

УДК: 663.543.005

**Вплив кліностатування на ультраструктурну організацію і функціонування
меристематичних клітин проростків гороху
Н.І.Адамчук-Чала, М.А.Соболь**

*Інститут ботаніки імені М.Г.Холодного НАН України (Київ, Україна)
m_nv@mail.ru*

Повільне горизонтальне кліностатування впливає на ультраструктурну організацію і функціонування кореневих і верхівкових меристем 3-добових проростків гороху. Ядерця в ядрах клітин периферійної зони апікальної меристеми кліностатованих проростків, як і ядерця кореневих меристем, містять ядерцеві вакуолі і характеризуються низькою функціональною активністю. При кліностатуванні в ядерцях меристематичних клітин корінця гороху змінюється кількість і локалізація фібриларину і нуклеоліну, найбільш важливих білків процесингу РНК. Отримані результати надають необхідну інформацію для розуміння і наступного вивчення ультраструктурних і молекулярних рівнів регуляції клітинного циклу.

Ключові слова: *меристема, горох, кліностатування, ядерце, фібриларин, нуклеолін.*

Вступ

Відкриття гравічутливості клітин поставило перед сучасними дослідниками наступні проблемні питання, що стосуються впливу мікрогравітації на процеси проліферативної активності та розвитку рослинних клітин: Які особливості механізму запуску клітинного поділу в умовах зміни сили тяжіння; Чи діє чинник на рівень генної експресії; Які первинні зміни метаболізму меристематичних клітин викликає мікрогравітація; За рахунок якої фази при мікрогравітації змінюється термін клітинного циклу; Які структурно-функціональні зміни меристематичних клітин сприяють їх адаптації до мікрогравітаційного стресу?

Результати космічних досліджень проліферативної активності меристематичних клітин мають суперечливий характер. За даними (Бармичева и др., 1989), під дією мікрогравітації у 7-добових паростків кукурудзи мітотична активність зменшувалася на 15–30 %. Автори зазначали, що подібний ефект впливає на зниження проліферативного пулу і змінює термін інтерфази і мітозу за рахунок скорочення останнього. В інших космічних біоекспериментах не відмічалось статистично вірогідної відмінності за мітотичною активністю клітин кореневої меристеми між контрольним і польотним варіантами (Kordyum, 1997). Проте за матеріалами попередніх біокосмічних експериментів відомо, що умови мікрогравітації суттєво впливають на структурно-функціональну організацію клітин кореневих меристем крес-салату (Kordyum, 1997), клітини корпусу та туніки етіольованих паростків бальзаміну виявилися менш чутливими до дії зміни сили тяжіння (Недуга и др., 1991). Дані про значний вплив кліностатування на розвиток клітин мезофілу та формування фотосинтетичного апарату проростків арабідопсису та гороху представлений в статтях (Адамчук, 1999, 2003). Дослідження білок-синтезуючого апарату клітин кореневих меристем кліностатованих проростків крес-салату виявило суттєвий вплив чинника на локалізацію фібриларину – найважливішого попередника pre-rRNA (Sobol, 2003). Клітини апікальних меристем пагону під дією кліностатування взагалі не вивчалися.

Матеріали і методи

За основний об'єкт дослідження були обрані клітини зон меристеми апексу пагону та головного кореня 3-добових проростків гороху (*Pisum sativum* L.). Апекси коренів покритонасінних рослин є зручним об'єктом для цитологічних досліджень внаслідок стабільності та чіткості топографії меристематичних клітин. Для вирощування рослинних об'єктів в умовах кліностатування нами були використані горизонтальні кліностати із швидкістю 2 оберти на хвилину.

Апекси пагінців 3-добових контрольних і кліностатованих проростків гороху фіксували у розчині 3%-го глютарового альдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) протягом доби при –5°C з попередньою інфільтрацією зразків шприцом об'ємом 20 мл у польових умовах. Після 15-хвилинного занурення матеріалу в аналогічний буфер у лабораторних умовах проводилася його півторагодинна постфіксація у 1%-му розчині OsO₄ на тому ж самому буфері з наступним зневоднюванням у спиртах висхідної концентрації і ацетоні. Зразки полімеризували у суміші епоксидних смол. Параметри ультраструктурних елементів досліджуваних клітин визначали в електронному трансмісійному мікроскопі JEM-1200EX за методом (Васильєв, Муравник, 1997). Для статистичної обробки даних застосовували програму Microsoft Excel 2000.

