

УДК 581.821: 581.47:582.734.3

УЛЫРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ ЛИСТА И ПЛОДА
MALUS DOMESTICA (ROSACEAE) В ХОДЕ СТАРЕНИЯ

Т.Х. КУМАХОВА

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Изучены ультраструктурные изменения в клетках листа и плода яблони в ходе старения. Показано, что при запуске программы старения как в листьях, так и в плодах происходят тканеспецифичные деструктивные изменения, имеющие разную динамику в деградации оргanelл. В клетках листа первые признаки деградации отмечаются в ядерном компартменте, что выражается в конденсации хроматина. Для плодов характерно опережающее старение пластид, в них накапливаются продукты деградации мембран тилакоидов — осмиофильные безмембранные образования (пластоглобулы), а в некоторых случаях и гранулы ферритина. Наряду с этим в плодах процесс старения проявляется в интенсивной вакуолизации клеток, происходящей, вероятно, за счет локального автолиза цитозоля с диктиосомами и элементами эндоплазматического ретикулума. Кроме того, на заключительном этапе старения в клетках плодов встречаются две популяции митохондрий: в одних из них происходит полная редукция системы крист и мембраны оболочки теряют целостность, а в других, так же как и в пластидах, накапливаются гранулы ферритина. Сделан вывод о том, что обнаруженные в ультраструктурном плане проявления запрограммированной гибели клеток в листьях и плодах яблони в процессе старения являются результатом реализации разных генетических программ.

Ключевые слова: апоптоз, деградация, мезофилл, митохондрия, перикарпий, пластоглобула, хлоропласт.

Проблема старения живых организмов давно интересует многих исследователей и в настоящее время исследование его механизма является одним из приоритетных направлений в современной биологии.

В изучении старения животных достигнут значительный прогресс, и многие его положения важны для понимания старения растений [21]. Относительно растений успехи в этой области значительно скромнее. Имеющиеся в литературе сведения в основном посвящены физиолого-биохимическим аспектам [8, 14, 15]. В связи с этим в последние годы активизировались исследования механизма старения растений, и уже установлено, что этот процесс, так же как у животных, сопровождается запрограммированной гибелью клеток (ЗГК), которая является обязательной на разных этапах онтогенеза и без нее невозможно их нормальное развитие [1,2,7, 16 и др.]. По мнению авторов, ключевым событием генетически детерминированной программы гибели клеток растений является деградация ядра (конденсация хроматина) и межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК, которую рассматривают как основной биохимический маркер апоптоза и ЗГК в целом. Из всех органов растений наиболее подробно изучено старение листа [3-5, 20, 22]. Однако до сих пор среди исследовате-

лей нет единого мнения о последовательности и длительности процессов деградации ядра и цитоплазмы [3, 7]. Одни авторы считают, что старение клеток листа генетически запрограммировано и происходит по апоптозному пути, другие отмечают длительное сохранение ядер в интактном состоянии, вплоть до завершающих этапов старения (до полного пожелтения листа), особенно в клетках мезофилла. Кроме того, имеются сведения, о том, что в стареющем листе хлоропласты — первые органеллы, в которых появляются деструктивные признаки, связанные с деградацией. При этом в хлоропластах листьев без видимых внешних признаков старения, прежде всего, разрушается ДНК, замедляется синтез и усиливается деградация макромолекул, но точный механизм их старения пока неизвестен.

Следует отметить, что в литературе также недостаточно сведений по ультраструктурным изменениям в клетках репродуктивных органов растений, в частности, плодов яблони на разных этапах старения [11, 13, 18, 19]. Между тем эти сведения представляют интерес не только для фундаментальной науки, но и имеют немаловажное прикладное значение в качестве основы для мониторинга сроков созревания и решения проблемы размягчения плодов при длительном хранении в промышленных условиях. Учитывая, что лежкость, которая определяется способностью впасть в состояние покоя, что тормозит старение, присуща только плодам культурных сортов яблони, они могут служить хорошим модельным объектом для изучения в этом плане.

Цель данной работы — сравнительное электронно-микроскопическое исследование клеток листа и плода яблони в ходе старения. Особое внимание в работе было уделено изучению ультраструктуры ядра, пластид, митохондрий и вакуолярной системы.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были листья и плоды разных представителей яблони домашней (*Mains domesticct* Borkh.), произрастающих в предгорьях Северного Кавказа. Клетки листа изучали на стадии зрелости и в ходе осеннего старения, начиная с темно-зеленого до желтого цвета. Для фиксации образцы вырезали из трех листьев между жилками в средней части пластинки. Клетки плодов изучали, начиная с стадии съемной зрелости и в ходе хранения (+2 °C) от 2 до 8 мес. Методика подготовки материала для исследований с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) подробно описаны нами ранее [12]. Редактирование микрофотографий и изготовление таблиц производили в программе *CorelDRAW5*.

Результаты исследования и обсуждение

1. Ультраструктура клеток зрелых и стареющих листьев яблони

В ультраструктурном плане клетки листа яблони, только что закончившего рост, имеют такое же строение, что и таковые большинства покрытосеменных растений [3-5].

Для эпидермальных клеток характерен небольшой постенный слой цитоплазмы, крупная центральная вакуоль, ядро, митохондрии, пластиды с небольшим количеством пластоглобул (рис. 1 а, б). Дцро, почти округлой или слегка удлинённой формы, занимает пристенное положение. Перинуклеарное пространство ядерной оболочки нерасширенное. Хроматин распределен по всей площади ядра почти равномерно. Дцрышко обычно одно (рис. 2 а). Но в ядерном компартменте некоторых клеток находятся слабо выраженные конденсированные участки хроматина, свиде-

тельствующие об инициации апоптоза. Популяция пластид главным образом представлена хлоропластами, которые имеют слабо развитую систему тилакоидов. В замыкающих клетках устьиц большую часть занимают электронно-плотные хлоропласты с 2-5 довольно крупными крахмальными зёрнами (рис. 1 б).

Клетки мезофилла содержат крупные центральные вакуоли и единичные липидные глобулы. Хлоропластов много, и они расположены довольно плотно в один слой вдоль клеточной стенки (рис. 1 в, г). При этом хлоропласты имеют характерную для них форму плосковыпуклой линзы, содержат 1-2 крупных крахмальных зёрна и осмиофильные безмембранные образования — пластоглобулы. Митохондрии имеют нормальное строение, но в матриксе некоторых из них присутствуют небольшие просветленные участки, образованные в результате редукции части крист. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) развит слабо. Выявляются лишь отдельные профили срезов цистерн гранулярного ЭР, несущих небольшое количество рибосом на наружной стороне мембран (рис. 1 д).

В клетках проводящего пучка находятся многочисленные митохондрии с хорошо развитой системой крист, они иногда образуют скопления. В прилегающих к ним клетках губчатого мезофилла хлоропластов мало, они имеют слабо развитую систему тилакоидов. Гранулярный ЭР развит слабо, его цистерны с редкими рибосомами расположены вдоль клеточной стенки (рис. 1 д).

