

Б И О Л О Г И Я

УДК 575. 224.4.633

СТРУКТУРА КЛЕТОК ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS L.* В НОРМЕ И ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА¹

*М. А. Федоренко*², *Г. М. Федоренко*³, *Е. В. Машкина*⁴, *А. Г. Федоренко*⁵,
*А. В. Усатов*⁶

STRUCTURE OF SUNFLOWER *HELIANTHUS ANNUUS L.* CELLS UNDER NORMAL
CONDITIONS AND AFTER ACTION OF OXIDATIVE STRESS

Fedorenko M. A., Fedorenko G. M., Mashkina E. V., Fedorenko A. G., Usatov A. V.

Comparative analysis of the cells morphology of resistant mutant sunflower forms en:chlorina-7, revertanta r-en: chlorina-7 and initial form 3629 has been carried out under normal conditions and after the action of oxidative stress. It has been shown that the stability of mutant forms is determined by a specific, distinct from the initial line, structural organization of endocellular organelles and the cells.

В последнее время в связи с повышенным антропогенным воздействием на биосферу происходят резкие изменения окружающей среды, зачастую носящие экстремальный характер для биологических видов [1]. Действие практически любого стрессового фактора на организмы вызывает усиленное образование активных форм кислорода и повышенное окислительное напряжение в клетках и тканях, способных инициировать целый ряд патологических процессов [2]. Классическим способом моделирования окислительного стресса является гипербарическая оксигенация (ГБО).

Растения, являющиеся основными продуцентами кислорода, в процессе фотосинтеза испытывают в естественных условиях состоя-

ние эндогенной гипероксии. Долговременная адаптация растений к действию ГБО связана с изменениями метаболизма, происходящими на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях. Последовательно выявляя корреляции между изменениями структуры и функции на этих уровнях организации, можно создать полную картину деструктивных процессов, протекающих в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды, а также их купирования. В качестве модельного объекта для подобного рода исследований удобно использовать мутантные формы одного вида растений, различающиеся по своей устойчивости.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение особенностей цитологических

¹Работа выполнена при поддержке РФФИ р2003юг (03-01-96546).

²Федоренко Марина Александровна, аспирант кафедры генетики Ростовского государственного университета.

³Федоренко Григорий Мефодьевич, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией ультраструктурного анализа НИИ нейрокибернетики Ростовского государственного университета.

⁴Машкина Елена Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

⁵Федоренко Алексей Григорьевич, научный сотрудник Кубанского государственного университета.

⁶Усатов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики НИИ биологии Ростовского государственного университета.

параметров клеток листовой ткани инбредной линии подсолнечника и мутантных форм, полученных на ее генетической основе в норме и после окислительного стресса.

1. Материал и методика

Объектом исследования служили растения инбредной линии 3629 подсолнечника *Helianthus annuus L.*, пластидный хлорофильный мутант *en:chlorina-7*, полученный после обработки N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) растений линии 3629, а также зелёный ревертант *r-en:chlorina-7*. Способ получения и природа хлорофильного мутанта *en:chlorina-7* описаны ранее [3].

Предварительно замоченные в водопроводной воде (18 ч), семена исследуемых линий проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге при температуре 25–26°C. Обработку ГБО проводили в барокамере чистым кислородом под давлением 0,7 МПа в течение первых 10 ч роста. Обработанные и контрольные проростки высевали в полевых условиях. В качестве критериев устойчивости растений к окислительному стрессу использовали всхожесть проростков и рост растений в фазу третьей пары листьев.

Содержание хлорофиллов исследуемых растений определяли спектрофотометрически в ацетоне по методике [4]. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре «Spectol-10» при длине волны 662, 644, 440,5 нм. Для светооптических наблюдений полутонкие срезы материала, заключённого в эпоновые среды, дополнительно окрашивали метиленовым синим [5] и фотографировали в микроскопе «Jeneval» при увеличении объектива $\times 25$.

Морфометрический анализ включал подсчёт площади, периметра и количество клеток на единицу площади листовой ткани. При этом использовалась специально разработанная автоматизированная система анализа микроизображений [6]. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Стьюдента [7].