Антитіла до ДНК (Sigma) були використані у розведенні 1:5 в блокуючому розчині (2%-ий альбумін бичачої сироватки (BSA), 0,05%-ий Tween 20 у PBS). Антитіла до NorA100 розводили в блокуючому розчині 2%-ого BSA і 0,05%-ого Tween 20 в PBS у співвідношенні 1:50 для ультраструктурної імуноцитохімії. Всі антитіла поставлені фірмою Sigma. Вторинні антитіла були кон'юговані з частками золота діаметром 10 нм для ультраструктурної імуноцитохімії.

Корені гороху фіксували сумішшю 4%-ого формальдегіду та 0,5%-ого глутаральдегіду у фосфатному буфері, рН 7,2 протягом 3 годин при кімнатній температурі. Меристеми дегідрували в етанолі зростаючої концентрації та заключали в акрилову смолу LRWhite. Ультратонкі зрізи товщиною 70–80 нм монтували на покритих формваром нікелевих сітках.

Ультратонкі зрізи меристем, заключених в смолу LRWhite, витримували у блокуючому розчині BSA-PBST та інкубували у первинних антитілах до ДНК (до NorA100 відповідно) протягом 1 години. Зрізи промивали у PBST та інкубували з вторинними антитілами протягом 1 години. Сітки фарбували у 2%-ому розчині ураніацетату протягом 15 хвилин. Препарати досліджували у трансмісійному електронному мікроскопі Philips 300, при 80 кВ. Щільність мічення над цитоплазматичними компартментами, ядерними структурами та субядерцевими компонентами вираховували, використовуючи програму "QWin Standard" (Leica) для автоматичного аналізу зображень. Контроль мічення проводили, випускаючи інкубацію в первинних антитілах.

Результати та обговорення

Порівняльний структурно-функціональний аналіз клітин різних зон апікальних меристем виявив, що меристематичні клітини кліноставованих проростків різних шарів мали менший об'єм – $317,2 \pm 56,0$ мкм³, порівняно з клітинами контрольного варіанту – $596 \pm 77,0$ мкм³. Нуклеоплазма та ядерця клітин експериментального варіанту на електронограмах мали гетерогенну гранулярну компоненту (рис. 1). Особливо ця відмінність була властива клітинам центральної зони. Параметри меристематичних клітин апексів пагону та корінця контрольних і кліноставованих проростків були подібні, проте ядерця в них містили ядерцеві вакуолі і, вірогідно, мали меншу функціональну активність. Проведене нами комплексне дослідження структурно-функціональної організації ядерця клітин кореневих апексів проростків гороху із застосуванням методів електронної імуноцитохімії в умовах кліноставування дозволило виявити суттєві особливості ядерця порівняно з контролем і, таким чином, вперше встановити зміну рівня їх функціональної активності під впливом зміненої гравітації.

Ядерця в клітинах гороху, за нашими даними, згідно прийнятої морфо-функціональної класифікації (Челидзе, Зацепина, 1988), відносяться до компактного типу, для якого характерний високий рівень функціональної активності. При підвищенні ядерцевої активності гетерохроматин фібрилярних центрів поступово деконденсується з утворенням тонких фібрил рДНК. Навпаки, при зниженні рівня функціонування ядерця рДНК всередині фібрилярних центрів поступово конденсується до утворення кластерів гетерохроматину (Highett et al., 1993). Це призводить до висновку, що конформацийні зміни фібрилярних центрів тісно пов'язані з транскрипційною активністю рДНК (Yano, Sato, 2000).

