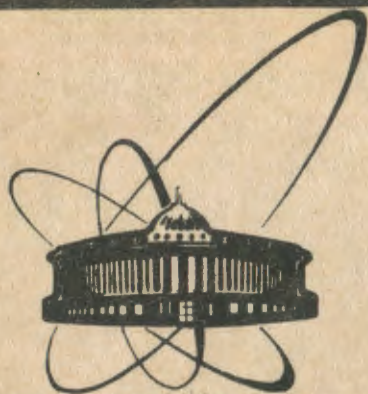


91-41



сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
Дубна

P19-91-41

Н. А. Белявская*, В. М. Фомичева*, Р. Д. Говорун,
В. И. Данилов

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОРНЕЙ ГОРОХА,
ЧЕЧЕВИЦЫ И ЛЬНА В УСЛОВИЯХ ЭКРАНИРОВАНИЯ
ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

*Институт ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

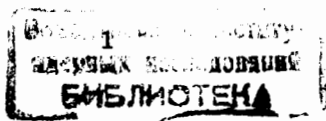
В последние годы исследования биологического действия магнитных полей (МП) вновь привлекли к себе внимание биологов, медиков, специалистов сельского хозяйства в связи с эффективными результатами, полученными при их использовании. Вместе с тем в подавляющем большинстве экспериментов, отображающих как фундаментальные, так и прикладные аспекты исследований, первичные механизмы действия МП до настоящего времени остаются неясными. Большинство экспериментальных и обзорных работ, рассматривающих механизмы действия МП на биологические объекты, посвящены молекулярным аспектам этой проблемы и выполнены на модельных биологических системах¹⁻³.

В предыдущих наших исследованиях было показано, что экранирование геомагнитного поля (ГМП) по постоянной составляющей в 10^5 - 10^6 раз приводило к преимущественному торможению прорастания семян и роста проростков гороха, чечевицы и льна⁴, а также снижало пролиферативную активность меристематических клеток корней этих растений и влияло на хронологию клеточного цикла⁵.

В данной работе сделана попытка методами электронной микроскопии и электронной цитохимии выявить первичные сенсорные реакции, возникающие непосредственно в растительной клетке при экранировании ГМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использованы корни проростков гороха сорта Рамонский 77, чечевицы сорта Полесская и льна сорта Киевский. Выбор объектов исследования обусловлен такими ценными качествами культур, как быстрый рост, неприхотливость к условиям освещения, питания и аэрации. Семена замачивали в водопроводной воде в чашках Петри и помещали в камеры установки "Магнитный экран", снижавший напряженность ГМП примерно в 10^5 - 10^6 раз⁶. Контролем служила камера, обеспечивавшая аналогичные условия прорастания семян и роста проростков в обычной геомагнитной обстановке, характерной для данного географического района (г.Дубна Московской области). В ходе проведенных исследований в камерах поддерживалась температура в стандартном режиме ($20,0 \pm 0,3$) °С. Продолжительность эксперимента составляла 73 часа.



Для электронномикроскопических исследований фиксацию кончиков корней длиной 1-2 мм проводили 2,5%-м раствором глутаральдегида (фирма "Serva", ФРГ) на 0,1 М какодилатном буфере (фирма "Fluka", Швейцария) pH 7,2 при комнатной температуре в течение 24 часов, промывали тем же буфером и постфиксировали 1%-м раствором осмиевой кислоты на какодилатном буфере в течение 12 часов на холоду. После промывки водой материалы обезвоживали в серии спиртов с возрастающей концентрацией и в пропиленоксиде и заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие продольные срезы кончиков корней получали на ультрамикротоме LKB-111, снимали на однощелевые бленды, покрытые напыленной углем формваровой пленкой, контрастировали уранил-ацетатом свинца. Изучение материала в электронном микроскопе JEM-1200 EX проводилось при ускоряющем напряжении 60 или 80 кВ преимущественно на серийных срезах.

