

А.Ф. ПОПОВА¹, М. МАСГРЕЙВ², А. КУАНГ³

¹ Институт ботаники НАН Украины, Киев
E-mail: afrorova@ukr.net

² Массачусетский университет, США

³ Техасский университет, США

РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ РАСТЕНИЙ *BRASSICA RAPA* L. В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ



Представлены результаты сравнительного цитозембриологического исследования зародышей идентифицированного возраста, сформированных в условиях микрогравитации и в наземном лабораторном контроле. Установлено значительное сходство темпов развития и степени дифференциации зародышей в обоих вариантах. Выявлены отдельные случаи нарушений в процессе формирования зародышей и ускорение развития эндосперма на ранних стадиях эмбриогенеза в условиях микрогравитации.

© А.Ф. ПОПОВА, М. МАСГРЕЙВ, А. КУАНГ, 2009

Введение. Получение семенной продукции высших растений на борту космических летательных аппаратов является одним из важных направлений гравитационной биологии с учетом все возрастающей длительности пребывания космонавтов в условиях космического полета и перспективами расширения космических трасс.

Это диктуется необходимостью решения как теоретических проблем, в частности, выяснения закономерностей генеративного развития растительных организмов в условиях микрогравитации, так и прикладных задач по созданию технологий культивирования высших растений в контролируемых экологических системах жизнеобеспечения (КЭСЖ) во время продолжительных космических полетов. В таких системах высшие растения планируется использовать в качестве основного компонента автотрофного звена благодаря их способности восстанавливать кислород, а также синтезировать питательные и биологически активные вещества, которые могут использоваться космонавтами.

Изучение многих аспектов генеративного размножения высших растений в условиях микрогравитации было начато довольно давно [1–12], однако проблема получения полноценных семян высших растений даже первого поколения остается пока что не полностью решенной.

Впервые семена были получены у однолетнего высшего растения *Arabidopsis thaliana* (L.) во время продолжительного космического эксперимента на борту орбитальной станции «Салют-7» [1], хотя многие из полученных семян вообще не проросли или наблюдались эмбриональные летали, приводящие к гибели проростков.

На сегодня благодаря совершенствованию культиваторов для выращивания растений в условиях микрогравитации получены семена у четырех видов однолетних высших растений – *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., *Brassica rapa* L., *Triticum aestivum* L. и *Pisum sativum* L. [1, 3, 4, 9–12], однако биометрические показатели семян (вес, размер, количество и состав запасных веществ, содержание лигнина, жизнеспособность, размеры органов зародышей), сформированных в условиях микрогравитации, снижены по сравнению с наземным контролем. Это, безусловно, может препятствовать разра-

ботке биотехнологий для КЭСЖ, когда необходимо выращивание растений на протяжении полного онтогенеза, а также получение нескольких генераций растений. Следует отметить, что анализ отклонений в процессе формирования семян в условиях микрогравитации достаточно затруднен ввиду отсутствия экспериментов, в которых зародыши отбирали бы для изучения на последовательных стадиях их развития. Исследования проводили только на сформированных семенах после их возвращения на Землю.

Материалы и методы. Украинско-американский эксперимент (STS-87) проведен на американском корабле «Колумбия» с использованием перекрестноопыляемого высшего растения *Brassica rapa* L., специально выведенной низкорослой формы *Astroplants*. Указанный эксперимент является уникальным в том плане, что впервые удалось получить зародыши с четко идентифицированным возрастом для проведения сравнительных исследований эмбриогенеза благодаря участию в эксперименте украинского космонавта Леонида Каденюка. Он выполнил искусственное опыление растений *B. rapa*, маркируя цветки с учетом дня опыления, а также осуществил фиксацию части опыленных цветков.

Основное внимание в эксперименте уделялось сравнительной характеристике темпов развития, степени дифференциации зародышей и накопления в них запасных питательных веществ в условиях микрогравитации по сравнению с наземным контролем, а также анализу жизнеспособности пыльцы, используемой для опыления цветков.