Між фібрилярними центрами виявлені філаменти ДНК, які утворюють щільний фібрилярний компонент, мічений на ультраструктурному рівні антитілами до ДНК. Отримані нами результати співпадають з літературними даними щодо наявності в фібрилярних центрах більшої кількості рДНК, ніж у щільному фібрилярному компоненті (Rawlins, Shaw, 1990).

В контрольному варіанті фібрилярні центри та щільний фібрилярний компонент були мічені антитілами до NorA100. В фібрилярних центрах більша частина NorA100 була розташована над перехідною зоною ФЦ-ЩФК (рис. 2, 3; табл. 1). Відомо, що нуклеолін активує транскрипцію р-генів (Lareyre et al., 1987). Отже, нуклеолін, як і всі його гомологи, є поліфункціональним білком, і баланс між виконанням ним окремих функцій залежить від превалювання в його структурі тих чи інших доменів (Ginisty et al., 1998, 1999). За нашою думкою, NorA100, виявлений нами в фібрилярних центрах, забезпечує деконденсований, потенційно-активний стан рДНК. NorA100, розташований у перехідній зоні ФЦ-ЩФК, вельми ймовірно, є задіяним в активації транскрипції рДНК та у ранньому процесингу пре-рРНК, яка синтезується. Ультраструктурна локалізація ДНК та гомологу нуклеоліну NorA100, до функцій якого входить регуляція процесів конденсації–деконденсації р-хроматину і підтримка рДНК у потенційно-активному стані, в фібрилярних центрах дала нам змогу візуалізувати потенційно-активні ділянки рибосомальної ДНК. Локалізація ДНК та NorA100 в перехідній зоні ФЦ-ЩФК дозволила також візуалізувати процеси активації р-генів та транскрипції рибосомальної ДНК, в яких бере участь NorA100, та раннього процесингу рибосомальної РНК, вклад в який робить і гомолог

