

	Название статьи	Страницы	Цит.
ОБЗОРЫ			
<input type="checkbox"/>	<i>К ВОПРОСУ О РАЗНООБРАЗИИ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ</i> Десницкий А.Г.	243-248	2
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ			
<input type="checkbox"/>	<i>СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА SC5, SC6, SC7 И SC3A</i> Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.	249-263	6
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	<i>ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МЕРИСТЕМ-СПЕЦИФИЧНОГО ГЕНА WOX5 ПРИ ОРГАНОГЕНЕЗЕ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ</i> Осипова М.А., Долгих Е.А., Лутова Л.А.	264-275	4
<input type="checkbox"/>	<i>ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ РОСТА КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ</i> Антонова Г.Ф., Железниченко Т.В., Стасова В.В.	276-284	1
<input type="checkbox"/>	<i>ЛАБИЛЬНОСТЬ МОРФОГЕНЕЗА РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ RUPPIA MARITIMA (RUPPIACEAE, ALISMATALES): ОТ ДВУХ ЛАТЕРАЛЬНЫХ ЦВЕТКОВ К ОДНОМУ ТЕРМИНАЛЬНОМУ</i> Локк И.Э., Соколов Д.Д., Ремизова М.В.	285-299	2
ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ			
<input type="checkbox"/>	<i>РАЗВИТИЕ И МЕТАБОЛИЗМ ЗАРОДЫШЕЙ КУРИЦЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ПРИ ЗВУКОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ</i> Солдатов И.Б.	300-306	2
ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	<i>РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА APETALA1 НА РАЗВИТИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ В ЦВЕТКАХ МУТАНТА ABRUPTUS ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH</i> Кавай-оол У.Н., Куприянова Е.В., Ежова Т.А.	307-311	1
ЦИТОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	<i>САМОСИНХРОНИЗАЦИЯ РИТМА СИНТЕЗА БЕЛКА В КУЛЬТУРАХ НАСАТ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА</i> Бродский В.Я., Терских В.В., Васильев А.В., Звездина Н.Д., Воротеляк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А.	312-319	3
РЕЦЕНЗИИ			
<input type="checkbox"/>	<i>"ОТ МИКРОСПОРЫ К СОРТУ" Т. Б. БАТЫГИНА, Н. Н. КРУГЛОВА, В. Ю. ГОРБУНОВА, Г. Е. ТИТОВА, О. А. СЕЛЬДИМИРОВА (М.: НАУКА, 2010. 174 С.)</i> Ежова Т.А.	320	0

УДК 591

К ВОПРОСУ О РАЗНООБРАЗИИ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ

© 2011 г. А. Г. Десницкий

Кафедра эмбриологии, Санкт-Петербургский государственный университет
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

E-mail: adesnitskiy@mail.ru

Поступила в редакцию 11.06.10
Окончательный вариант получен 28.09.10

Рассмотрены литературные данные по особенностям протекания процесса дробления яйца у разных представителей отряда хвостатых амфибий, состоящего из 10 семейств. Установлено, что у значительного числа видов Plethodontidae, Cryptobranchidae и некоторых других семейств синхронность делений утрачивается уже после 8-клеточной стадии дробления крупных, богатых желтком и непигментированных яиц. Описываемое в учебниках по биологии развития “стандартное” дробление ранних зародышей хвостатых амфибий, состоящее примерно из 10 синхронных делений сравнительно небольших яйцеклеток, характерно только для семейств Ambystomatidae и Salamandridae, включающих всего лишь 19.3% от общего числа видов отряда Caudata. Однако в каждом из этих семейств имеется некоторое число видов, для которых, по-видимому, характерен “нестандартный” тип раннего дробления. Обсуждаются эволюционные взаимоотношения между двумя основными типами раннего эмбриогенеза в отряде Caudata.

Ключевые слова: дробление, онтогенетическое разнообразие, размер яйца, эволюция развития, *Ambystoma*, Caudata, Hynobiidae, Plethodontidae, Salamandridae.

Представители отряда хвостатых амфибий (Caudata или Urodela) из семейств Ambystomatidae (прежде всего мексиканский аксолотль) и Salamandridae (прежде всего альпийский, испанский, обыкновенный и японский тритоны) были основными объектами экспериментальной эмбриологии в первой половине XX века (Nieuwkoop, 1996), но сохраняют свою ценность и в настоящее время (Hurtado, De Robertis, 2007). Имеются специальные исследования, посвященные морфологическим и хронологическим аспектам развития этих животных (Бордзиловская, Детлаф, 1975; Васецкий, 1975; Лиознер, 1975; Детлаф, 2001; и др.). На начальном этапе эмбриогенеза отложенные в воду яйца диаметром порядка 2 мм претерпевают обширный период синхронных делений, после чего происходят перестройка клеточного цикла и замедление темпов пролиферации клеток. В качестве примера особенно тщательного изучения этих процессов можно привести работы на мексиканском аксолотле *Ambystoma mexicanum* (Signoret, Lefresne, 1971; Hara, 1977) и японском тритоне *Synops (Triturus) pyrrhogaster* (Suzuki et al., 1976; Yamazaki-Yamamoto et al., 1984). У раннего зародыша аксолотля в пигментированном анимальном полушарии протекают 10 последовательных синхронных делений дробления, а у зародыша японского тритона — 11–12 синхронных делений. Эти данные о

подробностях раннего дробления хвостатых амфибий совершенно обоснованно включаются в учебники по эмбриологии и биологии развития (см., например, Бочаров, 1988; Signoret, Collenot, 1991).

Однако уже более ста лет тому назад было известно, что имеется (в основном в Северной Америке) значительное количество видов Caudata с непигментированными, богатыми желтком яйцами, у которых синхронность клеточных делений утрачивается на самых ранних этапах дробления (Eycleshymer, 1902; Wilder, 1904; Smith, 1906; и др.). В начале XX века американские хвостатые амфибии с “нестандартным” развитием из семейств Cryptobranchidae, Plethodontidae и Proteidae иногда использовались в качестве объектов экспериментально-эмбриологических исследований (Eycleshymer, 1904; Goodale, 1911; Smith, 1922). Однако впоследствии интерес эмбриологов к этим животным надолго угас, возможно, вследствие успехов школы Ганса Шпемана (Spemann, Mangold, 1924; Spemann, 1938) и других авторов, работавших с зародышами хвостатых амфибий из семейств Ambystomatidae и Salamandridae. Сравнительно недавние попытки (Jockusch, 1996; Wake, Hanken, 1996) вновь привлечь внимание эмбриологов к безлегочным саламандрам (семейство Plethodontidae) не привели к оживлению экспериментальных исследований по биологии развития этого семейства.

Недавно была опубликована подробная информация по варьированию процесса гастрюляции в пределах отряда Caudata (Keller, Shook, 2004). Однако в литературе отсутствуют сводки о вариабельности более ранних этапов эмбриогенеза этих животных. В настоящей статье представлен обзор литературных данных по особенностям протекания процесса раннего дробления яйца у разных представителей отряда хвостатых амфибий, состоящего (согласно сайту <http://amphibiaweb.org> на 29 мая 2010 г.) из 10 семейств и 585 видов.

В качестве отправной точки уместно взять представителей семейства Plethodontidae, самого многочисленного, состоящего из 395 видов (67.5% от общего числа видов в отряде Caudata). Безлегочные саламандры характеризуются значительным онтогенетическим разнообразием, включая прямое развитие, происходящее на земле, и различные варианты бифазного жизненного цикла с водной личинкой (Wake, Marks, 1993; Wake, Hanken, 1996). Как правило, яйца богаты желтком и лишены пигмента, при этом их диаметр варьирует у разных видов от 1.4 до 7.2 мм. Отметим, что безлегочные саламандры являются единственным семейством отряда хвостатых амфибий, у которых встречается прямое развитие.

Прежде всего, в литературе имеются данные по дроблению зародышей видов, у которых эмбриональное и личиночное развитие проходит в воде — *Eurycea (Spelerpes) bislineata* (Goodale, 1911) и *Gyrinophilus porphyriticus* (Collazo, Marks, 1994). Есть также данные по видам, у которых эмбриогенез протекает на земле, а потом имеется стадия водной личинки — *Desmognathus fuscus* (Hilton, 1904, 1909; Wilder, 1904) и *Hemidactylum scutatum* (Humphrey, 1928). Кроме того, изучены виды с прямым развитием — *Plethodon cinereus* (Dent, 1942) и *Desmognathus aeneus* (Marks, Collazo, 1998). Несмотря на разные репродуктивные стратегии и различия в диаметре яйца (около 2.2 мм у *D. aeneus*, 2.7 мм у *E. bislineata* и *H. scutatum*, 3 мм у *D. fuscus*, 4 мм у *G. porphyriticus* и *P. cinereus*), начальные этапы эмбриогенеза у всех перечисленных видов безлегочных саламандр протекают сходно. Синхронность делений клеток зародыша утрачивается на самых ранних этапах дробления — в большинстве случаев после 8-клеточной стадии, причем третье деление, как и два предыдущих, часто является меридиональным либо лишь немного отклоняется от меридионального. Различия размера образующихся в ходе последующего дробления очень мелких анимальных и очень крупных вегетативных бластомеров у зародышей Plethodontidae выражены гораздо резче, чем у аксолотля и тритона. Однако предположение (Wake, Hanken, 1996) о протекании меробластического дробления у *Ensatina eschscholtzii*, вида с прямым развитием и диаметром яйца 6.9 мм, не подтверждено в более поздней публикации, указывающей, что у всех безлегочных сала-

мандр дробление голобластическое (Marks, Collazo, 1998). Наконец, виды Plethodontidae с прямым развитием не обязательно имеют более крупные яйцеклетки, чем виды с бифазным развитием, что особенно хорошо видно при сопоставлении *D. aeneus* и *G. porphyriticus*. Недавнее молекулярно-филогенетическое исследование (Chippindale et al., 2004) показало возможность возврата от эволюционно продвинутого прямого развития плетодонтид к бифазному развитию (анцестральному как для этого семейства, так и для всего отряда хвостатых амфибий). По нашему мнению, этот эволюционный переход существенно облегчается тем обстоятельством, что у безлегочных саламандр при возникновении прямого развития не было обширных морфофизиологических преобразований на самых начальных этапах эмбриогенеза.

Представители семейств Cryptobranchidae (3 вида) и Proteidae (6 видов) откладывают в воду непигментированные, богатые желтком яйца диаметром 5–7 мм. У Cryptobranchidae ранний эмбриогенез подробно изучен у *Cryptobranchus allegheniensis* (Smith, 1906, 1912a, b, 1922, 1926) и *Andrias japonicus (Megalobatrachus maximus)* (de Bussy, 1905). Описания раннего дробления у зародышей этих животных очень хорошо совпадают с соответствующими данными, полученными на Plethodontidae. У Proteidae начальные этапы развития изучены только у *Necturus maculosus* (Eycleshymer, 1902, 1904, 1906). Характер дробления в основном сходен с таковым у плетодонтид и криптобранхид, однако отличается большей нерегулярностью прохождения борозд раннего дробления; весьма велики вариации даже у зародышей из одной и той же кладки.

Перейдем к рассмотрению семейства Hynobiidae (53 вида), представителей которого иногда используют (наряду с амбистоматидами и саламандридами) в экспериментально-эмбриологических исследованиях (Берман и др., 1987; Arizumi et al., 1998). У большинства видов этого семейства диаметр откладываемого в воду пигментированного яйца составляет 1.5–3.2 мм. Синхронность делений анимальных бластомеров утрачивается уже на 16-клеточной стадии у *Hynobius nebulosus* (Kunitomo, 1910) и *Salamandrella keyserlingii* (Сытина и др., 1987). Однако различия в размерах более мелких анимальных и более крупных вегетативных бластомеров при последующем дроблении обоих этих видов примерно такого же порядка, как у уже упомянутых зародышей аксолотля и тритонов. Иными словами, в целом, по-видимому, имеется больше сходства со “стандартным” дроблением Ambystomatidae и Salamandridae, чем с нестандартным дроблением Plethodontidae и Cryptobranchidae. К сожалению, в обстоятельных морфологических исследованиях развития *H. nigrescens* (Takahashi, Iwasawa, 1988; Iwasawa, Yamashita, 1991) нет деталей

о синхронности клеточных делений у ранних зародышей. Особого внимания заслуживает *Onychodactylus japonicus* (Iwasawa, Kera, 1980). У этого вида яйцеклетки крупные и непигментированные, диаметром около 5 мм, борозда третьего деления проходит по меридиану (в отличие от других исследованных представителей семейства Hynobiidae) и весь ход дробления весьма похож на таковой у зародышей Plethodontidae.

К сожалению, в литературе нет данных об особенностях дробления зародышей у четырех небольших семейств хвостатых амфибий, обитающих исключительно в Северной Америке и включающих всего лишь 15 видов. В большинстве случаев яйца крупные (диаметр более 4 мм), непигментированные и богатые желтком. Так обстоит дело у семейств Amphiumidae (Sever et al., 1996a; Fontenot, 1999; Gunzburger, 2003), Dicamptodontidae (Nussbaum, 1969, 1987) и Rhyacotritonidae (Noble, Richards, 1932; Nussbaum, Tait, 1977; Karkaker et al., 2005). Следовательно, есть определенные основания предполагать, что начальные стадии эмбриогенеза у этих трех семейств хвостатых амфибий могли бы быть сходными с таковыми у уже изученных Plethodontidae и Cryptobranchidae. С другой стороны, у представителей семейства Sirenidae откладываемые в воду яйцеклетки значительно мельче (не более 3 мм в диаметре) и анимальное полушарие яйца сильно пигментировано (Noble, Marshall, 1932; Noble, Richards, 1932; Sever et al., 1996b). Разумеется, вопрос о характере раннего дробления является в данном случае особо интригующим.

Наконец, уместно вернуться к представителям Caudata, наиболее обстоятельно изученным в отношении раннего эмбриогенеза – семействам Ambystomatidae (32 вида) и Salamandridae (81 вид). Отметим, что оба семейства представляют лишь 19.3% от общего числа видов хвостатых амфибий. Особенности начальных этапов развития типичных видов этих семейств – соответственно мексиканского аксолотля и японского тритона – уже были рассмотрены выше. Однако анализ литературы дает основания предполагать, что в каждом из двух семейств имеются виды с теми или иными отклонениями от стандартного протекания начальных этапов эмбриогенеза.

В частности, значительное число азиатских и европейских представителей семейства Salamandridae – *Echinotriton chinhaiensis*, *Euproctus montanus*, *Mertensiella caucasica*, *Pachytriton brevipes*, *P. labiatus*, *Salamandra salamandra (maculosa)*, *Tylosotriton taliangensis* и другие – характеризуется крупными, богатыми желтком яйцами (Банников и др., 1977; Noble, 1927; Buckley et al., 2007; см. также сайт <http://amphibiaweb.org>). Самые начальные этапы развития происходят (у разных видов по-разному) в воде, на земле или в яйцеводах материнской осо-

би. Отметим, что для значительного числа видов этого семейства данных по размеру яйца и другим аспектам биологии размножения вообще нет. Среди упомянутых видов Salamandridae с крупными яйцами особенности процесса раннего дробления подробно изучены только у живородящей саламандры *S. salamandra* (Groenroos, 1895). Результаты показывают гораздо больше сходства с начальными этапами эмбриогенеза у семейств Plethodontidae и Cryptobranchidae, чем с таковыми у обыкновенного, альпийского, испанского или японского тритона. Разумеется, данные этой старой работы было бы важно подтвердить на том же или каком-либо другом виде из рода *Salamandra*.

Североамериканское семейство Ambystomatidae состоит из единственного рода *Ambystoma*, в котором имеется два вида с необычной биологией размножения: *Ambystoma cingulatum* и *A. opacum* откладывают яйца не в воду, а на дно высохших временных водоемов (O'Donnell, 1937; Anderson, Williamson, 1976; Petranka et al., 1982). Таким образом, эмбриональное развитие протекает на земле, и вылупление личинок происходит после затопления яиц дождевой водой. Предполагают, что такие особенности онтогенеза эволюционировали у двух видов конвергентно, в ответ на сходные экологические условия. Важно отметить, что при этом у амбистоматид (в отличие от других семейств хвостатых амфибий, у которых имеет место переход к эмбриогенезу на земле) не наблюдается увеличения размеров и изменения структуры яйца (Nussbaum, 1987). В частности, диаметр зрелого яйца в пределах всего рода *Ambystoma* варьирует от 2 до 3 мм, тогда как у *A. cingulatum* и *A. opacum* он составляет соответственно 2.3 и 2.7 мм. Остается неизвестным, каков характер раннего дробления этих двух видов, и данный вопрос мог бы быть предметом специального исследования.

В заключение уместно кратко обсудить эволюционные аспекты раннего эмбриогенеза в отряде хвостатых амфибий. Более 40 лет тому назад (Salthe, 1969) была предложена экологическая классификация типов развития у Caudata. Особенности протекания ранних стадий дробления при этом не учитывались. Были выделены тип 1 (бифазное развитие маленьких пигментированных яиц, откладываемых в пруды или другие стоячие водоемы), тип 2 (бифазное развитие крупных непигментированных яиц, откладываемых в быстро текущую воду) и тип 3 (прямое развитие крупных непигментированных яиц, откладываемых на землю), а также предпринята попытка установить эволюционные взаимоотношения между ними. Однако в настоящее время ясно, и это видно из нашего обзора, что репродуктивные стратегии в отряде хвостатых амфибий гораздо более разнообразны, чем предполагалось в упомянутой работе. Типичные примеры: разные варианты протекания эмбрионального развития на земле с последующей

водной личинкой (у *Hemidactylum scutatum* и *Ambystoma opacum*), переход к прямому развитию у *Desmognathus aeneus* без существенного увеличения размера яйца и т.д. Тем не менее, мы считаем, что полностью отвергать гипотезу Сальте (Salthe, 1969) об анцестральном характере второго типа развития у Caudata было бы преждевременно. Отметим, что идею об анцестральности развития хвостатых амфибий в быстро текущей воде поддерживали также и некоторые другие авторы (Veith et al., 1998).

По нашему мнению, однако, ключевым должен быть вопрос о выяснении характера начальных этапов эмбриогенеза у самых примитивных семейств Caudata, имеющих наружное оплодотворение. Такими семействами являются Сруптобранхидае, Нунобидае и Сиренидае (Zhang, Wake, 2009). Как уже указано выше, раннее дробление примитивных криптобранхид сходно с нестандартным ранним дроблением эволюционно продвинутых плетодонтид. Многие Нунобидае (например, *Hynobius nebulosus* и *Salamandrella keyserlingii*) имеют промежуточный характер раннего дробления, но нельзя исключить, что в этом достаточно обширном семействе имеются виды со стандартным ранним дроблением, включающим серию из примерно 10 синхронных делений. Весьма вероятно наличие такого стандартного дробления у представителей семейства Сиренидае, но пока это не показано. Таким образом, вопрос об анцестральном типе раннего дробления в отряде хвостатых амфибий остается открытым.

Наконец, отметим, что в последние годы модельным объектом биологии развития стала листовая лягушка *Eleutherodactylus coqui* — представитель отряда Anura с нестандартным типом развития (Callery, 2006). Для биологии развития амфибий было бы очень важно сделать модельным объектом также и какой-то вид из отряда Caudata, имеющего крупные, богатые желтком яйца и необычный характер раннего дробления. При выборе такого объекта вопрос о наличии у него прямого развития или бифазного жизненного цикла, возможно, не имеет решающего значения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В.Г. и др. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М.: Просвещение, 1977. 415 с.
- Берман Д.И., Горголюк С.И., Нейфах А.А. Зависимость скорости эмбрионального развития от температуры у сибирского углозуба и тритона обыкновенно // Онтогенез. 1987. Т. 18. № 3. С. 247–256.
- Бордзиловская Н.П., Демлаф Т.А. Аксолотль *Ambystoma mexicanum* Соре // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 370–391.
- Бочаров Ю.С. Эволюционная эмбриология позвоночных. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 232 с.
- Васецкий С.Г. Испанский тритон *Pleurodeles waltlii* Michah // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 342–369.
- Демлаф Т.А. Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001. 211 с.
- Лиознер Л.Д. Тритоны *Triturus vulgaris*, *Tr. cristatus* // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 324–341.
- Сытина Л.А., Медведева И.М., Година Л.Б. Развитие сибирского углозуба. М.: Наука, 1987. 88 с.
- Anderson J.D., Williamson G.K. Terrestrial mode of reproduction in *Ambystoma cingulatum* // Herpetologica. 1976. V. 32. P. 214–221.
- Arizumi T., Takano K., Ninomiya H., Asashima M. Activin-treated urodele animal caps: 1. Mesoderm and endoderm differentiation of salamander animal caps // Zool. Sci. 1998. V. 15. P. 887–892.
- Buckley D., Alcobendas M., Garcia-Paris M., Wake M.H. Heterochrony, cannibalism, and the evolution of viviparity in *Salamandra salamandra* // Evol. Devel. 2007. V. 9. P. 105–115.
- Callery E.M. There's more than one frog in the pond: a survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology // Stem. Cell Devel. Biol. 2006. V. 17. P. 80–92.
- Chippindale P.T., Bonett R.M., Baldwin A.S. et al. Phylogenetic evidence for a major reversal of life-history evolution in plethodontid salamanders // Evolution. 2004. V. 58. P. 2809–2822.
- Collazo A., Marks S.B. Development of *Gyrinophilus porphyriticus*: identification of the ancestral developmental pattern in the salamander family Plethodontidae // J. Exp. Zool. 1994. V. 268. P. 239–258.
- de Bussy L.P. Die ersten Entwicklungsstadien des *Megalobatrachus maximus* // Zool. Anz. 1905. Bd 28. S. 523–536.
- Dent J.N. The embryonic development of *Plethodon cinereus* as correlated with the differentiation and functioning of the thyroid gland // J. Morphol. 1942. V. 71. P. 577–601.
- Eycleshymer A.C. The formation of the embryo of *Necturus*, with remarks on the theory of concrescence // Anat. Anz. 1902. V. 21. P. 341–353.
- Eycleshymer A.C. Bilateral symmetry in the egg of *Necturus* // Anat. Anz. 1904. V. 25. P. 230–240.
- Eycleshymer A.C. The habits of *Necturus maculosus* // Amer. Nat. 1906. V. 40. P. 123–136.
- Fontenot C.L. Reproductive biology of the aquatic salamander *Amphiuma tridactylum* in Louisiana // J. Herpetol. 1999. V. 33. P. 100–105.
- Goodale H.D. The early development of *Spelerpes bilineatus* (Green) // Amer. J. Anat. 1911. V. 12. P. 173–247.
- Groenroos H. Zur Entwicklungsgeschichte des Erdsalamanders (*Salamandra maculosa* Laur.) // Anat. Hefte. 1895. Bd 6. S. 153–247.
- Gunzburger M.S. Evaluation of the hatching trigger and larval ecology of the salamander *Amphiuma means* // Herpetologica. 2003. V. 59. P. 459–468.

