

УДК 581.14.21+576.31.347

ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Т. А. Платонова, А. С. Евсюнина, Н. П. Кораблёва

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071

e-mail: platonova@inbi.rus.ru

Поступила в редакцию 24.06.2010 г.

Показано увеличение площади митохондриального аппарата клеток (укрупнение митохондрий) апикальных меристем при стимуляции ростовых процессов в клубнях растений картофеля *Solanum tuberosum* L. с помощью препарата мелафен. Выявлен стимулирующий эффект мелафена на дифференцировку митохондрий (увеличение числа конденсированных митохондрий, более богатых кристами). Полученные данные свидетельствуют об усилении активности митохондриального аппарата, связанной с возрастанием энергетических потребностей клеток апексов клубней картофеля при активации роста с помощью мелафена.

В настоящее время по-прежнему актуально изучение механизмов действия природных фитогормонов и их синтетических аналогов, направленно изменяющих рост и развитие растений, повышающих продуктивность и качество сельскохозяйственных культур, а также их устойчивость к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды. Активно ведется поиск и испытания новых синтетических препаратов, действие которых в очень малых концентрациях приводило бы к стимуляции важнейших физиолого-биохимических процессов в растительном организме и, как результат, обеспечивало бы повышение урожайности и качества сельскохозяйственной продукции. В этой связи значительный интерес представляет регулятор роста нового поколения — синтетический препарат мелафен, представляющий собой меламиновую соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты, получаемый с высоким выходом из промышленно доступных продуктов [1]. При изучении ответных реакций растительных организмов было установлено, что мелафен в очень низких концентрациях проявляет рост-регулирующую активность и может быть рекомендован в качестве регулятора роста растений, отвечающий современным требованиям технологий применения регуляторов роста для повышения продуктивности важнейших сельскохозяйственных культур [2]. При изучении механизма действия мелафена на растения были установлены следующие факты:

— активация энергетических процессов, в частности дыхания и фотосинтеза, причем препарат в большей степени оказывал влияние на циклическое фотофосфорилирование [3];

— усиление регуляции метаболизма клеток тирозинкиназной сигнальной системой и изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков

фотосинтетической ассимиляции углерода под действием мелафена [4];

— усиление синтеза фенольных соединений и алкалоидов [5].

Высокая физиологическая активность препарата мелафен связана с его влиянием на физико-химическое состояние биологических мембран растительного и животного происхождения. Это, в свою очередь, приводит к изменению липид-белкового взаимодействия, влияющего на активность ассоциированных с мембранами ферментов [4].

Удобным объектом для изучения молекулярных механизмов действия регуляторов роста являются клубни картофеля *Solanum tuberosum* L., апикальные меристемы которых в течение определенного времени после уборки находятся в состоянии глубокого покоя, т.е. не переходят к росту даже при благоприятных условиях внешней среды. Продолжительность глубокого покоя закреплена генетически и является характерным признаком сорта. По окончании периода покоя меристемы клубней, находящихся в благоприятных условиях (температура, влажность) переходят к росту. При неблагоприятных условиях рост замедляется, наступает период вынужденного покоя. Регуляция прорастания клубней имеет большое значение для практики картофелеводства: подавление прорастания является существенным фактором при хранении урожая клубней картофеля, тогда как стимуляция прорастания важна для предпосевной обработки клубней.

Изучение механизма действия мелафена на ростовые процессы в клубнях растений картофеля показало его влияние на процессы деления, растяжения и активации эндоплазматического ретикулаума клеток апикальных меристем [6, 7]. Установлено

увеличение площади пластидного аппарата клеток (укрупнение пластид) и стимулирующее действие препарата на накопление крахмала и развитие периферического пластидного ретикула в лейкопластах клеток апикальных меристем клубней под действием мелафена [8]. В препарате плазмалеммы из паренхимных клеток обработанных мелафеном клубней отмечалось возрастание активности мембраносвязанной H^+ -АТФазы и увеличение пассивной протонной проницаемости мембраны везикул плазмалеммы, что влияет на поступление низкомолекулярных метаболитов и фитогормонов в клетки апекса и на процессы деления и растяжения клеток апекса клубней картофеля [7]. Однако имеющиеся данные не дают полного представления о механизмах действия мелафена, связанных с интенсификацией физиологических процессов в клетках апикальных меристем в процессе роста. В связи с этим дальнейшее изучение механизма действия этого перспективного регулятора роста на клетки клубней картофеля представляет значительный интерес.

