ISSN 1561-8889. Космічна наука і технологія. 2007. Т 13. № 2. С. 43—47.

УДК 576.36:577.218

О. А. Артеменко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Вплив зміненої гравітації на проліферативну систему дводобових проростків гороху

Надійшла до редакції 26.10.06

Встановлення впливу клиностатування на чутливість проліферативної системи рослин має велике значення для розуміння та подальшого дослідження особливості їхнього розвитку та вивчення молекулярних механізмів регуляції клітинного циклу в умовах зміненої сили тяжіння. Визначення мітотичної активності клітин кореневої меристеми дводобових проростків гороху, співвідношення фаз мітозу та розподіл за вмістом ДНК вказують на зменшення цих параметрів за умов клиностатування протягом перших 12 годин дії фактора. Стабілізація подій клітинного циклу після 12 годин експерименту свідчить про високу адаптаційну здатність проліферативної системи рослин.

ВСТУП

Дані про рівень проліферативної активності меристематичних клітин в умовах мікрогравітації мають суперечливий характер. Так, у більшості космічних експериментів мітотична активність клітин кореневої меристеми (проростки кукурудзи) зменшувалася на 15—30 %, що пов'язується зі зниженням проліферативного пулу, або відбувається з прискоренням мітозу [1]. В той же час наведені дані про збільшення мітотичного індексу у порівнянні з наземним контролем в клітинах кореневої меристеми проростків кукурудзи та сочевиці [9, 11]. Припускається, що збільшення мітотичної активності пов'язане з подовженням мітозу або зі скороченням тривалості клітинного циклу. Однак також є дані про відсутність статистично вірогідної відмінності за мітотичною активністю клітин кореневої меристеми крес-салату між контрольним і польотним варіантами [4]. Така неоднозначність результатів, описаних в літературних джерелах, пов'язана з дією різних чинників, а також з різними строками дослідження мітотичної активності. Тому метою даної роботи було визначення чутливості проліферативної системи дводобових проростків гороху на дію клиностатування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Аналіз літературних даних показав, що більшість робіт з вивчення проліферації клітин, зокрема механізмів проходження клітиною мітотичного циклу, проводилися на меристемі коренів проростків різних рослин [1, 2, 5, 9, 11]. Однак ми обрали горох не випадково, бо саме зародкова меристема кореня проростаючого насіння гороху, за даними [5], є зручним експериментальним об'єктом із синхронним просуванням клітин по циклу для вивчення фізіолого-біохімічних та молекулярних механізмів регуляції проліферації рослинних клітин.

В наземних дослідженнях впливу зміненої гравітації на рослини широко використовують

© О. А. АРТЕМЕНКО, 2007

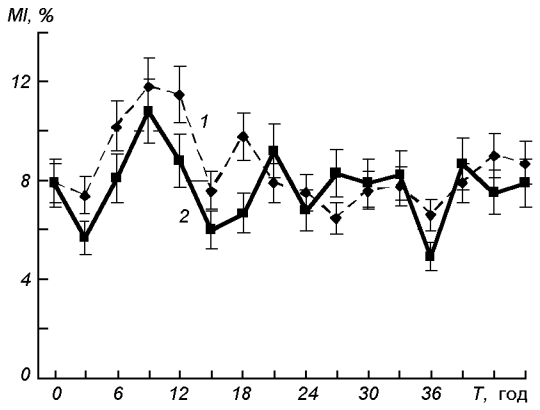

Рис. 1. Значення мітотичного індексу MI клітин меристеми коренів дводобових проростків гороху: *1* — у контролі, *2* — в умовах клиностатування

клиностати, що частково відтворюють біологічні ефекти мікрогравітації. За умов клиностатування рослина позбавлена можливості сприймати гравітаційний стимул. Об'єкт постійно дезорієнтується в полі земного тяжіння, таким чином створюється один з наслідків невагомості — відсутність постійності орієнтуючої дії вектору гравітації.