Для выявления локализации свободного и слабосвязанного кальция применяли метод Тандлера¹⁷ в модификации Г.В.Заалишвили¹⁸. Этот метод основан на осаждении ионов кальция в виде электронноплотного гранулярного типа осадка пироантимоната кальция. Дегидратацию и заливку материала проводили по общепринятой методике, описанной выше. Полученные срезы корней не подвергались дополнительному контрастированию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Горох. При проведении электронномикроскопических исследований ультраструктуры клеток был выявлен ряд специфических особенностей меристематических клеток корней трехсуточных проростков гороха, экспонированных в условиях глубокого "магнитного вакуума" (МВ). В ядрах клеток наблюдалось изменение топологии конденсированного хроматина. В ГМП он располагался равномерно в нуклеоплазме клеток корней (рис.1а). В клетках проростков в условиях МВ компактный хроматин большей частью был ассоциирован с периферической зоной ядра в контакте с ядерной оболочкой, его сгущения реже обнаруживались вблизи ядрышка (рис.1б). Также выявлено уменьшение объема гранулярного компонента ядрышка и появление ядрышковых вакуолей (рис.2а), что, очевидно, свидетельствует о снижении активности синтеза ядрышковой РНК; в ряде ядер отмечено присутствие двух примерно одинаковых по структуре ядрышек (рис.2а).

Другой особенностью было присутствие в клетках большого числа липидных капель размером 0,1-0,5 мкм, преимущественно локализованных по периферии клеток вдоль тесно прилегающей к клеточной оболоч-

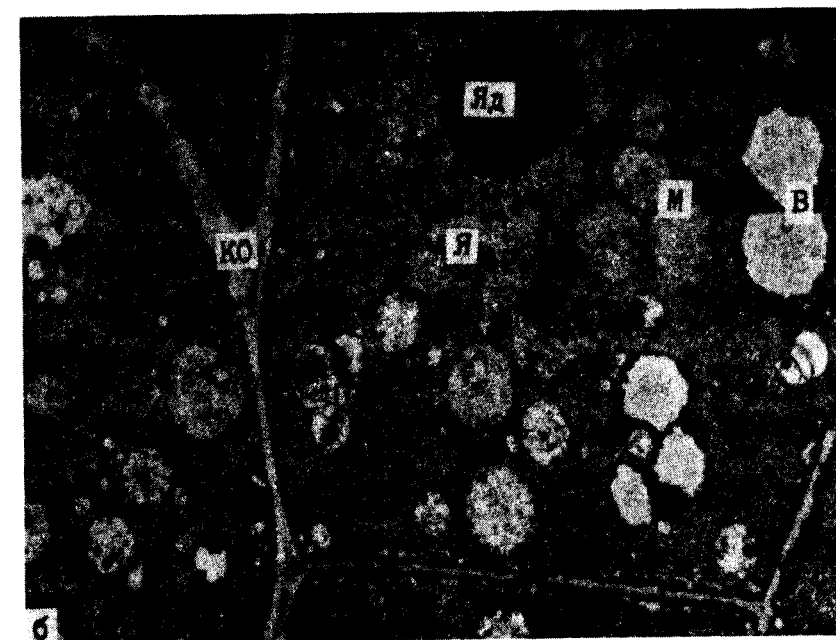
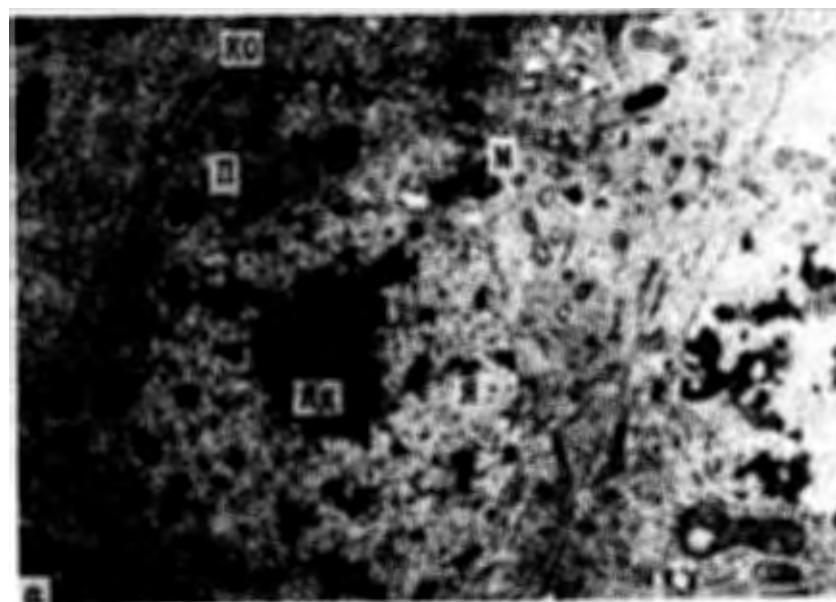


