

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
(СПбГУ)

УДК 581.1:633/635
Рег № НИОКТР АААА-А17-117040510104-2
Инв. № 37850521

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ

_____ Е.В. Лебедева
« » _____ 20__ г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

**Механизмы адаптации растений к микрогравитации, моделированной
путем 3D-клиностаტიрования**

По гранту РФФИ
№ 17-04-00862 от 06.04.2017 г.

Руководитель НИР,
Профессор,
Доктор биологических наук



Медведев С.С.

Санкт-Петербург
2019

Реферат

В условиях космического полета влияние микрогравитации на физиологию растительного организма не всегда легко обнаружить, поскольку растения одновременно находятся под воздействием других факторов (высокое содержание этилена, отсутствие конвекции, ограниченный объём, космическая радиация). В связи с этим внимание исследователей вновь обращается на клиностаты, которые позволяют на Земле имитировать эффекты микрогравитации. В ходе реализации проекта было запланировано выявить участие ключевых метаболитов и белков, а также цитоскелета в реакции растений на так называемый «гравитационный стресс», создаваемый 3D-клиностатированием, которое рандомизирует положение растений относительно вектора силы тяжести. Все запланированные задачи выполнены.

Обнаружено, что при клиностатировании проростки рапса и арабидопсиса демонстрируют дезориентированный рост корней и морфологические аномалии развития. У арабидопсиса наблюдаются многократные изгибы и торможение роста корней, а также искривление гипокотилей. Показано также, что 3D-клиностатирование вызывает увеличение содержания H_2O_2 в проростках рапса и арабидопсиса на начальных этапах развития.

Впервые описаны структурные особенности плодов и семян арабидопсиса, сформировавшихся в условиях непрерывного 3D-клиностатирования. Созревание семян у клиностатированных растений происходило с задержкой в 8-16 дней, а количество семян на одно растение сократилось на 20% по сравнению со статическим контролем. При этом, однако, сформированные семена не имели морфологических отклонений в развитии, влияющих на структуру семядолей, тропизмы, филлотаксис, гистогенез меристем побега и корня.

С использованием трансгенных растений арабидопсиса *GFP-fABD2*, *TUA6-GFP* и *MAP4-GFP* выявлено, что в условиях 3D-клиностатирования архитектура цитоскелета подвергается изменениям, при которых оказываются стабилизированы поперечно ориентированные и наклонно расположенные элементы, а доля аксиальных элементов уменьшается. То есть в контроле микрофиламенты были ориентированы, в основном, аксиально, а микротрубочки имели широкий спектр ориентации. 3-D-клиностатирование приводило к повышению спектра ориентации микрофиламентов актина и микротрубочек.

Обнаружено, что трехмерное случайное позиционирование прорастающих семян рапса и проростков арабидопсиса относительно вектора силы тяжести изменяет метаболические профили развивающихся растений, затрагивая, главным образом, метаболиты первичного энергетического обмена. Для большей части детектированных метаболитов в проростках арабидопсиса отмечали тенденцию к снижению их уровня при клиностатировании (арабинозы, арабитола, аспартата, глутамина, лизина, триптофана, валина, сахарозы и рафинозы). В то же время уровень малата возрастал почти в 5 раз по сравнению с растениями, расположенными стационарно.

Впервые установлено, что 3D-клиностатирование инициировало изменения паттерна белков (протеома) проростков семян рапса, прораставших 24 и 48 ч. Всего было обнаружено 97 и 39 белков, содержание которых, соответственно, возрастало и снижалось при клиностатировании. В наибольшей степени менялось содержание белков энергетического и белкового обмена. Последняя группа включает белки, которые составляют рибосомы, участвуют в инициации синтеза белка, фолдинге, транспорте и деградации белков, а также их пост-трансляционных модификациях. Выявлены неэнзиматические посттрансляционные модификации (окислительные и гликоокислительные) белков в прорастающих семенах рапса в ответ на 3D-клиностатирование. Важно также отметить, что 3D-клиностатирование увеличивало содержание белков, которые накапливаются в ответ на окислительный стресс (дегидринов, LEA-белков, белков теплового шока, ряда других стрессовых белков). Полученные данные позволяют предположить, что рандомизация положения прорастающих семян относительно вектора силы тяжести с помощью 3D-клиностатирования инициирует неспецифические стресс-реакции, направленные на адаптацию растений к *гравитационному стрессу*.

Введение

Процесс эволюции развивается на Земле при постоянном воздействии её гравитационного поля. Сила тяжести определяет нормальное развитие, морфологию и функционирование всех живых организмов. Растения в течение длительного периода эволюции также приспособились к гравитационным условиям Земли, начиная от отдельных клеток и заканчивая целым организмом. Растительные организмы способны постоянно "оценивать" свое положение в пространстве, ориентируясь на вектор силы тяжести, и при необходимости корректировать его за счет поляризованного роста. Однако на космических станциях растения находятся в условиях микрогравитации, при которых сила тяжести близка к нулю, что может оказывать неблагоприятное воздействие на их развитие и продуктивность. В условиях космического полета влияние микрогравитации на физиологию растительного организма не всегда удается выявить, поскольку растения одновременно находятся под влиянием других факторов (высокое содержание этилена, отсутствие конвекции, ограниченный объём, космическая радиация и др.).

Эффекты микрогравитации на Земле частично позволяет моделировать клиностамирование - т.е. вращение растения вокруг горизонтальной оси (или нескольких осей, 3D), что дезориентирует изучаемый объект при нахождении в постоянном поле силы тяжести. Микрогравитация, моделируемая 3D-клиностамированием, является очень эффективным методологическим приёмом, позволяющим анализировать роль вектора силы тяжести в становлении структуры и координации функций растительного организма. Клиностамирование позволяет имитировать невесомость в условиях Земли, поскольку клиностамируемые растения лишены возможности корректно воспринимать гравитационный стимул, так как их положение постоянно меняется по отношению к вектору силы тяжести.

В ходе выполнения проекта предполагается выяснить, является ли клиностамирование стрессовым воздействием, а также выявить ключевые метаболиты и белки, которые принимают участие в ответных реакциях растений рапса и арабидопсиса на «гравитационный стресс». Предполагается изучить полный жизненный цикл растений арабидопсиса в условиях 3D-клиностамирования. Планируется выяснить, как рандомизация вектора силы тяжести влияет на процессы роста и эмбрионального развития арабидопсиса, метаболом растений, организацию актиновых микрофиламентов и микротрубочек. Планируется также изучить роль ионов Ca^{2+} и активных форм кислорода в адаптивных реакциях растений арабидопсиса при 3D-клиностамировании.

Цель проекта: Изучить развитие растений рапса и арабидопсиса в условиях 3D-клиностамирования и выявить механизмы адаптации растений к рандомизации вектора силы тяжести.

Конкретные задачи фундаментального исследования:

1. Провести стресс-тестирование растений рапса и арабидопсиса в условиях 3D-клиностамирования и выяснить, является ли это воздействие стрессовым.
2. Сравнить метаболомные профили клиностамированных и контрольных растений рапса и арабидопсиса. Выявить метаболиты, изменение уровня которых коррелирует с рандомизацией вектора силы тяжести.
3. Изучить влияние клиностамирования на протеом растений рапса и арабидопсиса. Идентифицировать белки и триптические пептиды, которые могут являться маркерами гравитационного стресса.
4. Выяснить влияние клиностамирования на организацию актиновых микрофиламентов и микротрубочек трансгенных растений арабидопсиса *GFP-fABD2*, *Lifeact-Venus*, *GFP-MAP4* и *GFP-TUA6*.
5. Изучить роль ауксина, ионов Ca^{2+} и активных форм кислорода в адаптивных реакциях растений арабидопсиса при 3D-клиностамировании.
6. Изучить особенности эмбриогенеза и формирования семян арабидопсиса при 3D-клиностамировании.

ИТОГОВЫЙ ОТЧЕТ

1. Провести стресс-тестирование растений рапса и арабидопсиса в условиях 3D-клиностаტიрования и выяснить, является ли это воздействие стрессовым.

Для оценки физиологического состояния прорастающие семена рапса были мгновенно заморожены в жидком азоте, гомогенизированы до состояния муки на шаровой мельнице Retsch MM 400 (Германия). Размолотый замороженный растительный материал хранился при -80°C и использовался для биохимических анализов. Были определены следующие маркеры окислительного стресса и антиоксиданты: пероксид водорода, уровень восстановленной и окисленной форм аскорбата, а также содержание веществ, реактивных в отношении тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Установлено, что до 18.5 ч от начала прорастания происходит постепенное снижение уровня пероксида водорода как в контрольных, так и в клиностазируемых семенах рапса (Рис. 1). В ходе дальнейшего прорастания (до 24 ч) у контрольных семян содержание H_2O_2 продолжает постепенно снижаться, а у клиностазируемых резко возрастает. Поэтому можно предположить, что 3D-клиностаტიрование инициирует развитие окислительного стресса в прорастающих семенах рапса.

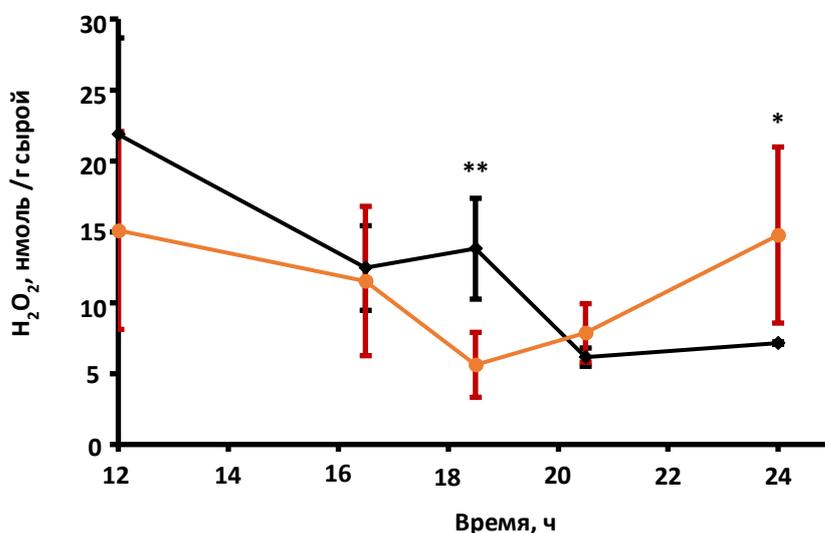


Рис. 1. Влияние 3D-клиностаტიрования на содержание H_2O_2 в прорастающих семенах рапса. Черная кривая – контрольные семена, красная кривая – клиностазированные.

