytes of the *ARG1 (ALTERED RESPONSE TO GRAVITY)* mutant. – *Am J Bot* 2008; 95(2):177–184.
- Kuznetsov O, Hasenstein K. Magnetophoretic induction of curvature in coleoptiles and hypocotyls. – *J Exp Bot* 1997; 48: 1951–1957.
- Kuznetsov O, Hasenstein K. Magnetophoretic induction of root curvature. – *Planta* 1996; 198: 87–94.
- Kuznetsov OA, Schwuchow J, Sack FD, Hasenstein KH. Curvature induced by amyloplast magnetophoresis in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. – *J Plant Physiol* 1999; 645–650.
- LaMotte C, Pickard B. Control of gravitropic orientation. II. Dual receptor model for gravitropism. – *Functional Plant Biology* 2004; 31: 109–120.
- Larsen P. Orthogeotropism in roots. – In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Ruhland W. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin 1962; 17(2): 153–199.

- Larsen P. The development of geotropic and spontaneous curvatures in roots. – *Physiol Plantarum* 1957; 10: 127–163.
- Laurinavičius R, Stočkus A, Buchen B, Sievers A. Structure of cress root statocytes in microgravity (Bion -10 mission). – *Adv Space Res* 1996; 17(6/7): 91–94.
- Laurinavičius R, Švegždienė D, Buchen B, Sievers A. Determination of the threshold acceleration for the gravitropic stimulation of cressroots and hypocotyls. – *Adv Space Res* 1998; 8/9: 1203–1207.
- Laurinavičius R, Švegždienė D, Gaina V. Force sensitivity of plant gravisensing. – *Adv Space Res* 2001; 5: 899–906.
- Laurinavičius R, Švegždienė D, Raklevičienė D et al. Ontogeny of plants under various gravity condition. – *Adv Space Res* 2001; 28(4): 601–606.
- Laurinavičius R, Švegždienė D, Sievers A. Statics and kinetics of statolith positioning in cress root statocytes (Bion-11Mission). – *Gravit Space Biol Bull* 1997; 11(1): 50.
- Laurinavičius R, Švegždienė D. The polarizing role of gravity in plant ontogeny. – *Sodininkystė ir Daržininkystė* 2000: 19(3) – 1: 330–340.
- Laurinavičius R. Interaction between gravity and plant cell. – *Eksperimentinė Biologija* 1991; 4: 103–118.
- Lee JS, Chang WK, Evans ML. Effects of ethylene on the kinetics of curvature and auxin redistribution of gravistimulated roots of *Zea mays*. – *J Plant Physiol* 1990; 94: 1770–1775.
- Lee JS, Mulkey TL, Evans ML. Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibitors. – *Planta* 1984; 160: 53–6543.
- Lefranc A, Jeune B, Driss-Ecole D, Perbal G. Action of the mechanical disruption of the actin network on the gravisensitivity of the root statocyte. – *Adv Space Res* 2005; 36: 1218–1224.
- Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder MEA, Staehelin LA. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical

- endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells. – *Plant Cell* 2009; 21: 843–860.
- Leitz G, Schnepf E, Greulich KO. Micromanipulation of statoliths in gravity-sensing *Chara* rhizoids by optical tweezers. – *Planta* 1995; 197: 278–288.
- Lewis DR, Miller ND, Splitt BL, Wu G, Spalding EP. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* *Multidrug Resistance-Like ABC* transporter genes. – *Plant Cell* 2007; 19: 1838–1850.
- Limbach C, Hauslage J, Schafer C, Braun M. How to activate a plant gravireceptor. Early mechanisms of gravity sensing studied in characean rhizoids during parabolic flights. – *J Plant Physiol* 2005; 139: 1030–1040.
- Link BM, Wagner E, Cosgrove D. The effect of a microgravity (space) environment on the expression of expansins from the peg and root tissues of *Cucumis sativus*. – *Physiol Plant* 2001; 113: 292–300.
- Lorenzi G, Perbal G. Root growth and statocyte polarity in lentil seedling roots grown in microgravity or on a slowly rotating clinostat. – *Physiol Plantarum* 1990; 78: 532–537.
- Luft JH. Improvements in epoxy resins embedding methods. – *J Biophys, Biochem, Cytol* 1961; 9: 409.
- Ma Z, Hasenstein KH. The onset of gravisensitivity in the embryonic root of flax. – *J Plant Physiol* 2006; 140: 159–166.
- Manzano AI, Herranz R, van Loon JJW, Medina J. A Hypergravity Environment Induced by Centrifugation Alters Plant Cell Proliferation and Growth in an Opposite Way to Microgravity. – *Microgravity Sci Technol* 2012; 24:373–381.
- Martizivanou M, Babbick M, Cogoli-Greuter M & Hampp R. Microgravity-related changes in gene expression after short-term exposure of *Arabidopsis thaliana* cell cultures. – *Protoplasma* 2006; 229: 155–162.

