

УДК 581.821:581.47:582.734.3

СОПРЯЖЕННОСТЬ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА В КЛЕТКАХ ОКОЛОПЛОДНИКА *MALUS DOMESTICA (ROSACEAE)* ПРИ СТАРЕНИИ

Т.Х. КУМАХОВА, И.В. СКОРОБОГАТОВА

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Изучены ультраструктурные особенности и гормональный статус клеток плодов яблони на стадии съёмной зрелости и при старении. Показано, что на начальных этапах хранения клетки околоплодника имеют хорошо развитую систему пластид, митохондрий, полярный эндоплазматический ретикулум, многочисленные рибосомы и др. Выраженной особенностью клеток наружной зоны (эпидерма и гиподерма) является преимущественное развитие агранулярного эндоплазматического ретикулула.

При хранении плодов в течение 6 месяцев ультраструктура клеток околоплодника практически не изменяется (за исключением вакуолизации). Установлено, что признаки деградации клеточных мембран наблюдаются через 8 месяцев, при этом во всех тканях околоплодника отмечается опережающее старение пластид. В эпидерме хромoplastы заполняются пластоглобулами, гиподерме – некоторые хлоропласты с расширенными тилакоидами и фрагментированной наружной оболочкой, паренхиме – в амилопластах сложные крахмальные зерна постепенно распадаются. Митохондрии, в отличие от других органелл, более длительное время сохраняют развитую ультраструктуру и высокую активность, но в некоторых клетках паренхимной части околоплодника их матрикс просветлен и оболочки имеют разрывы.

Наряду с высокоразвитой ультраструктурой клетки околоплодника на стадии съёмной зрелости характеризуются особым гормональным статусом, при котором соотношение фитогормонов – индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты (ГК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов специфично для каждой ткани и зависит от условий произрастания плодовых деревьев. Наблюдаемое в процессе старения плодов (6–8 месяцев хранения) изменение в соотношении фитогормонов, возможно, связано с их перераспределением из одних тканей в другие, либо синтезом «de novo» или деградацией. Вместе с тем, отмечается высокое содержание фитогормонов АБК и цитокининов как на стадии съёмной зрелости, так и на последних этапах старения плодов. Можно предположить, что выявленное в клетках длительно хранящихся плодов нарушение целостности мембран, приводящее к деградации клеточных структур, носит гормональный характер.

Ключевые слова: *гормональный статус, митохондрии, пластиды, эндоплазматический ретикулум, яблоко.*

Введение

Проблема старения живых организмов всегда вызывала интерес у многих исследователей и довольно широко обсуждается в литературе. Еще Б. Стреллер [16]

сформировал четыре критерия изменений, характерных для старения: универсальность, постепенность, эндогенность и разрушительность. Этим критериям соответствует старение и растительных тканей. Однако следует отметить, что в физиологическом и биохимическом плане созревание сочных плодов, точнее их околоплодника, – это начало старения. При созревании плодов одновременно с процессами деградации клеточных структур происходят синтетические процессы [12]. Крахмал и пектины гидролизуются, аминокислоты включаются в белок, а неорганический фосфор – в нуклеиновые кислоты.

В настоящее время нет сомнения, что фитогормоны осуществляют координацию взаимодействия клеток, тканей и органов растения. Они запускают практически все крупные физиологические и морфологические программы, а также ответные реакции на воздействие внешней среды [5, 13, 20].

По данным литературы, выделение этилена – ключевого гормона в созревании плодов (климактерических), в частности яблок, – это результат как деструктивных, так и синтетических процессов [22]. Поэтому созревание сочных плодов рассматривается большинством исследователей как сложное переплетение катаболических и анаболических процессов.

При созревании плодов активация биосинтеза белка начинается вслед за усилением образования этилена, а повышение активности малик-фермента связано с усилением биосинтеза белка [12]. Активации образования этилена также предшествует усиление биосинтеза липидов.

В последние годы немало внимания уделено фитогормонам АБК, цитокинам, ГК и ИУК. Согласно имеющимся в литературе сведениям, АБК играет важную, а порой и критическую роль на протяжении всего жизненного цикла растений, она участвует в формировании комплекса адаптивных ответов на абиотические стрессы, вызывает торможение роста, ускоряет старение тканей, участвует в регуляции процессов созревания и поддержания покоя семян и почек [1, 14]. Системы синтеза фитогормонов АБК и этилена, играющих фундаментальную роль в регуляции старения, найдены в хлоропластах. В связи с этим их рассматривают в качестве структур, способных играть ключевую роль в стимуляции и развитии старения растения в целом. Кроме того, установлено, что в стареющих органах увеличивается содержание этилена и АБК и уменьшается количество ауксинов [5]. Как известно, цитокинины – фитогормоны, задерживающие старение, регулируют выход семян из состояния физиологического покоя [6, 13]. Одним из ярких проявлений физиологической активности цитокининового сигнала считается стимуляция биогенеза пластид. В условиях освещения цитокинины стимулируют формирование фотосинтетически активных хлоропластов, они положительно влияют на накопление фотосинтетических пигментов и синтез хлоропластной рРНК [4]. Цитокинины предотвращают распад хлорофилла и разрушение хлоропластов и, тем самым, старение фотосинтетического аппарата, а также повышают аттрагирующую способность клеток [17].

Согласно последним исследованиям, максимум связывания цитокининов приходится на внутренние мембраны [11, 23]. По мнению авторов, рецепторы цитокинина локализуются в сети эндоплазматического ретикулаума (ЭР), а не в плазмалемме, как считалось ранее. При этом лиганд-связывающий модуль рецептора направлен в люмен ЭР, а киназный и ресиверный домены – в цитозоль, что дает возможность передавать сигнал в ядро. До настоящего времени аппарат рецепции и трансдукции цитокининового сигнала детально охарактеризован только у

Arabidopsis thaliana. Фитогормон ГК, в свою очередь, стимулирует прорастание и выход семян из состояния покоя [13]. Известно, что биосинтез ГК начинается в пластидах, затем продолжается в ЭПР и цитозоле. Содержание гиббереллинов меняется в онтогенезе, особенно их количество резко возрастает при прорастании семян. Развивающиеся семена продуцируют гиббереллины, необходимые для роста плодов. Предполагают, что ГК влияет на созревание плодов, поскольку ее недостаток вызывает приостановку ростовых процессов. Помимо этого, при действии гиббереллинов повышается интенсивность дыхания, усиливается синтез целлюлозы, изменяется активность ферментов углеводно-фосфорного обмена. Гиббереллины участвуют в разрастании завязи и образовании плодов; они накапливаются в хлоропластах и участвуют в фотосинтезе. Также ГК обладает аттрагирующим эффектом и индуцирует образование этилена, что влияет на ускорение процессов созревания и дозревания, в частности и плодов яблони [19].