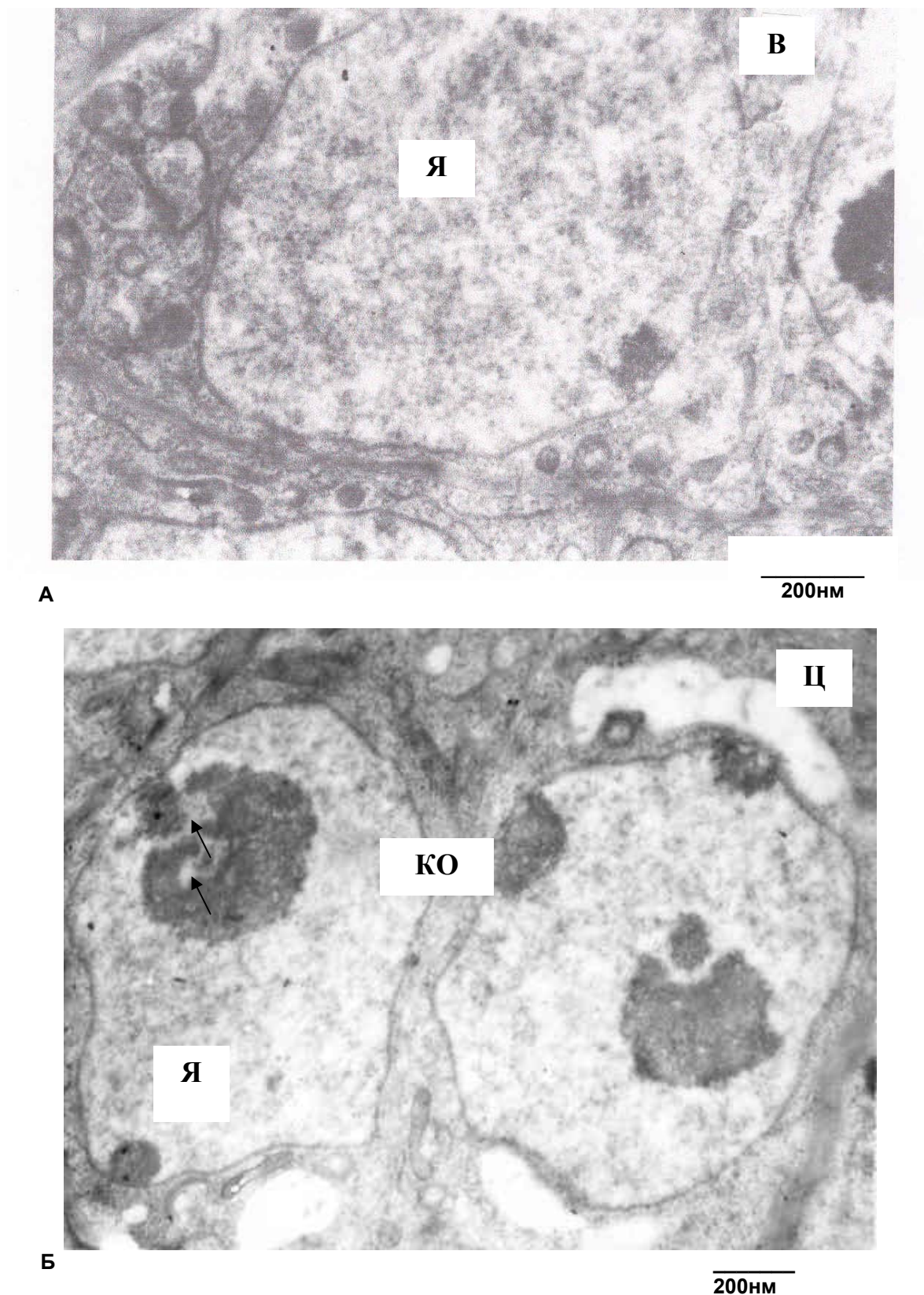
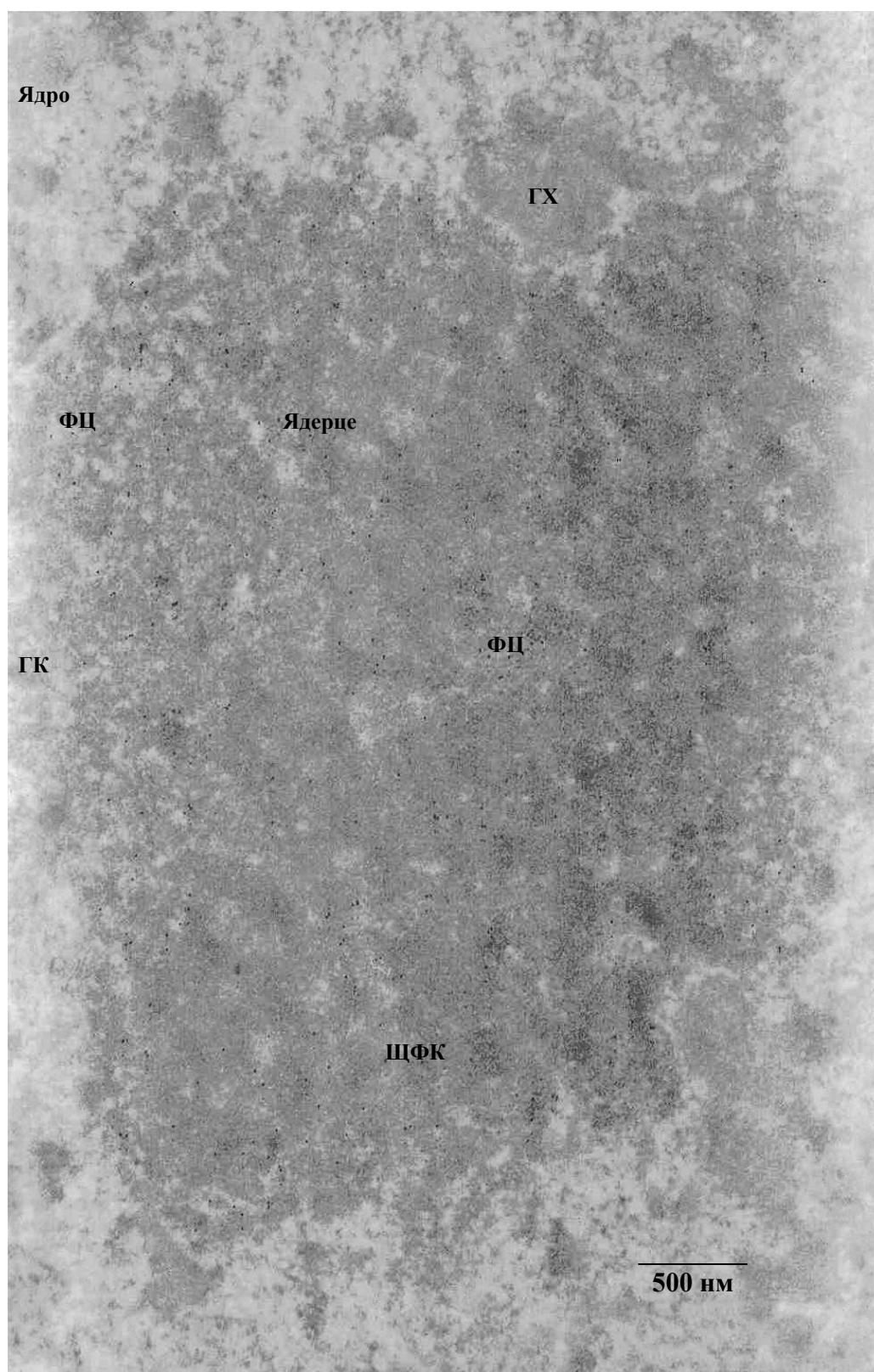