- Masson PH, Tasaka M, Morita MT, Guan C, Chen R, Boonsirichai K. *Arabidopsis thaliana*: A model for the study of root and shoot gravitropism. – In *The Arabidopsis Book*. Meyerowitz EM, Somerville CR, Rockville MD. (Ed.), American Society of Plant Biologists 2002; 1–26.
- Matía I, González-Camacho F, Herranz R, Kiss JZ, Gasset G, Van Loon JJWA, Marco R, Medina FJ. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. – *J Plant Physiol* 2010; 167(3):184–193.
- Merkys A, Darginavičienė J. Plant gravitropic response. – *Adv Space Biol Med* 1997; 6: 213–230.
- Merkys A, Laurinavičius R, Bendoraitytė D, Švegždienė D, Rupainienė O. Interaction of Growth – determining Systems with Gravity. – *Adv Space Res* 1986; 6 (12): 71–80.
- Merkys A, Laurinavičius R, Rupainienė O, Savičienė E, Jarošius A, Švegždienė D, Bendoraitytė D. The state of gravity sensors and peculiarities of plant growth during different gravitational loads. – *Adv Space Res* 1983; 3: 211–219.
- Merkys A, Laurinavičius R, Rupainienė O, Švegždienė D, Jarošius A. Gravity as an obligatory factor in normal higher growth and development. – *Adv Space Res* 1981; 1: 109–116.
- Merkys A, Laurinavičius R, Švegždienė D. Plant Growth, Development and Embriogenesis during Salyut – 7flight. – *Adv Space Res* 1984; 4: 55–63.
- Merkys A, Laurinavičius R. Development of higher plants under altered gravitational conditions. – *Adv Space Biol Med* 1991; 1: 155–181.
- Merkys A, Laurinavičius R. Plant growth in space. – In *Fundamentals of Space Biology*. Asashima M, Malacinski GM. (Ed.), Japan Science Society Press, Tokyo, Springer-Verlag, Berlin 1990; 69–83.
- Merkys AJ, Laurinavičius RS, Švegždienė DV, Raklevičienė DP, Jarošius AV. Evaluation of Experiments Involving the Study of Plant Orientation and

- Growth under Different Gravitational Conditions. – Adv Space Res 1989; 9: 23–32.
- Meškauskas A, Jurkonienė S, Moore D. Spatial organization of the gravitropic response in plants: applicability of the revised local curvature distribution model to *Triticum aestivum* coleoptiles. – New Phytol 1999; 143: 401–407.
- Monshausen GB, Sievers A. Basipetal propagation of gravity-induced surface pH changes along primary roots of *Lepidium sativum* L. – Planta 2002; 215(6): 980–988.
- Monshausen GB, Zieschang HE, Sievers A. Differential proton secretion in the apical elongation zone caused by gravistimulation is induced by signal from the root cap. – Plant Cell Environ 1996; 19: 1408–1414.
- Moore R. Abscisic acid is not necessary for geotropism in primary roots of *Zea mays*. – Ann Bot 1990; 66: 281–283.
- Morita MT, Kato T, Nagafusa K, Saito C, Ueda T, Nakano A, Tasaka M. Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in Arabidopsis. – Plant Cell 2002; 14: 47–56.
- Morita MT, Saito C, Nakano A, Tasaka M. *Endodermal-amyloplast less1* is a novel allele of *SHORT – ROOT*. – Adv Space Res 2007; 1127–1133.
- Morita MT, Tasaka M. Gravity sensing and signaling. – Current Opinion in Plant Biology 2004; 7: 712–718.
- Morita MT. Directional gravity sensing in gravitropism. – Annu Rev Biol 2010; 61: 705–20.
- Moseyko N, Zhu T, Chang H, Wang X, Feldmann L. Transcription profiling of the early gravitropic response in Arabidopsis using high-density oligonucleotide probe microarrays. – Plant Physiol 2002; 130: 720–728.
- Muday GK, DeLong A. Polar auxin transport: controlling where and how much. – Trends Plant Sci 2001; 6: 535–542.