- Hara K. The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting // Wilhelm Roux's Arch. 1977. V. 181. P. 73–87.
- Hilton W.A. Segmentation of the ovum of *Desmognathus fusca* // Amer. Nat. 1904. V. 38. P. 498–500.
- Hilton W.A. General features of the early development of *Desmognathus fusca* // J. Morphol. 1909. V. 20. P. 533–559.
- Humphrey R.R. Ovulation in the four-toed salamander, *Hemidactylium scutatum*, and the external features of cleavage and gastrulation // Biol. Bull. 1928. V. 54. P. 307–323.
- Hurtado C., De Robertis E.M. Neural induction in the absence of organizer in salamanders is mediated by MAPK // Devel. Biol. 2007. V. 307. P. 282–289.
- Iwasawa H., Kera Y. Normal stages of development of the Japanese lungless salamander, *Onychodactylus japonicus* (Houttuyn) // Japan. J. Herpetol. 1980. V. 8. P. 73–89.
- Iwasawa H., Yamashita K. Normal stages of development of a hynobiid salamander, *Hynobius nigrescens* Stejneger // Japan. J. Herpetol. 1991. V. 14. P. 39–62.
- Jockusch E.L. Techniques for obtaining and raising plethodontid salamander eggs // Int. J. Devel. Biol. 1996. V. 40. P. 911–912.
- Karraker N.E., Ollivier L.M., Hodgson G.R. Oviposition site of the southern torrent salamander (*Rhyacotriton variegatus*) in northwestern California // Northwest. Nat. 2005. V. 86. p. 34–36.
- Keller R., Shook D.R. Gastrulation in Amphibians // Gastrulation: from cells to embryo / Ed. by C.D. Stern. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. P. 171–203.
- Kunitomo K. Über die Entwicklungsgeschichte des *Hynobius nebulosus* // Anat. Hefte. 1910. Bd 40. S. 193–283.
- Marks S.B., Collazo A. Direct development in *Desmognathus aeneus* (Caudata: Plethodontidae): a staging table // Copeia. 1998. № 3. P. 637–648.
- Nieuwkoop P.D. What are the key advantages and disadvantages of urodele species compared to anurans as a model system for experimental analysis of early development? // Int. J. Devel. Biol. 1996. V. 40. P. 617–619.
- Noble G.K. The value of life history data in the study of the evolution of the amphibia // Ann. New York Acad. Sci. 1927. V. 30. P. 31–128.
- Noble G.K., Marshall B.C. The validity of *Siren intermedia* LeConte, with observations on its life history // Amer. Mus. Novit. 1932. № 532. P. 1–17.
- Noble G.K., Richards L.B. Experiments on the egg-laying of salamanders // Amer. Mus. Novit. 1932. № 513. P. 1–25.
- Nussbaum R.A. Nests and eggs of the pacific giant salamander, *Dicamptodon ensatus* (Eschscholtz) // Herpetologica. 1969. V. 25. P. 257–262.
- Nussbaum R.A. Parental care and egg size in salamanders: an examination of the safe harbor hypothesis // Res. Popul. Ecol. 1987. V. 29. P. 27–44.
- Nussbaum R.A., Tait C.K. Aspects of the life history and ecology of the Olympic salamander, *Rhyacotriton olympicus* (Gaije) // Amer. Midl. Nat. 1977. V. 98. P. 176–199.
- O'Donnell D.J. Natural history of the ambystomatid salamanders of Illinois // Amer. Midl. Nat. 1937. V. 18. P. 1063–1071.
- Petranka J.W., Just J.J., Crawford E.C. Hatching of amphibian embryos: the physiological trigger // Science. 1982. V. 217. P. 257–259.
- Salthe S.N. Reproductive modes and the number and sizes of ova in the urodeles // Amer. Midl. Nat. 1969. V. 81. P. 467–490.
- Sever D.M., Doody J.S., Reddish C.A. et al. Sperm storage in spermathecae of the great lamprey eel, *Amphiuma tridactylum* (Caudata: Amphiumidae) // J. Morphol. 1996a. V. 230. P. 79–97.
- Sever D.M., Rania L.C., Krenz J.D. Reproduction of the salamander *Siren intermedia* Le Conte with especial reference to oviducal anatomy and mode of fertilization // J. Morphol. 1996b. V. 227. P. 335–348.
- Signoret J., Lefresne J. Contribution à l'étude de la segmentation de l'oeuf d'axolotl: 1. Définition de la transition blastulienne // Ann. Embryol. Morphogen. 1971. V. 4. P. 113–123.
- Signoret J., Colletot A. L'organisme en développement. Des gamètes à l'embryon. Paris: Hermann, 1991. 278 p.
- Smith B.G. Preliminary report on the embryology of *Cryptobranchus allegheniensis* // Biol. Bull. 1906. V. 11. P. 146–164.
- Smith B.G. The embryology of *Cryptobranchus allegheniensis*, including comparisons with some other vertebrates. 1. Introduction; the history of the egg before cleavage // J. Morphol. 1912a. V. 23. P. 61–157.
- Smith B.G. The embryology of *Cryptobranchus allegheniensis*, including comparisons with some other vertebrates. 2. General embryonic and larval development, with special reference to external features // J. Morphol. 1912b. V. 23. P. 455–565.
- Smith B.G. The origin of bilateral symmetry in the embryo of *Cryptobranchus allegheniensis* // J. Morphol. 1922. V. 36. P. 357–399.
- Smith B.G. The embryology of *Cryptobranchus allegheniensis*. 3. Formation of the blastula // J. Morphol. Physiol. 1926. V. 42. P. 197–252.
- Spemann H. Embryonic development and induction. New Haven: Yale Univ. Press, 1938. 401 p.
- Spemann H., Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organismen // Wilhelm Roux's Arch. 1924. Bd 100. S. 599–638.
- Suzuki A., Kuwabara Y., Kuwana T. Analysis of cell proliferation during early embryogenesis // Devel. Growth Differ. 1976. V. 18. P. 447–455.
- Takahashi H., Iwasawa H. Changes in the size of egg-form embryos with the advance of development in the salamander *Hynobius nigrescens* // Japan. J. Herpetol. 1988. V. 12. P. 124–126.
- Veith M., Steinfartz S., Zardoya R. et al. A molecular phylogeny of 'true' salamanders (family Salamandridae) and the evolution of terrestriality of reproductive modes // J. Zool. Syst. Evol. Res. 1998. V. 36. P. 7–16.
- Wake D.B., Marks S.B. Development and evolution of plethodontid salamanders: a review of prior studies and

- a prospectus for future research // *Herpetologica*. 1993. V. 49. P. 194–203.
- Wake D.B., Hanken J. Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? // *Int. J. Devel. Biol.* 1996. V. 40. P. 859–869.
- Wilder H.H. The early development of *Desmognathus fusca* // *Amer. Nat.* 1904. V. 38. P. 117–125.
- Yamazaki-Yamamoto K., Takata K., Kato Y. Changes of chromosome length and constitutive heterochromatin in association with cell division during early development of *Cynops pyrrhogaster* embryo // *Devel. Growth Differ.* 1984. V. 26. P. 295–302.
- Zhang P., Wake D.B. Higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes // *Mol. Phylogen. Evol.* 2009. V. 53. P. 492–508.

ON THE DIVERSITY OF THE PRIMARY STEPS OF EMBRYONIC DEVELOPMENT IN THE CAUDATE AMPHIBIANS

A. G. Desnitskiy

*Department of Embryology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9,
St. Petersburg, 199034 Russia
E-mail: adesnitskiy@mail.ru*

Abstract—Literary data on the peculiarities of the egg cleavage process in various representatives of the order of caudate amphibians consisting of 10 families have been considered. It has been recognized that in considerable number of species of Plethodontidae, Cryptobranchidae, and some other families, the synchrony of divisions is lost already after the 8-celled stage of the cleavage in large, yolk-rich and unpigmented eggs. A “standard” cleavage of early embryos of caudate amphibians, which had been described in the text-books on developmental biology and consists approximately of 10 synchronous divisions of comparatively small eggs, is characteristic only of the families Ambystomatidae and Salamandridae including 19.3% of species within the order Caudata. However, within each of these families there seems to be a number of species with a “nonstandard” type of early cleavage. The evolutionary relationships between two main types of early embryogenesis within the order Caudata are discussed.

Keywords: cleavage, egg size, evolution of development, ontogenetic diversity, *Ambystoma*, Caudata, Hynobiidae, Plethodontidae, Salamandridae

УДК 611-013; 57.086.835;577.218

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА SC5, SC6, SC7 и SC3a¹

© 2011 г. А. М. Кольцова¹, О. Ф. Гордеева², Т. А. Крылова¹, Н. В. Лифанцева², А. С. Мусорина¹, Т. К. Яковлева¹, Г. Г. Полянская¹

¹Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

E-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

Поступила в редакцию 21.01.11

Окончательный вариант получен 14.02.11

Большой спектр линий эмбриональных стволовых клеток человека с различными генотипами широко используется в качестве клеточных моделей для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) SC5, SC6, SC7 и SC3a были получены из предимплантационных бластоцист и поддерживаются на митотически инактивированных фидерных клетках человека. Все полученные линии ЭСК прошли более 120 удвоений клеточной популяции, сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Эти линии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, щелочную фосфатазу. Кроме того, недифференцированные клетки линий SC5, SC6 и SC7 экспрессируют гены *DPPA3/STELLA*, *DAZL*, специфические для линии половых клеток, и не экспрессируют соматические маркеры дифференцировки. Напротив, недифференцированные клетки линии SC3a экспрессируют маркеры внезародышевой энтодермы GATA4 и AFP и не экспрессируют *DPPA3/STELLA* и *DAZL*. Результаты двойного иммунофлуоресцентного окрашивания колоний клеток SC5 и SC3a с помощью антител против Oct-4 и GATA4 показали, что большинство клеток линии SC3a были одновременно позитивны по обоим маркерным факторам. Кроме того, SC5, SC6 и SC7, но не SC3a, образовывали тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков. Эти результаты свидетельствуют о том, что клетки линии SC3a, в отличие от линий SC5, SC6 и SC7, представляют собой клеточную популяцию ранних коммитированных клеток. Кроме того, с помощью иммунофлуоресцентного и ПЦР анализа обнаружена экспрессия гена транспортера множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* в недифференцированных ЭСК всех линий и эмбрионидных тельцах, дифференцирующихся в течение 10 дней, тогда как экспрессия транспортера *ABCB1* выявлена с помощью ПЦР анализа только в дифференцирующихся эмбрионидных тельцах линий SC5, SC6 и SC7. Таким образом, полученные результаты демонстрируют различия в свойствах и потенциале к дифференцировке линий ЭСК SC5, SC6, SC7 и SC3a, которые были получены в разных условиях культивирования.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки человека, экспрессия маркеров, дифференцировка, кариотип.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями *in vitro*, обладающими способностью к самообновлению, т.е. к неограниченной пролиферации, и одновременно способностью дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток. Линии ЭСК являются уникальной экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в

разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии.

Первые постоянные линии ЭСК человека были получены в США (Thomson et al., 1998). В настоящее время в разных странах мира существуют уже более 600 постоянных линий ЭСК (Cowan et al., 2004; Inzunza et al., 2005; Oh et al., 2005; Ellerstrom et al., 2006; Chavez et al., 2008; Крылова и др. 2009; Aguilar-Gallardo et al., 2010; Englund et al., 2010; Priddle et al., 2010; Skottman, 2010; Strom et al., 2010). Основные характеристики, которые должна иметь постоянная линия ЭСК человека по крите-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а) и Научной программой СПб Научного Центра РАН Государственным Контрактом Минобрнауки РФ № 16.M04.11.0002.

риям регистра Национального Института здоровья (НИН) США, следующие: 1) неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоений клеточной популяции (число Хейфлика); 2) высокая теломеразная активность, обеспечивающая поддержание стабильной длины теломера, необходимую для сохранения высокой пролиферативной активности; 3) нормальный диплоидный кариотип; 4) экспрессия специфических поверхностных эмбриональных антигенов и специфических транскрипционных факторов OCT-4 и NANOG; 5) способность к дифференцировке в производные трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo*.

Для поддержания линий ЭСК человека в недифференцированном плюрипотентном состоянии разработаны различные системы культивирования. Исходно для поддержания самообновления ЭСК человека *in vitro* клеточные линии культивировали на слое фидерных клеток, которые экспрессируют факторы роста, способствующие пролиферации ЭСК и блокирующие их дифференцировку. В качестве фидерных клеток используют фибробласты разного происхождения. В настоящее время многие исследователи используют в качестве фидерных клеток фибробласты человека, чтобы избежать заражения ЭСК человека ретровирусами или другими патогенами грызунов (Martin et al., 2005; Skottman et al., 2006; Kubikova et al., 2009). Было показано, что морфология колоний ЭСК и их гетерогенность в значительной степени зависят от свойств используемого фидера (Skottman, Novatta, 2006; Stewart et al., 2006; Laursen et al., 2007; Richards et al., 2003;).

Многие исследователи разрабатывают бесфидерную систему культивирования с разными бесфидерными субстратами, включающими белки внеклеточного матрикса, при этом в культуральную среду добавляют ростовые факторы и другие агенты, стимулирующие клеточную пролиферацию (Xu et al., 2001; Amit et al., 2004; Rosler et al., 2004; Klimanskaya et al., 2005; Wang et al., 2005; Miyazaki et al., 2008; Promse et al., 2010). Бесфидерные субстраты, как и фидеры, различаются по метаболическим, адгезивным и секреторным функциям, благодаря которым ЭСК человека сохраняют статус пролиферирующих плюрипотентных популяций.

Для потенциального использования ЭСК человека в регенеративных медицинских технологиях необходимо исключить все ингредиенты животного происхождения при культивировании ЭСК, а также исключить любые фидерные клетки как субстрат, свойства которого существенно зависят от условий культивирования. В связи с этим, использование бесфидерных субстратов и среды определенного химического состава без добавок животного происхождения (Liu et al., 2006; Lu et al., 2006;

Ludwig et al., 2006) является необходимым условием технологии получения линий ЭСК, которые будут применяться в дальнейшем при трансплантациях. Недавно появились работы по успешному культивированию ЭСК в суспензионной и 3D системах (Mohr et al., 2006; Amit et al., 2010; Vazin, Freed, 2010; Steiner et al., 2010). Таким образом, в настоящее время продолжается разработка оптимальных технологий для получения и поддержания линий ЭСК человека с учетом их возможного клинического использования в перспективе. Однако несмотря на интенсивные исследования в этой области, оптимальные условия для культивирования линий ЭСК человека, позволяющие сохранять их основные биологические свойства в течение длительного периода, не разработаны до сих пор (Rajala et al., 2007 Hasegawa et al., 2010; Vazin, Freed, 2010).

Известно, что в течение длительного культивирования многие постоянные линии ЭСК претерпевают генетические и эпигенетические изменения в процессе адаптации линии к условиям *in vitro*. Некоторые генетические изменения способствуют злокачественной трансформации ЭСК (Draperg et al., 2004; Heins et al., 2006; Imreh et al., 2006; Baker et al., 2007; Harrison et al., 2007; Spits et al., 2008; Yang et al., 2008; Gopalakrishna-Pillai, Iverson, 2010; Yang et al., 2010). Возможно, изначальная иммортализация ЭСК человека, связанная, в частности, с наличием теломеразной активности, которая является обязательным условием иммортализации большинства типов клеток, также стимулирует начало канцерогенеза. Кроме того, нестабильные условия культивирования также могут приводить к злокачественной трансформации. В связи с перспективой клинического применения ЭСК человека необходима постоянная проверка стабильности генетического аппарата ЭСК.

Несмотря на различные этические и правовые ограничения в разных странах, получение новых постоянных линий ЭСК человека продолжается, т.к. линии ЭСК из разных генетических источников, т.е. бластоцист разных индивидуумов, характеризуются большим генетическим разнообразием. Для широкомасштабных фундаментальных и биомедицинских исследований с использованием ЭСК человека необходимо большое число линий с индивидуальной вариабельностью. Существуют данные, указывающие на различия между линиями и клонами ЭСК, связанные с иммунным и эпигенетическим профилем ЭСК, экспрессией отдельных генов и, в частности, генов, ответственных за разные направления дифференцировки, с морфологией колоний и скоростью роста (Drukker et al., 2002; Abeyta et al., 2004; Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004; Lagarkova et al., 2006; Sidhu and Tuch, 2006; Allegrucci, Young, 2007; Kim et al., 2007; Pal et al., 2009; Tavakoli et al., 2009). При этом выяв-

ленные различия не затрагивают основные характерные свойства, присущие всем линиям ЭСК.

В данной работе мы исследовали характеристики и потенциал к дифференцировке четырех новых линий ЭСК человека, выделенных из предимплантационных бластоцист от разных доноров. В этих линиях была исследована экспрессия генов, специфических для плюрипотентных клеток, а также линий соматических и половых клеток, в процессе дифференцировки *in vitro*. Помимо характеристик новых линий ЭСК, мы изучали характер экспрессии генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости ABCG2 и ABCB1, обеспечивающих в разных клеточных типах, включая и ЭСК, механизм защиты от повреждающих воздействий различных химических факторов (Bhattacharya et al., 2004; Ginis et al., 2004; Sarkadi et al., 2006, 2009; Apati et al., 2008; Pal et al., 2009).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a были использованы не подвергавшиеся заморозке бластоцисты (5–6 день развития), полученные в результате искусственного оплодотворения (*in vitro fertilization* – IVF) и оставшиеся невостребованными при трансплантации. Эмбриональный материал был предоставлен Международным центром репродуктивной медицины (Россия) с согласия доноров.

Внутреннюю клеточную массу (ВКМ) бластоцисты изолировали механически при помощи двух игл от одноразовых стерильных шприцов (23G, BD, Испания). Помещенную в каплю культуральной среды бластоцисту придерживали одной иглой, а при помощи второй освобождали от блестящей зоны (*zona pellucida*) и трофэктодермы. Полученные в результате этого клетки ВКМ переносили на слой митотически инактивированных фидерных клеток. В качестве фидерных клеток использовали постнатальные фибробласты крайней плоти человека (*human foreskin fibroblasts*) (CRL–2429, ATCC) и эмбриональные мезенхимные фибробласты человека (полученные в нашей лаборатории). При культивировании фидерных клеток использовали среды IMDM (Invitrogen, США) и DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone, США). Для блокирования пролиферации монослой фибробластов обрабатывали митомицином-C (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 часов.

Для получения и культивирования линий ЭСК человека использовали ростовую среду, включающую следующие компоненты: 80% Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (Gibco, США), 20%

Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 mM L-глутамина, 1% заменимых аминокислот NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma), 8 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Chemicon, США). ЭСК человека культивировали в условиях 5% CO₂, 37°C и 90% влажности. Для криоконсервации использовали среду, состоящую из 90% ростовой среды для ЭСК и 10% диметилсульфоксида (Sigma).

Важно отметить, что линию SC3a в течение нескольких пассажей после ее выделения культивировали в атмосфере 5% O₂ вместо обычных 20% O₂. Далее клетки содержали в криоконсервированном состоянии в течение 6 месяцев, затем они были разморожены и поддерживались в условиях, идентичных для остальных трех линий ЭСК SC5, SC6, SC7.

Механический пересев культуры ЭСК осуществляли под контролем микроскопа путем деления колонии на фрагменты при помощи одноразового скальпеля и их переноса на новый слой фидерных клеток. Смену среды проводили ежедневно. Колонии ЭСК пересевали каждые 5–6 дней.

Для расчета времени удвоения клеточной популяции измеряли площадь не менее 10 колоний в течение 4–5 дней вплоть до окончания логарифмической фазы роста. Колонии ЭСК фотографировали ежедневно при одинаковом увеличении, а их площадь определяли при помощи компьютерной программы WCIF ImageJ.

Кариотипический анализ 4-х клеточных линий ЭСК был проведен на 25-ом пассаже культивирования. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру ЭСК вводили колцемид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco), клетки диссоциировали с помощью смеси трипси-на и версена (1 : 3) и проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 M раствора KCl и 1% раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1, Реактив, Россия). Для количественного кариотипического анализа метафазных пластинок хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50, Sigma). Модальное число хромосомом и пределы изменчивости клеток по числу хромосомом определяли при анализе 260 метафаз в SC5, 215 – в SC6, 120 – в SC7 и 110 – в SC3a; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз в каждой клеточной линии. Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали не менее 30 метафаз в каждой линии ЭСК (30, 55, 50 и 32 в линиях SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно). Кариотипы линий анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического ка-

протипирования Ikaros 4 Karyotyping System (Meta-Systems, Germany) и описывали в соответствии с Международной системой для цитогенетической номенклатуры хромосом человека ISCN (2009).

Для характеристики линий ЭСК проводили гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы (FRV-alkaline AP substrate, Sigma) и иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционных факторов с использованием моноклональных антител против Oct-4 (Santa Cruz, США) и Nanog (BD Pharmingen, США). Для видовой идентификации ЭСК проводили иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностных антигенов, свойственных только ЭСК человека, SSEA-4 и TRA-1-60. Для этого использовали моноклональные антитела Mc813-70 (SSEA-4) и TRA-1-60 (Chemicon International, США). Для уточнения статуса линий ЭСК проводили дополнительное двойное окрашивание с использованием антител против транскрипционных факторов Oct-4 и GATA4 (Santa Cruz, США). Для выявления Р-гликопротеина, АТФ-связывающего ABCG2 транспортера были использованы моноклональные антитела VXP-21 (Alexis Biochemical, США). В качестве вторых антител были использованы иммуноглобулины кролика, козы и курицы, конъюгированные с флуоресцеином, FITC (Millipore, США), Alexa 488 и Alexa 594 (Molecular Probes, США).

Для определения активности щелочной фосфатазы, клетки в течение 20 мин фиксировали 4% параформальдегидом, а затем в течение 30 мин обрабатывали BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma) при температуре 37°C. Анализ проводили под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре и блокировали неспецифическое связывание 1% раствором бычьего сывороточного альбумина, BSA (Sigma, США), в течение 1 ч. Пермеабиллизацию клеток (для транскрипционных факторов) проводили с использованием 0.1% раствора Triton-X100 при комнатной температуре в течение 15 мин. Инкубирование клеток в растворе первых антител (1 : 50 или 1 : 100) проводили в течение ночи при температуре +4°C, препараты промывали раствором фосфатно-солевого буфера, PBS (Биолот), три раза. Вторые антитела разводили в соотношении 1 : 500 (Millipore, США) или 1 : 800 (Molecular Probes, США) и препараты инкубировали с ними в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. После отмывок препараты докрашивали ядерным красителем Hoechst 33342 (2 мкг/мл, Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали фидерные клетки и ЭСК, обработанные только вторыми антителами. Двойную иммунофлуорес-

центную окраску проводили в соответствии с приведенной выше методикой. Пары первых и вторых антител были подобраны, учитывая возможность совместной инкубации с исключением перекрестных реакций. Анализ проводили под микроскопом Zeiss LSM 5 Pascal.

Для подтверждения плюрипотентности полученных клеточных линий ЭСК кластеры колоний клеток SC5, SC6, SC7 и SC3a индуцировали к спонтанной дифференцировке путем изоляции от фидерных клеток и переноса в культуральные чашки с низкой адгезией (Медполимер, Россия). Образовавшиеся в суспензионной культуре эмбриоидные тельца (ЭТ) культивировали в среде для ЭСК без добавления фактора bFGF в течение 10 дней. ЭТ диссоциировали до единичных клеток, высевали на стекла, покрытые желатином, и культивировали в течение 2 недель в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Для выявления дифференцированных клеток-производных трех зародышевых листков проводили иммуногистохимический анализ экспрессии маркерных белков. Для определения экспрессии маркеров, ассоциированных с дифференцировкой в производные трех зародышевых листков, использовали первые антитела против β -тубулина III (разведение 1 : 50; Sigma) и нестина (1 : 50; Chemicon), характеризующих клетки эктодермального происхождения, α -фетопротеина (AFP, 1 : 50; Sigma), характеризующего энтодермальные клетки, и α -актина (1 : 50; Sigma), характеризующего клетки мезодермального происхождения. Иммунофлуоресцентный анализ проводили по методу, описанному выше.

Для изучения потенциала полученных линий ЭСК человека к дифференцировке *in vivo* был использован метод получения экспериментальных тератом. В качестве реципиентов использовали иммунодефицитных мышей (Nu/Nu) из питомника "Пушино" (Филиал Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова). Все протоколы по работе с животными одобрены Комитетом по биоэтике ИБХ РАН. Кластеры колоний ЭСК человека (1–2 × 10⁶) инъецировали мышам подкожно. Через 12 недель экспериментальных животных усыпляли и извлекали развившиеся тератомы. Образцы опухолевой ткани фиксировали в фиксаторе Буэна и заключали в парафин для дальнейшего приготовления гистологических срезов. Полученные гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином (Sigma, США).

Для анализа генной экспрессии тотальную РНК из недифференцированных ЭСК и ЭТ выделяли с использованием TRIzol® Reagent (Invitrogen) по протоколу, рекомендованному производителем. Каждый образец РНК обрабатывали ДНКазой (Ambion, США) для предотвращения конта-

Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии

Ген	Размер (пн)	Прямой и обратный праймеры	Номер последовательности GenBank
<i>OCT4/POU5F1</i>	259	5'gggtggaggaagctgacaac3' forward 5'gcatagtcgctgcttgatcg3' reverse	NM_002701 NM_203289
<i>NANOG</i>	368	5'tgcctcacacggagactgtc3' forward 5'ctgcgtcacaccattgctattc3' reverse	NM_024865
<i>DPPA3</i>	520	5'gcctagtgttggtcaagac3' forward 5'ggtgcaagaataagatttatggc3' reverse	NM_199286
<i>DAZL</i>	480	5'catcctcctccaccacagtt3' forward 5'aagcattgcccgacttcttc3' reverse	NM_001351
<i>GATA4</i>	352	5'tcceaaccagaaaacggaag3' forward 5'aagaccaggtgttccaaga3' reverse	NM_002052
<i>AFP</i>	312	5'gcccctcttccagaaacta3' forward 5'tttcatccaccaccaagctg3' reverse	NM_001134
<i>BRY</i>	353	5'agcatcccttgctcacacct3' forward 5'acattctaggggagagca3' reverse	NM_003181
<i>PAX6</i>	346/304	5'cagaagattgtagagctagc3' forward 5'gaagaactctgtttattgatgac3' reverse	NM_000280 NM_001604 NM_001127612
<i>ABCG2</i>	160	5'tacctgtatagtgacttcat3' forward 5'ggtcatgagaagtgttgcta3' reverse	NM_004827
<i>ABCB1</i>	541	5'gcctggcagctggaagacaaatac3' forward 5'ccataccagaaggccagagcataa3' reverse	NM_000927
<i>RPL19</i>	326	5'agggtacagccaatgccga3' forward 5'cctggataaagtcttgatgac3' reverse	NM_000981

минации геномной ДНК. Для синтеза кДНК библиотек использовали 0.5 мкг тотальной РНК из каждого клеточного образца, ревертазу RevertAid M-MuLV и случайные олигонуклеотидные последовательности (random hexamer oligonucleotide primers) в соответствии с протоколом производителя (Fermentas, Канада/Литва). Пробы для ПЦР-реакции были подготовлены в соответствии с протоколом производителя Taq ДНК-полимеразы (Silex, Россия). Температура отжига праймеров была адаптирована к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары праймеров. ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе Eppendorf (Германия) по следующей программе: начальная денатурация: 94°C – 5'; отжиг праймеров: 45"; элонгация: 72°C – 45"; денатурация 94°C – 45", 35 циклов; завершающее удлинение цепи: 72°C – 5'. Библиотеки кДНК из разных образцов нормализовали по уровню экспрессии гена общего метаболизма рибосомального белка RPL19. Последовательности использованных праймеров сконструированы на основе данных GenBank, размеры ПЦР-продуктов приведены в таблице.

Все представленные характеристики новых линий ЭСК были получены в интервале 25–30 пассажей (более 120 удвоений клеточной популяции).

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы, $P < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При получении линий ЭСК всего было использовано 20 бластоцист. После изоляции клетки ВКМ из 4-х бластоцист прикрепились к фидерному слою, начали активно пролиферировать и образовали колонии, типичные для ЭСК человека. Для поддержания линий ЭСК SC5, SC6 и SC7 их культивировали на фидере из мезенхимных клеток эмбриона человека. Линию SC3а культивировали на постнатальных фибробластах крайней плоти человека. Все клеточные линии ЭСК прошли более 120 удвоений клеточной популяции. Среднее время одного удвоения клеточной популяции для этих линий составляет: 28.2 ± 0.6 ч; 21.0 ± 0.6 ч; 24.0 ± 2.4 ч и 22.5 ± 1.4 для SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно. Для линии SC5 время удвоения было достоверно больше, чем для SC6 и SC3а ($P < 0.01$). Ранее в литературе также были описаны различия между линиями ЭСК человека по этому параметру (Cowan et al., 2004).

