
ПРОБЛЕМИ НООСФЕРОЛОГІЇ ТА КОСМІЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ

УДК 577.4

Є. Л. Кордюм, О. С. Талалаєв, В. В. Сарнацька

КОСМІЧНА ФІТОБІОЛОГІЯ: АКТУАЛЬНІ НАПРЯМКИ ТА НОВІ МОДЕЛІ

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України

Наведено характеристику актуальних напрямків та нових моделей космічної фітобиології. Представлено результати досліджень гравітропічної реакції кореня в комбінованому магнітному полі з частотою, резонансною циклотронній частоті йонів кальцію. Розглянуто особливості морфогенезу коренів та диференціювання клітин у культурі *in vitro*.

Ключові слова: космічна фітобиологія, актуальні напрямки, моделі, гравітропічна реакція та морфогенез коренів.

Е. Л. Кордюм, А. С. Талалаєв, В. В. Сарнацкая

Інститут ботаніки ім. Н. Г. Холодного НАН України

КОСМИЧЕСКАЯ ФИТОБИОЛОГИЯ: АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И НОВЫЕ МОДЕЛИ

Представлена характеристика актуальных направлений и новых моделей космической фитобиологии. Приведены результаты исследований гравитропической реакции корня в комбинированном магнитном поле с частотой, резонансной циклотронной частоте ионов кальция. Рассмотрены особенности морфогенеза корней и дифференциация клеток в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: космическая фитобиология, актуальные направления, модели, гравитропическая реакция и морфогенез корней.

E. L. Kordyum, O. S. Talalayev, V. V. Sarnatska

M. G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine

SPACE PHYTOBIOLOGY: URGENT TRENDS AND NEW MODELS

The description of urgent trends and new models of space phytobiology are given. The findings of the research of gravitropical reaction of the root in the combined magnetic field calcium ions frequency are presented. The characteristics of root morphogenesis and cell specialization in a crop *in vitro* are examined.

Key words: space phytobiology, urgent trends, models, gravitropical reaction, root morphogenesis.

Пріоритетні напрямки сучасної космічної біології в світовій науці охоплюють широке коло питань впливу мікрогравітації та інших факторів космічного польоту на клітинному та молекулярному рівнях організації живих систем, генетичну стабільність, ріст, розвиток, репродукцію, тривалість життя та старіння, поведінку та орієнтацію рослинних та тваринних організмів у першому та наступних поколіннях, особливо у зв'язку з майбутніми польотами людини на Місяць і Марс та її тривалим перебуванням за межами Землі в умовах різного гравітаційного навантаження.

У зв'язку із цим набувають нової актуальності дослідження та з'ясування клітинних та молекулярних механізмів гравічутливості рослинних організмів, які є по-

стійним та необхідними компонентом контрольованих екологічних систем життєзабезпечення космонавтів як регенеранти кисню, води та постачальники їжі і незамінних для людини біологічно активних речовин. Ці дослідження ведуться в таких напрямках:

- Дослідження структури, фізико-хімічних та функціональних властивостей біологічних мембран в умовах зміненої гравітації з метою експериментальної перевірки гіпотези гравітаційної декомпенсації, відповідно до якої первинним місцем дії мікрогравітації є цитоплазматична мембрана клітини, від стану якої значною мірою залежить нормальне функціонування організму. Такі дослідження вносять істотний вклад у розуміння механізмів адаптації організму в цілому до зміненої гравітації, з'ясування молекулярних механізмів розвитку патологічних змін, що є основою для розробки прийомів нормалізації функціонування клітин в умовах мікро- та гіпергравітації.

- Вивчення проліферативної активності, регуляції клітинного циклу, росту та диференціювання клітин в умовах зміненої гравітації. Ці процеси лежать в основі росту та розвитку організмів, проте відомості про їх зміни під впливом мікрогравітації дуже обмежені та суперечливі.

