

УДК 663.543.005

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ МЕРИСТЕМАТИЧНИХ КЛІТИН ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ ПІД ДІЄЮ КЛІНОСТАТУВАННЯ

Н.І. Адамчук-Чала, М.А. Соболь

*Структурно-функціональні зміни меристематичних клітин проростків гороху під дією кліностакування.– Н.І. Адамчук-Чала, М.А. Соболь.– В результаті порівняльного структурно-функціонального дослідження клітини зон апікальних меристем пагону та головного кореня 3-добових проростків гороху (*Pisum sativum* L.) за умов повільного (2 об/хв.) горизонтального кліностакування та стаціонарного контролю було виявлено, що структура меристематичних клітин апексів пагону та кореня як у контролі, так і у кліностакованих проростків, була подібною, проте ядрця клітин при кліностакуванні містили ядерцеві вакуолі. Застосування методів електронної імуноцитохімії дозволило виявити суттєве зниження функціональної активності ядерцеві меристематичних клітин кореня під дією кліностакування.*

*Адреса: 01601, Київ, вул. Терещенківська, 2, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України*

*Structural and functional changes of meristematic cells pea seedlings under clinorotation.– N.O. Adamchuk-Chala, M.A. Sobol'.– The comparative structural and functional investigation of apical zone meristematic cells of stem and main root of 3-day-old pea seedlings (*Pisum sativum* L.) under slow (2 rpm) horizontal clinorotation was revealed that structure meristematic cell of stem and root apexes was same in control as well as in the clinorotated seedlings, but nucleoids have nucleoid's vacuole in cells under. Using of electron-immunocytochemical methods elucidate to estimate an essential decreasing of nucleoids functional activity in the root meristematic cells under clinorotation.*

*Address: 01601, Kyiv, Tereshchenkivska str., 2, Institute of Botany named M.G. Kholodny NAS of Ukraine*

### Вступ

Вплив мікрогравітації та кліностакування на живі об'єкти різного походження досліджується багатьма методами [2, 10, 11]. Відкриття гравічутливості клітини, зокрема рослинної, поставило питання щодо механізмів біологічної дії мікрогравітації, базових гравізалезних клітинних процесів та ролі клітинних органел в реакції та адаптації клітин до дії цього фактора [1, 7]. Перебудови ультраструктурної організації клітинних органел в умовах мікрогравітації та кліностакування, розглянуті з загальних позицій ідентифікації їх функціонального стану, тобто рівня та направленості процесів основного обміну в клітині, свідчать про суттєві зміни в цих умовах енергетичного, вуглеводного та ліпідного обміну в клітинах, а також мембранного транспорту іонів [3]. На підставі цих даних виявляється суттєвим розглянути структурно-функціональну організацію ядерця як першої і однієї з найголовніших ланок білоксинтезуючого апарату клітини під дією кліностакування та мікрогравітації. Згідно загальноприйнятої точки зору, структурна організація ядерця тісно пов'язана з його функціональною активністю, тобто рівнем синтезу попередників рибосомної РНК,

швидкістю процесингу і виходу зрілих субодиноць рибосом з ядерця в нуклеоплазму [4].

Насьогодні відомий визначений масив інформації про феноменологію змін ядерця під впливом різних фізичних факторів та їх інтерпретацію, засновану на останніх даних про структурну організацію і функціонування ядерця та його компонентів [6, 9, 12, 13]. Зниження або посилення ядерцевої активності є відображенням зміни загального балансу між фізіологічними процесами, а діапазон змін ядерця позитивно корелює з активністю його функціонування.

Проте існує дуже мало даних щодо впливу кліностакування і реальної мікрогравітації на ядрце [5], з чого випливає, що цьому об'єктові приділялося напрочуд мало уваги з боку дослідників у галузі космічної біології.

### Матеріали і методи

За основний об'єкт дослідження були обрані клітини зон апікальних меристем пагону та головного кореня 3-добових проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Для вирощування рослинних об'єктів в умовах кліностакування нами було використано горизонтальний кліностап із швидкістю обертання 2 об/хв.

