

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г. КОЛОДНОГО

На правах рукопису

НЕДУХА
ОЛЕНА МАКАРІВНА

СТРУКТУРА І МЕХАНІЗМИ ЗМІН КЛІТИННОЇ ОБОЛОНКИ
РОСЛИН ПРИ НЕВАГОМОСТІ ТА КЛІНОСТАТУВАННІ

03.00.25 - Клітинна біологія

УДК 676.3+620.187:581.17:581.84

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1994



00778963 (1)

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного АН України

Офіційні опоненти: академік АН Молдови О.А. Чеботарь,
доктор біологічних наук О.Т. Демків,
доктор біологічних наук, професор В.А. Кунєв

Провідна установа - Інститут фізіології рослин і генетики
АН України

Захист відбудеться "17" серпня 1994 р. о 10 годині
в Інституті клітинної біології та генної інженерії
АН України /252143, Київ - 143, вул. Заболотного, 148/
на засіданні спеціалізованої ради по захисту дисертацій
за спеціальністю клітинна біологія та генетика

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці
Інституту клітинної біології та генної інженерії
АН України, м. Київ, вул. Заболотного, 148

Автореферат розіслано "16" серпня 1994 р.

Ечений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

Л.В. Малишева

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. При різноманітних екстремальних впливах/зміні температури, засоленню, зневодненню, засусі, дії радіації тощо/ змінюється структура і склад клітинної оболонки, що може призвести до порушення її функціонування /Тарчевський, Марченко, 1985/ як опорної, транспортної, накопичувачої і секреторної структури рослиної клітини. Уявлення про оболонку як одну з головних структур, що бере участь у встановленні полярності, протозонної орієнтації та механічній міцності рослини у гравітаційному полі Землі були сформульовані С.Швенднером і розвинуті В.Ф.Раздорським /1955/ та Г.Х.Молотковським /1961, 1968/. Ними встановлено, що структура і механічні якості клітинних оболонок корелюють з величиною гравітаційних навантажень. При зменшенні гравітації вага клітин і тканин на опорні структури знижена до мінімуму, що може призвести до руйнування структури та функції оболонок.

Розвиток космонавтики і освоєння космічного простору ставлять перед фітобіологами завдання: створити теоретичні уявлення про ріст та розвиток рослин в умовах мікрогравітації і на їх основі розробити біологічні системи життєзабезпечення космонавтів у тривалих космічних польотах /Газенко и др., 1986; Парфенов, 1985; Ситник и др., 1984/. З питання вивчення структурно-функціональної характеристики рослиної клітини в умовах мікрогравітації дані вельми різноманітні /Таирбеков и др., 1979; Ситник, Кордюм, 1986; Кордюм и др., 1984/. Численними роботами встановлено, що в системі фізіологічної реакції гравіорецепції органів рослин на клітинному рівні беруть участь не тільки цитоплазматичні органели і ядро, а й клітинні оболонки /Lee et al., 1984; Wilkins, 1984; Feldman et al., 1987/, ріст яких опосередкований впливом кальцію, фітогормонів, роботою протонної помпи і структурно-функціональним станом цитоплазматичних органел /Полевой, 1986/.

Ці дослідження дозволили підвести основи до уявлення про комплексну участь Ca^{2+} , IOK, АЛЖ та H^+ як у гравіорецепції

клітин, так і у рості клітинних оболонок. У літературі є лише одиничні роботи з питання біогенезу клітинних оболонок рослин, які вирощувалися в умовах мікрогравітації. Це роботи по вивченню складу моно- і полісахаридів оболонок надземних та підземних органів, по дослідженню активності деяких ферментів, які беруть участь у рості оболонок /Гродзівская, Заботина, Дозова и др., 1985; Гродзівская, 1986; Ярошье, Марчківкайтє, 1984; Sigel, 1984/. Однак, не зважаючи на певні успіхи в області біохімічного вивчення складу клітинних оболонок при дії мікрогравітації, багато аспектів їх біогенезу залишаються недослідженими. Як і раніше, великі суперечні дані про зміни вмісту целюлози і лігніну, не вивчені зміни структури оболонок різних типів клітин і метаболічні зміни оболонок, мало досліджена роль плазмалеми і органел клітини, які беруть участь у біогенезі оболонки при впливі мікрогравітації, відсутня концепція біогенезу оболонки в умовах мікрогравітації, яка розкрила б механізми порушень структури і функціонування клітинної оболонки рослин і їх зв'язок з порушеннями клітини в цілому.

Вирішення цих питань необхідно для розуміння клітинних механізмів адаптації до основних факторів космічного польоту і встановлення сенсорнореактивних систем рослинної клітини при впливі мікрогравітації.

Мета і завдання дослідження. Головною метою даної роботи було вивчення структурної організації клітинних оболонок різних типів клітин вищих рослин при впливі мікрогравітації різної тривалості, встановлення гравітаційночутливих ланок метаболізму клітинної оболонки, а також можливих механізмів змін їх структури при впливі, який ми вивчаємо. У зв'язку з вищесказаним, нами були поставлені такі завдання:

1. Провести порівняльне вивчення ультраструктури оболонок і цитоплазматичних органел протонеми листолюбного муху, вирощеної в умовах тривалої невагомості і горизонтального кліностатування.

2. Визначити гравітаційночутливі ланки метаболізму клітинних оболонок, які лежать в основі порушення їх ультраструктури.

3. З'ясувати можливість регенерації оболонки у протопластів вищих рослин в умовах клиностатування для з'ясування ролі гравітації у встановленні цієї клітинної структури.

4. Дослідити структуру оболонок у різних типів клітин, представників одно- і дводольних рослин, які вирощуються в умовах мікрогравітації.

5. На підставі даних літератури і власних результатів з'ясувати механізми змін структури клітинних оболонок рослин при впливі мікрогравітації.

Положення, які виносяться на захист і ступінь їх новизни.

1. Структурно-функціональні зміни клітинних оболонок рослин залежать від типу клітин і тривалості впливу.

2. Біологічні ефекти тривалої невагомості і клиностатування на структуру клітинних оболонок носять однотиповий характер.

3. Механізм впливу мікрогравітації на структуру клітинних оболонок включає порушення їх метаболізму та участь вторинного месенджера - іонів кальцію.

Вперше встановлена залежність структурних змін клітинних оболонок від типу клітин і тривалості впливу мікрогравітації на рослину. Показано, що структура клітинних оболонок епідермальних тканин надземних органів змінюється під впливом короткочасової мікрогравітації, тоді як ультраструктура оболонок меристематичних і деяких асиміляційних /мезофільних і паренхімних/ клітин цих органів не змінюється.

Показано, що при впливі мікрогравітації структурні зміни клітинних оболонок корелюють із змінами ультраструктури цитоплазматичних органел. Потоншення клітинних оболонок і зміна їх структури супроводжуються посиленням вакуолізації клітин, збільшенням популяції пероксисом, змінює структуру апарата

Гольджі, пластид та мітохондрій. У хлоропластах спостерігається набубнавлення тилакоїдів, зниження об'єму крохмалю, у мітохондріях - збільшення об'єму крист.

Механізм дії мікрогравітації на структуру клітинних оболонок, який пропонується, оснований на ряді експериментальних даних принципово нового характеру.

Встановлена однотиповість біологічних ефектів тривалої невагомості і горизонтального кліностатування. Показано, що ці фактори викликають зменшення розмірів клітин, часткове округлення останніх, потоншення клітинних оболонок, а також зміну їх ультраструктури і структури цитоплазматичних органел і ядер.

Виявлено гравітаційночутливі ланки метаболізму клітинних оболонок рослин. Вперше встановлено, що мікрогравітація викликає зниження синтезу кристалічної целюлози і збільшення її аморфної форми і калози. Виявлено загальне зниження вмісту целюлози і збільшення геміцелюлоз. Показана активація ферментів целюлозолітичного і пектолітичного комплексів, зокрема ендо- і екзоглюканази, пектиностерази і ендополігалактуронази.

Встановлено порушення кальцієвого гомеостазу клітин під впливом мікрогравітації, яке опосередковане інгібуванням активності Ca^{2+} -АТФази на плазмалемі і збільшенням її активності на мембранах кальцій-секвестуючих органел.

Вперше показано, що в умовах мікрогравітації зростає інтенсивність цитохімічної реакції на вільний і слабозв'язаний кальцій у периплазматичному просторі і оболонках та знижується відносний вміст мембраннозв'язаного кальцію у цих структурах.

Вперше встановлено інгібування ресинтезу оболонки у протопластів вищих рослин /до 90%/ при культивуванні їх на горизонтальному кліностаті. Виявлено, що процес відновлення оболонки починається з утворення полісахаридів матрикса, а потім утворюються мікрофібрили целюлози. Показана ультраструктурна однотипність змін органел при регенерації оболонки протопластами в умовах мікрогравітації і контролю.

На основі власних експериментальних результатів і даних літератури показано, що в механізмі змін структурно-функціональних показників клітинних оболонок вищих рослин в умовах невагомості і скаляризації вектора гравітації /горизонтального клиностатування/ включені процеси, регуляція яких здійснюється за участю іонів кальцію.