Растения *B. rapa* выращивали в стерильных условиях, поэтому поверхность семян перед посадкой стерилизовали и помещали их в стерильный искусственный субстрат — фому, предварительно прикрепив семена к специальной бумаге, что создавало зону для расположения корней в процессе их прорастания и дальнейшего роста растений [11]. Использовали специальные культиваторы (чемберы), куда помещали по шесть семян. Посев семян осуществляли с таким расчетом, чтобы к моменту старта космического корабля растения находись в фазе бутонизации (растения достигали этой стадии на 12-е сутки роста). Растения *B.*

rapa выращивали при непрерывном освещении 250 мкмоль/м²·с⁻¹.

Перед стартом космического корабля три культиватора с 12-суточными растениями помещали в общий специальный культиватор (PGF), который обеспечивал рост растений благодаря автоматически контролируемому уровню температуры, влажности и углекислого газа. Кроме того, в PGF устанавливали также три культиватора с высевными семенами для получения цветущих растений с целью анализа количества бутонов, цветков и состояния пыльцевых зерен, сформированных в условиях космического полета.

За два дня до старта PGF установили на борту космического корабля. Продолжительность эксперимента составляла 16 сут. Растения на протяжении космического эксперимента выращивали при непрерывном освещении 220 мкмоль/м²·с⁻¹ для более быстрого их развития. При поливе растений в соответствии с заранее составленным графиком использовали раствор Хогланда, который удерживался фомой в достаточном количестве благодаря ее физическим особенностям.

Культиваторы с растениями через 4 ч после посадки космического корабля были доставлены в лабораторию, где проводилась предварительная обработка материала — измерения, взвешивание и фиксация. На протяжении первого часа после доставки материала с космодрома в лабораторию жизнеспособность пыльцевых зерен и темпы роста пыльцевых трубок растений *B. rapa* определяли свежим раствором флюоресцеина диацетата.

Сформированные в условиях космического полета завязи и стручки, как и контрольные, после измерения препарировали с целью изоляции семенных зачатков, семян и зародышей. Структуру пыльников, семенных зачатков, зародышей и семян изучали с использованием светооптической, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии.

Пыльцевые зерна, семенные зачатки и зародыши для светооптических и электронно-микроскопических исследований фиксировали согласно заранее отработанной методике [11]. Материал для светооптической и трансмиссионной электронной микроскопии заключали в эпоксидные смолы в соответствии

с задачами исследований (Epon 812, Spurr и RL-wait).

Полутонкие срезы семенных зачатков, зародышей и их отдельных частей изготавливали с использованием ультрамикротомы (DuPont Sorvall, США).

Полутонкие срезы красили разными красителями в зависимости от цели исследований — толуидиновым синим, а также проводили реакцию Шифф-йодной кислотой [13].

В процессе выполнения эксперимента в условиях микрогравитации и в наземном контроле растения фотографировали на всех стадиях их развития.

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенный после приземления анализ состояния пыльцевых зерен с помощью флуоресцентных красителей показал высокую жизнеспособность пыльцы, которая использовалась для опыления как в условиях космического полета, так и в лабораторном контроле. Так, жизнеспособность пыльцевых зерен в полетном варианте составляла 93 %, в наземном контроле — 94 %.

На специальных приспособлениях для опыления выявлено большое количество пыльцевых зерен между волосками, а также на рыльцах столбиков завязи, как и пыльцевых трубок, что подтверждает успешное прохождение процесса опыления в условиях космического полета нормально сформированными пыльцевыми зернами.

Количество бутонов и цветков у растений *B. rapa*, развивающихся в условиях космического полета, было разным по сравнению с наземным контролем.

В частности, в полетном варианте количество бутонов было меньшим по сравнению с наземным контролем, тогда как количество цветков, наоборот, превышало количество в контрольном варианте, что свидетельствует о некотором ускорении цветения растений в условиях космического полета. В результате искусственного опыления растений на борту космического корабля (рис. 1, а), которое выполнялось согласно схеме эксперимента, получены стручки (рис. 1, б) и, соответственно, зародыши *B. rapa* разного возраста — от 3-суточных до 15-суточных, почти полностью дифференцированных (рис. 1, в, г).