Различий в уровне ТБК (тиобарбитурат)-реактивных веществ между контрольным и опытным вариантами не обнаружено. Динамика изменений содержания общего, восстановленного и окисленного аскорбата, у клиностазируемых растений также не отличалась от контроля. Содержание всех форм аскорбата поддерживалось на одном уровне от 12 до 20.5, но резко возрастало к 24 часу от момента замачивания семян. Вначале уровень восстановленного аскорбата был в пределах 1.5-2 мкмоль/г сырой массы, а к 24 ч возрастал до 6.3 мкмоль/г сырой массы (Рис. 2). При этом произошло двухкратное возрастание отношения Аск/Д-аск (от 0.31-0.36 до 0.76). Интересно отметить, что у той части семян, которые к 18.5 ч после замачивания еще оставались непроросшими, клиностаტიрование вызывало снижение содержания всех форм аскорбата. Таким образом, 3D-клиностаტიрование стимулирует образование пероксида водорода в прорастающих семенах рапса и вызывает снижение содержания аскорбата в семенах, у которых задерживается проклёвывание зародышевого корешка.

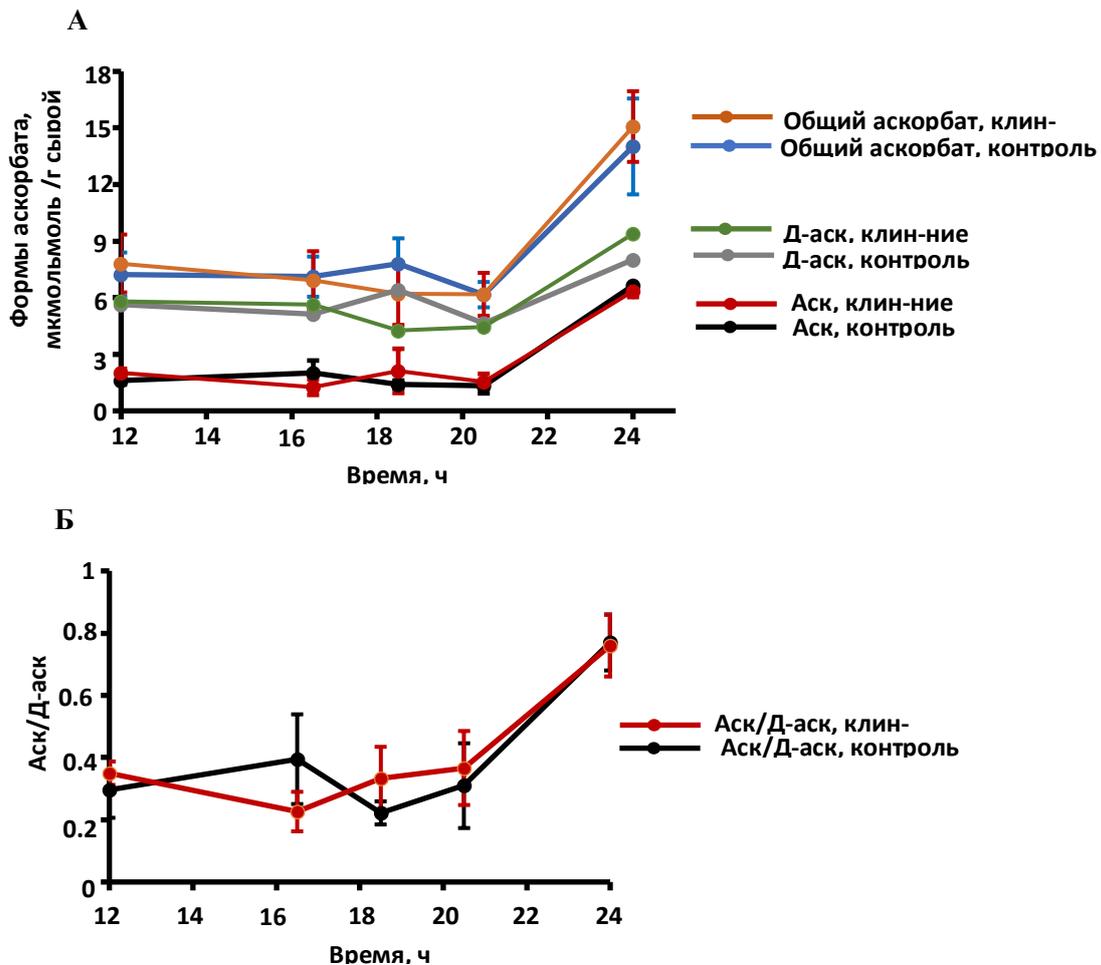


Рис. 2. Влияние 3D-клиностаტიрования на содержание общего, восстановленного и окисленного аскорбата (А) и отношение восстановленного к окисленному аскорбату (Б) в прорастающих семенах рапса.

Установлено, что клиностастированные семена рапса формируют больше ненормально развитых проростков. Показано также, что клиностастирование инициирует увеличение длины корней и дезориентирует их рост относительно вектора силы тяжести.

Изучено влияние 3D-клиностаტიрования на морфологию проростков арабидопсиса. Установлено, что выращивание арабидопсиса в течение 10 суток в 3D-клиностаате существенно сказывалось на их фенотипе растений (Рис. 3). Рандомизация положения растений относительно вектора силы тяжести приводит к искривлению гипокотилей, многократным изгибам и торможению роста корней. Подобные флексии, по-видимому, являются следствием возникновения при клиностастировании градиентов роста в латеральном направлении.

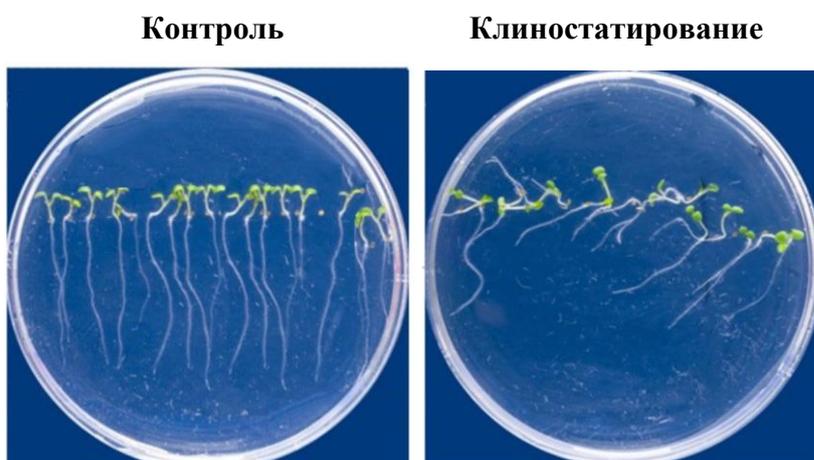


Рис. 3. Проростки арабидопсиса, (10-сут.) выращенные в условиях постоянной вертикальной ориентации (слева) и при

непрерывном вращении в 3D-клиностае (справа).

2. Сравнить метаболомные профили клиностатированных и контрольных растений рапса и арабидопсиса. Выявить метаболиты, изменение уровня которых коррелирует с рандомизацией вектора силы тяжести.

Известно, что растительный метаболом представляет собой чрезвычайно подвижную, динамически изменяющуюся систему, поэтому было проведено два независимых эксперимента в 6 биологических повторностях. В первом эксперименте было выявлено 139, а во втором 120 – хроматографических сигнала, соответствующих определённым анализам. Среди них было идентифицировано 42 метаболита, представленных 19 углеводами и родственными соединениями (глицерол, ксилоза, арабинофураноза, рибоза, фруктоза, сорбоза, глюкоза, галактоза, манноза, левоглюкозан, маннитол, ксилитол, инозитол, сахароза, мальтоза, раффиноза, а также фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат, инозитол-фосфат), семью аминокислотами (лизин, аспарагин, треонин, серин, фенилаланин, тирозин, аланин), четырьмя жирными кислотами (пальмитиновая, стеариновая, элаидиновая, лауриновая), девятью другими органическими кислотами (яблочная, лимонная, янтарная, фумаровая, глицериновая, пеларгоновая, пироглутамовая, рибоновая, синаповая), а также аминами (этаноламин, путресцин). Кроме этого была идентифицирована фосфорная кислота. Анализ результатов, полученных с помощью метода главных компонент двух экспериментов показал значительные различия в паттернах метаболитов прорастающих семян при их прорастании, причем эти различия выявляются уже при рассмотрении 1-й главной компоненты (PC 1) (Рис. 4).