Теоретичне і практичне значення роботи.

Одержані експериментальні результати структурних ознак клітинних оболонок, визначення гравіоочутливих лачок Іх метаболізму у рослин, вирощених при дії невагомості та клиностатування, а також виявлена реакція-відповідь оболонки та органел на сигнал мікрогравітації мають не тільки теоретичне, а й прикладне значення незалежно від того, на яких об'єктах - практично цінних, чи ні - ці дослідження виконані, оскільки виявлені закономірності зміни структури оболонок і гравітаційночутливих процесів Іх метаболізму носять загальний характер і, очевидно, властиві більшості вищих рослин. Дослідження допомагають повніше зрозуміти загальні закономірності ролі гравітації в біогенезі і функціонуванні оболонок - цього важливого компоненту клітини. Виявлені нами зміни в оболонках /зниження товщини стінки і ІІ кутикули, розпушення, зниження щільності воскового нальоту, зміна структурованості/ свідчать про лабільність ІІ структури, очевидне зниження механічно-опорної функції і збільшення кутикулярної транспірації клітин, тому вказані дані необхідно враховувати при подальшій розробці приладів та створенні оранжерей в біологічних системах життєзабезпечення космонавтів при тривалих космічних польотах.

Одержані експериментальні результати по вивченню дії мікрогравітації на оболонки епідермальних клітин надземних органів рослин дозволяють рекомендувати структуру зовнішніх оболонок епідермісу як діагностичний критерій дії невагомості на клітини вищих рослин.

Дані про вплив горизонтального клиностатування на вміст кристалічної целюлози в оболонках можна розглядати як непряме

обґрунтування для розвитку досліджень кристалізації біополімерів в умовах невагомості.

Реалізація. Робота була основною частиною досліджень, які проводилися у відділі цитології Інституту ботаніки ім.М.Г.Хвладного АН УРСР у 1980-1984 рр. по темі "Реакції рослинних клітин і їх адаптивні можливості при зміні сили тяжіння" № 8007149, у 1985-1988 рр. - "Клітинні механізми адаптації до головних факторів космічного польоту" № 01.85.0 000554, у 1989-1991 рр. "Сенсорно-реактивні системи рослинної клітини в процесах клітинного росту і диференціювання в умовах зміни геофізичних факторів і космічного польоту", № 01.89.0 036499. Основні результати робіт були надруковані у наукових статтях, використані при написанні монографій у співавторстві: Ситник К.М., Кордюм В.А., Кордюм Є.Л. та ін., "Мікроорганізми у космічному просторі", Київ, 1983; Ситник К.М., Кордюм Є.Л., Недуха О.М. та ін. "Рослинна клітина при зміні геофізичних факторів", Київ, 1984. Частина даних введена у курси лекцій "Ультраструктура рослинної клітини" і "Космічна ботаніка", які викладають на кафедрах фізіології рослин і ботаніки Донецького державного університету, Мелітопольського педінституту і Української сільськогосподарської академії.

Апробація. Матеріали дисертації доповідалися /або представлялися/ на XV Чехословацькій конференції по електронній мікроскопії /Прага, 1977/, XI Всесоюзній нараді з питань круговороту речовини у замкнених системах на основі життєдіяльності нижчих організмів /Київ, 1981/, республіканських науково-технічних конференціях по електронній мікроскопії /Київ, 1981, 1983, 1986/, VI наукових читаннях по космонавтиці /Москва, 1982/, XIII читаннях, присвячених розробці наукової спадщини і розвитку ідей К.Е.Ціолковського /Калуга, 1982/, II-VI все-союзних симпозіумах "Клітинні механізми адаптації" /Карадаг, 1985; Чернігів, 1988, 1991/, XLXIV-XXXV міжнародних конгресів астронавтичної федерації /МАС/ /Будапешт, Венгрія, 1983; Лозанна, Швейцарія, 1984; Брайтон, Англія, 1987; Малага, Іспанія, 1989/, XXV, XXVI-XXIX сесіях Міжнародного комітету космічних

досліджень /КОСПАР/ /Грац, Австрія, 1984; Еспоо, Фінляндія, 1988; Гаага, Нідерланди, 1990; Нью-Йорк, США, 1992/ міжнародному симпозиумі по підведенню підсумків експериментальних досліджень на біосупутнику "Космос-1887" /Москва, 1988/, 8-му і 9-му Сабінінських семінарах /Москва, 1986, 1987/, III Всесоюзній конференції "Біосинтез целюлози та інших компонентів клітинної стінки" /Казань, 1990/, Всесоюзної конференції "Бріологія у СРСР, її досягнення і перспективи" /Львів, 1991/.

Структура дисертації. Дисертація складається із вступу, одного розділу літературного огляду, експериментальної частини, яка включає розділ опису матеріалів і методів і 5 розділів дослідження і їх обговорення, заключної частини, висновків, списку літератури /I том/ і додатка /II том/. Дисертація викладена на 245 сторінках машинописного тексту, до списку літератури входять більш ніж 800 робіт вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота містить 10 таблиць, дві схеми, три графіки; у додатку розташовані ілюстрації /126 таблиць, включаючи 232 електронограми і 29 фотографій світлової мікроскопії/.

ЗМІСТ РОБОТИ

Склад, структура, біогенез клітинної оболонки і фактори середовища

На основі літературних джерел дано огляд сучасних уявлень про склад, структурну організацію і біогенез клітинних оболонок рослин. Відзначимо, що серед полісахаридів і білків в оболонках виявлено новий клас регуляторних молекул клітини-олігосахаринів, які виконують важливі регуляторні функції /Darvill et al., 1985; Ryan, 1988/. Показано, що біогенез оболонок пов'язаний з метаболічною активністю певних цитоплазматичних органел і катіонно-обмінною здатністю оболонок, у якій Ca^{2+} та H^{+} відіграють важливу роль, а також із дією ферментів, фітогормонів /ОК, АБК, фібелетини, етилен/ /Полевой, 1986; Ishizawa, Ewachi, 1984; Cleland, 1986/. Аналіз літератури показав, що фактори зовнішнього середовища в умовах земної

гравітації впливають на структурно-функціональну характеристику клітинних оболонок і їх ріст /Тарчевский, Марченко, 1985; Sekuri, Tanaka, 1987/. При гравіоіндукції також порушується ріст оболонок у спеціалізованих гравіорецепторних клітинах колумели коренів вищих рослин /Audus, 1979; Brown, 1985; Kim, Roux, 1988/. Установлено, що в умовах мікрогравітації відбувається порушення просторової орієнтації /Ілатонова, Перфенов, 1979/, росту рослин і ряду метаболічних процесів /Таирбеков и др., 1978; Сытник и др., 1984/, що може призвести до зміни ультраструктури органел і прискороеного старіння клітин /Сытник, Кордод, 1986; Кордод и др., 1989/. Аналіз літератури показав, що досліджені лише окремі компоненти системи біогенезу клітинних оболонок рослин, які ростуть в умовах мікрогравітації /Заботина и др., 1981; Тарбеков и др., 1988/. Про зміни структури і механізм можливих порушень клітинних оболонок в умовах мікрогравітації майже нічого невідомо.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктами досліджень були клітини протоніми листостеблого моху /*Funaria hygrometrica* Hedw./, меристематичні /туніка вегетативного пагону/ і ряд асиміляційних клітин /епідерміс і мезофіл листа, епідерміс і паренхіма сім'ядолей та гіпокотилів/ рослини пшениці /*Triticum durum* L./, бальзаміна /*Impatiens balsamine* L./. Використовували також протопласти картоплі /*Solanum tuberosum* L./.

Протоніми моху вирощували на агаризованому середовищі Кнопа або Хелера у приладі ТРС-2 і/або чашках Петрі згідно з методикою ведення асептично чистих культур при $+20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ та цілодобовому освітленні /освітленість 125 або 2000 лк/.

Культура протопластів картоплі одержана з листя асептично вирощених рослин за методом В.А.Сидорова та ін. /1985/, з подальшим культивуванням на агаризованому середовищі s-v-s pH 5,7, у чашках Петрі /3,5л см/ при $+24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 10 діб при освітленні /розсіяним світлом ламп денного світла/ 16 год

/1000 лк/ і 8 год темряви. Протопласти виділені В.М.Самойловим. Рослини пшениці вирощували на штучному іонітному субстраті ІС-2 у приладі "Світлоблок" протягом 16 діб при $+23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, цілодобовому освітленні /4000 лк/. Ідея цього експерименту по вирощуванню в умовах космічного польоту і його поставка належать співробітникам НПО "Енергія" Г.С.Нечитайло і ІМП МОЗ Росії О.А.Машинському.

Рослини бальзаміна вирощували 19 діб у контейнері між двома шарами дрібнопористого поролону на воді при $+20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в умовах повної етіології. Ідея експерименту по вирощуванні цієї рослини в умовах мікрогравітації і його постановка належить співробітникам ІОНА АН Росії В.Філіппенко і ІМП МОЗ Росії В.Г. Чучкіну. Для дослідження використовували інтактні рослини.

