

УДК 611.018.1, 635:64

## ВЛИЯНИЕ КИСЛОЙ pH СРЕДЫ НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЯДЕР И ЯДРЫШЕК КЛЕТОК ПОБЕГОВОЙ И КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМ ПШЕНИЦЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ

Е.Н. БАРАНОВА, А.А. ГУЛЕВИЧ, Н.В. ЛАВРОВА

(Кафедра хранения и переработки плодов и овощей)

Проведен анализ состояния ядерного компартмента побеговой и корневой меристем озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. при прорастании в условиях низких значений pH. Эффект кислой pH среды на структурную организацию ядер и ядрышек клеток побеговой и корневой меристем пшеницы при прорастании выразался в уменьшении числа митозов и их нарушении, а также ядрышек, имеющих протуберанцы, нарушении компактизации/декомпактизации хроматина и появлении в верхушечной меристеме ядерных телец, содержащих рибонуклеопротеиды.

**Ключевые слова:** кислотность, пшеница, меристема, ядерные тельца, ядрышки, прорастание, экспрессия генов, хроматин.

Верхушечная (побеговая) и корневая меристематические ткани представляют собой недифференцированную растительную ткань, клетки которой способны многократно делиться и предоставлять материал для образования различных специализированных тканей. В меристематической ткани происходят как обычные для делящихся клеток процессы, связанные с клеточным циклом, так и специфические процессы, связанные с реакцией на вызовы окружающей среды, которые могут, в конечном счете, приводить даже к наследуемым эпигенетическим изменениям адаптивного характера [1, 2], связанным с метилированием, ацетилизацией гистонов и другими, регулируемыми экспрессию механизмами [3].

Одной из реакций клеток на действие абиотических факторов может быть замедление или полное блокирование делений путем задержки клеточного цикла на определенной

стадии, вероятнее всего профазе. Следствием этого является накопление клеток в G<sub>2</sub> фазе, а также нарушение митоза — аномальный митоз, изменение митотического индекса и другие нарушения. Другим проявлением должно быть изменение экспрессии генов, вызванных сигнальным ответом, связанным с генетически детерминированными ответами на воздействия. И, наконец, нарушения, проявляющиеся в эпигенетических изменениях хроматина, структурных или регуляторных компонентах ядра. В верхушечной меристеме могут проявляться также нарушения, связанные с блокированием FLC [2] и вызывающие изменения, индуцирующие переход к генеративному развитию.

В литературе описаны изменения ультраструктуры ядерного компартмента и ядрышек под действием абиотических воздействий. Так, описано увеличение количества необычных ядрышек «амебоидной» формы в

апикальной меристеме побега пшеницы при яровизации. Также этот тип ядрышек был описан в побеговом апексе яровой пшеницы на ранних этапах замачивания [4, 5] и при прорастании в условиях щелочного рН, [6]. Методом световой микроскопии подобные структуры были выявлены при изучении преобразований ядрышка в процессе клеточного цикла [7]. Выявление ультраструктурных параметров в ядерных компартаментах апикальных меристем побега и корня на фоне действия факторов, имитирующих природные абиотические стрессоры, в частности кислой рН, ограничивающих рост и урожайность пшеницы, в частности в Нечерноземной зоне РФ, позволит ответить на многие вопросы, связанные с отличиями ядер клеток этих двух активно пролиферирующих зон и происходящими в них преобразованиями. Воздействие кислого рН с учетом влияния таких токсичных ионов, как Al (при их низких значениях) на различные физиологические и биохимические параметры, изучены недостаточно и наиболее тщательно проанализированы в работе [6]. Неоптимальные значения рН предположительно могут индуцировать ряд сигнальных путей, аналогичных проявляющимся при холодовом стрессе (токсическом и оксидативном), однако, вероятнее всего, они не являются характерными для многих абиотических стрессоров, таких как холод, засуха, засоление [9].

#### Методика исследований

Зерновки озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. прорастивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Для замачивания и проращивания использовали растворы следующего состава: 0,1 М натрий-калиевый фосфатный буфер рН 6,0 и 3,0, вода. Температура проращивания составляла 18-22°C. На 3-и сут. часть растений перемещали с рН 3,0 в чашки с буфером рН 6,0. Отпре-

парированные под световым микроскопом апексы побега и кончики корня фиксировали через 4 сут. после замачивания 2,5%-м глутаровым альдегидом на фосфатном буфере с добавлением сахарозы (рН 7,2) 4 ч с последующей дофиксацией 1% OsO<sub>4</sub> в течение 2 ч, заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, фотографировали под электронным микроскопом Хита-чи H-500 (Япония).