- З'ясування ролі та участі в гравічутливості клітин цитоскелету – опорно-рухомого апарату клітини. Особливий інтерес має питання про те, через які метаболічні шляхи в клітині гравітація впливає на молекулярну організацію та динаміку перебудов актинових та тубулінових елементів цитоскелету в клітинах різних типів у процесах їх ділення, росту та диференціювання.

- Вивчення функціонування сигнальних систем у клітинах в умовах мікрогравітації, у першу чергу йонів кальцію як вторинного месенджера, а також мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму, які депонують іони кальцію та забезпечують внутрішньоклітинну регуляцію кальцієвого гомеостазу в умовах зміненої гравітації.

- З'ясування структурно-функціональної організації клітин різних типів в умовах зміненої гравітації. Проведення таких досліджень планується у відповідь на питання, яким чином зміни метаболізму в умовах мікрогравітації інтегруються у фізіологічні та морфологічні реакції клітин різних типів, безпосередньо пов'язаних із здійсненням їх функцій.

- Визначення механізмів функціонування гравірецепторного апарату рослин за допомогою впливу зміненої гравітації та гравістимуляції в постійному та комбінованому магнітному полі.

- Дослідження фотосинтезу - процесу використання рослинами енергії сонячного світла для синтезу багатих на енергію сполук із води та вуглекислого газу, безпосередньо пов'язаного із продуктивністю рослин, в умовах зміненої гравітації. З'ясування впливу інтенсивності та спектрального складу світла на формування пігментної та мембранної систем фотосинтетичного апарату в умовах зміненої сили тяжіння та визначення енергетичного потенціалу рослин дозволять установити зв'язок між інтенсивністю та спектральним складом світла та ефективністю фотосинтетичного перетворення енергії в умовах мікрогравітації, що є одним із вихідних положень у створенні технологій космічного рослинництва.

- Вивчення впливу зміненої гравітації на процес трансформації рослинної клітини під впливом *Agrobacterium tumefaciens*.

Слід зазначити значне підвищення інтересу дослідників до використання трансгенних рослин та мутантів в експериментах з космічної біології. Ми пропонуємо дві нові моделі для досліджень з космічної та гравітаційної біології з таких питань: 1) функціонування гравірецепторного апарату кореня та 2) морфогенез кореня та диференціювання клітин.

Гравітропічна реакція кореня в комбінованому магнітному полі з частотою, резонансною циклотронній частоті йонів кальцію

Як відомо, ростові реакції рослин під дією вектора гравітаційного поля, що визначають їх просторову орієнтацію, ріст та життєдіяльність, називають гравітропізмом. У гравітропізмі розрізняють три фази: сприйняття гравітаційного сигналу, його

перетворення в біохімічний сигнал, який передається до клітин, що відповідають на сигнал, та власне росту відповідь, тобто вигин кореня або стебла. Хоча дослідження гравітропізму рослин тривають уже довгий час (Moore, 1985; Roux, 1997; Sinclear and Trewavas, 2003; Kordyum, 2003; Braun, 2006), ряд питань щодо механізмів сприйняття і трансдукції гравітаційного стимулу, зокрема ролі йонів кальцію та цитоскелету в цих процесах, залишається дискусійним. Тому необхідні нові експериментальні підходи для з'ясування ролі кальцію в гравітропічній реакції рослин.

У 1985 р. Блекмен та Лібов незалежно один від одного запропонували модель іонного циклотронного резонансу, який, на їх думку, лежить в основі біологічних ефектів слабких комбінованих магнітних полів із частотою, резонансною циклотронній частоті окремих іонів (Blackman et al., 1985; Liboff, 1985). Ми вперше показали, що комбіноване магнітне поле (КМП) з частотою, резонансною циклотронній частоті йонів кальцію, впливає на гравітропізм кореня (Kordyum et al., 2005; 2007). В експериментах використано дводобові проростки *Lepidium sativum* L., які в горизонтальному положенні (гравістимуляція) вміщували у вологу камеру всередині пермалоевого екрану (рис. 1), де створювали комбіноване магнітне поле (КМП). Контролем були проростки, вміщені в такий самий екран з постійним магнітним полем (ПМП), що дорівнювало 40 мкТл, приблизно величина геомагнітного поля. Перемінне магнітне поле, яке створювали з використанням соленоїдів, мало частоту 32 Гц, резонансну циклотронній частоті йонів кальцію, обчислену за формулою

$$f_c = qV/2\pi m,$$

де q – заряд іона ($q = 2e$ для Ca^{2+}); e – заряд електрона; V – магнітна індукція; m – маса йона. Параметри КМП контролювали за допомогою ферозондового магнітометра та надпровідного квантового інтерференційного детектора.



