

УДК 576.32/36:633

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТОК МЯТЫ

Бугара А. М., Теплицкая Л. М.

Исследование секреторных клеток растений представляет большой интерес для решения целого ряда вопросов теоретической биологии. Особенности дифференциации и функционирования этих клеток позволяют выявить специфику их внутриклеточного метаболизма и участие отдельных клеточных компонентов в биосинтезе секреторного продукта. Несмотря на то, что интенсивное изучение секреторных клеток с помощью современных методов началось более 40 лет назад, особенности их структурно-функциональной организации остаются еще во многом неясными. Это относится, прежде всего, к терпеноидогенным клеткам, синтезирующим эфирные масла, смолы и другие вещества. В изучении этих клеток до настоящего времени преобладает традиционный морфологический подход. Светооптические и электронно-микроскопические исследования показали, что эти клетки имеют обычно крупные ядра и ядрышки, плотную цитоплазму, насыщенную органеллами, среди которых преобладающим является агранулярный эндоплазматический ретикулум [1-3]. Значительно меньше данных касается вопросов регуляции функциональной активности терпеноидогенных клеток, а также взаимосвязи между их структурно-функциональной организацией и интенсивностью биосинтеза терпеноидов. В относительно ранних работах было показано, что секреторные клетки, различающиеся по интенсивности биосинтеза компонентов эфирных масел, обнаруживают отличия по уровню функциональной активности [4]. Однако подобные факты пока единичны и получены для ограниченного числа видов растений.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении секреторных клеток мяты с использованием электронно-микроскопических и цитохимических методов, а также установлении цитологических показателей, определяющих интенсивность маслообразовательного процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служили виды мяты *Mentha piperita* L. и *M. aquatica* L., отличающихся по интенсивности маслообразовательного процесса и уровню накопления эфирного масла. Для световой микроскопии секреторных структур апексы и молодые почки фиксировали по Карнуа, готовили давленные препараты и окрашивали основным фуксином по Модилевскому [5].

Для электронной микроскопии обработка материала проводилась по следующей схеме: фиксация в глутаровом альдегиде (4% раствор на 0,02 М фосфатном буфере, pH-7,2 в течение 4-х часов); обезвоживание материала в серии спиртов и ацетоне; высушивание в жидкой двуокиси углерода; высушенный

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТОК МЯТЫ

материал покрывали слоем платины. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Tesla, окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу [6], и исследовали на электронных микроскопах Tesla BS-613 и GSM35R.

Для люминесцентного анализа количества ДНК в ядрах клеток препараты окрашивали антибиотиком оливомицином [7]. Структурное состояние нуклеиновых кислот изучали после окраски препаратов акридиновым оранжевым [8]. Цитофлуориметрию и регистрацию спектров флуоресценции клеточных ядер проводили на приборе «Морфоквант» в режиме люминесценции. В качестве эталона, принятого за 2С ДНК, служила интенсивность флуоресценции ядер эпидермиса молодых листьев, окрашенных оливомицином и завершивших рост за счет деления клеток. Количество ДНК в ядрах железистых волосков изучалось на следующих стадиях дифференциации: 1- эпидермальная клетка; 2 – инициальная клетка; 3 – апикальная клетка; 4 – дифференцированная секреторная клетка. В ядрах железок: 1 – эпидермальная клетка, 2 – инициальная клетка; 3,4 – апикальная клетка; 5 – 2-х клеточная головка; 6- 4-х клеточная головка; 7 – секреторные клетки дифференцированной 8-клеточной головки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и накопление эфирного масла у мяты происходит в специализированных секреторных структурах эпидермального происхождения. Секреторный аппарат исследуемых видов мяты представлен структурами двух типов – железистыми волосками, имеющими одну апикально расположенную секреторную клетку, и железками, головка которых состоит из 8-ми секреторных клеток. Диаметр секреторной клетки, образующей головку железистого волоска, находится в пределах 20,0-25,0 мкм. Железки, имеющие головку из 8 секреторных клеток, отличаются и большими размерами. При этом диаметр головки варьирует в довольно узком интервале и у изучаемых видов мяты этот показатель находился в пределах 60,0-70,0 мкм (рис. 1.).

