

Д. О. Климчук, Г. М. Мартин

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

**Застосування модельних систем —
рослинних клітин in vitro — в дослідженні
гравічутливості організмів на клітинному рівні**

Наведено результати експериментів з культурами клітин та протопластів вищих рослин, проведених в умовах мікрогравітації та в модельних умовах з використанням горизонтальних кліностаблів. Показано, що рослинні клітини, виведені з-під контролю цілісного організму, чутливі до зміни сили тяжіння. Відповіді клітин на зміну сили тяжіння відбуваються, насамперед, за участю процесів росту клітин розтягом.

ВСТУП

Клітини вищих рослин в культурі *in vitro*, які позбавлені корелятивних зв'язків цілісного організму, використовуються як модельні системи для дослідження впливу різноманітних фізичних та хімічних чинників. Дослідження на рослинних клітинах *in vitro* дозволяють диференційовано підходити до оцінки значення сили тяжіння в процесах, що відбуваються безпосередньо на клітинному рівні, та її ролі в координації ростових процесів на рівні окремих тканин та органів. Клітини вищих рослин в умовах *in vitro*, зберігаючи здебільшого фізіологічні ознаки, характерні для клітин *in vivo*, залежать від фізико-хімічних умов вирощування, тому можуть змінювати рівень синтетичних процесів та набувати ознаки не властиві клітинам інтактного організму [2]. Ці особливості дають можливість використовувати їх як джерело цінних для людини речовин та відкривають перспективи для використання в космічних біотехнологіях. Тому знання закономірностей функціонування рослинних клітин *in vitro* в умовах зміненої сили тяжіння є важливим для їхнього практичного використання.

**ЕКСПЕРИМЕНТИ З РОСЛИННИМИ КЛІТИНАМИ
IN VITRO, ПРОВЕДЕНІ В УМОВАХ МІКРОГРАВІТАЦІЇ**

Калусні та суспензійні культури. Незважаючи на те, що рослинні культури були об'єктами досліджень з середини 80-х років минулого століття, до

цього часу проведена обмежена кількість експериментів в умовах мікрогравітації. В одному з перших експериментів на борту космічного корабля «Союз-22» калусна культура гаплопапусу *Haplopappus gracilis* (Nutt.) A. Gray вирощувалася впродовж 9 діб в умовах температури кабіни корабля (18—22 °C при оптимальній для даного клону 28 °C), що ускладнювало інтерпретацію відставання в рості та відсутності клітин в стані проліферації, виявлених після приземлення корабля [7].

Експонування культури ізольованих клітин моркви *Daucus carota* L. впродовж 20 діб на борту біосупутника «Космос-782» показало, що соматичний ембріогенез в умовах мікрогравітації відбувається подібно до наземних. Спостерігалось лише формування більш довгих коренів у дослідних зародків. Автори на підставі чого допускають, що умови мікрогравітації індукують більш прискорене формування та розвиток органів [3, 14].

В експериментах з культурами пухлинних тканин *Daucus carota* L., проведених на борту біосупутника «Космос-782» та «Космос-1129», було відмічено збільшення кількості клітин в радіусі меристемного осередка [1], зміни у складі ізоферментів [4], зниження інтенсивності дихання та посилення вивільнення з клітин електролітів іонів K⁺ та Na⁺, що свідчить про підвищення проникності клітинних мембран в умовах мікрогравітації [10].

В експерименті з культурою клітин томату *Lycopersicon esculentum* Mill. на борту «Космос-1667» не було відмічено суттєвих відмінностей в процесах диференціювання клітин та формування колоній,

хоча дослідні зразки характеризувалися затримкою зазначених процесів та підвищеним поліморфізмом [8]. В суспензійній культурі анісу *Pimpinella anisum* L., що експонувалася впродовж 7 діб в умовах мікрогравітації, відзначалося інтенсивніше накопичення біомаси в порівнянні, ніж у наземному контролі [20]. В культурі арабідопсису *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. після довготривалого (63 доби) експонування в умовах мікрогравітації відмічалось зниження кількості меристемних осередків та проліферативної активності, а також зменшення розмірів клітин у порівнянні з наземним контролем [15].

Аналіз ростових параметрів калусних культур гаплопапусу та гороху, що експонувалися впродовж 12 та 25 діб на борту «Союз-ТМ» та «Біон-10» відповідно, показав тенденцію до зниження накопичення біомаси та вмісту сухої маси. Суттєвіші відмінності спостерігалися в 25-добовому експерименті з культурою гаплопапусу. Вміст біомаси та маси сухої речовини в дослідних зразках в середньому складав відповідно 57 % та 78 % від наземних контролів. Відомо, що швидкість росту калусу залежить від маси експлантату. Оскільки суттєве зменшення оптимальної маси експлантату може призвести до зупинки росту калусу (без цілеспрямованого підбору складу поживного середовища), при плануванні експерименту з культурою гаплопапусу припускалося, що калуси з субоптимальною масою будуть уразливіші до дії будь-якого несприятливого фактору. Отримані дані підтвердили таке припущення: дослідні зразки з масою трансплантатів 200 мг більше відрізнялися від відповідних наземних контролів, ніж зразки з масою 300 мг [5].