#### Результаты и их обсуждение

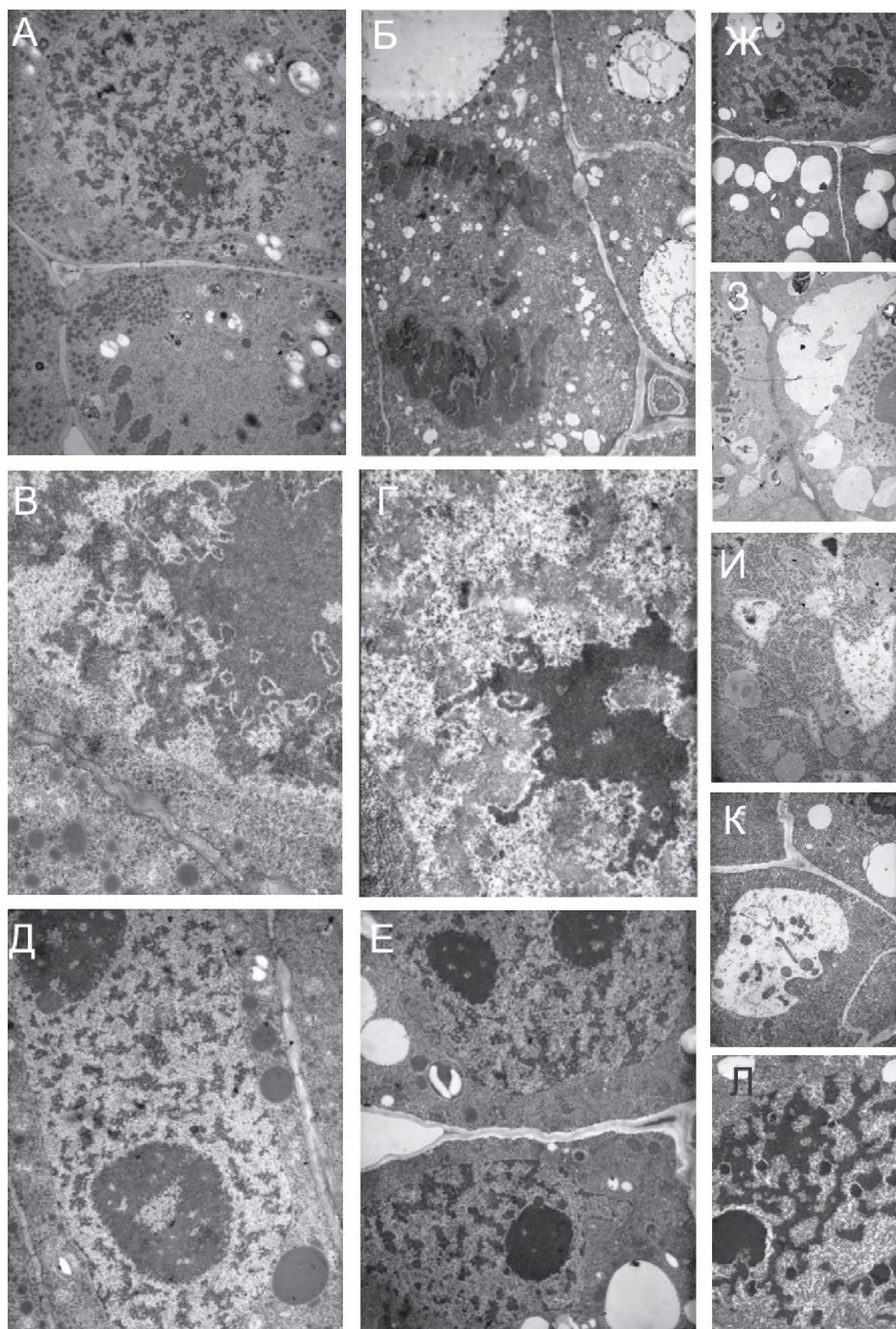
Клетки апикальных меристем побега (рис. 1 а, в, д, ж, и) и корня (рис. 2 а, в, д, ж, и) проростков, прораствовавших в условиях оптимальной рН 6,0 среды, имеют типичное для меристематической ткани строение. Наблюдается много делящихся клеток на различных стадиях митотического цикла. Митотический индекс в клетках апикальной меристемы корня — 9,7, в клетках верхушечной меристемы — 8,8. Интерфазные и профазные клетки имеют крупное ядро с хорошо развитым ядрышком, расположенное в центре клетки. В цитоплазме содержится множество рибосом как в свободном состоянии, так и прикрепленных к шероховатому эндоплазматическому ретикулуму. Наблюдается также незначительное количество пропластид и митохондрий (см. рис. 1 и; рис. 2 ж, и). Крупные округлые ядра занимают около половины объема клеток (см. рис. 1 д; рис. 2 д). Диспергированный хроматин, глыбки и тяжи конденсированного хроматина равномерно распределены по всему объему ядра. В некоторых ядрах встречаются участки локальной деконденсации — микропуффы, вблизи которых отмечаются скопления интерхроматиновых гранул в виде кластеров. Ядрышки имеют типичное строение и содержат фрагменты гранулярного, рыхлого и плотного фибриллярного компонен-