Клиностакування. Протоному моху і протопласти картоплі вирощували на горизонтальному клиностації, який обертається із швидкістю 2 об/хв, в умовах температури, вологості і освітленості аналогічних відповідним стаціонарним контролям.

Умови космічного польоту. Рослини пшениці вирощували на борту орбітальної станції "Мир" у приладі "Світлоблок" на субстраті ІС-2. Температура, вологість і освітлення, а також тривалість експериментів були аналогічні умовам у наземних лабораторних експериментах.

Шестидобові проростки бальзаміна поміщали на борт біосупутника "Космос-1887" в умовах повної етіології за 10-12 год до старту. Тривалість експерименту на орбіті - 13 діб; температура і вологість аналогічні контрольним на Землі.

Експерименти з вирощуванням протонеми моху проводили на борту орбітальної станції "Салют-6", спори моху висівали при участі космонавта СРСР Г.М.Гречко на агаризоване середовище Хелера у приладі ІС-2 напівавтоматично. Тривалість експерименту - 96 діб. Освітленість, вологість аналогічні умовам наземного контролю.

Цитологічні і аналітичні методи. Для освітлооптичного дослідження використовували фазово-контрастну /МББ-1А/ і люмінесцентну /МД-2/ мікроскопії. Ідентифікацію регенеруючих оболо-

нок у протопластів проводим калькофлуором згідно з методикою Херза / Herth, Schnepf, 1980/, цитофлуориметричне дослідження і визначення відносного вмісту в оболонках калози здійснювали за Каррієром / Currier, Shin, 1968/.

При електронномікроскопічному дослідженні фіксацію проводили 2,5%-ним розчином глутарового альдегіду і 1-2%-ним розчином O_3O_4 , як описано нами раніше /Сытник и др., 1984/ із наступним зневодненням матеріалу і заливкою у суміш епоксидних смол /епон-аралдит/. Контрастовані /ураніацетатом і/або цитратом свинцю/ або неконтрастовані /при цитохімічних дослідженнях/ зрізи переглядали і фотографували в електронних мікроскопах JEM-100 B і JEM-1200X. Поверхню кутикули епідермісу листя вивчали в скануючому мікроскопі JSM-35 після префіксації матеріалу альдегідами і зневоднення; наплення здійснювали золотом. Морфометричний аналіз електроннограм виконували за методикою, описаною О.В.Кисельовою з співавторами /1974/.

Локалізація АТФазної активності визначали за методом Вакштейна-Мейселя з деякими модифікаціями /Недуха, 1986/, локалізацію целюлазної і пектиназної активності - за методом Аллена і Неслера / Allen, Nessler, 1980; Nessler, Mahlberg, 1981/, ідентифікацію кальцій-зв'язаних центрів мембран - за Стоксом-Клейном / Velitser et al., 1982/, визначення вільного і слабкозв'язаного кальцію - піроантимонатним методом у модифікації Сімсона / Simson, Spicer, 1975/. Відносний вміст мембранозв'язаного кальцію в клітинах визначали по інтенсивності люмінесценції комплексу кальцій-хлортетрациклін /після фарбування клітин $10^{-5}M$ водним розчином хлортетрацикліна/. Рентген-спектральний аналіз клітинних структур на напівтовстих зрізах, фіксованих піроантимонатним методом, проводили за допомогою рентгенівського аналізатора /Link Systems/ Час накопичення сигналу 600 с.

Вміст полісахаридів в оболонках визначали за методами, які засновані на різниці швидкості їх гідролізу у розведених концентрованих кислотах та лугах: кристалічної та аморфної целюлози - за В.В.Арасимовичем та А.Н.Зрмаковим /1987/; пек-

тину, протопектину і геміцелюлозу - за Х.Н.Починком /1976/. Активність ферментів целюлозолітичного і пектолітичного комплексів визначали стандартними біохімічними методами /Лившиц, 1967; Класов и др., 1980; Колеснева, Мельничук, 1979/. Повторність дослідів 4-6-кратна. Результати обробляли статистичними методами /Урбах, 1963/.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

ВИВЧЕННЯ УЛЬТРАСТРУКТУРИ КЛІТИНИХ ОБОЛОНОК РОСЛИН ПРИ ДІЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ

Ультроструктурні ефекти тривалої невагомості на клітини протонеми моху

Наведені дані показують, що в умовах тривалого космічного польоту спори моху проростають і утворюють протонему, яка складається в цілому з клітин хлоронеми. Розміри клітин, їх структура і форма відрізнялися від контролю: дернинки і клітини були коротшими, 20% клітин мали округлу або гантелевидну форму, у контролі - циліндричному. Зменшення розмірів клітин, очевидно, пов'язано з порушенням вуглеводного обміну і розтягу клітин /Northcote, 1982; MacLachlan et al., 1982; Boyer, 1988/. Округлення клітин описано також іншими авторами на рослинних і тваринних клітинах /Ильина-Кукуева и др., 1977; Винников и др., 1979; Таирбеков и др., 1979/ і, очевидно, пов'язано з порушенням кальцієвого обміну і структури цитоскелету /Lorenzan, 1984/ або перерозподілом H^+ між периплазмою та плазматичною мембраною /Селле и др., 1980/. Показано, що клітини хлоронеми, що росла у контролі, мають типові ознаки ультроструктури фотосинтезуючих клітин, для яких характерні висококорозвинені гранальні хлоропласти з крохмальними зернами, гранулярний ендоплазматичний ретикулум, конденсовані мітохондрії, помірні структури апарата Гольджі і слабкохроматизоване ядро. Клітинні оболонки - асиметричні, шаруваті, щільність плазмодесми у поперечних оболонках помірна / ~ 12 на

на 1 μm^2 площі оболонки/. Встановлено, що в клітинах, які ростуть в умовах мікрогра-
вітації, ультраструктура органел і структура клітинної оболон-
ки типова для старіючих клітин. В мембранах оболонок хлоропласт-
тів і мітохондрій, а також у плазмалемі спостерігалося підви-
щена щільність, злипання, руйнування або втрата їх чіткості;
в пластидях - розбухання тилакоїдів і менший парціальний об'єм
крохмаль, в мітохондріях - руйнування крист; збільшення попу-
ляції пероксисом, зниження площі поверхні ендоплазматичного
ретикулуму і структур апарата Гольджі, каріолізіс і розрід-
ження гіалоплазми. Підвищення електронної щільності ендо-
мембран, злипання мембран оболонок органел дозволяють припус-
тити порушення їх структури і функції, що представлено в літе-
ратурі рядом побічних доказів /Юл'яна, 1988; Kordyum et al.,
1984/. Товщина клітинних оболонок була утрічі менша, ніж у
контролі, периплазматичний простір розширений, електронна
щільність оболонок у частини клітин підвищена, у іншій частини
спостерігалося розпушення структури, шеруватості часто не вид-
но, плазмодесми не виявляються. Ці зміни, очевидно, є наслідком
зниження синтезу субстратів-попередників полісахаридів, підси-
лення літичних процесів і процесів старіння клітин.

ВІВІВ КЛИНОСТАТУВАННЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНУ
ХАРАКТЕРИСТИКУ КЛІТИННИХ ОБОЛОНОК ПРОТОНЕМИ МОХУ
PUNARIA hygrometrica NEBW.

Біологічні ефекти невагомості у рослин відтворюють при їх
вирощуванні на горизонтальних клиностахах /Меркис, 1973; Brown,
Dahl, 1976/. За пропозицією ряду авторів, зміна структури
клітинних оболонок при клиностатуванні могла бути наслідком
дії ряду ферментів /Вага, Gordon, 1972; Siegel, Siegel, 1982/
і порушення синтезу полісахаридів /Гродзовская, 1986; Заботи-
но, 1987/. Однак, не виключено, що ступінь формування клітин-
них оболонок залежить від процесів кристалізації целюлози,
структури і функціонального стану плазмалемі, а також від дії

вторинних месенджерів. Тому з'ясування вмісту і співвідношення полісахаридів оболонки, вивчення активності певних ферментів, які беруть участь у метаболізмі оболонки, локалізації і визначенні вмісту кальцію перспективні для вивчення механізмів структурних змін клітинних оболонок рослин при впливі мікрогравітації. Не менш важливе визначення характеру структурних змін органел клітин залежно від впливу мікрогравітації на клітинні оболонки.

Структура оболонок і зміна ультраструктури клітин протонеми моху при кліностатуванні

Нами встановлена гетерогенність реакції протонеми на вплив мікрогравітації /Надуха, 1988/. Виявлено, що у 20% дернинок /перший тип/ клітини не реагували на вплив, ультраструктура органел і клітинних оболонок, а також товщина останніх були ідентичні контролю. У 60% /другий тип/ виявлені зміни в ультраструктурі органел і оболонок, у решти /третій тип/ - ознаки старіючих або плазмолізуючих клітин, які гинуть. Товщина клітинних оболонок другого типу дернинок була удвічі менша, ніж у контролі. Виявлено в клітинах другого типу порушення полярності і морфогенезу протонеми, яке відображається в утворенні від спори багатопроменевої хлоронеми, а також округлення клітин /за аналогією в умовах космічного польоту/ і зменшення їх розмірів.