Настоящая работа является частью комплексного биохимического исследования по изучению механизма действия мелафена на ростовые процессы в меристемах клубней картофеля. Синтетические процессы при росте требуют значительных энергозатрат, которые напрямую связаны с активацией энергетического обмена клеток и, в первую очередь, с изменением энергетики митохондрий. Представляло интерес оценить влияние мелафена в рост-стимулирующей концентрации на митохондриальный аппарат клеток апикальных меристем клубней картофеля. Митохондрии — одна из наиболее удобных для анализа структур при изучении реакции клеток на действие биологически активных веществ, поскольку их тонкая структура в значительной степени является показателем функционального состояния клеток.

Цель работы — электронно-микроскопическое и морфометрическое изучение митохондрий в клетках апикальных меристем клубней картофеля при прорастании и под действием мелафена в рост-стимулирующей концентрации.

МЕТОДИКА

Объект исследования — апексы (апикальные меристемы) клубней картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской в норме (на стадии прорастания) и под действием мелафена в ранее установленной рост-стимулирующей концентрации [6]. Для опыта брали по 30 клубней, находящихся в состоянии вынужденного покоя и погружали на 10 мин в раствор мелафена в концентрации 10^{-8} М (сильная стимуляция роста). Контролем служили клубни, обработанные дистиллированной водой. После обработки клубни из опытных и контрольных вариантов высушивали и помещали во влажные камеры при опти-

Таблица 1. Ультраморфометрическая характеристика митохондрий в клетках апикальных меристем клубней картофеля в норме (при прорастании) и под действием мелафена

Вариант	Число митохондрий на срезе клетки	Общая площадь митохондрий на срезе клетки, $\mu\text{м}^2$	Площадь одной митохондрии, $\mu\text{м}^2$
Контроль	2.03 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.22 ± 0.01
Мелафен, 10^{-8} М	2.04 ± 0.01	0.65 ± 0.02	0.32 ± 0.03

мальных условиях для прорастания (18°C , темнота). Через 12–14 сут при появлении на клубнях признаков роста из опытных и контрольных клубней под бинокулярным микроскопом МБС-2 (ЛОМО, Россия) извлекали “глазки” (апексы), фиксировали их в 2.5%-ном глутаровом альдегиде на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.1–7.2) и в 1%-ном OsO_4 , обезвоживали этанолом возрастающей концентрации и ацетоном, заключали в эпоксидную смолу ЭПОН-812 по общепринятой методике. Для сравнительного изучения из контрольных и опытных вариантов были взяты клетки стержневой меристемы апексов и клетки нижнего слоя центральной меристемы, граничащие со стержневой зоной. Согласно ранее полученным данным именно эти клетки являются клетками-мишенями для действия биологически активных веществ при регуляции ростовых процессов в клубнях картофеля [9, 10]. Предварительную ориентировку срезов для определения зональности апексов выполняли под световым микроскопом, используя полутонкие срезы. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме (“LKB”, Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца [11] и просматривали под электронным микроскопом JEM-100С (“Jeol”, Япония). Для количественной оценки митохондриального аппарата клеток апексов была применена специальная компьютерная программа “Cell Counter”, позволяющая автоматически обчислять площади клеток и различных внутриклеточных структур (в том числе, митохондрий, $\mu\text{м}^2$) по отсканированным изображениям, полученным с микроскопа (с учетом увеличений микроскопа и разрешений сканера) [12]. Точность вычисления площади определяется погрешностью при фотографировании и сканировании изображения, а также точностью представления вещественных чисел в компьютере.