та. В единичных клетках латеральной зоны побеговой меристемы и в ряде клеток корневого апекса можно отметить ядрышковый организатор и примыкающий к нему приядрышковый хроматин. Ядерные тельца и светлые участки ядрышек, так называемые ядрышковые вакуоли, встречаются только в единичных клетках периферической зоны меристемы и в ряде начавших дифференциацию клеток, примыкающих к меристематической зоне. «Амебоидные» ядрышки с вытянутыми, разветвляющимися отростками (протуберанцами) отмечаются в периферической зоне меристем и в примыкающих молодых тканях соответственно, 1—2% в корне и 3~5% в меристематической зоне побега (рис. 1 в; рис. 2 в).

В корневой меристеме растений пшеницы, проросших при рН 3,0 (рис. 2 б, г, е, з, к), отмечается замедление утилизации крахмала в пропластидах (см. рис. 2 к). Наблюдается множество клеток на различных стадиях митотического цикла, однако митотический индекс, указывающий на количество делений, снижается почти в 1,5 раза — до 5,0. На срезах отмечаются лишь единичные случаи делящихся клеток. Наблюдающиеся клетки имеют сформированные конденсированные хромосомы, расположенные в упорядоченной форме в светлой неструктурированной нуклеоплазме, с сохранением связывающих их микротрубочек веретена деления. Ядерный компартмент интерфазных и профазных клеток также имеет значительные отличия от нормы. Крупные ядрышки имеют типичную округлую форму, содержат выраженные фибриллярные центры и развитую центральную светлую область (рис. 2 г, е). У хроматина выражено резкое деление на светлую и темные зоны с высокой степенью конденсации неконститутивного гетерохроматина (рис. 2 е). Конденсированный хроматин представлен в виде от-