Клиностат складається з механічної платформи, що крутиться під кутом з рівномірною швидкістю навколо горизонтальної осі та обладнана скобами для фіксації контейнерів з дослідними організмами. Зазвичай використовують два типи клиностатів: повільний (зі швидкістю 1—5 об/хв), та швидкий (зі швидкістю 50—120 об/хв).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Середня тривалість фази мітозу в клітинах меристеми гороху складає 3 год, тому через кожні три години дії повільного горизонтального клиностатування відбирали фракції контрольного та дослідного варіантів. За вихідну точку вважали час початку досліду (48 год). Результати підрахунку мітотичного індексу представлені на рис. 1. На час початку досліду значення MI у вихідній точці дорівнювало 7.9 %. В контролі через 3 год після початку досліду мітотичний індекс зменшився у порівнянні з вихідною точкою, але не суттєво. Далі спостерігається поступове зростання мітотичної активності, і через 9 год MI складає 11.8±2.54 %, а потім зменшується до 11.5±1.0 %. В досліді через 3 год клиностатування відбувається помітне зменшення мітотичного індексу у порівнянні з вихідною точкою, MI в дослідному варіанті складає 5.7 %. Протягом всього експерименту за умов повільного горизонтального клиностатування спостерігається зменшення мітотичного індексу у порівнянні з контролем, хоча до 9 годин дії чинника включно ця різниця не є статистично вірогідною. Статистично вірогідна відмінність MI між контрольним та дослідним варіантами дводобових проростків гороху спостерігається лише через 12 годин після дії зміненої сили тяжіння. На цю годину MI в клиностатному варіанті становить 8.7 %, що майже на 3 % нижче ніж в контролі. Динаміка мітотичної активності за умов клиностатування подібна до такої в контролі. Крива мітозів повторює всі піки та зниження контрольного варіанту, але з нижчими показниками.

Співвідношення фаз мітозу клітинного циклу в клітинах кореня дводобових проростків гороху

T, год	ІНТЕРФАЗА : ПРОФАЗА : МЕТАФАЗА : АНАФАЗА : ТЕЛОФАЗА	
	Контроль	Клиностатування
0	91.99:3.64:2.07:0.8 :1.3	91.99:3.64:2.07:0.8 :1.3
3	92.60:3.80:1.75:0.76:1.09	94.24:2.16:1.30:1.20:1.10
6	89.81:4.80:1.98:1.61:1.80	91.90:3.72:1.75:0.75:1.88
9	88.16:5.68:2.26:2.32:1.57	89.14:4.82:2.15:1.85:2.04
12	89.45:5.96:2.60:1.19:1.80	91.23:4.75:1.75:1.10:1.17

Для визначення співвідношення фаз мітозу в клітинах (таблиця) за 100 % вважали загальну кількість досліджуваних клітин в кожному з варіантів. Подальші розрахунки співвідношення фаз проводили відносно цієї величини. Значне зниження кількості клітин майже на всіх фазах мітозу через 3 години після початку клиностатування вказує на чутливість проліферативної системи до відсутності сприйняття гравітаційного стимулу. Подальша стабілізація співвідношення профаз та метафаз і підвищення кількості клітин в цих фазах може свідчити про початок адаптаційних процесів, які відбуваються в клітині у відповідь на дію несприятливих чинників.