Выход семян из состояния физиологического покоя регулирует также ИУК [6, 13]. При всем этом, фитогормоны очень редко функционируют в одиночку, например, переход растений от состояния активного роста к физиологическому покою определяется балансом эндогенных фитогормонов, в частности ингибиторов – АБК и активаторов роста – гиббереллинов и цитокининов.

Между тем, вопрос – какие именно изменения характеризуют процесс старения растительных клеток и как можно регулировать обуславливающие их механизмы, до настоящего времени остается недостаточно изученным. В связи с этим комплексное исследование ультраструктуры и гормонального статуса клеток околоплодника на стадии созревания и хранящихся длительное время плодов яблони представляет немаловажный теоретический и практический интерес. По мнению авторов, материалы исследований могут быть полезными для мониторинга сроков созревания и решения проблемы сохранения товарных качеств при их длительном хранении в промышленных условиях.

Целью данной работы было изучение ультраструктуры и гормонального статуса клеток околоплодника яблони на стадии съемной зрелости и при старении.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были плоды позднеспелых сортов яблони (*Malus domestica* Borkn.), культивируемых в степной и горной зонах Кабардино-Балкарии. По почвенно-климатическим условиям степная и горная зоны характеризуются большим разнообразием (от континентального жаркого на равнине до холодного с четко выраженной вертикальной зональностью в горах).

Степная (равнинная) зона расположена на высоте 200–450 м над уровнем моря. Климат жаркий, засушливый с неустойчивым увлажнением. Характерны длительные суховеи (за вегетационный период – 70 дней).

Горная экологическая зона подразделяется на две подзоны: лесо-горную (550–800 м) и горно-степную (900–1500 м):

лесо-горная подзона – в основном теплая, с высокой степенью увлажнения. Рельеф под яблоневыми насаждениями представлен пологими склонами и межсклонными равнинами. Подзона в целом благоприятна для горного садоводства, при этом наблюдаются кратковременные (10–15 дней) суховеи;

горно-степная подзона – умеренно прохладная (среднесуточная температура воздуха в июле 15,6°C), характеризуется большим количеством солнечных дней и

высокой инсоляцией. Отмечаются кратковременные суховеи (до 8 дней). Характерны резкие суточные перепады температуры и маломощные почвы. Яблоневые насаждения расположены в межсклонных долинах и пологих южных склонах, пересекающихся горными реками, создающими наряду с макро- специфические микроклиматические условия.

Изучали гормональный статус и ультраструктуру клеток наружной зоны (эпидерма и гиподерма) и паренхимной части околоплодника на стадии съёмной зрелости (сентябрь) и при хранении в холодильной камере (2°C) в течение 6–8 месяцев.

Цитологические исследования проводили в лаборатории электронной микроскопии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Подготовку материала проводили по модифицированной ранее методике [7, 9]. Материал фиксировали глутаровым альдегидом (на 0,1 М фосфатном буфере с рН=7,2) и 1%-ным раствором четырехоксида осмия. Затем образцы обезвоживали в серии спиртов и ацетонов возрастающей концентрации и заливали в Эпон-812. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB-III-8801А. Срезы контрастировали 2%-ным водным раствором уранил-ацетата (37°C) и цитратом свинца по Рейнольдсу. Редактирование микрографий ТЭМ производили в программе CorelDRAWX5.

Содержание эндогенных фитогормонов (АБК, ГК, ИУК, цитокининов) определяли в одной навеске растительного материала в Центре молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева по методике, разработанной в лаборатории регуляторов роста [15].

Определение ИУК. ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор флуоресцентный RF-350 (Shimadzu), Em-350 нм, Ex-280 нм, колонка Lichrosorb RP-18, 6 мкм, 4×250. Подвижная фаза – 40%-ный водный раствор метанола, скорость потока 0,8 мл/мин, время удерживания – 6 мин. Идентификация ИУК проводилась сравнением времени удерживания синтетической ИУК (Sigma) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация ИУК составила 5,0 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Определение АБК. ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор ультрафиолетовый (модель ВТ 3030), длина волны 254 нм, колонка Lichrosorb RP-18, 6 мкм, 4×250. Подвижная фаза – 40%-ный водный раствор метанола, скорость потока 0,5 мл/мин, время удерживания АБК – 10 мин. Идентификация АБК проводилась сравнением времени удерживания синтетической АБК (Calbiochem) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация АБК составила 7,5 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Определение цитокининов. ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор ультрафиолетовый (модель ВТ 3030), длина волны 268 нм, колонка Lichrosorb RP-18, 6 мкм, 4×250. Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–уксусная кислота (V/V – 55:44:1), скорость потока 0,8 мл/мин, время удерживания – 15 мин. Идентификация зеатина проводилась сравнением времени удерживания синтетического зеатина (Calbiochem) с природным. Минимальная регистрируемая концентрация зеатина составила 20,0 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Определение гиббереллинов. Определение биологической активности гиббереллинов проводили по росту гипокотилей салата сорта Берлинский. Количественно гиббереллины определяли по калибровочной кривой, для построения которой использовали гибберелловую кислоту (Россия).