Рис. 1. Пермалоевий екран

У КМП з частотою, резонансною циклотронній частоті йонів кальцію, як ми вже відмічали, корені виявляли негативну гравітропічну реакцію, на відміну від ПКП, де гравітропічна реакція коренів була позитивною (рис. 2). Після 30 хв. гравістимуляції в контролі амілопласти-статоліти переміщувалися до фізично нижнього боку статоцитів. У КМП амілопласти мали тенденцію скупчуватися в центрі статоцитів, часто уздовж довгої осі клітини (положення амілопластів було подібним до такого за умов мікрогравітації). Після 60 хв. гравістимуляції в ПМП амілопласти розташовувалися в дистальній частині статоцитів. У КМП амілопласти локалізувалися біля верхньої поздовжньої стінки клітин (рис. 3), що виявилось особливо цікавим, оскільки амілопласти-статоліти переміщувалися проти гравітаційного вектора під час гравістимуляції. Ядро, як і звичайно, залишалося в проксимальній частині статоцитів під час гравістимуляції в ПМП та КМП. та було оточено, як і амілопласти, сіткою актинових мікрофіламентів.

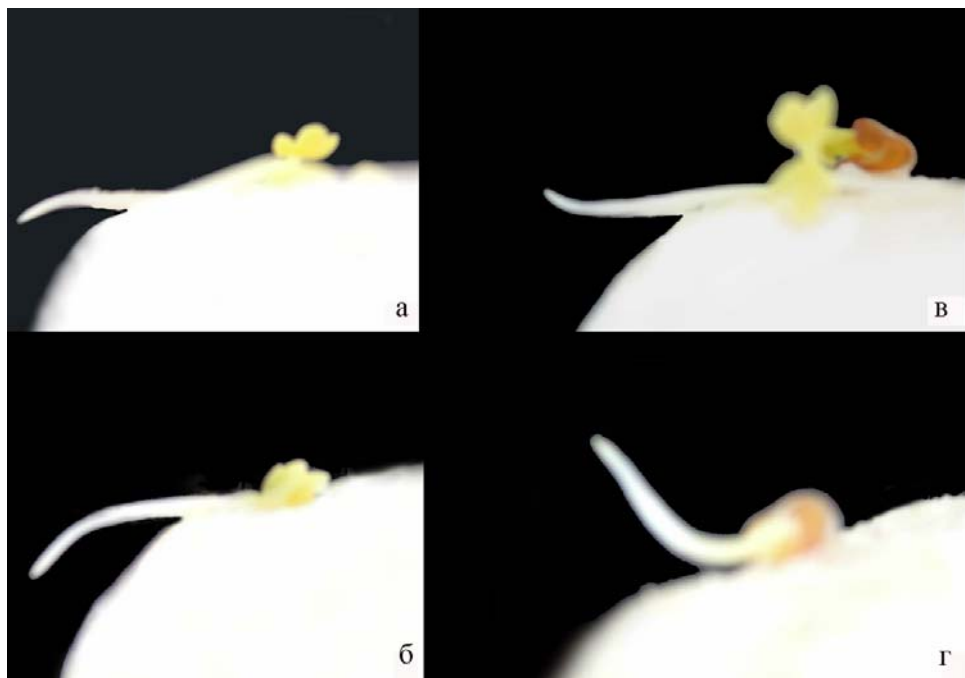


Рис. 2. Проростки *Lepidium sativum* через 30 хв. (а, в) та 60 хв. (б, г) гравістимуляції в ПМП (а, б) та КМП (в, г)