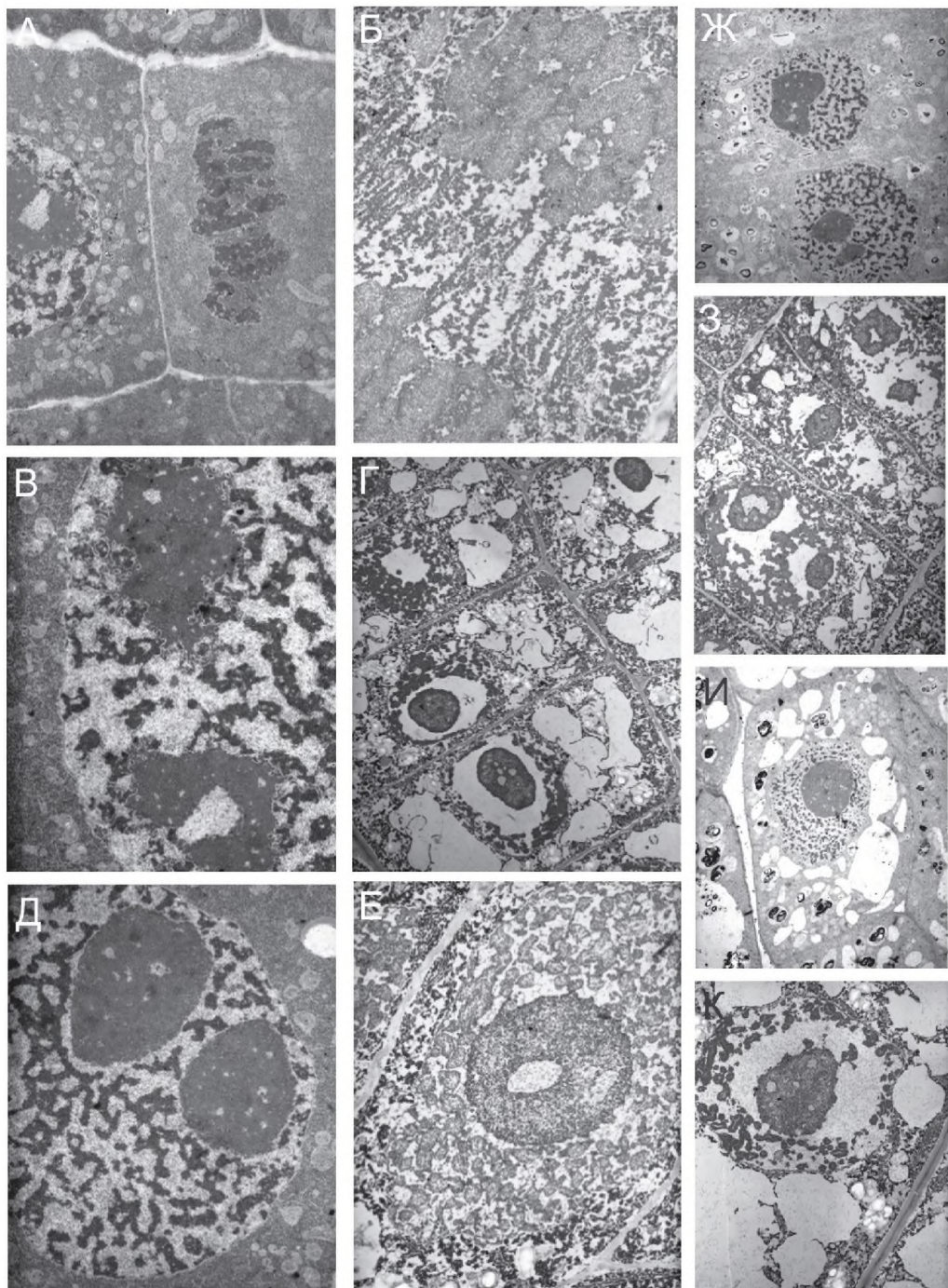
дельных округлых, реже продолговатых и разветвленных, глыбок с более плотным краем и несколько разрыхленным центром. Можно наблюдать четко выраженное отделение хроматина от ядрышка в форме светлого ареола. Незначительная часть глыбок конденсированного хроматина ассоциирована с ядерной оболочкой, но их большее число равномерно размещено в нуклеоплазме. В ряде клеток наблюдается наличие конденсированного хроматина, подобного собраным хромосомам, однако ядрышек с сохранением фрагментов амебоидного ядрышка не наблюдается. Можно отметить более темноокрашенные протуберанцы неизвестной природы у ряда ядрышек в ядрах, имеющих значительную зону, подобно ареолу, отделяющую ядрышко от глыбок конденсированного хроматина. Возможно, это связано с видоизменениями описанных ранее [6] протуберанцев ядрышкового компартмента при данном воздействии (см. рис. 2 к).

Апикальная меристема побега проростков пшеницы, проросших при рН 3,0, также содержит незначительное число делящихся клеток (митотический индекс 5,6), и основная часть клеток находится предположительно на стадии ранней и средней телофазы. Структура ядер и их форма значительно отличаются от нормы (рис. 1 а, в, д, л). Хроматин имеет участки диспергированного хроматина, а также тяжи и разветвленную сеть конденсированных участков с ячеистой структурой. В различных участках некоторых ядер наблюдается большое число ядерных телец неизвестной этиологии, представляющих собой более темные, чем конденсированный хроматин, структурированные образования различного размера неправильной шаровидной формы, ассоциированных с одной или двух сторон с участками конденсированного хроматина, окруженные светлым ореолом (см. рис. 1 л). Рядом с этими тель-