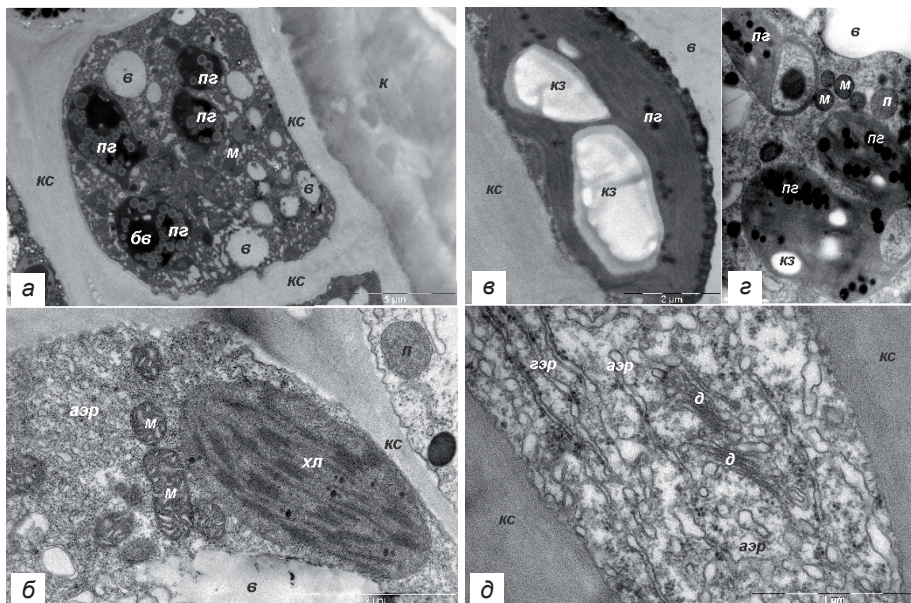


Рис. 1. Фрагменты клеток наружной зоны плода яблони сорта Ренет Симиренко, произрастающей в степной (а–в) и горной (г, д) зонах на стадии съемной зрелости: а – эпидерма (хромопласты, вакуоль); б – гиподерма (хлоропласт, митохондрии, агранулярный ЭР, вакуоль); в – паренхима (амилопласты); г, д – гиподерма (хлоропласты, пероксисомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи).
 Обозначения: азр – агранулярный эндоплазматический ретикулум; бв – белковые включения; в – вакуоль; гэр – гранулярный эндоплазматический ретикулум; д – диктиосома; кз – крахмальное зерно; кс – клеточная стенка; к – кутикула; м – митохондрия; п – пероксисома; пг – пластоглобулы, хл – хлоропласт

Результаты и обсуждение

Ультраструктура клеток околоплодника яблони на стадии съемной зрелости и при старении

По данным электронно-микроскопических исследований, в околоплоднике яблони на стадии созревания (съемная зрелость) выявляются две топографические зоны: наружная (эпидерма и гиподерма), составленная из более мелких толстостенных клеток, и крупноклеточная паренхимная, занимающая большую сочную часть плода, граничащая с хрящевидным эндокарпием.

В равнинных (степных) условиях клетки околоплодника имеют хорошо развитую ультраструктуру: мощный пластидом, хондриом, эндоплазматический ретикулум, многочисленные рибосомы в виде полисом и др. (рис. 1, а–в).

Популяция пластидов представлены тремя типами: в эпидерме – хромопластами, гиподерме – хлоропластами гранальной структуры, паренхиме – амилопластами со сложными крахмальными зернами (1–2 на срез). В тилакоидах хлоропластов часто внутренние пространства заняты электронно-плотным материалом, свидетельствующим об их участии в синтетических процессах.

Митохондрии многочисленные, с хорошо развитыми кристами и умеренно плотным матриксом.

Выраженная особенность клеток эпидермы и гиподермы – преимущественное развитие агранулярного эндоплазматического ретикулума (АЭР) везикулярного типа (рис. 1). Вакуоли в клетках эпидермы небольшие, одиночные, разбросаны по всей цитоплазме. Гиподерма содержит центральную и несколько цитоплазматических вакуолей разных размеров, много рибосом, часто образующих скопления – полисомы. Для клеток паренхимной части околоплодника характерна хорошо развитая вакуолярная система.

Клетки плодов, выращенных в горных (лесо-горной и горно-степной) условиях, отличаются от равнинных сильно развитым полярным ЭР (рис. 1, з, д). Гранулярный ЭР представлен длинными цистернами, агранулярный – густой сетью извитых трубочек. Гиподерма характеризуется меньшей вакуолизацией и большей насыщенностью органеллами, в частности пластидами, митохондриями и пероксисомами, образующими часто скопления «триады», а также межмембранные контакты. При этом в хлоропластах клеток гиподермы кардинально перестраивается мембранная система, грани состоят из меньшего числа тилакоидов, наблюдается уплотнение стромы, формирование инвагинаций, изменение формы и, как следствие, увеличение их размеров за счет площади стромы (рис. 1, з). Аппарат Гольджи (1–2 на срез) активный.

По данным авторов статьи, независимо от высоты произрастания деревьев (300, 600, 1200 м) внешний вид их плодов и ультраструктура клеток околоплодника

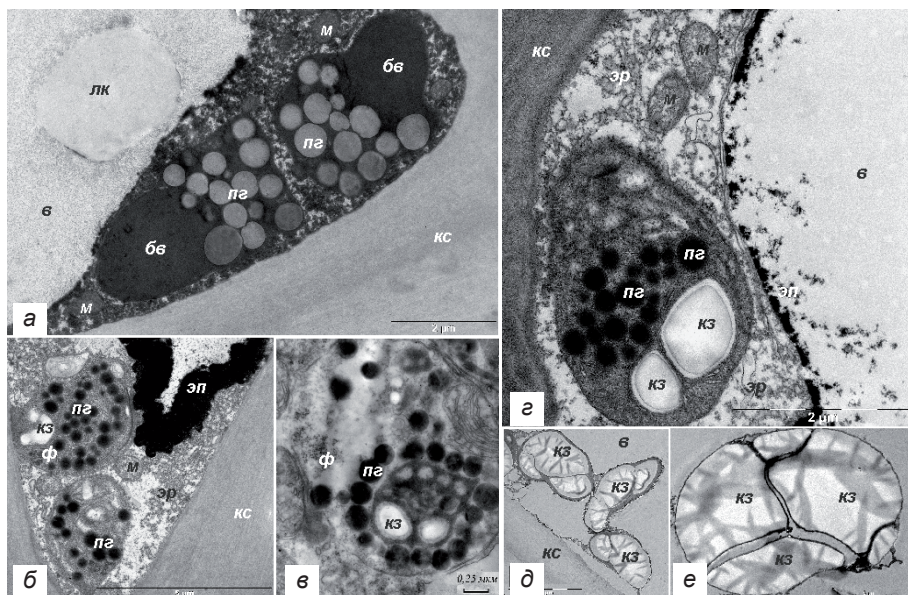


Рис. 2. Фрагменты клеток наружной зоны (а – эпидерма, б–г – гиподерма) и паренхимной части (д, е) плода яблони сорта Ренет Симиренко в ходе старения (б (а, б) и 8 месяцев (в–е) хранения).

Обозначения: лк – липидная капля; эп – электронно-плотный материал; ф – ферритин; остальные обозначения – см. рис. 1

при хранении в течение 6 месяцев практически не изменяется, кроме вакуолизации, наиболее сильно выраженной в паренхимной части. Клетки эпидермы и гиподермы в ультраструктурном плане на этом этапе старения мало чем отличаются от таковых на стадии созревания.

