

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 20 (59). 2007. № 2. С. 3-9.

УДК 576.32.36:633

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ЯДРАХ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК ЛАВАНДЫ (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Бугара А.М., Бугара И.А., Теплицкая Л.М.

Проведено количественное цитофлуориметрическое исследование ядерной ДНК в процессе дифференциации секреторных терпеноидогенных структур различных морфологических типов у лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.). Установлено, что в интерфазных ядрах дифференцированных секреторных клеток железистых волосков содержится кратно увеличенное количество ДНК, соответствующее 4С, что является результатом эндорепродукции и выхода в конечную дифференцировку в G₂-периоде. В интерфазных ядрах секреторных клеток дифференцированных железок выявлено 2С ДНК.

Ключевые слова: *Lavandula angustifolia*, секреторные клетки, ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Секреторная функция характерна для большинства растительных клеток. Однако у многих видов растений имеются специализированные клетки, для которых эта функция является преобладающей. К таким клеткам можно отнести терпеноидогенные клетки, которые особенно характерны для эфирномасличных растений. Эти клетки могут располагаться одиночно или входить в состав клеточных комплексов различной сложности, объединяемых под общим названием секреторные (железистые) структуры, при этом секреторные клетки являются их основным структурным и функциональным элементом.

Секреторные терпеноидогенные клетки имеют своеобразную морфологию. Методом электронной микроскопии было показано, что для них характерны крупные ядра и ядрышки, а также слабо вакуолизируемая цитоплазма, насыщенная органеллами. При этом главной отличительной особенностью терпеноидогенных клеток является сильное развитие агранулярного эндоплазматического ретикулума – органеллы, которая обычно слабо развита в растительных клетках [1,2]. Цитохимические исследования позволили обнаружить в ядрах секреторных терпеноидогенных клеток кратно увеличенное количество ДНК, что может служить показателем значительной гиперфункции. Так, в ядрах секреторных эфирномасличных клеток мяты (*Mentha piperita* L. и *M. aquatica* L.)

было выявлено 4С ДНК, а в ядрах секреторных клеток герани (*Pelargonium roseum* Willd.) как 4С, так и 8С. При этом клетки с кратно увеличенным содержанием ДНК в ядре характеризовались повышенной интенсивностью в отношении биосинтеза эфирного масла [3,4]. Однако такие количественные цитохимические показатели содержания ДНК в ядрах секреторных терпеноидогенных клеток получены пока для очень ограниченного числа видов. Это, естественно, не позволяет сделать обобщающие выводы о цитофизиологических особенностях секреторных терпеноидогенных клеток растений. В этой связи привлечение для исследований новых, ранее не изученных в этом отношении видов, представляет не только значительный теоретический интерес, но и имеет прикладное значение для селекционно-генетических исследований, направленных на создание сортов эфирномасличных растений с повышенной продуктивностью эфирного масла.

Целью настоящей работы являлось количественное цитофлуориметрическое исследование содержания ДНК в ядрах секреторных терпеноидогенных клеток лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Степная, выращиваемые в полевых условиях. Бутоны, находящиеся на ранних стадиях развития (длиной 1 – 1,5 мм), изолировали с растений и фиксировали в смеси Карнуа [5] в течение 4-х часов (2 часа при комнатной температуре и 2 часа при 4°C в холодильной камере). Чашелистики отделяли от бутонов и использовали для приготовления временных давленных препаратов. Для морфологических исследований секреторных клеток препараты окрашивали ацетокармином [5]. Линейные размеры клеток измеряли окулярным винтовым микрометром МОВ 1x15. Для количественного цитохимического выявления ДНК использовали окраску оливомицином [6].