2. Результаты и обсуждение

Морфофизиологический анализ растений исходной линии 3629, пластомного мутанта *en:chlorina-7* и ревертанта *r-en:chlorina-7* свидетельствует, что мутация в хлоропластной

ДНК приводит к изменению высоты растений. Результаты полевых измерений представлены в табл. 1.

Рост растений в фазу цветения хлорофильного мутанта уменьшен относительно такового у зеленого контроля (линия 3629) на 25%. Реверсия в хпДНК у ревертанта *r-en:chlorina-7* приводит к увеличению исследуемого показателя не только по сравнению с исходным мутантом *en:chlorina-7*, но и с растениями линии 3629 (при $p < 0,01$). Схожий характер ростовых характеристик исследуемых линий отмечен и в фазу роста третьей пары листьев (табл. 4).

Результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа, проведенного в лаборатории генетики и цитологии НАН Беларуси О. Г. Давыденко, выявил, что вторичная обработка мутагеном семян линии *en:chlorina-7* индуцировала обратное изменение мутантной последовательности хлоропластной ДНК таким образом, что она стала соответствовать хпДНК исходной линии 3629 [8].

Анализ светооптических изображений клеток линии 3629, пластомного мутанта *en:chlorina-7* и ревертанта *r-en:chlorina-7* показал, что листовая ткань у всех линий имеет чётко выраженное деление на столбчатую и губчатую паренхиму. Форма и размер клеток зелёного контроля и ревертанта имеют схожий характер (рис. 1, 2) и характеризуются упорядоченной организацией и равномерной локализацией клеток в мезофиле листа. У желто-зеленого мутанта *en:chlorina-7* отмечено хаотичное расположение клеток в листовой ткани, особенно в столбчатой паренхиме (рис. 3). В табл. 2 приведены морфологические показатели клеток мезофила листьев исследуемых линий подсолнечника.

Как видно из табл. 2, в столбчатой паренхиме площадь клеток и их периметр у пластомного мутанта *en:chlorina-7* достоверно меньше по сравнению с линией 3629, в то время как количество клеток на единицу площади листа не отличается от такового показателя у зеленого контроля, что при одинаковой толщине листа приводит к увеличению межклеточного пространства. У ревертанта площадь клеток и их периметр существенно не отличаются от линии 3629. Однако количество клеток на единицу площади у ревертанта больше по сравнению с контролем на 33%, что может быть основой для интенсификации метаболических процессов, например, фотосин-