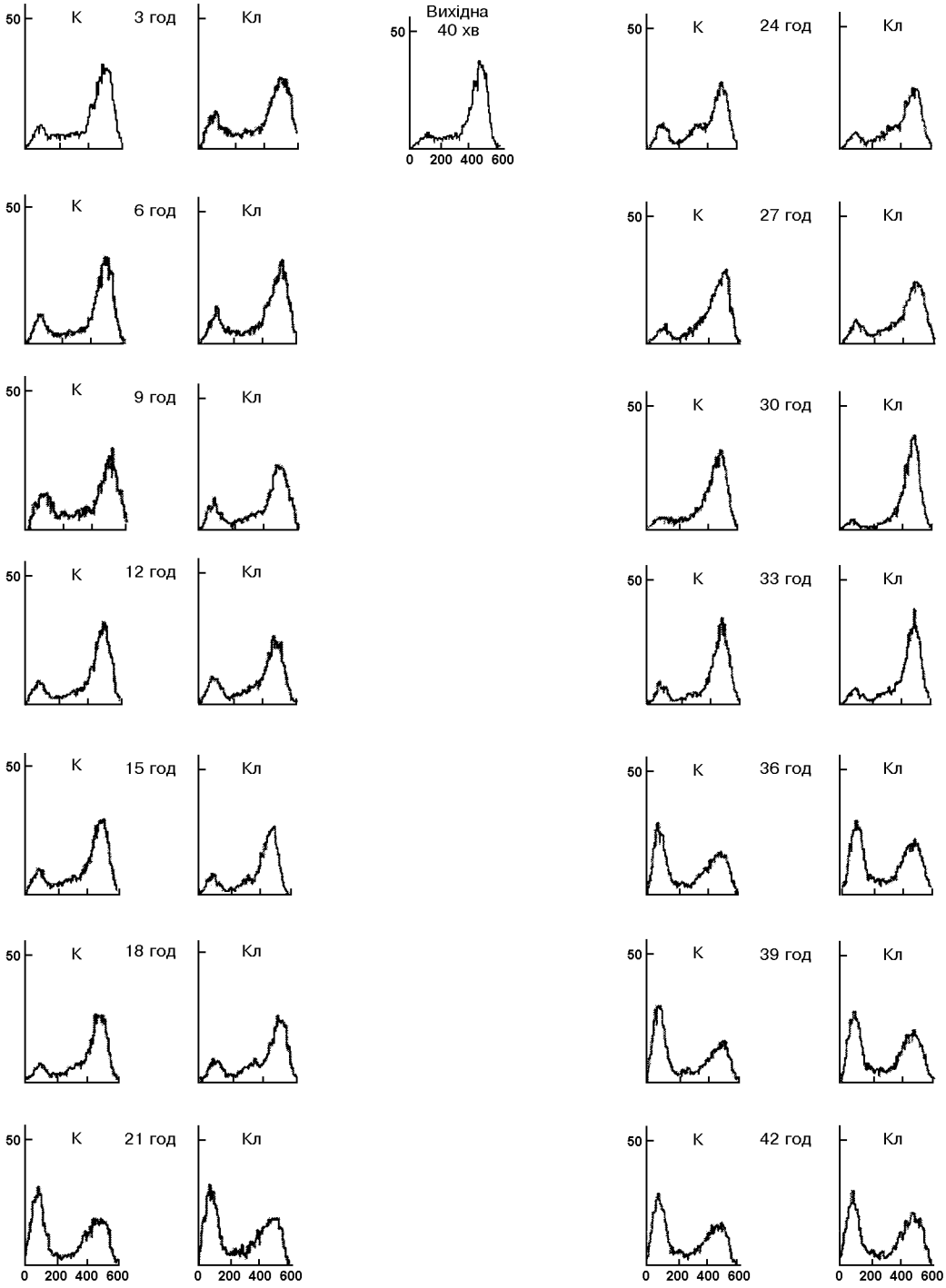

Рис. 2. Розподіл ядер клітин кореневої меристеми гороху за інтенсивністю флуоресценції йодистого пропідію (К — контроль, Кл — клиностатування)

Як в контрольному, так і в дослідному варіантах на 12-ту годину після початку клиностатування відмічено значну подібність параметрів розподілу клітин на різних фазах мітозу до параметрів вихідної точки, що вказує на значні адаптаційні можливості проліферативної системи.

Результати цитофлуорометричного аналізу зв'язування йодистого пропідію ядрами клітин меристем наведено на рис. 2 у вигляді гістограм, що відображають розподіл ядер за інтенсивністю флуоресценції. У меристемах дводольових проростків переважна кількість клітин, майже 75 %, зосереджена у другому піку і має середній рівень флюоресценції близько 400 умовних одиниць (у. о.), що відповідає клітинам з чотирикратним (4С) вмістом ДНК. Такий розподіл вказує на перехід до мітозу основної популяції клітин меристеми гороху, що характерне для зрілого насіння багатьох видів рослин. Окрім того, у першому, меншому піку, представлена популяція клітин з рівнем інтенсивності флюоресценції до 200 у. о., тобто 2С-клітин, що свідчить про несинхронність переходу клітин з однієї фази до іншої. Протягом експерименту, до 24-ї год включно, в умовах клиностатування спостерігалося зменшення кількості ядер з 4С-вмістом ДНК, а з 27-ї год і до кінця експерименту, навпаки, — її збільшення у порівнянні з контрольним варіантом. Проте починаючи з 33-ї год відбуваються зміни в розподілі клітин за вмістом ДНК як в контролі, так і в умовах клиностатування. Кількість клітин з 2С- та 4С-вмістом ДНК стає майже однаковою в обох варіантах, але у порівнянні з контролем кількість клітин з 4С-ДНК в умовах клиностатування більша. Така асинхронність популяції може свідчити про закінчення періоду високої мітотичної активності перших клітинних циклів і перехід до латентного стану з вмістом клітин у стані спокою та тих, які активно діляться.

Отримані нами дані про мітотичну активність дводольових проростків гороху виявили її зменшення, що збігається з даними для інших рослин. У роботах [1, 10, 12] вважається, що таке зниження мітотичного індексу пов'язане зі зниженням клітинної проліферації та/або зі змінами співвідношення клітин, які діляться, та інтерфазних клітин, що може призвести до зменшення тривалості мітозу.