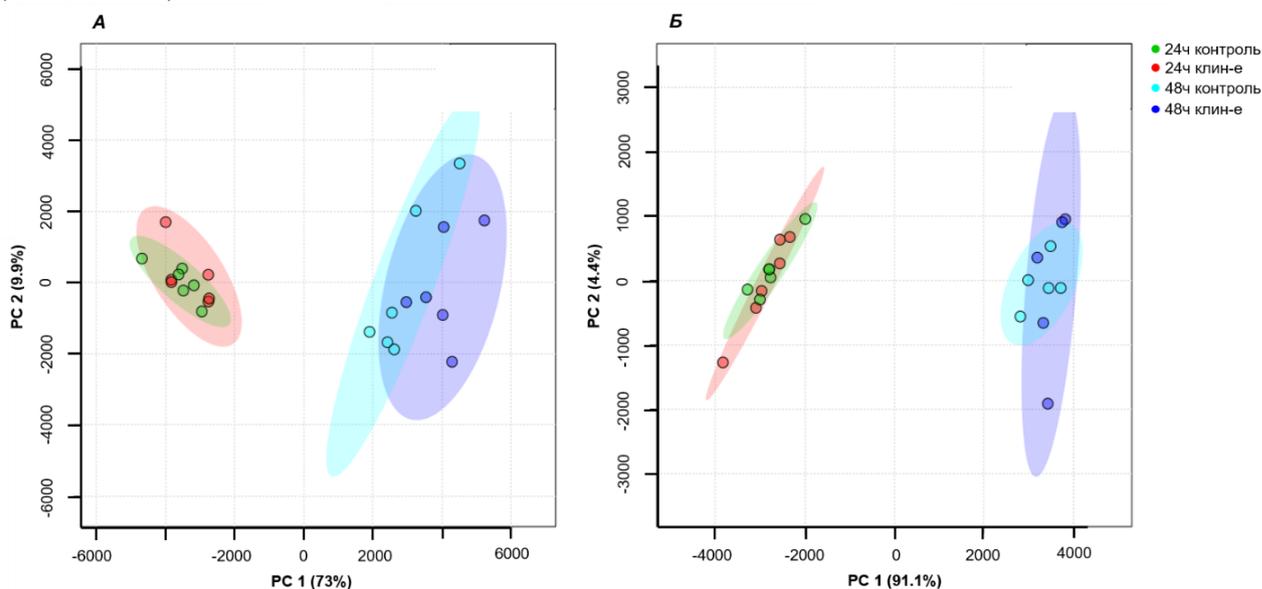


Рис. 4. Анализ относительного содержания полярных метаболитов семян рапса, прорастающих в условиях 3D-клиностаирования и статического контроля первого (А) и второго (Б) независимых экспериментов с помощью метода главных компонент.

Дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов, проведенный для каждого из двух экспериментов, показал значительную вариабельность между биологическими повторностями (Рис. 5 и 6). Тем не менее нам удалось выявить ряд соединений, содержание которых изменялось при 3D-клиностаировании.

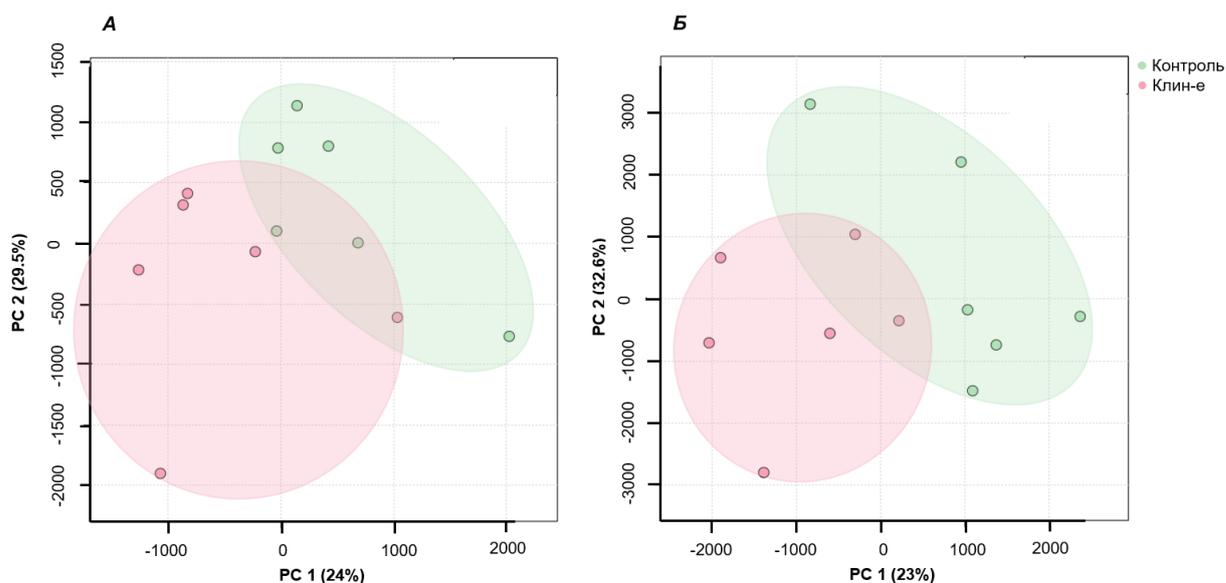


Рис. 5. Дискриминантный анализ относительного содержания метаболитов семян рапса, выращенных в рамках первого независимого эксперимента и собранных через 24 ч (А) и 48 ч (Б) после начала прорастания в условиях клиностатирования и статического контроля

В первые сутки клиностатирования изменялось содержание лимонной, пироглутамовой и γ -аминомасляной кислоты, а также сахарозы и глюкозы.

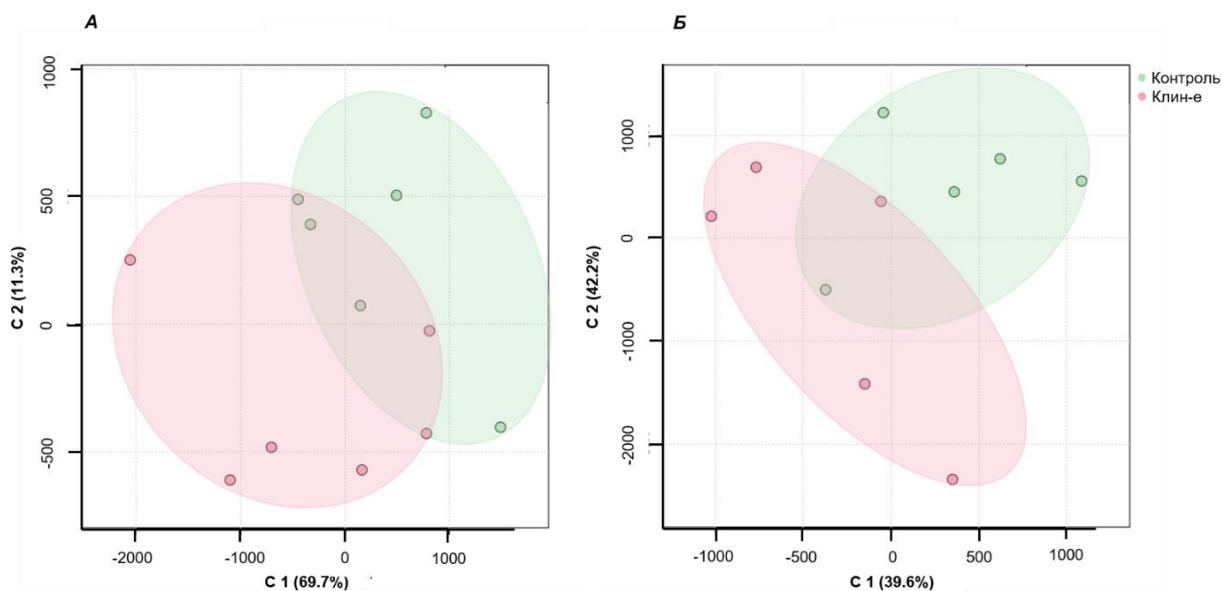


Рис. 6. Дискриминантный анализ относительного содержания метаболитов семян рапса, выращенных в рамках второго независимого эксперимента и собранных через 24 ч (А) и 48 ч (Б) в условиях клиностатирования и статического контроля

Состав метаболитов через 2-суток после клиностатирования отличался от контрольных растений еще в большей степени. У двухсуточных проростков рапса при клиностатировании изменялось содержание не только лимонной, пироглутамовой и γ -аминомасляной кислот, сахарозы и глюкозы, но также глицериновой кислоты, стеариновой кислоты и неорганического фосфата.

3. Изучить влияние клиностаტიрования на протеом растений рапса и арабидопсиса. Идентифицировать белки и триптические пептиды, которые могут являться маркерами гравитационного стресса.

В нашем исследовании методом «gel free bottom up» протеомики, с использованием нанопоточной ВЭЖХ, совмещенной с высокоточным масс-спектрометром, впервые удалось выявить значительно бóльший спектр белков участников белкового метаболизма, ассоциированных с ответными реакциями прорастающих семян рапса на клиностаტიрование. Установлено, что при 3D-клиностаტიровании содержание 97 белков в прорастающих семенах возрастает, а 39 – снижается (Рис. 7). Белки, чувствительные к рандомизации вектора силы тяжести, относились к 19 функциональным группам. На рис. 7 столбиками (и цифрами) показано количество белков определенной функциональной группы, содержание которых возрастало или снижалось в условиях клиностаტიрования. Причем около половины белков были идентифицированы только у тех семян, которые проросли в условиях клиностаტიрования, но не обнаруживались в контрольном варианте. Наибольшие изменения наблюдались в белках, участвующих в белковом метаболизме, энергетическом обмене, метаболизме РНК, а также в процессах развития. Содержание большинства белков изменялось от 1,5 до 3 раз. Уровень 22 белков изменился почти в 40 раз! (37,5).

Согласно данным протеомного анализа одной из ранних реакций растений на клиностаტიрование является активация энергетического обмена. В нашей работе в паттерне дифференциально регулируемых белков, были обнаружены белки (фосфоглюкомутаза, дигидролипоилтрансацилаза, НАДН-убихинон оксидоредуктаза и др.) различных этапов энергетического обмена, содержание которых многократно возрастало в тканях порастающих семян в основном в первые 24 ч клиностаტიрования [Frolov et al., 2018]. Интересно отметить, что 24 ч-клиностаტიрование стимулировало синтез ряда белков теплового шока, однако, этого не обнаруживалось через 48 ч.