У клітинах другого типу дернинок зміни відображались у розбуханні тилакоїдів хлоропластів, зникненні гран, зниженні розмірів крохмальних зерен, появі крупних мітохондрій, збільшенні популяції пероксисом і перціального об'єму ендоплазматичного ретикулуму, появі кальцій-зв'язуючих центрів мембран. За структурою клітинної оболонки в цьому типі дернинок виділені три підтипи: перший - з тонкими оболонками, структура яких шарувата, другий - з тонкими розпушеними оболонками або з тонкими електроннощільними, третій - з тонкими дізуючими оболонками.

Вивчення вмісту полісахаридів оболонки, локалізація
целюлаз і пектиназ і визначення їх активності у
протонемі моху

Вміст полісахаридів клітинних оболонок протонеми моху, яка росла у контролі і при кліноостатуванні, суттєво відрізняється. Найбільші відмінності стосуються вмісту кристалічної целюлози і геміцелюлоз /табл.1/.

Таблиця 1
Вміст /%г сирої маси/ полісахаридів у 30-добовій протонемі моху, яку вирощували у контролі і при кліноостатуванні

Полісахарид	Умови	
	Контроль	Кліноостатування
Целюлоза		
кристалічна	42,48	17,29
аморфна	16,77	22,08
всього	59,26	39,37
Геміцелюлози	7,18	21,00
Пектинові речовини		
розчинний пектин	0,33	0,67
протопектин	1,34	0,38

Очевидно, це може свідчити про те, що в умовах мікрогравітації знижуються синтез целюлози і кристалізація мікрофібрил, а також утворення і зміна основного транспорту УДФГ, більша частина якої йде на утворення геміцелюлоз /Гудвін, Мерсер, 1986/, які мають вищу водоутримувачу здатність, ніж інші полісахариди /Рис, Стернберг, 1988/.

Електронноцитохімічне вивчення локалізації целюлаз і пектиназ у клітинах протонеми, яка росла у контролі, показало, що в присутності екзогенних субстратів ІЗМД і яблучного пектину, відповідно, преципітат реакції виявляється в клітинних

оболонках, у цитоплазмі - відсутні. В клітинах кліностатного варіанта виявлена ідентичність локалізації і збільшення розмірів преципітату і його щільності, особливо на пектинази /у периплазматичному просторі/.

У спільних дослідженнях із співробітницями Інституту ботаніки АН УРСР Трутневою І.А. ідентифіковані ферменти комплексу пектиназ, од.мг⁻¹.хв⁻¹ /КФ 3.2.1.15; КФ 3.1.1.11; КФ 3.2.1.67/:

полігалактуроназа	у контролі	83,20
полігалактуроназа	при кліностатуванні	110,80
пектинестераза	у контролі	сліди
пектинестераза	при кліностатуванні	13,60
екзополігалактуроназа	у контролі	не виявлено
екзополігалактуроназа	при кліностатуванні	не виявлено

Ідентифікація ферментів комплексу целюлаз також показала суттєві відмінності у їх активності під впливом мікрогравітації, мк.моль⁻¹.мл⁻¹ /КФ 3.2.1.4; КФ 3.2.1.74/:

ендоглюканаза	у контролі	0,12
ендоглюканаза	при кліностатуванні	0,32
екзоглюканаза	у контролі	1,54
екзоглюканаза	при кліностатуванні	7,04

Одержані результати свідчать про те, що в умовах кліностатування зниження кристалізації целюлози пов'язано з підвищенням реакційної здатності целюлаз, тобто із зростанням ферментативної реакції гідролізу целюлози /Клесов, 1987; Клесов і др., 1980; Синицин, Клесов, 1981/, тоді як висока активність пектолітичних ферментів - з гідролізом галактозидуронідних зв'язків у пектинах і вивільненні зв'язаного кальцію /Demarty et al., 1984/.

Цитофлуориметричний аналіз вмісту калози у клітинах протонеми моху фунарія водогомірна при кліностатуванні

Під впливом екзогенних факторів у клітинних оболонках синтезується калоза, з допомогою гідративних оболонок якої відбувається регуляція транспорту водних розчинів по апопласту /Dwelle, 1974; Mergon, Lucas, 1986/. Цитофлуориметричний аналіз вмісту калози у клітинних оболонках протонеми моху виро-

Таблиця 2
Вплив кількостатування на вміст калози в оболонках протонеми дунарії вологомірної

Порядковий номер клітини протонеми	Вміст калози, відн. од.			
	у контролі в оболонках		при кількостатуванні, 2 ос/хв, в оболонках	
	поздовжній	поперечний	поздовжній	поперечний
1	13,84±1,63	33,21±4,89	12,17±1,78	54,58±5,40*
2	16,66±3,50	33,41±4,79	20,55±0,96	103,40±13,37*
3	16,72±3,19	48,76±7,96	30,55±5,49*	64,55±14,46
4	19,02±3,41	54,98±8,64	20,40±1,98	81,06±12,81
5	19,31±2,57	49,55±5,76	22,68±4,57	129,46±18,82*
6	12,98±0,90	49,90±6,30	26,20±4,46*	156,17±6,79*
7	12,47±1,02	52,80±9,23	39,20±5,58*	97,04±17,89*
8	15,13±3,02	64,94±10,88	35,16±5,05*	147,80±21,04*
9	10,96±0,59	86,92±19,57	20,80±3,13*	154,24±18,43*
10	8,07±1,19	50,74±5,59	16,20±1,47*	141,95±16,02*
11	10,90±0,27		39,78±7,19*	

* Значущо відрізняється від величини в контролі / $P \leq 0,05$ /

щеної в контролі, показав, що її вміст у поперечних і поздовжніх оболонках суттєво відрізняється. У оболонках клітин кліно-статичного варіанта вміст цього глікану достовірно вище, ніж у клітинах контролю /табл.2/. Одержані дані свідчать про те, що умови, мікрогравітації зумовляють стимулюючий ефект на синтез і/або активацію β -1,3-глікансинтетази при впливі невідомих сигнальних індукторів, на роль яких можуть претендувати фітогормони і іони кальцію /Polulyach et al., 1988; Trety et al., 1987/. Для перевірки цього припущення були застосовані цитохімічні методики і використані прямі і побічні показники: вивчення локалізації вільного і слабкозв'язаного кальцію, АТФаз та вмісту мембраннозв'язаного кальцію в оболонках.

Цитохімічне визначення іонізованого і слабкозв'язаного кальцію і цитофлуориметричне визначення вмісту мембраннозв'язаного кальцію в клітинах протонеми моху

Преоантисмонатним методом встановлена локалізація іонізованого і слабкозв'язаного кальцію в клітинних оболонках протонеми моху, яка росте у контролі і при кліностагуванні. Виявлено, що в клітинах контрольного варіанта поздовжні і поперечні оболонки марковані скупченнями дрібних /20-30 нм/ або піловидних гранул преципітата, плазмодесми позбавлені їх. Структури клітинних органел /ядра, хлоропласти, мітохондрії, мікротільця, апарат Гольджі/, а також плазмадема і тонопласт характеризуються різною інтенсивністю реакції.

У кліностагованих клітинах встановлена подібність і відмінність у локалізації преципітату та інтенсивності цитохімічної реакції від такої у контролі. Відмінності стосувалися підсилення інтенсивності цитохімічної реакції у периплазмі, оболонках, мембранах ядра, стромі та крохмальних зернах хлоропластів, матриці мітохондрій, на тонопласті і у гіалоплазмі. Відзначені зміни свідчать про підвищення пулу іонізованого кальцію у периплазмі і гіалоплазмі, і, можливо, зумовлені вивільненням Ca^{2+} , який зв'язаний з карбоксильними групами пектинів оболонок / Jarvis et al., 1988/, і переходом

його із зв'язаного стану у вільний, а також інгібуванням виведення Ca^{2+} із клітини, що здійснюється Ca^{2+} -АТФазою / Dieter, Marme, 1980/ та інтенсифікацією його депонування кальцій-секвеструючими органелами. Це характерно як для клітин тварин, так і для клітин рослин при впливі різноманітних альтеруючих факторів /Заалішвили и др., 1986; Машанский, Рабинович, 1987; Goble, 1984; Marme, 1985/.

З метою ідентифікації іонів кальцію у преципітаті після піроантимонатної реакції проведено рентген-спектральний аналіз напівтовстих зрізів досліджуваних клітин. Встановлено, що преципітат реакції у клітинних оболонках /рис.1/, мітохондріях і хлоропластах містить елементи кальцію і сурми.

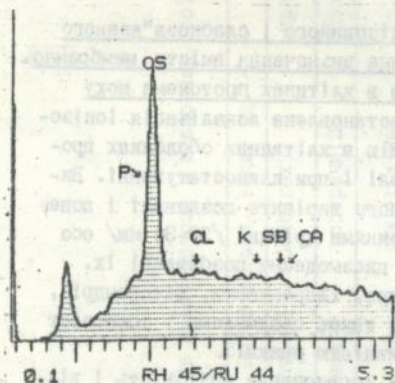


Рис.1. Рентген-спектральний склад елементів ділянки клітинної оболонки протонеми моху, вирощеної при кліностатуванні /після піроантимонатної реакції/. По горизонталі - енергія у KeV, де кожному елементу відповідає свій енергетичний спектр, по вертикалі - кількість імпульсів лічби.