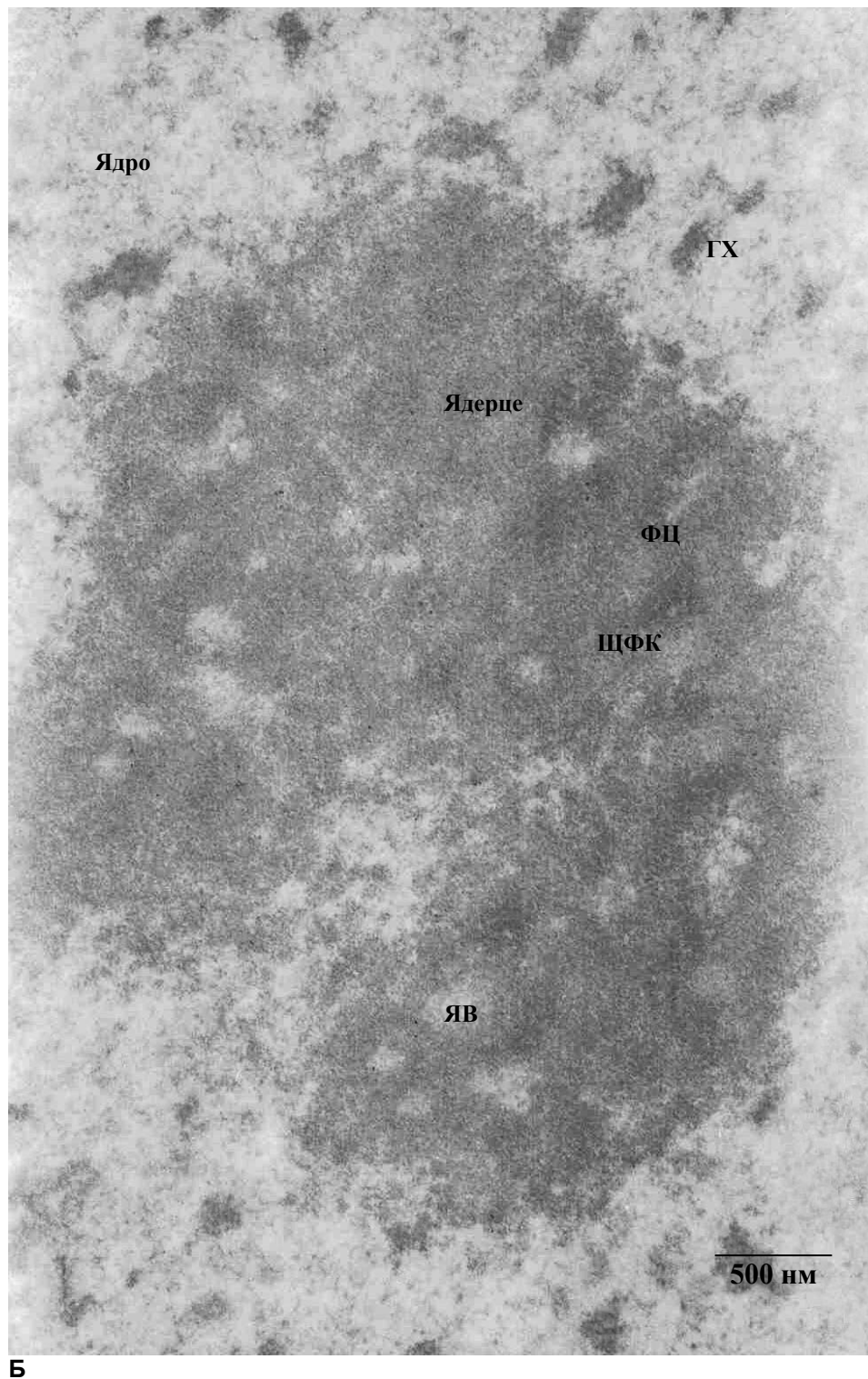