Цитохимические исследования содержания ДНК проводили на цитофлуориметре, состоящим из люминесцентного микроскопа Люмам-ИЗ, насадки ФМЭЛ-1 и регистрирующего устройства. Количество ДНК в ядрах клеток оценивали в классах плоидности – С, при этом в качестве эталона, принимаемого за 2С, служило содержание ДНК в ядрах клеток эпидермиса. Количество ДНК в ядрах железистых волосков лаванды определяли на следующих основных стадиях дифференциации: 1 – эпидермальную клетку, 2 – инициальную клетку, 3 – апикальную клетку, 4 – секреторную клетку дифференцированного железистого волоска. В ядрах эфирномасличных железок на стадиях: 1 – эпидермальную клетку, 2 – инициальную клетку, 3,4 – апикальные клетки, 5 – железка с 2-клеточной головкой, 6 – железка с 4-клеточной головкой, 7 – секреторные клетки дифференцированной 8-клеточной головки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические исследования позволили выявить на чашелистиках лаванды два типа дифференцированных железистых структур: 3-клеточные железистые волоски с одной секреторной клеткой-головкой и 10-клеточные железки, имеющие головку

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК

из 8 секреторных клеток (рис. 1). Дифференциация обоих типов железистых структур происходила из клеток эпидермиса. Начало процесса дифференциации обнаруживалось визуально по обособлению в эпидермисе инициальной клетки. В результате митотического деления инициальной клетки наблюдалось образование двух клеток – базальной и апикальной (2-клеточный комплекс). Апикальная клетка вновь вступала в митоз, что приводило к образованию универсального 3-клеточного комплекса состоящего из базальной клетки, промежуточной клетки-ножки и апикальной клетки. Если процесс дифференциации на этом заканчивался, то это приводило к образованию 3-клеточного железистого волоска, апикальная клетка которого приступала к выполнению секреторной функции. Однако, если апикальная клетка, входящая в состав 3-клеточного комплекса, проходила три волны синхронных митозов, то результатом являлось последовательное образование железки, головка которой состояла из 2-х, 4-х и, наконец, из 8-ми секреторных клеток.

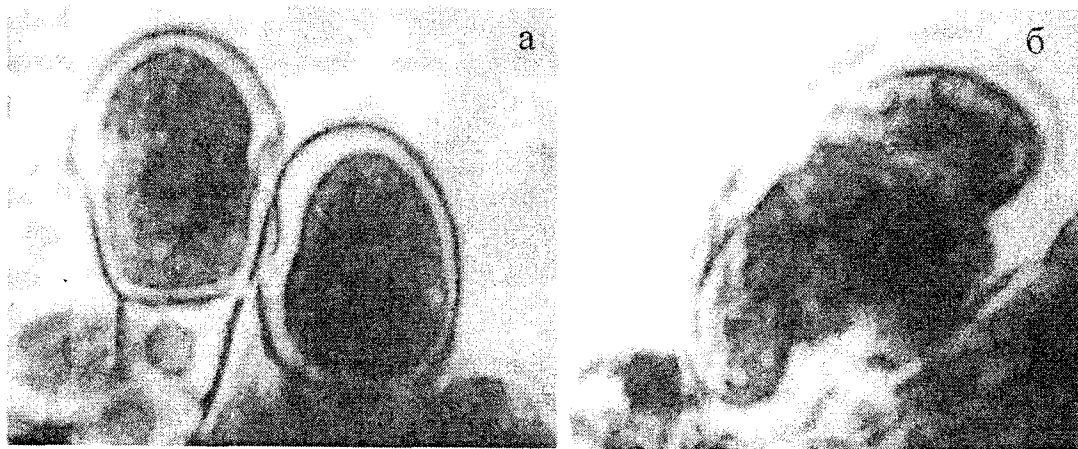


Рис. 1. Дифференцированные секреторные структуры различных морфологических типов на чашелистиках лаванды: а – 3-клеточные железистые волоски, б – 10-клеточные железки.

Диаметр секреторной клетки, образующей головку железистого волоска, находился в пределах 10 – 20 мкм, а диаметр 8-клеточной головки железки – в пределах 80 – 120 мкм. Секреторные клетки, входящие в состав железистых структур, имели крупные ядра с хорошо выраженным ядрышком, а также плотную цитоплазму с мелкими вакуолями. При этом расположенные рядом обычные эпидермальные (не секреторные) клетки характеризовались сильной вакуолизацией, имели ядра и ядрышки относительно небольшого размера, цитоплазма в таких клетках располагалась, как правило, тонким слоем вдоль клеточной стенки ввиду сильно развитой системы вакуолей.