Рис. 7. Функциональная аннотация белков, дифференциально экспрессирующихся при 3D-клиностаტიровании в прорастающих семенах рапса. А – семена, прорастающие 24 ч; Б – семена, прорастающие 48ч. Стрелки указывают на возрастание (↑) или снижение (↓) содержания белков.

Многие белки чувствительные к клиностаტიрованию также были вовлечены в процессы транспорта, метаболизма РНК и сигналинга. Было обнаружено 3 белка энергетического обмена, содержание которых увеличилось более чем в 10 раз в условиях 24 ч-клиностаტიрования: фосфоглюкомутаза (Phosphoglucumutase, EC 5.4.2.2), дифосфат-фруктоза-6-фосфат 1-фосфотрансфераза (PEP, Diphosphate—fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.90), пируват фосфатдикиназа (Pyruvate, phosphate dikinase, EC 2.7.9.1). Интересно отметить, что 24 ч-

клиноостатирование стимулировало синтез ряда белков теплового шока, однако, этого не обнаруживалось через 48 ч.

Полученные данные указывают, что белки, принимающие участие в белковом обмене, некоторые субъединицы рибосом, а также ряд ферментов энергетического обмена наиболее чувствительны к рандомизации вектора сила тяжести.

Наибольшее же количество белков, содержание которых изменялось в условиях клиноостатирования, было вовлечено в белковый метаболизм (13 и 16 белков через 24 и 48 часов прорастания, соответственно). В эту входили белки, участвующие в синтезе рибосом, инициация синтеза белка, фолдинге, транспорте и деградации белков, а также их пост-трансляционных модификациях (Рис. 8).

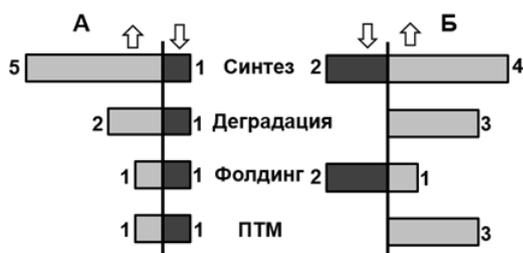


Рис. 8. Белки, вовлеченные в белковый метаболизм, содержание которых изменялось в условиях 3D-клиноостатирования. А – семена рапса, прорастающие 24 ч; Б – семена, прорастающие 48ч.

Причем синтез некоторых белков (аспартат-протеазы и аминопептидазы) активировался только при клиноостатировании и не выявлялся в контрольной группе семян. Интересно отметить, что в ответ на клиноостатирование изменялось содержание многих рибосомальных белков. В частности, содержание белков S13, S8, S3 и S9, входящих в состав малой субъединицы 40S рибосомы после 24 ч клиноостатирования возрастало в 2.5, 3, 6 и 25 раз, соответственно. Это может указывать на изменения процессов сборки рибосом. Значительный эффект клиноостатирования на белковый метаболизм можно объяснить высокой активностью синтеза белков в течение первых двух дней развития растений. В это время также активируются ферменты β -окисления жирных кислот. Этот процесс сопровождается образованием ацетил-СоА, его последующее включение в цикл трикарбоновых кислот может приводить к синтезу аминокислот из промежуточных продуктов цикла Кребса.

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что 3D-клиноостатирование инициирует изменения паттерна белков (протеома) проростков рапса, среди которых преобладают белки-участники белкового метаболизма (в том числе белки, входящие в состав рибосомальных субъединиц S40, S60 и S30). Важно также отметить, что при клиноостатировании возрастает содержания белков, синтез которых активируется ответ на окислительный стресс: дегидринов, LEA-белков и ряда белков теплового шока [Frolov et al., 2018]. Поэтому можно предположить, что в прорастающих семенах при рандомизации вектора силы тяжести в ходе 3D-клиноостатирования запускается неспецифические стресс-реакции, направленные на адаптацию растений к гравитационному стрессу.

Влияние 3D-клиноостатирования на гликирование и окислительные модификации белков прорастающих семян рапса.

В рамках данной задачи был охарактеризован окислительный и гликоокислительный протеом семян рапса, прорастающих в течение 24 и 48 часов в статических условиях и при непрерывном вращении со скоростью 2.5 об/мин вокруг каждой из двух ортогонально расположенных осей клиностата (3D-клиноостатирование). Для поиска неэнзиматических постреплиционных модификаций, то есть окислительных и гликоокислительных модификаций белков в ответ на 3D-

накоплением сахаров, приводит к усилению аутоокисления моносахаридов, карбонильному стрессу и повреждению белка. В этом контексте можно ожидать увеличения скорости гликирования и окисления белков, что может

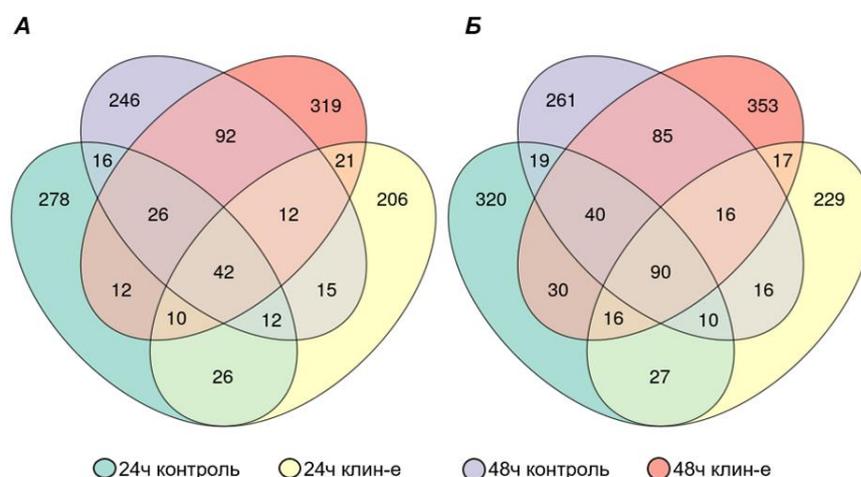


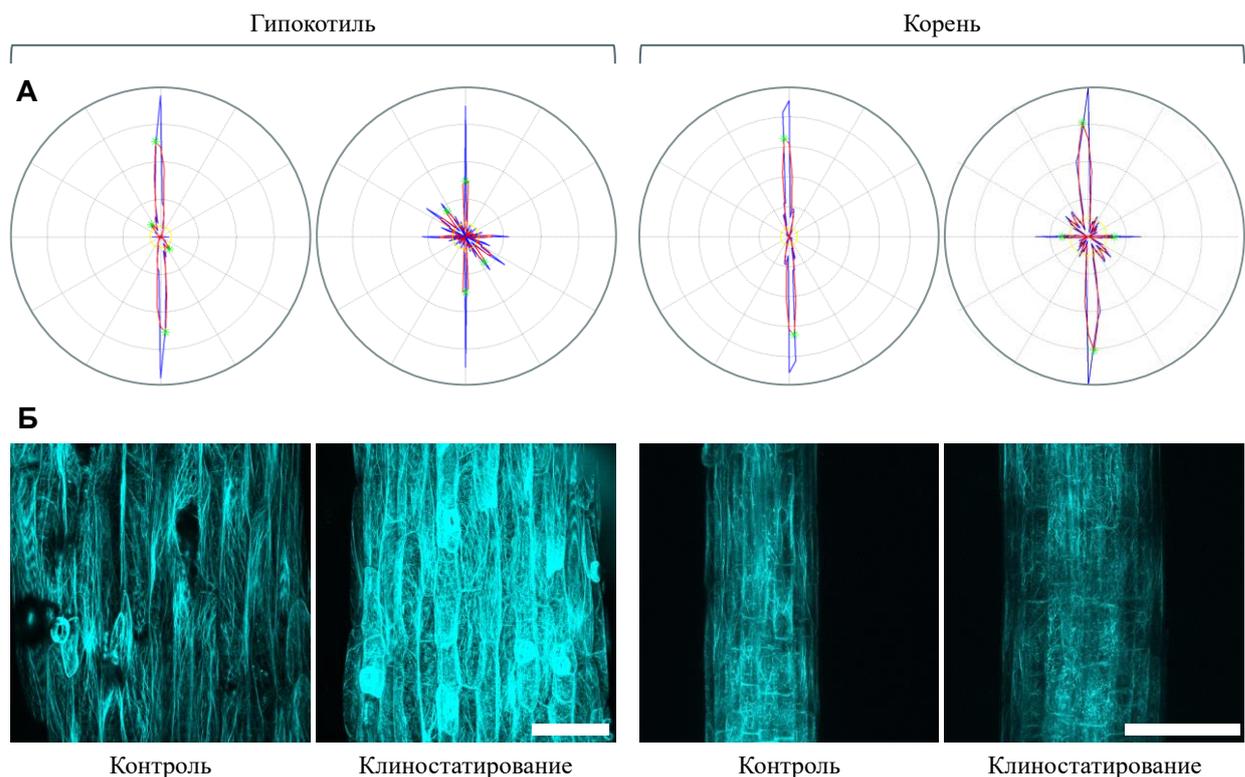
Рис. 10. Количество сайтов гликирования (А) и окисления (Б), идентифицированных в белках семян рапса, пророщенных в рамках второго независимого эксперимента.

напрямую влиять на их функции [Bilova et al., 2016]. Недавно было подтверждено существование «горячих точек гликирования», то есть специфических остатков в аминокислотных последовательностях, с повышенной чувствительностью к гликированию [Barnaby et al., 2011]. Таким образом, нельзя исключать, что такое сайт-специфическое гликирование может быть частью какого-то неизвестного регуляторного механизма, с помощью которого растения могут приспособить свой рост к новым условиям. Таким образом, нам впервые удалось получить результаты, которые дают представления о посттрансляционных неэнзиматических модификациях, которые возникают в растениях под действием 3D-клиностагирования. В настоящее время такая информация в литературе отсутствует.