Количественный кариотипический анализ полученных линий SC5, SC6, SC7 и SC3а показал,

что эти линии характеризуются высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (98.0 ± 0.9 ; 98.6 ± 0.8 ; 99.2 ± 0.8 и $99.0 \pm 0.9\%$), и низкой долей полиплоидных клеток (0.2 ± 0.2 ; 2.8 ± 0.7 ; 3.0 ± 0.8 ; $1.0 \pm 0.9\%$, соответственно). Структурные изменения хромосом были выявлены в 3 из 50 проанализированных клеток только в линии SC7: парацентрическая инверсия хромосомы 10 inv(10)(q11.2q24) в одной клетке и аномальный характер G-бандирования коротких плеч хромосом 1 и 7 в двух других метафазах (рис. 1, в). Измененный рисунок дифференциального G-окрашивания короткого плеча хромосомы 1, по-видимому, является результатом парацентрической инверсии [inv(1)(?p21~22p36.1)], сопровождаемой дупликациями хромосомного материала. Хромосомная нестабильность, наблюдаемая при G-окрашивании, FISH анализе и использовании молекулярных методов наиболее часто связана с анеуплоидией, дупликациями, делециями и транслокациями, тогда как инверсии наблюдаются значительно реже (Cowan et al., 2004). Обнаруженные нами структурные хромосомные изменения носят единственный характер в изученных пластинках 50 клеток, тем более, что рекомендуемая выборка для G-кариотипирования составляет 20 метафаз, из которых нормальными должны быть не менее 90% (Meisner, Johnson, 2008). Наши результаты свидетельствуют, что частота нормальных метафаз в SC7 линии составляет 94.0%. Только дальнейшее культивирование этих клеток может определить, случайны эти изменения или существенны для клеточной популяции. Таким образом, судя по характеру дифференциального G-окрашивания хромосом при уровне разрешения 400–550 дисков на гаплоидный набор хромосом, кариотипы клеточных линий ЭСК не имели отличий от нормального кариотипа человека 46XX – SC5, SC6 и SC3a и 46XY – SC7 (рис. 1).

Для подтверждения сохранения плюрипотентного статуса полученных линий ЭСК при длительном культивировании был проведен гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы (рис. 2) и иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционных факторов Oct-4, Nanog и поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1-60 (рис. 3, а–л, м–у). Как показали результаты этих тестов, все линии экспрессируют маркерные факторы, которые являются ключевыми для плюрипотентных клеток человека (Draper et al., 2002; Ginis et al., 2004).

Как было отмечено выше, основным характеристикой ЭСК является плюрипотентность, т.е. способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты по изучению потенциала к дифференцировке *in vitro* показали, что все четыре линии ЭСК человека способны дифференцироваться в клетки экто-, эндо- и мезо-

дермального происхождения. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил присутствие белков, специфических для клеток-производных трех зародышевых листков (рис. 4).

Результаты исследования экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и дифференцированных клеток различных типов, в процессе дифференцировки полученных линий ЭСК *in vitro* представлены на рис. 5. В нашей работе мы исследовали экспрессию генов *OCT4*, *NANOG*, генов *GATA4*, *AFP*, *BRY*, *PAX6*, специфических для соматических клеток-производных трех зародышевых листков, а также генов, специфичных для линии половых клеток, *DPPA3/STELLA*, *DAZL*. Было обнаружено, что недифференцированные клетки линий ЭСК SC5, SC6 и SC7 экспрессируют *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL* и не экспрессируют гены-маркеры соматических клеток. Как показал ПЦР-анализ, в процессе дифференцировки ЭТ, образованных клетками этих линий, увеличивается экспрессия генов *GATA4* и *AFP*, специфических для внезародышевой и зародышевой энтодермы, и генов *BRY* и *PAX6*, специфических для ранних мезодермальных и нейроэктодермальных клеток соответственно. В то же время уровень экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL*, специфических для плюрипотентных клеток и линии половых клеток, постепенно снижался.

Анализ транскрипционных профилей ЭСК линии SC3a показал, что в недифференцированных клетках и в дифференцирующихся ЭТ экспрессируются не только гены *OCT4* и *NANOG*, но также выявляется и низкий уровень экспрессии гена *GATA4* (рис. 5). Более того, экспрессия генов *DPPA3/STELLA* и *DAZL*, специфичных для линии половых клеток, не была выявлена ни в одном из анализируемых вариантов. Кроме этого, экспрессия гена *AFP* была обнаружена как в недифференцированных клетках, так и в дифференцирующихся ЭТ, что свидетельствует о присутствии в колониях коммитированных клеток внезародышевой энтодермы (рис. 5). Выявленные нами различия в транскрипционных профилях изучаемых линий ЭСК человека были также подтверждены с помощью сравнительного иммунофлуоресцентного анализа колоний клеток линий SC3a и SC5 при двойном окрашивании колоний моноклональными антителами против транскрипционных факторов Oct-4 и *GATA4* (рис. 6). Показано, что во всех проанализированных колониях линии SC3a, в отличие от линии SC5, все клетки одновременно экспрессируют Oct-4, и *GATA4*. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки в колониях линии SC3a, в отличие от остальных линий, являются преимущественно коммитированными в направлении дифференцировки во внезародышевую энтодерму. Таким образом, из полученных результатов по изучению транскрипционного профиля маркерных генов следует, что линии SC5, SC6, SC7

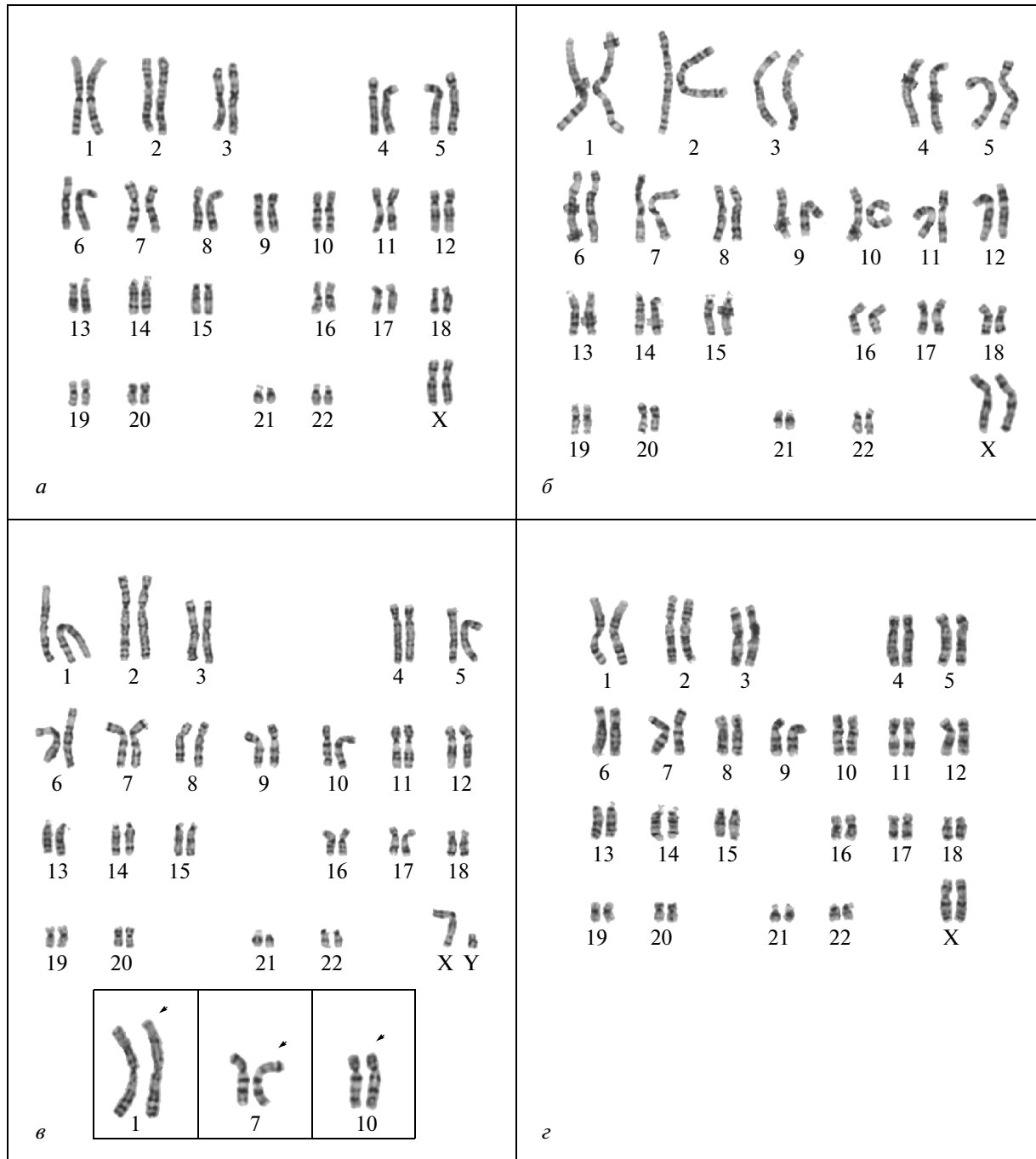


Рис. 1. Кариотипы линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3a.

a – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC5; *б* – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC6; *в* – нормальный 46XY кариотип клеточной линии SC7, в рамках случайные структурные хромосомные перестройки: аномальное G-бандирование 1p(*a*), 7p(*б*) и inv(10)(q11.2q24); *з* – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC3a.

удовлетворяют критериям для плюрипотентных линий ЭСК, тогда как линию SC3a можно рассматривать как самую раннюю стадию дифференцировки ЭСК.

Наши эксперименты по изучению потенциала полученных линий ЭСК к дифференцировке *in vivo* показали, что после трансплантации клеток

всех четырех линий иммунодефицитным мышам тератомы развивались только в линиях SC5, SC6, SC7. Гистологический анализ тератом выявил присутствие разных типов дифференцированных соматических клеток, являющихся производными эктодермы, мезодермы и энтодермы: клетки ороговевающего эпителия, гладкомышечные клетки,

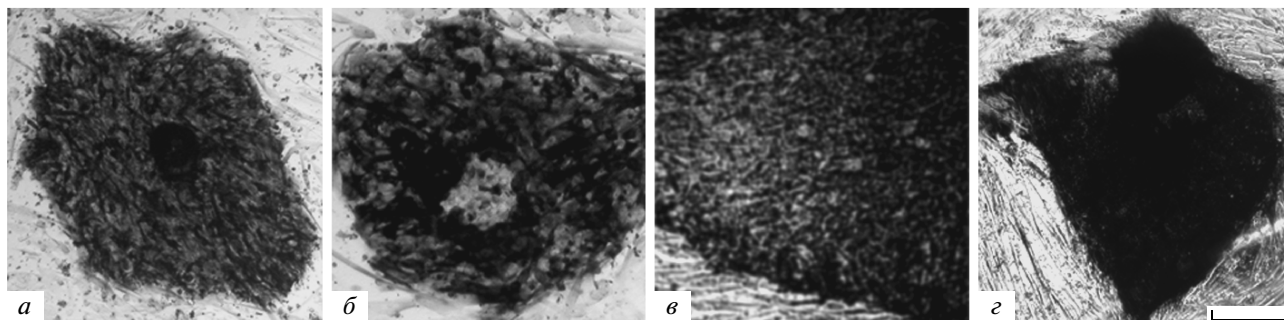


Рис. 2. Гистохимический анализ экспрессии щелочной фосфатазы в недифференцированных ЭСК человека. *а–г* – колонии линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно. Бар, 150 мкм.

клетки соединительной и жировой тканей, секретирующие эпителиальные клетки в зачатках крипт кишечника (рис. 7). Однако в тех же условиях эксперимента клетки линии SC3а не образовывали тератомы. Этот тест также демонстрирует различия в потенциале клеток линий SC5, SC6, SC7 и линии SC3а. Первые три линии обладают способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков как *in vitro*, так и *in vivo*, тогда как линия SC3а имеет ограниченный потенциал к дифференцировке.

Для изучения механизмов, предохраняющих ЭСК человека от различных стрессорных факторов *in vitro*, мы также исследовали экспрессию генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* и *ABCB1* во всех полученных линиях ЭСК. С помощью ПЦР-анализа была исследована экспрессия генов *ABCG2* и *ABCB1* в недифференцированных клетках и дифференцирующихся эмбрионидных тельцах (рис. 8). Экспрессия мРНК *ABCG2* транспортера наблюдалась во всех линиях на всех изученных стадиях. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ также выявил экспрессию *ABCG2* и на уровне белка (рис. 9). Полученные данные согласуются с результатами других авторов, также выявивших экспрессию гена *ABCG2* в ЭСК человека, как на уровне мРНК, так и на уровне белка (Bhattacharya et al., 2004; Ginis et al., 2004; Apati et al., 2008; Sarkadi et al., 2009; Pal et al., 2009).

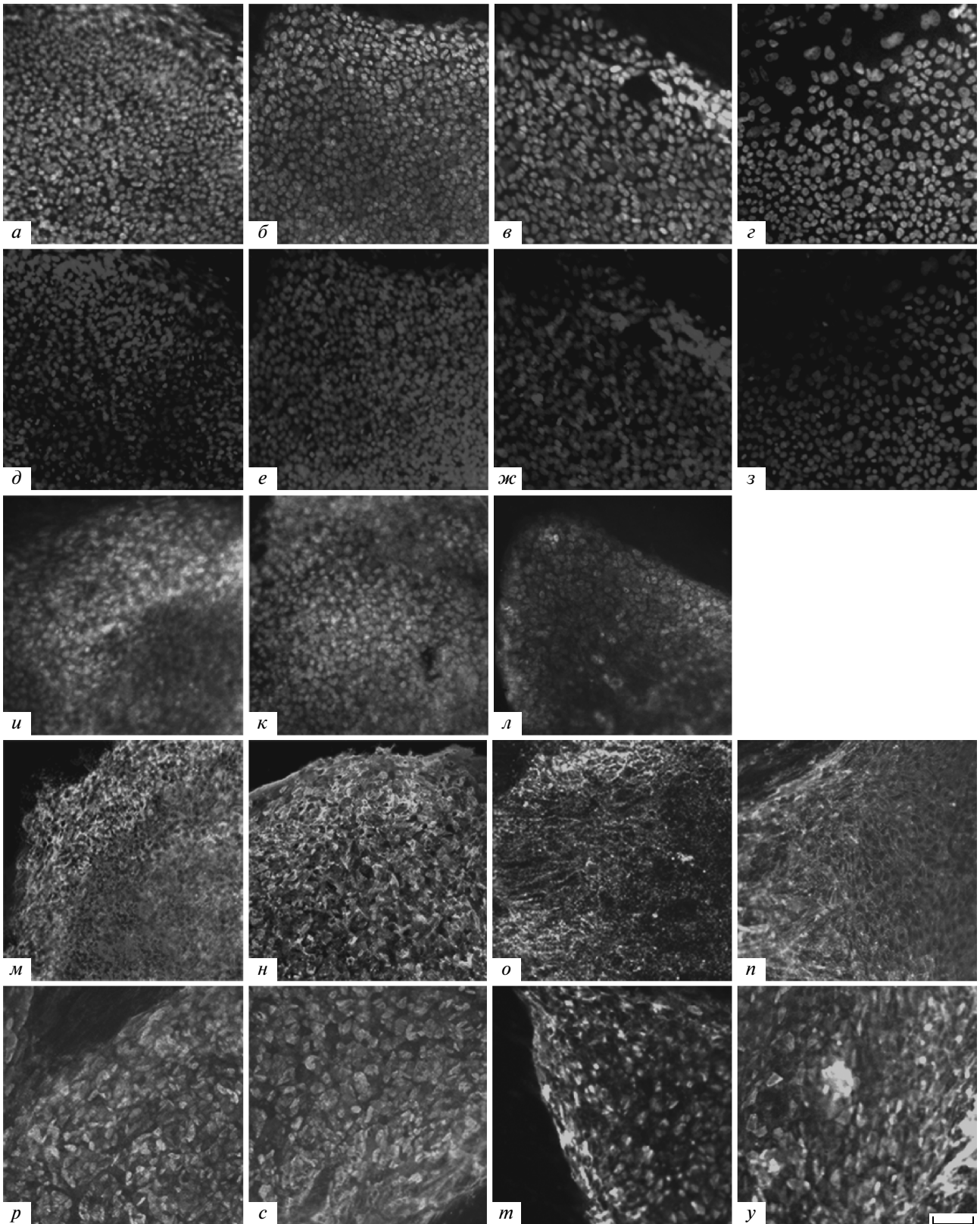
Существенно более низкий уровень экспрессии был обнаружен для гена транспортера *ABCB1* и только в трех клеточных линиях – SC5, SC6 и SC7. Экспрессия гена *ABCB1* транспортера не была выявлена в линии SC3а, в линии SC6 она имела место

на всех изученных стадиях, в линии SC5 только в дифференцирующихся ЭТ, а в SC7 она наблюдалась только на 10-е сут дифференцировки ЭТ. Кроме того, уровень экспрессии этого гена значительно повышался в процессе дифференцировки ЭТ (рис. 8). В работе Апати и др. (Apati et al., 2008) с помощью ПЦР-анализа также была выявлена экспрессия *ABCB1* транспортера в ЭСК человека. Однако иммунофлуоресцентный анализ с помощью моноклональных антител и анализ функционального действия этого транспортера не обнаружил экспрессии *ABCB1* на посттрансляционном уровне. В связи с низким уровнем экспрессии мРНК *ABCB1* мы не проводили иммунофлуоресцентный анализ его экспрессии, поэтому можно только констатировать наличие некоторых межлинейных различий между линиями SC5, SC6, SC7 и SC3а по экспрессии *ABCB1* и только на транскрипционном уровне. Необходимо отметить, что мРНК *ABCB1* транспортера экспрессируется в ЭСК человека на очень низком уровне и в некоторых случаях, возможно, он ниже уровня чувствительности используемого метода при описанных условиях. Поэтому наблюдаемые различия могут отражать как реальную межлинейную изменчивость, так и следствие конкретных условий культивирования этих линий. Возможно, функционирование этого транспортера в ЭСК человека проявляется не во всех условиях культивирования.

Следует отметить, что наблюдаемые различия между линиями SC5, SC6, SC7 и SC3а могут быть связаны с разными исходными условиями культивирования этих линий. Так, при получении и культивировании линий SC5, SC6 и SC7 мы использовали систему культивирования с высоким содер-

Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров плюрипотентных клеток в недифференцированных ЭСК человека линий SC5, SC6, SC7 и SC3а.

а–г – окрашивание колоний клеток антителами против Oct4 линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *д–з* – окрашивание Хехстом 33342 соответствующих колоний *а–г*; *и–л* – окрашивание антителами против Nanog колоний клеток линий SC5, SC6, и SC7 соответственно; *м–п* – окрашивание антителами против SSEA-4 колоний ЭСК линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *р–у* – окрашивание колоний клеток моноклональными антителами против TRA-1-60 линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; Бар, 50 мкм.



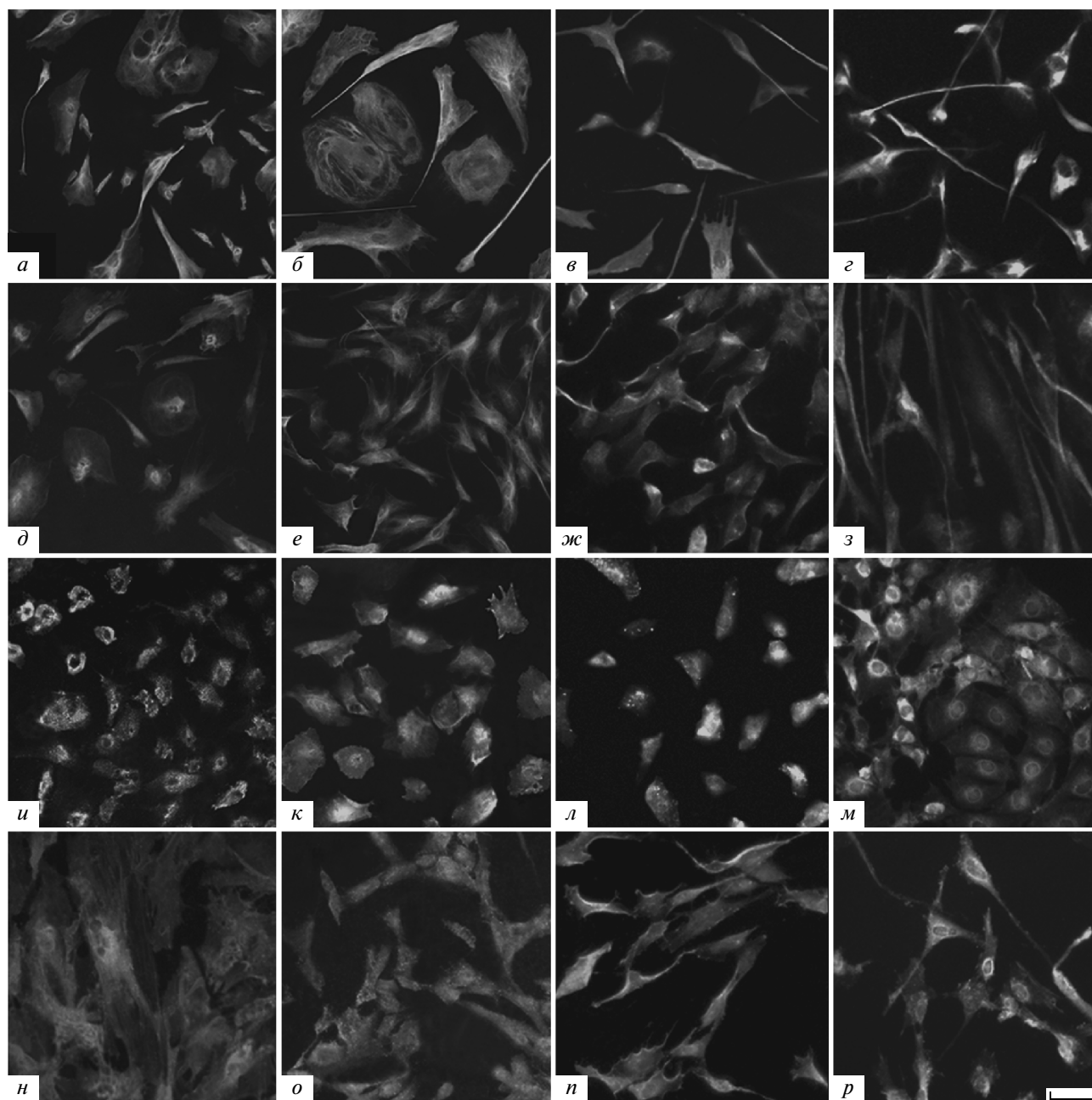


Рис. 4. *In vitro* дифференцировка линий ЭСК человека.

a–d и *д–з* – окрашивание клеток моноклональными антителами против нестина и β -тубулина III (маркеры эктодермы) линий SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно; *и–м* – окрашивание моноклональными антителами против α -фетопротейна (энтодермальный маркер) клеток линий SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно; *н–р* – окрашивание моноклональными антителами против α -актина (маркер мезодермы) клеток линий SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно. Бар, 50 мкм.

жанием кислорода (20%), в то время как при получении линии SC3a сразу после выделения из бластоцисты клетки ВКМ культивировали в атмосфере 5% O_2 . В ряде работ было рекомендовано снижение уровня кислорода до 4–5% с целью приближения к физиологическим условиям организма, которые способствуют стабилизации характеристик ЭСК (Ezashi et al., 2005; Forsyth et al., 2006).

Через несколько пассажей популяция предшественников линии SC3a была разделена на две части. Одна часть клеток была заморожена, а из другой части клеточного материала в условиях пониженной концентрации кислорода была получена линия SC3, которая обладала способностью к самообновлению и, согласно результатам иммунофлуоресцентного анализа, сохраняла плюрипо-

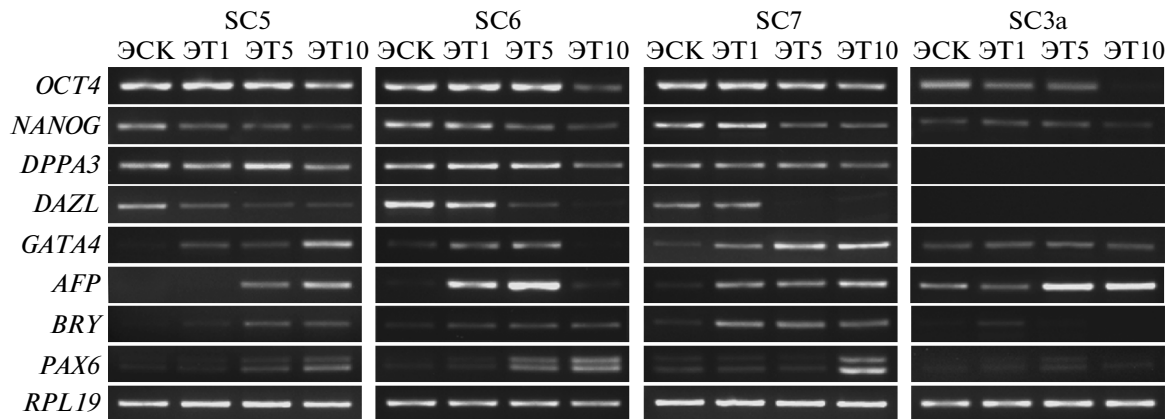


Рис. 5. Транскрипционный профиль недифференцированных ЭСК человека и эмбрионных телец (ЭТ) на 1, 5 и 10 сут дифференцировки линий SC5, SC6, SC7 и SC3a.

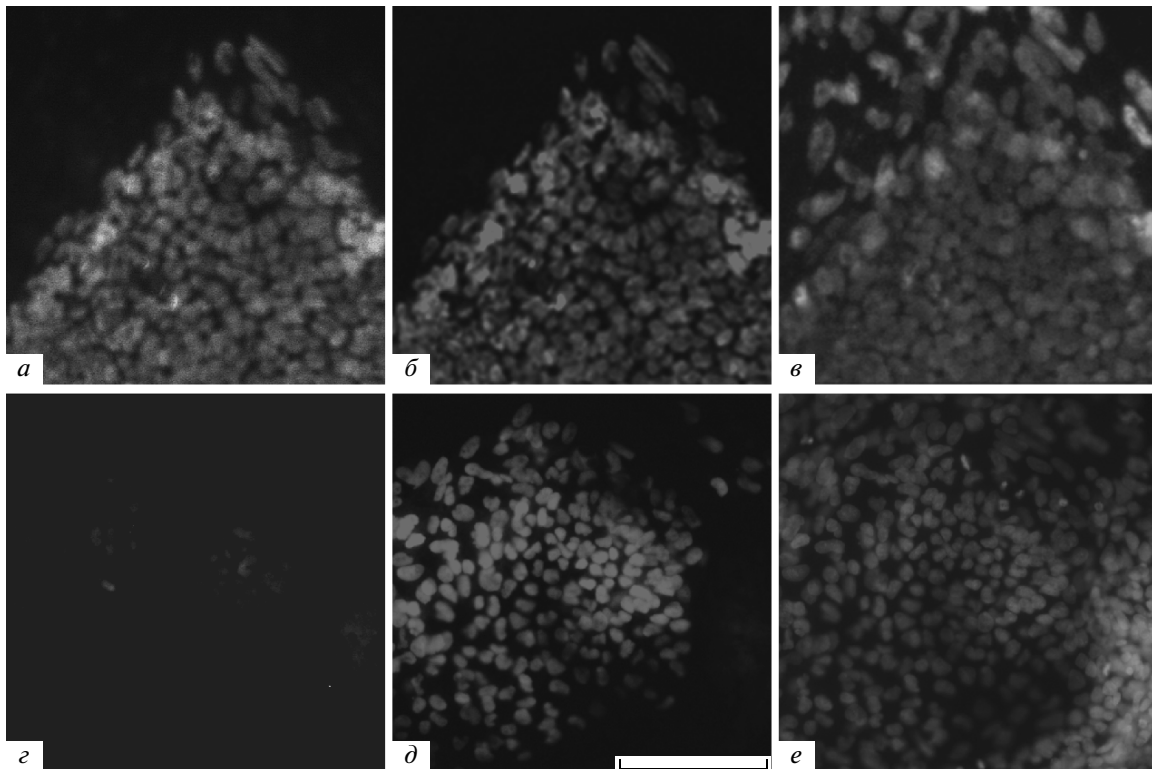


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Oct4 и GATA4 в линиях SC3a и SC5.