Цитофлуориметричне визначення вмісту мембранозв'язаного кальцію у клітинних оболонках досліджуваного матеріалу показало, що в умовах кліностатування його вміст достовірно нижчий, ніж у оболонках контрольного варіанта /таб.3/.

Це дає можливість припустити, що кальцій, який вивільнюється із пектинів, частково виходить із клітин у середовище, а частково залишається у апопласті.

ІНЖ ім. В. Стефаніва
АН УРСР

Таблиця 3

Вплив кліностатування на вміст мембранозв'язаного кальцію в клітинних оболонках протонеми мому

Порядковий номер клітини	Оболонка	Вміст кальцію, відн.од.,	
		в контролі	при кліностатуванні
1	Апеко	11,82±2,39	4,56±0,48*
	Поздовжня	15,95±2,54	5,79±0,71
	Поперечна	41,23±5,17	12,18±1,19*
2	Поздовжня	15,77±1,56	6,47±0,83
	Поперечна	33,92±3,00	16,39±1,78
3	Поздовжня	16,18±2,67	6,64±0,59*
	Поперечна	40,24±4,48	15,17±1,88*
4	Поздовжня	18,59±2,95	7,87±0,90*
	Поперечна	33,36±2,99	16,88±1,59
5	Поздовжня	19,28±2,81	7,50±0,32*
	Поперечна	35,85±3,15	13,03±2,06*
6	Поздовжня	17,15±2,63	5,82±0,66*
	Апеко	12,27±2,41	3,46±0,33*

* Значучо відрізняється від величини в контролі / $P \leq 0,05$ /.

Електронноцитохімічне визначення локалізації Ca^{2+} та Mg^{2+} -активованих АТФаз у клітинах протонеми мому

Електронноцитохімічне вивчення локалізації Ca^{2+} і Mg^{2+} -активованих АТФаз у інтеркалярних клітинах протонеми дозволило визначити певну закономірність у розподілі продукту реакції /електронноцільних гранул неправильної форми/ у варіанті стаціонарного контролю і кліностатування /табл.4/.

При кліностатуванні виявлено суттєву відмінність у локалізації і інтенсивності реакції: відсутність продукту реакції на Ca^{2+} -АТФазу на плазматичній мембрані більшості досліджуваних клітин і його поява /або збільшення розмірів і щільності

преципітату/ в ендомембранній системі клітинних органел; а також інтенсифікація маркування плазмалеми, тонопласта і структур апарата Гольджі - на Mg^{2+} -АТФази.

Таблиця 4

Інтенсивність цитохімічної реакції на АТФази в клітинах протонеми моху, вирощеної в контролі та при клиностатуванні, 2 об/хв

Органели та їх компоненти	Контроль		Клиностатування	
	Ca^{2+} -АТФаза	Mg^{2+} -АТФаза	Ca^{2+} -АТФаза	Mg^{2+} -АТФаза
Плазмалема	+++*	++	+-	+++
Хлоропласти	+++	++	+++	++
Мітохондрії	+-	+	++	+-
Ядро				
хроматин	+-	+	++	+-
ядерце	+-	+	++	+-
ядерна оболонка	+-	+	+++	++
Ендоплазматичний ретикулум	-	+++	+++	+-
Диктіосоми	+-	+++	+++	+++
Тонопласт	-	++	+++	+++
Плазмодесми	-	-	+++	-

* Позначення: Кількість +/- відповідає інтенсивності реакції, /-/- реакція відсутня, +/- - реакція в окремих структурах.

Беручи до уваги, що при клиностатуванні виявлено відсутність локалізації активності Ca^{2+} -АТФази на плазмалемі більшості клітин, і дані літератури про те, що збільшення концентрації цитоплазматичного кальцію веде фізіологічного рівня інгібує активність Ca^{2+} -АТФази / Caldwell, Heng, 1982/, меха-

нізм якої може бути наслідком утворення міжмолекулярних зшивок за рахунок взаємодії із вторинними продуктами ПОЛ і збільшення швидкості термоденатурації ферменту /Владимиров, 1973; Архипенко и др., 1983; Пучкова и др., 1983/, можна припустити, що мікрогравітація призводить до інгібування Ca^{2+} -АТФаз плазмалемі, що пізніше було доведено також прямими методами /Kordyum et al., 1984/. З іншого боку, збільшення інтенсивності цитохімічної реакції на плазмалемі, тонопласті і мембранах структур апарату Гольджі клиностатованих клітин і дані літератури про те, що Mg^{2+} -залежна АТФаза клітин вищих рослин, яка стимулюється іонами калію, являє собою H^{+} -АТФазу $\text{E}_1\text{-E}_2$ -типу /Палладина, 1987; Hagenstein, Evans, 1986; Nawchke et al., 1988/, що контролює транспорт протонів /Максимов и др., 1989; Neven, 1985 /, дозволяє припустити, що клиностатування підсилює роботу антипорта $2\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ на плазмалемі дослідних клітин.

РЕГЕНЕРАЦІЯ КЛІТИННОЇ ОБОЛОНКИ У ПРОТОПЛАСТІВ *SOLANUM TUBEROSUM* L. В УМОВАХ КЛИНОСТАТУВАННЯ

Для розуміння ролі гравітаційних сил Землі в утворенні первинної оболонки та внеску їх дії на структурні показники росту клітин важливо з'ясувати, як залежить регенерація цієї структури у протопластів вищих рослин від ростових процесів в умовах моделювання мікрогравітації. Для вивчення відновлення оболонок у протопластів картоплі ми досліджували цей процес на певних етапах культивування /Недуха и др., 1991/. Встановлено, що розмір протопластів при культивуванні на клиностаті збільшувався значно повільніше, ніж у контролі /табл. 5/.

З допомогою калькофлуора спідстерігали за появою ламінесценції в області утворення клітинної оболонки, встановивши тривалість лаг фази регенерації стінки, яка в контролі становила 48 год, а при клиностатуванні - 72 год. Виявлено, що при регенерації оболонки її флуоресценція починається у локальній

Таблиця 5

Розмір /мкм/ протопластів картоплі, культивованих
в контролі та при клиностатуванні, 2 об/хп

Тривалість культивування протопластів, доба	Умови	
	Контроль	Клиностатування
0,04 /голі протопласти/	16±1	16±1
2	21±2	20±2
3	55±4x35±1	36±2x22±2
4	60±2x36±2	41±2x30±3
7	66±4x35±1	44±2x36±1

ділянці поверхні протопласта, а потім охоплює весь його поверхню. Встановлено значне пригнічення регенерації оболонки при клиностатуванні: на 10-ту добу вміст протопластів з відновленою оболонкою становить 10%, тоді як у контролі - 42%.

Аналіз результатів електронномікроскопічного та електронноцитохімічного вивчення регенерації оболонки у протопластів дозволяє виділити типові риси поетапних /у часі/ змін ультраструктури цитоплазматичних органел у процесі відновлення оболонки: ущільнення гіалоплазми, поява новосинтезованого крохмалю у пластидах та утворення шорсткого каналікулярного ретикулуму. Апарат Гольджі характеризується невисокою активністю, в області плазмалеми спостерігаються везикули, які контактують з нею /зовні або всередині/ або з ендоплазматичним ретикулумом. Позитивна цитохімічна реакція /з альціановим синім/ у везикулах і зовнішньому шарі плазмалеми /через 48 год у контрольному варіанті і через 72-96 год - при клиностатуванні/ і відсутність мікрофібрил целюлози на перших етапах регенерації оболонки, очевидно, свідчать про те, що у протопластів спочатку відкладаються полісахариди матрикса. Через добу після цього в клітинній оболонці спостерігали окремі різнонаправлені мікрофібрили целюлози. У протопластів з відновленою оболонкою мікрофібрилярна сітка була рідкою порів-

няно з оболонками мезофільних клітин. Відзначена ідентичність структурних змін при регенерації оболонки у протопластів, вирошених у контролі і при кліностатуванні.

Ультраструктурні ефекти короткочасної невагомості на клітинні оболонки тканин надземних органів рослин

Порівняльне ультраструктурне вивчення клітинних оболонок ряду асиміляційних клітин /епідермісу та мезофіла листової пластинки, епідермісу і флоємної паренхіми гіпокотилу, а також меристематичних клітин туніки вегетативного пагона/ представників одно- та дводольних рослин (пшениці та бальзаміна), вирошених в умовах реального космічного польоту /16 і 13 діб відповідно/ і в контролі, дозволило виявити ряд закономірностей. Вони стосувалися змін їх ультраструктури і товщини, і, очевидно, відображали адаптаційні зміни клітинного метаболізму і реакцію - відповідь на сигнал мікрогравітації.