Дослідження розподілу йонів Ca^{2+} в епідермісі та корі дистальної зони розтягання гравістимульованих коренів у ПМП та КМП за допомогою флуоресцентного індикатора fluo-3 у конфокальному мікроскопі LSM 5 PASCAL показали їх накопичення в районі згину, проте звичайно по різних боках – нижнього у ПМП та верхнього у КМП. У КМП найвиразніший латеральний перерозподіл Ca^{2+} спостерігали після 30 хв. гравістимуляції. Клітини дистальної зони розтягання відрізняються специфічними фізіологічними властивостями, зокрема чутливістю до різних ендогенних сигналів і екзогенних факторів, та відіграють важливу роль у гравітропізмі (Ishikawa and Evans, 1995). Як відомо, гравістимуляція у звичайних умовах ініціює швидкий рух йонів Ca^{2+} до нижнього боку кореня (Sinclair and Trewavas, 1997). Отже, концентрація кальцію підвищується в зоні кореня з меншою швидкістю розтягання клітин та знижується в зоні прискороного росту. Відомо, що висока концентрація кальцію в тканині суттєво пригнічує ріст клітин (Slocum, Roux, 1983). Особливо цікавим є факт переміщення амілопластів-статолітів, багатих на йони кальцію, у статоцитах до верхньої поздовжньої стінки, що поєднується з одночасним переміщенням йонів кальцію в цитозолі, тобто амілопласти розташовуються, як і при позитивній гравітропічній реакції, на одному рівні із увігнутою частиною згину кореня. Таким чином, гравітропічна реакція кореня в КМП здійснюється за нор-

мальним фізіологічним шляхом, але з протилежним знаком (рис. 4). Одержані результати чітко демонструють участь іонів кальцію в гравітропічній реакції кореня. Подальші дослідження мають спрямовуватися на встановлення механізмів латерального перерозподілу іонів Ca^{2+} у відповідь на гравістимуляцію.

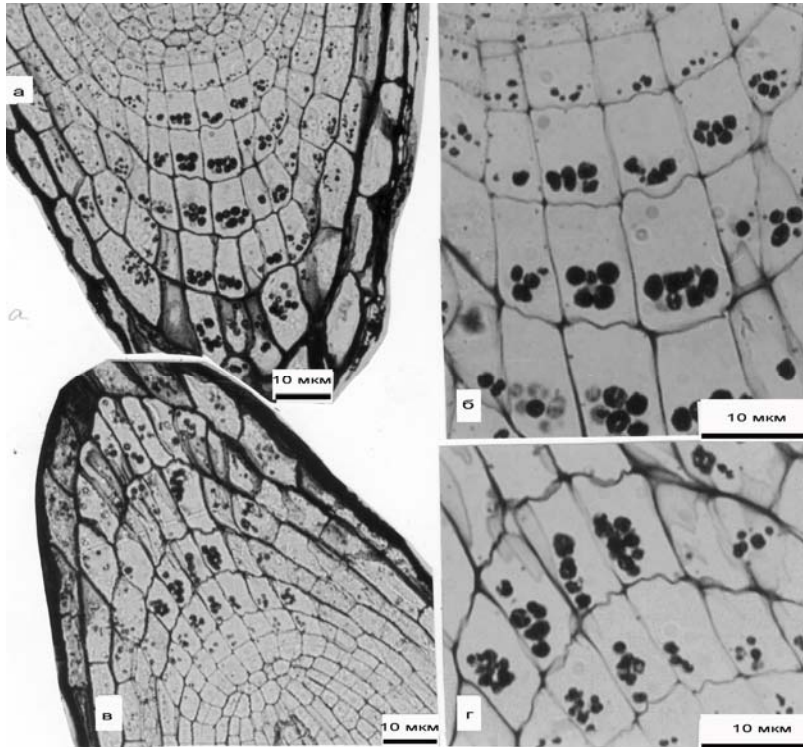


Рис. 3. Кореневі чохлаки (а, в) та статоцити з амілопластами (б, г) після 60 хв. гравістимуляції в ПМП (а, б) та КМП (в, г)