Рис. 1. Фрагменти клітин меристем апексу пагінцю проростку гороху: А – контроль, Б – кліноостатування, Я – ядро, КО – клітинна оболонка, В – вакуоль, Ц – цитоплазма, стрілками вказано ядерцеві вакуолі



А



Б

Рис. 2. Імуноцитохімічна локалізація NorA100 антитілами до NorA100 за умов контролю (А) та кліностатування (Б). Умовні позначення: ФЦ – фібрилярний центр; ЩФК – щільний фібрилярний компонент; ГК – гранулярний компонент; ЯВ – ядерцева вакуоль; ГХ – гетерохроматин

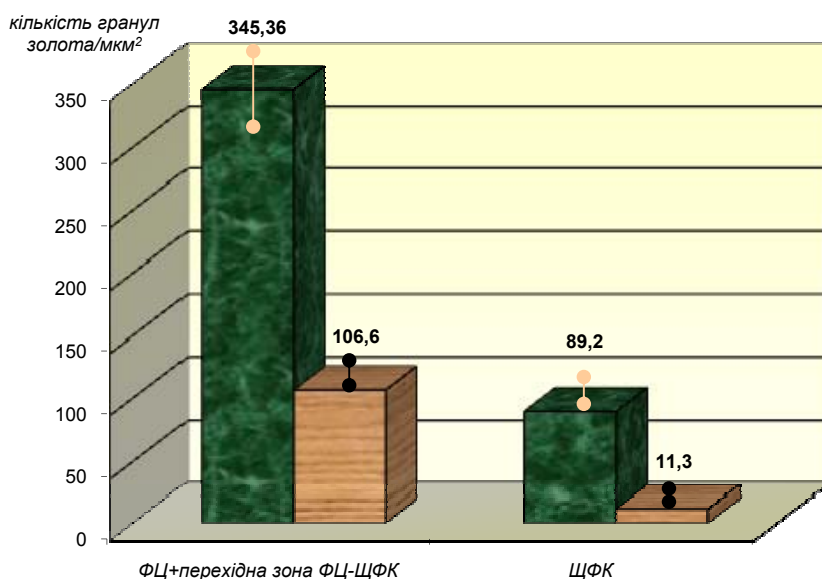


Рис. 3. Гістограма щільності мічення антитілами до NorA100 ядерця в контролі та за умов зміненої гравітації:

- контроль;
- кліноштатування.

Таблиця 1.