Число митохондрий на срез клетки (или частоту встречаемости митохондрий) просчитывали визуально на тех же изображениях клетки. Результаты измерений с 30 негативов каждого варианта опыта, выраженные средними морфометрическими показателями, и их стандартные ошибки представлены в табл. 1. Статистическую обработку данных проводи-

Таблица 2. Ультраструктурная характеристика митохондрий в клетках апексов клубней картофеля под действием мелафена (в % от числа просмотренных митохондрий)

Вариант	Характеристика митохондрий				
	форма	строма		кристы	
		электронно-прозрачная	конденсированная	единичные, пластинчатые	многочисленные
Контроль	Округлая, овальная	58	42	58	42
Мелафен, 10^{-8} М	Округлая, овальная, удлиненная	38	62	38	62

ли с помощью компьютерной программы “Microsoft Excel”. Кроме того, наряду со средними морфометрическими данными о числе и площади митохондрий представляли интерес показатели, характеризующие разнообразие митохондриального аппарата (по ультраструктурной характеристике) в клетках апексов контрольных и опытных растений. Для этого в каждом случае подсчитывали число митохондрий с той или иной морфологией. Эти данные, выраженные в процентах от общего числа просмотренных митохондрий в каждом варианте опыта, представлены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный аппарат клеток стержневой и пограничного с ней слоя центральной меристемы в контроле (при прорастании) представлен в среднем двумя митохондриями на срез клетки (при увеличении микроскопа 15000; табл. 1). Средняя площадь одной митохондрии составляла 0.22 ± 0.01 мкм², а общая площадь всех митохондрий на срезе клетки — 0.45 ± 0.01 мкм² (табл. 1). В клетках стержневой меристемы апексов клубней картофеля митохондрии были достаточно разнообразными по морфологии даже в

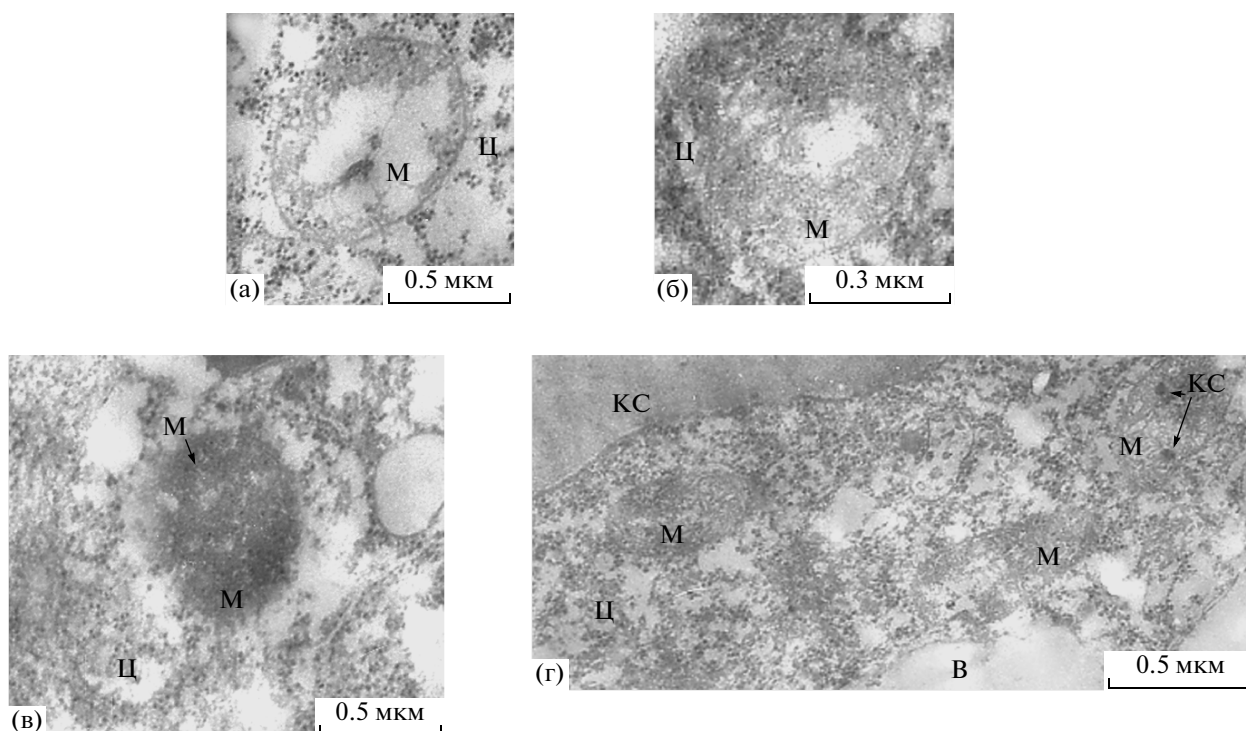


Рис. 1. Фрагменты клеток стержневой меристемы апексов клубней картофеля (контроль, при прорастании): а, б – митохондрии с участками малой электронной плотности в центре и слабовыраженными кристами; в, г – конденсированные митохондрии.