Первые признаки деградации органелл отмечаются на стадии темно-зеленого листа. При этом наиболее выраженные изменения происходят в клетках мезофилла. В ядерном компартменте этих клеток образуются скопления конденсированного хроматина, что считают одним из основных признаков апоптоза. Дырочки уже деградировали (рис. 2 б). Особенностью этих клеток также является раннее формирование пузыревидных образований — автофаговых вакуолей и мультивезикулярных тел (рис. 3 а-в, д). Хлоропласты набухли, но без выраженных изменений мембранной системы (рис. 3 б, д).

В клетках желто-зеленых листьев продолжают изменяться в структуре ядра, конденсированный хроматин в них начинает постепенно смещаться к краю ядерной оболочки. Некоторые ядра с вздутиями и локальными разрывами оболочки (рис. 2 в, г). В пластидах крахмальные зёрна утилизировались, они имеют повышенную электронно-плотную строму. Другая их особенность — активное накопление материала пластоглобул, сопряженное с постепенным уменьшением числа мембран (рис. 3 в). Немногочисленные граны тилакоидов равномерно распределены по всей площади пластид, но в матриксе некоторых хлоропластов выявляются хорошо заметные в электронном микроскопе рыхлые участки (от 2 до 6), вероятно, содержащие пт ДНК (нуклеоиды). Форма и размеры хлоропластов заметно изменились, многие из них приобрели неправильную форму, но при этом сохраняется целостность внешней и внутренней мембран (рис. 3 б-д).

На заключительном этапе старения (желтые листья) основной объем клеток занимают гигантские вакуоли, на мембранах тонопласта находится небольшой слой электронно-плотного материала. Уменьшился размер ядра, его съезживание сопровождается увеличением площади конденсированного хроматина. Кроме того, значительная часть ядра лишена оболочки, но его содержимое в виде самостоятельной структуры сконцентрировано в центре сильно вакуолизированной клетки (рис. 2 д). На более продвинутых стадиях дегенерации ядра конденсированный хроматин уплотняется, становится гомогенным, а нуклеоплазма в остальных его частях — более светлой. Наряду с этими изменениями в большинстве клеток находятся окруженные электронно-плотным материалом липидные глобулы (2-5 на срез)

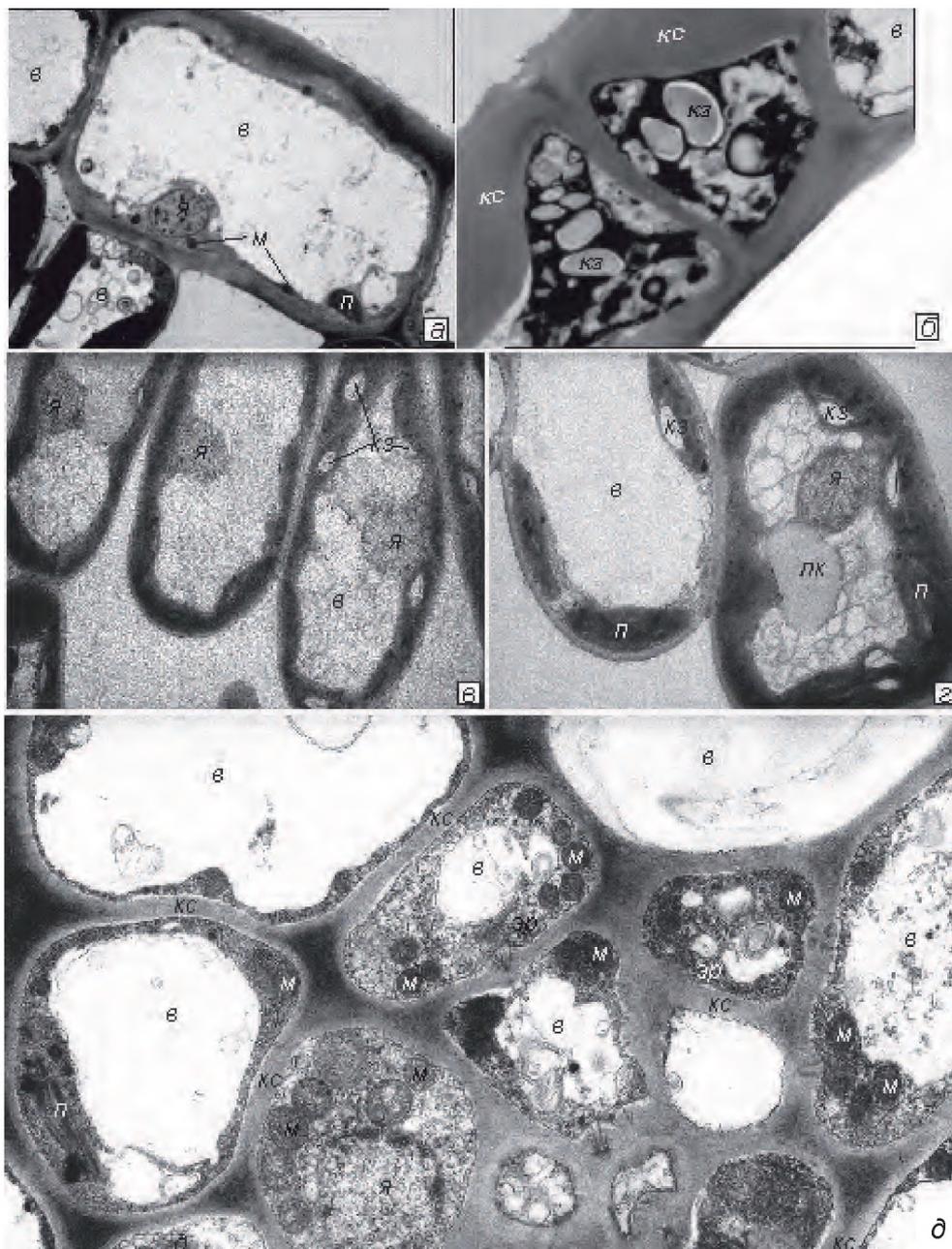


Рис. 1. Общий вид клеток зрелых листьев яблоки: а — эпидермальная клетка; б-замыкающие клетки устьица; в — клетки палисадной паренхимы; г — клетки губчатой паренхимы; д — клетки пучка и прилегающей к ним губчатой паренхимы. Обозначения: в-вакуоль, д — диктиосома, кз — крахмальное зерно, кс — клеточная стенка, лл — липидная капля, м — митохондрия, л — пластида, эр — эндоплазматический ретикулум, я — ядро. Увеличения: а-б — 4000х; в-д — 4000х