Рис. 1. Поперечный срез листа линии 3629 в норме, $\times 25$

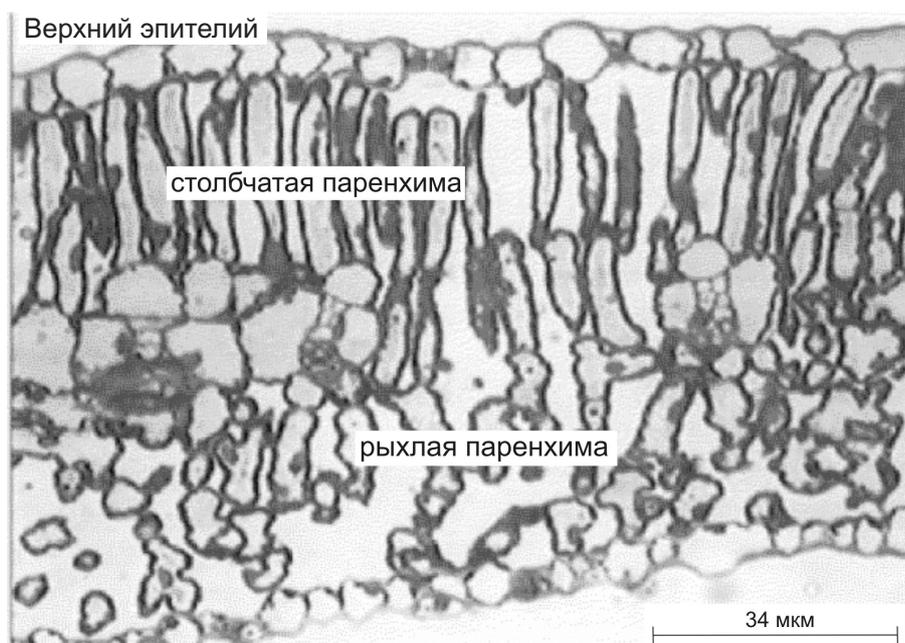


Рис. 2. Поперечный срез листа ревертанта r-en:chlorina-7 в норме, $\times 25$

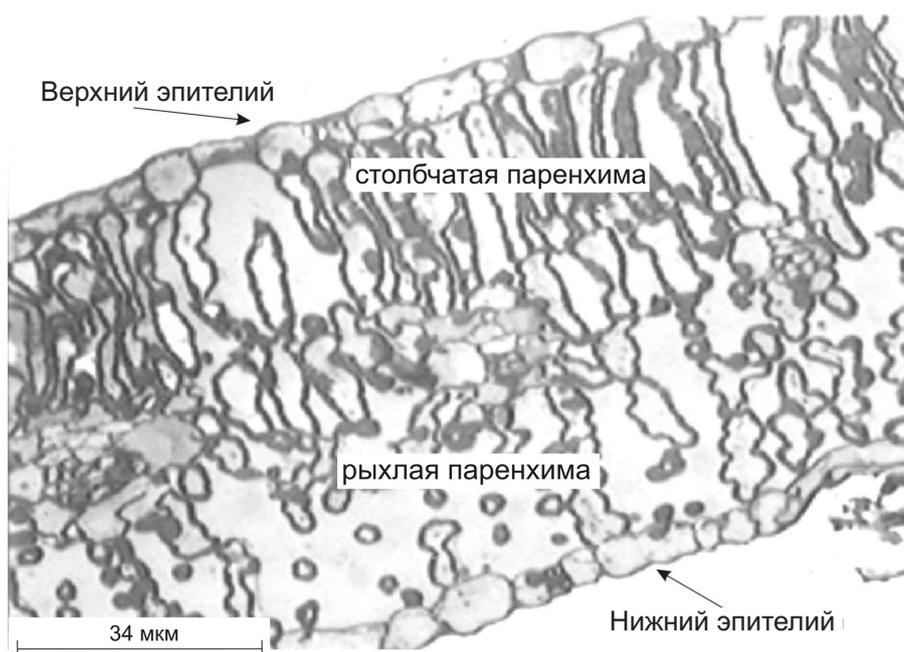


Рис. 3. Поперечный срез листа хлорофильного мутанта ep:chlorina-7 в норме, $\times 25$

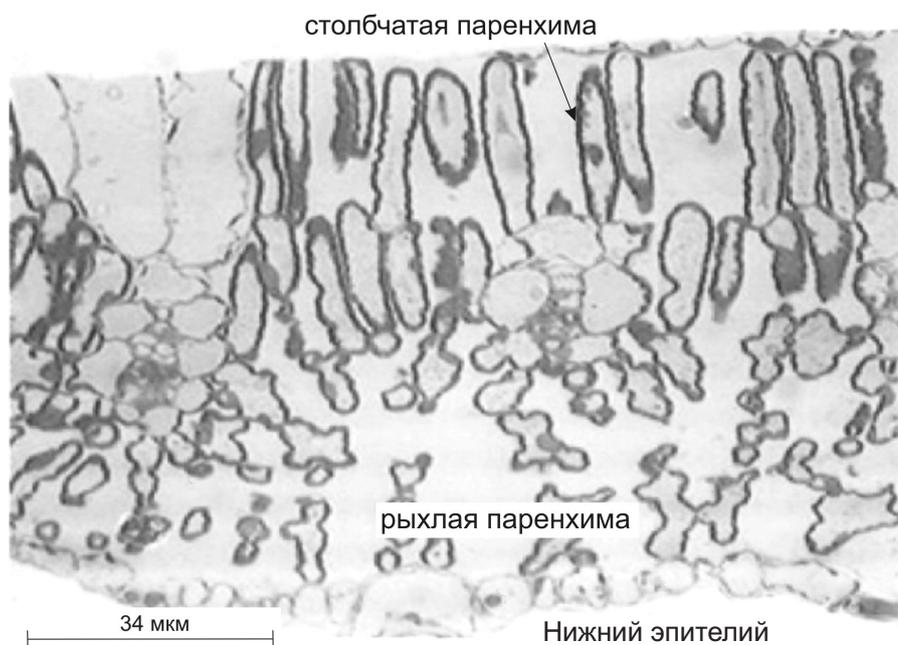


Рис. 4. Поперечный срез линии 3629 после действия ГБО, $\times 25$



Рис. 5. Поперечный срез листа ревертанта *r-en:chloina* после действия ГБО, $\times 25$