Обозначения к рис. 1, 2: В – вакуоль, ИГ – интрамитохондриальные гранулы, КС – клеточная стенка, М – митохондрия, Пл – пластида, Ц – цитоплазма.

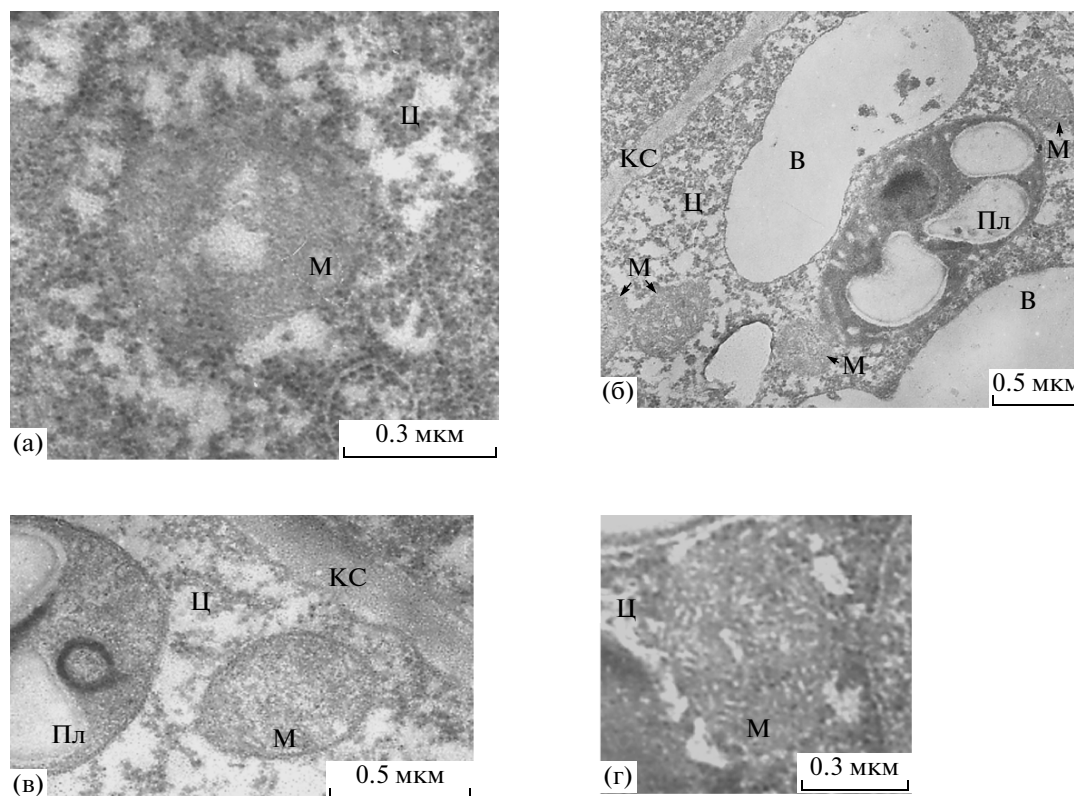


Рис. 2. Фрагменты клеток стержневой меристемы клубней картофеля (обработка мелафеном, 10^{-8} М): а – митохондрия с электронно-прозрачным участком в центре; б–г – конденсированные митохондрии.