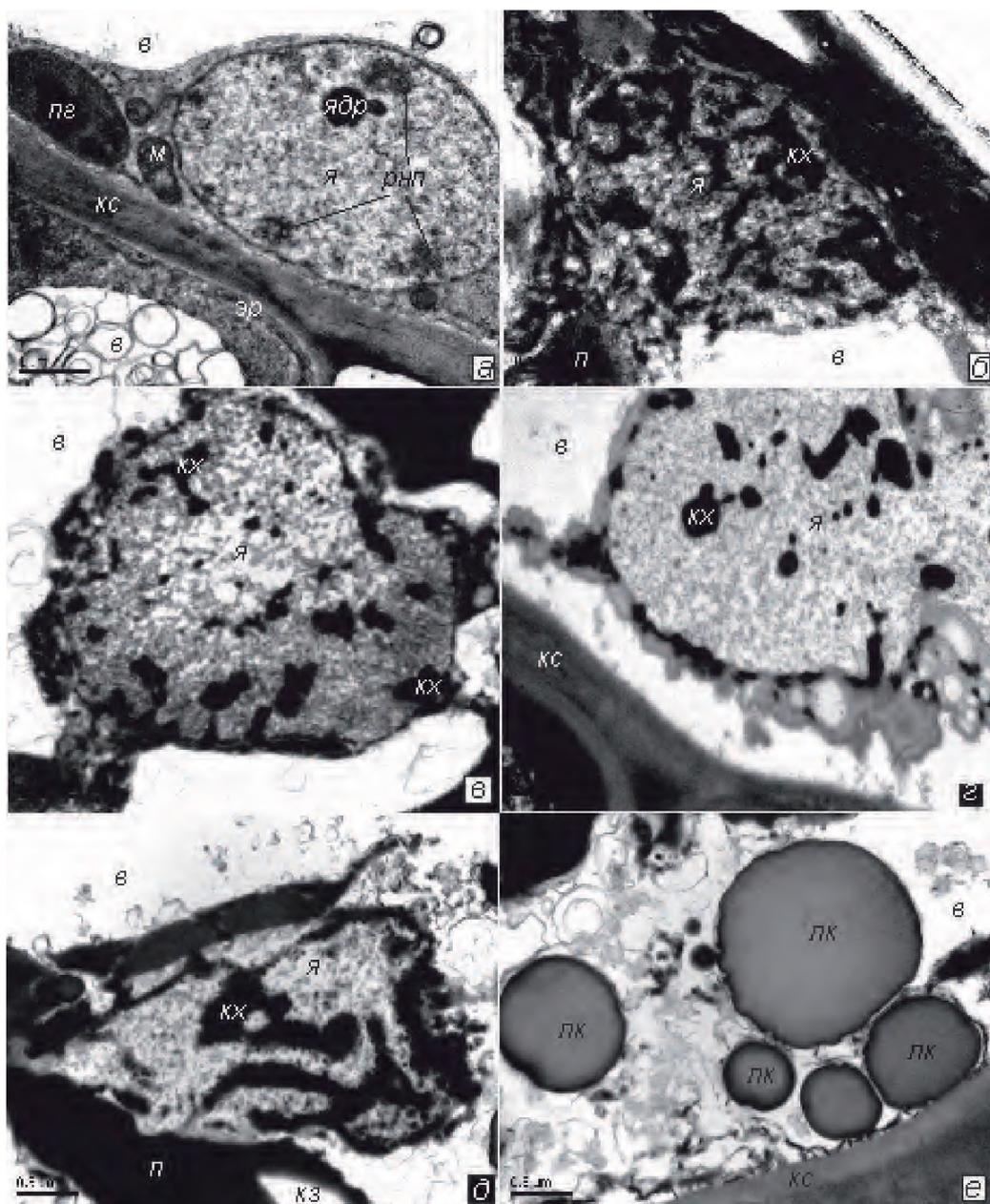


Рис. 2. Ядра клеток (а) зрелого и стареющего листьев (б — темно-зеленого; в, г — желто-зеленого; д — желтого) яблони: а — ядро с равномерно распределенным хроматином; б — ядро с выраженной конденсацией хроматина; в — ядро с конденсацией и маргинацией (сдвижением) хроматина; г — ядро со вздутиями и локальным разрывом оболочки; д — ядро, значительная часть которого утратила целостность оболочки; е — участок клетки (д) с крупными липидными каплями. Обозначения: кк — конденсированный хроматин, лг — пластоглобулы, рнп — рибонуклеопротеидные структуры, ядро — ядрышко, остальные обозначения см. рис. 1