Апекси пагонів добових контрольних і кліноставованих проростків гороху фіксували у розчині 3%-го глютарового альдегіду на 0,1M фосфатному буфері (pH 7,4) протягом доби при –5°C з попередньою інфільтрацією зразків шприцем об'ємом 20 мл у польових умовах. Після 15-ти хвилинного занурення матеріалу у аналогічний буфер у лабораторних умовах проводилася його півторигодинна постфіксація у 1%-му розчині OsO<sub>4</sub> на тому ж самому буфері з наступним зневоднюванням у спиртах висхідної концентрації і ацетоні. Зразки полімеризували у суміші епоксидних смол. Параметри ультраструктурних елементів досліджуваних клітин визначали в електронному трансмісійному мікроскопі JEM-1200EX. Для статистичної обробки даних застосовували програму Microsoft Excel 2000.

Антитіла до ДНК (Sigma) були використані у розведенні 1:5 в блокуючому розчині (2%-ий альбумін бичачої сироватки (BSA), 0,05%-ий Tween 20 у PBS). Всі антитіла поставлені фірмою Sigma. Вторинні антитіла були кон'юговані з частками золота діаметром 10 нм для ультраструктурної імуноцитохімії.

Корені гороху фіксували сумішшю 4%-ого формальдегіду та 0,5%-ого глютаральдегіду у фосфатному буфері, pH 7,2 протягом 3 годин при кімнатній температурі. Меристеми дегідрували в етанолі зростаючої концентрації та заключали в акрилову смолу LRWhite. Ультратонкі зрізи товщиною 70-80 нм монтували на покритих формваром нікелевих сітках. Сітки фарбували у 2%-ому розчині ураніл ацетату протягом 15 хвилин. Препарати досліджували у трансмісійному електронному мікроскопі Philips 300, при 80 кВ. Щільність мічення над цитоплазматичними компартментами, ядерними структурами та субядерцевими компонентами вираховували, використовуючи програму "QWin Standard" (Leica) для автоматичного аналізу зображень. Контроль мічення проводили, випускаючи інкубацію в первинних антитілах.

### Результати досліджень та обговорення

Дводобові проростки гороху у нормі мали зародковий корінь, гіпокотиль, сім'ядолі та зачатки першої пари справжніх листків. Корені орієнтувалися строго вертикально. Кліноставовані рослини відрізнялися від контрольних вигнутими або покрученими зародковими коренями.

Порівняльний структурно-функціональний аналіз клітин різних зон апікальних

меристем виявив, що меристематичні клітини кліноставованих проростків різних шарів мали менший об'єм –  $317.2 \pm 56.0$  мкм<sup>3</sup>, порівняно з клітинами контрольного варіанту –  $596 \pm 77.0$  мкм<sup>3</sup>. Нуклеоплазма та ядрця клітин експериментального варіанту на електронограмах

мали гетерогенну гранулярну компоненту. Особливо ця відмінність була властива клітинам центральної зони. Структурна організація меристематичних клітин апексів пагону та кореня контрольних і кліноставованих проростків були подібні, проте ядрця в них містили ядерцеві вакуолі (Рис. 1) і, вірогідно, мали меншу функціональну активність.

В контролі ультраструктура меристематичних клітин коренів гороху була характерною для клітин цього типу. Клітини 2-4 шарів периферії містили ядро, яке займало центральне положення, круглої або овальної форми, наповнене переважно дифузним хроматином. Грудки конденсованого хроматину спостерігалися біля ядерної оболонки або в каріоплазмі. Поодинокі велике ядрце круглої або злегка овальної форми було розташовано в центрі ядра. Згідно прийнятої морфо-функціональної класифікації [8] ядрця в клітинах, що аналізувалися, можуть бути віднесені до компактного типу, для якого характерний високий рівень функціональної активності. Фібрілярні центри (ФЦ) розміщувалися по всьому ядерцевому об'єму (Рис. 2А). Щільний фібрілярний компонент (ЩФК) розміщувався навколо фібрілярних центрів або між ними. Гранулярний компонент (ГК) був розташований на периферії ядрця та навколо вакуолей. Широкий пухкий шар гранулярного компоненту на ядерцевій периферії може бути непрямим показником інтенсивного транспорту рибосомних субодиниць з ядрця в каріоплазму і потім в цитоплазму. Деякі кластери ГК виявлялися всередині ядрця. Ядрцеві вакуолі (ЯВ) різних розмірів розміщувалися по всьому ядрцевому об'єму, мали нечіткі контури та нуклеоплазмо-подібний вміст. Маленькі фібрілярно-гранулярні грудки спостерігали всередині деяких великих вакуолей. Іноді ЯВ межували з ФЦ.