Рис.1. Общий вид клеток зоны меристемы корней трехсуточных проростков гороха: а) условия ГМП, х 4000; б) условия МВ, х 5000. Обозначения: В — вакуоль, КО — клеточная оболочка, М — митохондрия, П — пластида, Я — ядро, ЯД — ядрышко.

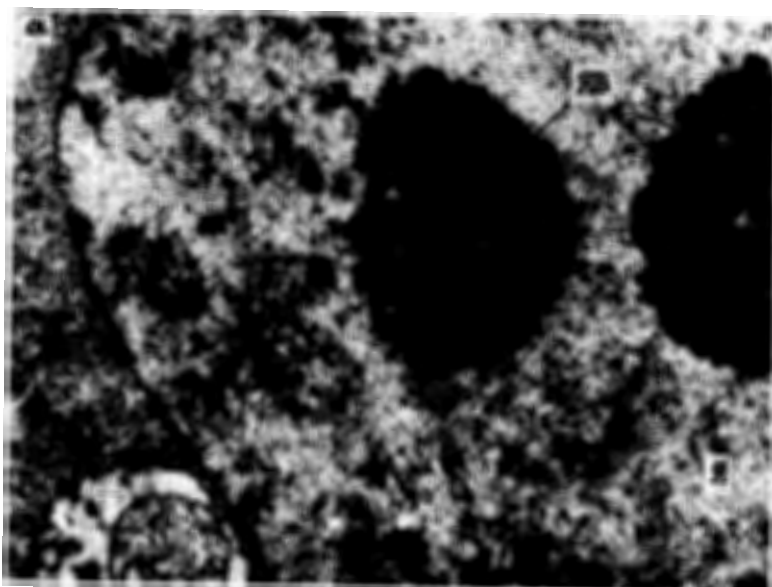


Рис.2. Фрагменты клеток зоны меристемы корней трехсуточных проростков гороха, находящихся в условиях МВ: а) ядро клетки, $\times 40000$; б) лизис гиалоплазмы с помощью цитосегресом. Наличие в митохондриях электронноплотного материала (стрелки), $\times 30000$. Обозначения: КО — клеточная оболочка, М — митохондрия, Ц — цитосегресома, Я — ядро, ЯВ — ядрышково-вакуоли.

ке плазмалеммы. К данному сроку проращивания семян в ГМП эти включения в клетках практически отсутствовали. Это может быть связано с более медленным протеканием процесса липолиза, осуществляемого с помощью липолитических ферментов. Последний факт, по-видимому, можно объяснить либо снижением синтеза этих ферментов, либо их ингибированием в связи с меньшими потребностями в энергии при экранировании ГМП.

В условиях МВ обнаружены различные компоненты литического компартмента: цитосегресомы, рыхлые и компактно упакованные миелопоподобные тела, вакуоли (рис.1б, 2б). Последние, как правило, имеют округлую форму, вдоль тонопласта видны электронноплотные отложения с рыхлой структурой, позволяющие интерпретировать такие вакуоли как остатки белковых тел. Лизис клеточных компонентов происходит также с помощью цитосегресом. Важную роль в их генезисе играют ферменты эндоплазматического ретикулума, цистерны которого, смыкаясь, изолируют участки цитоплазмы, а находящиеся в его полости гидролитические ферменты поступают внутрь такого замкнутого мешка. В некоторых случаях происходит частичная деградация содержимого цитосегресом с образованием миелопоподобных тел. Такие тела представляют собой структуры, состоящие из концентрически или коаксиально уложенных мембран, между которыми расположен гомогенный материал. Хотя нельзя исключить возможность образования миелопоподобных тел в результате усиленного роста плазмалеммы, однако нам кажется более предпочтительной точка зрения относительно резистентности мембранных компонентов клетки и разрушающему действию гидролаз¹⁹. Наличие различных компонентов литического компартмента, как правило, отсутствующих в контроле, может свидетельствовать о продвинутых паталогических процессах в меристематических клетках корней растений, растущих в условиях МВ.