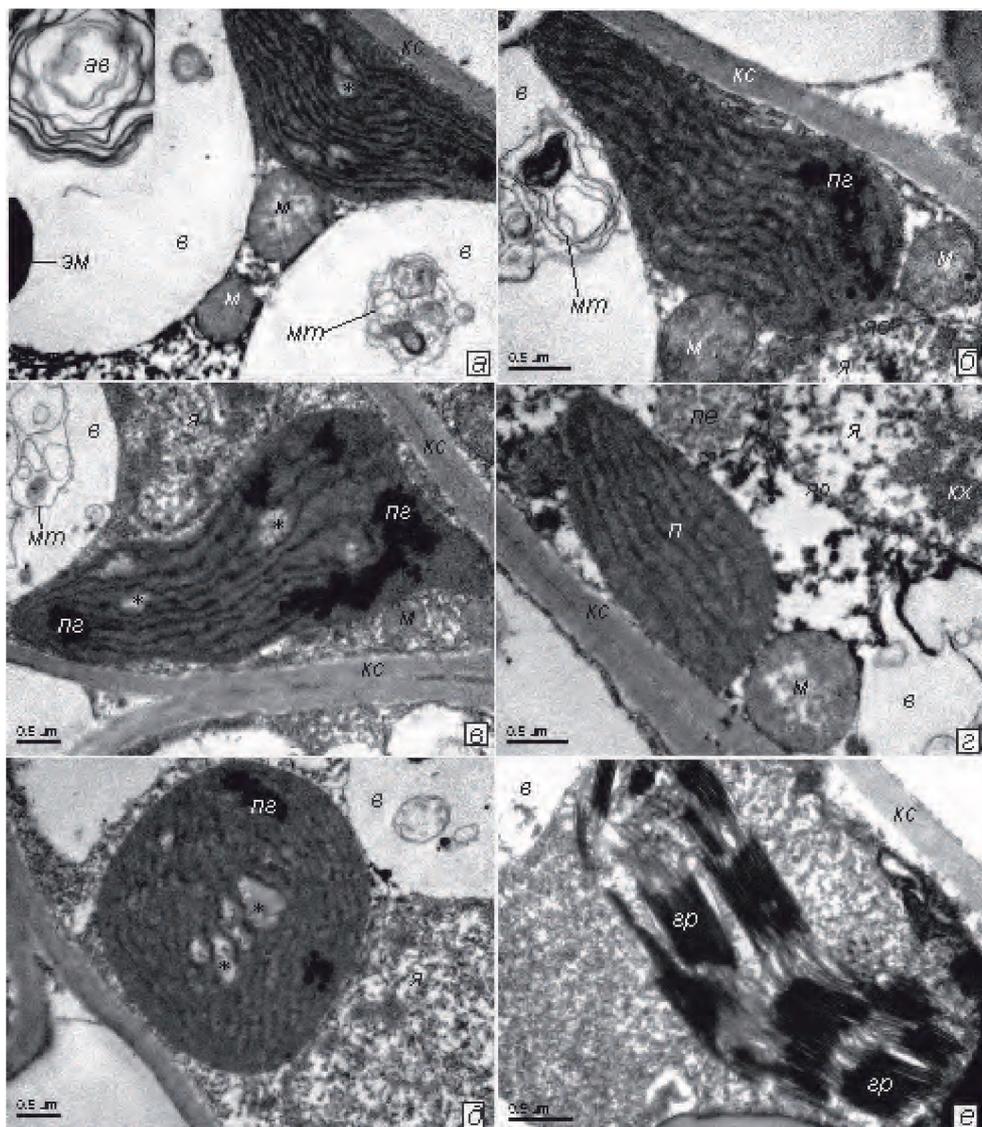


Рис. 3. Фрагменты клеток мезофилла листа (а — темно-зеленого; б-г — желто-зеленого; д,е — желтого) яблони в ходе старения: а — хлоропласт с равномерно расположенными гранами, митохондрии, врезка автофаговой вакуоли в увеличенном виде; б — контакт митохондрии с набухшим хлоропластом неправильной формы; в — хлоропласт неправильной формы с признаками разрушения тилакоидной системы и скоплениями мелких пластоглобул в стро-ме; г — конденсированный хлоропласт, ядро с почти прозрачной нуклеоплазмой, набухшие пероксисомы, митохондрии с просветленным матриксом; д — округлой формы хлоропласт с набухшей стромой; е — хлоропласт с разрушенной оболочкой, многотилакоидные много-ступенчатые граны которого контактируют с цитоплазмой. Обозначения: ав — автофаговые вакуоли, гр — граны, мт — мультивезикулярное тельце, кх — конденсированный хроматин, пг — пластоглобула, пе — пероксисома, эм — электронно-плотный материал, яо — ядерная оболочка; * — рыхлые области в стро-ме хлоропластов, содержащие птДНК, остальные обо-значения см. рис. 1, 2

разных размеров (рис. 2 е). Митохондрии почти округлой формы, с просветленным матриксом, но сохраняют целостность мембран оболочки (рис. 3 г). Пероксисомы набухли. Сильно изменилась форма хлоропластов-геронтопластов, некоторые из них приобрели почти округлую форму (рис. 3 д). Часть хлоропластов утратили целостность мембран оболочки, при этом редукция мембранной системы неполная, грани и тилакоиды сохранились, они свободно лежат в цитоплазме (рис. 3 е).

2. Ультраструктура клеток плодов яблони при созревании и в ходе старения (перезревания)

Следует отметить, что в отношении сочных плодов вместо термина «старение» обычно используют «созревание» и «перезревание». Хотя в физиологическом и биохимическом плане сущность этих терминов одинакова: созревание плодов, точнее перикарпия, — это «начало конца», первый этап старения [15]. Картины ультраструктурных изменений клеток плодов в ходе созревания, которую рассматривают как особую форму старения, в работе не приведены, так как подробно описаны ранее [10].

Ультраструктура клеток плодов, хранящихся в течение двух мес. в холодильной камере, практически не отличается от таковой на стадии созревания. В клетках эпидермы сохраняется полная компартментация, цитоплазма без выраженных признаков деструкции. Она содержит все основные компартменты: хорошо развитый эндоплазматический ретикулум (ЭР) агранулярного типа, аппарат Гольджи, ядро с ядрышком, пластиды, рибосомы, митохондрии и др. Вакуоли крупные электронно-прозрачные, тонопласт имеет ровные очертания. Пластиды с относительно развитой системой тилакоидов.

В некоторых клетках гиподермы и глубже лежащей паренхимы отмечаются первые признаки дегенерации органелл (рис. 4 а, б). В пластидах постепенно разрушается тилакоидная система, накапливаются пластоглобулы (рис. 4 б). Наряду с пластоглобулами они содержат крахмальные зерна (1-2 на срез). На этом этапе старения перикарпия хромопласты по ультраструктурным признакам можно считать дегенерирующими формами пластид, подвергнутыми липофанерозу — разрушению липопротеидных мембран. Кроме того, плазмалемма клеток гиподермы имеет извилистый контур, она иногда образует впячивания, внедряющиеся в цитоплазму. Цистерны агранулярного ЭР расширены, они нередко, сливаясь, образуют цитоплазматические вакуоли небольших размеров. Наряду с этими изменениями хорошо заметной становится разнокачественность клеток гиподермы. В вакуолях некоторых из них содержится электронно-плотный материал, вероятно фенольной природы. Митохондрии сохраняют интактную структуру.

В пластидах клеток паренхимы, полости которых изначально были забиты крупными крахмальными зернами, происходит постепенная их утилизация.

Наиболее выраженные ультраструктурные изменения в клетках плодов происходят через 4 мес. хранения (рис. 4 в, г). В эпидермальных клетках этих плодов изменяется форма ядра. Перинуклеарное пространство ядерной оболочки расширилось, и его контуры стали извилистыми. Пластиды набухли, тилакоидная система в них полностью редуцировалась, они содержат довольно крупные пластоглобулы. Пероксисомы тоже сильно набухли. Целостность мембраны тонопласта нарушена, в некоторых местах на ней находится большое количество электронно-плотного материала. Выраженные изменения претерпели клетки паренхимы. В митохондриях этих клеток остатки крист сильно расширились. Цистерны АЭР редуцировались, и в сильно обводненной цитоплазме находится немного рибосом.