В умовах кліноставування ядра та ядрця не відрізнялися від контролю за формою та положенням. Ядрця були віднесені до вакуолізованого типу, зокрема, з центральною вакуоллю, для якого характерний помірний рівень функціональної активності (Рис. 2Б). Ядрця характеризувалися щільним пакуванням компонентів. Щільний шар гранулярного компоненту займав ядрцеву периферію. Ядрцеві вакуолі були чітко окреслені і мали електронно-прозорий внутрішній матеріал. Більші за розміром ЯВ розташовувалися в центральній частині ядер.

В ядрі найбільш міченими виявилися блоки гетерохроматину. Значно менша кількість часток золота була виявлена над дифузним хроматином. В ядрці мітка антитіл до ДНК була локалізована над фібрілярними центрами та щільним фібрілярним компонентом.

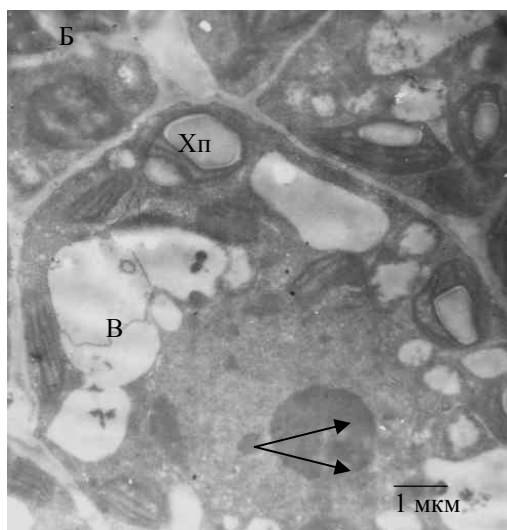
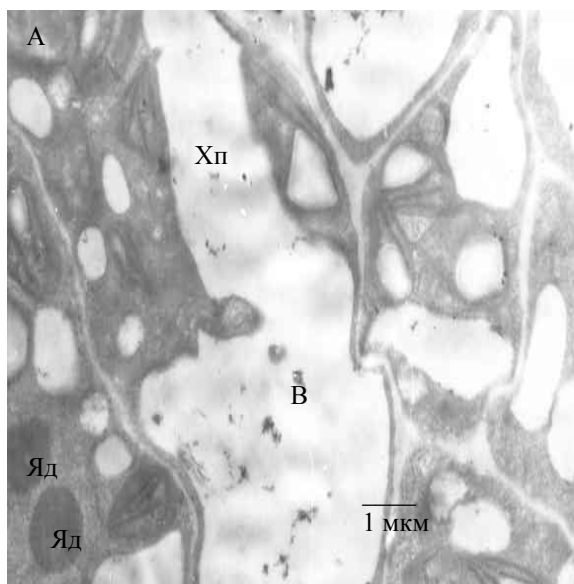


Рисунок 1. Фрагменти клітин центральної зони апікальних меристем пагону проростків гороху А – в контролі, Б – при кліностагуванні Умовні позначення: Хп – хлоропласт; В – вакуоль; Яд – ядро; стрілками вказано ядерцеві вакуолі.

В фібрилярних центрах частки золота виявлені над кластерами конденсованого хроматину, над внутрішніми фібрилами деконденсованої рДНК та на границі ФЦ-ЩФК. Гранулярний компонент та ядерцеві вакуолі були позбавлені мітки.

За кількісним розподілом мітки антитіл до ДНК в ядрі, в умовах кліностагування виявлено збільшення мітки над фібрилярними центрами порівняно з контролем (Табл. 1).