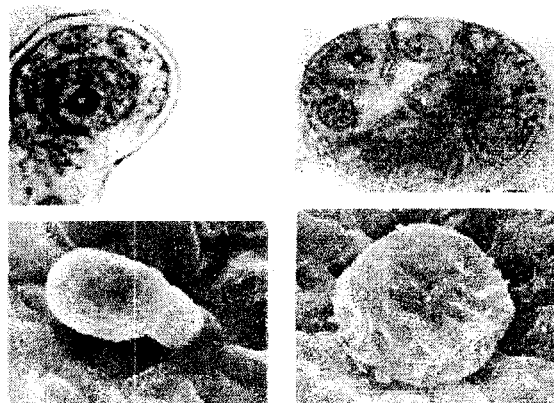


Рис. 1. Головка железистого волоска (одна секреторная клетка) и железки (8 секреторных клеток) мяты *Mentha piperita* при исследовании в световом и сканирующем электронном микроскопе.

Исследование секреторных клеток железок мяты с помощью электронной микроскопии показало, что клетки вида *Mentha piperita*, имеющего повышенную маслянисть, отличаются по своей ультраструктуре от секреторных клеток низкомасличного вида *Mentha aquatica*. Секреторные клетки высокомасличного вида отличались сильным развитием агранулярного эндоплазматического ретикулума (АЭР). Элементы АЭР у данного вида представлены расширенными цистернами, заполненными электронноплотным веществом – терпеноидами (рис. 2а). В контакте АЭР находятся крупные, осmioфильные включения округлой формы (рис. 2б). Морфологический контакт этих включений с элементами АЭР может свидетельствовать об их функциональном взаимодействии в процессе биосинтеза компонентов эфирного масла. Пластидный аппарат секреторных клеток высокомасличного вида представлен лейкопластами, содержащими крахмал и пластоглобулы, при чем последние занимают значительную часть площади пластиды (рис. 2в). В секреторных клетках железок низкомасличного вида *Mentha aquatica* уменьшено количество и размер цистерн АЭР, а также количество осмофильных включений и пластид (рис. 2г).

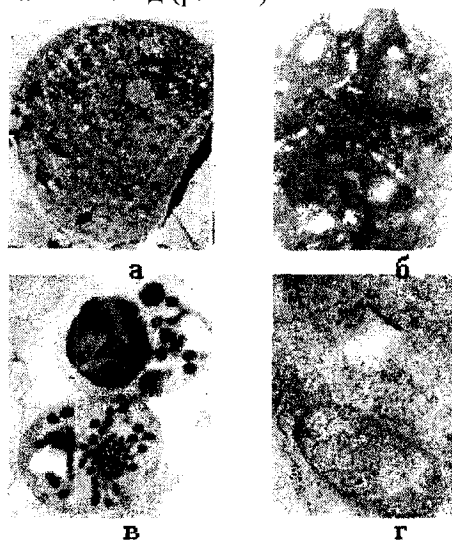


Рис. 2. Ультраструктура секреторных клеток железок мяты.

Проведенные исследования секреторных клеток высокомасличного и низкомасличного видов мяты показали, что различия в степени развития АЭР коррелируют с интенсивностью маслообразовательного процесса и могут служить морфологическим параметром оценки функциональной активности секреторных клеток, синтезирующих терпеноиды.

Дополнительные факты о функциональной активности секреторных клеток железок высоко и низкомасличного видов мяты были получены при цитофлуориметрическом исследовании содержания ДНК и структурного состояния нуклеиновых кислот в ядре. При количественном определении содержания ДНК (окраска оливомицином) в процессе дифференциации различных типов железистых

**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТОК МЯТЫ**

структур у обоих изучаемых сортов было показано, что дифференцированные секреторные клетки железистых волосков имели 4С ДНК в ядре. Дифференцированные секреторные клетки железок содержали 2С ДНК в ядре (рис. 3).