**Рис. 1.** Ультраструктура ядер клеток верхушечной меристемы пшеницы при прорастании в условиях оптимального (а, в, д) и кислого (б, г, е, ж, з, и, к, л) рН





**Рис. 2.** Ультраструктура ядер клеток корневой меристемы пшеницы при прорастании в условиях оптимального (а, в, д) и кислого (б, г, е, ж, з, и, к) рН

цами интерхроматиновые гранулы и микроуффы отсутствуют, ядрышки имеют тонкую, светлую окантовку, отделяющую их от приядрышкового хроматина. Количество «амебоидных» ядрышек с протуберанцами незначительно увеличено по сравнению с контролем (рис. 1 г).

Причинами различного ответа ядерного компартмента побеговой и корневой меристем могут быть как различия в доступности их для действующего стрессового фактора — относительно прямое воздействие на корневую меристему, и опосредованное, связанное с защитными свойствами проводящих и окружающих тканей, влияющих на апекс побега, так и генетически запрограммированные различия в ответах на воздействия стрессовых факторов.

При детальном рассмотрении амебоидных ядрышек, обладающих протуберанцами, можно предположить, что это явление может быть вызвано замедлением процесса сборки гранулярного компонента ядрышка после прохождения делений в интерфазных и профазных клетках. В литературе встречается ограниченное количество примеров, подтверждающих наличие незначительных протуберанцев ядрышка. Методом конфокальной микроскопии удалось заснять разветвленные ядрышки фолликулярной клетки яичника бабочки [11] и клеток млекопитающих [7].

Изменение количества таких ядрышек и разветвленности сети протуберанцев свидетельствует о чувствительности процесса их формирования в присутствии стресса и можно предположить повреждение какой-либо связанной с этим процессом структуры в момент нахождения ядерного материала без оболочки в процессе митотического деления. Это может быть вызвано изменением конформации задействованных при этих процессах белков либо нарушениями процессов ацетилирования, метили-

рования или фосфорилирования, в т.ч. на этапе отсутствия ядерной мембраны.

Этиология обнаруженных в побеговой меристеме ядерных телец при прорастании в условиях кислой рН среды на данный момент не установлена. Однако на основании существующей в настоящее время классификации [12] и при визуальном сравнении ультраструктуры можно предположить, что наблюдаемые тела представляют собой образования, связанные с процессингом, более вероятно, в связи с его нарушением. Эти образования отличаются от телец Кахаля (имеющих кольцевую структуру) или скоплений стрессовых белков (образующих гомогенные образования), так как ассоциированы с конденсированным хроматином и, вероятно, не могут быть отнесены к микроядрышкам, поскольку структура их не содержит аналогичного ядрышковому выраженному гранулярного или фибриллярного компонента. Возможно, этот вид телец является необычной формой видоизмененных микроуффов.

Нарушения клеточного цикла характерны для многих стрессовых воздействий и являются типичной реакцией растительных клеток на действие солей [13, 14], обезвоживание [15], однако при данном воздействии они описаны впервые. Главные критические точки цикла деления эукариотической клетки находятся в переходах G1<sup>S</sup> и G2<sup>AM</sup>. Прохождение через эти границы катализируется циклин-зависимыми киназами (CDKs), активность которых регулируется событиями фосфорилирования и дефосфорилирования, и благодаря связыванию с каталитической субъединицей — циклином. За последнее десятилетие у растений было выявлено множество ключевых регуляторов клеточного цикла, включая CDKs, циклины, ингибиторы CDKs и т.п. [15].

Нарушения процессов конденсации / деконденсации хромосом, вы-

званное воздействием низкого значения pH, может быть частично связано с появлением ядерных телец и с изменением структуры ядрышка, если предположить, что при этом воздействии происходит не только нарушение процессинга рибосомальной РНК, но также процессов ацетилирования, метилирования или фосфорилирования нуклеиновых кислот и белков.