4. Выяснить влияние клиностагирования на организацию актиновых микрофиламентов и микротрубочек трансгенных растений арабидопсиса *GFP-fABD2*, *Lifect-Venus*, *GFP-MAP4* и *GFP-TUA6*.

Моделью служили трансгенные проростки *A. thaliana*, несущие репортерные вставки *GFP-fABD2* и *Lifect-Venus*, позволяющие визуализировать актиновые микрофиламенты, а также трансгенные линии, которые позволяют выявлять микротрубочки в гипокотилиях (*TUA6-GFP*) и корнях (*MAP4-GFP*) арабидопсиса. В гипокотиле организацию цитоскелета изучали в эпидерме и коре; в зоне растяжения корня – в ризодерме и коре.

В зоне растяжения корня вертикально растущих растений *GFP-fABD2* наблюдали преимущественно аксиальную ориентацию микрофиламентов актина в коре корня и стеле (60% и 50%, соответственно), доля наклонных микрофиламентов была в 2 раза меньше в коре корня (29%) и в 1,5 раза меньше в стеле (34%) (Рис. 11). Минорную долю составляли поперечно ориентированные микрофиламенты (11% и 14%, соотв.).



Arabidopsis thaliana GFP-fABD2

Рис. 11. Организация актиновых микрофиламентов, визуализированных методом конфокальной микроскопии в клетках растений *Arabidopsis thaliana* GFP-fABD2. А: круговые диаграммы распределения угловой ориентации микрофиламентов актина относительно оси корня. Б: типичные конфокальные изображения организации актинового цитоскелета в гипокотиле и зоне растяжения корня. Приведены суммарные проекции 10–12 оптических срезов. Масштабная линейка: 100 мкм.

В растениях *Lifect-Venus* доля аксиальных и наклонных микрофиламентов была приблизительно одинакова в коре корня и стеле (44% и 42%, 44% и 36%, соответственно), уровень поперечно ориентированных микрофиламентов был выше, чем в растениях GFP-fABD2. В условиях клиностагирования в коре корня зоны растяжения у растений GFP-fABD2 доля аксиально ориентированных микрофиламентов существенно снижалась, а доля наклонно и поперечных микрофиламентов возрастала (до 41% и 40%, соответственно). Однако в стеле таких изменений не наблюдалось. В клиностагируемых проростках *Lifect-Venus* не было обнаружено достоверных различий в доле микрофиламентов той или иной ориентации по сравнению с контролем, однако спектр угловой ориентации был расширен.

В гипокотиле вертикально ориентированных растений актиновые микрофиламенты были ориентированы преимущественно аксиально, со вторичным максимумом наклонной ориентации (Рис. 11). Выращивание растений в условиях 3D-клиностагирования приводило к более интенсивной флуоресценции GFP вокруг актиновых микрофиламентов, что может косвенно свидетельствовать о более обильном образовании толстых пучков актина по сравнению с вертикальным контролем. При клиностагировании в гипокотиле (также как и корнях) в 2–3 раза увеличивалось количество наклонно ориентированных микрофиламентов, направление которых составляет 30–60° от оси корня (Рис. 11).

Микротрубочки в гипокотиле контрольных растений *TUA6-GFP* характеризовались широким спектром ориентации с преобладанием наклонных и аксиальных элементов (Рис. 12), а также вторичным максимумом поперечно ориентированных МТ. Доля аксиально ориентированных МТ в гипокотиле клиностагированных растений снижалась, а доля расположенных наклонно – возрастала одновременно с уширением спектра их ориентации.

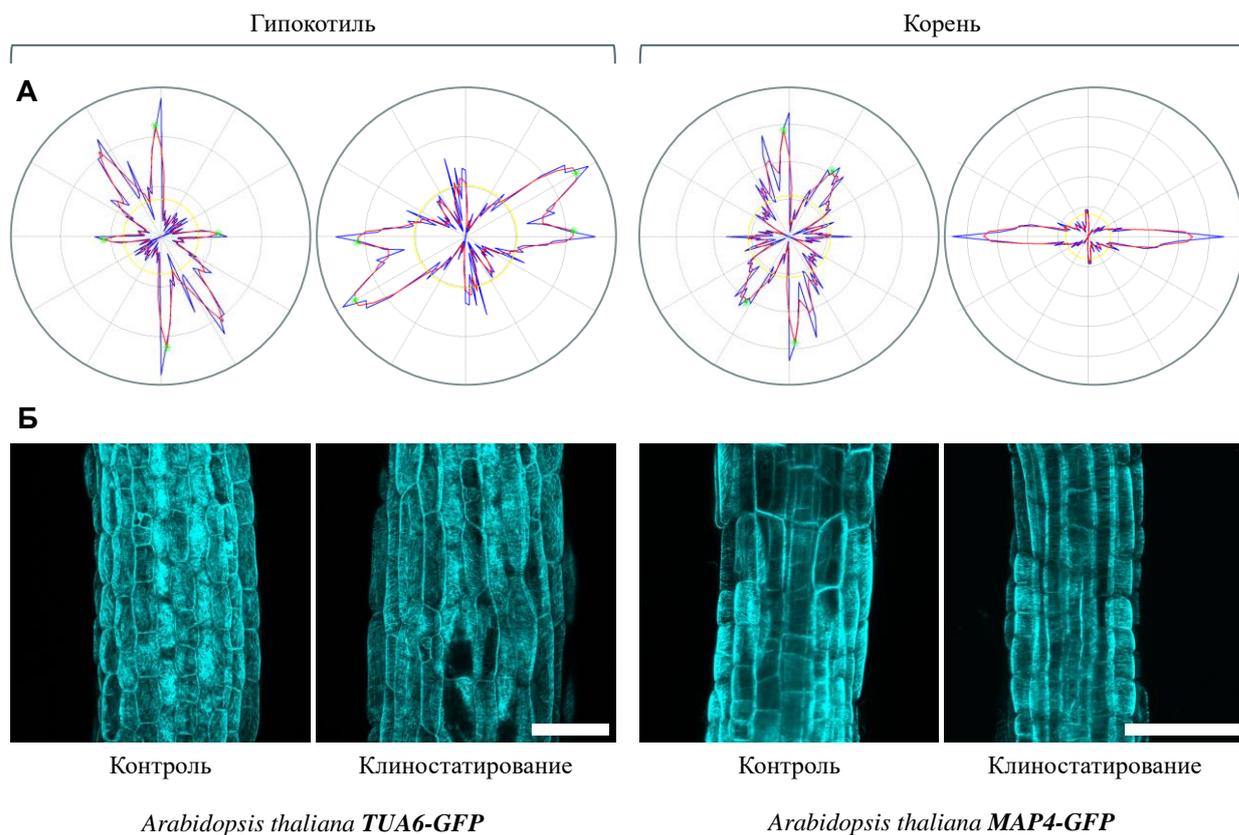


Рис. 12. Организация микротрубочек в клетках растений *Arabidopsis thaliana*. Микротрубочки в гипокотылях выявлены с помощью конфокальной микроскопии в линии трансгенных растений TUA6-GFP, а в корне – в растениях MAP4-GFP. А: круговые диаграммы распределения угловой ориентации микротрубочек относительно оси корня. Б: типичные конфокальные изображения организации микротрубочек в гипокотиле и зоне растяжения корня. Приведены суммарные проекции 10–12 оптических срезов. Масштабная линейка: 100 мкм.

В зоне растяжения корня вертикально ориентированных растений MAP4-GFP микротрубочки были расположены наклонно и поперечно (Рис. 12); в ряде клеток наблюдали и микротрубочки, расположенные вдоль оси корня. Клиностамирование резко снижало количество наклонных и аксиальных микротрубочек и стабилизировало их поперечную ориентацию.

Следует особо подчеркнуть, что при помещении чашек Петри с растениями, постоянно выращиваемых в условиях клиностамирования, в вертикальное положение (мы назвали этот процесс *первичной гравитимуляцией*), характер углового распределения микрофиламентов в коре корня GFP-fABD2 уже через 30 мин. был такой же, как и в клетках статического контроля. Таким образом, после прекращения клиностамирования в клетках корня арабидопсиса уже через 30 преобладает аксиальная ориентация микрофиламентов.

Таким образом, в контроле микрофиламенты были ориентированы, в основном, аксиально, а микротрубочки имели широкий спектр ориентации. 3-D-клиностамирование приводит к повышению спектра ориентации микрофиламентов актина и микротрубочек.

5. Изучить роль ауксина, ионов Ca²⁺ и активных форм кислорода в адаптивных реакциях растений арабидопсиса при 3D-клиностамировании.

Методом гистохимического окрашивания визуализировано распределение фитогормона ИУК в 7-суточных проростках *Arabidopsis DR5::GUS*, выращенных вертикально либо в условиях моделирования микрогравитации путём 3D-клиностамирования с момента окончания стратификации. Оказалось, что в кончике корня распределение ИУК как в контроле, так и при клиностамировании не имеет существенных отличий: локальный максимум ИУК наблюдали в области покоящегося центра (QC) апикальной меристемы корня, более слабое ИУК-зависимое

окрашивание отмечали в колумелле и клетках-предшественниках коры корня. По мере отдаления от покоящегося центра сигнал быстро затухал на расстоянии 8-12 клеток. В гипокотиле ИУК-зависимый сигнал был распределён диффузно в силу высокой вакуолизации клеток коры; повышенное окрашивание наблюдали вдоль хода флоэмных элементов и в корневой шейке, а в семядольных листьях – в дистальной части и вдоль проводящих элементов, при этом существенных различий в распределении ИУК между надземными органами вертикально растущих и клиностатированных растений не выявили. Однако клиностатированные растения отличались от контрольных по морфологическим признакам, контролируемым ауксином: длина апикальной меристемы корня клиностатированных растений была достоверно больше (на 12%) чем при вертикальном росте. Интересно, что при этом длина корня у клиностатированных проростков достоверно снижена как у дикого типа, так и у всех использованных в нашей работе линий с репортерами цитоскелета *in vivo* (GFP-fABD2, Lifeact-Venus, MAP4-GFP, TUA6-GFP). Диаметр корней клиностатированных растений в области апикальной меристемы при этом был также незначительно больше, чем у вертикально растущих растений. Напротив, семядольные листья у клиностатированных растений были уже и короче, чем у вертикально растущих.