Наиболее значительные изменения в условиях МВ претерпевала популяция митохондрий. Так, на 12% увеличилась их популяционная плотность (количество органелл на срезе клетки). В 1,5-2 раза возросли размеры отдельных органелл. Митохондрии, которые обычно имели несколько удлиненную ортодоксальную форму, в условиях МВ становились округлыми. Их кристы представляли собой узкие короткие трубки, выявляемые лишь на периферии органелл. Количество крист существенно снижалось (до нескольких на срезе митохондрий), а в некоторых органеллах они полностью отсутствовали. Матрикс митохондрий был просветленным, часто содержал электронноплотные включения, не обладавшие специфической структурированностью. Нити митохондриальных нуклеотидов не выявлены в матриксе. Лишь изредка обнаруживались на срезах органелл митохондриальные рибосомы. Подобный тип изме-

нений митохондрий классифицируется в литературе, посвященной данному вопросу¹⁰, как набухание органелл, обычно связанное с нарушением водно-солевого обмена, который опосредованно определяет угнетение функциональной активности. Кроме того, следует учитывать, что одной из важнейших функций митохондрий является поглощение из цитозоля ионов кальция, концентрация которых в нем должна поддерживаться на очень низком уровне, так как даже незначительные изменения этого параметра служат регуляторами, сопрягающими внеклеточные стимулы с функциональной активностью клеток^{11,12}. Известно, что во внутренней мембране митохондрий находится транспортный белок, эффективно переносящий кальций в матрикс за счет мембранного потенциала. Как было показано в¹³, добавление значительного количества кальция к дышащим митохондриям приводило к полному прекращению синтеза АТФ, а вся энергия расходовалась на транспорт ионов кальция. При этом у митохондрий из различных тканей *in vivo* и *in vitro* обнаруживалась характерная реакция — набухание¹⁴⁻¹⁶, что свидетельствовало о длительном усилении потока кальция в клетке.

В ходе предварительного опыта по исследованию ультраструктур клеток меристемы корней наблюдали в условиях МВ присутствие мембраносвязанных структур, напоминающих Са-связанные центры мембран (рис.3).



Рис.3. Электронноплотные образования, напоминающие Са-связывающие центры мембран. Условия МВ, $\times 30000$.

Для проверки рабочей гипотезы об изменении баланса ионов кальция в клетках меристемы корней нами был проведен эксперимент по цитохимическому выявлению локализации свободных и слабосвязанных ионов кальция с помощью пироантимонатного метода. В результате анализа полученных данных показано, что в варианте ГМП осадок пироантимоната кальция присутствовал в больших количествах в периплазматическом пространстве и клеточной стенке, а также в виде редко встречающихся гранул во внутриклеточных Са-секвестирующих депо — ядре, пластидах, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и митохондриях (рис.4а). В условиях МВ большое количество гранул крупного размера выявлено в гиалоплазме клеток, а гранул более мелкого размера — в просветленном матриксе набухших митохондрий, тогда как в главном Са-содержащем компартменте, клеточной стенке и периплазме кальций присутствовал лишь в виде мелкого пылевидного осадка (рис.4б). Среди кальций-секвестирующих органелл важную роль играют митохондрии, внешний вид которых (набухшая конфигурация) и функциональное состояние (наличие избытка ионов кальция в матриксе) свидетельствуют о снижении их функциональной активности, направленной на выработку АТФ, и полное переключение на откачку кальция из гиалоплазмы.

Полученные с помощью цитохимической методики данные согласуются с результатами предварительного эксперимента, в котором в условиях МВ были выявлены Са-связывающие центры мембран (рис.3). Последние, как правило, образуются при избытке ионов кальция как специфическая реакция клеточных мембран. Пока не ясно, почему в этом эксперименте была включена система связывания кальция на мембранах. Однако, возможно, что именно этот процесс способствовал сохранению нормальной функциональной активности у митохондрий, форма которых была близкой к ортодоксальной конфигурации. Не исключено, что Са-связывающая способность мембран проявляется при относительно невысоких концентрациях этих ионов, которые находятся в диапазоне компенсаторных возможностей клеток.