На рисунке 2 представлены кривые изменения содержания ядерной ДНК на последовательных стадиях дифференциации секреторных структур. Из представленных результатов следует, что клетки эпидермиса чашелистиков лаванды

содержали в интерфазных ядрах 2С ДНК. На стадии инициальной клетки содержание ДНК в ядре приближалось к 4С, что связано с прохождением S- и G₂-периодов интерфазы. Такой же уровень ДНК обнаруживался в ядре апикальной клетки сразу после митоза, что указывает, на укорочение G₁-периода и очень быстрое вступление клеток в синтетический S-период. После деления апикальной клетки секреторная клетка уже сформированного железистого волоска содержала 4С ДНК и сохраняла его на этом постоянном уровне.

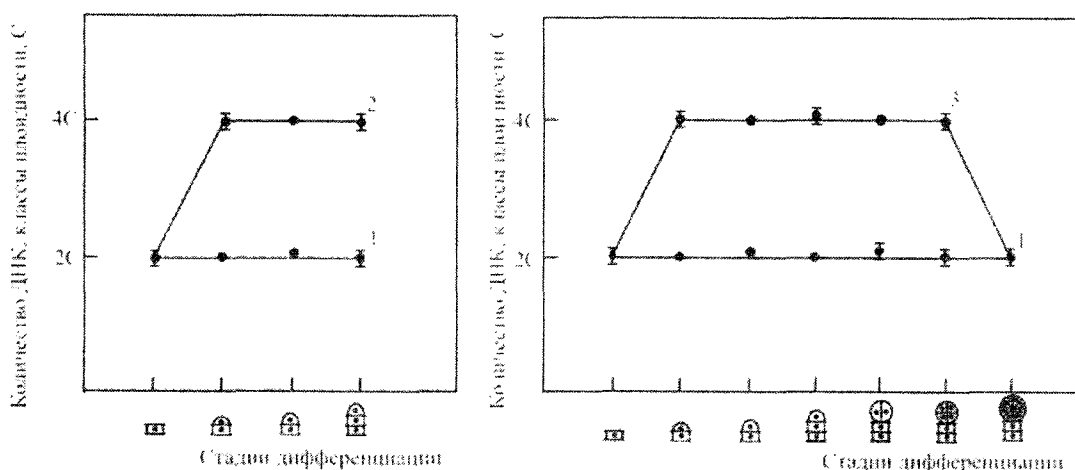


Рис 2. Динамика количественных изменений ДНК в процессе дифференциации секреторных структур лаванды: 1 – эпидермальная клетка, 2 – железистые волоски, 3 – железки с многоклеточной головкой

Таким образом, в процессе дифференциации железистых волосков наблюдалось несколько циклов репликации ДНК. Первый цикл репликации обнаруживался в инициальной клетке эпидермиса и завершался полным прохождением митоза, результатом которого являлось образование апикальной клетки 2-клеточного комплекса. Второй репликативный цикл выявлялся в апикальной клетке накануне митоза, приводящего к формированию 3-клеточного комплекса. В результате третьего цикла репликации, но уже без последующего митоза, наблюдалось увеличение количества ДНК до 4С, в результате чего дифференцированная секреторная клетка железистого волоска содержала кратно увеличенный уровень ДНК по сравнению с обычными клетками эпидермиса.

Ранние стадии дифференциации железок с многоклеточной головкой во многом напоминали этот процесс у железистых волосков. Среднее количество ДНК, близкое к 4С, сохранялось вплоть до стадии 4-клеточной головки. Однако ядра дифференцированных секреторных клеток 8-клеточной головки содержали 2С ДНК и не отличались по этому показателю от обычных клеток эпидермиса. Следовательно, в данном случае на заключительном этапе дифференциации процесс репликации ДНК в клетках 4-клеточной головки завершался полным прохождением митоза без последующей эндорепродукции.

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить некоторые морфологические и цитологические особенности секреторных терпеноидогенных клеток, входящих в состав железистых структур лаванды. Установлено, что эти клетки отличались от обычных клеток эпидермиса крупными ядрами и ядрышками, а также плотной цитоплазмой со слабо развитой системой вакуолей. Особый интерес представляют результаты цитофлуориметрического анализа ДНК в ядрах секреторных терпеноидогенных клеток, входящих в состав железистых структур. Как было показано, дифференцированные секреторные клетки железистых волосков и железок отличались по содержанию ДНК в интерфазных ядрах. Так, единственная секреторная клетка железистого волоска имела 4С ДНК в ядре, а каждая из 8 секреторных клеток железок – 2С. Следовательно, в интерфазных ядрах специализированных секреторных клеток железистых структур различных морфологических типов было выявлено различное содержание ДНК.