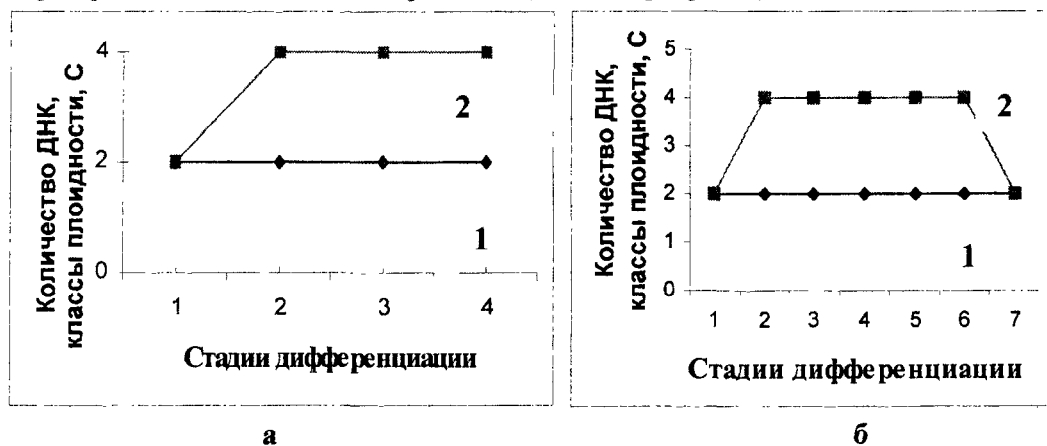


Рис.3. Изменение количества ДНК в ядрах эпидермальных (1) и секреторных клеток (2) мяты *Mentha piperita*:
а – секреторные клетки железистых волосков;
б – секреторные клетки железок.

Таким образом, цитофлуориметрический анализ содержания ДНК позволил установить, что в процессе дифференциации железистых структур кратное увеличение ДНК до 4С характерно только для секреторных клеток железистых волосков. Дифференцированные секреторные клетки железок содержали 2С ДНК, то есть такое же количество, как и в ядрах обычных эпидермальных клеток.

Для оценки функционального состояния клеток эпидермиса, а также секреторных клеток железистых волосков и железок, был использован параметр α , представляющий собой отношение интенсивностей красной и зеленой флуоресценции акридинового оранжевого (I640/I530). Исследования показали, что у обоих изучаемых видов минимальные значения параметра α характерны для ядер дифференцированных обычных эпидермальных клеток. Максимальные значения параметра α были обнаружены для ядер дифференцированных секреторных клеток железистых волосков, имеющих кратно увеличенный уровень ДНК (4С). Ядра секреторных клеток железок, имеющие 2С, занимали по этому показателю промежуточное положение. При этом значение параметра α для секреторных клеток железок высокомасличного вида *Mentha piperita* были достоверно выше, чем для клеток железок низкомасличного вида *Mentha aquatica* (рис. 4).

Регистрация спектров флуоресценции ядер эпидермальных и секреторных клеток после окраски акридиновым оранжевым позволила выявить во многом сходные закономерности. Для обоих изучаемых видов выявлено значительное сходство спектров флуоресценции ядер обычных эпидермальных клеток, а также секреторных клеток железистых волосков. Различия обнаруживались только для

секреторных клеток железок. У высокомасличного вида пик в области 640 мкм был достоверно выше, чем у низкомасличного (рис. 5.).

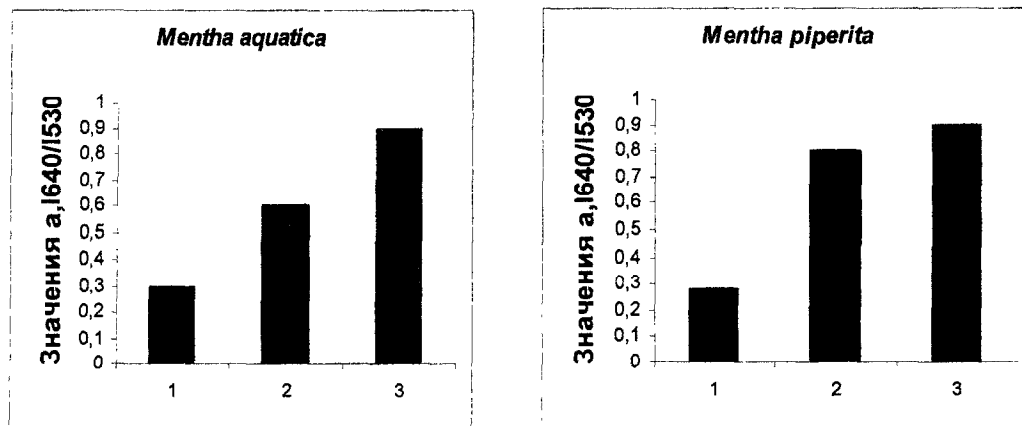


Рис. 4. Значение параметра α для клеток эпидермиса (1), дифференцированных секреторных клеток железок (2) и железистых волосков (3).