Вероятно, существенное экранирование ГМП способно вызывать нарушения в системе пассивного и/или активного транспорта ионов кальция через плазматическую мембрану, что, в свою очередь, приводит к перенасыщению гиалоплазмы этими ионами, а также к включению системы их максимальной откачки на мембранах Са-секвестирующих органелл. Нельзя исключить возможность того, что для ряда клеток корней гороха неспецифической реакцией на ряд различных воздействий является открывание кальциевых каналов, по которым эти ионы проникают в клетки пассивно по градиенту концентрации, и как результат появление избыточного количества этих ионов.

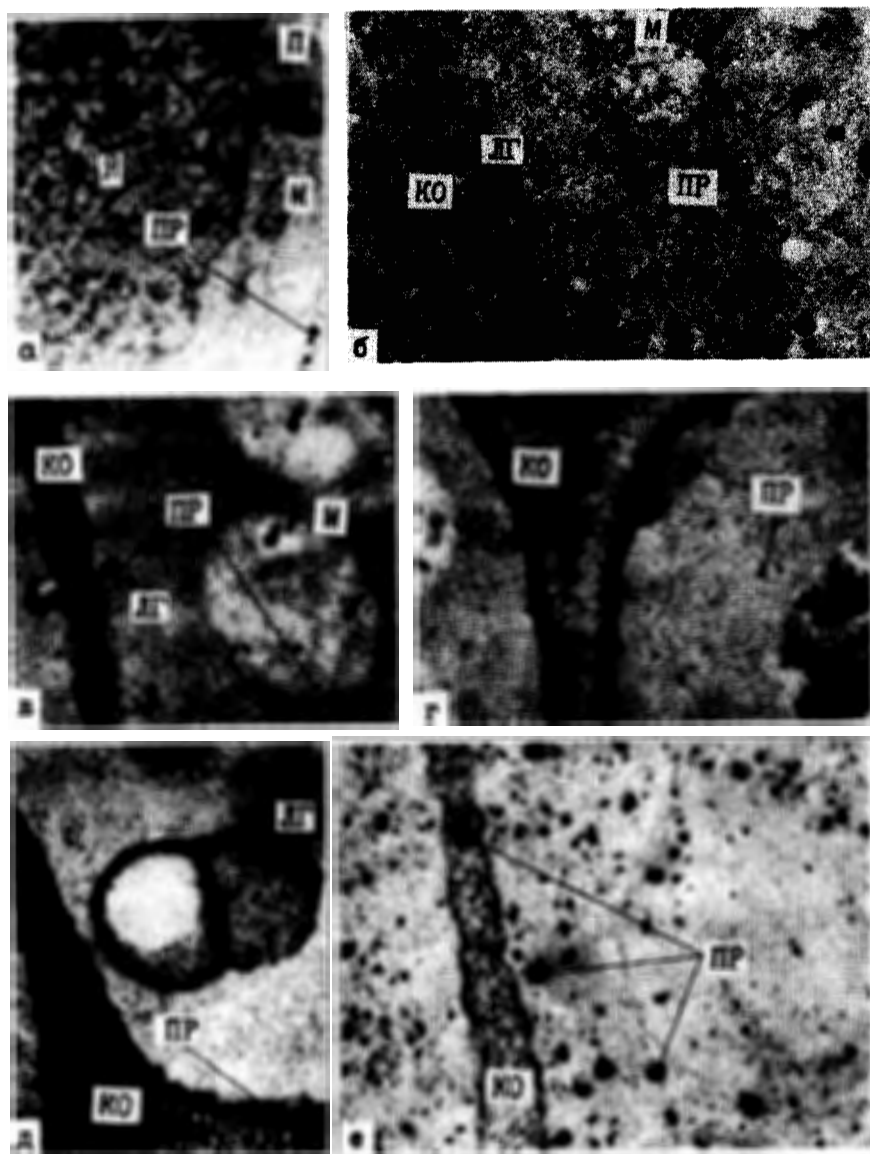


Рис.4. Цитохимическая реакция, выявляющая свободный и слабосвязанный кальций в клетках меристемы гороха (а, б), чечевицы (в, г) и льна (д, е) в условиях ГМП: а) — х 15000; в) — х 30000; д) — х 40000 и МВ: б) — х 20000; г) — х 30000; е) — х 40000. Обозначения: КО — клеточная оболочка, ЛГ — липидная глобула, М — митохондрия, П — пластида, ПР — преципитат, Я — ядро.