Окрашивание колоний клеток SC3a (а, б) и SC5 (с, д) моноклональными антителами против GATA4 и Oct4 соответственно; окрашивание ядер тех же колоний Хехстом 33342 (е, е). Бар, 100 мкм.

тентность при культивировании *in vitro* (Крылова и др., 2009). Однако при изменении условий культивирования, связанных с увеличением концентрации кислорода до 20%, клетки этой линии потеряли способность к активной пролиферации, причем эти изменения были необратимыми. Тем не менее, ЭСК, которые были декриоконсервированы на ранних пассажах после культивирования в атмосфере 5% O₂, оказались способными к росту

после размораживания и активному самообновлению при культивировании в атмосфере 20% O₂ до получения постоянной линии SC3a. Однако клетки данной линии имеют ряд отличий от трех других линий ЭСК. Причем, несмотря на селекцию недифференцированных клеток, проводящуюся при каждом механическом пересеве ЭСК, колонии линии SC3a, тем не менее, поддерживают устойчивую структуру с преобладанием коммити-

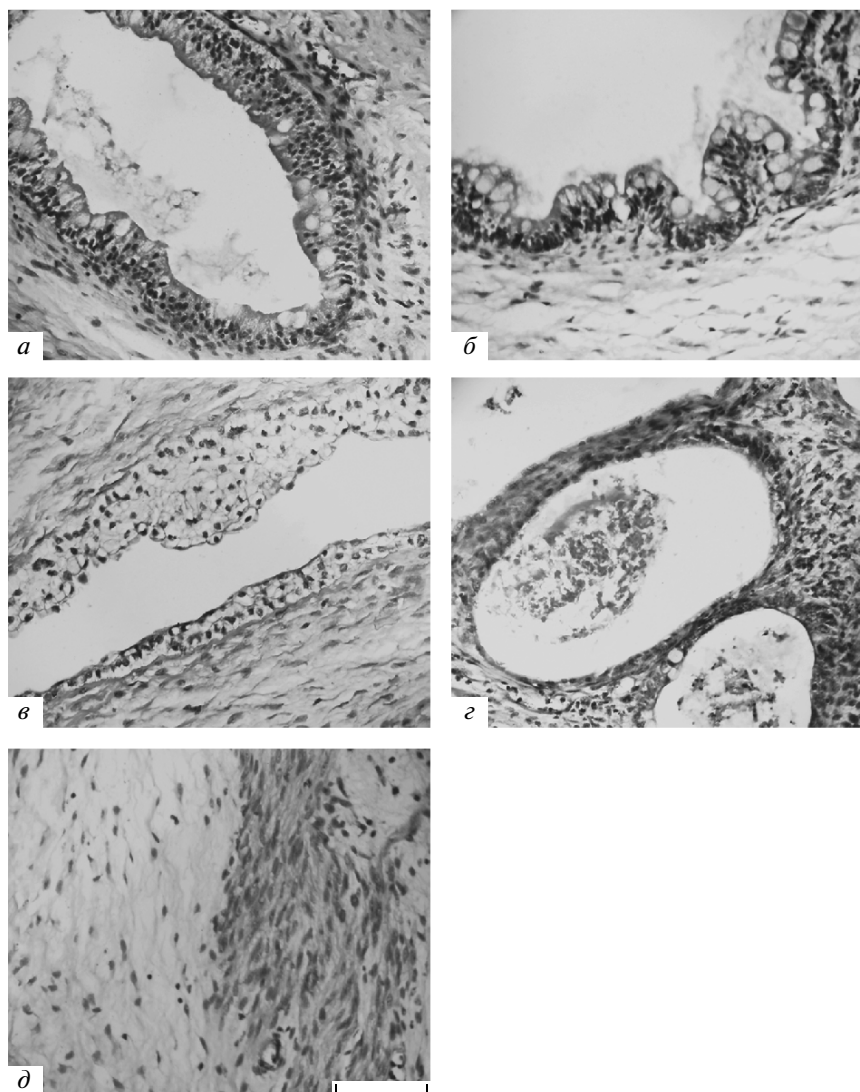


Рис. 7. Дифференцировка *in vivo* линий ЭСК человека в производные трех зародышевых листков в экспериментальных тератомах.

a, б – секреторный эпителий кишечного типа в зачатках кишечных крипт; *в* – клетки соединительной и жировой ткани; *г* – клетки ороговевающего эпителия; *д* – гладкомышечные клетки; в качестве примера представлена линия SC7. Бар, 100 мкм.

рованных клеток, которые, подобно недифференцированным клеткам, активно делятся, как показали наши данные по изучению скорости роста *in vitro* и данные кариотипического анализа этой линии ЭСК. Интересно отметить, что структура кариотипа линии SC3a не изменилась при переходе из одной системы культивирования в другую. Ранее в работах по клонированию ЭСК было показано восстановление гетерогенности в процессе роста колонии ЭСК человека в линиях H9 и H1. Так, в процессе роста колонии из одной клетки, экспрессирующей поверхностный антиген SSEA-3, также быстро возникали и SSEA-3-негативные клетки (Stewart et al., 2006). Таким образом, гетерогенность клеток в колониях является характерной

особенностью линий ЭСК, в отличие от ЭСК мыши. Вероятно, на самых ранних этапах образования линии ЭСК человека в определенных условиях культивирования устанавливается ее статус, который в большей или меньшей степени отличается от статуса клеток ВКМ бластоцисты. Изменение системы культивирования может приводить к необратимым изменениям характерных свойств или кариотипа линии ЭСК и, как следствие, ее потенциала к дифференцировке. Недавно было показано, что при получении и дальнейшем культивировании ЭСК человека в условиях с низким содержанием кислорода не происходит преждевременная и необратимая инактивация X-хромосомы, которая имеет место в линиях ЭСК человека, поддер-

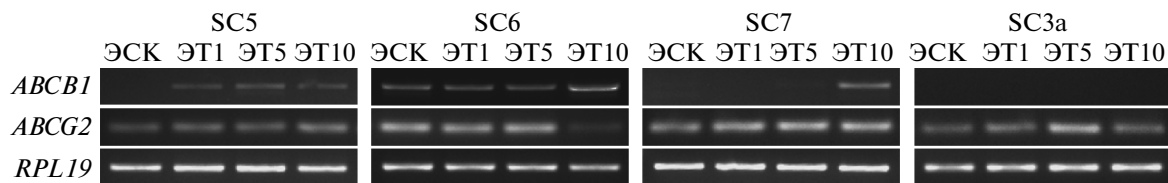


Рис. 8. Экспрессия генов транспортеров *ABCG2* и *ABCB1* в недифференцированных ЭСК человека и в эмбрионидных тельцах (ЭТ) на 1, 5 и 10 сут дифференцировки линий SC5, SC6, SC7 и SC3a.

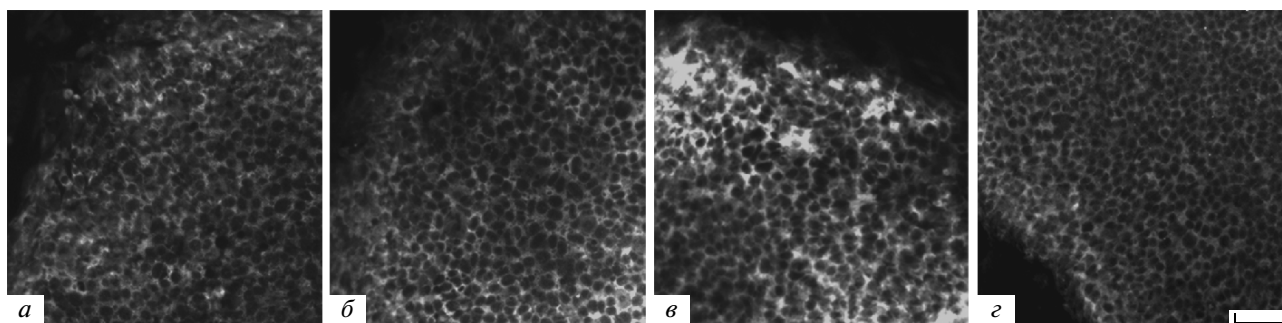


Рис. 9. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии гена транспортера множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* в линиях ЭСК человека.

а–г – колонии линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно. Бар, 65 мкм.

живаемых в традиционных системах культивирования с высоким содержанием кислорода (Lengner et al., 2010). Таким образом, полученные разными исследователями данные свидетельствуют о том, что характеристики и потенциал к дифференцировке линий ЭСК человека в значительной мере зависят от используемой системы культивирования, которая является искусственной нишей для ЭСК, обеспечивающей их стабильность. Изменение условий культивирования может привести к необратимому нарушению статуса линии.

Авторы выражают благодарность проф. Н.Н. Мамаеву и Т.Л. Гиндиной (СПб, Медицинский университет им. И.П. Павлова) за возможность использования Ikaros4 Karyotyping System for transmitted light (MetaSystems, Germany).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В. и др. Характеристики и специфические особенности новых линий эмбриональных стволовых клеток человека // Цитология. 2009. Т. 51. № 7. С. 565–576.
- Abeyta M.J., Clark A.T., Rodrigues R.T. et al. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem lines // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 601–608.
- Aguilar-Gallardo C., Poo M., Gomez E. et al. Derivation, characterization, differentiation, and registration of seven human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on human feeder // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2010. V. 46. P. 317–326.
- Allegrucci C., Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines // Hum. Reprod. Update. 2007. V. 13. P. 103–120.
- Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells // Biol. Reprod. 2004. V. 70. P. 837–845.
- Amit M., Chebath J., Margulets V. et al. Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells // Stem Cell Rev. 2010. V. 6. P. 248–259.
- Apati A., Orban T.I., Varga N. et al. High level functional expression of the *ABCG2* multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells // Biochimica et Biophysica Acta. 2008. V. 1778. P. 2700–2709.
- Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vitro // Nature Biotechnol. 2007. V. 25. P. 207–215.
- Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R. et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature // Blood. 2004. V. 103. P. 2956–2961.
- Carpenter M.K., Rosler E.S., Fisk G.J. et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system // Dev. Dyn. 2004. V. 229. P. 243–258.
- Chavez S.L., Meneses J.J., Nguyen N.M. et al. Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions // Stem Cells Dev. 2008. V. 17. P. 535–546.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. New Engl. J. Med. 2004. V. 350. P. 1353–1356.

- Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al.* Recurrence gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 53–54.
- Drukker M., Katz G., Urbach A. et al.* Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 9864–9869.
- Ellerstrom C., Strehl R., Moya K. et al.* Derivation of a xenon-free human ES cell line // *Stem cells.* 2006. V. 24. P. 2170–2176.
- Englund M.C., Caisander G., Noaksson K. et al.* The establishment of 20 different human embryonic stem cell lines and subclones; a report on derivation, culture, characterisation and banking // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 217–230.
- Ezashi T., Das P., Roberts R.M.* Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cell // *Proc. Natl. Acad. USA.* 2005. V. 102. P. 4783–4788.
- Forsyth N.R., Musio A., Vezzoni P. et al.* Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities // *Cloning and Stem Cells.* 2006. V. 8. P. 16–23.
- Ginis I., Luo Y., Takumi M. et al.* Differences between human and mouse embryonic stem cells // *Dev. Biol.* 2004. V. 269. P. 360–380.
- Gopalakrishna-Pillai S., Iverson L.E.* Astrocytes derived from trisomic human embryonic stem cells express markers of astrocytic cancer cells and premalignant stem-like progenitors // *BMC Med. Genomics.* 2010. V. 3. P. 12–30.
- Harrison N.J., Baker D., Andrews P.W.* Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy // *Int. J. Androl.* 2007. V. 30. P. 275–281.
- Hasegawa K., Pomeroy J.E., Pera M.F.* Current technology for the derivation of pluripotent stem cell lines from human embryos // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. P. 521–531.
- Heins N., Lindahl A., Karlsson U. et al.* Clonal derivation and characterization of human embryonic stem cell lines // *J. of Biotechnology.* 2006. V. 122. P. 511–520.
- Imreh M.P., Gertow K., Cederwall J. et al.* In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells // *J. Cell Biochemistry.* 2006. V. 99. P. 508–516.
- Inzunza J., Gertow K., Stromberg M.A. et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 544–549.
- Kim S.E., Kim B.K., Gil J.E. et al.* Comparative analysis of the developmental competence of three human embryonic stem cell lines in vitro // *Mol. Cells.* 2007. V. 23. P. 49–56.
- Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L. et al.* Human embryonic stem cells derived without feeder cells // *Lancet.* 2005. V. 365. P. 1636–1641.
- Kubikova I., Konecna H., Sedo O. et al.* Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin // *Cytotherapy.* 2009. V. 11. P. 330–340.
- Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V. et al.* Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. P. 416–420.
- Laursen S.B., Møllgard K., Olesen C. et al.* Regional differences in expression of specific markers for human embryonic stem cells // *Reprod. Biomed. Online.* 2007. V. 15. P. 89–98.
- Lengner C.J., Gimelbrant A.A., Erwin J.A. et al.* Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations // *Cell.* 2010. V. 141. P. 872–883.
- Liu Y., Song Z., Zhao Y. et al.* A novel chemical-defined medium with bFGF and N2 B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 346. P. 131–139.
- Lu J., Hou R., Booth C.J. et al.* Defined culture conditions of human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. USA.* 2006. V. 103. P. 5688–5693.
- Ludwig T.E., Levenstein M.E., Jones M.J. et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 185–187.
- Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A.* Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid // *Nat. Med.* 2005. V. 11. P. 228–232.
- Meisner L.F., Johnson J.A.* Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells // *Methods.* 2008. V. 45. P. 133–141.
- Miyazaki T., Futaki S., Hasegawa K. et al.* Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. P. 27–32.
- Mohr J.C., de Pablo J.J., Palecek S.P.* 3-D microwell culture of human embryonic stem cells // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 6032–6042.
- Oh S.K., Kim H.S., Ahn H.J. et al.* Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3 // *Stem cells.* 2005. V. 23. P. 211–219.
- Ozkinay C., Mitelman F.* A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes // *Hereditas.* 1979. V. 90. P. 1–4.
- Pal R., Totey S.S., Mamidi M.K. et al.* Propensity of human embryonic stem cell lines during early stage of lineage specification control their terminal differentiation into mature cell types // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2009. V. 234. P. 1230–1243.
- Priddle H., Allegrucci C., Burridge P. et al.* Derivation and characterisation of the human embryonic stem cell lines, NOTT1 and NOTT2 // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 367–375.
- Prowse A.B., Doran M.R., Cooper-White J.J. et al.* Long term culture of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin in ascorbate free media // *Biomaterials.* 2010. V. 31. P. 8281–8288.
- Rajala K., Hakala H., Panula S. et al.* Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. P. 1231–1238.
- Richards M., Tan S., Fong C.-Y. et al.* Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells // *Stem Cells.* 2003. V. 21. P. 546–556.
- Rosler E., Fisk G.J., Ares X. et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions // *Dev. Dyn.* 2004. V. 229. P. 259–274.

- Sarkadi B., Homolya L., Szakács G., Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. P. 1179–1236.
- Sarkadi B., Orbán T.I., Szakács G. et al. Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? // *Stem cells.* 2009. V. 28. P. 174–176.
- Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (eds). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) // S. Karger, Basel. 2009.
- Sidhu K.S., Tuch B.E. Derivation of clones from human embryonic stem cell lines by FACS sorting and their Characterization // *Stem cells and Development.* 2006. V. 15. P. 61–69.
- Skottman H., Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells // *Reproduction.* 2006. V. 132. P. 691–698.
- Skottman H., Dilber M.S., Hovatta O. The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines // *FEBS Letter.* 2006. V. 580. P. 2875–2878.
- Skottman H. Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 206–209.
- Spits C., Mateizel I., Geens M. et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1361–1363.
- Steiner D., Khaner H., Cohen M. et al. Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. P. 361–366.
- Stewart M.H., Bosse M., Cladwick K. et al. Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment // *Nature Methods.* 2006. V. 3. P. 807–815.
- Ström S., Holm F., Bergström R. et al. Derivation of 30 human embryonic stem cell lines—improving the quality // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 337–344.
- Tavakoli T., Xu X., Derby E. et al. Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines 13, 16 and BG01V // *BMC Cell Biol.* 2009. V. 10. P. 44–58.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.* 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Vazin T., Freed W.J. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review // *Restorative Neurology and Neuroscience.* 2010. V. 28. P. 589–603.
- Wang G., Zhang H., Zhao Y. et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 330. P. 934–942.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // *Nature Biotechnology.* 2001. V. 19. P. 971–974.
- Yang S., Lin G., Tan Y.Q. et al. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture // *Genes Chromosomes Cancer.* 2008. V. 47. P. 665–679.
- Yang S., Lin G., Tan Y.Q. et al. Differences between karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cells // *Cell Prolif.* 2010. V. 43. P. 195–206.

Comparative Characteristics of New Human Embryonic Stem Cell Lines SC5, SC6, SC7, and SC3a

A. M. Kol'tsova¹, O. F. Gordeeva², T. A. Krylova¹, N. V. Lifantseva²,
A. S. Musorina¹, T. K. Yakovleva¹, G. G. Poljanskaya^{1,*}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia 194064*

²*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 119334*

*E-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

Abstract—Numerous human embryonic stem cell lines with different genetic background are widely used as cell models for fundamental, biomedical and pharmacological research. New hES cell lines SC5, SC6, SC7, and SC3a are derived from the blastocysts and maintained on mitotically inactivated human feeder cells. All derived hES cell lines passed through more than 120 cell population doublings, retained normal diploid karyotype and ability of *in vitro* differentiation in the derivatives of three germ layers. These lines express the markers of undifferentiated hES cells: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, and alkaline phosphatase. Moreover, undifferentiated cells of SC5, SC6, and SC7 lines expressed germ line specific genes *DPPA3/STELLA* and *DAZL* and did not express somatic lineages specific genes. In contrast, undifferentiated cells of SC3a line did not express *DPPA3/STELLA* and *DAZL* but expressed extra embryonic endoderm cell markers GATA4 and AFP. Double staining of SC5 and SC3a colonies by antibodies against transcription factors Oct-4 and GATA4 has demonstrated that most SC3a cells in colonies were positive for both factors. Furthermore, the cells of SC5, SC6, SC7 lines but not of SC3a line formed teratomas containing the derivatives of the three germ layers. These results indicate that, in contrast to the other cell lines, the cells in the SC3a colonies represent an early committed cell population. Moreover, expression of the multidrug resistance transporter gene *ABCG2* was detected in undifferentiated cells and differentiating embryonic bodies during 10 days of all lines by immunofluorescent and RT-PCR analyses, whereas RT-PCR analysis has revealed up-regulation of the *ABCB1* transporter gene expression in differentiating embryoid bodies of SC5, SC6, and SC7 cells only. Thus, these findings demonstrate different characteristics and differentiation potential of SC5, SC6, SC7, and SC3a hES cell lines which were derived in different conditions.

Keywords: human embryonic stem cells, marker expression, differentiation, karyotype

УДК 577

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МЕРИСТЕМ-СПЕЦИФИЧНОГО ГЕНА *WOX5* ПРИ ОРГАНОГЕНЕЗЕ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ¹

© 2011 г. М. А. Осипова*, Е. А. Долгих, Л. А. Лутова*

Всероссийский Научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3

*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

E-mail: mary_osipova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.10 г.

Окончательный вариант получен 17.06.10 г.

В последние годы активно исследуется роль генов *WOX*, кодирующих транскрипционные факторы с гомеодоменом, в развитии апикальных меристем побега и корня. Однако роль генов *WOX* в контроле пролиферации клеток в других типах меристем малоизучена. Наша работа посвящена изучению роли гена *WOX5* в развитии меристемы специализированных органов — азотфиксирующих клубеньков, формирующихся на корнях бобовых растений при симбиозе с бактериями ризобиями. Мы показали, что ген *WOX5* вовлечен в развитие меристемы клубенька бобовых растений, оценили количественно его экспрессию на различных этапах клубенькообразования, а также изучили локализацию его экспрессии с помощью конструкции, содержащей промотор *WOX5*, соединенный с репортерным геном. Обсуждается роль транскрипционного фактора *WOX5* в органогенезе клубеньков и его возможное взаимодействие с гормональной системой при развитии клубеньков.

Ключевые слова: развитие клубенька, бобово-ризобияльный симбиоз, меристемоспецифичные гены, *WOX*.

ВВЕДЕНИЕ

При симбиозе бобовых растений с почвенными бактериями семейства *Rhizobiaceae* (так называемыми ризобиями) на корнях растений формируются новые органы — симбиотические клубеньки, в которых бактерии осуществляют процесс биологической фиксации молекулярного азота. Бобово-ризобияльный симбиоз представляет собой сложно регулируемый процесс, контролируемый генами обоих партнеров. Развитие симбиоза начинается с сигнальных взаимодействий между бактериями и растением-хозяином. В ответ на выделяемые в ризосферу бобовыми растениями флавоноиды бактерии синтезируют липохитоолигосахаридные молекулы Nod-факторы. Nod-факторы связываются со специфичными рецепторами бобовых растений и активируют каскад событий, ведущих к развитию инфекции и формированию клубеньков (Ben Amor et al., 2003; Radu-

toiu et al., 2003; Limpens et al., 2003). При рецепции Nod-факторов, в клетках корневой эпидермы происходит деполяризация мембраны (Ehrhardt et al., 1992, 1996; Harris et al., 2003), возникают колебания концентрации кальция в перинуклеарном пространстве (Felle et al., 1999; Engstrom et al., 2002; Charron et al., 2004), изменения в структуре цитоскелета (Van Brussel et al., 1992; de Ruijter et al., 1999) и, как следствие, деформации клеток эпидермы (Lerouge et al., 1990), а также экспрессируются гены ранних нодулинов (*ENOD* гены, от англ. early nodulins) (Horvath et al., 1993; Albrecht et al., 1998). Вызываемые Nod-факторами ответные реакции в эпидерме корня четко скоординированы с процессами, происходящими в коре корня — реактивацией делений клеток коры корня и перицикла и формированием примордия/меристемы клубенька (Oldroyd, Downie, 2008). У группы бобовых растений (*Lotus japonicus*, *Glycine max*), которые формируют клубеньки детерминированного типа, реактивация делений происходит в клетках внешней коры, тогда как у растений (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*), формирующих клубеньки недетерминированного типа, напротив, делятся клетки внутренней коры. Так как Nod-факторы не проникают внутрь корня, а остаются связанными с клетками эпидермы, в контроль процессов реактивации делений клеток и закладки

¹ Работа была поддержана грантами РФФИ 10-08-01207а, РФФИ-НСИ 09-04-92865а, РФФИ 08-04-00537а, РФФИ 11-04-01689, грантом Президента для поддержки научных школ НШ-5399.2008.4, НШ 7623.2006.04; Государственным контрактом от Федерального агентства по науке и инновациям 02.740.11.0276, Государственным контрактом от Федерального агентства по образованию П1301, CRDF ST-012; CRDF-Минобразования RUXO-012-ST-06 (BP2M12), грантом РФФИ-NWO 047.018.001 и грантом Правительства Санкт-Петербурга 2.6/27-04/012.

примордия могут быть вовлечены эндогенные регуляторы самого растения (в частности, гормоны). Однако механизмы такой регуляции еще далеки от понимания. Как было показано, реактивацию клеточных делений в коре корня стимулирует цитокинин (Murray et al., 2007; Tirichine et al., 2007). У модельных бобовых *Medicago truncatula* и *Lotus japonicus* были выявлены компоненты цитокининового сигнального пути, вовлеченные в развитие клубенька, а именно рецептор цитокинина MtCRE1/LjLHK1 и регуляторы цитокининового ответа RR В-типа и А-типа (MtRR1, MtRR4, соответственно). Показано, что Nod-факторы стимулируют накопление флавоноидов, ингибирующих полярный транспорт ауксина в месте инфекции (Hirsch et al., 1989; Mathesius et al., 1998; Grunewald et al., 2009). Это приводит к локальному изменению соотношения концентрации ауксина и цитокинина в тканях корня и, вероятно, активации цитокининового ответа. Таким образом, Nod-факторы запускают реакции в эпидерме корня, приводящие к развитию инфекции, и в то же время, манипулируя гормональной системой растений, стимулируют действие эндогенных регуляторов пролиферации клеток растений цитокининов, индуцирующих развитие примордия клубенька.

Наряду с механизмами локального контроля, в процесс формирования клубеньков у бобовых растений также вовлечены и системные механизмы (так называемая, система авторегуляции клубенькообразования). Авторегуляция является механизмом, посредством которого растение ингибирует дальнейшее формирование клубеньков на корнях после того, как уже появились несколько первых клубеньков (Caetano-Anolles, Gresshoff, 1991). В авторегуляцию вовлечены рецептор-подобные киназы семейства CLAVATA, действующие в побегах, которые были идентифицированы у нескольких видов бобовых. Предполагается, что инокуляция растений ризобиями приводит к выработке сигнала (неизвестной природы), который поступает из корней в надземную часть, связывается там с системой белков CLAVATA, что в свою очередь, способствует активации другого сигнала, который поступает в корни и ингибирует дальнейшую закладку клубеньков (Okakura, Kawaguchi, 2006). Таким образом, формирование клубеньков у бобовых растений находится под контролем сложной системы регуляции, локальные и системные механизмы которой еще предстоит расшифровать.