пределах одной клетки. Они были округлой или овальной формы (рис. 1а, 1б), более правильной, чем форма пластид. Митохондрии имели среднюю электронную плотность матрикса, равную либо незначительно превышающую плотность окружающей гиалоплазмы и заметно ниже плотности стромы пластид (табл. 2; рис. 1а, 1б). У многих митохондрий в центре обнаруживалась светлая зона малой электронной плотности (табл. 2; рис. 1а, 1б), в которой при больших увеличениях микроскопа можно наблюдать фибриллы митохондриальной ДНК. Митохондрии имели немногочисленные, неупорядочно ориентированные, рыхло расположенные, часто слабо выраженные кристы (рис. 1а, 1б). В матриксе отдельных митохондрий можно было наблюдать темные интрамитохондриальные гранулы неизвестной природы (рис. 1г). Таким образом, в большинстве случаев (58%) митохондрии имели ортодоксальную конфигурацию, соответствующую состоянию сниженной выработки АТФ. Однако, наряду с ортодоксальными митохондриями, встречались и более конденсированные митохондрии (уплотненный матрикс, четко очерченные кристы с расширенными интракристными промежутками, 42%) (табл. 2; рис. 1в, 1г), что соответствует состоянию активной продукции АТФ.

Анализ электронно-микроскопических и ультраморфометрических данных показал, что под дей-

ствием мелафена в стимулирующей рост концентрации по отдельным параметрам внутренней структуры митохондриального аппарата клеток апикальных меристем клубней картофеля происходили качественные и количественные изменения.

Подсчет числа митохондрий на срез клетки не выявил различий между опытным и контрольным вариантами (табл. 1), однако в 1.5 раза увеличивалась средняя площадь одной митохондрии (до 0.32 ± 0.03 мкм²) и общая площадь всего митохондриального аппарата клеток (до 0.65 ± 0.03 мкм², табл. 1). Таким образом, наблюдалось укрупнение митохондрий под действием мелафена в стимулирующей рост концентрации. Этот факт может свидетельствовать об усилении активности митохондрий, проявляющейся в увеличении площади их поверхности [13, 14], что необходимо для оптимизации энергетических потребностей растущей клетки. Следует отметить, что это явление хорошо согласуется с нашими данными об усилении роста апексов клубней картофеля при данной концентрации мелафена [6].

При обработке мелафеном в клетках отмечалось уменьшение числа митохондрий с электронно-прозрачными участками матрикса (до 38%, табл. 2; рис. 2а) и увеличение (до 62%) числа конденсированных митохондрий, более богатых кристами

(дифференциация митохондрий) (рис. 2б–2г). Известно, что конденсированная структура митохондрий соответствует усилению процесса окислительного фосфорилирования и, следовательно, увеличению выработки АТФ в клетке [15] при возрастании потребности в энергии.

На митохондриях, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), было показано [16], что под действием мелафена происходило увеличение максимальной скорости окисления НАДФ-зависимых субстратов и эффективности окислительного фосфорилирования, активирование переноса электронов на конечном (цитохромоксидазном) участке дыхательной цепи митохондрий, что, по-видимому, обеспечивало активацию энергетических процессов в клетке. С этим, очевидно, связано описанное в литературе ускорение прорастания семян, усиление теплопродукции растительных клеток и активация синтетических процессов под действием мелафена [2].

К настоящему времени накоплена обширная литература относительно морфологических изменений в ответ на различного рода воздействия на клетку. Показано, что структурные и ультраструктурные изменения клеточных органоидов в ответ на воздействия соответствуют характеру и степени определенных функциональных и биохимических клеточных изменений. Можно считать доказанным, что изменения структуры клеточных органоидов связаны с их функциональным состоянием и хорошо отражают его [14, 15, 17], а точные количественные параметры не только существенно дополняют картину структурных изменений клеточных органелл, но и позволяют судить о степени функциональной активности клетки и ее структур.

Ультраморфометрический анализ полученных данных позволяет заключить, что под действием мелафена в стимулирующей рост концентрации в клетках апикальных меристем клубней картофеля площадь митохондриального аппарата и отдельные показатели внутренней структуры митохондрий были выше, чем в контроле. Следует отметить, что наблюдалась определенная корреляция между действием мелафена в рост-стимулирующей концентрации и действием цитокинина. Это корреляция проявлялась в стимуляции процессов деления и растяжения клеток, в активации гранулярного эндоплазматического ретикулума цитоплазмы, в укрупнении пластид, накоплении крахмала и развитии периферического пластидного ретикулума в клетках апикальных меристем клубней картофеля, показанных нами ранее [6–8], а также в установленной в опытах *in vitro* стимуляции активности митохондрий клеток меристем картофеля в присутствии кинетина [18].