Чечевица. Ультраструктура клеток меристемы корней чечевицы, экспонированных в условиях МВ, практически не отличалась от таковой в ГМП. При изучении препаратов корней чечевицы, фиксированных по пироантимонатной методике, выявлено, что в варианте ГМП пироантимонат кальция в основном маркировал апопластный компартмент, равномерно располагаясь или же в большой степени концентрируясь вдоль плазмалеммы, а также внутриклеточные компартменты (рис.4в).

Характерной особенностью клеток зоны меристемы корней чечевицы в ГМП и МВ было присутствие большого числа белковых телец, варьирующих по размерам и степени их автолиза. К третьим суткам проращивания автолиз белковых телец был настолько продвинут, что белковый матрикс оставался лишь у части органелл этой популяции и в основном на периферии. Лизированная зона белковых телец была плотно заполнена преципитатом цитохимической реакции (рис.4г). Формирующиеся в результате автолиза белковых телец вакуоли различного размера содержали меньшее количество продукта реакции, в крупных вакуолях гранулы пироантимоната кальция были обнаружены большей частью на периферии органелл, вдоль тонопласта.

Митохондрии в клетках данного вида как в ГМП, так и в условиях МВ были представлены овальными или круглыми органеллами с электроннопрозрачным матриксом и короткими кристами, расположенными на периферии этих органелл (рис.4в). Продукт цитохимической реакции в виде различного размера гранул маркировал матрикс митохондрий (рис.4в). Мелкие гранулы пироантимоната кальция интенсивно маркировали нуклеоплазму ядер и зону ядрышковых вакуолей. Компактный хроматин и компоненты ядрышек были лишены осадка. Интересно отметить, что продукт цитохимической реакции интенсивно окрашивал инвагинации плазмалеммы (рис.4в,г). Характер маркирования внутриклеточных органелл и апопластного компартмента в условиях МВ почти не отличался от ГМП. Сильнее выражена была тенденция к интенсивному маркированию зоны, прилегающей к наружной поверхности плазмалеммы, тогда как центральная часть клеточной оболочки содержала гораздо меньшее число гранул пироантимоната, чем в условиях ГМП (рис.4в,г). Особенностью варианта МВ было появление продукта цитохимической реакции в гиалоплазме клеток (рис.4г). Более интенсивной выглядела реакция в митохондриях.

Таким образом, в клетках меристемы корней чечевицы, экспонированных в условиях МВ, наблюдается поступление ионов кальция в гиалоплазму клеток, очевидно, из апопластного компартмента; при этом активизируется работа митохондрий по откчке иона-регулятора из гиалоплазмы в матрикс этих органелл.

Лен. Анализ препаратов корней льна показал, что в целом ультраструктура клеток в условиях МВ не претерпевала существенных изменений по сравнению с естественными условиями ГМП.

При изучении материала с использованием пироантимонатной реакции в клетках меристематической зоны корней в ГМП обнаружено, что пироантимонат кальция в основном сосредоточен в апопластном компартменте, где его гранулы практически равномерно маркировали материал клеточной стенки, узкое периплазматическое пространство и инвагинации плазмалеммы (рис.4д). В пластидах осадок пироантимоната кальция присутствовал в межмембранном пространстве оболочек и в просветах периферического пластидного ретикулума. Клеточная структура, проявляющая позитивную реакцию на ионизированный кальций и окруженная одной мембраной, очевидно, представляет собой микротельце. Подобную идентификацию подтверждает и такой топографический признак, как наличие плотного протяженного контакта с липидной глобулой (рис.4д). Подобные пространственные ассоциации между микротельцами и липидными глобулами свидетельствуют о глиоксиомной функции первых, т.е. об их участии в процессах липолиза¹¹⁷. Важно отметить тот факт, что в месте контакта между микротельцем и липидной глобулой интенсивность реакции на ионизированный кальций гораздо выше, чем в соседних неконтактирующих зонах, что может служить подтверждением имеющихся данных об участии ионов кальция в стимуляции ряда липолитических ферментов¹¹⁸.