- Muday GK, Lomax TL, Rayle DL. Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, *diageotropica*. – *Planta* 1995; 195: 548–553.
- Muday GK, Murphy AS. An emerging model of auxin transport regulation. – *Plant Cell* 2002; 14: 293–299.
- Muday GK. Auxin and tropisms. – *Plant Growth Reg* 2001; 20: 226–243.
- Musgrave M, Kuaang A, Xiao Y, Stout S, Bintam G, Briarty L, Levenskikh M, Sychev V, Podolski I. Gravity independence of seed – to cycling in *Brassica rapa*. – *Planta* 2000; 210(3): 400–406.
- Nakamura M, Toyota M, Tasaka M, Morita MT. An *Arabidopsis* E₃ Ligase, SHOOT GRAVITROPISM₉, Modulates the Interaction between Statoliths and F – Actin in Gravity Sensing. – *The Plant Cell* 2011; 23(5): 1830–1848.
- Nemec B. Ueber die art der wahrnehmung des schwekraftereizes bei den pflanzen. – *Ber Dtsch Bot Ges* 1900; 18: 241–245.
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer W, Spalding E, Murphy A. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. – *Nature* 2003; 423: 999–1002.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development. – *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 2: a001537.
- Palmieri M, Kiss JZ. Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in *Arabidopsis* hypocotyls. – *J Exp Bot* 2005; 56: 2539–2550.
- Palmieri M, Schwind MA, Stevens MHH, Edelmann RE, Kiss JZ. Effects of the myosin ATLASE inhibitor 2,3-butane-dione monoxime (BDM) on amyloplast kinetics and gravitropism of *Arabidopsis* hypocotyls. – *Physiol Plantarum* 2007; 130: 613–626.
- Perbal G, Driss-Ecole D, Rutin J, Salle G. Graviperception of lentil seedlings roots grown in Space (Spacelab D-1 Mission). – *Physiol Plantarum* 1987; 70: 119–126.

- Perbal G, Driss-Ecole D, Tewinkel M, Volkmann D. Statocyte polarity and gravisensitivity in seedling roots grown in microgravity. – *Planta* 1997; 203: 857–862.
- Perbal G, Driss-Ecole D. Contributions of Space experiments to the study of gravitropism. – *J Plant Growth Reg* 2002; 21: 156–165.
- Perbal G, Driss-Ecole D. Development and gravitropism of lentil seedling roots grown in microgravity. – In *Biology in Space and Life on Earth*. Brinckmann E, Wiley-VCH Verlag Gmb H & Co. KgaA, Weinheim (Ed.), 2007; 71–121.
- Perbal G, Driss-Ecole D. Mechanotransduction in gravisensing cells. – *Trends Plant Sci* 2003; 8: 498–504.
- Perbal G, Driss-Ecole D. Polarity of statocytes in lentil seedling roots grown in space (Spacelab D1 Mission). – *Physiol Plantarum* 1989; 75: 518–24.
- Perbal G, Driss-Ecole D. Sensitivity to gravistimulus of lentil seedlings grown in space during the IML 1 mission of spacelab. – *Physiol Plantarum* 1994; 90: 313–318.
- Perbal G, Lefranc A, Jeune B, Driss-Ecole D. Mechanotransduction in root gravity sensing cells. – *Physiol Plantarum* 2004; 120: 303–311.
- Perbal G. From Roots to Gravi-1: Twenty Five Years for Understanding How Plant Sense Gravity. – *Microgravity Sci Technol* 2009; 21(1-2): 3-10.
- Perbal G. Gravisensing in roots. – *Adv Space Res* 1999; 24: 723–729.
- Perera IY, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss W. A universal role for Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Mediated signaling in plant gravitropism. – *Plant Physiol* 2006; 140: 746–760.
- Perrin RM, Young LS, Narayana Murthy UM, Harrison BR, Wang Y, Will L, Masson PH. Gravity signal transduction in primary roots. – *Annals of Botany* 2005; 96: 737–743.
- Pickard BG. Early events in geotropism of seedling shoots. – *Ann Rev Plant Physiol* 1985; 36: 55–75.
- Pickard BG. Geotropic response of *Avena* coleoptile. 1. Dependence on angle and duration of stimulation. – *Canad J Bot* 1973; 51: 1003–1021.