Приріст біомаси та вміст сухої маси калусів в 12-добовому експерименті з культурою гороху складала 76 % та 84 % від контрольних відповідно. Індекс росту культури в умовах мікрогравітації та наземного контролю становив 2.2 та 2.9 відповідно [5]. Очевидно, що відмінності між варіантами в експериментах з культурами гаплопапусу та гороху в більшій мірі стосуються показників приросту біомаси і в меншій — накопичення сухої маси. Зіставлення цих даних дозволяє визначити, за рахунок яких процесів відбуваються зміни їхнього росту: інтенсивності проліферації чи інтенсивності росту розтягом. В обох експериментах дослідні зразки відзначалися зниженням відносного вмісту води у порівнянні з наземними контролями, що може бути зумовлено зниженням інтенсивності росту клітин розтягом.

За даними електронно-мікроскопічних досліджень клітини гаплопапусу та гороху дослідних популяцій порівняно з наземними контролями ха-

рактеризувалися нижчим вмістом рибосом в гіалоплазмі. У стромі частини амілопластів клітин гаплопапусу відмічалися проламелярні тіла та скупчення фітоферетину, які не виявлялися в органелах клітин наземних контролів. Особливістю структурної організації пластидного апарату клітин гороху була наявність в стромі лейкопластів запасного крохмалю, який за даними морфометричного аналізу виявлявся у 42.9 % органел дослідних клітин порівняно з 90.5 % — для контрольних клітин [5].

Експерименти з протопластами вищих рослин. Відсутність у протопластах клітинної оболонки дозволяє вивчати біохімічні процеси, пов'язані з її регенерацією. З цією метою на борту біосупутника «Космос-2044» впродовж 14 діб проводився експеримент «Протодин». Протопласти виділялися із 8-добових проростків рапсу *Brassica napus* L. та культури клітин *Daucus carota* L. Проведений через 12 год після приземлення біосупутника аналіз показав, що життєздатність клітин (визначалася за допомогою флуоресцентної мікроскопії та доданого до середовища інкубації протопластів флуоресциндацетату) в середньому становила 63 % в дослідних варіантах та 68 % в наземних контролях. 75 % протопластів дослідних варіантів та 80 % контрольних регенерували клітинну оболонку. Об'єм клітин після їх осадження становив 66 % та 80 % від контрольних для рапсу та моркви відповідно. Кількісний аналіз складу основних компонентів клітинної оболонки за допомогою радіоізотопного методу показав, що загальний вміст целюлози в 2.2 рази, а геміцелюлози — у три рази був нижчим в порівнянні з наземними контролями. Вміст білку та активність пероксидази становили також приблизно 50 % від контрольних [11, 13, 19].

Згідно з проведеним ультраструктурним аналізом переважна частина протопластів дослідних та контрольних варіантів регенерувала клітинну оболонку. Оболонки клітин в умовах мікрогравітації були вдвічі тоншими, ніж у наземних контролях. Дослідні зразки характеризувалися також нижчим вмістом цистерн ендоплазматичного ретикулуму, зменшенням кількості крист в мітохондріях та збільшенням об'єму ліпідних крапель в цитоплазмі клітин [13]. Разом з тим при подальшому субкультуванні спостерігався нормальний ріст культур, хоча інтенсивність росту культур обох наземних варіантів була вищою порівняно з культурами, які експонувалися в умовах мікрогравітації. На підставі отриманих даних автори вважають, що фактори космічного польоту, в першу чергу мікрогравітація, можуть спричинювати зміни основних морфофункціональних характеристик рослинних клітин [9].

В наступному експерименті, проведеному з протопластами проростків рапсу та культури клітин моркви в умовах мікрогравітації, зразки експонувалися на бортовій центрифугі при навантаженні 1g, фіксувалися на орбіті. Проведений аналіз показав, що популяція клітин у дослідних зразках характеризувалася меншим об'ємом після осадження клітин, меншою кількістю клітин в клітинних агрегатах, зниженням активності пероксидази. Клітини в умовах мікрогравітації були більшими за розміром, більш вакуолізовані та характеризувалися нижчим вмістом крохмалю в пластидах, ніж клітини у бортовій центрифугі чи наземному контролі [18].