Як правило, зменшення МІ у клітинах меристеми коренів різних рослин в умовах мікрогравітації та клиностатування спостерігається протягом перших діб експерименту, і збільшується після 5 діб [8], що пов'язувалось зі збільшенням вмісту гормонів (ІОК, АБК, зеатину) в коренях дослідних рослин після 5, 15 та 20 діб росту. Відсутність динаміки мітотичної активності в цих літературних даних також ускладнює аналіз та узагальнення цих результатів. Отже, зниження мітотичної активності може відбуватися за рахунок прискорення мітозу або пов'язане зі зниженням проліферативного пулу, яке відбувається завдяки збільшенню тривалості пресинтетичної фази. Зменшення кількості метафазних клітин також вважають однією з можливих причин зменшення мітотичного індексу в умовах клиностатування. Тут ми вважаємо, що зниження проліферативної активності клітин кореневої меристеми дводольових проростків гороху пов'язане з виявленням нижчих показників МІ. Виявлені нами зменшення мітотичної активності в умовах клиностатування є наслідком затримки переходу клітин з пресинтетичної фази циклу до фази синтезу ДНК, зумовленого подовженням G_1-фази. Ці дані повністю збігаються з літературними даними про збільшення тривалості цієї фази у відповідь на будь-які фізичні та хімічні фактори [2, 3, 6, 7]. Отриманий висновок про стабілізацію подій мітотичного циклу після 12 год експерименту вказує на високу адаптаційну здатність проліферативної системи рослин.

1. Бармичева Е. М., Гриф В. Г., Таирбеков М. Г. Рост и структура клеток апекса корня кукурузы под влиянием космического полета // Цитология.—1989.—**31**.—С. 1324—1328.
2. Гриф В. Г., Иванов В. Б. Параметри митотического цикла у цветковых растений // Цитология.—1995.—**37**, № 8.—С. 723—743.
3. Гудков И. Н. Регуляция клеточного цикла растений. — Киев: Наук. думка, 1985.—180 с.
4. Таирбеков М. Г., Парфенов Г. П., Платанова Р. Н., Жваликовская В. П. Биологические исследования на биоспутниках «Космос». — М.: Наука, 1979.—160 с.
5. Троян В. М. Клітинний цикл рослин та його регуляція. — Київ: Наук. думка, 1998.—171 с.
6. Удовенко Г. В., Драгавцев В. А., Волкова А. М. Реакция разных генотипов яровой мягкой пшеницы на засуху при различных температурных режимах вегетации // С.-х. биология.—1998.—Вып. 3.—С. 60—68.

7. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. — Уфа: Гилем, 2001.—160 с.
8. Aarrouf J., Schoevaert D., Maldiney R., Perbal G. Changes in hormonal balance and meristematic activity in primary root tips on the slowly rotating clinostat and their effect on the development of the rapeseed root system // Physiol. Plant.—1999.—**105**.—P. 708—718.
9. Darbelly N. Effects de la stimulation gravitropique et de la microgravitu sur la differenciation cellulaires dans les racines primaires // Bull. Soc. Bot. Fr.—1988.—N 135.—P. 229—250.
10. Driss-Ecole D., Perbal G. Importance of the l_g controls in interpreting the results of an experiment on plant gravitropism. — Malaga, 1989.—334 p.—(Preprint of the 40th Congress of IAF).
11. Driss-Ecole D., Shoevaert D., Now M., Perbal G. Dencitometric analysis of nuclear DNA content in lentil roots grown in space // Biol. Cell.—1994.—N 81.—P. 59—64.
12. Krikorian A. D., O'Connor S. A. Karyological observation // Ann. Bot.—1984.—**54**, Suppl. 3.—P. 49—63.

THE ALTERED GRAVITY EFFECT ON PROLIFERATIVE SYSTEM OF TWO-DAY PEA GERMS

O. A. Artemenko

The study of clinorotation effect on proliferative system sensibility of plants is very important for understanding and future investigations of their development characteristics and for examination of cell cycle regulation molecular mechanisms. Determination of two-day pea germ mitotic activity of cells, correlation of mitosis phase and DNA content point to decrease of these parameters under clinorotation during the first 12 hours of the factor influence. Cell cycle stabilization after 12 hours of the experiment show high adaptation capacity of plant proliferative system.