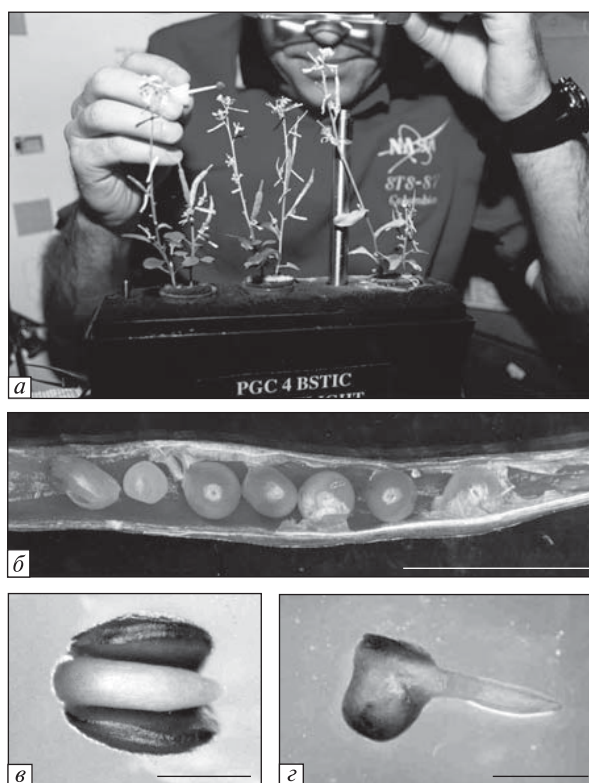


Рис. 1. Проведение Леонидом Каденюком искусственного опыления и маркирования цветков *B. rapa* в условиях космического полета. На растениях видны уже сформировавшиеся стручки (а), раскрытый стручок с 15-суточными семенами, сформированными в условиях космического полета (б); 15-суточные «космические» зародыши: в — нормально дифференцированный зародыш, г — отсутствие изгиба зародышевого корня. Масштаб: б — 3 мм; в, г — 1 мм

Число сформированных стручков в условиях космического полета более чем в два раза было меньшим по сравнению с наземным контролем (31 и 70 шт. соответственно), тогда как количество семян в одном стручке существенно не отличалось в обоих вариантах (в среднем 4,2 шт. — полетный вариант, 5,5 шт. — наземный контроль).

Полученные зародыши в полетном и контрольном вариантах находились на разных стадиях развития — шаровидные или сердцевидные с однослойным нитевидным подвеском (3-суточные), дифференцирующиеся, в которых начинается формирование изгиба зародышевого корня (7-суточные), и согнутые, почти полностью дифференцированные зародыши (15-суточ-

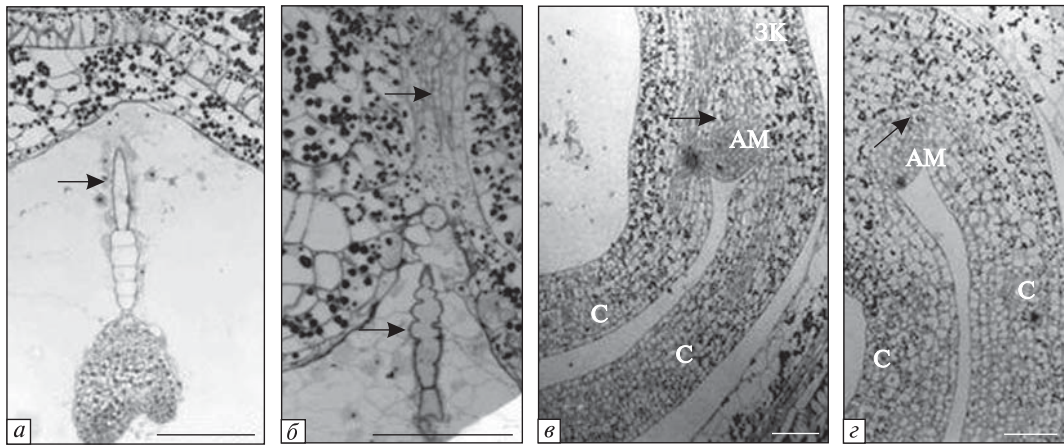


Рис. 2. Трехсуточные зародыши *B. rapa* с суспензорами: *a* – наземный контроль (указана стрелками апикальная клетка суспензора); *б* – гирозная оболочка апикальной клетки суспензора, космический полет (указаны стрелками микропиле и апикальная клетка суспензора); *в* – фрагменты 14-суточных зародышей, наземный контроль, *г* – космический полет; АМ – апикальная меристема, С – семядоли. Масштаб: *a* – 60 мкм; *б* – 70 мкм; *в*, *г* – 50 мкм