Визуализация и анализ распределения НуPer показал, что у вертикально растущих растений основная область генерации АФК локализована в дистальной области зоны растяжения корня как в коре, так и в стеле (сразу после апикальной меристемы) и продолжается по зоне растяжения корня на расстояние около 1 мм, что примерно соответствует длине апикальной меристемы корня. Напротив, у клиностатированных растений НуPer-зависимый сигнал находится в области апикальной меристемы и затухает в дистальной части зоны растяжения корня. Наибольшую концентрацию пероксида водорода в кончике корня клиностатированных растений наблюдали в корневом чехлике, колумелле, коре корня в апикальной меристеме. В зоне растяжения корней клиностатированных растений пероксид-зависимый сигнал отмечали спорадически в центральной части клеток.

Визуализация Ca²⁺-чувствительного FRET-репортера с сигналом ядерной локализации YC3.6-NLS в вертикально растущих и клиностатированных проростках *Arabidopsis* показала, что уровень кальция в апикальной меристеме и дистальной части зоны растяжения корня клиностатированных проростков был выше (~30%) по сравнению со статическим контролем. Повышение концентрации кальция при клиностатировании также наблюдалось в активно растущих растяжением клетках гипокотыля.

Влияние 3D-клиностатирования на рост и динамику пероксида водорода в проростках арабидопсиса.

У проростков арабидопсиса, которые подвергались 3D-клиностатированию замедлялось развитие растений и накопление биомассы (Рис. 13). Масса клиностатированных проростков составляла 70 ±7% массы контрольных растений. На рис 13. Видно, что 1-суточное (рис. 13А) и 10-суточное (рис. 13Б) вращение приводили к одинаковому снижению биомассы. Такой результат мы объясняем тем, что развитие растений останавливалось в течение первых суток с момента начала вращения. Затем развитие клиностатированных растений возобновлялось, и скорость накопления биомассы не отличалась от контрольной.

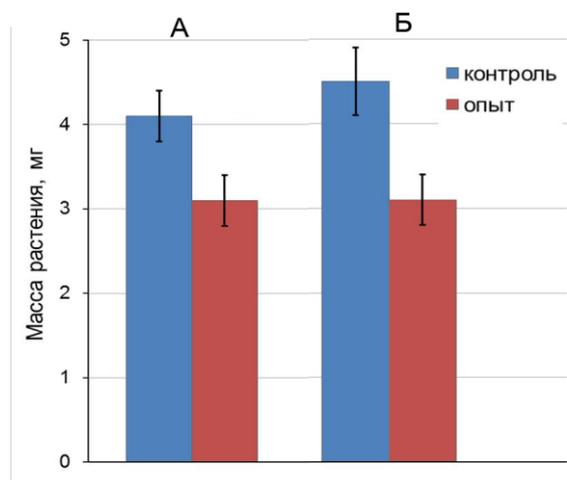


Рис. 13. Влияние клиностатирования (опыт) на биомассу 10-ти-суточных проростков арабидопсиса. А: Проростки подвергали клиностатированию только в последние сутки

выращивания. **Б:** Проростки вращали в 3D-клиностае в течение 10 суток выращивания.

Вращение растений в 3D-клиностае, безусловно, является стрессовым воздействием, одно из проявлений которого является приостановка роста, которую мы обнаружили, измерив биомассу растений (Рис. 13). Обратимая остановка роста в условиях стресса, происходящая без изменения осмотичности среды, может быть вызвана включением сигналинга на стрессор. Неспецифическим эндогенным стресс-сигналом, приводящим к остановке роста, во многих ситуациях выступает пероксид водорода, уровень которого резко возрастает на непродолжительное время, демонстрируя концентрационную «вспышку».

В научной литературе имеются сведения об изменении редокс-баланса в процессе реакции растений на изменение ориентации. У гравистимулированных корней арабидопсиса происходило увеличение активности аскорбат-оксидазы и возрастало содержание дегидроаскорбиновой кислоты [Lee e.a., 2011]. У проростков кукурузы через 1 ч после начала гравистимуляции содержание АФК в кончике корня увеличивалось в 3 раза, а через 7 ч — снижалось до контрольных значений [Joо e.a., 2001]. В условиях микрогравитации происходило резкое снижение содержания окисленных фенольных соединений (лигнина и диферулатов) в клеточных стенках проростков риса [Wakabayashi e.a., 2015].

Влияние рандомизированной ориентации растений арабидопсиса на динамику содержания в них пероксида водорода ранее не изучалось. Мы проверили, может ли и в данном случае посредником в остановке роста выступать H_2O_2 . Для этого была определена его концентрация в гомогенате растений, подвергнутых длительному и кратковременному клиностаированию. Результаты представлены на Рис. 14. Очевидно, что в процессе клиностаирования наблюдалась временный подъем концентрации H_2O_2 . Поэтому растения, подвергнутые кратковременному клиностаированию, содержали пероксида водорода в 1.5 раза больше, чем контрольные растения (Рис. 14 А), а растения, которые клиностаировали в течение 10 суток, не отличались от контрольных по уровню H_2O_2 в тканях (Рис. 14 Б).

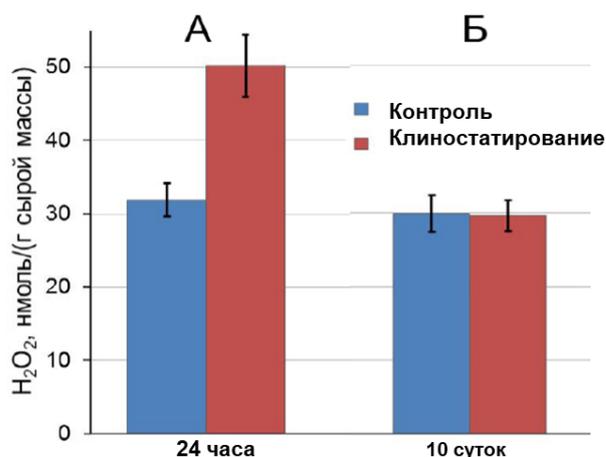


Рис. 14. Влияние 3D-клиностаирования на содержание пероксида водорода в проростках арабидопсиса.

Таким образом уровень H_2O_2 в проростках арабидопсиса повышается в первые сутки клиностаирования, но сравнивается с контролем при дальнейшем вращении растений в клиностае (Рис. 14). Очевидно, что условия клиностаирования являются стрессовым фактором для растений арабидопсиса.

Сравнение метаболитных профилей вертикально растущих и клиностаированных растений арабидопсиса.

В эксперименте использовали 10-суточные проростки арабидопсиса, выращенные в вертикальных условиях либо в 3D-клиностае (2 об./мин.) на искусственном субстрате Панион-320/Панион-100 при насыщающем увлажнении субстрата каждые 48 часов. Полярные метаболиты проростков арабидопсиса экстрагировали в водно-метанольном растворе; их триметилсилильные производные

анализировали в газовом хроматографе LECO Pegasus 4D, сопряжённом с времяпролётным масс-спектрометрическим детектором. Выявлены основные классы полярных метаболитов – сахара, аминокислоты, органические кислоты (Рис. 15).

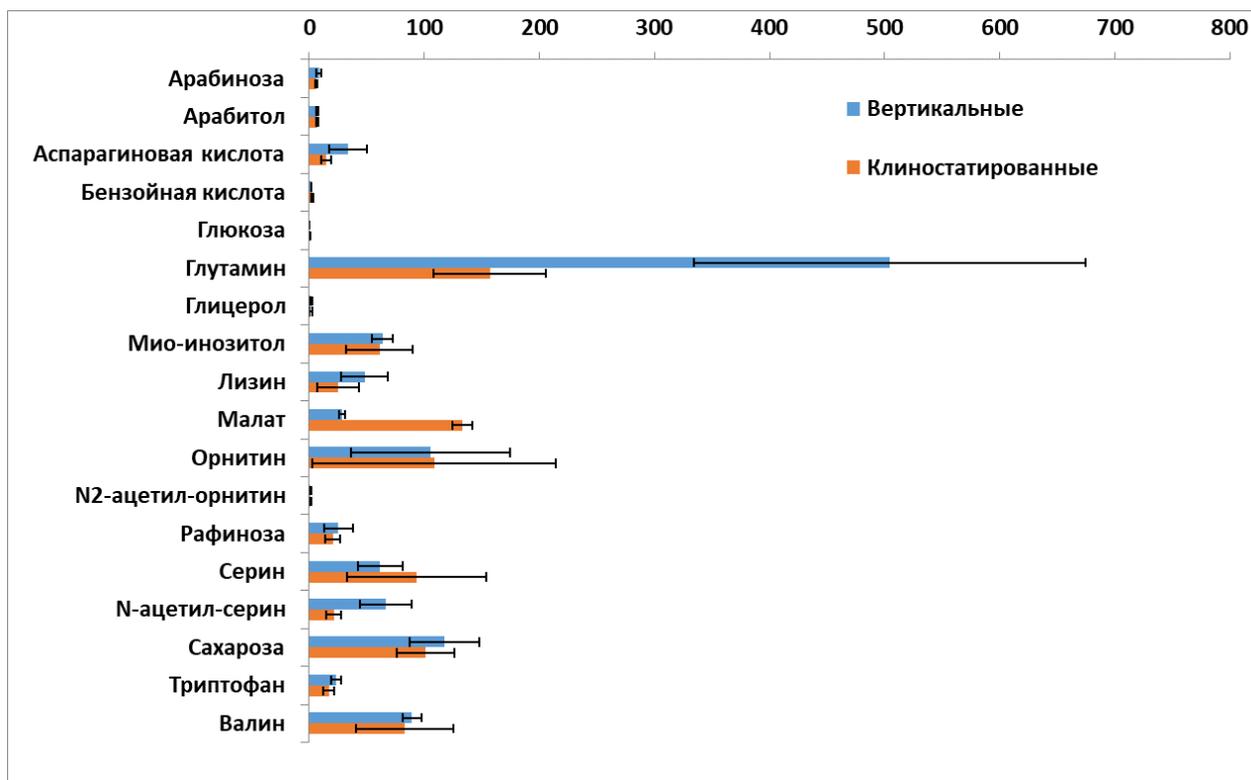


Рис. 15. Влияние клиностатирования на метаболитные профили вертикально растущих и клиностатированных растений арабидопсиса.