Показано, что мелафен, подобно стимуляторам роста цитокининового ряда, участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений, о чем свидетельствуют данные об однонаправленно-

сти действия природного фитогормона цитокинина и мелафена на растительную клетку. Однако пока нельзя утверждать, что механизмы действия этих веществ полностью совпадают [19, 20].

Полученные данные могут представлять интерес для практики картофелеводства, так как расширяют наши представления о биохимических механизмах регуляции ростовых процессов в клубнях картофеля с помощью мелафена и могут быть использованы при разработке новых биотехнологий по регуляции покоя, роста и повышения продуктивности картофеля.

Авторы выражают глубокую благодарность разработчикам препарата д.б.н. В.С. Резнику и к.х.н. С.Г. Фаттахову (Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН) за предоставленную возможность работать с мелафеном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ № 2158735 // Б.И. 2000. № 31. С. 314.
2. Фаттахов С.Г., Лосева Н.Л., Коновалов А.И., Резник В.С., Алябьев А.Ю., Гордон Л.Х., Трибунских В.И. // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 1. С. 127–129.
3. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г., Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. // Докл. РАН. 2006. Т. 409. № 1. С. 123–125.
4. Каримова Ф.Г., Ванюшина С.А., Федина Е.О., Мударисов Ф.А. Сб. материалов Всерос. семинара-совещания “Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения “Мелафен” в сельском хозяйстве и биотехнологии”. Казань: РИЦ “Школа”, 2006. С. 50–69.
5. Загоскина Н.В., Алявина А.К., Гладышко Т.О. Сб. материалов Всерос. семинара-совещания “Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения “Мелафен” в сельском хозяйстве и биотехнологии”. Казань: РИЦ “Школа”, 2006. С. 114–120.
6. Ладыженская Э.П., Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Фаттахов С.Г., Кораблёва Н.П., Резник В.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 246–251.
7. Платонова Т.А., Ладыженская Э.П., Евсюнина А.С., Лагутина Н.Ф., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 4. С. 468–475.
8. Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 354–360.
9. Платонова Т.А., Кораблёва Н.П. // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 6. С. 870–881
10. Korableva N.P., Platonova T.A., Dogonadze M.Z., Evsyunina A.S. // Biol. Plantarum. 2002. V. 45. № 1. P. 39–43.
11. Reynolds E.S. // J. Cell Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208–210.
12. Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Беликов С.В., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 3. С. 330–339.

13. Машанский В.Ф., Винниченко Л.Н., Мосевич Т.Н., Дунаева С.Е., Сеницкая И.А. // Ультраструктура растительных клеток. Л.: Наука, 1972. С. 90–97.
14. Польшгалова О.О., Гордон Л.Х., Бутакова И.В., Алексеева В.Я., Ценцевицкий А.Н., Швец И.М. // Физиология и биохимия культ. растений. 1991. Т. 23. № 4. С. 343–348.
15. Пономарева А.А., Польшгалова О.О. // Цитология. 2001. Т. 43. № 6. С. 561–565.
16. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 5. С. 672–677.
17. Машанский В.Ф., Рабинович И.М. Ранние реакции клеточных органоидов. Л.: Наука, 1987. 119 с.
18. Шатило В.И., Морозова С.Е., Мелик-Саркисов О.С. // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 1. С. 150–157.
19. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. // Физиология растений. 2000. Т. 49. № 4. С. 626–640.
20. Кашина О.А., Фаттахов С.Г., Лосева Н.Л., Коновалов А.И., Гордон Л.Х., Алябьев А.Ю., Резник В.С. // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 1. С. 123–124.

Effect of Melafen on Mitochondrial Apparatus of Apical Meristem in Growth Regulation in Potato Tubers

T. A. Platonova, A. S. Evsyunina, and N. P. Korablyova

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: platonova@inbi.ras.ru

Received June 24, 2010

Abstract—Growth stimulation in potato *Solanum tuberosum* L. tubers by melafen preparation caused an increase in area of mitochondrial apparatus (increase in mitochondrial size) in apical meristem cells. Melafen stimulated mitochondrial differentiation (increase in number of condensed mitochondria enriched in cristas). Obtained data revealed an increase in activity of mitochondrial apparatus which is connected with an increase in energetic demands of cells in potato tuber apexes at melafen growth activation.