На конечных этапах старения (через 8 месяцев хранения) плоды еще имеют неплохой товарный вид и хорошие вкусовые качества. Но на ультраструктурном уровне отмечаются выраженные изменения, которые состоят главным образом в усилении вакуолизации клеток – из цистерн ЭР в результате автолиза сформировались крупные центральные вакуоли, в постенном слое цитоплазмы исчезают рибосомы, а также элементы эндомембранной системы. Судя по микрографиям ТЭМ во всех тканях околоплодника происходит опережающее старение пластид: в эпидерме хромопласты с многочисленными пластоглобулами и крупными аморфными белковыми включениями, гиподерме – хлоропласты с расширенными тилакоидами и фрагментированной наружной оболочкой, паренхиме – крахмальные зерна утилизируются (рис. 2, в–е). На более продвинутых стадиях старения в некоторых хлоропластах полностью разрушается тилакоидная система, они набухают, имеют локальные разрывы мембран оболочки и преобладающим их компонентом являются электронно-плотные образования – пластоглобулы (рис. 2, в). Накопление пластоглобул в стромах пластид не всегда является индикатором старения, так как они обнаружены и описаны авторами статьи у молодых плодов в ходе созревания [9, 10]. Как известно, материал пластоглобул служит запасным пулом липидов, поэтому заполнение полости хлоропластов

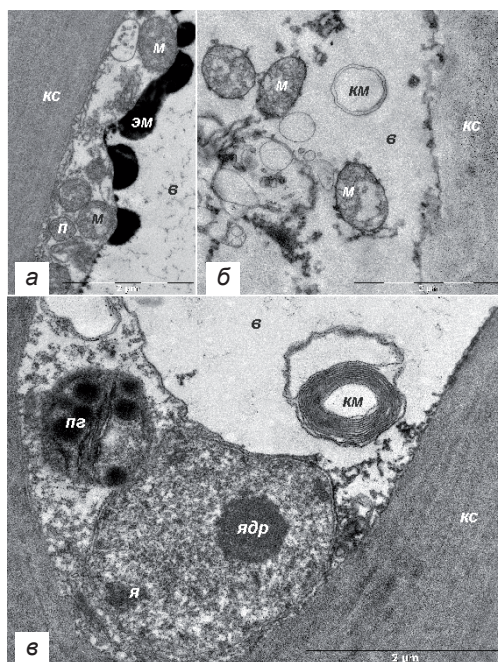


Рис. 3. Фрагменты клеток наружной зоны плода яблоки сорта Ренет Симиренко на последних этапах старения: а, б – митохондрии; в – ядро, пластида, вакуоль.

Обозначения: км – концентрические мембранные структуры; я – ядро; ядр – ядрышко; остальные обозначения – см. рис. 1, 3

пластоглобулами, вероятно, обусловлено разрушением мембран тилакоидной системы, происходящем в процессе старения плодов.

Если на начальных стадиях старения митохондрии имели типичное строение, то на более продвинутых их матрикс просветлен, значительно уменьшились кристы (рис. 2, *а*, *б*, рис. 3). Большинство из них перемещаются к клеточной стенке и занимают постенное положение в узком слое цитоплазмы, либо они свободно лежат в сильно обводненной ее части. Пероксисомы тоже набухают, теряют ровные очертания мембран оболочки. Форма ядра практически не изменяется, и ядрышки присутствуют довольно длительное время (рис. 3, *а*).

Особенностью горных плодов как на стадии созревания, так и при хранении является накопление в вакуолях клеток эпидермы и гиподермы электронно-плотного материала разной конфигурации (рис. 2, *б*, *г*, рис. 3, *а*), вероятно, фенольной природы и крупных липидных глобул в цитоплазме (рис. 2, *а*).

В ходе старения цистерны ЭР расширяются, фрагментируются и, сливаясь, образуют крупные центральные и новые цитоплазматические вакуоли разных размеров (рис. 2, *г*, рис. 3). При этом ЭР часто образует концентрические мембранные структуры, которые также формируются из тонопласта вакуоли (рис. 3 *б*, *в*). В цитоплазме значительно меньше рибосом (в виде полисом). Заметно изменяется морфология диктиосом аппарата Гольджи, которые также участвуют в образовании вакуолей.

Гормональный статус клеток околоплодника яблони на стадии съемной зрелости и при старении

По данным авторов статьи, плоды яблони на стадии съемной зрелости характеризуются особым гормональным статусом, который изменяется для каждого из исследуемых фитогормонов в процессе старения индивидуальным образом (см. таблицу).

Общий гормональный статус плодов яблони

Высота над уровнем моря, м	Фитогормоны, нг/г сырой массы							
	ИУК		АБК		цитокинины		ГК	
	зрелый	старение	зрелый	старение	зрелый	старение	зрелый	старение
300	–	10,3*	159,1	188,9	1436,0	1116,6*	43,7	96,9*
600	–	16,1*	241,3	258,9	710,4	335,5*	58,3	44,2
1200	4,1	11,3*	124,1	161,4	622,6	354,6*	103,3	31,7*

Примечания: 1. Увеличение и снижение количества фитогормонов после хранения обозначено звездочкой *. 2. Приведены средние значения из 3 биологических и 3–5 аналитических повторностей.

При этом соотношение фитогормонов ИУК, ГК, АБК и цитокининов специфично для каждой ткани, зависит от условий произрастания плодовых деревьев (рис. 4, *а*) и изменяется при старении (рис. 4, *б*).

ИУК. На стадии съемной зрелости в небольшом количестве фитогормон ИУК детектируется в клетках наружной зоны (эпидерма и гиподерма) и паренхимной части плодов, выращенных на высоте 1200 м, в отличие от плодов, собранных с более низких высот (в которых количество индолилуксусной кислоты ниже значений, измеряемых прибором). В ходе хранения плодов количество ИУК увеличивается во всех образцах, собранных на любой высоте (табл. 1). Причем увеличение происходит как за счет повышения содержания в наружной зоне, так и паренхимной части око-