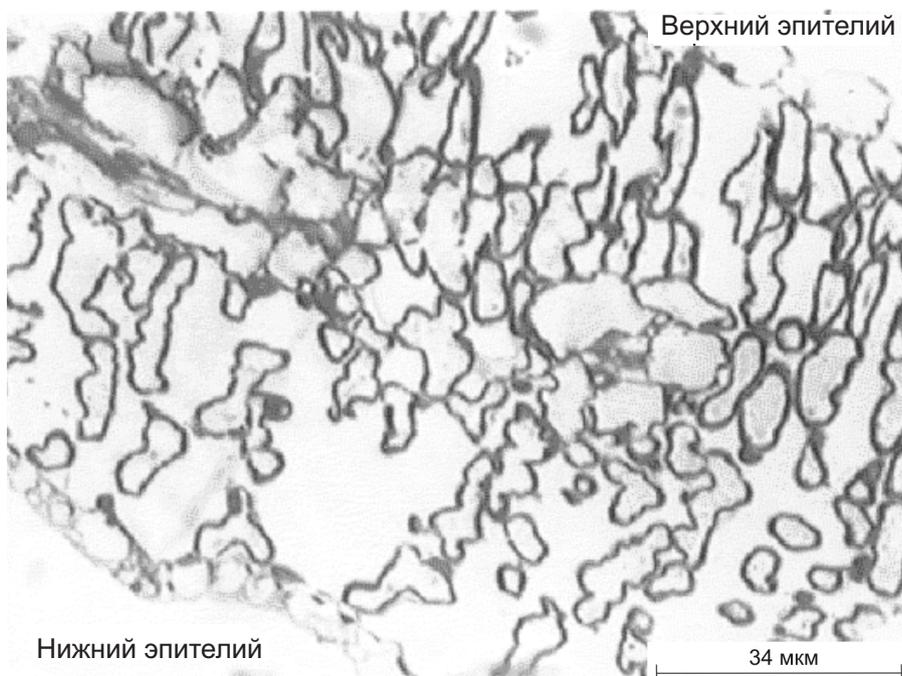


Рис. 6. Поперечный срез листа хлорофильного мутанта *en:chloina-7* после действия ГБО, $\times 25$

Т а б л и ц а 1

Морфофизиологическая характеристика различных линий подсолнечника в фазу цветения

Линия	Высота растений в фазу цветения (см)	
	Абсолютные значения	Относительно 3629%
3629	145,5±1,5	100
en:chlorina-7	110,3±1,5***	75
r-en:chlorina-7	155,9±3,2**	107

П р и м е ч а н и е: достоверные отличия по сравнению с линией 3629: *** при $p < 0,001$; ** при $p < 0,01$.

Т а б л и ц а 2

Цитоморфологический анализ листовой ткани растений различных линий подсолнечника в норме и после действия ГБО

Линия	Столбчатая паренхима листовой ткани			Губчатая паренхима листовой ткани		
	Площадь клеток, (S)·10 ⁻⁸ см ²	Периметр клеток, (P)·10 ⁻⁴ см	Количество клеток на единицу площади (35×35 мкм ²)	Площадь клеток, (S)·10 ⁻⁸ см ²	Периметр клеток, (P)·10 ⁻⁴ см	Количество клеток на единицу площади (35×35 мкм ²)
Контроль						
3629	2,99±0,12	1,11±0,05	12,54±0,014	2,37±0,154	0,92±0,047	9,21±0,11
en:chlorina-7	2,06±0,24 ^{^^}	0,38±0,04 ^{^^^}	11,22±0,20	1,49±0,06 ^{^^^}	0,29±0,05 ^{^^^}	10,32±0,16
r-en:chlorina-7	3,23±0,14	1,01±0,047	15,87±0,15	2,52±0,17	0,79±0,04	9,44±0,17
ГБО						
3629	3,68±0,17***	2,02±0,21***	7,31±0,15***	1,49±0,142***	0,60±0,065***	6,12±0,12**
en:chlorina-7	1,67±0,13	0,39±0,03	12,11±0,25	1,54±0,144	0,42±0,028*	12,01±0,16
r-en:chlorina-7	2,45±0,15	0,79±0,05	20,14±0,22**	1,74±0,134**	0,61±0,04	13,94±0,12**