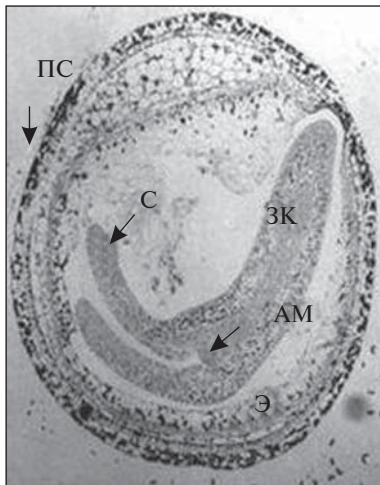


Рис. 3. Общий вид семенного зачатка с 15-суточным зародышем, сформированным в условиях космического полета: ЗК – зародышевый корень; С – две семядоли; АМ – точка роста с апикальной меристемой; ПС – покровы семени

ные). Последние имели изогнутые зародышевый корень и две длинные семядоли с точкой роста между ними.

Трехсуточные зародыши, сформированные в условиях космического полета, по темпам развития были в основном подобны зародышам наземного лабораторного контроля.

Через 3 сут после опыления зародыши в обоих вариантах имели, как правило, шаровидную или сердцевидную форму, состояли

из меристематических клеток с дифференцированным слоем покровных клеток – протодермой, имели однослойные нитчатоподобные суспензоры, апикальная клетка которых значительно заужена и входит в микропиле (рис. 2, *a*, *б*).

Следует отметить, что в зародышах, сформированных в условиях микрогравитации, оболочки апикальных клеток иногда имели волнистые (гирозные) контуры (рис. 2, *б*).

С учетом того, что апикальные клетки, входящие в микропиле, выполняют важную трофическую роль в процессе развития зародышей, формирование гирозной клеточной оболочки, значительно увеличивающей поверхность контакта суспензора зародыша с клетками эндосперма, вероятно, способствует более интенсивной трофике зародышей в условиях микрогравитации. Следует отметить также ускоренное формирование эндосперма на этой стадии развития семенных зачатков в условиях космического полета, что проявлялось в образовании клеточного эндосперма, тогда как для контрольного варианта на этой стадии развития был характерен только ядерный эндосперм.

Степень дифференциации и темпы развития 7-суточных зародышей в основном были подобны наземному контролю. Зародыши сохраняли подвесок, длина которого увеличивалась по сравнению с шаровидными зародышами.

Возрастали также и размеры семядолей. Между семядолями формировалась точка роста в виде небольшого бугорка клеток апикальной меристемы. Зародышевый корень, как и семядоли, имели сформированные тяжи прокаэмбальной ткани.

К возрасту 12 сут размер зародышей, сформированных в условиях микрогравитации и наземного контроля, увеличивался, как и усиливался изгиб сформированных семядолей и зародышевого корня. Четких различий по степени дифференциации зародышей в обоих вариантах не обнаружено.

Зародыши как наземного контроля (рис. 2, в), так и «полетные» (рис. 2, г и рис. 3) возрастом 15 сут представляли собой изогнутую стадию развития, для которой характерно наличие хорошо развитых семядолей, точки роста с апикальной меристемой, зародышевого корня, гипокотилия, а также корневого чехлика.

По степени дифференциации сформированные в условиях микрогравитации зародыши в основном не отличались от контрольных. На этой стадии развития эндосперм представлен в виде узкого тяжа, состоящего из нескольких слоев, который окружает зародыш (рис. 3). Семенной зачаток имел два интегумента, которые формируют покровы семени.

Выводы. Таким образом, темпы развития зародышей *B. rapa*, сформированных в условиях космического полета, на начальных этапах развития в основном такие же, как и в наземном контроле.

Выявлены определенные отклонения на начальных этапах формирования семян в условиях космического полета, в частности, ускорение развития эндосперма — формирование клеточного эндосперма по сравнению с ядерным, характерным для контрольного варианта в этот период, а также образование гиридных оболочек апикальных клеток суспензоров зародышей.