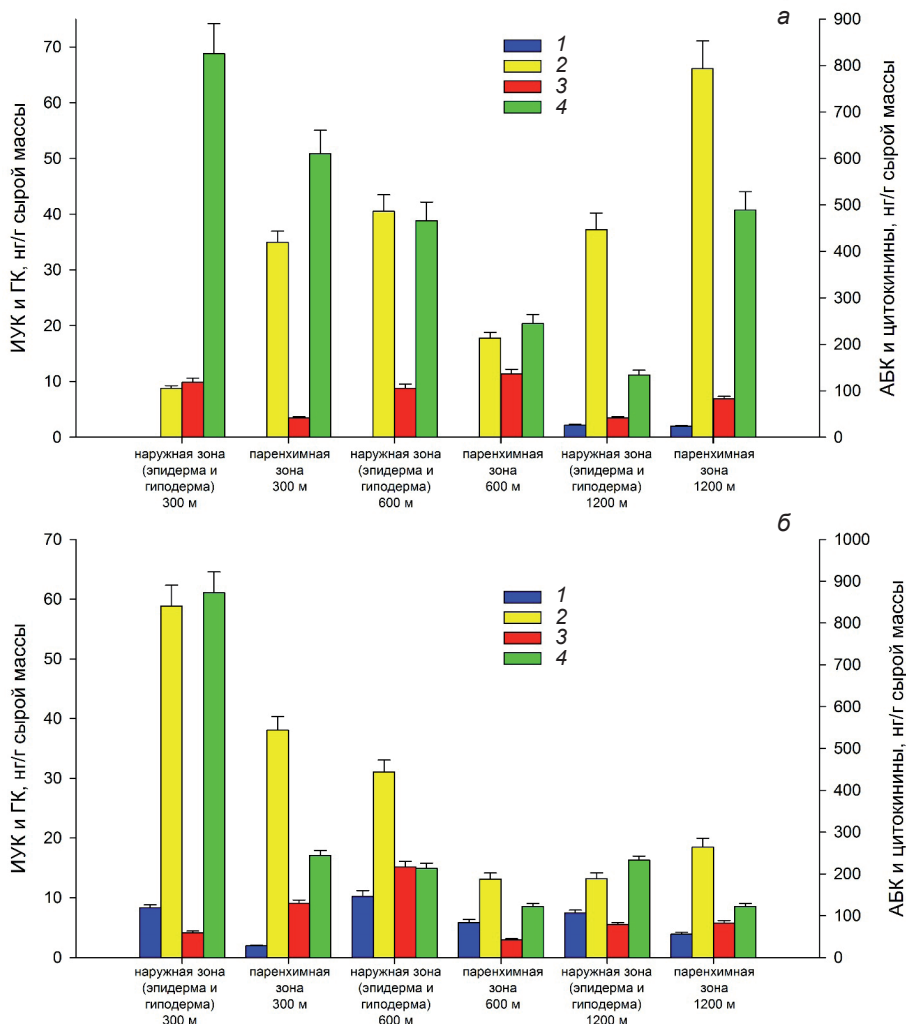


Рис. 4. Содержание фитогормонов в клетках наружной (эпидерма и гиподерма) и паренхимной зоны плодов яблони, произрастающих на разных высотах (300, 600, 1200 м) над уровнем моря на стадии съемной зрелости (а) и в процессе старения (б) (приведены средние значения из 3 биологических и 3–5 аналитических повторностей и их стандартные отклонения): 1 – ИУК; 2 – ГК; 3 – АБК; 4 – цитокинины

лоплодника (рис. 4, а, б). Значительное повышение содержания ИУК в ходе старения наблюдается в плодах, собранных на высоте 600 м. К концу хранения плодов, произраставших на высотах 300 и 1200 м, ее уровень достигает практически одинаковых абсолютных значений.

Изменение уровня ИУК в плодах носит различный характер для разных высот: на 300 м количество гормона увеличивается более чем в 10 раз, в то время как на 1200 м всего в 3 раза. Очень низкое содержание ИУК во всех тканях околоплодника на высотах 300 и 600 м, вероятно, связано с инактивацией физиологических процессов, при

которых плоды прекращают трату энергии на рост и перенаправляют ее на активацию защитных систем.

Следует отметить, что на всех высотах произрастания плодовых растений в клетках околоплодника при хранении, особенно в эпидерме и гиподерме, наблюдается постепенное повышение содержания ИУК (рис. 4, б). Такая закономерность может быть связана с усилением дыхания. У яблок наиболее интенсивное дыхание отмечается в первые дни после отделения от материнского растения. Затем интенсивность дыхания постепенно снижается, наступает состояние покоя, а к концу хранения – вновь возрастает [17]. Под влиянием ИУК в клетках околоплодника активируются дыхательные ферменты, в частности аскорбиноксидаза, что приводит к повышению интенсивности дыхания в целом. За счет ИУК увеличивается и количество АТФ, так как он усиливает сопряжение окисления и фосфорилирования. В присутствии ауксина увеличивается активность не только дыхательных, но и гидролитических ферментов (карбогидраз, пептидаз, эстераз), что приводит к превращению запасных веществ в водорастворимые и легко транспортируемые вещества [13]. Результатом этого процесса является увеличение количества дыхательного субстрата (глюкозы и других веществ), что также усиливает дыхание.

Известно, что основным местом синтеза ауксина в плодах являются семена [2]. Транспортируясь из семян в растущие ткани, ИУК отвечает за рост плодов. Отмеченное наибольшее количество ауксина в клетках плодов, выращенных на высоте 1200 м, до хранения может быть связано с суровыми условиями произрастания и необходимостью дополнительной стимуляции для роста плода. В процессе старения (после 8 месяцев хранения) наблюдается повышение содержания ИУК во всех плодах, что, вероятно, обусловлено подготовкой к выходу или выходом семян из состояния покоя. Ауксин участвует в процессе прорастания семян, и поэтому после длительного хранения плодов необходимо повышение концентрации ИУК для индуцирования ростовых процессов при низких температурах. Кроме того, известно, что фитогормоны, обуславливающие ростовые процессы, проявляются опосредованно через пересечение их сигнальных путей. Поэтому повышение содержания ИУК может быть связано и с изменением ГК статуса в клетках плодов, который непосредственно связан с контролем прорастания семян.

АБК. На стадии съемной зрелости, то есть перед заложением на хранение, содержание фитогормона АБК во всех тканях околоплодника различно. Кроме того, оно также зависит от высоты над уровнем моря, на которой произрастали плоды. По данным авторов статьи, в условиях степной зоны (300 м) содержание АБК выше в наружных тканях – эпидерме и гиподерме, граничащих непосредственно с внешней средой. Уровень АБК в клетках паренхимной части довольно низкий (рис. 4).

По своим климатическим характеристикам степная зона довольно засушливая, здесь в течение вегетационного периода создаются стрессовые ситуации, в частности продолжительные суховеи (70 дней). АБК – как стрессовый гормон, вероятно, запускает каскад ответных реакций на неблагоприятные условия, особенно на высокую температуру и недостаточную влажность [18]. Известно, что при водном дефиците синтез АБК активизируется, что служит растению сигналом к снижению транспирации. В проведенных авторами исследованиях, накопление АБК в клетках эпидермы в условиях низкой влагообеспеченности, вероятно, способствует уменьшению не только устьичной транспирации, но и кутикулярной, характерной плодам яблони. Сравнительно высокое содержание АБК во всех тканях плодов наблюдается на высоте 600 м, что также обусловлено условиями данной зоны. Низкий уровень АБК характерен для клеток наружной зоны плодов, выращенных в горной зоне на высоте 1200 м (рис. 4, а). Данная зона

специфическая, она характеризуется высокой инсоляцией и пониженной температурой, сопровождающейся резкими суточными перепадами. Наряду с макроклиматическими, здесь создаются и специфические микроклиматические условия, поскольку яблоневые насаждения расположены в межсклонных долинах и пологих южных склонах, пересекающихся горными реками. В этих суровых условиях рост клеток околоплодника значительно угнетен, он мелкоклеточный, толстостенный [8]. Если учесть, что АБК не только стрессовый гормон, но и ингибитор роста, то можно предположить, что в клетках околоплодника еще продолжается интенсивный синтез фитогормонов-стимуляторов, тогда как синтез абсцизовой кислоты замедлен.