Представлена характеристика ультраструктури оболонок, цитоплазматичних органел і ядер досліджуваних клітин рослин, вирошених в умовах стаціонарного контролю. Відзначено, що клітини характеризуються типовою структурою, яка характерна для клітин даних органів рослин /Васильев и др., 1980; Гамалей, Куликов, 1978; Мірославов, 1974/. Зовнішні оболонки епідермальних клітин листової пластинки, сім'ядолей і гіпокотилів клітин першого шару туніки мали асиметричну шарувату /у листків і гіпокотилів/ або перехресно-багатшарову - у епідермісу і палісадної паренхіми сім'ядолей. Антиклинальні і периклинальні оболонки епідермальних клітин, оболонки клітин мезофілу і меристематичних клітин мають ледь помітну шарувату структуру у перших і безладну з типово гранулярно-фібрилярною структурованістю у останніх. Показано, що епідермальні клітини верхньої поверхні листків покриті шаром воску у вигляді бугорків і видовжених сосочків з досить високою щільністю /22,4±3,1 на 1 мкм² поверхні/.

Встановлено, що короткочасна /16 та 13 діб/ невагомість не здійснює видимого впливу на ультраструктуру оболонок клітин

мезофіла, меристематичних клітин туніки і клітин кори /гіпоко-
тиль/. Товщина оболонки більшої досліджуваних типів клітин
була достовірно меншою, ніж у контролі. Електронна щільність
кутикулярного шару в усіх епідермальних клітинах була нижче,
ніж у контролі, в більшій частині цих оболонках знайдені чис-
ленні розпушення і просвіти, в яких не виявлялася фібрилярна
або гранулярна структурованість; в оболонках епідермісу і на-
решті сім'ядолей відсутня перехресно-багатошарова структу-
ра. Воскові пагорбки на поверхні епідермальних клітин листків
були вдвічі ширші, а їх щільність - на порядок менша порівня-
но з контролем. У літературі є дані про те, що щільність вос-
кового шару, його розмір, товщина кутикули, а також вміст роз-
чинних ліпідів у кутикулі є критерієм інтенсивності кутикуляр-
ної транспірації /Эзау, 1980; Невзъ, Schonherr, 1979/. Вра-
ховуючи одержані нами дані і вищезгадане, можна припустити,
що мікрогравітація викликає збільшення транспірації. Виявлені
в умовах невагомості розпушення в клітинних оболонках не є
специфічними для даного впливу. Подібні явища відбуваються
внаслідок гідролізу полісахаридів оболонки і спостерігаються
в багатьох клітинах при листопаді, збільшенні секреції і при
дії ряду інших чинників /Муравник, 1988; Sexton et al., 1977/.

Вивчення ультраструктури досліджуваних клітин показало
ряд відмінностей: у епідермісі - картини лізису, у меристемі -
збільшення розмірів вакуолей, активація структур апарату Голь-
джі; у мезофілі - зменшені /у півтора рази/ розміри площі се-
рединних зрізів клітин, популяційної щільності хлоропластів,
їх розмірів, зміна числа гран і розмірів тилакоїдів. Врахову-
ючи одержані нами експериментальні дані про зменшення розмірів
товщини клітинних оболонки і дані літератури про кореляцію
відзначених параметрів і вміст асимілятів у фотосинтетичних
клітинах /Курсанов, 1976/, можна припустити зменшення утво-
рення асимілятів, певна частина яких іде на синтез полісахаридів
клітинних оболонки.

Проведені дослідження дозволяють зробити застереження, що клітинні оболонки рослин, які ростуть в умовах невагомості та клиностаування, являються гравітаційночутливими структурами, лабільність яких залежить від типу тканин і тривалості дії чинника і зв'язана із змінами метаболізму клітин /схема 1, 2/. Вивчення ультраструктури клітинних оболонок тканин надземних органів показало, що дія короткочасної невагомості на структуру оболонок апікальної меристеми стебла, тілової паренхіми гіпокотилів, а також асиміляційних клітин листків помітного впливу не чинила. В той же час структура клітинних оболонок епідермісу незалежно від органа польотних рослин відрізнялась від клітинних оболонок контролей маршмов торашков, потовщенням кутикули, змінює її структури, зменшенням щільності і розмірів воскового нальоту, що свідчить про посилення кутикулярної транспірації та зміну вуглеводного обміну. Таким чином, вивчення структури зовнішніх оболонок епідермісу будь-якого органа надземної частини рослини може служити діагностичною ознакою дії мікрогравітації на структурно-функціональні зміни клітин.

Структурні зміни в клітинних оболонках і цитоплазмі, виникає в умовах тривалого космічного польоту в протонемі моху, частково схожі на зміни при моделюванні їх біологічного ефекту на горизонтальних клиностагах в лабораторії. Встановлено, що перебуцови клітинних оболонок при дії мікрогравітації, як правду, пов'язані із змінами в метаболізмі оболонок та змінами структурних і обмінних процесів у цитоплазмі: активацією гідролітичних ферментів, посиленням синтезу калози та геміцелюлоз, зниженням - целюлози, зменшенням об'єму крохмалю в хлоропластах, змінах ультраструктури органел, появі нових множинних молекулярних форм МДГаз і СДГаз. Зміни на клітинному рівні виражені в зменшенні розмірів клітин, появі кальцій-зв'язуючих сайтів мембран, збільшенні компартментів літичного апарату та пероксисом, порушенні ультраструктури органел і свідчать про прискорене старіння клітин під дією мікрогравітації.

Встановлено, що гравітаційночутливими ланками метаболізм-

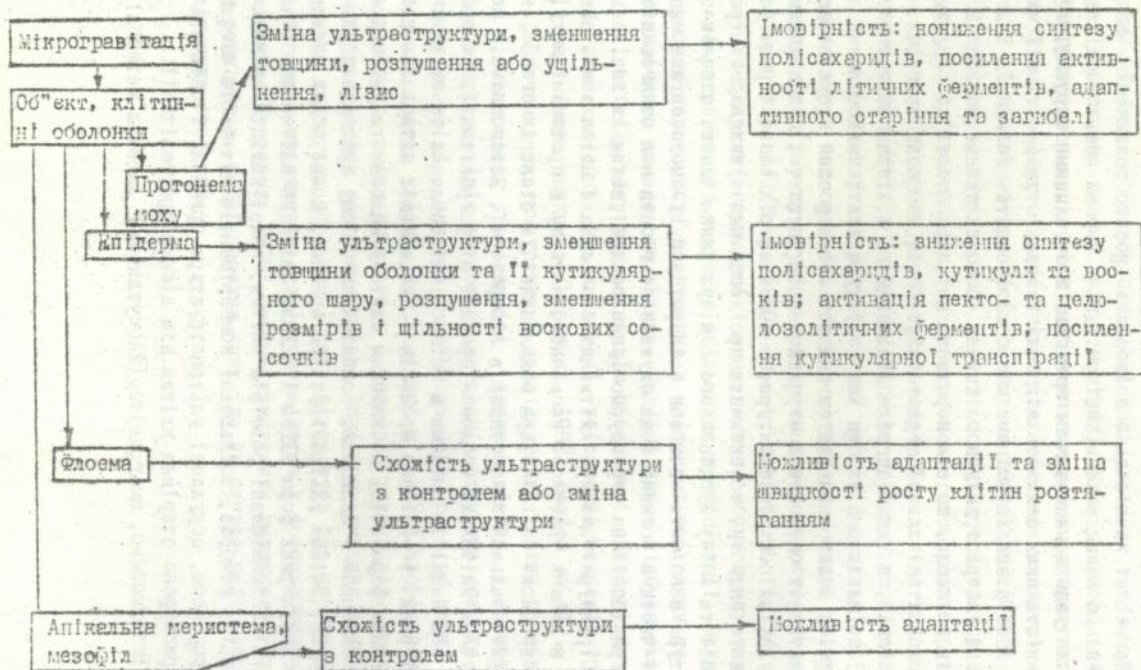


Схема I. Схема основних біологічних ефектів та можливих механізмів впливу мікрогравітації на клітинні оболонки рослин

му клітинних оболонок є процес синтезу полісахаридів /целюлози, геміцелюлоз, пектину, протопектину і калози/, кристалізація мікрофібрил целюлози, гідроліз внутрішніх і зовнішніх зв'язків целюлози і пектинових речовин, зв'язування вільних карбоксильних груп пектинів іонами кальцію або ж протонами.

Визчення регенерації клітинної стінки у протопластів мезофілу листків картоплі показало, що процес утворення первинної оболонки є гравітаційночутливим. Нами встановлено, що клиностатування інгібує відновлення оболонки на 90%, подовжує лаг-фазу її регенерації та пригнічує ріст розтягом протопластів. Експериментальні дані та аналіз літератури з питань індукованого відновлення оболонки дозволяють зробити висновок, що клиностатування пригнічує синтез і транспорт вуглеводних попередників та синтез полісахаридів на поверхню цитоплазматичної мембрани, а також процес екзоцитозу полісахаридів матрикса та попередників синтезу целюлози.