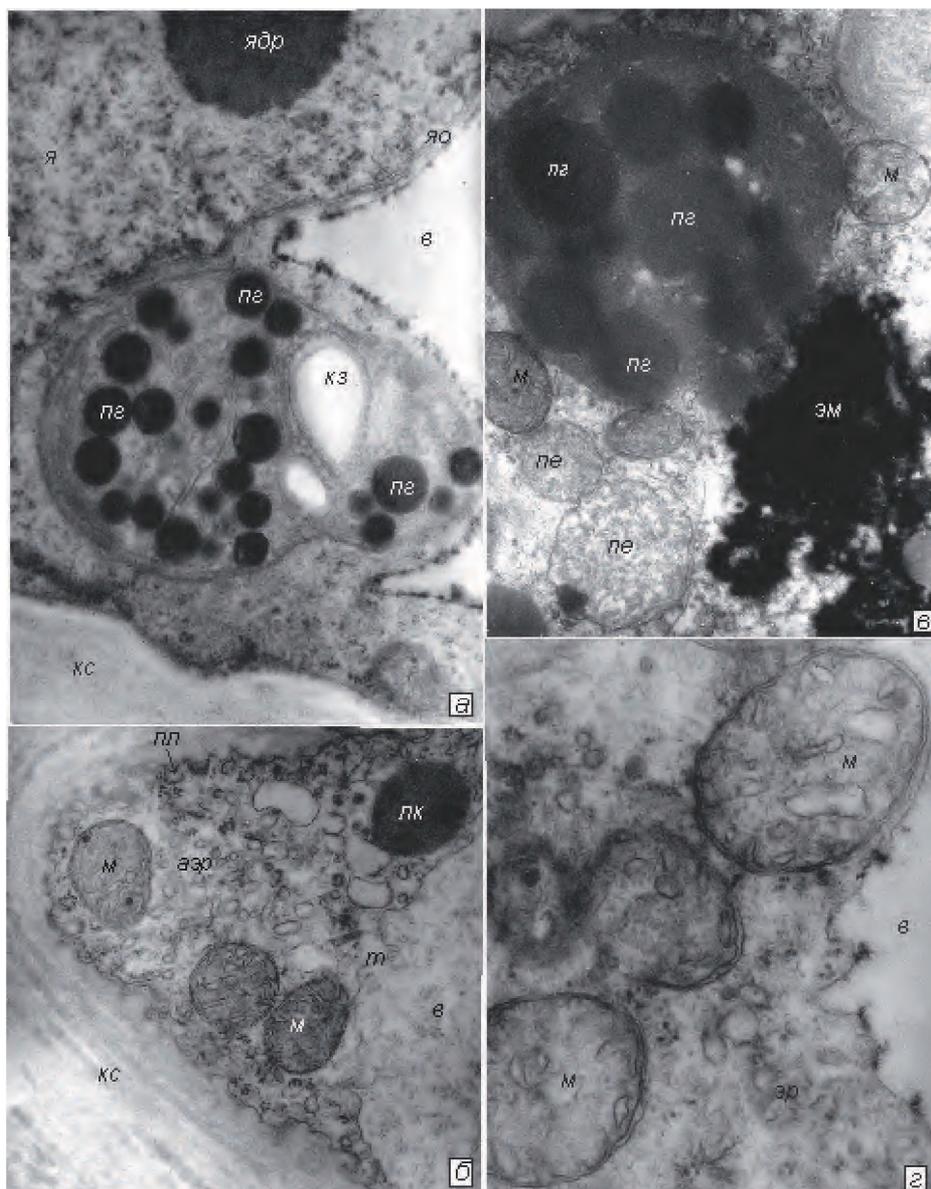


Рис. 4. Фрагменты клеток плода яблони после 2 (а, б) и 4 (в, г) мес. хранения: а — пластида с редуцированной тилакоидной системой, крупными крахмальными зёрнами и пластоглобулами, ядро и ядрышко без выраженных изменений, электронно-прозрачная вакуоль клетки эпидермы; б — трубчатый агранулярный ретикулум с расширенными цистернами, митохондрии интактной структуры, вакуоль клетки гиподермы с хлопьевидным материалом; в — вакуоль с электронно-плотным материалом, пластида с крупными пластоглобулами и другие органеллы клетки эпидермы; г — вакуоль, митохондрии с редуцированными и расширенными кристами, а также разрывом мембран оболочки, цитоплазма с остатками цистерн ЭР клетки паренхимы. Обозначения: *пл* — плазмалемма, *эм* — электронно-плотный материал, *ядр* — ядрышко, остальные обозначения см. рис. 1-3. Увеличения: а-в — 36000х, г — 56000х

Через 6 мес. хранения продолжают изменения в пластидах и митохондриях клеток гиподермы. Наряду с пластоглобулами в стромах большинства пластид является аморфное включение (рис. 5 а). Некоторые из них с локальными разрывами мембран оболочки и содержат скопления электронно-плотных гранул ферритина (рис. 5 б). Но преобладающим компонентом пластид являются пластоглобулы. На этом этапе старения практически все митохондрии претерпели выраженные деструктивные изменения: значительно уменьшилась площадь, занимаемая кристами, их матрикс просветлен, они приобрели неправильную форму и контуры мембран оболочки неровные (рис. 5 а). Клетки паренхимы сильно вакуолизированы, из ставшего узким слоя постенной цитоплазмы исчезли рибосомы и элементы эндомембранной системы (рис. 5 г). Остатки цистерн ЭР сильно расширились, заметно изменилась структура и морфология диктиосом аппарата Гольджи. В митохондриях полностью редуцировались кристы. На мембране тонопласта находятся крупные скопления электронно-плотного материала (рис. 5 г).

На заключительном этапе старения (через 8 мес. хранения) большинство клеток эпидермы и гиподермы находятся на продвинутой стадии старения, в них практически разрушены внутриклеточные мембраны (рис. 5 в, д-к). Часть пластид потеряла целостность оболочки и цитозоль проникает в их строму (рис. 5 в). Обнаруживаются пластиды, у которых оболочки подверглись полной деструкции, и пластоглобулы свободно лежат в сильно вакуолизированной цитоплазме (рис. 5 е). В некоторых митохондриях также редуцировались кристы, остались только отдельные их профили и в просветленном матриксе находятся скопления гранул ферритина (рис. 5 ж). Размер и форма ядра тоже изменились, хроматин в них распределен неравномерно, но ядрышки присутствуют (рис. 5 ж). Подверглись везикуляции элементы ЭР, остались только отдельные профили срезов цистерн ГЭР, на мембранах которых находятся слипшиеся между собой рибосомы (рис. 5 з). Судя по ультраструктурным картинам, большинство клеток гиподермы и паренхимы находятся на стадии вакуолярного коллапса (рис. 5 д, е, и, к). В паренхимных клетках цитоплазма сильно конденсирована, из всех органелл в них присутствуют только митохондрии, на поверхности которых наряду с другими вышеописанными деструктивными изменениями появились небольшие прозрачные вздутия (рис. 5 и, к).

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования выявили картины тканеспецифичных деструктивных изменений, но при этом механизм запуска программы старения и динамика деградации органелл в клетках листа и плода яблона различаются.

Судя по полученным ультраструктурным материалам, старение листа происходит главным образом по апоптозному пути. Об этом свидетельствует появление в ядре раньше, чем в других органеллах, признаков апоптозной деградации: конденсация хроматина, а на более поздних этапах старения его смещение к краю оболочки. Кроме того, на продвинутых стадиях дегенерации ядра через локальные разрывы оболочки часть конденсированного хроматина выходит в полость клетки. Рано деградируют и ядрышки, что вероятно, связано с подавлением активности и постепенным прекращением синтетических процессов. Подобные картины ультраструктурных изменений в ядре обнаружены в замыкающих клетках устьиц листа гороха, в колеоптиле и первом листе проростков пшеницы в экспериментальных условиях при воздействии индуктором апоптоза [1, 2]. По другим литературным данным, хлоропласты — первые органеллы, в которых происходят деструктивные изменения, связанные с деградацией, а митохондрии — единственные органеллы, остающиеся интактными даже на заключительных этапах старения.