При анализе распределения АБК по тканям околоплодника видно, что к концу хранения уровень фитогормона в наружной зоне плодов, выращенных на высоте в 600 м довольно высокий, а в паренхиме – сочной части, наоборот, резко падает (рис. 4). Такая особенность, по-видимому, связана с анатомией околоплодника. Плоды, выращенные на высоте 600 м, имеют более толстую кутикулу, чем на 300- и 1200-метровой. Клетки эпидермы этих плодов, возможно, интенсивнее теряют тургор, что обусловлено также кутикулярной транспирацией. Однако общее количество АБК достоверно не изменяется в процессе старения в плодах, собранных с разных высот (см. таблицу). Исходя из этого предполагается, что в плодах яблони АБК принадлежит двойная функция. Это, во-первых, уже ранее отмеченная адаптация к различным абиотическим стрессам, во-вторых, – ингибирование прорастания семян в период покоя [11].

Как представляется, именно из-за такого постоянного уровня АБК яблоки пре-красно хранятся, не теряют товарных и вкусовых качеств. Вместе с тем, при старении отмечен транспорт АБК к клеткам наружной зоны плода, что, вероятно, связано с антагонистическим характером действия АБК и ИУК, и на фоне роста ИУК при подготовке семян к прорастанию и выхода из состояния покоя после длительного периода хранения (более 6 месяцев хранения).

Цитокинины на стадии съемной зрелости характеризуются высоким содержанием во всех тканях околоплодника и на всех высотах произрастания плодовых деревьев (рис. 4, а). Наибольшее количество цитокининов содержится в плодах, собранных на высоте 300 м (см. таблицу). На высотах 600 и 1200 м количество цитокининов в клетках околоплодника практически равное. Такая закономерность, скорее всего, обусловлена ультраструктурными особенностями клеток плодов яблони, прежде всего формированием высокоразвитого полярного эндоплазматического ретикулума (АЭР и ГЭР). Рецепторы цитокинина, согласно последним молекулярным исследованиям, локализируются главным образом в сети эндоплазматического ретикулума (ЭР), при этом лиганд-связывающий модуль рецептора направлен именно в люмен ЭР [14, 23].

Количество цитокининов снижалось в процессе старения в плодах, собранных с разных высот. В клетках плодов, выращенных на высоте 300 м, снижение уровня цитокининов происходит за счет уменьшения фитогормона в паренхиме, на 600 м – как в паренхиме, так и в наружной зоне, на 1200 м – в паренхиме околоплодника на фоне некоторого повышения в их наружной зоне (рис. 4, б). По некоторым данным, цитокинины задерживают старение листьев, усиливают все виды РНК и их трансляцию, активируя РНК-полимеразу, а также задерживают распад хлорофилла, усиливают его синтез и восстановление мембран хлоропластов [5, 6]. Кроме того, цитокинины обладают высокой аттрагирующей способностью, они притягивают ассимиляты (аминокислоты, углеводы) и регуляторные вещества к клеткам и тканям. Таким образом, падение содержания цитокининов в процессе старения как раз и может быть обусловлено поддержанием сохранности внутриклеточных структур и, как следствие, товарного вида плодов.

Кроме того, известно, что цитокинины часто проявляют антагонистические функции с ИУК и гиббереллинами [11]. Поскольку количество последних возрастает, то вероятно, что снижение концентрации цитокининов также может быть связано с подготовкой выхода семян из покоя и обусловлено синтезом ИУК после длительного (8 месяцев) периода хранения.

ГК. Изменение содержания ГК в процессе хранения плодов носит высотную зависимость. Так, для плодов, собранных на высоте 300 м, в процессе старения характерно двукратное увеличение содержания ГК, для тех, что произрастали на 600-метровой отметке над уровнем моря, количество фитогормона достоверно не изменялось, а для плодов с высоты 1200 м наблюдается более чем трехкратное падение содержания данного фитогормона (см. таблицу). При старении в плодах, собранных с высоты 300 м, изменение количества ГК происходило за счет повышения ее в наружных зонах околоплодника. Снижение уровня ГК в горных (1200 м) плодах происходило как в наружных слоях, так и в паренхиме (рис. 4). Абсолютное наибольшее количество ГК содержалось в яблоках, снятых с высоты 1200 м, где, вероятно, продолжают ростовые процессы путем растяжения, однако в процессе хранения оно уменьшалось до уровня ниже, чем в плодах до закладки на хранение с 300 м. Как известно, местом синтеза ГК являются пластиды [1].

Такие специфические изменения содержания ГК в тканях околоплодника при старении могут быть связаны с физиологическим состоянием этих органелл. Вероятно, в клетках околоплодника ГК выполняет одну из присущих ей функций, а именно контроль прорастания семян [21, 24]. Предполагается, что ГК действует совместно с ИУК на фоне повышения концентрации последней. Однако в отличие от повышения концентрации ИУК на всех высотах, в процессе старения уровень ГК меняется по-разному. Так, на самой низкой высоте (300 м) произрастания плодовых деревьев концентрация ГК возрастает, при этом на 600 м – ее уровень не изменяется, а в плодах с 1200-метровой высоты, напротив, падает (см. таблицу).

Следует отметить, что у плодов с самой высокой точки (1200 м) начальный уровень ГК был более чем в два раза выше, чем на 300 и 600 м. Учитывая, что гиббереллины – это основной гормон, регулирующий переход к цветению, возможно, такое изначально высокое ее количество связано со сложными условиями произрастания в горах, особенно высоким УФ-индексом, что, вероятно, требует постоянно высокого содержания ГК в тканях этих растений, необходимой для нормальной жизнедеятельности (особенно цветения и оплодотворения, а затем и плодоношения).

Важно отметить, что в выполненных авторами исследованиях в плодах отмечено повышенное содержание двух фитогормонов – АБК и, особенно, цитокининов, как на стадии съемной зрелости (созревания), так и на этапах послеуборочного хранения, то есть при старении. Наряду с этим, клетки свежесобранных и хранящихся плодов характеризуются высококоразвитым эндоплазматическим ретикуломом. Полученные материалы коррелируются с последними молекулярными данными, что рецепторы цитокинина локализуются в сети эндоплазматического ретикулума, при этом лиганд-связывающий модуль рецептора направлен в люмен [23]. Что касается высокого содержания АБК – гормона, ответственного за индукцию и поддержание покоя семян [3], то вероятно, это связано с формированием в клетках околоплодника высококоразвитого АЭР, характерного терпеноидогенным клеткам. В химическом отношении АБК относится к сексвитерпенам, синтез которых происходит именно в агранулярном ретикулуме [3, 25].