В течение многих лет в литературе обсуждается вопрос об эволюционном происхождении клубеньков. Согласно наиболее распространенной гипотезе, клубеньки возникли в ходе эволюции на основе модификации программы развития боковых корней (Mathesius et al., 2000; Bright et al., 2005). Эту гипотезу подтверждает выявление мутаций, затрагивающих как развитие боковых корней, так и развитие клу-

беньков (Bright et al., 2005). Кроме того, известны аномалии развития клубеньков, при которых из меристемы сформировавшегося клубенька развивается эктопический корень. Интересно, что такая аномалия может быть обусловлена как мутацией растительного гена (*PsCoch*) (Ferguson et al., 2005), так и мутациями в генах бактерий (в частности, генов, контролирующих биосинтез пиримидинов и пуринов) (Ferraioli et al., 2004). Общая особенность развития бокового корня и клубенька состоит в том, что инициация клеточных делений при образовании примордиев клубеньков, также как и закладка примордиев боковых корней у бобовых растений происходит напротив пучков ксилемы. Кроме того, в системный контроль (авторегуляцию) развития клубеньков и боковых корней могут быть вовлечены общие компоненты: у мутантов, характеризующихся увеличением количества клубеньков (суперклубенькообразующие мутанты) также увеличено и число боковых корней, по сравнению с диким типом (Searle et al. 2003). Все эти данные в совокупности подтверждают существование общих регуляторных механизмов, лежащих в основе развития бокового корня и клубенька. Помимо того, что клубеньек, также как и боковой корень возникает *de novo* в результате реактивации клеточных делений в тканях корня, другой важной особенностью, сближающей развитие клубенька с боковым корнем, является наличие у него собственной меристемы. К настоящему времени, вопрос о том, каким образом регулируется развитие и функционирование меристемы клубенька, остается малоизученным. Неразрешенным остается вопрос о существовании общих механизмов, регулирующих развитие меристемы клубенька и корня. Как показали исследования последних лет, важную роль в регуляции активности меристемы корня играет гомеобокс-содержащий ген *WOX5* (Haescker et al., 2004). У мутантов по гену *WOX5* корень укорочен, структура покоящегося центра меристемы нарушена (размер клеток покоящегося центра увеличен), а прилежащие клетки-инициали претерпевают дифференцировку (Sarkar et al., 2007). Ген *WOX5* экспрессируется в покоящемся центре (организаторе) меристемы корня и отвечает за поддержание клеточных делений и подавление дифференцировки прилежащих клеток-инициалей (стволовых клеток), однако конкретный механизм его действия остается неизученным. *WOX5* является представителем семейства гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов *WOX*, играющих важную роль в развитии меристем растений (Haescker et al., 2004, обзор см. Лутова, Додуева, 2007). Наиболее изучена роль *WOX* в регуляции пролиферации клеток в апикальной меристеме побега. В меристеме побега (в организующем центре) экспрессируется представитель семейства *WOX* — ген *WUS*. Транскрипционный фактор *WUS* стимулирует деления

клеток, непосредственно взаимодействуя с компонентами цитокининового сигнального ответа, обеспечивая локальное усиление действия цитокинина, гормона, стимулирующего пролиферацию, в меристеме (Leibfried et al., 2005). С другой стороны, ген *WUS* взаимодействует с системой белков *CLAVATA*, включающей гетеродимерный рецепторный комплекс *CLV1/CLV2* и пептидный лиганд *CLV3* (*CLE*-пептид) и регулирует поддержание пула стволовых клеток в меристеме (Schoof et al., 2000). Как показали исследования на модельном объекте, арабидопсисе, продукты генов *WUS* и *WOX5* функционально эквивалентны (Sarkar et al., 2007): оба эти гена экспрессируются в “организующих центрах” меристем и обеспечивают поддержание пула стволовых клеток, стимулируя их пролиферацию и блокируя дифференцировку. На основании сходства выполняемых функций можно предположить схожий механизм действия регуляторов *WUS* и *WOX5*. Последние данные свидетельствуют о том, что *WOX5* может взаимодействовать с *CLAVATA*-подобной системой в меристеме корня: *CLE*-пептид (компонент системы *CLAVATA*) *CLE40* ограничивает область экспрессии *WOX5* в меристеме корня таким же образом, как *CLV3* ограничивает область экспрессии гена *WUS* в меристеме побега (Stahl, Simon, 2009). Влияние *WOX5* на цитокининовый ответ в меристеме корня изучено не было. Таким образом показано, что *WOX5* стимулирует пролиферацию и подавляет дифференцировку стволовых клеток-инициалей в меристеме корня, но конкретные механизмы его действия к настоящему времени не известны.

Поскольку программы развития боковых корней и клубеньков эволюционно близки, мы предположили, что ген *WOX5* может быть также вовлечен в контроль органогенеза клубеньков. К настоящему времени роль *WOX5* в развитии клубенька остается неизученной, хотя в литературе имеются данные о возможном участии этого гена в развитии клубенька (Wan, 2007). Контролируется ли развитие меристемы клубенька и меристемы бокового корня общими регуляторными факторами? Этот вопрос приобретает особый интерес в свете дискуссии об эволюционном происхождении клубенька. Принципиальные различия в индукции развития клубенька и бокового корня связаны с гормональной регуляцией этих процессов. Индуктором образования боковых корней является ауксин, стимулирующий пролиферацию клеток перицикла при развитии примордия бокового корня. Было показано, что ген *WOX5*, экспрессия которого активируется при первых делениях клеток перицикла, является ауксин-регулируемым (Gonzali et al., 2005; Imin et al., 2007; Chen et al., 2009). Таким образом, при развитии бокового корня ауксин может активировать экспрессию гена *WOX5*, участвующего в развитии меристемы бокового корня. В отличие от ауксина, гормон цитокинин подав-

ляет развитие бокового корня. Локальное усиление концентрации цитокинина в клетках перицикла (например, вызванное сверхэкспрессией гена биосинтеза цитокинина изопентинилтрансферазы) нарушает закладку примордиев боковых корней. Экзогенное добавление цитокинина вызывает изменение направлений клеточных делений в формирующемся примордии, нарушая его структуру, что приводит к формированию “плоского” примордия бокового корня (Laplaze et al., 2007). В противоположность этому, было показано, что именно цитокинин играет ключевую роль в активации делений клеток коры при развитии примордия клубенька. Каковы же относительные роли ауксина и цитокинина в инициации развития примордия клубенька? Какую роль играет активируемый ауксином ген *WOX5* в закладке меристемы клубенька? Существует ли связь *WOX5* с действием цитокинина и с действием системы *CLAVATA*?

В поисках ответа на поставленные вопросы может помочь изучение экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька, в особенности на начальных этапах его развития. В этой статье мы показали, что ген *WOX5* вовлечен в развитие меристемы клубенька бобовых растений, оценили количественно его экспрессию на различных этапах клубенькообразования, а также изучили локализацию его экспрессии с помощью конструкции, содержащей промотор *WOX5*, соединенный с репортерным геном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий

Для инокуляции растений гороха *Pisum sativum* L. использовали штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* CIAM 1026 (Safonova, Novikova, 1996), полученный из коллекции ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (<http://www.aggiam.spb.ru/eng/lab10/>). Для инокуляции растений люцерны *M. truncatula* использовали штамм *Sinorhizobium meliloti* 2011. Жидкие культуры выращивали на качалке при 28°C в среде *B*- (van Brussel et al., 1977) до оптической плотности $A_{600} = 0.7-1$ (приблизительно 10^7-10^8 клеток на мл). Для инокуляции использовали 1 мл бактериальной суспензии на растение.

Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* MSU440.

Растительный материал и условия выращивания растений

В работе использовали горох (*Pisum sativum* L.) сортов *Frisson* и *SGE*, а также полученные на основе сорта *SGE* мутантные линии *SGENod-8* (*sym38*), *SGEFix-2* (*sym33*), *SGENod-3* (*sym35*) из коллекции

ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (<http://www.arriam.spb.ru/eng/lab9/collections.html>), а также линию люцерны диплоидной *Medicago truncatula Gaertn A17*.

Семена стерилизовали с использованием концентрированной серной кислоты в течение 10 минут с последующей 5-кратной промывкой в стерильной воде. Семена высевали на 1% водный агар и проращивали в темноте в течение 4–5 дней. В эксперименте по изучению экспрессии генов проростки гороха переносили в горшки с вермикулитом, поливали жидкой средой Jensen (Jensen, 1942). Растения выращивали в фитотроне с режимом день/ночь 16/8 часов, 21°C, относительной влажности 75%, освещенности. Образцы корней для выделения РНК собирали на 5, 7, 9, 11, 15, 22 дни после инокуляции, корни 3–4 растений на вариант.

Идентификация гена *WOX5*

На основании взятых из базы данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *WOX5 Arabidopsis thaliana* (GenBank AY251396) и *Medicago truncatula* (GenBank BF649819) были подобраны вырожденные праймеры к консервативным участкам, которые использовали для получения продукта на матрице ДНК и кДНК гороха:

WOX5_F: AAGTGYGGKCGWTGGAATCC,

WOX5_R: CTC AAYCGTAAGTCYAAATGGYGG.

Для выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот применяли программу AlignX, использующую алгоритм Clustal W (Thompson et al., 1994), из пакета Vector NTI Advance 10 (InforMax, Inc <http://www.informaxinc.com>). Амплификацию проводили по следующей программе: 30 сек при 94°C, затем 30 сек при 56°C и 40 сек при 72°C, 28 циклов, 5 мин при 72°C. Полученный продукт выделяли из геля с помощью DNA extraction kit (Fermentas, Латвия) согласно предложенному производителем протоколу. Выделенные фрагменты лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы (Sigma, США) в течение ночи при 14–16°C в векторе pAL-TA (Евроген, Россия). Полученной реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (DH5). Отбор трансформантов производили на среде LB/ampicillin/IPTG/X-Gal. Плазмидную ДНК выделяли из ночной культуры клеток *E. coli* методом лизиса с щелочью (Lee, Rasheed, 1990). Анализ первичных последовательностей проводили с помощью автоматического секвенатора SEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя.

Анализ экспрессии генов

Образцы корней для выделения РНК собирали на 5, 7, 9, 11, 15, 22 дни после инокуляции. Чтобы избежать попадания примордиев боковых корней в анализируемый материал, брали участки корня между боковыми корнями. Эксперимент повторяли в двух независимых биологических повторностях. РНК выделяли с использованием реагента TRI® (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Обработку с помощью фермента ДНКазы (Fermentas, Латвия) проводили в течение 1 часа при 37°C, с последующим осаждением с использованием хлороформа. Для синтеза кДНК брали по 2.5 мкг РНК. Реакцию синтеза кДНК проводили в реакционной смеси общим объемом 20 мкл, содержащей 10 mM tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM дНТФ, 100 пМ олиго(dT12), 1 ед. ингибитора РНКаз (Fermentas, Латвия) и 200 ед. обратной транскриптазы М-MLV (Fermentas, Латвия) в течение 1 часа при 37°C с последующим прогреванием в течение 5 минут при 95°C. Полученные пробы кДНК разбавляли до 100 мкл. В состав реакционной смеси для ПЦР общим объемом 20 мкл входило 2 мкл полученного раствора кДНК в 10 mM трис-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM дНТФ, 10 пМ каждого праймера 1 ед. Таq-полимеразы. Амплификацию проводили по следующей программе: 30 сек при 94°C, затем 30 сек при 56°C и 40 сек при 72°C, 28 циклов, 5 мин при 72°C с праймерами к гену *PsWOX5* и гену убиквитина:

PsWOX5_FOR

5'-GGTTTCAA AATCATAAGGCTAGGGA-3',

PsWOX5_REV

5'-TCAACCGTAAGTCTAATGGTGGATG-3',

Ubiquitin_FOR:

5'-ATGCAGATC/TTTTGTGAAGAC-3',

Ubiquitin_REV:

5'-ACCACCACGG/AAGACGGAG-3'.

Продукты ПЦР разделяли в 1.5% агарозном геле. Для контроля качества и количества РНК в анализируемых образцах проводили реакцию с праймерами к конститутивно экспрессирующемуся гену убиквитину.

ПЦР, совмещенная с обратной транскрипцией, с детекцией в реальном времени

ПЦР в реальном времени с помощью системы Bio-Rad iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием коммерческого набора iQ SYBR Green Supermix. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1X буфер для ПЦР, 4 mM MgCl₂, 10 mM дНТФ, 1 ед. Таq-полимеразы “jumpstart”, 10 пМ каждого праймера и 0.5xSYBR Green I. Ам-

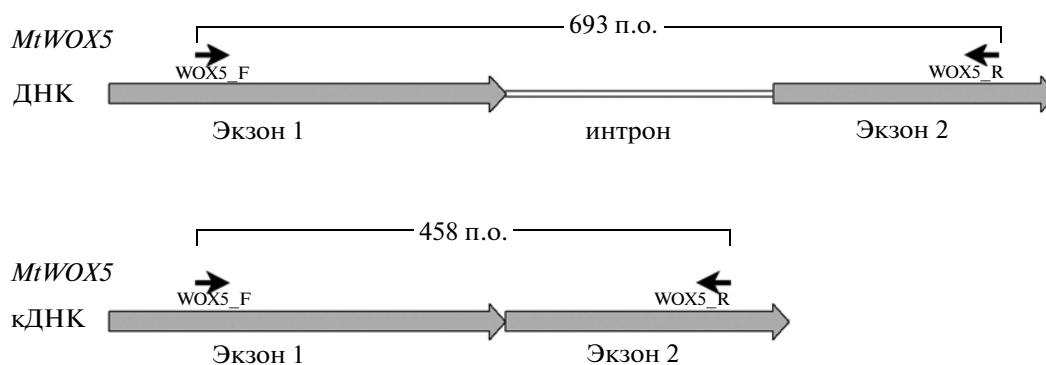


Рис. 1. Схема расположения вырожденных праймеров на матрице ДНК и кДНК *MtWOX5*, используемых для идентификации гена *WOX5* у гороха.

пификацию проводили по следующей программе: 95°C в течение 30 сек, 56°C в течение 30 сек и 72°C в течение 40 сек. Флуоресценцию интеркалирующего красителя SYBR Green I регистрировали в конце каждого цикла при 72°C. Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили с помощью программы BioRad IQ5. Данные по количественной оценке анализируемого гена представлены в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнем экспрессии референсного гена убиквитина. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях.

Получение генетической конструкции *pMtWOX5::GUS*

Для амплификации промотора гена *MtWOX5* на матрице геномной ДНК люцерны диплоидной амплифицировали фрагмент размером 1967 п.о. до старт-кодона АТГ гена *MtWOX5* с помощью высокоточной полимеразы Pfu (Силекс, Россия). Амплификацию проводили с использованием праймеров:

pMtWOX5_FOR

5'-CACCCAACCAAGCCTTATCATAGTAT-3' и

pMtWOX5_REV

5'-GCTCTCTTCCATATTTCAATTCTAGA-3',

по следующей программе: 30 сек при 94°C, 40 сек при 56°C и 3 мин при 72°C, 28 циклов.

Полученный фрагмент клонировали в векторе pENTR(tm)/D-TOPO® (Invitrogen, США). Правильность вставки промотора в вектор путем проверяли с помощью секвенирования. После этого промотор переклонировали с помощью attR-attL рекомбинации в вектор pBGWFS7 (VIB-Ghent, Бельгия), содержащий последовательности репортерных генов GFP/GUS и терминатора T35S. Полученную конструкцию вводили в клетки *Agrobacterium rhizogenes* MSU440.

Трансформация гороха и люцерны диплоидной

Штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим генетическую конструкцию *pMtWOX5::GFP/GUS*, трансформировали растения люцерны диплоидной и гороха. Трансформацию осуществляли по протоколу, описанному Лимпенсом и соавторами (Limpens et al., 2004), путем нанесения суспензии бактерий на срез в области гипокоты асептических проростков *in vitro* и культивирования проростков с агробактериями в течение 4–5 дней на твердой питательной среде Färhaeus. После трансформации экспланты переносили на питательную среду Emergence (Limpens et al., 2004) с добавлением антибиотика цефотаксима 300 мкг/мл и культивировали до регенерации корней, после чего растения пересаживали в горшочки, заполненные субстратом вермикулитом с добавлением жидкой питательной среды Färhaeus. Инокуляцию люцерны диплоидной проводили с использованием штамма ризобий *Sinorhizobium meliloti* 2011, а растения гороха инокулировали штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum* CIAM1026.

Локальный анализ экспрессии гена *WOX5*

Детекцию активности репортерного гена GUS осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Sigma-Aldrich, США), инкубируя растительные ткани в буфере для GUS-окрашивания (NaPO₄ – буфер, pH 7.0; 0.5 мМ K₃Fe(CN)₆; 0.5 мМ K₄Fe(CN)₆; 0.05% Triton X-100; 0.5 мМ X-Gluc в ДМФ) при 37°C в течение 1.5–2 часов. Срезы тканей растений получали с использованием микротомы с вибрирующим лезвием HM 650V (Micom International GmbH). Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа LSM 510 META NLO (Carl Zeiss).

										Section 1
	(1)	10	20	30	40	50	60			74
<i>PsWOX5</i>	(1)	ATTGGTTTCAAATCATAAGGCTAGGGAAGACAAAAACGTCGGAGGTTTCTTTTGATGATGAAGGATGTT								
<i>MiWOX5</i>	(1)	ATTGGTTTCAAATCA CAAAGCTAGAGAAAGACAAAAACGTCGTAAGGTTTCTTTTGATGATGACAAAGGATGTC								
	(75)	80	90	100	110	120	130			Section 2
										148
<i>PsWOX5</i>	(75)	ATTGTTTCATCATAGAGACAACCTCCATGCTGCTTCTAACAAGTTTGTGTGAGATGTAAGGATGAGGCTAATAG								
<i>MiWOX5</i>	(75)	ATAGTTTCAT ---AGAGACAACCTCTATGAATGCTTCAACACAAAAGTTTGTGTGAGATGTAAGGATGAGGCTAATAG								
	(149)	160	170	180	190	200	210			Section 3
										222
<i>PsWOX5</i>	(149)	GGTGATTGAGACTCTTGAGCTTTTCCATTGAACCTCTTGGTGAATCAGAATCAGAACTGAGAAAGCTGAGTG								
<i>MiWOX5</i>	(146)	AGTGATTGAGACTCTTGAGCTTTTCCATTGAACCTCATTTGGTGAATCAGAATCAGAA-----AAGTGGAGTA								
	(223)	230	240	250	260	270	280			Section 4
										296
<i>PsWOX5</i>	(223)	TGCAATGTAATGAAAGTAGGGAAAAATCCTATATTGCTTACACATGCAATGGGTGAGCAAATAGAGCATCCA								
<i>MiWOX5</i>	(214)	TGCAATGCAATGAAATG CAGGGAAAAATCAATGTTTGCATACACATGTACAATGGGAGAACAAATGGAAACCCCA								
	(297)	315								Section 5
										296
<i>PsWOX5</i>	(297)	CCATTAGACTTACGGTTGA								
<i>MiWOX5</i>	(288)	CCATTGGACTTACGGNTGA								

Рис. 2. Выравнивание последовательности нуклеотидов амплифицированного фрагмента кДНК гена гороха *PsWOX5* с соответствующим участком кДНК гена люцерны диплоидной *MiWOX5*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация гена *PsWOX5* у гороха

На основании взятых из базы данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *WOX5 Arabidopsis thaliana* и *Medicago truncatula* были подобраны вырожденные праймеры к консервативным участкам, которые использовали для получения продукта на матрице кДНК гороха (см. рис. 1).

С использованием вырожденных праймеров на матрице ДНК и кДНК гороха (Frison) были получены продукты ожидаемого размера. Анализ последовательностей, полученных в результате амплификации, выявил сходство данных фрагментов с соответствующими последовательностями арабидопсиса и люцерны диплоидной (см. рис. 2). На основании анализа полученных последовательностей нами были подобраны полностью комплементарные праймеры к кДНК гороха *PsWOX5* (от *Pisum sativum WOX5*), которые использовали для анализа экспрессии этого гена при развитии клубеньков гороха.

Анализ экспрессии гена *PsWOX5* при развитии клубеньков у гороха

Мы проанализировали экспрессию *PsWOX5* на различных сроках после инокуляции ризобиями. В целом, после инокуляции уровень экспрессии *PsWOX5* возрастал, достигал максимума к 9–11 дню после инокуляции (дни), затем на 15 дни происходило снижение экспрессии гена *PsWOX5* (см. рис. 3, а, б). Так, по сравнению с 5 дни, на 7 дни наблюдали увеличение экспрессии гена *PsWOX5* в 3.6 раза, к 9 дни экспрессия *PsWOX5* увеличивалась в 6 раз, а к 11 дни – в 9.4 раз. К 15 дни наблюдали снижение экспрессии *PsWOX5*, по сравнению с 11 дни, в 4.6 раза, а на 22 дни – уровень экспрессии *PsWOX5* снижался в 22 раза (см. рис. 3, б). В неинокулированных контрольных образцах экспрессию гена *PsWOX5* не наблюдали (см. рис. 3, а).

Кроме того, мы проанализировали экспрессию *PsWOX5* у мутантов с нарушением развития примордиев/меристемы клубеньков *sum35* и *sum38*. У мутантов *sum35* наблюдается ранний блок в развитии клубеньков: не происходит активация делений клеток коры, тогда как у мутантов *sum38* образуются очень редкие примордии клубеньков, но меристема не формируется. У мутантов *sum35* и *sum38* экспрессия гена *PsWOX5* в ответ на инокуляцию нами не была выявлена. При этом у дикого типа и у мутанта *sum33*, у которого меристема клубенька формируется, но происходят нарушения на последующих этапах клубенькообразования, наблюдали экспрессию *PsWOX5* в ответ на инокуляцию (см. рис. 4).

В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что ген *PsWOX5* действительно вовлечен в развитие примордия/меристемы клубенька гороха.

Таким образом, мы проанализировали динамику экспрессии гена *WOX5* в тканях корня гороха в ответ на инокуляцию ризобиями, начиная с 5 дни. На этом сроке у гороха происходит рост инфекционных нитей, посредством которых ризобии проникают внутрь коры корня. Параллельно с этим активно протекают деления клеток внутренних слоев коры и перицикла, приводящие к формированию примордия клубенька – группы пролиферирующих клеток, формирующих зачаток клубенька, которые впоследствии дают начало тканям клубенька (Voroshilova et al., 2009). Согласно нашим данным, на этом сроке происходит значительное увеличение экспрессии гена *WOX5* в инокулированных корнях гороха. Такое увеличение может быть связано с активной пролиферацией клеток примордия клубенька, поскольку ген *WOX5*, согласно литературным данным, вовлечен в регуляцию пролиферации клеток. Примерно к 9–11 дни растущие инфекционные нити достигают пролиферирующих клеток примордия клубенька и бактерии начинают их инфицировать, проникая в клетки корня посредством эндоцитоза.

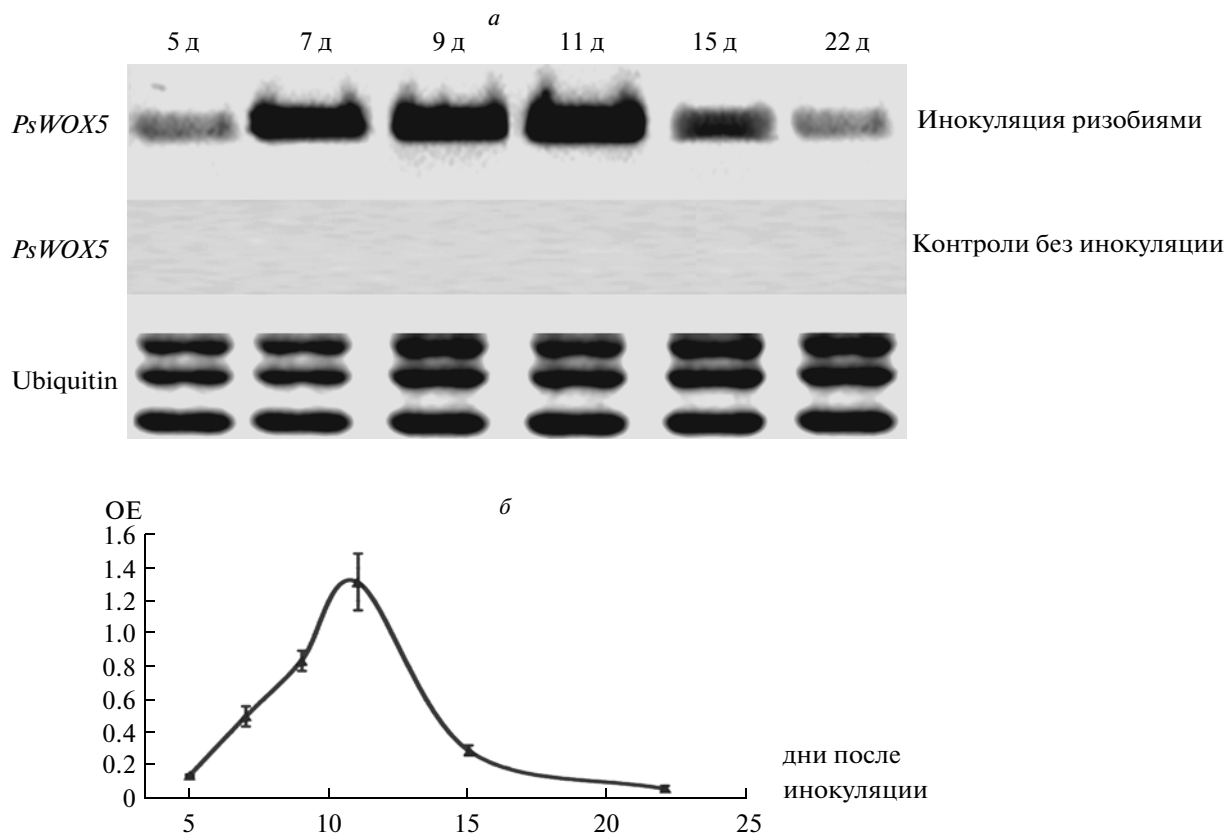


Рис. 3. Анализ динамики экспрессии гена *PsWOX5* при развитии клубенька гороха линии *Frison*:

a – Анализ динамики экспрессии *PsWOX5* методом ОТ-ПЦР;

б – Количественный анализ динамики экспрессии *PsWOX5* методом ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на этом этапе уровень экспрессии гена *WOX5* в примордиях клубеньков достигает максимального значения. На более поздних сроках (после 11 дни) происходит формирование меристемы клубенька и выход клубенька на поверхность материнского корня (Voroshilova et al., 2009). Обособление зоны меристемы сопровождается формированием характерной для азотфиксирующего клубеньков гистологи-

ческой структуры. Так, в клубеньках возрастом около 15 дни уже различимы зоны, характерные для зрелых клубеньков недетерминированного типа: на верхушке клубенька располагается меристема, за которой располагается зона инфекции, и вслед за ней к основанию клубенька – зона азотфиксации (Brewin, 1991). Согласно нашим данным, к 15 дни происходит значительное снижение уровня экспрессии *WOX5*. Таким образом, начальное увеличение уровня экспрессии *WOX5* по времени совпадает с активной пролиферацией клеток на ранних этапах развития клубенька (формированием примордия), а достижение максимума экспрессии *WOX5* (9–11 дни) предшествует формированию у клубенька собственной меристемы. При этом дифференцировка тканей клубенька (примерно 15 дни) сопровождается значительным снижением уровня экспрессии этого гена.