Кількісний аналіз розподілу мітки антитіл до NorA100 в ядерцевих субкомпонентах в контролі та за умов зміненої гравітації

Умови експерименту	ФЦ+перехідна зона ФЦ-ЩФК	ЩФК
	кількість гранул золота/мкм ²	
Контроль	345,36±54,42	89,21±14,77
Дослід	106,60±13,22***	11,39±1,31***

*** $p < 0,001$

нуклеоліну. Ультраструктурна детекція NorA100 в щільному фібрилярному компоненті дала змогу візуалізувати наступні стадії процесингу рРНК, які проходять за участю цього білку. Наявність в щільному фібрилярному компоненті ДНК, з врахуванням присутності гомологу нуклеоліну, свідчить про транскрипцію р-генів не лише на периферії фібрилярних центрів, але й на ділянках рибосомальної ДНК, простягнутої між фібрилярними центрами.

В умовах зміненої гравітації ми продемонстрували морфологічні перебудови ядерця, які відображаються в його переході з компактного, вельми активного типу, до вакуолізованого типу, який характеризується помірним рівнем функціональної активності. Кожний морфологічний тип ядерця відображає рівні трьох основних процесів, пов'язаних з біогенезом рибосом: транскрипції рДНК, процесингу пре-рРНК та виходу передрибосом в цитоплазму. Отже, можна припустити, що перебудови ядерцевої структури є морфологічним проявом змін у співвідношенні рівнів цих процесів, в нашому випадку, в бік зменшення функціонального навантаження ядерця.

Виявлено зменшення втричі кількості NorA100 у внутрішньому просторі фібрилярних центрів та зменшення у вісім разів його вмісту в щільному фібрилярному компоненті та перехідній зоні ФЦ-ЩФК порівняно з контролем. Збільшення кількості рДНК, локалізованої в фібрилярних центрах, корелювало зі зменшенням кількості NorA100, що дало нам змогу припустити зниження рівня транскрипції рДНК та перехід її у потенційно-активний або неактивний стан. Виявлене зменшення кількості NorA100 в

щільному фібрилярному компоненті дало нам змогу висловити припущення про зниження рівня процесингу рРНК.

Виявлені структурно-функціональні зміни меристематичних клітин допоможуть спрогнозувати наступні відхилення у спеціалізації клітин досліджуваних рослин, розробити способи корекції цих відхилень при створенні космічних рослинних технологій.

Висновки

Повільне горизонтальне кліностатування впливає на структурно-функціональну організацію кореневих і верхівкових меристем 3-добових паростків гороху. При тривалій його дії зменшується об'єм меристематичних клітин апексу пагону гороху. Ядерця в ядрах клітин периферійної зони апікальної меристеми кліностатованих проростків, як і ядерця кореневих меристем, містили ядерцеві вакуолі і характеризувалися низькою функціональною активністю. Встановлена динаміка змін вмісту NorA100 в ядерцевих субкомпонентах вказує на те, що в ядерцях клітин кореневих меристем гороху гомолог нуклеоліну NorA100 переважно бере участь в процесингу рРНК.

Виявлені нами в умовах кліностатування особливості ультраструктурної організації ядерцевих субкомпонентів, пов'язані зі змінами локалізації рДНК та кількості одного з найважливіших функціональних ядерцевих білків – NorA100, свідчать про зниження рівня транскрипції рДНК та процесингу рРНК, що дозволяє встановити зниження рівня функціональної активності ядерців під впливом зміненої гравітації.

Отримані результати надають необхідну інформацію для розуміння та подальшого вивчення ультраструктурних та молекулярних рівнів регуляції клітинного циклу.