Установленный факт дает основание считать, что в процессе дифференциации железистых волосков лаванды на заключительной стадии наблюдается кратное увеличение количества ДНК в ядре как результат сокращения клеточного цикла. Известно, что кратное увеличение количества ДНК в ядре может быть обусловлено двумя основными причинами. Это увеличение может являться результатом полиплоидии или политении [5]. Полиплоидия возникает в результате удвоения числа хромосом в соматической клетке и является, как правило, следствием полиплоидизирующего митоза, остановленного на той или иной стадии. Политения представляет собой удвоение, обычно многократное, числа хромосом (хроматид) в диплоидном наборе хромосом. В данном случае выпадает весь механизм митоза, и клетка блокируется в G_2 -периоде. При этом структура цикла включает всего два периода – синтетический и межсинтетический.

Из изложенных фактов естественно возникает вопрос, как соотнести уже известные данные с полученными нами результатами, показавшими кратное увеличение содержания ДНК в секреторных клетках железистых волосков лаванды. Анализ морфологических изменений, происходящих в процессе дифференциации железистых волосков, показал полное отсутствие картин полиплоидизирующего митоза. Секреторные клетки, содержащие 4С ДНК в ядре, имели типичную интерфазную организацию, в них обнаруживались крупные хромоцентры и одно крупное ядрышко. Проведенные нами морфологические и цитохимические исследования дают основание полагать, что в данном конкретном случае полиплоидия как вариант умножения генома маловероятна. Вместе с тем секреторные клетки железистых структур лаванды нельзя отнести к классическим случаям политении, так как она предполагает все же серию многократно повторяющихся репликаций. Однако в процессе дифференциации железистых волосков эндорепродукция наблюдалась всего один раз, и рассматривать этот факт как случай классической политении было бы не совсем правильно.

Случай кратного увеличения содержания ДНК в клетках растений довольно распространенное явление. Различным аспектам этой проблемы посвящено значительное количество работ. Клетки, с кратно увеличенным по отношению к диплоидному уровню содержанием ДНК, описаны в тканях корня, стебля, листа,

зародыша, эндосперма, семяздолей, пыльника [7-9]. Во всех исследованных случаях авторы указывали на более высокий уровень функциональной активности клеток с кратно увеличенным содержанием ДНК в ядре.

Вероятно, кратное увеличение количества ДНК в ядрах секреторных клеток железистых волосков лаванды придает этим клеткам целый ряд полезных свойств. Следствием выхода клеток в конечную дифференцировку в G₂-периоде, и обусловленное этим кратное повышение содержания ДНК в ядре, является удлинение активной жизни клетки из-за исключения процесса митоза. Хромосомы таких клеток находятся в интерфазе, а, следовательно, всегда в активном состоянии. В этой связи потенциал таких клеток не расходуется на синтез структурных и ферментных белков, необходимых для прохождения митоза, а целиком используется на синтез необходимых продуктов, в данном конкретном случае компонентов эфирного масла (терпеноидов).

В связи с вышеизложенными рассуждениями естественно возникает вопрос о тех механизмах, которые могут ограничивать прохождение полного митоза в процессе дифференциации железистых волосков. Одна из таких причин может быть заключена в не активности собственно митотических генов. Хорошо известно, что прохождение фаз митотического цикла контролируется на генетическом уровне и определяется спецификой транскрипции и синтезом специфических белков [10]. И хотя многие из этих белков еще не идентифицированы, их влияние на прохождение отдельных фаз митотического цикла проявляется достаточно отчетливо. Не исключено, что в процессе дифференциации железистых волосков блокирование определенных генов обуславливает отсутствие в клетке специфических белков, ответственных за прохождение цитокинеза.