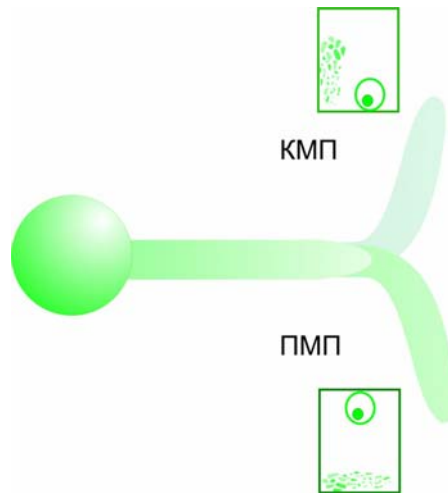


Рис. 4. Схематичне зображення гравістимульованого кореня в ПМП та КМП

Припускається, що в умовах комбінованого магнітного поля з частотою, резонансною циклотронній частоті іонів кальцію, збільшується енергія іонів і, отже, змінюється швидкість обертання та/або напрям іонних потоків у коренях проростків *L. sativum*, що, на нашу думку, відповідає моделі іонного циклотронного резонансу в

біосистемах (Liboff, 1985). Можливо також, що біоелектричні градієнти, які створюються в результаті транспорту йонів Ca^{2+} та H^+ крізь мембрани при гравітимуляції осьових органів, змінюються в КМП.

Модель негативної гравітропічної реакції в КМП з частотою, резонансною циклотронній частоті йонів Ca^{2+} , рекомендується як нова та перспективна для майбутніх досліджень механізмів гравітропізму та ролі йонів Ca^{2+} у ростових реакціях рослин.

Морфогенез коренів та диференціювання клітин в культурі *in vitro*

Дослідження рослин, які росли та розвивалися в умовах космічного польоту та кліностагування, показали, що процеси мітозу, цитокінезу та диференціювання клітин вегетативних і генеративних органів відбуваються подібно до таких в умовах 1 g. Проте переважна більшість таких досліджень була проведена з інтактними рослинами, які виростили з насіння, що утворилося в земних умовах (Halstead and Dutcher, 1987; Kordyum, 1997). Як відомо, зрілі рослинні клітини здатні до дедиференціювання в умовах культури *in vitro*, тобто їм властива тотипотентність, що є характерною рисою цих клітин. У той же час наявне лише одне повідомлення щодо відсутності диференціювання клітин колумели в статоцити в чохликах коренів, які утворилися *de novo* в умовах мікрогравітації (Podlutzky, 1992). Тому ми пропонуємо нову модель для таких досліджень – ризогенез, тобто утворення коренів *in vitro*, у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* (короткокореневих) мутантів (Pysh et al., 1999; Helariutta et al., 2000), для яких характерним є формування лише одного шару кори.

Було відпрацьовано оптимальні умови для утворення калусу з листкових експлантів *A. thaliana* та ризогенезу як з недиференційованих клітин калусу (рис. 5), так і безпосередньо на листкових експлантах (рис. 6) як адекватних моделей для досліджень впливу стимульованої мікрогравітації на морфогенез, диференціювання клітин та генну експресію.

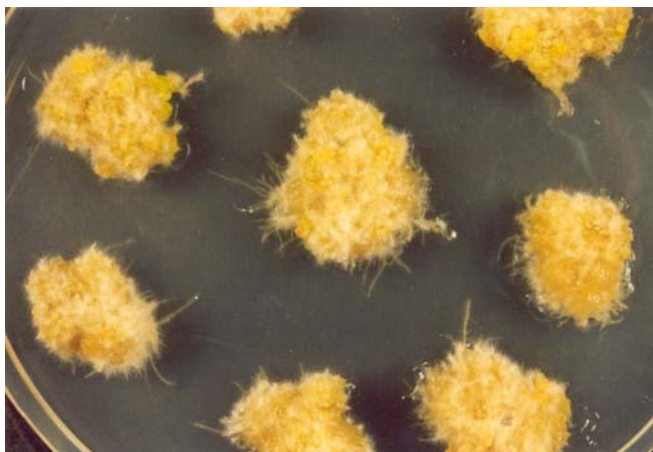


Рис. 5. Ризогенез у калусі із листкових експлантів *Arabidopsis thaliana* на оптимізованому середовищі