Уровень метаболитов в клиностатируемых растениях характеризовался очень высокой индивидуальной изменчивостью, при этом коэффициент вариации был минимален для следующих метаболитов: малат, арабитол, триптофан, глутамин, арабиноза, бензоат, валин и мио-инозитол (от 0,19 до 0,29), причём при клиностатировании для последних трёх метаболитов коэффициент вариации увеличивался в 4–5 раз. Таким образом, статистически значимые различия были выявлены только по уровню малата ($P < 0,01$; $n = 20$): уровень малата при клиностатировании возрастал почти в 5 раз по сравнению с условиями вертикального роста. Для большей части детектированных метаболитов отмечали тенденцию к снижению их уровня при клиностатировании: арабиноза, арабитол, аспартат, глутамин, лизин, триптофан, валин, сахароза и рафиноза.

6. Изучить особенности эмбриогенеза и формирования семян арабидопсиса при 3D-клиностатировании.

Для выращивания растений арабидопсиса расы Columbia в условиях клиностатирования был успешно применён искусственный органический ионообменный субстрат Панион-320/Панион-100, созданный группой акад. В.С. Солдатова (Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск).

Созревание стручков и семян у клиностатированных растений происходило с задержкой в 8-16 дней по сравнению с вертикально растущими, число семян с одного растения при клиностатировании было снижено на 20%.

Собраны плоды, семена и зародыши арабидопсиса, сформировавшиеся в нормальных условиях и при 3D-клиностатировании. Впервые изучены особенности эмбриогенеза и формирования семян арабидопсиса в условиях 3D-клиностатирования. Прижизненные наблюдения проводили с помощью стереомикроскопа Stemi-2002 (Carl Zeiss, Germany). Тонкие детали внешнего строения семян и проростков выявляли с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6390 LA ("Jeol Ltd", Japan).

Сравнительный анализ структуры семян, полученных при выращивании растений арабидопсиса в условиях 3-D-клиноостатирования и статических условиях, показал следующее. Как в контроле, так и при 3-D-клиноостатировании, семена характеризовались достаточно высокой степенью выполненности. Были выделены 3 основные фракции семян: I – полностью выполненные семена (Рис. 16: 1а-в, 6а-в); II – не полностью выполненные семена (Рис. 16: 2-4, 7-9); III – невыполненные семена (Рис. 16: 5, 10). Процентное соотношение степени выполненности семян в опытном и контрольном варианте близким.



Рис. 16. Внешний вид семян, полученных из растений, выращенных в условиях контроля (1а-5) и 3-D-клиноостатирования (6а-10); прижизненные наблюдения.

1а-в, 6а-в – фракция полностью выполненных семян (1б - внешний вид семени увеличено, 1в – его бесцветный зародыш); 2-4, 7-9 – фракция не полностью выполненных семян (1, 7 – более развитые и крупные семена, 4, 9 – менее развитые мелкие, 3а, 8а – недоразвитые семена с тонкой, местами непигментированной семенной кожурой и зеленым зародышем; 3б-г, 8б-г: 3б, г, 8б, г - внешний вид семени увеличено, 3в, 8в – его зеленый зародыш); 5, 10 – фракция невыполненных семян.

Как в контроле, так и при 3-D-клиноостатировании выполненные семена (фракция I) имели одинаковые размеры (с варьированием длины от 0.43 до 0.57 мм, ширины от 0.20 до 0.31 мм) и коричневую окраску; содержали полностью сформированную семенную кожуру (с хорошо выраженной поверхностной скульптурой, а также развитые зародыш и эндосперм (Рис. 16: 1б, 6б; 2, 1а-3б, 3, 1а-3б). Семена являлись капилотропными - с U-образным изгибом морфологической оси семени, и соответствующим U-образным искривлением зародыша и эндосперма; зародыш бесцветный (Рис. 16: 1в, 6в), отчетливо дифференцирован на органы: семядоли, апекс побега и гипокотиль-корневую ось.

Гистогенез в апексе побега и зародышевого корня в обоих вариантах опыта нормальный (Рис. 17: 4а-4в; 3, 4а-4в).

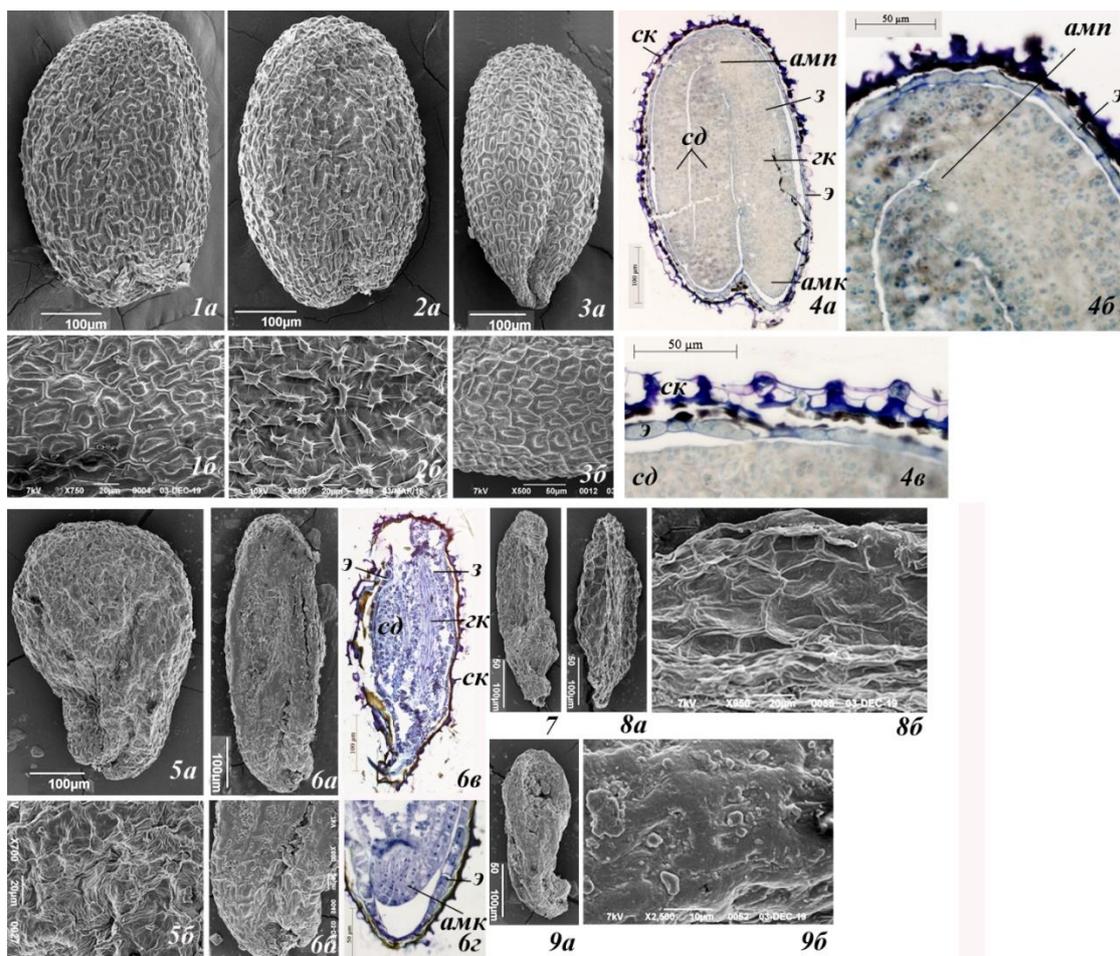


Рис. 17. Строение семян, полученных из растений, выращенных в условиях контроля (сканирующая электронная (СЭМ) и световая микроскопия (СМ).

1а-4в – фракция полностью выполненных семян, 5а-8б – фракция не полностью выполненных семян (5а-б – более развитые семена, 6а-г – менее развитые семена, 7-8б – семена с зеленым зародышем), 9а-б – фракция невыполненных семян; 1а, 2а, 3а, 5а, 6а, 7, 8а, 9а - внешний вид семян, 1б, 2б, 3б, 5б, 6б, 8б, 9б – структура поверхности семенной кожуры, 4а, 6в – строение семени на продольном срезе (4б – фрагмент зародыша с апексом побега, 6г – с апексом корня, 4в - семенной кожуры, увеличено). амк – апикальная меристема корня, амп – апикальная меристема побега, гк – гипокотиль, з – зародыш, cd – семядоли, ск – семенная кожура, э – эндосперм; 1а-3б, 5а-6а, 7-9б – СЭМ, 4а-в, 6в-г – СМ, полутонкие срезы.