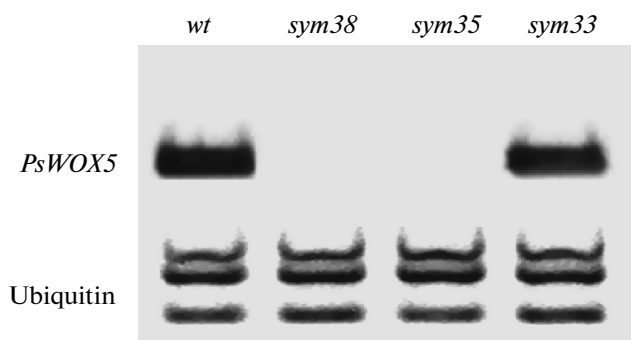


Рис. 4. Анализ экспрессии *PsWOX5* в корнях гороха дикого типа и мутантов *sym35*, *sym38*, *sym33*, инокулированных ризобиями, на 7 день после инокуляции.

Выявленный характер динамики экспрессии гена указывает на его возможное участие в контроле процесса формирования примордия/меристемы клубенька. Однако для подтверждения этого предположения необходимо было провести локальный анализ экспрессии *WOX5* при развитии клубенька.

Локальный анализ экспрессии WOX5 при развитии корней и клубеньков гороха и люцерны диплоидной

Для локального анализа экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька нами была создана конструкция, содержащая промотор этого гена, соединенный с репортерным геном бета-глюкоконидазы (*GUS*) (*pMtWOX5::GUS*) (см. рис. 5). Для создания конструкции мы использовали последовательность промоторной области гена *pMtWOX5* люцерны диплоидной (*M. truncatula*). Люцерна диплоидная является модельным бобовым растением, геном которого к настоящему времени полностью расшифрован. Люцерна, как и горох, образует клубеньки недетерминированного типа. Кроме того, о близком эволюционном родстве этих видов свидетельствует наличие тесной синтении между участками генома люцерны диплоидной и гороха посевного (Zhu et al., 2005; Жуков и др., 2009). На основании этого мы ожидали, что активность промотора *M. truncatula* будет регулироваться сходным образом на генетическом фоне гороха, поскольку сходство процессов клубенькообразования предполагает сходство регуляторных механизмов.

Горох известен как труднотрансформируемый объект (Савельева и др., 2005). Агробактериальную трансформацию гороха осложняет низкая регенерационная способность, в частности низкая способность к корнеобразованию. В связи с этим, параллельно с горохом, мы также проводили трансформацию люцерны диплоидной, для которой методы генетической трансформации хорошо отработаны (Chabaud et al., 2006). Кроме того, важной задачей этой части работы был сравнительный анализ локализации экспрессии *pMtWOX5::GUS* в тканях люцерны *M. truncatula* и гороха. Такой анализ позволил бы оценить адекватность использования конструкций, содержащих промотор гена *M. truncatula*, для изучения регуляции активности ортологичного гена у гороха.

В результате трансформации с помощью *A. rhizogenes* нам удалось получить достаточно высокую долю трансгенных корней как у растений люцерны, так и гороха. Однако, следует отметить, что в наших экспериментах процесс регенерации корней у гороха, после трансформации бескорневых эксплантов, в целом был не очень эффективным (1–3 корня на растение). У полученных трансгенных корней гороха и люцерны мы наблюдали экспрессию *pMtWOX5::GUS* в меристеме корня, в области, соответствующей покоящемуся центру меристемы (см. рис. 6: а, в). Это согласуется с литературными данными о локализации экспрессии гена *WOX5* арабидопсиса в покоящемся центре меристемы корня (Haescker et al., 2004). Таким образом, полученная нами конструкция оказалась эффективной для изуче-

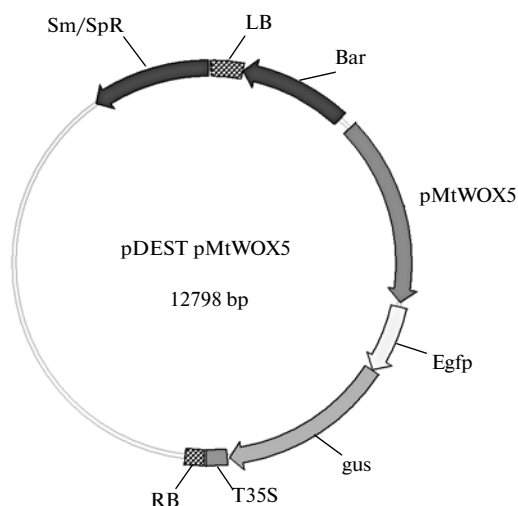


Рис. 5. Схема вектора, используемого для локального анализа экспрессии гена *WOX5*.

ния локализации экспрессии гена *WOX5* как у люцерны *M. truncatula*, так и у гороха.

Корни трансформированных растений были инокулированы ризобиями с целью последующей локализации экспрессии *WOX5* на различных этапах органогенеза клубеньков. У люцерны *M. truncatula* в ответ на инокуляцию происходила нормальная закладка примордиев клубеньков, которые со временем развивались в азотфиксирующие клубеньки. У гороха мы также наблюдали формирование примордиев клубеньков в ответ на инокуляцию, однако такие примордии останавливались в развитии, и оформленных клубеньков на корнях трансформированных растений гороха нам получить не удалось. Остановка развития примордиев клубеньков у гороха на корнях трансформированных растений может быть связана с возможным изменением гормонального статуса корней-регенерантов. Известно, что различные штаммы *A. rhizogenes*, используемые для трансформации, характеризуются различной степенью вирулентности (в частности, влиянием на гормональный статус растения). В частности, используемый нами штамм MSU440 характеризуется достаточно высокой степенью вирулентности, как известно из литературы, может вызвать образование корней-регенерантов с аномальным ростом и морфологией, характеризующихся измененным гормональным статусом (Chabaud et al., 2006). Таким образом, действительно целесообразным представляется сравнительный анализ экспрессии полученной конструкции параллельно у двух объектов.

В данной работе с использованием конструкции *pMtWOX5::GUS* нам удалось локализовать экспрессию гена *WOX5* на ранних этапах развития примордия клубенька у люцерны диплоидной и гороха. В

целом, локализация экспрессии *WOX5* у этих двух видов бобовых оказалась схожей, что позволяет нам обобщать данные по экспрессии изучаемого гена у люцерны диплоидной и гороха (см. рис. 7). Мы показали, что на самых ранних этапах *WOX5* экспрессируется в перицикле напротив тяжа ксилемы, что соответствует месту закладки примордия клубенька (рис. 7, а). Далее экспрессия гена *WOX5* связана с пролиферирующими клетками примордия клубенька (рис. 7, б, в, г). Следует отметить, что локализация экспрессии *WOX5* в клетках примордия клубенька согласуется с высоким уровнем экспрессии этого гена, определенном с помощью метода ОТ-ПЦР, на 5–11 дни – сроках, когда происходит закладка примордиев клубеньков. Таким образом, корреляция этих данных подтверждает наше предположение об участии транскрипционного фактора *WOX5* в процессе формирования примордия/меристемы клубенька.

Кроме того, нами практически не было выявлено экспрессии гена *WOX5* в клетках эпидермы (корневых волосках), что указывает на участие данного гена только в контроле процессов, происходящих в коре и перицикле у двух изученных бобовых растений.

Известно, что у арабидопсиса экспрессия гена *WOX5* индуцируется ауксином (Gonzali et al., 2005; Imin et al., 2007; Chen et al., 2009). Сайты закладки примордиев клубеньков соответствуют зонам накопления ауксина при действии Nod-факторов. Показано значительное перекрытие (90%) спектров белков (протеомные исследования), синтез которых индуцируется в ответ на действие ауксина и инокуляцию ризобиями (van Noorden et al., 2007). С помощью ауксин-регулируемых генетических конструкций GH3::GUS и DR5::GUS у люцерны *M. truncatula* и клевера *Trifolium repens* наблюдали усиление ауксинового ответа в делящихся клетках коры и перицикла на ранних этапах развития примордия клубенька (Mathesius et al., 1998; Huo et al., 2006). Все эти данные указывают на важную роль ауксина в органогенезе клубеньков, однако механизм действия ауксина на процессы, лежащие в основе формирования примордия клубенька, остается не выясненным. В нашей работе мы показали, что ген *WOX5*, известный как ауксин-регулируемый ген, экспрессируется на ранних этапах развития клубенька и вовлечен в развитие примордия. Таким образом, можно предположить, что активация экспрессии *WOX5* опосредована действием ауксина при развитии примордиев клубеньков.

Вместе с тем, для паралога гена *WOX5* у арабидопсиса, функционирующего в меристеме побега, показано их непосредственное участие в цитокининовом ответе. Так, транскрипционный фактор WUS

подавляет экспрессию генов *ARR* А-типа, вовлеченных в контроль цитокининового ответа. Известно, что у арабидопсиса при связывании цитокинина с рецептором, активируются регуляторы цитокининового ответа – транскрипционные факторы *ARR* В-типа и А-типа. *ARR* В-типа связываются с промоторами цитокинин-регулируемых генов и активируют их экспрессию. В свою очередь, транскрипционные факторы *ARR* А-типа по механизму обратной связи подавляют действие транскрипционных факторов В-типа и, тем самым препятствуют дальнейшему распространению цитокининового ответа. Так как WUS подавляет экспрессию генов *ARR* А-типа, то его действие способствует локальному усилению цитокининового ответа. Другой транскрипционный фактор семейства *WOX*, *WOX9*, как предполагается, участвует в активации цитокинин-регулируемых генов наряду с ранее охарактеризованными регуляторами цитокининового ответа – транскрипционными факторами *ARR* В-типа. Таким образом, в меристеме побега гены *WOX* локально усиливают цитокининовый ответ, стимулируя пролиферацию клеток меристемы.

Известно, что на ранних этапах развития клубенька наблюдается усиление цитокининового ответа и экспрессия цитокинин-регулируемых генов, необходимых для развития примордия клубенька. В корнях люцерны *M. truncatula*, инокулированных ризобиями, экспрессия рецептора цитокинина *MiCRE1* локализована в клетках коры и в развивающемся примордии клубенька (Lohar et al., 2006). Таким образом, локализация компонентов, вовлеченных в цитокининовый ответ у бобовых растений, совпадает с локализацией экспрессии гена *WOX5*. Кроме того, в развитие цитокининового ответа у бобовых также вовлечены гены *RR* А- и В-типа. Можно предположить, что ген *WOX5* вовлечен в регуляцию цитокининового ответа при развитии примордия клубенька, аналогично действию его паралога, функционирующего у арабидопсиса.

Интересно отметить, что другим геном, для которого показано участие в формировании примордия клубенька, является цитокинин-регулируемый ген раннего нодулина *ENOD40* (Fang, Hirsh, 1998). На ранних этапах клубенькообразования он экспрессируется в перицикле и в делящихся клетках примордия (Imaizumi-Anraku et al., 2000, Wan et al., 2007). Как известно, продукт гена *ENOD40*, представляющий собой регуляторный пептид, оказывает влияние на ауксиновый ответ в тканях корня (van de Sande et al., 1996). Таким образом, *ENOD40* вовлечен во взаимодействие между цитокининовым и ауксиновым ответом при развитии клубенька.

Так как известно, что транскрипционный фактор *WOX5* является ауксин-регулируемым, но при этом

может влиять на распространение цитокининового ответа (мишенью его действия могут являться RR A-типа), мы предполагаем, что при развитии клубенька *WOX5* играет роль связующего звена между и цитокининовым и ауксиновым ответом. Это предположение требует подтверждения в экспериментах по изучению влияния гормонов цитокинина и ауксина на развитие клубеньков с использованием полученных конструкций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы показали, что ген *PsWOX5* вовлечен в контроль развития клубеньков гороха и экспрессируется на высоком уровне в пролиферирующих клетках развивающихся примордиев клубеньков. Результаты нашей работы демонстрируют, что при развитии разных структур, таких как клубенок и корень, пролиферация клеток у растений контролируется одним и тем же регуляторным геном *WOX5*. При этом, вероятно, особенности развития этих органов определяются тонкой регуляцией взаимодействия транскрипционного фактора *WOX5* с гормонами растений, прежде всего цитокинином и ауксином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жуков В.А., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю. и др. Молекулярно-генетические механизмы контроля растением ранних стадий развития взаимовыгодных (мутуалистических) симбиозов бобовых // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1449–1460.
- Лутова Л.А., Додуева И.Е. Роль меристемоспецифичных генов растений в формировании генетических опухолей // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 420–433.
- Савельева Н.В., Дудник Е.Э., Лутова Л.А. Модификация методов агробактериальной трансформации *in vitro* и *in vivo* для получения трансгенных растений моркови и гороха // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2005. Т. 1. № 1. С. 37–46.
- Albrecht C., Geurts R., Lapeyrie F. et al. Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12a* // Plant J. 1998. V. 15. P. 605–614.
- Ben A.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E.D. et al. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation // Plant J. 2003. V. 34. P. 1–12.
- Bowman J., Yuval E. Formation and maintenance of the shoot apical meristem // Trends in Plant Science. 2000. Vol. 5. № 3. P. 110–115.
- Brewin N.J. Development of the legume root nodule // Annu. Rev. Cell Biol. 1991. V. 7. P. 1–226.
- Bright L.J., Liang Y., Mitchell D.M. et al. The *LATD* gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 521–532.
- Chaubaud M., Boisson-Dernier A., Zhang J. et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated root transformation // The *Medicago truncatula* handbook. Mathesius U, Journet EP, Sumner LW (eds). ISBN 0-9754303-1-9. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>
- Charron D., Pingret J.L., Chaubaud M. et al. Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium nodulation* factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca^{2+} spiking and specific *ENOD* gene expression // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 3582–3593.
- Chen S.-K., Kurdyukov S., Kereszt A. et al. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula* // Planta. 2009. V. 230. № 4. P. 827–840.
- Crespi M., Gálvez S. Molecular mechanisms in root nodule development // J. Plant Growth Regul. 2000. V. 19. P. 155–166.
- de Ruijter N.C.A., Bisseling T., Emons A.M.C. *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes // Mol. Plant Microbe Interact. 1999. V. 12. P. 829–832.
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors // Science. 1992. V. 256. P. 998–1000.
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals // Cell. 1996. V. 85. P. 673–681.
- Engstrom E.M., Ehrhardt D.W., Mitra R.M. et al. Pharmacological analysis of Nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*: evidence for the requirement of type IIA calcium pumps and phosphoinositide signaling // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 1390–1401.
- Fang Y., Hirsch A.M. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa // Plant Physiol. 1998. V. 116. I. 1. P. 53–68.
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A. et al. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. // Planta. 1999. V. 209. P. 207–212.
- Ferguson B.J., Reid J.B. Cochleata: Getting to the root of legume nodules // Plant and Cell Physiology. 2005. V. 46. № 9. P. 1583–1589.
- Ferraioli S., Taté R., Rogato A. et al. Development of ectopic roots from abortive nodule primordia // Mol. Plant Microbe Interact. 2004. V. 10. P. 1043–1050.
- Gonzali S., Novi G., Loreti E. et al. A turanose-insensitive mutant suggests a role for *WOX5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2005. V. 44. P. 633–645.
- Grunewald W., Van Noorden G., Van Isterdael G. et al. Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2553–2562.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B. et al. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* // Development. 2004. V. 131. P. 657–668.

- Harris J.M., Wais R., Long S.R. Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus* // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. V. 16. P. 335–341.
- Hirsch A.M., Bhuvaneswari T.V., Torrey J.G. et al. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86(4). P. 1244–1248.
- Horvath B., Heidstra R., Lados M. et al. Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection related early nodulin gene expression in pea root hairs // Plant J. 1993. V. 4. P. 727–733.
- Huo X., Schnabel E., Hughes K. et al. RNAi phenotypes and the localization of a protein:GUS fusion imply a role for *Medicago truncatula* PIN genes in nodulation // J. Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 156–165.
- Imin N., Nizamidin M., Wu T. et al. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula* // J. Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 439–451.
- Imaizumi-Anraku H., Kouchi H., Syono K. et al. Analysis of ENOD40 expression in *alb1*, a symbiotic mutant of *Lotus japonicus* that forms empty nodules with incompletely developed nodule vascular bundles // Mol. Gen. Genet. 2000. V. 264. P. 402–410.
- Jensen H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I., Proc. Int. Soc. NSW, 1942; 66:68–108.
- Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A. et al. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem // Plant J. 2003. V. 35. P. 429–441.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I. et al. Cytokinin act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3889–3900.
- Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. 1990. V. 9. № 6. P. 676–679.
- Leibfried A., To J.P., Busch W. et al. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators // Nature. 2005. V. 438. P. 1172–1175.
- Limpens E., Ramos J., Franken C. et al. RNA interference in *Agrobacterium* rhizogenes-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula* // Journal of Experimental Botany. 2004. V. 55, N. 399. P. 983–992.
- Limpens E., Franken C., Smit P. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // Science. 2003. V. 302. P. 630–633.
- Lohar D.P., Sharopova N., Endre G. et al. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 221–234.
- Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spalink H.P. et al. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides // Plant J. 1998. V. 14. P. 23–34.
- Mathesius U., Weinman J.J., Rolfe B.J. et al. Rhizobia can induce nodules in white clover by “hijacking” mature cortical cells activated during lateral root development // Mol. Plant-Microbe Interact. 2000. V. 13. P. 170–182.
- Mayer K., Schoof H., Haecker A. et al. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem // Cell. 1998. V. 95. P. 805–815.
- Murray J.D., Karas B.J., Sato S. et al. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis // Science. 2007. V. 315(5808). P. 101–104.
- Oldroyd G.E.D., Downie A.J. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 519–546.
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B. et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // Nature. 2003. V. 425. P. 569–570.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S. et al. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers // Nature. 2007. V. 446. P. 811–814.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A. et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes // Cell. 2000. V. 100. P. 635–644.
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S. et al. Long-distance signalling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase // Science. 2003. V. 299. № 5603. P. 109–112.
- Stahl Y., Simon R. Is the *Arabidopsis* root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4? // Plant Signal Behav. 2009. V. 4. № 7. P. 634–635.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.
- Tirichine L., Sandal N., Madsen L.H. et al. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis // Science. 2007. V. 315(5808), P. 104–107.
- Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B. et al. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*–pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // Annals of Botany. 2002. V. 89. P. 357–366.
- van Brussel A.A.N., Planque K., Quispel A. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms // Journal of General Microbiology. 1977. V. 101. P. 51–56.
- van de Sande K., Pawlowski K., Czaja I. et al. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume // Science. 1996. V. 273. N. 5273. P. 370–373.
- van Noorden G.E., Kerim T., Goffard N. et al. Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti* // Plant Physiol. 2007. V. 144. P. 1115–1131.
- Wan X., Hontelez J., Lillo A. *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. I. 8. P. 2033–2041.
- Wan X. Analyses of nodule meristem persistence and ENOD40 functioning in *Medicago truncatula* nodule formation. Thesis Wageningen University, The Netherlands. 2007.
- Zhu H., Choi H.-K., Cook D.R. et al. Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics // Plant Physiology. 2005. V. 137. P. 1189–1196.

Features of the Expression of a Meristem-Specific *WOX5* Gene during Nodule Organogenesis in Legumes

M. A. Osipova^b, E. A. Dolgikh^a, and L. A. Lutova^b

^a All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, 196608 Russia
e-mail: mary_osipova@mail.ru

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

Abstract—In recent years, the role of *WOX* genes encoding homeodomain transcription factors in the development of the apical meristem of shoots and roots has been actively investigated. However, the role of *WOX* genes in the control of the cell proliferation in other meristem types is poorly studied. In our work, we have studied the role of the *WOX5* gene in the development of the meristem in nitrogen-fixing nodules developing on the roots of legumes in a symbiosis with rhizobia. We have shown that the *WOX5* gene is involved in the development of the nodule meristem in legumes, have quantitatively evaluated the gene's expression at different nodule formation stages, and have studied the localization of its expression using a construction containing the *WOX5* promoter conjugated with a reporter gene. The role of the *WOX5* transcription factor in the nodule organogenesis and its possible interaction with the hormonal system in the course of the nodule development has been discussed.

Keywords: nodule development, legume–rhizobium symbiosis, meristem-specific genes, *WOX*

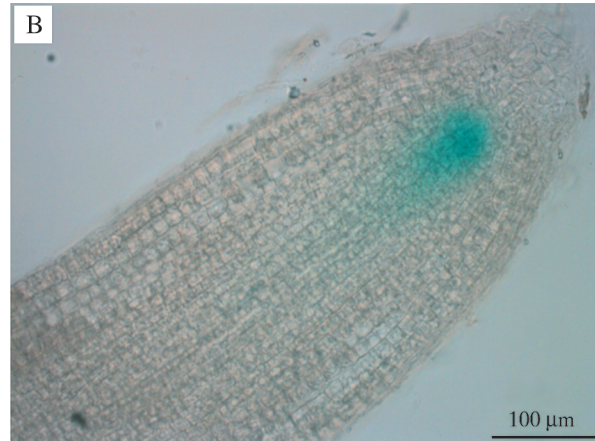
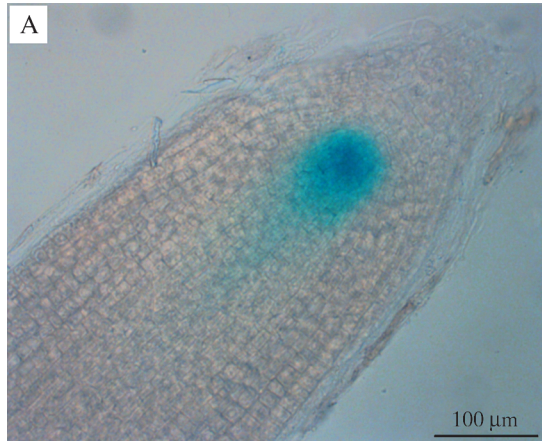


Рисунок 6. Локальный анализ экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) в кончике корня гороха (A) и люцерны диплоидной (B) (пояснения в тексте)

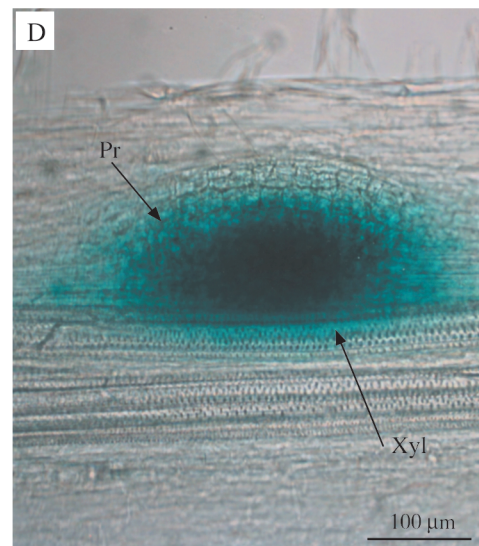
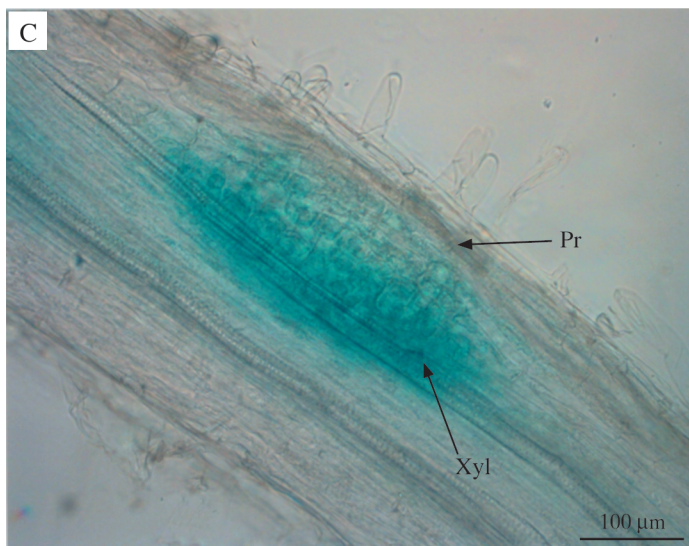
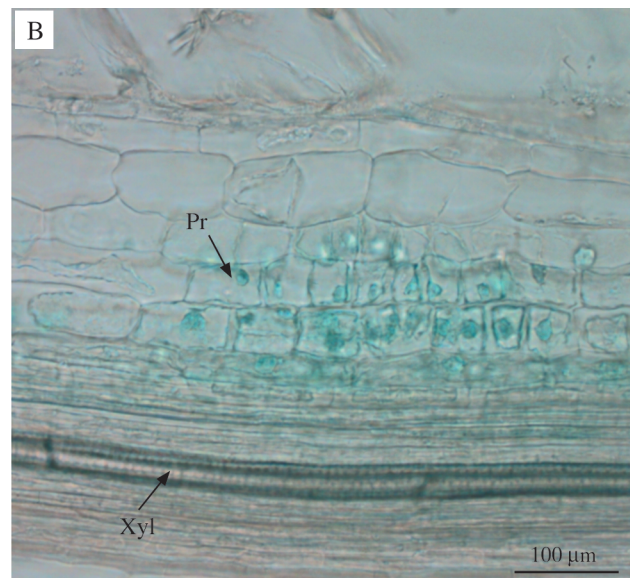
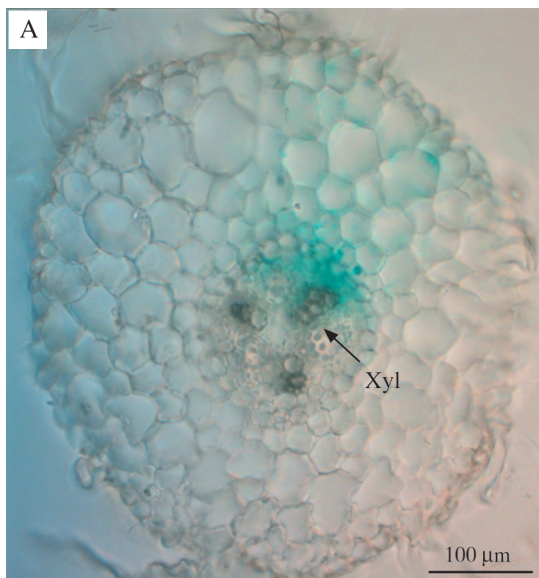


Рисунок 7. Локальный анализ экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) в примордии клубенька гороха (B, D) и люцерны диплоидной (A, C) (пояснения в тексте)



УДК 581.19:577.13

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ РОСТА КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2011 г. Г. Ф. Антонова, Т. В. Железниченко, В. В. Стасова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,

660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: institute_forest@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 23.06.09 г.