МОДЕЛЬНІ ЕКСПЕРИМЕНТИ

В численних модельних експериментах, що проводилися в Інституті ботаніки ім. Н. Г. Холодного НАН України, застосовувалися горизонтальні кліностати зі швидкістю обертання від 2 до 50 об/хв та центрифуги. Об'єктами дослідження були калусні культури гаплопапусу, гороху, квасолі, сої та культура ізолюваних клітин гаплопапусу, які вирощувалися на агаризованих середовищах. Дослідження проводилися в динаміці розвитку субкультур з 7 по 35 добу через 7-добовий інтервал з визначенням показників приросту сирової маси, вмісту сухої маси, відносного вмісту води в клітинах, кількості клітин на грам біомаси, мітотичної активності, кількості хромосом та ультраструктурної організації клітин тощо [6].

В умовах повільного (2 об/хв) кліностатування ростові показники калусної культури гаплопапусу в динаміці розвитку були близькими до контрольних. В умовах кліностатування зі швидкістю 50 об/хв накопичення біомаси в динаміці пасажу в середньому на 20 % переважало контрольне. Нагромадження сухої маси при цьому залишалося близьким до контрольних показників. Інтенсивніше накопичення біомаси супроводжувалося відносно вищим вмістом води в клітинах. Кількість клітин на грам біомаси в динаміці пасажу в умовах кліностатування зі швидкістю 50 об/хв була меншою порівняно з іншими варіантами [6]. Останні дані свідчать про те, що розміри клітин в умовах кліностатування (50 об/хв) збільшувалися порівняно з контрольними, та інтенсифікація приросту біомаси була зумовлена більш інтенсивним ростом клітин розтягом.

У зв'язку з тим, що біологічна дія кліностата залежить від швидкості обертання та від просторового положення біологічного об'єкта [12], поряд з кліностатуванням, при якому пробірки з калусною

Залежність реакції клітин калусної культури гаплопапусу від їхнього просторового положення на кліностаті (50 об/хв)

Варіант	Сира маса, мг	Суха маса, мг	Сира маса/суха маса,
Кліностатування I	641 ± 52	21 ± 2	31,0 ± 0.6,
Кліностатування II	491 ± 57	19 ± 2	25,4 ± 0.9,
Контроль (горизонтальний)	605 ± 59	21 ± 2	29,3 ± 0.6,
Контроль (вертикальний)	542 ± 48	19 ± 2	28,6 ± 0.5

Примітка: кліностатування I — пробірки розташовані паралельно осі обертання кліностата; кліностатування II — пробірки розташовані перпендикулярно до осі обертання кліностата

тканиною орієнтуються паралельно осі обертання кліностата, нами проводилося кліностатування з перпендикулярним розташуванням пробірок до осі обертання кліностата. Калусна тканина вирощувалася впродовж 14 діб в темряві в культивацийних пробірках 110×12 мм. Реакція клітин, пробірки яких орієнтувалися перпендикулярно до осі обертання кліностата, відрізнялася від реакції клітин, пробірки яких орієнтувалися паралельно осі обертання кліностата. Накопичення біомаси при цьому було нижчим, ніж у контролях, а вміст сухої маси залишався в межах контрольних значень (таблиця). Видно, що реакції клітин на просторову орієнтацію в умовах кліностатування стосуються переважно накопичення біомаси, варіації якого вказують на зв'язок з процесами, які контролюють ріст клітин розтягом. Ці дані ілюструють важливість просторового положення клітин, ростові реакції яких можуть бути зумовлені їхньою фізіологічною полярністю.

Наведені експериментальні дані, отримані на культурах тканин, клітин та протопластів вищих рослин в умовах мікрогравітації та кліностатування, показують, що метаболізм клітин, позбавлених контролю цілісного організму, чутливий до зміни сили тяжіння. Ці дані спонукають до розгляду можливих гравірецепторних механізмів клітин, виведених з-під контролю цілісного організму, що могли сформуватися в процесі еволюційного розвитку. Один із таких механізмів може асоціюватися зі структурною неоднорідністю цитоплазматичної мембрани рослинних клітин [16, 17], зміни просторового положення яких супроводжуються ростовими реакціями, насамперед змінами інтенсивності росту клітин розтягом.

ПЕРСПЕКТИВНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для поглиблення уявлень про механізми гравічутливості рослинних клітин заплановано експери-

мент «Мембрана», який входить в перелік експериментів, що проводитимуться на установці «Біолабораторія» на російському сегменті Міжнародної космічної станції. В ролі модельних систем запропоновані культури поодиноких клітин та протопластів, що вирощуються *plating*-методом. Ці моделі дозволяють вивчати функціонування рослинних клітин в «чистому вигляді», оскільки позбавлені як координаційних зв'язків цілісного організму, так і зв'язків розглянутих вище тканинних культур. Культивування клітин та протопластів в тонкому (≈ 1 мм) шарі агарового середовища робить можливим їхні мікроскопічні спостереження при незначних збільшеннях інвертованого мікроскопа. Однією з переваг цього методу є можливість аналізу та реєстрації поведінки індивідуальних клітин та протопластів на початкових етапах росту культури, можливість одержати кількісні характеристики таких важливих процесів, як інтенсивність формування клітинної стінки, проліферації, росту розтягом, диференціювання клітин, формування клітинних агрегатів тощо.