В изученных нами стареющих листьях пластиды по сравнению с ядром более устойчивы. Когда ядро практически разрушено, хлоропласты находятся еще в нормальном состоянии. На ультраструктурном уровне изменения в пластидах выражаются в конденсации стромы, постепенной редукции тилакоидной системы и накоплении материала пластоглобул. Однако редукция мембранной системы в пластидах неполная, в некоторых из них происходит укрупнение гран и увеличение среди них доли многотилакоидных, что считается характерным признаком старения хлоропластов [8]. Наиболее сильным изменениям подвергаются их форма и размеры, они сильно набухают, приобретают неправильную, а иногда почти округлую форму. Кроме того, в матриксе большинства хлоропластов имеются хорошо заметные более рыхлые участки (от 2 до 6), в которых, вероятно, происходит постепенное разрушение птДНК, что свидетельствует о замедлении синтетических процессов и усилении их деградации. Обнаруженные нами деструктивные изменения в хлоропластах клеток стареющих листьев не противоречат литературным данным. На более продвинутых стадиях старения, как и ядро, хлоропласты-геронтопласты все же утрачивают непрерывность мембран оболочки, при этом сохраняя строму и целостность системы тилакоидов. Наряду с этими изменениями в клетках мезофилла довольно рано формируются пузырьвидные образования — автофаговые вакуоли и мультивезикулярные тела, свидетельствующие о частичной утилизации внутриклеточных мембран. Как известно, автофаговые вакуоли содержат гидролитические ферменты, которые при определенных условиях перемещаются в цитоплазму и вызывают ее разрушение [16 и др.]. По мнению авторов, лизис протопласта играет главную роль в ЗГК у растений. Признаком старения листа также является формирование в клетках мезофилла крупных липидных глобул (2-5 на срез), образованных за счет разрушения внутриклеточных мембран и являющихся впоследствии резервными веществами липидной природы. При всех этих ультраструктурных изменениях, по нашим наблюдениям, основным диагностическим признаком старения листа можно считать, прежде всего, конденсацию хроматина.

В отличие от листьев в клетках стареющих плодов признаков апоптозной деградации ядра и формирования автофаговых вакуолей нами не обнаружены. До заключительных этапов старения ядро имеет почти нормальное строение, в них присутствуют все компартменты, в т. ч. и ядрышки. Во всяком случае, деградация ядра в клетках стареющих плодов происходит значительно позже, чем других субклеточных компартментов. Длительное сохранение ядра в функциональном состоянии, вероятно, имеет смысл, так как разрушение других клеточных структур находится во многом под его контролем. По нашим данным, наиболее интенсивные деструктивные изменения раньше всех органелл происходят в пластидах. У них полностью деградирует тилакоидная система и полости заполняются пластоглобулами. Однако накопление пластоглобул не всегда может служить индикатором старения, поскольку они накапливаются и в пластидах молодых плодов [10]. Заполнение полости пластид глобулами, скорее всего, обусловлено увеличением их размеров, которое происходит по мере разрушения мембран тилакоидной системы. При этом материал пластоглобул является запасным пулом липидов. Наряду с пластоглобулами в строме как пластид, так и митохондрий обнаружены скопления гранул ферритина — железосодержащего белка. Как известно, ферритин часто аккумулируется в строме пластид стареющих тканей и фотосинтетически неактивных хлоропластов [11, 17]. Причины накопления ферритина в митохондриях пока остаются до конца не изученными.

Для понимания выявленных нами признаков ультраструктурных изменений в клетках стареющих плодов интерес представляют имеющиеся в литературе све-

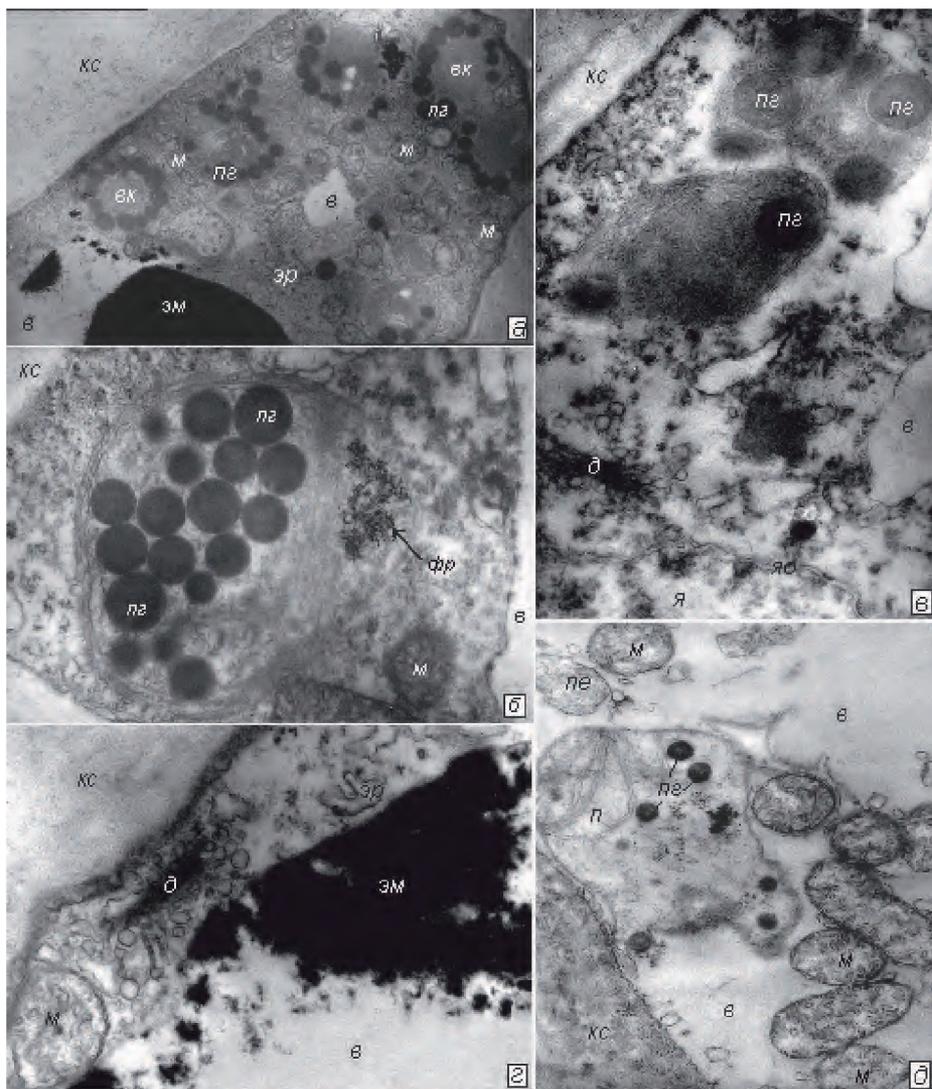


Рис. 5. Фрагменты клеток плода яблоки, после 6 (а, б, г) и 8 (в, д-к) мес. хранения: а — хромопласты с ограниченным мембраной включением, митохондрии с редуцированными кристами, вакуоль с электронно-плотным материалом клетки гиподермы; б — пластида с редуцированной тилакоидной системой, пластоглобулами и скоплением гранул ферритина клетки эпидермы; в — распадающиеся пластиды, просветленный цитозоль с фрагментированным эндоплазматическим ретикуломом, аппарат Гольджи с расширенными цистернами клетки гиподермы; г, д, и — паренхимные клетки в стадии вакуолярного коллапса; е - просветленный цитозоль с распадающимися хромопластами, контактирующие между собой митохондрии с редуцированными кристами клетки гиподермы; ж- митохондрии со скоплением гранул ферритина и другие органеллы клетки гиподермы; з — просветленный цитозоль с отдельными профилями гранулярного ЭР и другие органеллы клетки эпидермы; к — сжавшаяся клетка гиподермы с конденсированной цитоплазмой, митохондрией с редуцированными кристами и разрывом мембран оболочки. Обозначения: *вк* — включение, *фр* — ферритин, остальные обозначения см. рис. 1-4. Увеличения: а — 1300х, б — 36000х, в-г — 40000х, д — 17200х, е — 3000х, ж — 32000х, з-к — 40000х