Окончательный вариант 22.03.10 г.

Содержание и состав фракций спирторастворимых фенолкарбонных кислот (ФК) изучали в связи с ростом клеток ксилемы в ходе образования годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной. Клетки камбиальной зоны, двух этапов роста растяжением и начала вторичного утолщения (до лигнификации) в период формирования ранней ксилемы последовательно выделялись из отрезков ствола 25-летних деревьев сосны при постоянном анатомическом и гистохимическом контроле. Содержание свободных и связанных форм, а в их составе простых и сложных эфиров ФК, извлеченных из тканей 80%-ным этанолом, рассчитывали на сухой вес и на клетку. Содержание, соотношение фракций и состав кислот значительно меняются от камбиальной зоны до начала вторичного утолщения трахеид, и характер варьирования зависит от метода расчета. В расчете на клетку количество свободных и связанных ФК, а в их составе сложных и, особенно, простых эфиров, увеличивалось на первом этапе роста растяжением, снижалось на втором и вновь возрастало в начале отложения вторичной стенки. В зависимости от стадии развития клеток пул связанных кислот превышал пул свободных в 2–5 раз. В составе свободных оксикоричных кислот доминировали синаповая и феруловая кислоты. Состав и содержание оксикоричных кислот в простых и сложных эфирах тоже зависели от этапа развития клеток. В камбии основными агликонами в простых эфирах были п-кумаровая и синаповая, на других стадиях развития — синаповая и кофейная. Сложные эфиры камбия включали главным образом п-кумаровую кислоту, а других этапах развития — синаповую и феруловую кислоты. На первых стадиях роста бензойная кислота входила в состав главным образом в сложные эфиры. Пул этих эфиров от первой фазы роста к началу утолщения стенок уменьшался. Соответственно повышался уровень свободной бензойной кислоты.

Ключевые слова: фенолкарбонные кислоты, фракции, состав, камбиальная зона, рост растяжением, вторичное утолщение, ранняя ксилема, *Pinus sylvestris*.

В росте и развитии растений важную роль играют такие продукты вторичного метаболизма, как фенолкарбонные кислоты (ФК) и, в частности, оксисинаповые и оксикоричные, а также их производные (Запрометов, 1993). В растениях оксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, феруловая, синаповая) обладают разными физиологическими функциями. Опосредуя действие таких ростовых веществ, как цитокинин, производные ФК контролируют деление и расширение клеток (Teutonico et al., 1991). Благодаря природным антиоксидантным свойствам, эфиры оксикоричных кислот, в частности, хлорогеновая кислота, могут защищать липиды от перекисного окисления *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997). По некоторым данным оксикоричные кислоты обладают антимутагенными свойствами (Ferguson et al., 2003) и могут влиять на апоптоз клеток (Tamagnon et al., 1998; Ванюшин и др., 2004; Дубравина и др., 2005). Поскольку ФК в

свободной форме потенциально токсичны для клетки, они находятся в растениях главным образом в связанной форме и конъюгированы с сахарами или органическими кислотами.

Помимо участия в синтезе лигнина, фенилпропановые единицы которого являются производными оксикоричных кислот, ФК используются в росте клеток и создании структуры первичных клеточных стенок. Димеризованные оксикоричные кислоты, такие как диферуловая кислота, могут поперечно связывать как сами пектины, так и пектины с другими нецеллюлозными полисахаридами и протеогликанами (Fry, 1993, 2004; Waldron et al., 1997; Антонова, 1999).

Тесно связанные с компонентами клеточных стенок ФК выделяются из ткани только растворами щелочи или кислоты, разрушающими эти связи, и такой метод их выделения используется в большин-

стве работ, посвященных изучению ФК в растениях, например, в двудольных (Lozovaya et al., 1999). Несвязанные с компонентами стенок бензойные и оксикоричные кислоты и их производные извлекаются такими органическими растворителями как спирты или их водные растворы.

Уровень таких спирторастворимых фенолов зависит от степени дифференциации тканей, как это было обнаружено в каллусных культурах чайного растения (Загоскина и др., 1994) и при развитии зерен ржи (Weidner et al., 2000). Было показано, что общих фенольных соединений, а в их составе ФК в расчете на сухой вес, больше в начале развития, чем на конечных стадиях созревания (Weidner et al., 2000).

ФК и их роль в процессе роста изучалась в основном на однодольных и двудольных растениях. Значительно меньше исследований было посвящено ФК в связи с ростом древесных растений, в том числе хвойных. Исследуя образование ранних и поздних трахеид в стволах лиственницы сибирской, мы нашли, что содержание свободных и связанных ФК, а также их состав, зависит как от стадии дифференциации клеток, так и типа (ранней или поздней) ксилемы, которая формируется в данный период вегетации (Чаплыгина, 2007). Изменение фракционного состава и содержания ФК в ходе роста трахеид лиственницы коррелировало с содержанием и соотношением аскорбиновой (АК) и дегидроаскорбиновой (ДАК) кислот (Антонова и др., 2005). В тканях растений от соотношения этих кислот, которое определяет их окислительно-восстановительный потенциал, зависит процесс сшивания полисахаридов (Zarra et al., 1999) и полимеризация монолигнолов – предшественников лигнина (Takahama, 1993, 1994). Считают, что аскорбиновая кислота регулирует количество коричных кислот доступных действию пероксидаз, присутствующих в стенке, и пока аскорбат доступен для перекиси водорода, процессы сшивки и полимеризации в стенке тормозятся (Takahama, Oniki, 1997). Например, зоне активного роста корней огурца соответствует повышенное содержание АК и определенное соотношение АК/ДАК, которое в апопласте и симпласте изменяется вдоль оси роста корня (Córdoba-Pedregosa et al., 2003; Ros-Barceló et al. 2006). На гипокотиле сосны было показано, что высокое содержание АК благоприятствует их росту, но с уменьшением ее количества вдоль оси рост гипокотилей тормозится (Sánchez et al., 1997; Zarra et al., 1999). Предполагают, что ограничение роста клеток гипокотилей происходит в результате образования диферуловых мостиков между полисахаридами клеточной стенки под действием пероксидаз, присутствующих в стенке.

Мы изучали содержание и соотношение аскорбата и дегидроаскорбата в растущих клетках ксилемы при образовании годичного слоя в стволах дере-

вьев сосны обыкновенной (Антонова и др., 2009). Было найдено, что каждая из стадий дифференциации клеток характеризуется определенным уровнем АК и ДАК. Такие изменения в метаболизме должны влиять на содержание и фракционный состав ФК, а это, в свою очередь, на ростовые процессы. Поэтому следующим этапом исследования явилось изучение содержания и состава свободных и связанных форм ФК.

В работе изучались спирторастворимые ФК, их фракционный состав и содержание оксикоричных кислот на этапах образования и роста ранних трахеид при формировании годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили слои клеток развивающегося годичного слоя ксилемы, полученные в начале июня из стволов двух интактных 20–25 летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), растущих в посадках Погорельской экспериментальной базы Института.

Стволы распиливали по мутовкам, удаляли кору, непроводящую и проводящую флоэму, и методом микрорасщепления с помощью скальпеля собирали слои клеток, постоянно контролируя гистохимически стадию их развития, как было сделано ранее (Антонова и др., 2009). В качестве красителей применяли крезил-виолет, позволяющий, благодаря метахромазии, визуально определять принадлежность клеток к фазам дифференциации (Антонова, Шебеко, 1981), а также реактив Визнера (флороглюцин – соляная кислота) для определения начала лигнификации.

Были получены клетки камбиальной зоны (Кам), зоны роста растяжением и начала вторичного утолщения. В начале июня, когда идет образование ранней ксилемы, зона роста растяжением содержала, как обычно в это время сезона, достаточное большое (до 10–14) число клеток, что позволило разделить ее на две подзоны. Одна из них прилежала к камбиальной зоне, т.е. клетки ксилемы находились в первой фазе роста радиального диаметра (Рост1), а вторая часть прилежала к зоне отложения веществ вторичной стенки и находились соответственно во второй фазе (Рост2). В тот же период развития в формирующемся годичном слое присутствовали клетки первого этапа вторичного утолщения, в которых отмечалось отложение вторичной стенки, но лигнификация не наблюдалась (D1). Начало роста клеток растяжением отмечали по видимому увеличению радиальных размеров клеток, начало отложения веществ вторичных стенок – по появлению окаймления пор, что характерно для начала отложения вторичной стенки трахеид (Murmanis, Sachs, 1969).

Полученный материал по мере отбора погружали в этанол (конечная концентрация спирта была не более 80%), взвешивали и хранили в холодильнике до анализа. Вес полученных образцов определяли с учетом веса 96% спирта, использованного для фиксации. Одновременно отбирали навески ткани на мацерацию и для определения влажности ткани. Мацерацию тканей проводили по методикам, примененным в работе (Москалева, 1958; Одинцов и др., 1967). Число клеток в мацерате подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя.

Анализ материала

Суспензию, полученную при фиксации материала, фильтровали, твердые остатки растирали в ступке с жидким азотом и экстрагировали 80% водным этанолом при комнатной температуре с периодическим помешиванием и сменой растворителя через 12 часов до отрицательной реакции на углеводы (Dubois et al., 1956). Фильтрат и экстракт объединяли и общий объем раствора замеряли.

Аликвоту раствора (20–50 мл, в зависимости от веса исходного материала) выпаривали до сухого состояния, сухие вещества обрабатывали водой и хлороформом. Водный слой после хлороформа использовали для определения углеводов, урановых кислот, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот и общего содержания фенолов. Такой комплексный подход дает возможность сравнивать динамику исходных метаболитов и фенольных соединений, а также определять функциональные зависимости между ними.

Аликвоту водного раствора после добавления соляной кислоты до pH 2.5–3 трижды обрабатывали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки выпаривали на воздухе досуха, остаток растворяли в 3 мл ацетона и в растворе определяли свободные ФК.

Водный слой после отделения эфира использовали для определения связанных форм ФК. Сложные эфиры определяли после щелочного гидролиза. Сложноэфирные связи устойчивы к воздействию кислот, но легко разрушаются щелочью даже при комнатной температуре (Enoki et al., 1983). К аликвоте водного слоя добавляли равный объем 4н гидроксида натрия. Раствор выдерживали при комнатной в температуре в течение 2 часов, после чего осторожно добавляли 18% HCl до pH 2.0–2.5. Подкисленный раствор обрабатывали трехкратно эфиром, объем водного слоя измеряли, а эфирный слой выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона и раствор использовали для определения сложных эфиров ФК.

После отделения эфирной вытяжки к водному слою добавляли 18% HCl до конечной концентрации 2 н, и раствор выдерживали при температуре 100°C в течение 1 часа. К гидролизату осторожно добавляли 4 н NaOH до pH 2.0–2.5 и затем три раза

обрабатывали эфиром. Эфирные вытяжки выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона и в аликвоте определяли содержание простых эфиров ФК.

Содержание свободных и сложных форм ФК определяли с реактивом Фолин-Дениса по способу, позволяющему определять фенолы в присутствии белка (Jennings, 1981). Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 760$ нм, используя кювету с толщиной слоя 1 см. Калибровка проводилась по тирозину (0–100 мкг/мл).

Определение состава ФК

Аликвоту ацетоновых вытяжек высушивали, сухой остаток растворяли в 0.1 мл ацетона. Состав свободных и связанных ФК анализировали методом ТСХ, используя в качестве носителя пластинки "Silufol UV-254". После нанесения пятен (объем пятен от 0.01–0.02 мл) пластинки обрабатывали паром, подсушивали на воздухе и помещали в камеру со смесью бензол–уксусная кислота (9 : 1). Кислоты идентифицировали по Rf метчиков и УФ-спектрам индивидуальных пятен. Коричную и бензойную кислоты после удаления с подложки экстрагировали 3 мл этанола. Затем хроматограммы опрыскивали смесью 0.5% раствора п-нитроанилина в 2 н HCl, 5% NaNO₃ и 20% ацетата натрия в воде (5 : 5 : 20, по объему). Пятна кислот соскребали и экстрагировали 3 мл этанола. Поглощение раствора определяли при длине волны, наиболее характерной для каждой кислоты. Содержание кислоты рассчитывали по уравнению, найденному по калибровочной кривой, построенной для соответствующего метчика после хроматографирования его в указанных выше условиях.

Все операции, начиная с обработки спиртовых экстрактов, проводили в двукратной повторности, аналитическое определение веществ – не менее чем в трехкратной повторности. Все результаты анализов рассчитывали на сухую массу ткани и на клетку. Статистическую обработку результатов проводили по методу параметрического сравнения средних. На рисунках в барах показана относительная величина погрешности.

Определение состава кислот проводили в 5–7 кратной повторности при постоянном соблюдении объемов растворов. На рисунках содержание выражено как мол/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание спирторастворимых фенольных соединений (ФС) на этапах развития трахеид в формирующемся слое ксилемы в начале июня, рассчитанное на сухой вес и на клетку, представлено на рис. 1. Как показывают данные, изменение содержания ФС по этапам развития зависит от метода расчета данных. Так минимальное содержание ФС

отмечается на втором этапе роста растяжением при расчете на сухую навеску и в камбиальной зоне при расчете на клетку. С переходом ксилемных производных камбия к росту растяжением содержание ФК в клетках возрастает более чем в три раза, но уже во второй фазе роста значительно снижается. С началом образования вторичной клеточной стенки их количество снова увеличивается.

Уровень свободных ФК тоже связан со стадией развития клеток, и его изменение подобно изменению ФС (рис. 2). Но в зоне камбия содержание свободных ФК при обоих методах расчета было наименьшим по сравнению с другими этапами развития клеток, а в D1 их уровень оказался наиболее высоким. В фазу роста содержание свободных форм ФК снижается от первой стадии ко второй.

Содержание простых и сложных эфиров ФК тоже изменяется по этапам развития (рис. 3). При этом простых эфиров ФК в клетках было в два-пять (от Кам к D1) раз больше, чем сложных. В то же время общие тенденции варьирования ФК с двумя типами связи сохраняются. После зоны камбия количество эфиров ФК с кислотолабильными и, в меньшей степени, щелочелабильными связями в первой фазе роста растяжением увеличивается, а во второй – уменьшается. В начале утолщения вторичной стенки перед лигнификацией содержание простых эфиров кислот резко повышается.

Индивидуальный состав свободных и связанных ФК тоже изменяется по стадиям роста ранних трахеид (рис. 4). Из свободных оксикоричных кислот п-кумаровая кислота обнаруживалась только в Кам, тогда как кофейная, феруловая и синаповая кислоты помимо Кам присутствовали на всех этапах развития клеток (рис. 4а). В начале роста их содержание увеличивалось, но далее изменялось дифференцированно. Уровень кофейной кислоты, которая является предшественником феруловой, был примерно постоянным в ходе роста и повышался в D1. Пул феруловой увеличивался после Кам вдвое, повышался в Рост2 и незначительно в D1. Пул синаповой на первой ступени роста возрастал по сравнению с Кам в 2.5 раза, практически не менялся на втором этапе и почти в два раза повышался перед лигнификацией. Очевидно, что активность гидроксилаз и метил-трансфераз, участвующих в гидроксилировании и метилировании оксикоричных кислот (Witten, Sideroff, 1995), тоже дифференцированно меняется в процессе роста клеток и в начале отложения их вторичных стенок.

На хроматограммах было отмечено также пятно кислоты, располагавшееся рядом с феруловой, дающее голубое свечение в УФ свете и красно-коричневое окрашивание с п-нитроанилином. УФ спектр кислоты был аналогичен спектру феруловой, что позволило отнести его к цис-форме этой кислоты. Ее присутствие было отмечено в Кам и в D1, однако полная идентификация не была проведена.

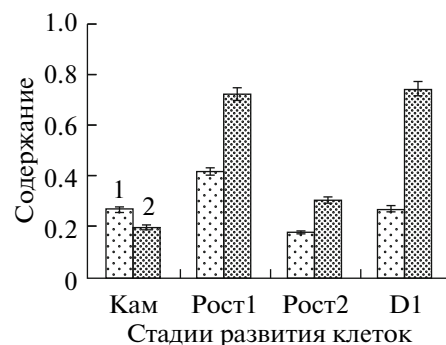


Рис. 1. Содержание ФС в клетках камбиальной зоны (Кам), двух этапов зоны роста растяжением (Рост1 и Рост2) и начального этапа развития вторичной стенки (D1) при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня: 1 – % сухой массы; 2 – мг × 10⁻⁶ на клетку.

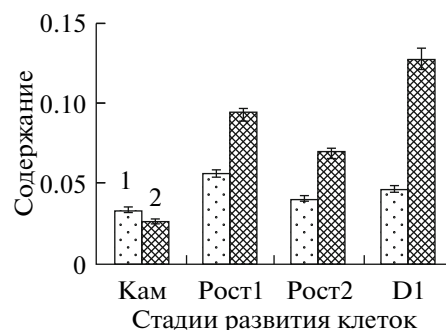


Рис. 2. Содержание свободных ФК в клетках камбиальной зоны (Кам), двух этапов зоны роста растяжением (Рост1 и Рост2) и начального этапа развития вторичной стенки (D1) при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня: 1 – % сухой массы; 2 – мг × 10⁻⁶ на клетку.

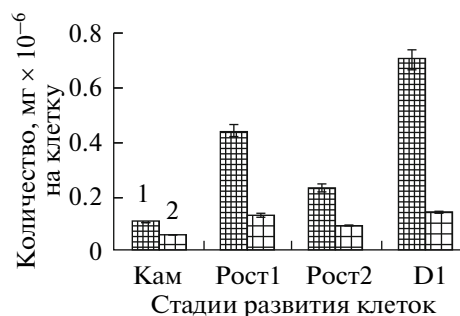


Рис. 3. Изменение количества простых (1) и сложных (2) эфиров ФК на стадиях дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

Коричная кислота, как предшественник оксикоричных кислот, в свободной форме в Кам отсутствовала, от Рост1 до Рост2 увеличивалась в 2 раза и снижалась незначительно в D1. Из бензойных кис-

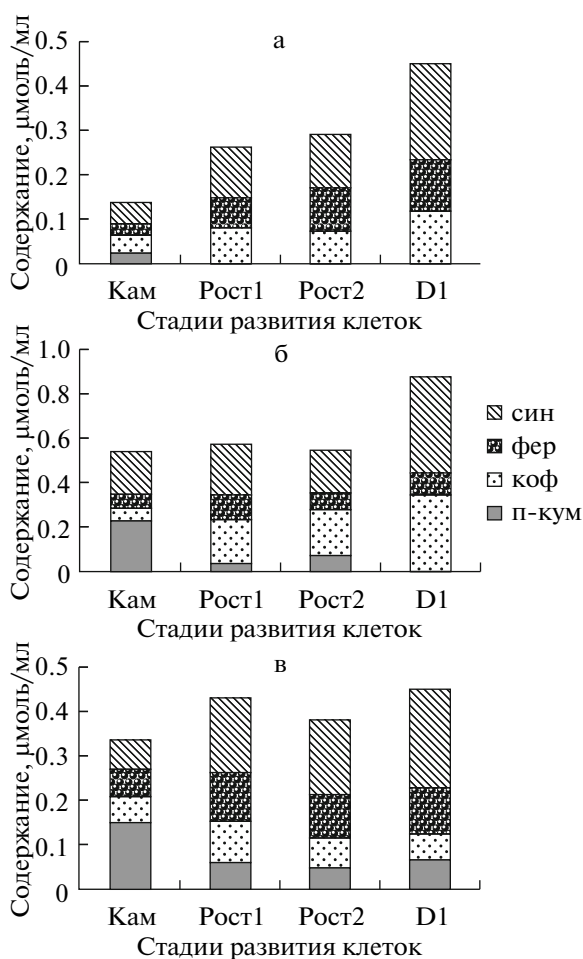


Рис. 4. Изменение содержания и состава свободных (а), простых (б) и сложных (в) эфиров оксикоричных кислот (син – синаповая, фер – феруловая, коф – кофейная, п-кум – п-кумаровая) по стадиям дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

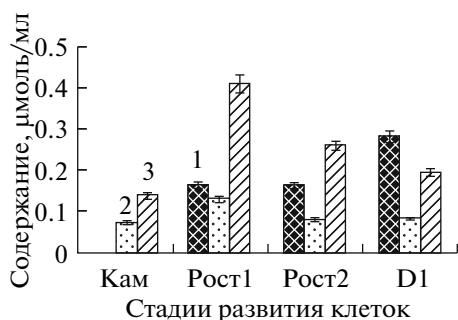


Рис. 5. Изменение содержания свободной бензойной кислоты (1) и ее гликозидов (2) и сложных эфиров (3) в клетках ксилемы по стадиям дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

лот в свободной форме в Рост1 присутствовали п-оксибензойная (следовые количества) и бензойная. Количество последней в зоне роста было постоянным, но увеличивалось в D1 в более чем в два раза по сравнению с Рост2 (рис. 5). Между коричневой и бензойной кислотами располагались три пятна, дающие голубое свечение в УФ и ярко-малиновые или сине-фиолетовые пятна с п-нитроанилином в 2н HCl. По поведению в нейтральной и кислой средах эти соединения были условно отнесены к антоцианинам, ацилированным оксикоричными кислотами.

Состав связанных оксикоричных кислот и соотношение форм тоже менялись в ходе развития клеток (рис. 4б, в). Агликонами в простых эфирах (гликозидах) в Кам были в уменьшающемся порядке синаповая, п-кумаровая, феруловая и кофейная кислоты (рис. 4б). На первом этапе роста по сравнению с Кам пул гликозидов, содержащих п-кумаровую кислоту, падал более чем в шесть раз, повышаясь, однако, на второй ступени роста. Гликозиды кофейной кислоты, увеличиваясь после Кам, оставались на одном уровне в период роста клеток и снова повышались к D1. Пул гликозилированных производных феруловой вдвое повышался в Рост1, снижался в Рост2, увеличиваясь затем в D1. Если рассматривать пятно выше феруловой как изо-феруловую кислоту, можно отметить, что ее содержание, увеличиваясь от Кам к Рост1, снижается незначительно в Рост2 и снова повышается в D1. Но в D1 феруловой, даже с учетом изо-формы феруловой, было в два раза меньше, чем синаповой. Простые эфиры с синаповой кислотой, слегка увеличиваясь после Кам, в период роста были практически на одном уровне и резко возрастали перед лигнификацией. В Рост2 и D1 присутствовали также эфиры коричной и ванилиновой кислоты.

В составе сложных (щелочеллабильных) эфиров в Кам основным агликоном тоже была п-кумаровая кислота. Ее пул уменьшался в процессе роста, тогда как пул эфиров, в составе которых входили кофейная и феруловая кислоты, повышался на первой стадии (рис. 4в) и падал на второй. К D1 пул кофейной кислоты практически не изменялся, в то время как для п-кумаровой и феруловой наблюдалась тенденция к увеличению. Пул эфиров с синаповой кислотой в период роста был самым значительным и особенно возрастал в D1. Кроме того, в Рост2 и D1 появлялась изо-феруловая кислота. На всех стадиях развития в составе сложных эфиров обнаруживалась коричная кислота – предшественник п-кумаровой. Сиреневая, как результат β-окисления синаповой, наблюдалась только в камбии.

Бензойная кислота в свободной форме, как упоминалось выше, отсутствовала в Кам и в основном входила в состав сложных эфиров, уровень которых уменьшался от Рост1 к D1 (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные показывают изменение содержания и состава фракций спирторастворимых ФК по этапам дифференциации клеток ксилемы сосны.

Изменения в составе фракций ФК при развитии первичной стенки трахеид можно сопоставить с динамикой роста клеток в зоне. Как было установлено, рост первичных стенок трахеид сосны обыкновенной наиболее интенсивно происходит на первых этапах, а затем скорость роста снижается (Антонова, Шебеко, 1985; Антонова, 1999). Такая динамика соответствует варьированию общих ФС (рис. 1), свободных и связанных форм ФК в зоне (рис. 2, 3). Относительное содержание свободных ФК в составе ФС клеток камбиальной зоны и первой фазы роста составляло 12.5 и 12.8% соответственно. Это означает, что пул свободных ФК в начале развития трахеид поддерживается на определенном уровне, поскольку свободные ФК являются потенциальными ядами для клетки. Хотя во второй фазе роста абсолютное количество свободных ФК уменьшается, их содержание в составе ФС увеличивается до 22.5%, т.е. идет относительное накопление фракции свободных ФК. В то же время на фоне снижения общего количества свободных форм ФК в Рост2 (рис. 2) суммарное содержание оксикоричных кислот в них возрастает, что, по-видимому, вызвано изменением соотношения оксикоричных и бензойных кислот. Так отношение суммы оксикоричных кислот и бензойной кислоты в начале роста составляет 2.9, а во второй фазе роста уже 3.4. Очевидно, что в ходе роста растяжением трахеид в составе ФС начинает превалировать свободные ФК, а в их составе – оксикоричные кислоты.

Со снижением интенсивности роста сопряжено не только падение общего содержания свободных ФК. Одновременно падает уровень их простых и сложных эфиров (рис. 3). Изменения на втором этапе роста свободных и связанных форм, которые служат транспортными формами ФК в апопласт, указывает, с одной стороны, на использование связанных форм в процессе формирования структуры первичных стенок, с другой – на торможение синтеза их эфиров. Об этом дополнительно свидетельствует увеличение свободных оксикоричных кислот за счет феруловой и синаповой во второй фазе роста (рис. 4а).