- Бейкер Р., Бейкер Б., Єлліот Л. Развитие и анатомия опухоли. Биологические исследования на биоспутнике «Космос». — М.: Наука, 1979.—С. 137—142.
- Бутенко Р. Г., Воробьев А. С., Носов А. М., Князьков И. Е. Синтез, накопление и локализация стероидных гликозидов в клетках разных штаммов *Dioscorea deltoidea* Wall // Физиология растений.—1992.—39.—С. 907—912.
- Бутенко Р. Г. Дмитриева Н. Н., Онгко В. и др. Влияние невесомости на соматический эмбриогенез // Биологические исследования на биоспутниках «Космос». — М.: Наука, 1979.—С. 118—125.
- Клайншустер Л., Магон К. Активность глутаминсинтетазы. Биологические исследования на биоспутнике «Космос». — М.: Наука, 1979.—С. 147—148.
- Климчук Д. А., Таирбеков М. Г., Мартин Г. М. Рост и ультраструктурная организация клеток растений *in vitro* в условиях микрогравитации // Цитология и генетика.—1995.—29, № 4.—С. 15—21.
- Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Белявская Н. Л. и др. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994.—73.—С. 54—71.
- Сидоренко П. Г., Машинский А. Л. Влияние условий космического полета на клетки высших растений в культуре *in vitro* // Космич. исследования на Украине.—1978.—С. 39—42.
- Таирбеков М. Г. Исследования с культурой клеток растений в космосе // Биоспутники «Космос»: Тез. докл. междунар. симпоз. — М., 1991.—С. 119—120.
- Таирбеков М. Г. Гравитационная биология клетки. — М.: ISBN, 1997.—127 с.
- Таирбеков М. Г., Воронков Л. А., Гужова Н. В. Некоторые физиолого-биохимические характеристики галловой опухоли моркови, развившейся в невесомости // Космич. биол. и авиакосм. мед.—1982.—№ 2.—С. 45—48.
- Таирбеков М. Г., Кордюм Е. Л., Климчук Д. А. и др. Развитие изолированных растительных клеток в условиях космического полета (эксперимент «Протопласт») // Изв. РАН. Сер. В.—1992.—№ 1.—С. 5—17.
- Brown A. H., Dahl A. O., Chapman D. K. Limitation on the use of the horizontal clinostat as gravity compensatory // Plant Physiol.—1976.—58, N 2.—P. 127—130.
- Klimchuk D. A., Kordyum E. L., Danelvich L. A., et al. Structural and functional organization of regenerated plant protoplasts exposed to microgravity on Biokosmos 9 // Adv. Space Res.—1992.—12.—P. 133—140.
- Krikorian A. D., Steward F. C. Morphogenetic response of cultured totipotent cells of carrot (*Daucus carota* var. *carota*) and zero gravity // Science.—1978.—200.—P. 67—68.
- Merkys A., Laurinavichus R., Kenstaviciene P., Nechitailo G. S. The study of the role of gravity on the processes of dedifferentiation of plant cells // 27th COSPAR Plenary Meet. — Helsinki, 1988.—P. 368.
- Moore R., Evans M. How roots perceive and respond to gravity // Amer. J. Bot.—1986.—73.—P. 574—587.
- Pickard B. G. Early events in geotropism of seedling shoots // Annu. Rev. Plant Physiol.—1985.—36.—P. 55—75.
- Rasmussen O., Baggerud C., Larsen H., et al. The effect of 8 days of microgravity on regeneration of intact plants from protoplasts // Physiol. Plantarum.—1994.—92.—P. 404—411.
- Rasmussen O., Klimchuk D. A., Kordyum E. L., et al. The effect of exposure to microgravity on the development and structural organization of plant protoplasts flown on Biokosmos 9 // Physiol. Plantarum.—1992.—84.—P. 162—170.
- Theimer R. R., Kudielka R. A., Rosch I. Induction of somatic embryogenesis in anise in microgravity // Naturwissenschaften.—1986.—73, N 7.—P. 442—443.

THE USE OF THE MODEL SYSTEMS, PLANT CELLS IN VITRO, IN STUDING GRAVISENSITIVITY OF ORGANISMS AT CELLULAR LEVEL

D. O. Klymchuk, G. M. Martyn

The results of the experiments with cell and protoplast cultures under spaceflight and clinorotation conditions are presented. It is shown that the metabolism of plant cells *in vitro* is sensitive to altered gravity. Mainly, the response of the cells to altered gravity is accompanied by changes in cell expansion growth.