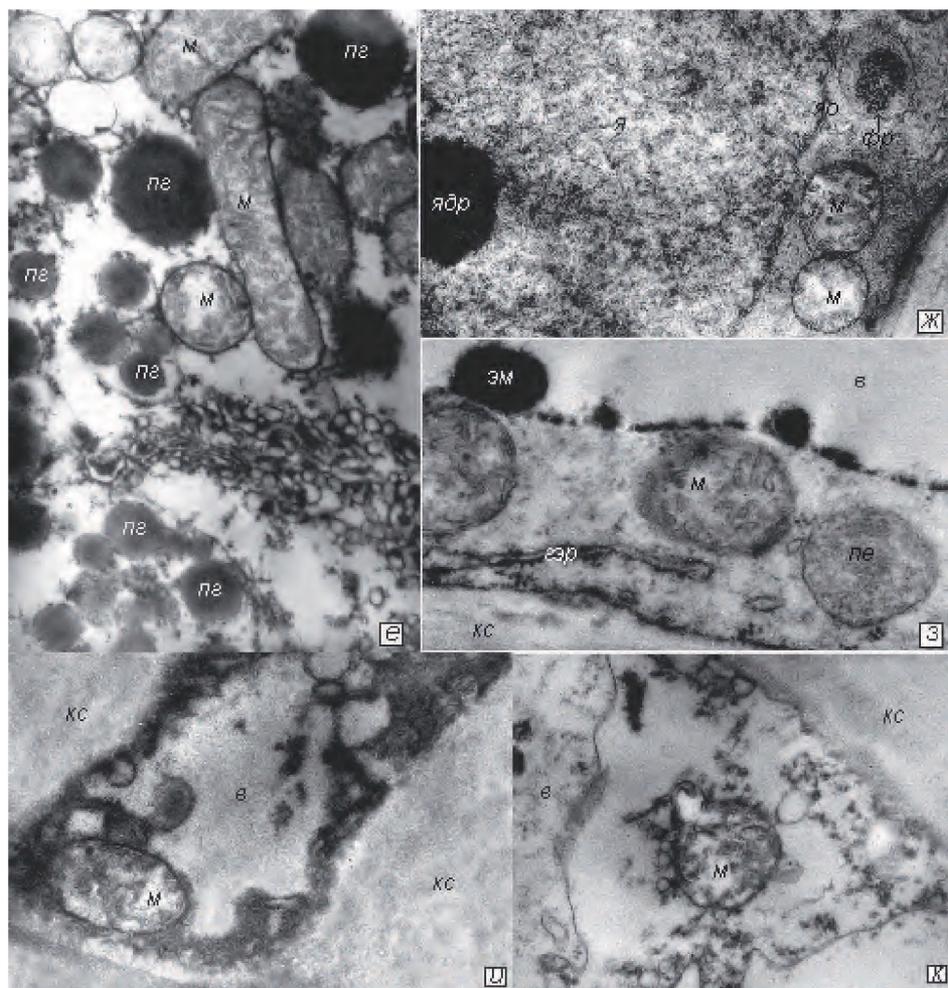


Рис. 5. (Продолжение)

дения по физиолого-биохимическим аспектам их созревания и старения [7, 15]. Согласно этим данным, у яблок все процессы формирования и созревания идут за счет энергии дыхания. При этом созревание сопровождается изменением скорости дыхания. Резкий подъем дыхания, называемый климактерическим у яблок, совпадает с периодом созревания, который наступает до их отделения от материнского растения и продолжается в послеуборочный период. В свою очередь, климактерический подъем дыхания связан с повышенными потребностями в энергии и его обычно рассматривают как кульминацию процесса созревания и начало старения. В этот период увеличивается проницаемость тонопласта, и органические кислоты выходят из вакуоли в цитозоль, что приводит к развитию анаэробных процессов. Причиной анаэробного сдвига дыхания является уменьшение поступления воздуха из-за увеличивающегося синтеза кутина и восковых отложений на поверхности плодов. Образование мощных

восковых отложений и толстой кутикулы на поверхности плодов яблони нами выявлены и описаны ранее [12]. По нашему мнению, вышеописанные процессы приводят к структурно-функциональным изменениям, прежде всего митохондрий как энергетических структур. Так как митохондрии, являясь поставщиками ряда апоптогенных факторов (цитохрома с, прокаспаз, белков-регуляторов ЗГК, активных форм кислорода и др.), играют важную роль в запрограммированной гибели клеток у животных, то можно предположить, что обнаруженные нами перестройки в их структуре представляют собой один из механизмов, запускающих гибель клеток в перезревающих плодах яблони. Вероятно, факторы, инициирующие гибель клеток перикарпия, могут исходить как из пластид, так и из митохондрий, если основываться на принципе «что питает, то и губит». Эти органеллы не только принимают и координируют сигналы, запускающие механизм гибели клеток плодов, но и сами их вырабатывают [15]. Однако для более точного установления, на каких стадиях созревания плодов этот феномен происходит, по нашему мнению, необходимы дополнительные исследования с учетом биоэнергетического статуса митохондрий в клетке, поскольку одновременно с деградацией происходят и синтетические процессы.

Анализируя литературные данные и полученные нами материалы, можно предположить, что в стареющих плодах реализуется иная программа клеточной смерти, в инициации которой основную роль играет, прежде всего, центральная вакуоль. Как известно, интенсивная вакуолизация клеток перикарпия происходит за счет локального автолиза цитозоля с диктиосомами и элементами ЭР. А разрыв тонопласта обусловлен аккумуляцией на его мембране большого количества электронно-плотного материала в виде сплошного слоя. Гибель клеток при участии центральной вакуоли часто встречается в стареющих клетках генеративных органов высших растений [1]. Согласно существующей гипотезе, вакуолярный коллапс обусловлен изменением проницаемости тонопласта для органических ионов. Высвобожденные из вакуоли гидролазы начинают атаковать клеточные органеллы. Впоследствии центральная вакуоль сморщивается и подвергается фрагментации, после того как их содержимое смешивается с цитоплазмой, останавливается ток цитоплазмы, и все органеллы постепенно подвергаются деградации. Сначала разрушаются одномембранные органеллы, несколько позднее деградируют двумембранные. При этом обводняется матрикс, нарушается целостность внешних и внутренних мембран органелл. Деструктивные изменения, аналогичные им, обнаружены нами в органеллах клеток стареющего плода.