Список літератури

- Адамчук Н.И. Влияние клиностатирования на фотосинтетический аппарат семисуточных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Космична наука і технологія. Додаток. – 2003. – Т.9, №2. – С. 44–47.
- Адамчук Н.И. Зміни структурно-функціональної організації клітин мезофілу гороху за умов кліностатування // Физиология и биохимия культ. растений. – 1999. – Т.31, №4. – С. 266–269.
- Бармичева Е.М., Гриф В.Г., Таирбеков М.Г. Рост и структура клеток корневых апексов кукурузы в условиях полёта // Цитология. – 1989. – Т.31. – С. 1324–1328.
- Васильев А.Е., Муравник Л.Е. Динамика клеточных компонентов тканей листа *Populus deltoides* (Salicaceae) в ходе жизненного цикла. 2. Палисадный мезофилл в ходе роста // Ботанический журнал. – 1997. – Т.82, №9. – С. 1–13.
- Недуга Е.М., Кордюм Е.Л., Филиппенко В.Н., Чучкин Ж.А. Влияние микрогравитации на клеточные оболочки надземных органов проростков *Impatiens balsamina* L. // Депон. В ВИНИТИ 08.01.91, №137-В. – С. 1–22. – Препринт, Киев, 1991. – 12с.
- Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии. – 1988. – Т.105, вып.2. – С. 252–268.
- Ginisty H., Amalric F., Bouvet P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing // EMBO J. – 1998. – Vol.17. – P. 1476–1486.
- Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. Structure and functions of nucleolin // J. Cell Sci. – 1999. – Vol.112. – P. 761–772.
- Highett M.I., Rawlins D.J., Shaw P.J. Different patterns of rDNA distribution in *Pisum sativum* nucleoli correlate with different levels of nucleolar activity // J. Cell Sci. – 1993. – Vol.104. – P. 843–852.
- Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinorotation // Int. Rev. Cytol. – 1997. – Vol.171. – P. 1–78.
- Lapeyre B., Bourbon H., Amalric F. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol.84. – P. 1472–1476.
- Rawlins D.J., Shaw P.J. Three-dimensional organization of ribosomal DNA in interphase nuclei of *Pisum sativum* by in situ hybridization and optical tomography // Chromosoma. – 1990. – Vol.99. – P. 143–151.
- Sobol M.A. Ultrastructural subnucleolar localization of fibrillarin, one of the most important proteins of pre-rRNA processing, is changed in altered gravity // J. Gravitational Physiology. – 2003. – Vol.10, №1. – P. 25–26.
- Yano H., Sato S. Ultrastructural localization of transcription sites, DNA, and RNA reveals a concentric arrangement of structural and functional domains in plant nucleolonema // Protoplasma. – 2000. – Vol.214. – P. 129–140.

Влияние клинотатирования на ультраструктурную организацию и функционирование меристематических клеток проростков гороха
Н.И.Адамчук-Чалая, М.А.Соболь

Медленное горизонтальное клинотатирование влияет на ультраструктурную организацию и функционирование корневых и верхушечных меристем 3-суточных проростков гороха. Ядрышки в ядрах клеток периферической зоны апикальной меристемы клинотатированных проростков, как и ядрышки корневых меристем, содержали ядрышковые вакуоли и характеризовались низкой функциональной активностью. При клинотатировании в ядрышках меристематических клеток корешка гороха изменяется количество и локализация фибрилларина и нуклеолина, наиболее важных белков процессинга РНК. Полученные результаты предоставляют необходимую информацию для понимания и последующего изучения ультраструктурных и молекулярных уровней регуляции клеточного цикла.

Ключевые слова: *меристема, горох, клинотатирование, ядрышко, фибрилларин, нуклеолин.*

Clinorotation influence on the ultrastructural organization and functioning of pea seedlings meristematic cells
N.I.Adamchuk-Chala, M.A.Sobol

Slow horizontal clinorotation influences the ultrastructural organization and functioning of root and stem apical meristems of 3-days-old pea seedlings. The parameters of meristematic cells from stem apex are changed under their induction. Nucleoli in the nuclei of peripheral zone of apical meristematic cells of clinorotated seedlings as well as nucleoli of root meristems are characterized by low functional activity. Under clinorotation in the nucleoli of pea root meristematic cells the quantity and localization of most important proteins of RNA processing – fibrillar and nucleolin are changed. Obtained results presented necessary information for understanding and next investigating of ultrastructural and molecular levels of cell cycle regulation.

Key words: *meristem, pea, clinorotation, nucleolus, nucleolin, fibrillar.*

Представлено О.І.Жуком
Рекомендовано до друку Н.Г.Шестопаловой