Таблиця 1. Кількісний аналіз розподілу мітки антитіл до ДНК в ядерцевих субкомпонентах

Умови дослідження	ФЦ	ЩФК
	кількість гранул золота/мкм <sup>2</sup>	
Контроль	28,05±6,63*	13,79±1,90
Кліностагування	93,03±18,50**	26,72±4,10**

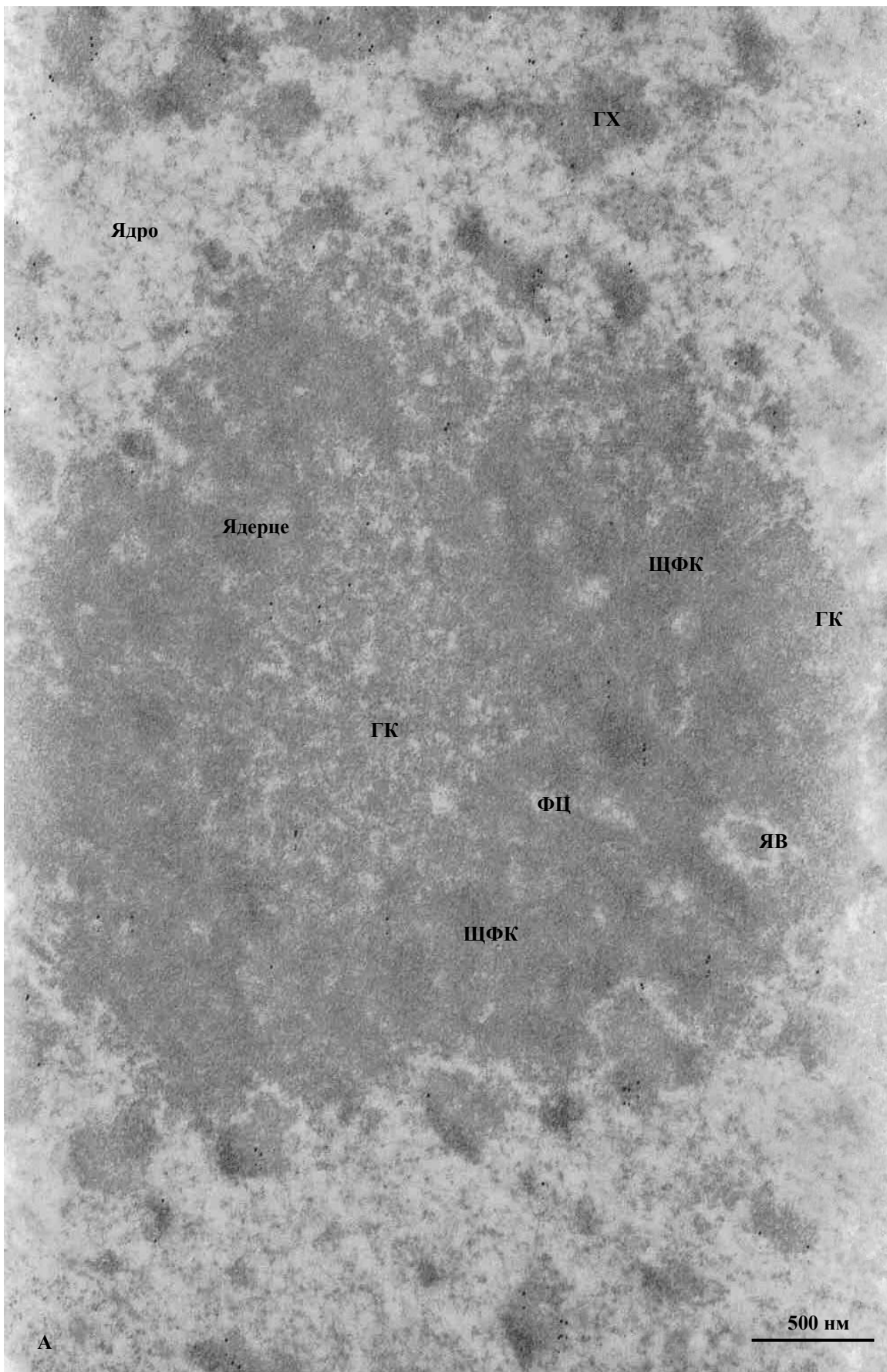
середнє±стандартне відхилення, \*\*p<0,01