Рис. 6. Ризогенез на листкових експлантах *Arabidopsis thaliana* на оптимізованому середовищі

Установлено нормальне проходження цих процесів в умовах кліностакування, що підтверджує наші попередні висновки. Як і в контролі, корені дикого типу, які утворилися в калусі та на листових експлантах, мали два шари кори, короткочореневі мутанти – лише один (рис. 7). Не було відмічено істотної різниці в експресії гена SHR, яка визначалася за методом RT-PCR для мутантного локусу (рис. 8).

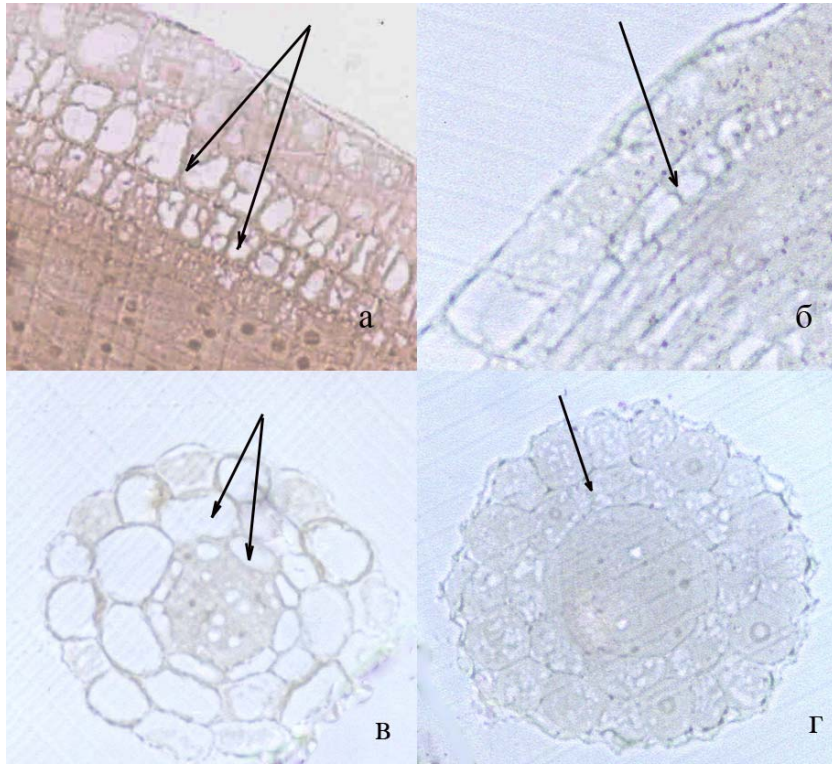


Рис. 7. Фрагменти поздовжніх (а, б) та поперечних (в, г) зрізів коренів *Arabidopsis thaliana*, сформованих на листових експлантах: а, в – дикий тип, б, г – *scr* мутант. Стрілками вказані шари кори

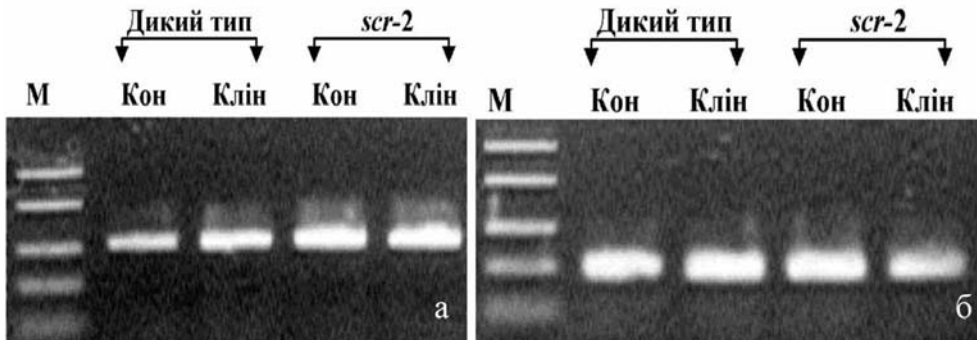


Рис. 8. Продукти експресії генів *scr* (а) та *ubq5* (б) в агарозному гелі після РТ-ПЛР