- Pilet P, Rivier L. Abscisic acid distribution in horizontal maize root segments. – *Planta* 1981; 153: 453–458.
- Plieth C, Trewavas AJ. Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. – *J Plant Physiol* 2002; 129: 786–796.
- Plieth C. Calcium: Just another regulator in the machinery of life? – *Ann Bot* 2005; 96: 1–8.
- Pollard EC. Theoretical studies on living systems in the absence of mechanical stress. – *J Theoret Biol* 1965; 8: 113–123.
- Poovaiah BW, McFedden JJ, Reddy ASN. The role of calcium ions in gravity signal perception and transduction. – *Physiol Plantarum* 2006; 71(3): 401–407.
- Raklevičienė D, Švegždienė D. Agurkų Kauniai daigų ir regenerantų in vitro gravimorfogenetinės charakteristikos. – *Sodininkystė ir daržininkystė* 2004; 23(1): 95–106.
- Rosen E, Chen R, Masson PH. Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus?. – *Trends Plant Sci* 1999; 4(10): 407–412.
- Russomano T, Cardoso RB, Falca`o FP et al. Development and validation of 3D clinostat for the study of cells during microgravity simulation. – 27th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Shanghai, China, 4–8 September, 2005.
- Sack FD, Suyemoto MM, Leopold AC. Kinetics of amyloplast sedimentation in gravistimulated maize coleoptiles. – *Planta* 1984; 161: 459–464.
- Sack FD. Plant gravity sensing. – *External Rev Cytol* 1991; 127: 193–252.
- Sack FD. Plastids and gravitropic sensing. – *Planta* 1997; 203:63–68.
- Saito Ch, Morita MT, Kato T, Tasaka M. Amyloplasts and Vacuolar Membrane Dynamics in the Living Gravidceptive Cell of the Arabidopsis Inflorescence Stem. – *Plant Cell* 2005; 17: 548–558.
- Salinas-Mondragon R, Brogan A, Ward N, Perera I, Boss W, Brown CS, Winter Sederoff H. Gravity and light: integrating transcriptional

- regulation in roots. – *Gravitational and Space Biology* 2005; 18: 121–122.
- Scherp P, and Hasenstein H. Anisotropic viscosity of the *Chara* (Characeae) rhizoid cytoplasm. – *Am J Botany* 2007; 94(12): 1930–1934.
- Scott AC, Allen NS. Changes in cytosolic pH within Arabidopsis root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. – *J Plant Physiol* 1999; 121: 1291–1298.
- Sedbrook JC, Chen R, Masson PH. *ARG1* (Altered Response to Gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. – *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1140–1145.
- Shen-Miller J, Hinchmann R, Gordon SA. Thresholds for Georesponse to Acceleration in Gravity-compensated *Avena* Seedlings. – *J Plant Physiol* 1968; 43: 338–344.
- Shevchenko GV, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. – *Adv Space Res* 2005; 35: 289–295.
- Sievers A, Behrens H, Buckhout T, Gradmann D. Can a Ca²⁺ pump in the endoplasmic reticulum of the *Lepidium* root be the trigger for rapid changes in membrane potential after gravistimulation? – *J Plant Physiol* 1984; 114: 195–200.
- Sievers A, Braun M. The root cap: structure and function. – In *Plant roots - the hidden half*. 2nd. Marcel Dekker (Ed.), New York, 1996; 31–49.
- Sievers A, Buchen B, Volkmann D, Hejnowicz Z. Role of cytoskeleton in gravity perception. – In *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Lloyd CW. (Ed.), Academic Press, London, 1991; 169–182.
- Sievers A, Heyder-Caspers L. The effect of centrifugal acceleration on the polarity of statocytes and on graviperception of cress roots. – *Planta* 1983; 157: 64–70.
- Sievers A, Kruse S, Kuo-Huang L, Wendt M. Statoliths and microfilaments in plant cells. – *Planta* 1989; 179: 275–278.