Таким образом, ультраструктурные изменения, происходящие в стареющих клетках листа и плода яблони, указывают на взаимозависимость, а не автономность сигнальных путей старения. Это позволяет исключить тот факт, что оно происходит благодаря одному типу органелл. Можно предположить, что в клетках листа старение протекает в основном по апоптозному пути. В плодах оно тоже находится под контролем ядра, но главными инициирующими компартментами являются пластиды и митохондрии, в большей степени вакуоли. Выявленные в ультраструктурном плане проявления запрограммированной гибели клеток в листьях и плодах яблони в ходе старения, вероятно, являются результатом реализации разных генетических программ. На наш взгляд, полученные нами материалы дополняют имеющиеся в литературе молекулярные и биохимические данные по механизмам старения растений и могут быть использованы в качестве цитологических маркеров для идентификации апоптоза, а также поиска у них новых разновидностей запрограммированной гибели клеток.

Библиографический список

1. Апоптоз у проростков пшеницы при нормальном световом дне / Н.И. Александрюшина [и др.] // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 3. С. 356-366.
2. Ванюшин В.Б. Апоптоз у растений // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 3-38.
3. Васильев А.Е. Изменение структуры ядра клеток мезофилла в ходе развития листа тополя // Цитология. 1989. Т. 31. № 1. С. 15-22.
4. Васильев А.Е. Динамика клеточных компонентов тканей листа тополя *Populus deltoides* (Salicaceae) в ходе жизненного цикла. Основные клетки эпидермиса // Ботанический журнал. 2008. Т. 93. № 12. С. 1724-1736.
5. Васильев А.Е. Генезис и структура оболочки основных клеток эпидермиса листа тополя *Populus deltoides* (Salicaceae) // Ботанический журнал. 2008. Т. 93. № 8. С. 1209-1212.
6. Васильев А.Е., Муравник Л.Е. Динамика клеточных компонентов тканей листа *Agabidopsis thaliana* в ходе дифференциации. 2. Палисадный мезофилл // Ботанический журнал. 2001. Т. 86. № 3. С. 1-14.
7. Горшков Т.А. Биогенез растительных волокон. М.: Наука, 2009. 206 с.
8. Замятина Л.Е., Бакеева Л.Е., Александрюшкина Н.И., Ванюшин В.Б. Апоптоз в первом листе у этиолированных проростков пшеницы: Влияние антиоксиданта ионола (ВНТ) и перекисей // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 2. С. 253-264.
9. Клячко Н.Л., Кулаева О.Н. Факторы старения и омоложения листьев // Биология развития растений. М., 1975. С. 214-229.
10. Кумахова Т.Х. Особенности ультраструктуры клеток плодов *Malus domestica* (Rosaceae) // Ботанический журнал. 1992. Т. 77. № 2. С. 25-32.
11. Кумахова Т.Х. Ультраструктура клеток яблок при хранении // Цитология. 2003. Т. 45. № 6. С. 564-568.
12. Кумахова Т.Х., Меликян А.П. Ультраструктура кутикулы плодов разных сортов *Malus domestica* (Rosaceae) // Ботанический журнал. 1989. Т. 74. № 3. С. 328-332.
13. Матиенко Б.Т., Загорнян Е.М., Рот ару Г. П. Изменение в субмикроскопической организации эпидермальных клеток плодов дикорастущей и культурной яблони во время хранения // Эколого-анатомические особенности изменчивости культурных растений. Кишинев, 1984. С. 38-59.
14. Мерзляк М.Н., Жиров В.К. Свободнорадикальное окисление в хлоропластах при старении растений // Актуальные проблемы биофизики растительной клетки. М.: ВИНТИ (Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 40). 1990. С. 101-135.
15. Метлицкий Л.В. Биохимия иммунитета, покоя, старения растений. М.: Наука. 1984. 264 с.
16. Мирославов Е.А., Бармичева Е.М. Апоптотная деградация пыльцевых зерен у *Scilla sibirica* связана с отсутствием пониженных температур при их развитии // Физиология растений. 2009. Т. 6. № 6. С. 942-947.
17. Парамонова Н.В., Шевякова Н.П., Кузнецов В.В. Ультраструктурные особенности ферритина в листьях *Mesembryanthemum crystallinum* при стрессе // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 2. С. 275-289.
18. Платонова Т.А., Салькова Е.Г., Метлицкий Л.В. Ультраструктурные изменения в клетках околоплодника яблони при созревании и старении // Физиология растений. 1974. Т. 21. № 5. С. 915-918.
19. Ротару Г.П. Некоторые изменения в субмикроскопической морфологии клеток наружной зоны околоплодника яблони и груши во время хранения // Структура и ультраструктура плода. Кишинев, 1968. С. 31-33.
20. Самуилов В.Д. Участие хлоропластов в программируемой гибели клеток у растений // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 6. С. 757-765.
21. Скулачев В.П. Работы по запрограммированной смерти клетки увенчаны Нобелевской премией // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 2. С. 290-291.
22. Fukuda H. Plants // Mol. Biol. 2000. Vol. 44. P. 245-253.

Рецензент — д.б.н. А.Н. Смирнов

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN BOTH LEAF AND FRUIT CELLS OF MALUS DOMESTICA (ROSACEAE) IN THE PROCESS OF AGING

T.KH. KUMAKHOVA

(RTSAU named in honour of K A. Timiryazev)

Ultrastructural changes occurring in the course of aging in both fruit and leaf cells of apple trees were studied. It was shown that the start of the ageing programme was followed by tissue-specific destructive changes with varying dynamics in regards to organells degradation. In leaf cells, the first sings of degradation — chromatine condensation — were obsen'ed in the nuclear compartment. Fruits are characterized by anticipatory plastid aging: they accumulate products of thylakoids membrane degradation — osmiophvlic non-membranousformations (plastoglobules), or sometimes ferritin granules. Along with this the ageing process in fruits is expressed in extensive cell vacuolation due to local autolysis of cytosol with dvtiosomes and endoplasmic reticulum. Moreover, in fruit cells, two populations of mitochondria can be found at the final stages of aging: one with the total reduction of cristae system and coating membranes lose integrity, the others, as well as plastids, accumulate ferritin granules. We conclude that revealed ultra-structural manifestations of programmed cell death in both apple fruits and leaves in the course of ageing are the result of implementation of various genetic programmes.

Key words: apoptosis, degradation, mesophvll, mitochondria, pericarp, plastoglobules, chloroplast.

Кумахова Тамара Хабаловна — к.б.н., доцент кафедры ботаники РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; тел./факс: (495) 976-04-20; e-mail: tkumachova(@gmail.com).