П р и м е ч а н и е: а) достоверные отличия по сравнению с линией 3629: ^{^^^} при $p < 0,001$; ^{^^} при $p < 0,01$; б) достоверные отличия по сравнению с контролем: *** при $p < 0,001$; ** при $p < 0,01$; * при $p < 0,05$.

теза, и, следовательно, восстановления габитуса растений.

В рыхлой паренхиме у растений линии 3629 и ревертанта количество клеток на единицу площади меньше, чем в столбчатой паренхиме. Достоверных различий по данному показателю между столбчатой и рыхлой паренхимой у пластомного мутанта en:chlorina-7 не обнаружено. Различия, выявленные в площади и периметре клеток столбчатой паренхимы исследуемых линий подсолнечника, характерны и для рыхлой паренхимы.

Представляется интересным сопоставить выявленные морфометрические показатели с уровнем содержания зелёных пигментов в листовой ткани (табл. 3).

Видно, что в соответствии с цветом листьев у желто-зеленого мутанта en:chlorina-7

содержание хлорофиллов а + b снижено на 23,1% по сравнению с исходной линией 3629. У ревертанта r-en:chlorina-7 полностью восстанавливается содержание зелёных пигментов, и по данному показателю он не отличается от растений линии 3629. Ранее было показано [8], что восстановление содержания хлорофиллов в листьях ревертанта связано с восстановлением нуклеотидной последовательности плазмидной ДНК до исходной структуры хлДНК зелёного контроля (линия 3629).

Таким образом, можно отметить определённую корреляцию между габитусом исследуемых линий подсолнечника и некоторыми показателями метаболизма: данными полевых измерений, уровнем содержания зелёных пигментов в листьях и данными цитоморфометрии. Так, для линии 3629 и ревертанта r-

Т а б л и ц а 3
Содержание хлорофиллов а + b в листьях растений различных
линий подсолнечника в фазу бутонизации

Линия	Содержание хлорофиллов а + b	
	Абс., мг/г сухой массы	относительно 3629, %
3629	7,52±0,17	100
en:chlorina-7	5,78±0,16***	76,9
r-en:chlorina-7	7,61±0,14	101,2

П р и м е ч а н и е: *** при $p < 0,001$ отличия достоверны.

Т а б л и ц а 4
Морфофизиологические характеристики различных линий подсолнечника в норме и после действия ГБО
(0,7МПа – 10ч)

Линия	Всхожесть растений			Рост растений (см) в фазу 3-ей пары листьев		
	Контроль	ГБО		Контроль	ГБО	
		Абсолют.	Относит.%		Абсолют.	Относит.%
3629	85,3±1,37	45,3±1,46***	53	12,2±0,35	6,8±0,45***	55,7
en:chlorina-7	74,7±1,27	49,3±1,38***	65,9	8,1±0,3	5,5±0,39***	68
r-en:chlorina-7	80,0±1,40	54,7±1,35***	68,3	10,8±0,4	8,2±0,34***	76

П р и м е ч а н и е: достоверные отличия по сравнению с соответствующим контролем (***) при $p < 0,001$.

en:chlorina-7 с высоким уровнем ростовых параметров, содержания хлорофилла, всхожести семян характерны максимальные цитоморфометрические показатели и, напротив — для мутанта en:chlorina-7 эти показатели минимальны.

Данные литературы свидетельствуют, что реакция организмов на стрессорное воздействие может быть в значительной степени модифицирована особенностями метаболизма. Пластиды растений являются составной частью общей окислительной системы клетки. В хлоропластах осуществляется фотосинтез — ключевой процесс метаболизма [8]. Мутации в хлоропластной ДНК, изменяя окислительно-восстановительный обмен клеток, могут влиять на рост и развитие растений. В связи с этим исследовано действие ГБО на хлорофильные мутанты подсолнечника.