- Sievers A. From Gravitational to Space Biology in Bonn. – Newsletter of ASGSB 2000; 16(3): 18–25.
- Silady RA, Kato T, Lukowitz W, Sieber P, Tasaka M. and Somerville C R. The gravitropism defective 2 mutants of *Arabidopsis* are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. – Plant Physiol 2004; 136: 3095–3103.
- Smith JD, Todd P, Satchel LA. Modulation of statolith mass and grouping in white clover (*Trifolium repens*) grown in 1g microgravity and on the clinostat. – Plant J 1997; 12(6): 1361–1373.
- Soga K, Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S. Hypergravity increases the molecular mass of xyloglucans by decreasing xyloglucan-degrading activity in Azuki bean epicotyls. Plant Cell Physiol 1999; 40: 581–585.
- Stahelin LA, Zheng HQ, Yoder TL, Smith JD, Todd P. Columella cells revisited: novel structures, novel properties, and a novel gravisensing model – Gravit Space Biol Bull 2000; 13: 95–100.
- Staiger CJ, Gibbon BC, Kovar DR, Zonia LE. Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants. – Trends Plant Sci 1997; 2: 275–281.
- Stankovič B. A plant space odyssey. – Trends Plant Sci 2001; 6(12): 591-593.
- Staves MP, Wayne R, Leopold A. Cytocholas in D does not inhibit gravitropism in roots. – Am J Bot 1997a; 84: 1530–1535.
- Staves MP. Cytoplasmic streaming and gravity sensing in *Chara* internodal cells. – Planta 1997; 203: 79–84.
- Stočkus A. Pirminių šaknų gravitropinės reakcijos atskirų fazių sąveikos tyrimas. Disertacija biologijos mokslų daktaro laipsniui įgyti, Vilnius, 1993.
- Stočkus A. Basic assumptions and comparison of three gravitropic response models. –Adv Space Res 1994a; 14: 145–148.
- Švegždienė D, Koryznieienė D, Laurinavičius R. Structure and functioning of statocytes in *Lepidium* seedlings grown in weightlessness and under 1g conditions. – Biologija 2001; 2: 62–64.

- Švegždienė D, Raklevičienė D, Gaina V. Kinetics of gravity-induced amyloplast sedimentation in statocytes of cress roots grown under fast clino-rotation, 1 g and after 180° inversion. – *Adv Space Res* 2005; 36: 1 277–2 283.
- Švegždienė D. Importance of gravity in the coordination of growth responses of axial organs. – *Sodininkystė ir Daržininkystė. Mokslo darbai* 2000; 19(3): 122–133.
- Švegždienė D. Svorio jėgos vaidmens pirminių salotų šaknų erdvinės orientacijos, morfogenezės ir augimo procesuose tyrimas. Disertacija biologijos mokslų kandidato laipsniui įgyti, Vilnius, 1991.
- Taylor DP, Slattery J, Leopold AC. Apoplastic pH in corn root gravitropism: a laser scanning confocal microscopy measurement. – *Physiol Plantarum* 1996; 97: 35–38.
- Tasaka M, Kato T, Fukaki H. Genetic regulation of gravitropism in higher plants. – *Int Rev Cytol* 2001; 206: 135–154.
- Tasaka M, Kato T, Fukaki H. The endodermis and shoot gravitropism. – *Trends Plant Sci* 1999; 4: 103–107.
- Tewinkel M, Volkmann D. Gravisensitivity of cress roots: Determination of threshold values under reduced gravity during the spacelab mission D-2. – In *Proc Fifth Eur Symp Life Sci Res in Space*, Arcachon, Oser H., Guyenne TD (Eds.), ESA SP-366, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, 1994; 139–144.
- Todd P. Gravity-dependent phenomena at the scale of the single cell. – *ASGS Bulletin* 1989; 2: 95–113.
- Todd P. Mechanical analysis of statolith action in roots and rhizoids. – *Adv Space Res* 1994; 14(8): 121–124.
- Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M. Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings. – *J Plant Physiol* 2008; 146: 505–514.
- van Loon JJWA, Krause J, Cunha H, Goncalves J, Almeida H, Schiller P. The Large diameter Centrifuge, LDC, for life and physical sciences and