Отже, показано, що морфогенез, гістогенез та диференціювання клітин коренів, які формуються *in vitro* в казусній культурі із неспеціалізованих та недиференційованих клітин або безпосередньо на листових експлантах дикого типу та короткочорневих мутантах *Arabidopsis thaliana*, в стаціонарному контролі та в умовах симульованої мікрогравітації (кліностакування) відбуваються подібно, що підтверджує реалізацію генетично запрограмованої програми морфогенезу в умовах зміненої гравітації. Розроблена модель пропонується як нова та перспективна для досліджень морфогенезу

незу коренів *in vitro* та експериментів на міжнародній космічній станції для перевірки уявлень щодо значення скалярної величини гравітації в індукції програми диференціювання гравірецепторних клітин кореня.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Blackman C. F., Benane S. G., Rabinowitz J. R. et al.** A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro* // *Bioelectromagnetics*. – 1985. – 6. – P. 327-337.
- Braun M., Limbach C.** Rhizoids and protonemata of characean algae: model cells for research on polarized growth and plant gravity sensing // *Protoplasma*. – 2006. – 229. – P. 133-142.
- Di Laurencio L. et al.** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root // *Cell*. – 1996. – 86. – P. 423-433.
- Halstead T.W. & Dutcher F.R.** Plants in space // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1987. – 38. – P. 317-345.
- Helariutta Y. et al.** The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling // *Cell*. – 2000. – 101. – P. 555-567.
- Ishikawa H., Evans M. L.** Specialized zone of development of roots // *Plant Physiol.* – 1995. – 109. – P. 725-727.
- Kordyum E. L.** Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cyt.* – 1997. – 171. – P. 1-78.
- Kordyum E. L.** Calcium signaling in plant cells in altered gravity // *Adv. Space Res.* – 2003. – 32. – P. 1621-1630.
- Kordyum E. L., Bogatina N. I., Kalinina Ya. M.** A weak combined magnetic field changes root gravitropism // *Adv. Space Res.* – 2005. – 36. – P. 1229-1236.
- Kordyum E., Sobol M., Kalinina Ja., Bogatina N., Kondrachuk A.** Cyclotron-based effects on plant gravitropism // *Adv. Space Res.* – 2007. – 39. – P. 1210-1217.
- Liboff A. R.** Geomagnetic cyclotron resonance in living cells // *J. Biol. Physics*. – 1985. – 13. – P. 99-102.
- Moore R.** Movements of calcium across tips of primary and lateral roots of *Phaseolus vulgaris* // *Am. J. Bot.* – 1985. – 72. – P. 785-787.
- Podlutzky A.G.** Ultrastructural analysis of organization of roots obtained from cell cultures at clinostating and under microgravity // *Adv. Space Res.* – 1992. – 12. – P. 93-98.
- Pysh L. D. et al.** The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes // *Plant J.* – 1999. – 18. – P. 111-119.
- Roux S. J.** Calcium as mediator of plants' directional growth response to gravity // *Fundamentals of Space Biology*. – Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press, 1990. – P. 57-67.
- Sinclair W., Trewavas A. J.** Calcium in gravitropism. A re-examination // *Planta*. – 1997. – 203. – P. 85-90.
- Slocum R. D., Roux S. J.** Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated oat coleoptiles and its possible significance in the establishment of tropic curvature // *Planta*. – 1983. – 157. – P. 481-492.

Надійшла до редколегії 19.11.09