В табл. 4 представлены результаты всхожести семян пластомных хлорофильных мутантов и исходной линии подсолнечника в норме и после действия ГБО. В контроле всхожесть изучаемых линий сходна.

После действия ГБО всхожесть растений линии 3629 уменьшилась на 47% по сравнению с контролем (100%). Наиболее устойчи-

вым к окислительному стрессу оказался ревертант (снижение всхожести на 31,2%).

Анализ светооптических фотографий клеток листовой ткани исследуемых растений выявил наличие корреляции между цитологическими изменениями структуры клетки листа и выживаемостью проростков после действия окислительного стресса. Степень упорядоченности клеток в столбчатой и губчатой паренхиме листовой ткани растений исходной линии 3629 и ревертанта, а также их локализация не изменились после действия ГБО (рис. 4 и 5).

Окислительный стресс не влияет на дифференцировку клеток листовой ткани данных линий, но приводит к количественному изменению их цитоморфометрических показателей. У хлорофильного мутанта en:chlorina-7 окислительный стресс приводит к стиранию различий между столбчатой и рыхлой паренхимой (рис. 6). Данные морфометрического анализа действия ГБО представлены в табл. 2. Видно, что у растений линии 3629 происходит некоторое увеличение площади и периметра клеток столбчатой паренхимы при резком сокращении их количества на единицу площади. У растений линии r-en:chlorina-

7 различия в значениях этих показателей по сравнению с контролем выражены значительно меньше, а у мутантной линии даже отмечена тенденция к их увеличению. При этом наиболее высокие показатели всхожести семян и высоты растений (по сравнению с контролем) оказались у мутантных линий и наименьшими, соответственно, у инбредной линии 3629.

Таким образом, на организменном (всхожесть проростков, высота растений) и клеточном уровне выявлена повышенная устойчивость мутанта *en:chlorina-7* и ревертанта *г-en:chlorina-7* к окислительному стрессу. Выявление клеточных (органельных) мишеней действия ГБО, а также ультраструктурных механизмов устойчивости мутантных линий является целью нашего дальнейшего электронно-микроскопического исследования.

Литература

1. Агаджанян Н. А. Человек и биосфера. (Медико-биологич. аспекты). М.: Знание, 1987. 95 с.
2. Ефунги С. Н. Руководство по гипербарической оксигенации. М.: Медицина, 1986. 416 с.
3. Разорителева Е. К., Таран С. Ф., Усатов А. В. Генетическая коллекция пластомных мутантов подсолнечника // Генетические коллекции растений. Вып. 3. Под ред. С. Ф. Ковалева. Новосибирск, 1995.
4. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 393 с.
5. Белецкий Ю. Д., Федоренко Г. М., Разорителева Е. К., Степанова Л. Б. Реверсия у пластомного мутанта подсолнечника типа *chlorina* // Цитология и генетика. 1981. Т. 15. С. 34–37.
6. Федоренко Г. М., Владимирский Б. М. Система анализа структурных характеристик клеток растительных и животных организмов // Перспективные информационные технологии в анализе изображений. Ташкент, 1992. С. 22–25.
7. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М.: Мир, 1973. 271 с.
8. Triboush S. O., Danilenko N. G., Davydenko O. G. Location of induced mutation and reversions in the chloroplast genome of *Helianthus annuus* // Plant Growth Regulation. Kluwer Academic Publishers. 1999. Vol. 27. P. 75–81.
9. Давыденко О. Г., Палилова А. Н., Щетинкина М. И. Дивергенция структуры митохондрий и хлоропластов у *Aegilops* и *Triticum*. Морфометрический анализ ультраструктуры хлоропластов // Генетика. 1984. Т. 20. № 3. С. 448–456.

Статья поступила 21 января 2005 г.

Ростовский государственный университет

НИИ нейрокибернетики Ростовского государственного университета

НИИ биологии Ростовского государственного университета

Кубанский государственный университет

© Федоренко М. А., Федоренко Г. М., Машкина Е. В., Федоренко А. Г., Усатов А. В., 2005