Не полностью выполненные семена (фракция II), как в контроле, так и в эксперименте, также имели сходные размеры (с варьированием длины от 0.39 до 0.50 мм и ширины от 0.14 до 0.17 мм) и более или менее сформированную семенную кожуру, но с менее выраженными папиллами в центральной части клеток наружной эпидермы тесты (Рис. 16: 2, 4, 7, 9; 2, 5а-6б, 3, 5а-6б). Такие семена часто являлись несколько сморщенными, нередко имели неправильную форму и содержали недоразвитые зародыш и эндосперм. Наиболее развитые семена фракция II имели U-образно изогнутые зародыш и эндосперм, однако семядоли зародыша были более короткие и недоразвитые (с признаками дегенерации в клетках паренхимы), апикальная меристема зародышевого корня была не полностью сформированной; в эндосперме почти отсутствовало накопление запасных питательных веществ (Рис. 17: 6в, г; 3, 6б, в). Среди семян этой группы присутствовали семена с зеленым зародышем, наличие которого коррелировало с формированием более тонкой, частично лишенной пигментации (местами почти прозрачной) семенной кожуры (Рис. 16: 3а-г; 8а-г); папиллы на поверхности клеток наружной эпидермы семенной кожуры в таких случаях, как правило, отсутствовали (Рис. 17: 7-8б; 3, 7-8б).

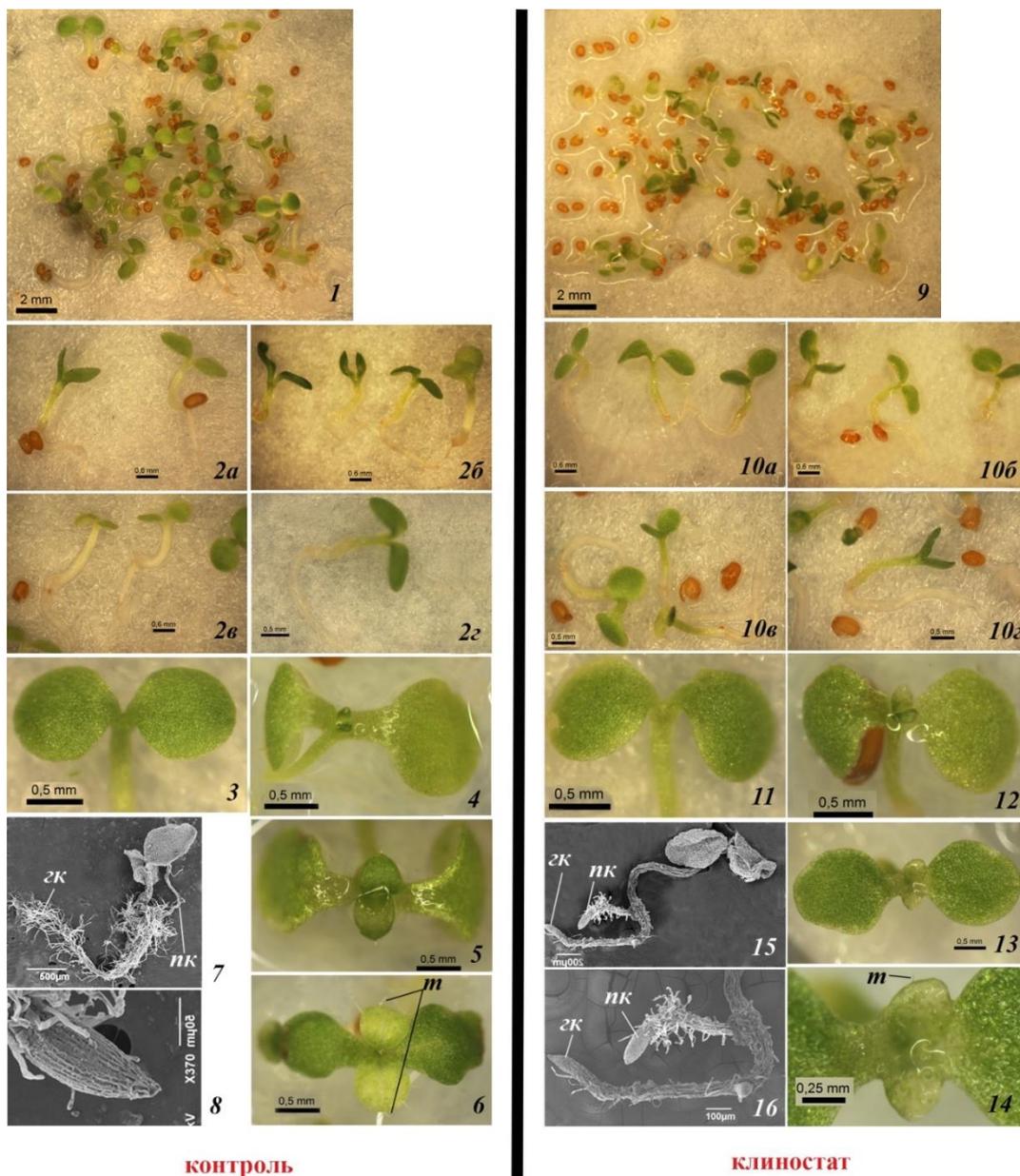


Рис. 19. Строение проростков, полученных из семян растений, выращенных в условиях контроля (1а-8) и 3-D-клиностатирования (9-16); 1-6, 9-14 - прижизненные наблюдения, 7, 8, 15, 16 – сканирующая электронная микроскопия.

1, 9 – общий вид проростков, 2а-г, 10а-г – группы отдельных проростков увеличено, 3, 11 – внешний вид семядолей, 4-6, 12-14 – последовательные стадии развития настоящих листьев на апексе побега (на дет. 6 и 14 видны трихомы на листьях), 7, 8, 15-16 – внешний вид проростка (7, 15) и его корней (8, 16): видны корневые волоски и зачатки боковых корней на главном корне. гк – главный корень, пк – придаточный корень, т – трихомы

Анализ ультраструктуры семян, их зародыша и эндосперма у растений арабидопсиса, выращенных в условиях 3-D-клиностатирования (Рис. 18), позволяет заключить, что семена характеризуются достаточно высоким качеством и жизнеспособностью, близким по показателям к семенам, полученным в условиях статического контроля.

Анализ прорастания полностью выполненных семян (фракция I) показал, что как контрольные семена, так и семена, полученные в условиях клиностатирования, имели довольно высокую всхожесть и энергию прорастания – в среднем до 51% проростков в контроле и 54% - при клиностатировании на 7 сутки от начала опыта (Рис. 19: 1, 9); прорастание большей части семян (около 50%) отмечалось на 5 сутки, его завершение - после 7 суток от начала опыта. На 5 сутки

большинство проростков имели развернутые, супротивные семядоли и развитый главный зародышевый корень. Структура семядольного аппарата была нормальной; отклонений в числе семядолей, их срастания или недоразвития не наблюдалось (Рис. 19: 2а-г, 3, 10а-г, 11). На 7 сутки в большинстве проростков, как в контроле, так и в эксперименте, отмечалось заложение и развитие зачатков настоящих листьев (с их расположением перпендикулярно медианной плоскости семядолей); на поверхности листьев формировались трихомы (Рис. 19: 4-6, 12-14), а на главном корне – система корневых волосков и боковых корней, первые признаки появления которых отмечались еще на 5 сутки от начала опыта (Рис. 19: 7, 8, 15, 16). Прорастание семян фракции II, как в контроле, так и в эксперименте, было единичным: проросли лишь наиболее развитые семена, в том числе, с зеленым зародышем. Семена фракции III не проросли.

Таким образом, нам впервые удалось получить семена растений арабидопсиса, выращенных при постоянном 3-D-клиностаировании. Полученные семена характеризуются достаточно высоким качеством и жизнеспособностью, близким по показателям к семенам растений, выращенных в условиях статического контроля. Структура выполненных семян, их зародыша, эндосперма полностью соответствовала семенам *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbus). Полученные из таких семян проростки в целом характеризовались отсутствием каких-либо отклонений в развитии (изменений в структуре семядольного аппарата, нарушений тропизмов, типа филлотаксиса, гистогенеза апикальных меристем побега и зародышевого корня).

Список использованной литературы:

1. Barnaby O.S., Cerny R.L., Clarke W., Hage D.S. (2011) Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation. *Clin. Chim. Acta.* 412: 277-285
2. Bilova T., Lukasheva E., Brauch D., Greifenhagen U., Paudel G., Tarakhovskaya E., Frolova N., Mittasch J., Balcke G.U., Tissier A., Osmolovskaya N., Vogt T, Wessjohann L.A, Birkemeyer C., Milkowski C., Frolov A. (2016) A Snapshot of the Plant Glycated Proteome: Structural, Functional and Mechanistic Aspects. *J. Biol. Chem.* 291(14):7621-36.
3. Frolov A.A., Didio A., Ihling C., Chantseva V.V., Grishina T., Hoehenwarter W., Sinz A., Smolikova G.N., Bilova T.E., Medvedev S.S. (2018) The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome. *Functional Plant Biology.* 45: 440-452.
4. Joo J.H., Bae Y.S., Lee J.S. (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol.* 126: 1055–1060.
5. Lee Y., Park C.H., Kim A.R., Chang S.C., Kim S.-H., Lee W.S., Kim S.-K. (2011) The effect of ascorbic acid and dehydroascorbic acid on the root gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 909–916.
6. Wakabayashi K, Soga K, Hoson T, Kotake T, Yamazaki T, Higashibata A, et al. Suppression of hydroxycinnamate network formation in cell walls of rice shoots grown under microgravity conditions in space. *PLoS ONE* 10(9):e0137992.
7. Zheng H.Q., Han F., Le J. (2015) Higher plants in space: microgravity perception, response and adaptation *Microgravity Sci. Technol.* 27:377-386.