В ядрі мітка антитіл до ДНК у значно більшій кількості була локалізована над фібрилярними центрами та щільним фібрилярним компонентом (Рис. 2Б). В ядрі виявлені великі вакуолі, що безпосередньо межували з ФЦ. В цьому випадку ФЦ вирізнялися наявністю в них мітки антитіл до ДНК, а вакуолярні ділянки – наявністю в них передрибосомних частинок. За кількісним розподілом мітки антитіл до ДНК в ядрі, найбільш міченими виявилися фібрилярні центри, щільний фібрилярний компонент містив меншу кількість мітки гранул золота на мкм<sup>2</sup> (Рис.3).

Ядрця в клітинах гороху, за нашими даними, згідно прийнятої морфо-функціональної класифікації [8] відносяться до компактного типу, для якого характерний високий рівень функціональної активності. Нами продемонстровано, що за міченням антитілами до ДНК в фібрилярних центрах локалізовані кластери конденсованого хроматину, внутрішні фібрили деконденсованої рДНК, а також перехідна зона ФЦ-ЩФК. Кластери конденсованого хроматину в фібрилярних центрах утворені нуклеосомними фібрилами рДНК, тимчасово виведеної зі стану активації, та міжгенними нетранскрибованими спейсерними районами рДНК [13]. При підвищенні ядерцевої активності гетерохроматин фібрилярних центрів поступово деконденсується з утворенням тонких фібрил рДНК. Навпаки, при зниженні рівня функціонування ядра рДНК всередині фібрилярних центрів поступово конденсується до утворення кластерів гетерохроматину [9]. Це призводить до висновку, що конформаційні зміни фібрилярних центрів тісно пов'язані з транскрипційною активністю рДНК [13].

Між фібрилярними центрами виявлені філаменти ДНК, які утворюють щільний фібрилярний компонент, мічений на ультраструктурному рівні антитілами до ДНК. Отримані нами результати співпадають з літературними даними щодо наявності в фібрилярних центрах більшої кількості рДНК, ніж у щільному фібрилярному компоненті [5].

Ми показали зміну локалізації рДНК та збільшення її кількості вдвічі в щільному фібрилярному компоненті та в 3,5 рази в фібрилярних центрах. Ми можемо припустити, що в умовах кліностагування біля ядерцевий хроматин, який містить локуси дезактивованих р-генів, входить в ядро, готуючись до активації після зняття зовнішнього несприятливого фактору, водночас, рДНК з щільного фібрилярного компоненту входить до фібрилярних центрів, переходячи у потенційно-активний або неактивний стан. Інше наше припущення полягає в тому, що зменшення рівня пізнього процесингу рРНК та зменшення відносного об'єму гранулярного компоненту, яке є наслідком зменшення кількості передрибосом, про що свідчать морфо-функціональні перебудови ядра, може спричинювати демаскування щільного фібрилярного компоненту, а з іншого боку, викликати вхід до ядра позаядерцевого р-хроматину для наступної його активації.