Вместе с тем возможны и другие механизмы, ограничивающие прохождение полных митозов. При этом одним из главных, на наш взгляд, механизмом может быть конкурентное взаимодействие внутриклеточных метаболических процессов. Известно, что клетки могут осуществлять одновременно и специфические и пролиферативные синтезы [11]. Однако эти процессы могут находиться, до некоторой степени, в конкурентных отношениях. Если рассматривать этот аспект применительно к нашим данным, то, как было отмечено, вплоть до образования описанного выше комплекса из трех клеток – апикальной, промежуточной и базальной, реализуется программа полного прохождения митоза. Однако если допустить, что на данной стадии апикальная клетка приступает к биосинтезу компонентов эфирного масла, то их синтез может выступать как один из факторов, ограничивающих деление клетки при сохранении S- и G₂-периодов. По-видимому, в данном конкретном случае речь может идти о подавлении программы полного прохождения митоза со стороны специфических продуктов биосинтеза, которыми являются вещества терпеноидной природы.

ВЫВОДЫ

1. Дифференцированные терпеноидогенные структуры на чашелистиках лаванды представлены двумя основными типами – железистыми волосками и железками, содержащими в интерфазных ядрах секреторных клеток 4С и 2С ДНК.

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК

2. Кратное увеличение содержания ДНК в дифференцированных секреторных клетках железистых волосков до 4С связано с блокированием митоза и выходом клеток в конечную дифференцировку в G₂-периоде клеточного цикла.

Список литературы

1. Васильев А.Е. Функциональная морфология секреторных клеток растений. – Л.: Наука. 1977. – 207 с.
2. Теплицкая Л.М. Особенности морфологии и дифференцировки железистого аппарата мяты в связи с интенсивностью и направленностью маслообразовательного процесса: Дис... канд. биол. наук: 03.00.05. – Симферополь, 1982. – 234 с.
3. Вишневский С.О., Бугара А.М., Бугаенко Л.А. Морфологическое и кариометрическое исследование секреторных клеток мяты // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34. – №3. – С.3 – 9.
4. Бугара А.М., Теплицкая Л.М. Цитофлуориметрическое и цитотометрическое исследование нуклеиновых кислот и белков в секреторных терпеноидогенных клетках *Pelargonium roseum* Willd. // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия. – 2004. – Т.17. – №1(56). – С. 3 – 7.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос. 1980. – 304 с.
6. Бородина В.М., Сондоре О.Ю., Зеленин А.В. Использование антибиотика оливомицина для цитохимического изучения хроматина // Цитология. – 1979. – Т.21. – №9. – С. 1036 – 1040.
7. Cremonini R., Cionini P. Extra DNA synthesis in embryo suspensor cells of *Phaseolus coccineus* // *Protoplasma*. – 1977. – V. 91. N3. – P. 303 – 317.
8. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. – М.: Наука. 1974. – 223 с.
9. Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. – М.: Наука. 1984. – 270 с.
10. Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А. Покоящиеся клетки. – М.: Наука, 1983. – 180 с.
11. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка. – М.: Наука, 1981. – 259 с.

*Бугара О.М., Бугара Л.О., Теплицкая Л.М. Цитофлуориметричне дослідження вмісту ДНК в ядрах секреторних клітин лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 3-9.*

Проведено кількісне цитофлуориметричне дослідження ядерної ДНК в процесі диференціації секреторних терпеноїдогенних структур різних морфологічних типів у лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.). Встановлено, що в інтерфазних ядрах диференційованих секреторних клітин залізистих волосків міститься кратно збільшена кількість ДНК – 4С, що є результатом ендорепродукції і виходу в кінцеве диференціювання в G₂-періоді. В інтерфазних ядрах секреторних клітин диференційованих залоз виявлено 2С ДНК.

Ключові слова: *Lavandula angustifolia*, секреторні клітини, ДНК.

*Bugara A.M., Bugara L.O., Teplitskaya L.M. The cytofluorimetric study of DNA content in nucleus of secretory cells of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 2. – P. 3-9.*

Cytofluorimetric content of DNA in secretory cells of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) during differentiation were investigated. It was shown, that interphase nucleus of secretory cells of gland hair content 4C DNA. Quantity 4C DNA is the result of endoreproduction and yield in terminal differentiation in G₂-period. Interphase nucleus of gland content 2C DNA.

Keywords: *Lavandula angustifolia*, secretory cells, DNA.

Поступила в редакцію 06.07.2007 г.