Таким образом, анализируя литературные данные и полученные авторами результаты исследований, можно предположить, что в клетках стареющих плодов яблони ре-

ализуется физиологическая программа, регулируемая сложными пересечениями путей передачи гормональных сигналов. Цитологическими маркерами старения могут быть пластиды и ЭР, эти органеллы не только принимают и координируют сигналы, запускающие механизм старения, но и сами их вырабатывают. Результаты выполненного исследования могут быть использованы для разработки методологических подходов при высотном возделывании плодовых культур, в частности, гормонального регулирования созревания урожая в суровых горных районах, а также сохранения товарных качеств яблок при хранении. Учитывая протекторные функции фитогормонов, в дальнейшем могут быть разработаны методы регулирования механизмов старения растительных клеток, связанных с нарушением их ультраструктурной организации.

Благодарности

Авторы выражают признательность научному сотруднику отдела физико-химических методов исследования ИФР РАН им. К.А. Тимирязева Александру Сергеевичу Воронкову за ценные замечания и оказанную помощь при написании раздела, посвященного фитогормонам.

Библиографический список

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В. и др. Физиология растений. М.: Академия, 2005. 620 с.
2. Галактионов С.Г. Биологически активные. М.: Молодая гвардия, 1988. 272 с.
3. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 2. С. 244–254.
4. Зубо Я.О., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К. и др. Цитокинины активируют транскрипцию хлоропластных генов // Доклады Академии наук. 2005. Т. 400. № 3. С. 48–51.
5. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений в 2 т. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Юрайт, 2016. Т. 1. 437 с.
6. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функция. М.: Наука, 1973. 263 с.
7. Кумахова Т.Х., Меликян А.П. Ультраструктура кутикулы плодов сортов *Malus domestica* (Rosaceae) // Ботанический журнал. 1989. Т. 74. № 3. С. 328–332.
8. Кумахова Т.Х. Особенности ультраструктуры клеток плодов *Malus domestica* (Rosaceae) // Ботанический журнал. 1992. Т. 77. № 2. С. 25–32.
9. Кумахова Т.Х. Некоторые особенности анатомии плодов *Malus domestica* (Rosaceae) в зависимости от высоты культивирования в горах // Ботанический журнал. 2003. Т. 88. № 6. С. 75–84.
10. Кумахова Т.Х. Ультраструктурные изменения в клетках листа и плода *Malus domestica* (Rosaceae) в ходе старения // Известия ТСХА. 2012. Вып. 6. С. 40–54.
11. Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2011. 432 с.
12. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Кораблева Н.П. Биохимия иммунитета, покоя, старения растений. М.: Наука, 1984. 254 с.
13. Медведев С.С. Физиология растений. СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2004. 336 с.
14. Новикова Г.В., Степанченко Н.С., Носов А.В., Мошков И.Е. В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 6. С. 806–823.

15. *Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н.* Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // *Агрехимия*. 1999. № 8. С. 49–53.
16. *Стрелер Б.* Время, клетки и старение. М.: Мир, 1964. 251 с.
17. *Bona C.A., Revillard J.-P.* Cytokines and cytokine receptors // *Physiology and pathological disorders*. Harwood academic publishers, 2000. 581 p.
18. *Chandler P.M., Robertson M.* Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994. Vol. 45. P. 113–141.
19. *Cleland R.E.* Auxin-induced growth of *Avena* coleoptiles involves two mechanism with different pH optima // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. No. 4. P. 1556–1561.
20. *Davies J., Davies D.* Origins and evolution of antibiotic resistance // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010. Vol. 74. No. 3. P. 417–433.
21. *Karssen C.M., Zagorski S., Kepczynski J., Groot S.P.C.* Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination // *Ann Bot.* 1989. Vol. 63. No. 1. P. 71–80.
22. *Lieberman M.* Biosynthesis and action of ethylene // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1979. Vol. 30. P. 533–591.
23. *Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Arkhipov D.V., Osolodkin D.I., Schmulling T., Romanov G.A.* Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands // *J. Experimental Botany*. 2015. Vol. 66. No. 7. P. 1851–1863.
24. *Singh D.P., Jermakow A.M., Swain S.M.* Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2002. Vol. 14. P. 3133–3147.
25. *Vassilyev A.E.* Quantitative ultrastructural data of secretory duct epithelial cells in *Rhus toxicodendron*. Lnt. // *J. Plant Sci.* 2000. Vol. 161. P. 615–630.

CORRELATIONS OF ULTRASTRUCTURAL CHANGES
AND HORMONAL STATUS IN THE CELLS OF *MALUS DOMESTICA*
(*ROSACEAE*) PERICARP DURING STALING

T.KH. KUMAKHOVA, I.V. SKOROBOGATOVA

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

The authors have studied ultrastructural characteristics and a hormonal status of the cells of apple fruits at a picking stage maturity and in staling. It has been shown that at the initial stages of storage, pericarp cells have a well-developed system of plastids, mitochondria, polar endoplasmic reticulum, numerous ribosomes, etc. A pronounced feature of the cells in outer zones (epidermis and hypodermis) is the predominant development of an agranular endoplasmic reticulum.

When fruit are stored for 6 months, the ultrastructure of pericarp cells remains practically unchanged (except vacuolation). It has been established that the signs of cell membrane degradation are observed after 8 months, all the pericarp tissues featuring advanced aging of plastids. Chromoplasts in epidermis are filled with plastoglobuli, in hypodermis there can be found some chloroplasts with enhanced telecode and fragmented outer sheath, and in parenchyma, complex

starch grains in amyloplasts gradually disintegrate. Mitochondria, unlike other organelles, retain a well-developed ultrastructure and high activity some time longer, but in some cells of the wheat plant's part of a pericarp their enlightened matrix and sheath have laceration.

Along with a well-developed ultrastructure, the pericarp cells of picking maturity are characterized by a particular hormonal status, in which the ratio of phytohormones – indoleacetic acid (IAA), gibberellic acid (GA), abscisic acid (ABA) and cytokinin is specific for each tissue and depends on the growing conditions of fruit trees. A change in the balance of phytohormones that is observed in the fruit aging process (6–8 months of storage) can be possibly connected with their redistribution from one tissue to others, or «de novo» synthesis, or degradation. However, there is a high content of phytohormones, ABA and cytokinin at the stage of picking maturity, and at the last stages of the fruit staling. It can be assumed that the damaged integrity of membranes leading to degradation of cellular structure detected in cells of long-stored fruit is of a hormonal nature.

