

УДК 576.32.36:633

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ В СЕКРЕТОРНЫХ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТКАХ *Pelargonium roseum Willd*

Бугара А. М.

Секреторные клетки многих видов цветковых растений способны синтезировать и накапливать эфирные масла, представляющие собой, как правило, смесь веществ терпеноидной природы. Особенности биосинтеза и химического состава эфирных масел исследованы у достаточно большого числа видов. Однако вопросы структурно-функциональной организации маслосинтезирующих клеток остаются исследованы крайне неравномерно. Основной объем имеющегося фактического материала посвящен описанию функциональной морфологии маслосинтезирующих клеток на основании результатов электронномикроскопических исследований [1-3]. Значительно меньше данных касается вопросов регуляции функциональной активности этих клеток на уровне генома. Сегодня известно, что секреторные клетки, синтезирующие эфирные масла, характеризуются высокой функциональной активностью. Эти клетки могут содержать как диплоидный так и полиплоидный уровень ДНК в ядре, обладая повышенной интенсивностью синтеза РНК и белка по сравнению с расположенными рядом обычными несекреторными клетками [4]. Вместе с тем подобные факты пока единичны и получены для ограниченного числа видов растений. Привлечение новых объектов исследования позволит существенно дополнить уже имеющиеся сведения о строении и функционировании секреторных клеток, продуцирующих эфирные масла.

Целью настоящей работы являлось цитофлуориметрическое и цитофотометрическое исследование терпеноидогенных клеток *Pelargonium roseum*, а также установление цитохимических показателей, определяющих уровень их функциональной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения Розовой герани (*Pelargonium roseum Willd.*), выращиваемые в условиях закрытого грунта. Вегетативные почки фиксировали по Карнуа, раздавливали на покровных стеклах и подготовленные таким образом объекты высушивали в термостате при 27⁰С в течение двух суток. Давленные препараты окрашивали ацетокармином [5] и исследовали под световым микроскопом МБИ-15.

Цитофлуориметрические и цитофотометрические исследования проводили на приборе «Морфоквант». Для цитофлуориметрии ДНК в клеточных ядрах препараты окрашивали антибиотиком оливомицином [6]. Цитофотометрические исследования РНК и общих белков проводили на препаратах, окрашенных галлоцианин-

хромовыми квасцами и нафтоловым желтым [7,8]. Количественное определение нуклеиновых кислот и белков проводили на 5 последовательных стадиях дифференциации секреторных структур: 1 – эпидермальные клетки; 2 – инициальные клетки; 3-4 – апикальные клетки; 5 – секреторные клетки, дифференцированных трихом. Результаты цитохимических исследований выражали в классах плоидности С (ДНК) или в условных единицах (РНК, белок). В качестве эталона, принятого за 2С, служила интенсивность флуоресценции ДНК в эпидермальных клетках молодых листочков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Местом биосинтеза и накопления эфирного масла у *Pelargonium roseum* являются железистые трихомы, состоящие из одной секреторной клетки, покоящейся на 1-4 клеточной ножке. На молодых листочках обнаруживались трихомы двух основных типов, даже визуально отличающиеся по размерам секреторных клеток. Первый тип имел диаметр секреторных клеток в пределах 10-20 мкм, второй – 50-60 мкм (рис. 1).



Рис. 1. Маслосинтезирующие структуры *Pelargonium roseum* с мелкими (диаметр 10-20 мкм) и крупными (50-60 мкм) секреторными клетками.

Цитофлуориметрическое определение содержания ДНК в процессе дифференциации обоих типов железистых трихом позволило выявить наличие эндорепродукции в результате чего дифференцированные секреторные клетки содержали 4С и 8С ДНК. При этом уровень 4С был характерен для секреторных клеток с диаметром 10-20 мкм, а 8С – 50-60 мкм (рис. 2).

Характер синтеза РНК в процессе дифференциации железистых трихом показал, что уже в инициальной клетке количество цитоплазматической РНК выше, чем в расположенных рядом обычных клетках эпидермиса.

На протяжении дальнейших этапов дифференциации наблюдалось интенсивное накопление РНК в цитоплазме апикальных клеток, причем этот процесс более интенсивно протекал в секреторных клетках, образующих крупную головку железистых трихом (рис. 3).

**ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ В СЕКРЕТОРНЫХ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТКАХ
PELARGONIUM ROSEUM WILLD**

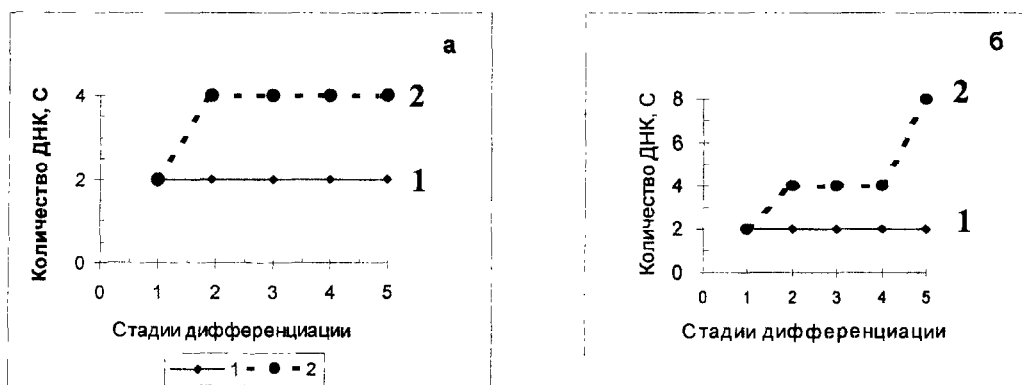


Рис. 2. Динамика количественных изменений ДНК в процессе дифференциации железистых структур с мелкой (а) и крупной (б) секреторной клеткой:
1 – эпидермальные клетки;
2 – инициальные, апикальные и секреторные клетки.

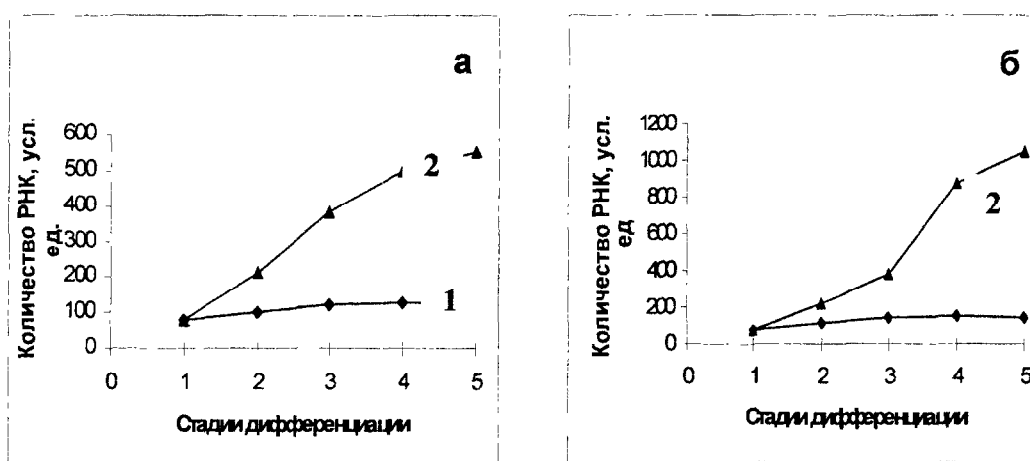


Рис. 3. Динамика количественных изменений РНК в процессе дифференциации железистых структур с мелкой (а) и крупной (б) секреторной клеткой:
1 – эпидермальные клетки;
2 – инициальные, апикальные и секреторные клетки.

Сопоставление секреторных структур различных морфологических типов по содержанию РНК и общих белков в дифференцированных секреторных клетках показало, что более высокий уровень РНК и белков обнаруживался в ядре и цитоплазме клеток, образующих крупную головку. В месте с тем секреторные клетки обоих типов железистых образований значительно превышали по содержанию указанных макромолекулярных соединений обычные эпидермальные клетки (рис. 4).

Таким образом, проведенные цитофлуориметрические исследования позволили установить, что дифференцированные секреторные клетки *Pelargonium roseum* могут содержать различный уровень ДНК в ядре. Для обоих типов железистых структур характерно кратное увеличение количества ДНК по сравнению с

обычными эпидермальными клетками. При этом в секреторных клетках диаметром 10-20 мкм выявлен уровень ДНК соответствующий 4С, а в секреторных клетках 50-60 мкм - 8С. Кратное увеличение количества ДНК связано, вероятно, с эндорепродукцией и выходом в конечную дифференцировку после одного или двух циклов репликации.

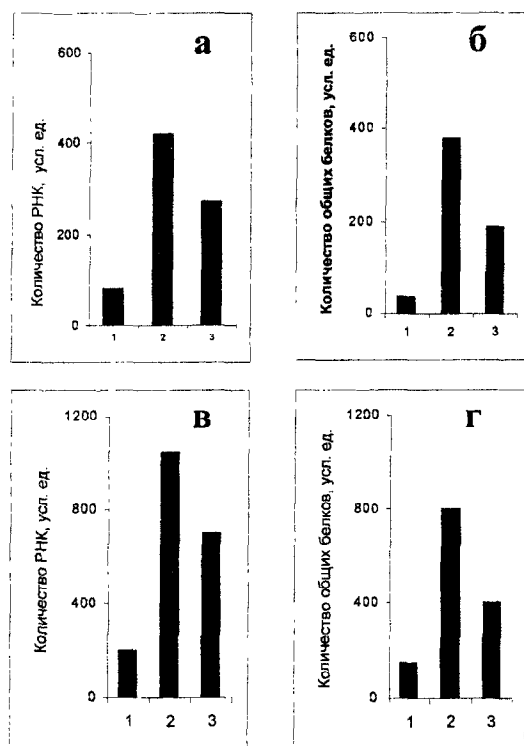


Рис. 4. Количество РНК и общих белков в ядре (а, б) и цитоплазме (в, г) клеток:

- 1 – эпидермальные клетки;
- 2 – крупная секреторная клетка-головка;
- 3 – мелкая секреторная клетка-головка.

Кратное увеличение количества ДНК в секреторных клетках обуславливает высокий уровень их функциональной активности, о чем может свидетельствовать повышенное содержание в этих клетках РНК и общего белка. По-видимому, высокий уровень функциональной активности этих клеток связан с осуществлением специфических биосинтезов, направленных на образование компонентов эфирных масел. Высокая функциональная активность терпеноидогенных клеток показана и для других видов растений. Так, при цитофлуориметрических исследованиях секреторных клеток мяты удалось показать, что секреторные клетки железистых трихом содержали 4С ДНК в ядре и проявляли признаки повышенной функциональной активности [9].

Наши исследования показали, что содержание РНК и общего белка в секреторных клетках увеличивалось пропорционально повышению содержания ДНК в ядре. Следовательно, для клеток, в которых произошла эндорепродукция

**ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ В СЕКРЕТОРНЫХ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТКАХ
PELARGONIUM ROSEUM WILLD**

ДНК. была свойственна более высокая активность в отношении синтеза РНК и белка, что может служить показателем значительной гиперфункции. На сегодняшний день известны две основные причины, обуславливающие кратное увеличение ДНК в ядре. Это увеличение может быть результатом полиплоидии или политении [10]. Полиплоидия связана с удвоением числа хромосом в соматической клетке и является результатом полиплоидизирующего митоза, то есть варианта обычного митоза, остановленного на той или иной стадии. Политения представляет собой удвоение числа хромосом (хроматид) в диплоидном наборе хромосом. В данном случае выпадает весь механизм митоза и клетка блокируется в G₂ периоде. При этом структура клеточного цикла включает всего два периода – синтетический и межсинтетический. При морфологических исследованиях секреторных структур *Pelargonium roseum* мы не обнаружили случаев полиплоидизирующего митоза. Дифференциация секреторных структур складывается из ряда последовательных нормальных митозов, приводящих к образованию многоклеточной ножки и секреторной клетки. Лишь на заключительных этапах дифференциации секреторных клеток происходит эндорепродукция, приводящая к кратному увеличению количества ДНК. Таким образом, наши результаты дают основание считать, что в данном случае для секреторных клеток *Pelargonium roseum* полиплоидия как вариант умножения генома маловероятен, а имеет место политения, обуславливающая присутствие у данного вида секреторных клеток, содержащих 4С и 8С ДНК в ядре.

Список литературы

1. Васильев А.Е. Функциональная морфология секреторных клеток растений. – Л.: Наука, 1977. – 207с.
2. Pedro L., Campus., Pais M.S. Morphology, ontogeny and histochemistry of secretory trichomes of *Geranium robertianum* (Geraniaceae) // Nord J. Bot. – 1990. – Vol. 10, №5. – P. 501-509.
3. Oliveira M.M., Pais M.S. Glandular trichomes of *Humulus lupulus* var. *Brewer's gold* (hops): ultrastructural aspects of peltate trichomes // J. Submicrosc. Cytol. And Pathol. – 1990. – V. 22, №2. – P. 241-248.
4. Бугара А.М. Клеточная дифференциация и экспериментальный морфогенез у эфиромасличных растений // Автореф. дис. ... доктора биол. наук, 03.00.05. – Кишинев, 1992. – 25 с.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304с.
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. Зандриттер В., Кифер Г., Рик В. Галлоционин-хромовые квасцы // Введение в количественную цитохимию. - М.: Мир. 1969. - С.240-264.
8. Дейч А. Цитоморфометрия нуклеиновых кислот // Введение в количественную цитохимию. – М.: Мир, 1969. - С. 265-287.
9. Вишневецкий С.О., Бугара А.М., Бугаенко Л.А. Цитохимические исследования секреторных клеток высоко- и низкомасличных генотипов мяты // Ученые записки ТНУ. Серия: Биология, химия. - 2001. – Т. 14, №1. – С.46-50.
10. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка. - М.: Наука, 1987. – 259.

Поступила в редакцию 12.12.2003 г.