Морфологические особенности 15-суточных зародышей свидетельствуют о сходных темпах развития и дифференциации зародышей в условиях космического полета и наземного лабораторного контроля, что подтверждает отсутствие существенного влияния микрогравитации на эмбриогенез растений.

A.F. Popova, M. Musgrave, A. Kuang

DEVELOPMENT OF *BRASSICA RAPA* L. EMBRYOS UNDER MICROGRAVITY

Results of comparative studies of the embryos of identical age formed under microgravity and ground laboratory control are presented. Significant similarity of a rate of embryo development and degree of their differentiation in both variants has been shown. The single cases of the disturbances in embryo formation, and also a certain acceleration of endosperm development at the early stages of seed formation in microgravity are revealed.

A.Ф. Попова, М. Масгрейв, А. Куанг

РОЗВИТОК ЗАРОДКІВ РОСЛИН *BRASSICA RAPA* L. В УМОВАХ МІКРОГРАВІТАЦІЇ

Представлено результати порівняльного цитоембріологічного дослідження зародків ідентифікованого віку, сформованих в умовах мікрогравітації та в наземному лабораторному контролі. Встановлено значну подібність темпів розвитку та ступеня диференціації зародків в обох варіантах. Виявлено окремі випадки порушень в процесі формування зародків та певне прискорення розвитку ендосперму на ранніх стадіях формування насіння в умовах мікрогравітації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Меркус А.И., Лауринавичюс Р.С. Полный цикл индивидуального развития растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Neunh. на борту орбитальной станции Салют-7 // Докл. АН СССР. — 1983. — 271. — С. 509—512.
2. Кордюм Е.Л., Черняева И.А. Особенности формирования андроцея и гинецея у *Arabidopsis thaliana* (L.) Neunh в условиях космического полета // Биологические исследования на орбитальных станциях «Салют». — М.: Наука, 1984. — С. 81—96.
3. Левинских М.А., Сычев В., Дерендяева Т.А. и др. Анализ влияния космических факторов на рост и развитие суперкарликовой пшеницы в оранжерее «Свет» // Авиакосмич. медицина и экология. — 1999. — 33. — С. 30—37.
4. Левинских М.А., Сычев В.Н., Дерендяева Т.А. и др. Рост и развитие растений в ряду поколений в условиях космического полета в эксперименте «ОРАНЖЕРЕЯ-5» // Авиакосмич. и эколог. медицина. — 2001. — 35, № 4. — С. 45—50.
5. Kordyum E., Popova A., Mashinsky A. Influence of orbital flight conditions of formation of genitals in *Muscari racemosum* and *Anethum graveolens* // Life Sci. and Space Res. — 1979. — 17, № 2. — P. 301—304.
6. Krikorian A.D., Levine H.G. Development and growth

- in space // Plant physiology: growth and development / Ed. H.G. Steward. — New York : Acad. press, 1991. — P. 491–555.
7. Kuang A., Musgrave M.E., Matthews S.W. Modification of reproductive development in *Arabidopsis thaliana* under spaceflight conditions // Planta. — 1996. — **198**. — P. 588–594.
8. Kuang A., Popova A., Xiao Y., Musgrave M.E. Pollination and embryo development in *Brassica rapa* L. in microgravity // Intern. J. Plant Sci.— 2000. — **161**, № 2. — P. 203–211.
9. Bingham G.E., Sytchev V.N., Levinskikh M.A., Podolsky I.G. Final plant experiments on Mir provide second generation wheat and seeds // Gravitat. and Space Biol. Bul. — 1999. — **13**, № 1. — P. 48–52.
10. Musgrave M.E., Kuang A., Matthews W.S. Plant reproduction during spaceflight // Planta. — 1997. — **203**. — P. 177–184.
11. Musgrave M.E., Kuang A., Yi Xiao et al. Gravity-independence of seed-to-seed cycling // Planta. — 2000. — **210**. — P. 400–406.
12. Sytchev V.N., Levinskikh M.A., Gostimsky S.A. et al. Spaceflight effects on consecutive generations of peas grown onboard the Russian segment of the International Space Station // Acta Astronautica. — 2007. — **60**. — P. 426–432.
13. Наумов Н.А., Козлов В.Е. Основы ботанической микротехники. — М.: Наука, 1954. — С. 254–276.

Поступила 13.02.08