Отримані експериментальні дані про дію мікрогравітації на активність Ca^{2+} -АТФаз плазмалеми, вміст кальцію в апопласті та цитоплазмі клиностатованих клітин та дані літератури про вплив клиностатування та невагомості на активацію ПОЛ, жирнокислотний та фосфоліпідний склад мембран, а також на відновлення оболонки у клиностатованих протопластів свідчать про лабільність цитоплазматичної мембрани та її кальцієвих каналів. З другого боку, встановлена нами активація екзо- та ендоглюканази, пектинестерази і полігалактуранази та Mg^{2+} -АТФази плазмалеми в клиностатованих клітинах і дані літератури про те, що такий спектр метаболічних змін є однією з ланок дії фітогормонів, очевидно, свідчать про те, що в умовах мікрогравітації відбувається посилений синтез ІОК, яка призводить до активації протонної помпи, підкислення апопласта, активації целюлаз і пектиназ, вивільнення частини зв'язаного кальцію з пектинів.

Таким чином, результати нашої роботи показують, що в механізмі змін структурно-функціональних показників клітинних оболонок рослин в умовах мікрогравітації включені процеси, регуляція яких здійснюється за участю вторинного посередника - іонів кальцію.

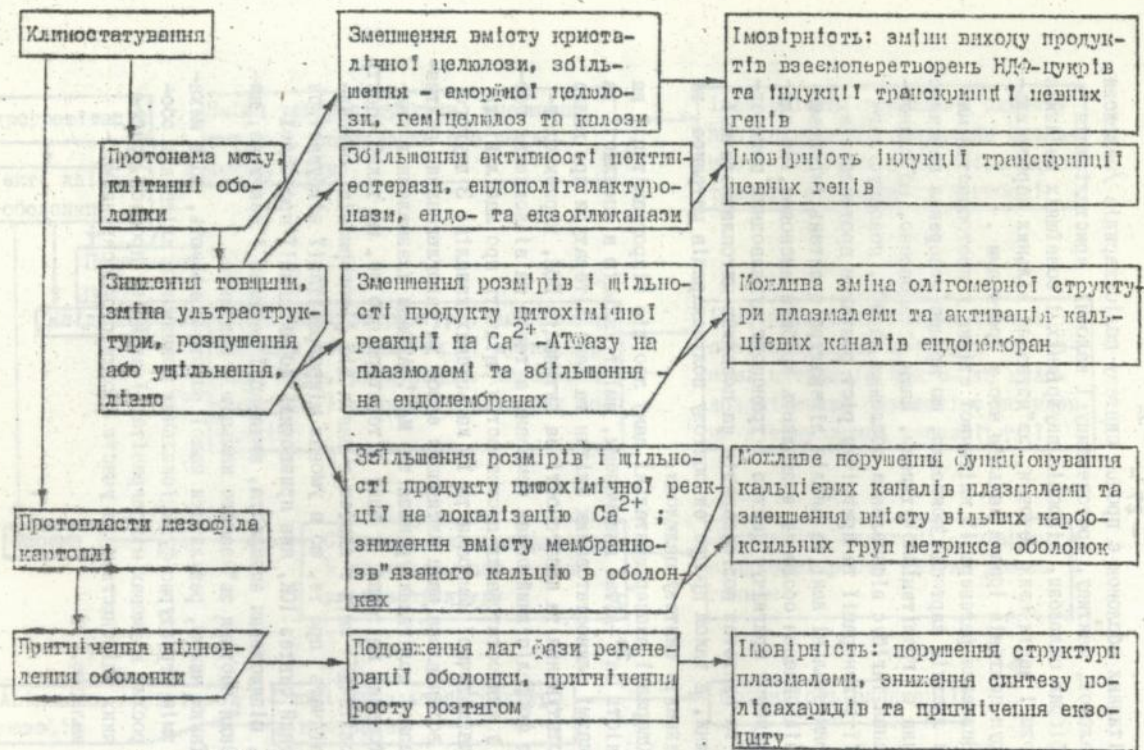


Схема 2. Схема основних біологічних ефектів та можливих механізмів впливу клімостатування на клітинні оболонки рослин

ВИСНОВКИ

1. Зміни структурно-функціональної характеристики клітинних оболонок рослин під дією невагомості залежать від типу клітин і тканин, а також тривалості чинника. Серед реакційних до дії мікрогравітації клітинних оболонок надземних органів рослин виділена група зовнішніх оболонок епідермальних тканин. Гравітаційно-нереактивні зовнішні оболонки епідермісу на відміну від оболонок нереакційних тканин характеризуються меншою товщиною, потоншенням шаром кутикули, воску та зміною ультраструктури. Структурно-функціональні процеси у реакційних оболонок при дії мікрогравітації, очевидно, направлені на збереження оптимального гомеостазу клітин.

2. Вивчення структури зовнішніх клітинних оболонок епідермісу надземних органів рослин може бути діагностичною ознакою дії мікрогравітації на структурно-функціональні зміни клітин вищих рослин.

3. Встановлена однотиповість біологічних ефектів дії тривалої невагомості і клиностагування на структуру клітинних оболонок вищих рослин. Показано, що зміна їх ультраструктури супроводжується зменшенням розмірів клітин, частковим їх округленням, посиленням вакуолізації, збільшенням компартменту пероксисом і порушенням ультраструктури органел, які свідчать про прискорене старіння клітин. Зміни в ультраструктурі оболонок і органел при дії мікрогравітації пов'язані із змінами метаболічних процесів клітин.

4. Встановлено, що гравітаційночутливими ланками метаболізму оболонок є синтез полісахаридів та активність літичних ферментів:

а/ вперше встановлено, що при клиностагуванні рослин вміст кристалічної целюлози зменшується, а її аморфної форми збільшується; зниження загального вмісту целюлози супроводжується збільшенням зривчі вмісту геміцелюлоз і калози;

б/ виявлено, що клиностагування викликає достовірне збільшення активності пектинестерази, полігалактуронази, ендота екзо-1,4- β -галактази в клітинах вищих рослин.

5. Ізольовані протопласти вищих рослин - унікальна модельна система для вивчення біогенезу оболонки при дії мікрогравітації, а також для дослідження ролі цитоплазматичних органел в цьому процесі. Пригнічення регенерації оболонки у кліноставованих протопластів свідчить про інгібування синтезу первинних оболонки та гравітаційну залежність цього процесу.

6. Експериментальні результати та дані літератури в галузі космічної фітобіології дозволяють рекомендувати як мішені дії мікрогравітації на клітинні оболонки: кальцій, зв'язаний з карбоксильними групами пектинів, та цитоплазматичну мембрану при спрямованому пошуку засобів захисту рослин від дії невагомості в біологічних системах життєзабезпечення космонавтів.

7. При впливі мікрогравітації порушується кальцієвий гомеостаз рослинної клітини. Механізми дії заснований на зміні активності Ca^{2+} -АТФаз плазмалем та ендомембран, появи кальцій-зв'язаних центрів мембран, активації целюлаз і пектиназ, синтезу калози, зниженні вмісту мембранозв'язаного кальцію в оболонках та переході частини апопластного кальцію із зв'язаного стану у вільний.

ОСНОВНІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ ПО ТЕМІ
ДОКТОРСЬКОЇ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Попова А.Ф., Сидоренко П.Г. Локалізація глюкозо-6-фосфатази, фосфорилази, сукцинатдегідрогенази и АТФаз в клітках рослин и бактерій. - Матер. XV Чехословацкой конф. по електронній мікроскопії. Прага, 1977, с.181-182.
2. Ситник К.М., Кордюм Е.Л., Недуха Е.М. Структурно-функціональна організація кліток протонеми *Funaria hygrometrica* рослинної, рослуїей 96 суток в умовах космічного поїета // Докл. АН УССР, сер. біол., 1980, № 10, с.93-95.
3. Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Сидоренко П.Г. и др. Впливие вибрати и ускориення на структуру и функції рослин. - Тезиси 2 Респ. конф. по електронній мікроскопії. Кишинев, 1981, с.61-62.
4. Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Попова А.Ф. и др. Особенности ультраструктури клітки при кліностатировании. Тезиси 2 Республ. конф. по електронній мікроскопії, Кишинев, 1981, с.63.
5. Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Попова А.Ф. и др. Организм и космос. Киев: Рад. школа, 1981, с.1-72.
6. Kordyum E.L., Sytnik K.M., Nedukha E.M. et al. Optical and electron-microscopic studies of the *Funaria hygrometrica* protonema after cultivation for 96 days in Space // Life Sciences and Space Research, 1981, v. 1, p. 159-162.
7. Недуха Е.М., Уварова С.А., Овруцкая И.И. Впливие кліностатировании на ультраструктуру кліток протонеми мха *Funaria hygrometrica*. - Тезиси VII съезда УВУ. Киев: Наук. думка, 1982, с.95.
8. Недуха Е.М., Уварова С.А., Овруцкая И.И. Рост и структура протонеми *Funaria hygrometrica* при кліностатировании. - в сб. XI Всес. рабочее совещание по вопросам круговорота