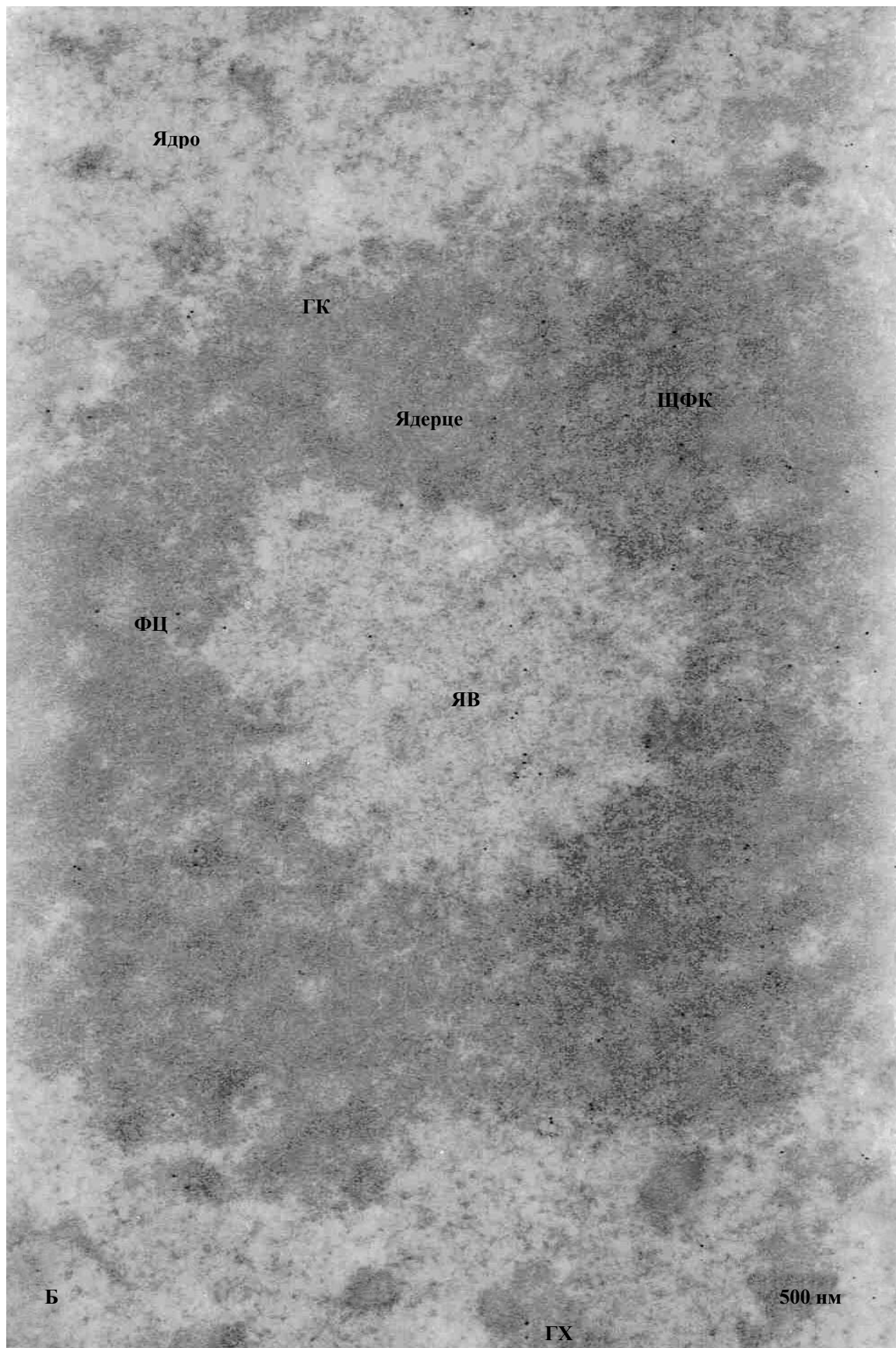


Рисунок 2. Імуноцитохімічна локалізація ДНК антитілами до ДНК А - в контролі, Б – при кліностагуванні. Умовні позначення: ФЦ - фібрилярний центр; ЩФК – щільний фібрилярний компонент; ГК - гранулярний компонент; ЯВ - ядерцева вакуоль; ГХ – гетерохроматин.