#### Выводы (заключение)

С учетом обнаруженных изменений под действием кислой pH среды впервые возможно: 1) идентифицировать различия в реакции ядер клеток корневой и верхушечной апикальных меристем растения; 2) идентифицировать протуберанцы ядрышек в корневой меристеме и прилегающих формирующихся тканях; 3) подтвердить

изменение количества и разветвленности «амебоидных» ядрышек в ответ на действие абиотического стресса; 4) установить специфические изменения в ультраструктуре ядра, выражающиеся в изменении структуры конденсированного хроматина, образовании ядерных телец, ассоциированных с участками конденсированного хроматина в верхушечной меристеме; 5) отметить нарушения митотического цикла, вызывающие появление аномальных митозов и блокировку клеток в одной из фаз клеточного цикла, предположительно телофазе; в верхушечной меристеме и на разных стадиях профазы; в анафазе в корневой меристеме, вызванные, вероятно, повреждениями цитоскелета, в ряде случаев, необратимыми.

Работа частично профинансирована грантом РФФИ 07-08-00610-а и программой РАСХН 04.03.03.01.

#### Библиографический список

1. *Аветисова Л.В., Кадыков В.А.* Ультраструктура апикальной меристемы проростков пшеницы, развивающихся при низких положительных температурах // Цитология, 1985. Т. 27. С. 28-32.
2. *Аветисова Л.В., Шапошников Я.Д., Кадыков В.А.* Изменения ультраструктуры ядер в клетках апикальной меристемы пшеницы при прорастании // Онтогенез, 1988. Т. 19. № 2. С. 181-190.
3. Атлас по биологии клетки. М.: Мир, 1978.
4. *Баранова Е.Н., Гулевич А.А.* Эффект щелочного pH на структурную организацию ядер и ядрышек клеток побеговой и корневой меристемы пшеницы // Доклады РАСХН, 2009. № 1 С. 16-18.
5. *Баранова Е.Н., Гулевич А.А.* Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению // С.-х. биология. Сер. Биология растений, 2006. N 1. С. 39-56.
6. *Климашевский Э.Л.* Генетический аспект минерального питания растений. М.: Агрпромпиздат, 1991.
7. *de Castro R.D., van Lammeren A.A.M., Groot S.P.C., Bino R.J., Hilhorst H.W.M.* Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not // Plant Physiol, 2000. Vol. 122. P. 327-335.
8. *Gautier P., Robert-Nicoud M., Guilly M.-N., Hernandez-Verdun D.* Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy // J. Cell Sci., 1992. Vol. 102. P. 729-737.
9. *Finnegan J.E., Kovac K.A., Jaligot E., Sheldon C.C., Peacock J.W., Dennis E.S.* The downregulation of Flowering Locus C expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms // Plant J., 2005. Vol. 44. P. 420-432.
10. *He Y., Michaels S.D., Amasino R.M.* Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis // Science, 2003. Vol. 302. P. 1751-1754.

11. Sheldon C.C., Hills M.J., Lister C., Dean C., Dennis E.S., Peacock W.J. Resetting of Flowering Locus C expression after epigenetic repression by vernalization // PNAS, 2008. Vol. 105. P. 2214-2219.
12. Show P.J., Broun J.W.S. Plant nuclear bodies // Curr. Opin. in Plant Biol, 2004. Vol. 7. P. 714-720.
13. Schuppler U., He P.-H., John P.C.L., Munns R.. Effect of water stress on cell division and Cdc2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaf // Plant Physiol, 1998. Vol. 117. P. 667-678.
14. Veylder L., Van Montagu M., Inze D. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus // Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 509-521.
15. West G., Inze D., Beemster G.T.S. Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress // Plant Physiol, 2004. Vol. 135. P. 1050-1058.

*Рецензент* – д. с.-х. н. И.В. Кобозев

### SUMMARY

Nuclear compartment condition analysis, in both spear and root meristem of winter wheat *Triticum aestivum* L., when germinating under low pH-range conditions, has been carried out. The effect of acidic pH medium on structural arrangement of both nuclei and nucleoli in cells of spear and root meristem, when germination occurs, is expressed by a decrease in the number of mitoses, their disturbance, nucleoli having protuberances (prominences), chromatin compactness, failure, and emergence of nuclear corpuscles having ribonucleoproteins in the apical meristem.

**Key words:** acidity, wheat, formative tissue (meristem), nuclear corpuscles, germination, genes' expression, chromatin

Баранова Екатерина Николаевна — к. б. н., Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН. Эл. почта: greenpro2007@rambler.ru

Гулевич Александр Анатольевич — Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН.

Лаврова Наталия Владимировна — д. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-10-33. Эл. почта: Gaplo@rambler.ru