В результате электронноцитохимического изучения локализации ионизированного кальция в клетках меристемы корней льна в условиях МВ обнаружено резкое отличие по сравнению с ГМП (рис.4е). Выявлена цитохимическая реакция в гиалоплазме клеток, где преципитат практически отсутствовал в ГМП. В условиях МВ значительно снизилась интенсивность реакции в апопластном компартменте, что свидетельствует о выходе ионов кальция из клеточной стенки в гиалоплазму. Концентрация пироантимоната кальция в пластидах была сравнима с цитоплазматическим "фоном" (рис.4е), повышенная концентрация преципитата выявлена лишь вокруг крахмальных зерен. Высокая степень маркирования преципитатом в МВ была присуща митохондриям, гранулы пироантимоната кальция полностью отсутствовали в липидных глобулах, мелкий преципитат реакции обнаружен в петлях компактного хроматина, в ядрышковом организаторе, в незначительном количестве на компактном и гранулярном компонентах ядрышка.

Итак, цитохимические исследования выявили определенную закономерность в реакции меристематических клеток различных видов растений на экранирование ГМП — появление свободного и слабосвязанного кальция в гиалоплазме клеток, по-видимому, поступающего в нее из апопласта. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что МВ

способен вызывать нарушения структурно-функционального состояния клеток корней высших растений, в первую очередь, кальциевого гомеостаза. Последнее позволяет предположить, что одним из важнейших механизмов, определяющих реакцию растительных организмов на условия МВ, является нарушение в системе пассивного и/или активного транспорта ионов кальция через плазматическую мембрану, что приводит к перенасыщению гиалоплазмы этими ионами и переключению митохондрий на их откачку.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о важной роли ГМП в жизни растений. Оно является существенным фактором, определяющим нормальный метаболизм в их клетках. В результате глубокого экранирования ГМП наблюдается общая реакция клеток меристематической зоны исследованных видов растений — увеличение в гиалоплазме концентрации ионов кальция, практически отсутствующего при росте проростков в условиях ГМП. По интенсивности маркирования продуктом цитохимической реакции гиалоплазмы меристематических клеток можно составить следующий ряд в порядке возрастания: чечевица, горох, лен. Вместе с тем, пока не представляется возможным сделать окончательный вывод о том, является ли изученный нами параметр клеточного метаболизма первичной реакцией на столь сильное ослабление ГМП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бучаченко А.Л., Сагдеев Р.З., Салихов К.Н. — Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. Новосибирск; Наука, 1978, с.296.
2. Пирузян Л.А., Кузнецов А.Н. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1983, № 6, с.805.
3. Кузнецов А.Н., Ваняг В.К. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1987, № 6, с.814.
4. Говорун Р.Д. и др. — ОИЯИ, P19-90-333, Дубна, 1989.
5. Фомичева В.М., Говорун Р.Д., Данилов В.И. — ОИЯИ, P19-91-40, Дубна, 1991.
6. Давидков Д.С. и др. — ОИЯИ, P13-81-586, Дубна, 1981.
7. Tandler C.J., Libanati C.M., Sanchis C.A. — J. Cell Biol., 1970, 45, p.355.
8. Заалишвили Г.В. — Электронномикроскопическое изучение локализации кальция в клетках корневых апексов в ячмене. Автореф. канд. дис., М., 1983.
9. Белицер Н.В. — Цитология, 1972, 14, с.836.
10. Ченцов Ю.С. — Общая цитология. М.: "МГУ", 1984.
11. Орлов С.Н. — Усп. совр. биол., 1981, 92, с.19.
12. Rasmussen H. — Fed. Proc., 1980, 39, p.1519.
13. Nicholson C. — Ann. New York Acad. Sci., 1980, 356, p.346.
14. Rublikover S.L., Dunkan C.J., Smith J.L. — Cell Tissue Res., 1977, 185, p.373.
15. Kroener H. — Biochem. Pharmacol., 1982, 31, p.1069.

16. Петруняка В.В., Научитель М.М., Лебедев О.Е. — Цитология, 1984, 26, с.896.
17. Белицер Н.В., Субелиани В.Р. — Ботан. журн., 1980, 65, с.206.
18. Kauss H. — Ann.Rev. Plant Physiol., 1987, 38, p.47.

**Рукопись поступила в издательский отдел
23 января 1991 года.**