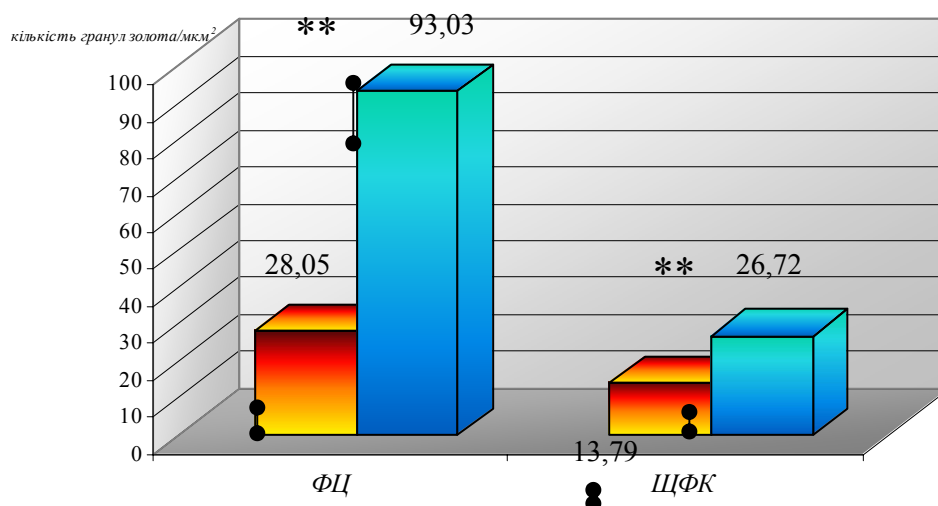


Рисунок 3. Гістограма щільності мічення антитілами до ДНК ядра в контролі та за умов зміненої гравітації: - контроль; - кліностакування.

#### Висновки

В умовах кліностакування ми продемонстрували морфологічні перебудови ядра клітин апікальних меристем пагону і головного кореня проростків гороху, які виявляють перехід ядра з компактного, вельми активного типу, до вакуолізованого типу, що характеризується помірним рівнем функціональної активності. Проведене нами комплексне дослідження

структурно-функціональної організації ядер клітин кореневих апексів проростків гороху із застосуванням методів електронної імуноцитохімії в умовах кліностакування дозволило виявити суттєві особливості ядер клітин порівняно з контролем і, таким чином, вперше встановити зміну рівня їх функціональної активності під впливом зміненої гравітації.

1. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А., Жадко С.И., Климчук Д.А., Полулях Ю.А. Современные проблемы космической биологии. М.: Наука, - 1994, 293с.
2. Меркис А.И. Значение силы тяжести в ростовых процессах растений // Проблемы космической биологии, - 1976, т. 33, 146 с.
3. Меркис А., Лауринавичюс Р., Машинский А.И. и др. Влияние условий невесомости и их имитации на рост, морфологию клеток и тканей проростков гороха и салата. - В кн.: Организмы и сила тяжести. Вильнюс: Мантис, - 1976, С. 238-246.
4. Меркис А., Лауринавичюс Р., Швякшдене Д. Влияние условий невесомости на начальные фазы развития проростков салата и арабидопсиса. Материалы 9-го Всесоюзного рабочего совещания по вопросам круговорота веществ в замкнутых системах на основе жизнедеятельности высших организмов. Канев, сент., - 1981, Киев, - 1983, С. 113-117.
5. Невзгодина Л.В., Григорьев Ю.Г., Маренный А.М. Действие тяжелых ионов на биологические объекты. М.: Энергоатомиздат, - 1990, 216с.
6. Недуха Е.М., Чучкин В.Г., Филипенко В.Н. Ультраструктура клеток апикальных меристем побега, семядолей и гипокотыля проростков *Impatiens balsamina* L. В: "Результаты исследований на биоспутниках" (под ред. О.Г. Газенко), - 1992, М.: Наука, С. 309-312.
7. Платонова Р.Н., Парфенов Г.И., Ольховенко В.П. и др. Проростание семян сосны в невесомости. В кн.: 6 Исследования на искусственных спутниках Земли „Космос-782” // Докл. АН СССР, - 1977, №5, С. 770-776.
8. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии, - 1988, т. 105, вып. 2. - С. 252-268.
9. Erard M.S., Lakhdar-Ghazal F., Amalric F. Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin // Eur. J. Biochem., - 1990, v. 191, pp. 19-26.
10. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol., - 1997, Vol. 171, P. 1-78.
11. Kordyum E.L. Space biology and medicine: conception and experimental data. Space research in Ukraine 2000-2002. National Space Agency of Ukraine. Ed. O. Fedorov. - 2002. - Prin. House "KIT". pp. 52-62.
12. Merkys A.I., Laurinavichius R.S. Plant growth in space / Fundamentals of space biology, - 1990, pp. 69-85.
13. Yano H., Sato S. Ultrastructural localization of transcription sites, DNA, and RNA reveals a concentric arrangement of structural and functional domains in plant nucleolonema // Protoplasma, - 2000, v. 214, pp. 129-140.

Отримано: 10 жовтня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 листопада 2007 р.