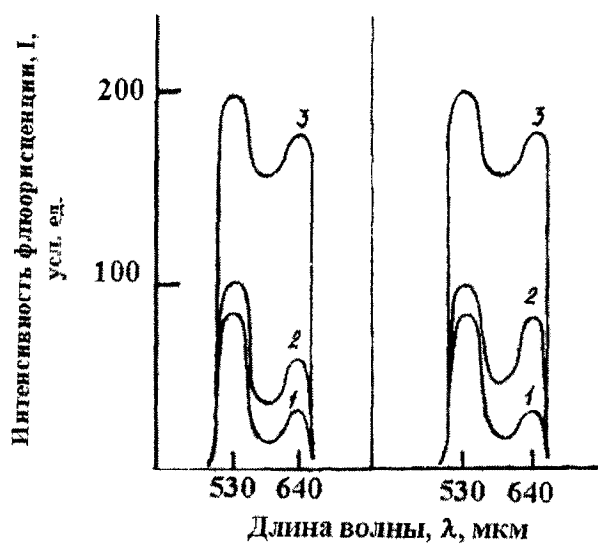


Рис. 5. Спектры флуоресценции для ядер клеток эпидермиса (1), дифференцированных секреторных клеток железок (2) и железистых волосков (3):
а – *Mentha aquatica*; б – *M. Piperita*.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить особенности ультраструктуры и функциональной активности секреторных клеток у видов мяты, различающихся по содержанию эфирного масла. Секреторные клетки вида с повышенной масличностью отличались сильным развитием агранулярного эндоплазматического ретикулума и пластидного аппарата. При этом в клетках

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕРПЕНОИДОГЕННЫХ КЛЕТОК МЯТЫ

обнаруживалось значительно больше осмиофильных веществ, представляющих собой зафиксированные терпеноиды. Полученные результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями других авторов, показавших, что преобладающим компонентом цитоплазмы терпеноидогенных клеток является, прежде всего, агранулярный эндоплазматический ретикулум [1]. Наши исследования показали, что для дифференцированных секреторных клеток высокомасличного вида характерна насыщенность цитоплазмы органеллами, и это может свидетельствовать о более высокой функциональной активности этих клеток, по сравнению с секреторными клетками низкомасличного вида.

Полученные результаты нашли подтверждение при цитофлуориметрическом анализе содержания ядерной ДНК и спектров флуоресценции ядерного хроматина. Проведенные исследования показали, что для обоих изучаемых видов характерна более высокая функциональная активность секреторных клеток железистых волосков. Вместе с тем, при сопоставлении по уровню функциональной активности дифференцированных секреторных клеток железок было показано, что функциональная активность клеток вида с повышенной масличностью выше, чем у низкомасличного вида. Об этом однозначно свидетельствуют данные, полученные при определении значений параметра α . Известно, что повышение функциональной активности клетки всегда связано с появлением в ядре активных в синтетическом отношении односпиральных участков молекул ДНК и молекул РНК [8]. Указанные изменения проявляются при сравнении спектров флуоресценции, на которых обнаруживается увеличение пика в области 640 мкм, обуславливающего возрастание значений параметра α . Таким образом, высокий уровень функциональной активности секреторных клеток высокомасличного вида подтверждается как данными электронной микроскопии, так и результатами люминесцентного спектрального анализа. Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее при кариометрическом анализе высоко- и низкомасличных гибридов мяты [9]. Удалось показать, что секреторные клетки высокомасличного генотипа отличаются от клеток низкомасличного увеличенным размером ядра и ядрышка. Установленный факт также указывает на высокую функциональную активность секреторных клеток у высокомасличного генотипа. Результаты наших исследований не только подтверждают данные, но и объясняют возможные механизмы регуляции функциональной активности дифференцированных секреторных клеток у генотипов, различающихся по интенсивности маслообразовательного процесса.

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. – V. 10, №5. – P. 501-509.
3. Бугара А.М., Резникова С.А. Цитохимическое исследование ДНП в клетках лепестка розы эфиромасличной при различных функциональных состояниях // Цитология и генетика. – 1979. – Т. 13, №6. – С. 503-509.

4. Использование методов количественной цитохимии для изучения процессов дифференциации и функционирования секреторных клеток эфиромасличных растений // Цитология.- 1991.- Т.33, №9.- С. 56-57.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
6. Гайер Г. Электронная гистохимия / Под. ред. Райхлина Н.Т.- М.: Мир, 1974. - 488 с.
7. Бородин В.М., Сондоре О.Ю., Зеленин А.В. Использование антибиотика оливомицина для цитохимического изучения хроматина // Цитология.- 1979.- Т.21, №9.- С. 1036-1040.
8. Карнаузов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978. – 206 с.
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.

Поступила в редакцию 12.12.2003 г.