Key words: hormonal status, mitochondria, plastids, endoplasmic reticulum, apple.

References

1. Alekhina N.D., Balnokin Yu.V. i dr. Fiziologiya rasteniy [Plant physiology]. M.: Akademiya, 2005. 620 p.
2. Galaktionov S.G. Biologicheski aktivnyye [The biologically active]. M.: Molodaya gvardiya. 1988. 272 p.
3. Goodwin T., Mercer E. Vvedeniye v biokhimiyu rasteniy [Introduction to plant biochemistry]. M.: Mir, 1986. Vol. 2. P. 244–254.
4. Zubo Ya.O., Selivankina S.Yu., Zubkova N.K. i dr. Tsitokininy aktiviruyut transkriptsiiyu khloroplastnykh genov [Cytokinins activate the transcription of chloroplast genes] // Doklady Akademii nauk. 2005. Vol. 400. No. 3. P. 48–51.
5. Kuznetsov V.V., Dmitriyeva G.A. Fiziologiya rasteniy v 2 t. [Plant physiology in two volumes]. 4th ed., rev. and add. M.: Yurayt, 2016. Vol. 1. 437 p.
6. Kulayeva O.N. Tsitokininy, ikh struktura i funktsiya [Cytokinins, their structure and function]. M.: Nauka, 1973. 263 p.
7. Kumakhova T.Kh., Melikyan A.P. Ultrastruktura kutikuly plodov sortov *Malus domestica* (Rosaceae) [Ultrastructure of fruits cuticle of *Malus domestica* (Rosaceae) varieties] // Botanicheskiy zhurnal, 1989. Vol. 74. No. 3. P. 328–332.
8. Kumakhova T.Kh. Osobennosti ultrastrukturnykh kletok plodov *Malus domestica* (Rosaceae) [Characteristic features of the ultrastructure of *Malus domestica* (Rosaceae) fruit cells] // Botanicheskiy zhurnal. 1992. Vol. 77. No. 2. P. 25–32.
9. Kumakhova T.Kh. Nekotoryye osobennosti anatomii plodov *Malus domestica* (Rosaceae) v zavisimosti ot vysoty kul'tivirovaniya v gorakh [Some features of the anatomy of *Malus domestica* fruits (Rosaceae) depending on the cultivation height in the mountains] // Botanicheskiy zhurnal. 2003. Vol. 88. No. 6. P. 75–84.
10. Kumakhova T.Kh. Ultrastrukturnyye izmeneniya v kletkakh lista i ploda *Malus domestica* (Rosaceae) v khode stareniya [Ultrastructural changes in *Malus domestica* (Rosaceae) leaf and fetal cells during aging] // Izvestiya TSKhA. 2012. Issue 6. P. 40–54.
11. Lutova L.A., Yezhova T.A., Dodyeva I.Ye., Osipova M.A. Genetika razvitiya rasteniy [Genetics of plant development]. SPb.: Izd-vo N-L, 2011. 432 p.
12. Metlitskiy L.V., Ozeretskoyevskaya O.L., Korableva N.P. Biokhimiya immuniteta, pokoya, stareniya rasteniy [Biochemistry of immunity, rest, and aging of plants]. M.: Nauka, 1984. 254 p.

13. *Medvedev S.S.* Fiziologiya rasteniy [Plant physiology]. SPb.: Izd-vo S.-Peterburgskogo un-ta, 2004. 336 p.

14. *Novikova G.V., Stepanchenko N.S., Nosov A.V., Moshkov I.Ye.* V nachale puti: vospriyatiye ABK i peredacha yeyo signala u rasteniy [At the beginning of a path: the perception of ABA and the transmission of its signal in plants] // Fiziologiya rasteniy. 2009. Vol. 56. No. 6. P. 806–823.

15. *Skorobogatova I.V., Zakharova Ye.V., Karsunkina N.P., Kurapov P.B., Sorkina G.L., Kislin Ye.N.* Izmeneniye soderzhaniya fitogormonov v prorostkakh yachmenya v ontogeneze i pri vnesenii regulyatorov, stimuliruyushchikh rost [Change in the content of phytohormones in barley seedlings in ontogenesis and in introducing growth-stimulating regulators. Agrochemistry] // Agrokimiya. 1999. No. 8. P. 49–53.

16. *Streler B.* Vremya, kletki i stareniye [Time, cells and aging]. M.: Mir, 1964. 251 p.

17. *Bona C.A., Revillard J.-P.* Cytokines and cytokine receptors // Physiology and pathological disorders. Harwood academic publishers, 2000. 581 p.

18. *Chandler P.M., Robertson M.* Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 45. P. 113–141.

19. *Cleland R.E.* Auxin-induced growth of *Avena* coleoptiles involves two mechanism with different pH optima // Plant Physiol. 1992. Vol. 99. No. 4. P. 1556–1561.

20. *Davies J., Davies D.* Origins and evolution of antibiotic resistance // Microbiol Mol Biol Rev. 2010. Vol. 74. No. 3. P. 417–433.

21. *Karssen C.M., Zagorski S., Kepczynski J., Groot S.P.C.* Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination // Ann Bot. 1989. Vol. 63. No. 1. P. 71–80.

22. *Lieberman M.* Biosynthesis and action of ethylene // Ann. Rev. Plant Physiol. 1979. Vol. 30. P. 533–591.

23. *Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Arkhipov D.V., Osolodkin D.I., Schmulling T., Romanov G.A.* Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands // J. Experimental Botany. 2015. Vol. 66. No. 7. P. 1851–1863.

24. *Singh D.P., Jermakow A.M., Swain S.M.* Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis* // The Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 3133–3147.

25. *Vassilyev A.E.* Quantitative ultrastructural data of secretory duct epithelial cells in *Rhus toxicodendron*. Lnt. // J. Plant Sci. 2000. Vol. 161. P. 615–630.

Кумахова Тамара Хабаловна – к. б. н. доц. кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; тел./факс: (499) 976-04-20; e-mail: kumachova@gmail.com).

Скоробогатова Ирина Витальевна – к. б. н., ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; тел./факс: (499) 976-04-20; e-mail: irina_timacad@mail.ru).

Tamara Kh. Kumachova – PhD (Bio), Associate Professor of Botany, Plant Breeding and Seed Technology Department, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; phone: +7 (499) 976-04-20; e-mail: kumachova@gmail.com).

Irina V. Skorobogatova – PhD (Bio), Senior Researcher of Center For Molecular Biotechnology; Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; phone: +7 (499) 976-04-20; e-mail: irina_timacad@mail.ru).