- technology. – In: Proc.of the Life in Space for Life on Earth Symposium, Angers, France 2008. (ESA SP-663, December 2008)
- van Loon JJWA. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. – *Adv Space Res*, 2007; 39: 1161–1165.
- Versel JM, Pilet PE. Distribution of growth and proton efflux in gravireactive roots of maize (*Zea mays* L.). – *Planta* 1986; 167: 26–29.
- Vicente-Agullo F, Rigas S, Desbrosses G, Dolan L, Hatzopoulos P, Grabov A. Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots. – *Plant J* 2004; 40: 523–535.
- Vitha S, Yang M, Sack FD, Kiss JZ. Gravitropism in the starch excess mutant of *Arabidopsis thaliana*. – *Am J Botany* 2007; 94(4): 590–598.
- Volkman D, Baluška F. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. – *Microscope Research Technology* 1999; 47: 135–154.
- Volkman D, Baluška F. Actin cytoskeleton related to gravisensing in higher plants. – In *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*. Staiger C, Baluška F, Volkman D, Barlow PW. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000; 557–571.
- Volkman D, Behrens H, Sievers A. Development and gravit sensing of cress roots under microgravity. – *Naturwissenschaften* 1986; 73: 438–441.
- Volkman D, Buchen B, Hejnowicz Z et al. Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets – *Planta* 1991; 185: 153–161.
- Volkman D, Buchen B, Hejnowicz Z, Tewinkel M, Sievers A. Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitational field during parabolic flights of rockets. – *Planta* 1991; 185: 153–161.
- Volkman D, Sievers A. Gravit perception in multicellular organs. – In *Physiology of movements*. Encyclopedia of plant physiology, new

- series. Haupt W, Feinleib M (Eds.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1979; 7: 573–600.
- Volkman D, Tewinkel M. Gravisensitivity of cress roots: investigations of threshold values under specific conditions of sensor physiology. – *Plant Cell Environ* 1996; 19: 1195–1202.
- Volkman D, Winnborner U, Waberzeck KJ. Graviresponsiveness of Cress Seedlings and Structural Status of Presumptive Statocytes from the Hypocotyl. – *J Plant Physiol*, 1993; 142: 710–716.
- Wayne R, Staves MP, Leopold AC. The contribution of the extracellular matrix to gravisensing in *Characean* cells. – *J Cell Sci* 1992; 101: 611–623.
- Wakabayashi K, Soga K, Hoson T. Modification of Cell Wall Architecture in Gramineous Plants under Altered Gravity Conditions. – *Biological Sciences in Space* 2009; 23(3): 137–142.
- Weise SE, Kiss JZ. Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutant of *Arabidopsis*. – *Int J Plant Sci* 1999; 160: 521–527.
- Weise SE, Kuznetsov OA, Hasenstein KH, Kiss JZ. Curvature in *Arabidopsis* inflorescence stems is limited to the region of amyloplasts displacement. – *Plant Cell Physiol* 2000; 41: 702–709.
- Wolverton C, Ishikawa H, Evans M. The kinetics of root gravitropism: dual motor and sensors. – *J Plant Growth Regul* 2002a; 21: 102–112.
- Wolverton C, Mullen J, Ishikawa H, Evans M. Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. – *Planta* 2002 b; 215: 153–157.
- Zhang Z, Friedman H, Meir S, Belausov E, Philosoph-Hadas S. Actomyosin mediates gravisensing and early transduction events in reoriented cut snapdragon spikes. – *J Plant Physiology* 2011; 168(11): 1176–1183.
- Zheng H, von Mollard GF, Kovaleva V, Stevens TH and Raikhel NV. The plant vesicle-associated SNARE AtVT11a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. – *Mol Biol Cell* 1999;10: 2251–2264.

- Zheng HQ, Staehelin LA. Nodal endoplasmic reticulum, a specialized form of endoplasmic reticulum found in gravity-sensing root tip columella cells. – *J Plant Physiol* 2001; 125: 252–265.
- Владимирский БМ. Математические методы в биологии. Ростов н/Д: Изд-во. Рост. ун-та, 1983. 304.
- Лауринавичюс РС, Ярошюс АВ, Радзявичюс ГС. Методика постановки опытов по изучению значения силы тяжести в процессах роста и развития растений. – Биологические исследования на орбитальных станциях "Салют". М.: Наука 1984; 15–20.
- Меркис АИ. Геотропическая реакция растений. Вильнюс, Минтис 1973.
- Меркис А, Лауринавичюс Р, Швягжде Д. Гравитационная чувствительность и рост растений в условиях невесомости. – Известия Академии Наук СССР. Серия Физическая 1985; 715–722.
- Меркис АМ, Лауринавичюс РС. Рост и развитие растений в условиях измененной весомости. – Регуляция роста и питания растений. Вильнюс Мокслас 1980; 54–74.
- Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. Москва, Мир, 1984. 512.
- Эзау К. Анатомия семенных растений. Москва, Мир 1980.