- веществ в замкнутых системах. Киев: Наук. думка, 1983, с.120-124.
9. Сытник К.М., Кордюм В.А., Кордюм Е.Л. и др. Микроорганизмы в космическом полете - Киев: Наук. думка, 1983. 153 с. /Глава Уш, с. 134/.
 10. Sytnik K.M., Kordyum E.L., Belyavskaya N.A. et al. Cytological aspects of higher plant ontogenesis under microgravity.- Abstracts of 34 Congress of Intern. Astronautical Federation. Budapest, Hungary, 1983, p. 190.
 11. Sytnik K.M., Kordyum E.L., Belyavskaya N.A. et al. Cytological aspects of higher plant ontogenesis under microgravity. - Preprint IAF-190, Budapest, Hungary, 1983, p.1-5.
 12. Kordyum E.L., Belyavskaya N.A., Nedukha E.M. et al. The role of calcium ions in cytological effects of hypogravitation. - Abstracts of XXV COSPAR, Graz, Austria, 1984, p. 299.
 13. Kordyum E.L., Belyavskaya N.A., Nedukha E.M. et al. The role of calcium ions in cytological effects of hypogravitation // Adv. Space Res., 1984, v. 4, N 12, p. 23-26.
 14. Nedukha E.M. Long clinostation influence on the ultrastructure of Funaria hygrometrica moss protonema cells. - // Abstracts of 25 COSPAR, Graz, Austria, 1984, p.299.
 15. Nedukha E.M. Long clinostation influence on the ultrastructure of Funaria hygrometrica moss protonema cells // Adv. Space Res., 1984, v. 4, N 12, p. 19-22.
 16. Kordyum E.L., Sytnik K.M., Belyavskaya N.A., Nedukha E. M. et al. Possible mechanism of cell adaptation to hypogravitation. - Abstracts of XXV of the Intern. Astron. Federation, Lausanne, 1984, p. 192.
 17. Сытник К.М., Кордюм В.А., Недуха Е.М. и др. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. Киев: Наукова думка, 1984. - 136 с. /С.10, 11, 15-19, 28, 29, 68, 69, 107-119/.

18. Недуха Е.М., Овруцкая И.И. Структурно-функциональная характеристика клеток протонеми мха *Funaria* влагомерной при длительном клиностатировании // Микроорганизмы в искусственных фотосистемах. Новосибирск: Наука /Сибирское отд./, 1985, с.19-22.
19. Кордем Е.М., Недуха Е.М., Белявская Н.А. Современное развитие идей К.Э.Циолковского в вопросе роста растений в условиях невесомости // Материалы XVII научн. чтений, посвященных научн. наследию К.Э.Циолковского, М.: посвященный научн. наследию К.Э.Циолковского, М.: Наука, 1985, с.131-134.
20. Недуха Е.М., Умарова С.А., Тулик Н.Д. Действие гипогравитации на активность и множественные формы дегидрогеназ протонеми мха *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журнал, 1985, т.42, №1, с.52-55.
21. Nedukha E.M., Functional lability of the protonema cell wall of *Funaria hygrometrica* moss under the influence of long clinostatting. - Abstracts of XXVI COSPAR Toulouse / France, 1986, p. 314.
22. Недуха Е.М. Электронноцитохимическое выявление свободного и слабсвязанного кальция в протонеме мха при клиностатировании. - Тезисы докл. научн.-техн. конферен. по электронной микроскопии. Кишинев, 1986, с.41.
23. Недуха Е.М. Влияние клиностатирования на ультраструктуру протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журнал, 1986, т.43, №2, с.20-23.
24. Недуха Е.М. Локализация Mg^{2+} -АТФазы в клетках протонеми мха *Funaria* влагомерная // Цитология, 1986, №6, с.639-641.
25. Недуха Е.М. Электронноцитохимическое выявление Ca^{2+} -АТФазы протонеми мха *Funaria* влагомерная при гипогравитации // Цитология и генетика, 1987, №1, с.3-5.
26. Недуха Е.М. О возможных механизмах изменений структуры и морфогенеза клеток протонеми мха *Funaria* влагомерная в условиях микрогравитации. В сб.: У Всес. школы по теоретической морфологии растений. Львов: Ин-т ботаники, 1987, с.63-73.

27. Недуха Е.М., Кордун Е.Л., Даневич Л.А. Влияние микрогравитации на содержание каллозы в клетках протонемы мха *Funaria hygrometrica* Hedw. // Укр. ботан. журнал, 1988, №6, с.53-60.
28. Недуха Е.М., Кордун Е.Л., Даневич Л.А. Изучение содержания каллозы в клетках протонемы мха (*Funaria*) влагомерная при гипогравитации // Цитология, 1988, т.30, №2, с.212-217.
29. Недуха Е.М., Трутнева И.А. Роль пектинов в механизме изменений клеточных оболочек протонемы мха при клиностатировании // Докл. АН УССР, сер. биол., 1988, №7, с.75-78.
30. Недуха Е.М. Электронохимическое выявление локализации целлюлозы в клетках протонемы мха (*Funaria*) влагомерная при клиностатировании. - Тезисы VI Всес. симп. "Ультраструктура растений". Чернигов, 1988, с.164.
31. Недуха Е.М. Эффекты клиностатирования на матрикс оболочек высших растений. - Тезисы VI Всес. симп. "Ультраструктура растений". Чернигов, 1988, с.165.
32. Kordyum E.L., Nedukha E.M., Popova A.F. et al. Prospects of autotrophic link functioning in biological life-support systems based on cell biology studies // Acta Astron. 1988, v. 10, N 4, p. 225-228.
33. Nedukha E.M. Long clinostation influence on the localisation of free and weakly bound calcium in cell walls of *Funaria hygrometrica* moss protonema cells // Abstracts of XXVII Plenary of COSPAR, Finland - Espoo, 1988, p. 369.
34. Nedukha E.M. Long clinostation influence on the localization of free and weakly bound calcium in cell walls of *Funaria hygrometrica* moss protonema cells // Adv. Space Res., 1989, Vol. 9, N11, p. 83-86.
35. Недуха Е.М. Эффекты клиностатирования на распределение ионов кальция в клетках протонемы мха. // Докл. АН УССР, сер. биол., 1989, №4, с.71-73.
36. Недуха Е.М. Роль целлюлазы в механизме изменений клеточных оболочек протонемы мха при клиностатировании. - Тезисы 3 Всес. конф. "Биосинтез целлюлозы и др. компон. клеточной

- стенки". Казань, 1990, с.24.
37. Недуха Е.М., Сидоров В.А., Самойлов В.М. Эффекты клиноста-
тирования на регенерацию клеточной оболочки и у протопла-
стов *Solanum tuberosum* L. - Тезисы 33 Всес. конф. "Биосин-
тез целлюлозы и др. компонентов клеточной стенки", Казань,
1990, с.55.
38. Недуха Е.М., Кордюм Е.Л., Нечитайло Г.С. Влияние гипограви-
тации на структуру клеток листовой пластинки *Triticum du-
rum* L. - Тезисы IV Республ. конф. по электронной микроско-
пии. Клишиев, 1990, с.86.
39. Sytnik K.M., Kordyum E.L., Nedukha E.M., Polulyach Yu. The
strategy of cell adaptation to microgravity. - Abs-
tracts of 28 COSPAR, Hague-Netherlands, 1990, p. 55.
40. Nedukha E.M. The role of cellulases in the mechanism of cell
walls in *Fumaria hygrometrica* moss protonema at clinostating
//Abstracts of XXIV Plenary of COSPAR, Hague-Netherlands,
1990, p. 56.
41. Недуха Е.М., Кордюм Е.Л., Филиппенко В.Н., Чучкин Г.А.
Влияние микрогравитации на клеточные оболочки надземных
органов проростков *Impatiens balsamina* L. // Депон. в
ВИНИТИ 08.01.91, № 137-891, с.1-22.
42. Недуха Е.М., Кордюм Е.Л., Нечитайло Г.С. Влияние 16-суточ-
ного космического полета на ультраструктуру клеток листьев
Triticum durum L. // Депон. в ВИНИТИ 08.01.91 №138-В-91,
с.1-22.
43. Недуха Е.М., Сидоров В.А., Самойлов В.М. Биологические
эффекты клиноста-тирования на регенерацию клеточной оболоч-
ки протопластов *Solanum tuberosum* L. // Депон. в ВИНИТИ
08.01.1991, №139-891, с.1-21.
44. Недуха Е.М., Чучкин В.Г., Филиппенко В.Н. Ультраструктура
клеток апикальной меристемы побега, семидолей и гипскотил-
лей у проростков *Impatiens balsamina* L. // Результаты
исследований на биоспутниках. М.: Наука. - 1992. С.309-312.

45. Nedukha E.M. The role cellulases in the mechanism of changes of cell walls of *Funaria hygrometrica* protonema at clinostatating
// Adv. Space Res., 1992, vol. 12, N 1, p. 99-102.
46. Nedukha E., Sidorov V., Samoylov V. Clinostation influence on the regeneration of cell wall of *Solanum tuberosum* L. protoplast - Abstracts of "The World Space Congress" (29 COSPAR, 43 IAF), Washington, DC, USA, 1992, p.526.
47. Nedukha E.M., Machinskiy A.L. 16 days influence microgravity on the ultrastructure *Triticum durum* L. leaves cells - Abstracts of "The World Space Congress" (29 COSPAR, 43 IAF), Washington, DC, USA, 1992, p.528.

УБЕНТЗ, 1994, зам. I9, тип. II5

AB 29 388

AB 29.388