Пул простых эфиров, доминирующих в связанных ФК, повышался от Кам к Рост1 на 75.5%, а пул сложных эфиров – на 56%. В Рост2 количество простых и сложных эфиров уменьшалось неравномерно. Пул простых снизился на 47%, а сложных – только на 26%. Это означает, что при создании структуры первичных стенок в основном используются ФК, входящие в состав простых эфиров. В свою очередь, это свидетельствует о преимущественном, в сравнении с эстеразами, постепенном

увеличении активности гидролаз во второй фазе роста.

Вторичное утолщение является следующей стадией дифференциации трахеид, а ее начало, когда лигнификация еще не началась, – важным подготовительным этапом к этому процессу. В D1 увеличивается содержание свободных и связанных форм ФК. Пул простых эфиров после Рост2 увеличивался в 1.7 раз, тогда как сложных эфиров – в 1.4 раза. Несмотря на колебание содержания фракций ФК, отношение кислотолабильных форм к щелочелабильным постепенно увеличивается от Кам к D1 с 0.55 до 0.2, свидетельствуя о преимущественном образовании простых эфиров перед лигнификацией. Очевидно, что изменения разных фракций ФК в зоне роста растяжением связаны с динамикой роста первичных стенок трахеид, а в начале вторичного утолщения – с подготовкой к процессу лигнификации. Таким образом, клетка регулирует образование гликозидов и сложных эфиров кислот и их использование.

Не рассматривая детально метаболизацию всех оксикоричных кислот, следует рассмотреть изменчивость феруловой и синаповой кислот, учитывая ингибирующее действие первой на рост, а также ее роль в связывании полисахаридов клеточной стенки (Fry, 1986; Waldron et al., 1997) и в биосинтезе гваяцилпропановых единиц лигнина хвойных.

Синаповая кислота в свободной форме была основной из этих двух кислот от Кам и до D1, что указывает на активные процессы гидроксилирования феруловой кислоты и последующего метилирования ее производного, особенно в начале вторичного утолщения. Это совпадает с более низким уровнем феруловой кислоты по сравнению с синаповой. Практически постоянный уровень синаповой в первой и второй фазах роста и повышение уровня феруловой кислоты, начиная со второго этапа роста растяжением, может быть следствием снижения активности гидроксилаз и 5-метил-трансферазы. Перед лигнификацией разница между уровнями кислот особенно усиливается, даже если учесть присутствие изо-феруловой кислоты.

Снижение пулов простых и сложных эфиров феруловой кислоты может быть результатом использования их, после расщепления гидролазами и эстеразами в апопласте, для сшивания гемицеллюлоз клеточной стенки. Как было показано ранее, в первый период роста клеток сосны уровень АК выше, чем во втором (Антонова и др., 2009), т.е. в начале превалируют процессы синтеза и восстановления АК, тогда как во второй фазе роста преобладают окислительные процессы. Это согласуется с положением, что высокое содержание АК тормозит процессы сшивки гемицеллюлоз через диферуловые мостики (Fry, 1993; Waldron et al., 1997), и соответствует повышенному содержанию гликозидов и сложных эфиров феруловой кислоты на первом

этапе роста. Снижение пула АК и отношения АК/ДАК на втором этапе совпадает с падением уровня как гликозидов, так и сложных эфиров феруловой кислоты, что в свою очередь может указывать на расходование ее для создания связей между компонентами первичных стенок.

Согласно Хореману и др. (Horemans et al., 2000) концентрация АК в апопласте по сравнению с симпластом низкая. Но нужно учесть, что пул АК может пополняться прямо в апопласте за счет восстановления монодегидроаскорбатредуктазой монодегидроаскорбиновой кислоты, продукта первой ступени окисления АК (Hossain et al., 1984). Этот фермент был обнаружен в апопласте ячменя и листьях овса (Vanacker et al., 1998). Возможность регенерации аскорбата в апопласте сообщалась (Castillo, Greppin, 1988; Luwe, 1996). Можно предположить, что клетка сама способна регулировать содержание АК на оптимальном уровне с учетом изменения метаболизма, поступления субстратов и активности ферментов на стадиях дифференциации.

Существенное повышение свободных и связанных форм ФК, а в их составе оксикоричных кислот, и главным образом синаповой, с началом вторичного утолщения ясно указывает на преимущественный синтез в симпласте потенциальных предшественников лигнина.

Хотя основными структурными единицами лигнина хвойных являются гваяцилпропановые – производные феруловой кислоты, в нем присутствуют также сирингильные структуры – производные синаповой. По нашим данным лигнин первых стадий лигнификации ранних трахеид сосны, выделенный из того же слоя трахеид, содержит больше сирингильных фенилпропановых единиц, чем лигнин зрелой ранней ксилемы (Антонова и др., 2009), в которой, напротив, больше производных феруловой кислоты. При этом скорость отложения лигнина в ранней ксилеме сосны оказалась особенно низкой на первых стадиях процесса, что может быть вызвано низкой реакционной способностью синаповой кислоты, как предшественника монолигнолов сирингильного типа. Таким образом, наблюдается постепенное изменение направленности окислительных и конденсационных процессов, связанных с особенностями строения предшественников лигнина и их биосинтеза.

Очень большое значение перед лигнификацией может иметь высокий уровень свободной бензойной кислоты. Глас и Данлоп (Glass, Dunlop, 1974), исследуя действия ФК на мембраны, нашли, что феруловая кислота и, особенно, бензойная, деполаризуют мембраны, что влияет на их проницаемость и может благоприятствовать транспорту метаболитов. По нашим данным пул бензойной кислоты почти в два раза увеличивается при переходе клеток к вторичному утолщению. Повышение, очевидно, идет в основном за счет снижения уровня сложных

эфиров (рис. 5). Увеличение свободных бензойной и феруловой кислот в начале вторичного утолщения перед лигнификацией должно обеспечить выход эфиров оксикоричных кислот в апопласт. Кроме того, может усилиться транспорт АК, а это, в свою очередь, будет влиять на лигнификацию, так как перекись водорода будет расходоваться на окисление аскорбата. О возможном влиянии некоторых факторов на транспорт аскорбата указывалось в работе (Fry, 1998).

Появление бензойной кислоты в свободной форме в росте растяжением обусловлено в большей степени β -окислением коричной кислоты, а в начале вторичного утолщения расщеплением ее сложных эфиров. Ванилиновая кислота, отмеченная в составе гликозидов на второй ступени роста и начале утолщения стенок, тоже связана с β -окислением феруловой кислоты через ее КоА-эфиры (Запрометов, 1993), хотя может существовать и другой, неокислительный, механизм образования ванилиновой кислоты (French et al., 1976).

Увеличение уровня кофейной кислоты в свободной и связанной формах и одновременное снижение пула п-кумаровой кислоты становится понятным, если учесть повышенный уровень АК на первом этапе роста. Гидроксилирование п-оксикоричной кислоты осуществляется фенолоксидазой в присутствии аскорбиновой кислоты (Запрометов, 1993).

Таким образом, содержание ФК, соотношение их фракций и состав значительно меняются от камбиальной зоны до начала вторичного утолщения трахеид сосны и характер варьирования зависит от метода расчета (на сухой вес или на клетку). В расчете на клетку количество свободных и связанных ФК, а в их составе сложных и, особенно, простых эфиров, увеличивалось на первом этапе роста растяжением, снижалось на втором и вновь возрастало в начале отложения вторичной стенки. Пул связанных кислот в зависимости от стадии развития клеток превышал пул свободных в 2–5 раз. В составе свободных оксикоричных кислот доминировали синаповая и феруловая кислоты. В простых и сложных эфирах состав и содержание оксикоричных кислот тоже зависели от этапа развития клеток. В простых эфирах основными агликонами в камбии были синаповая и п-кумаровая, на других стадиях развития – синаповая и кофейная. Сложные эфиры камбия включали в основном п-кумаровую кислоту, а других этапов – синаповую и феруловую кислоты. На первых этапах роста бензойная кислота была связана в основном сложноэфирными связями. Пул этих эфиров уменьшался от первой фазы роста к началу утолщения стенок. Соответственно повышался уровень свободной бензойной кислоты.

Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 06-04-49501).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Наука, 1999. 232. 19 с.
- Антонова Г.Ф., Баженов А.В., Вараксина Т.Н., Железниченко Т.В. Отложение лигнина на стадиях развития трахеид ранней и поздней древесины в стволах сосны обыкновенной // Материалы IV Всероссийской научной конференции “Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья”, Барнаул. 2009. Изд. Алтайского гос. ун-та. Барнаул. 2009. Кн. 1. С. 78–79.
- Антонова Г.Ф., Стасова В.В., Вараксина Т.Н. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы и флоэмы в стволе сосны обыкновенной // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 210–219
- Антонова Г.Ф., Чаплыгина И.А., Вараксина Т.Н., Стасова В.В. Аскорбиновая кислота и развитие ксилемы в стволах деревьев лиственницы сибирской // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 97–107.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Формирование ксилемы хвойных. 3. Динамика развития трахеид в зонах дифференциации // Лесоведение. 1985. № 5. С. 71–74.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Использование крезилового прочного фиолетового при изучении образования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.
- Ванюшин Б.Ф., Александрушкина Н.И., Замятина В.А. Фенольные соединения в системе регуляции апоптоза, клеточной дифференцировки, роста и развития растений // Сб. тез. VI Симп. по фенольным соединениям. М., 2004. С. 17–18.
- Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дифференциации тканей тиса ягодного и тиса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 5. С. 755–762.
- Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Фролова Л.В., Азаренкова Н.Д., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень ploидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 762–767.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Москалева В.Е. О формировании трахеид сосны // Тр. Ин-та леса АН СССР. 1958. Т. 37. С. 254–265.
- Одинцов П.П., Каткевич Р.Г., Пендере М.К., Каткевич Ю.Ю. Уроновые кислоты в молодых побегах ели // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1967. № 3. С. 632–639.
- Чаплыгина И.А. Особенности формирования ранних и поздних трахеид при образовании древесины лиственницы сибирской: Автореферат дис. ... кан. биол. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2007. 17 с.
- Castillo F.J., Greppin H. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure // Environ. Exp. Bot. 1998. V. 28. P. 231–238.
- Córdoba-Pedregosa Md.C., Córdoba F., Villalba J.M., González-Reyes J.A. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 697–706.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–355.
- Enoki A., Yaki F., Koshijima T. Synthesis of LCC Model compounds and their chemical and enzymatic stabilities // Holzforschung. 1983. 37. P. 135–141.
- Ferguson L.R., Lim I.F., Pearson A.E., Ralph J., Harris P.J. Bacterial antimutagenesis by hydrocinnamic acids from plant cell walls // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2003. V. 542. № 1–2. P. 49–58.
- French C.J., Vance C.P., Towers G.H.N. Conversion of p-coumaric acid to p-hydroxybenzoic acid by cell free extracts of potato tubers and *Polyporus hispidus* // Phytochemistry. 1976. V.15. № 4. P. 564–566.
- Fry S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: Their structure and possible functions // Planta. 1983. V. 157. P. 111–123.
- Fry S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms // Annu. Rev. Plant Physiol. 1986. V. 37. P. 165–186.
- Fry S.C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals // Biochem. J. 1998. V. 50. P. 931–937.
- Fry S.C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid Residues, intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking // Phytochemistry. 2004. Reviews.V. 3. P. 97–111.
- Glass A.D.M., Dunlop J. Influence of phenolic acids on ion uptake. 4. Depolarization of membrane potential // Plant Physiol. 1974. V. 54. P. 855–858.
- Horemans N., Foyer C.H., Potters G., Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants // Plant Physiol. Biochem. 2000. V. 38. P. 531–540.
- Hossain M.A., Nakano K., Asada K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide // Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. P. 385–395.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes // Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 733–737.
- Jennings A.C. The determination of dihydroxyphenolic compounds in extracts of plant tissues // Analyt. Biochem. 1981. V. 118. P. 396–398.
- Kutsuki Y., Shimada M., Higuchi T. Distribution and roles of p-hydroxycinnamate CoA ligase in lignin biosynthesis // Phytochemistry/ 1982. V. 21. P. 267–271.
- Lam N.B.T., Iiyama R., Stone B.A. Distribution of free and combined phenolic acids in wheat internodes // Phytochemistry. 1990.V. 29. P. 429– 433.
- Lozovaya V.V., Gorshkova T.A., Yablokova E.V., Rumyantseva N.I., Valieva A., Ulanov A., Luwe M. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves, seasonal variations and response to changing ozone concentrations in air // Plant Cell Environ. 1996. V. 19. P. 321–328.
- Murmanis L., Sachs J.B. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobus* L. // Wood Sci. Technol. 1969. V. 3. P. 177–193.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds // Trends Plant Sci. 1997. V. 2. P. 152–159.

- Ros-Barceló A., Gómez-Ros L.V., Ferrer M.A., Hernández J.A. The apoplastic antioxidant enzymic system in the wood-forming tissues of trees // *Trees*. 2006. V. 20. P. 145–156.
- Sánchez M., Quejjeiro E., Revilla G., Zarra I. Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotyls: effect on peroxidase activity associated with cell walls // *Physiol. Plant*. 1997. V. 101. P. 815–820.
- Tamagnon L., Mtrida A., Stacey N., Plaskitt K., Parr A., Chang C.-F., Lynn D., Dow J.M., Roberts K., Martin C. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants // *Plant Cell*. 1998. V. 10. P. 1801–1816.
- Takahama U. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from epicotyls of *Vigna angularis* // *Plant Cell Physiol*. 1993. V. 34. P. 809–817.
- Takahama U. Changes induced by abscisic acid and light in the redox state of ascorbate in the apoplast of epicotyls of *Vigna angularis* // *Plant Cell Physiol*. 1994. V. 35. P. 975–978.
- Takahama U., Oniki T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells // *Physiol. Plant*. 1997. V. 101. P. 845–852.
- Teutonico R.A., Dudley M.W., Orr J.D., Lynn D.G., Binns A.N. Activity and accumulation of cell division—promoting phenolics in tobacco tissue cultures // *Plant Physiol*. 1991. V. 97. P. 288–297.
- Vanaker H., Harbinson J., Ruisch J., Carver W., Foyer C.H. Antioxidant defences of the apoplast // *Protoplasma*. 1998. V. 205. P. 129–140.
- Waldron K.W., Ng A., Parker M.L., Parr A.J. Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture // *J. Sci. Food Agric*. 1997. V. 74. P. 221–228.
- Wallace G., Fry S.C. Phenolic compounds of the plant cell wall // *Int. Rev. Cytol*. 1994. V. 151. P. 229–267.
- Weidner S., Amorowicz R., Karama M., Fraczek E. Changes in Endogenous Phenolic Acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains // *Plant Physiol. Biochem*. 2000. V. 38. № 7–8. P. 595–602.
- Whetten R., Sedoroff R. Lignin biosynthesis // *Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 1001–1013.
- Widholm J.M. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax) // *Phytochemistry*. 1999. V. 50. Issue 3. P. 395–400.
- Wodzicki T.J., Brown C.L. Organization and breakdown of the protoplast during maturation of pine tracheids // *Amer. J. Bot*. 1973. V. 60. P. 631–640.
- Zarra, Sánchez I.M., Quejjeiro E., Peña M.J., Revilla G. The cell wall stiffening mechanism in *Pinus pinaster* Aiton: regulation by apoplastic levels of ascorbate and hydrogen peroxide // *J. Sci. Food Agric*. 1999. V. 79. P. 416–420.

The Changes in Contents and Composition of Phenolic Acids during Cell Xylem Growth in Scots Pine

G. F. Antonova, T. V. Zheleznichenko, V. V. Stasova

Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: institute_forest@ksc.krasn.ru

Abstract—The contents and composition of alcohol soluble phenolic acids were studied during cell xylem growth in the course of wood annual increment formation in the stems of Scots pine. The cells of cambium zone, of two stages of expansion growth and the outset of secondary thickening zone (before lignification) were successively gathered from the stem segments of 25-old pine trees in the period of earlywood xylem formation with constant anatomical and histochemical control. The contents of free and bound forms of phenolic acids, isolated by 80% ethanol from tissues, as well as of their ethers and esters were calculated both per dry weight and per cell. The content and relation of the fractions and the composition of phenolic acid have been found to change significantly from cambium zone to the outset of tracheid secondary thickening. The character of the variations depends on a calculation method. According to the calculation per cell the amount of free and bound phenolic acids and in their composition of esters and especially ethers increased at the first step of expansion growth zone, decreased at the second one and rose again in the outset of secondary wall deposition. In dependence on the stage of cell development the pool of bound phenolic acids exceeded of free acid pool in 2–5 times. Sinapic and ferulic acids dominated in the composition of free hydroxycinnamic acids. The content and composition of hydroxycinnamic acids in ethers and esters depended on cell development phase. In cambium p-coumaric and sinapic acids were principal aglycons in ethers, at other stages these were sinapic and caffeic acids. The esters in cambium zone included essentially p-coumaric acid and at the other stages — sinapic and ferulic acids. At the first phase of growth benzoic acid was connected principally by ester bonds. The pool of these esters decreased from the first phase of growth to the outset of cell wall thickening and in proportion to this the level of free benzoic acid rose.

Keywords: phenolic acids, fractions, composition, cambium zone, extension growth, secondary thickening, early wood xylem, *Pinus sylvestris*

УДК 582.531

ЛАБИЛЬНОСТЬ МОРФОГЕНЕЗА РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ *Ruppia maritima* (Ruppiaceae, Alismatales): ОТ ДВУХ ЛАТЕРАЛЬНЫХ ЦВЕТКОВ К ОДНОМУ ТЕРМИНАЛЬНОМУ

© 2011 г. И. Э. Локк, Д. Д. Соколов, М. В. Ремизова

Кафедра высших растений биологического факультета МГУ, 119991 Москва

E-mail: ingridlock@rambler.ru, sokoloff-v@yandex.ru, remizowa@yahoo.com

Поступила в редакцию 25.02.10

Окончательный вариант получен 16.11.10

Элементарное соцветие *Ruppia* обычно представлено открытым двухцветковым колосом, но изредка цветки конгенитально сростаются друг с другом, образуя единую терминальную цветкоподобную структуру. Данное отклонение от типичного для *Ruppia* хода морфогагенеза репродуктивных структур похоже на таковое у хорошо изученных мутантов модельных объектов генетики развития — *Arabidopsis* и *Antirrhinum*. Изучение *Ruppia* позволяет проследить лабильность морфогагенеза по данному признаку в естественных популяциях. Эти данные важны для понимания эволюционного перехода от открытых к закрытым соцветиям. В этой работе впервые приводятся данные о частоте встречаемости терминальных цветкоподобных структур в природных популяциях *Ruppia maritima* и об особенностях их морфогагенеза, впервые проведено сравнение васкулатуры соцветий со свободными и сростшимися цветками. Показано, что частота встречаемости соцветий со сростшимися цветками сильно варьирует от популяции к популяции. Данные о варьировании числа органов в цветках у растений из разных популяций позволяют предположить, что увеличение размера флоральных примордиев — один из факторов, способствующих их объединению в единый примордий терминальной структуры. Проводящая система соцветий *R. maritima* со сростшимися цветками устроена так же, как проводящая система одного цветка, причем ничто не противоречит гипотезе о терминальном положении этой структуры. В соцветиях *R. maritima* со сростшимися цветками в трансверсальном положении нередко встречаются тычинки с инвертированной полярностью. Возможно, это первый документально зафиксированный случай инверсии относительной полярности тычинок и плодолистиков у покрытосеменных растений.

Ключевые слова: морфогагенез, инверсия полярности, конгенитальное срастание, соцветие, терминальные цветкоподобные структуры, фасциация, цветок, *Ruppia*.

В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании генетических механизмов регуляции морфогагенеза соцветий у модельных представителей покрытосеменных растений. Традиционно при изучении морфологии соцветий большое внимание уделяют наличию или отсутствию терминальных цветков на осях различных порядков. Этот признак лежит в основе описательных классификаций соцветий, которые широко используются ботаниками (Troll, 1964; Weberling, 1989; Кузнецова, 1991; Кузнецова и др., 1992). Два классических объекта экспериментальных исследований генетической регуляции морфогагенеза репродуктивных органов растений — *Arabidopsis* и *Antirrhinum* — в диком типе имеют соцветия без терминальных цветков. Получены мутанты *Arabidopsis* и *Antirrhinum*, которые всегда или при определенных условиях развивают соцветия с терминальными цветками, выявлены и проанализированы со-

ответствующие регуляторные гены (Alvarez et al., 1992; Coen, Nugent, 1994; Bradley et al., 1996, 1997; Liljegren et al., 1999; Ежова, Пенин, 2001; Пенин и др., 2005), а отчасти — их ортологи у некоторых других покрытосеменных (Ordidge et al., 2005). Детальное изучение мутантов показало, что структура, развивающаяся у них на верхушке соцветия, может существенно отличаться по морфологии от латеральных цветков, характерных для данного вида (Пенин и др., 2005). Иногда ее можно интерпретировать как результат полного срастания самых верхних латеральных цветков. Поэтому для обобщения всего разнообразия структур, наблюдаемых у такого рода мутантов, целесообразно использовать более нейтральное понятие — терминальные цветкоподобные структуры (о термине см.: Sokoloff et al., 2006).

Терминальные цветкоподобные структуры выявлены — с большей или меньшей частотой — и при

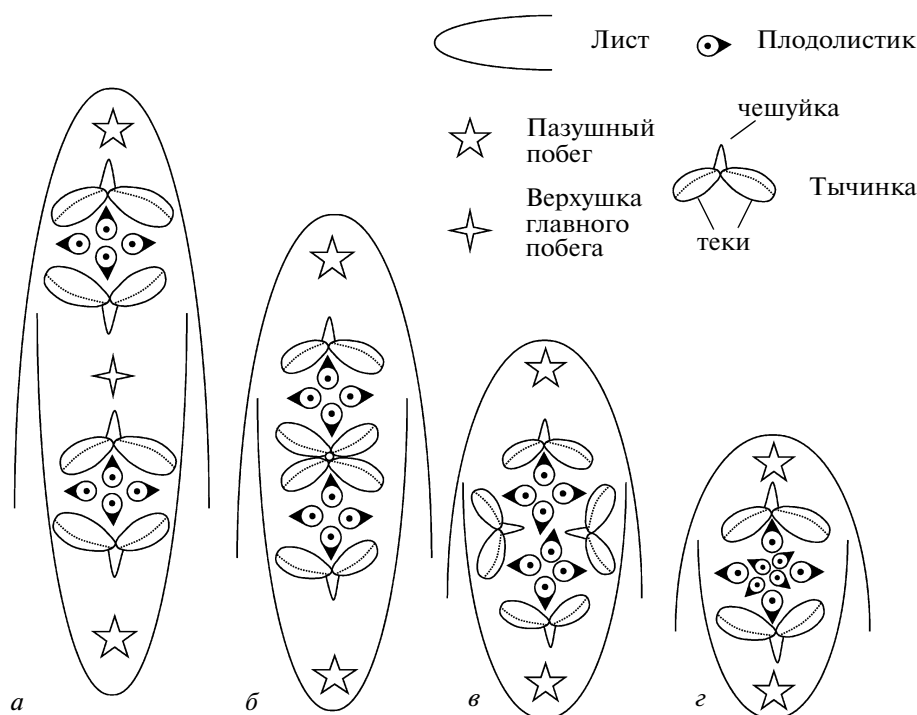


Рис. 1. Диаграммы, иллюстрирующие морфологический ряд, связывающий соцветия *Ruppia maritima* типичного строения и соцветия с терминальной цветкоподобной структурой. Рисунок в графически измененной форме воспроизведен из работы (Sokoloff et al. 2006); положение придатков тычинок на рисунке в указано по новым результатам данного исследования.

изучении естественной изменчивости структуры соцветий в природных популяциях различных однодольных и двудольных растений, которые в норме имеют соцветия без терминального цветка (Buzgo, Endress, 2000; Buzgo et al., 2004; Sokoloff et al., 2006; Lock et al., 2009). Анализ терминальных цветкоподобных структур у растений из природных популяций и их сравнение с таковыми у мутантов модельных организмов важны для понимания общих для покрытосеменных растений механизмов регуляции морфогенеза, а также для выявления возможных направлений эволюционных преобразований соцветий и конкретных сценариев таких преобразований (Sokoloff et al., 2006). Представители семейства Ruppiales, включающего один род (*Ruppia*), на наш взгляд, особенно перспективны как объект для исследований в данной области. У них отмечено не просто формирование терминальных цветкоподобных структур, а полное преобразование двухцветкового колоса (то есть соцветия с двумя сидячими латеральными цветками) в терминальную цветкоподобную структуру. Высказана гипотеза, что в ходе эволюции сходные преобразования привели к возникновению традиционно описываемых как терминальные цветки своеобразных репродуктивных структур у близкого к Ruppiales семейства Cymodoceaceae (Sokoloff et al., 2006).

Виды *Ruppia* — многолетние или однолетние водные растения, обитающие в солоноватых водоемах разной степени солености. Имея исключительно широкое географическое распространение, представители рода встречаются как в прибрежных водах и на литорали морей и океанов, так и во внутриматериковых водоемах. Когда растение переходит к формированию репродуктивных структур, побеги *Ruppia* сильно ветвятся и оси каждого порядка ветвления завершаются элементарным соцветием — двухцветковым колосом (Gamerro, 1968; Posluszny, Sattler, 1974; Dahlgren et al., 1985; Цвелев, 1982; Kaul, 1993; Мавродиев, Соколов, 1998). В колосе *Ruppia* один цветок расположен несколько выше другого. Цветки не имеют кроющих листьев, поэтому может возникнуть вопрос, не является ли верхний цветок морфологически терминальным. Латеральное положение верхнего цветка колоса доказывается его расположением под явственным углом (около 90 градусов) к оси соцветия, а также наблюдаемым иногда продолжением оси соцветия выше места прикрепления верхнего цветка (Gamerro, 1968; Цвелев, 1982; Tomlinson, 1982). Цветок *Ruppia* (см. рис. 1, а) имеет две тычинки в медианном положении, каждая с очень короткой нитью и широким связником. На верхушке связника, с его абаксиальной (т.е. удаленной от центра цветка) стороны, находится небольшая чешуйка. Согласно одной точке зрения — это

рудимент приросшего к тычинке листочка околоцветника, а согласно другой – вырост тычинки, не имеющий отношения к околоцветнику (Gamerro, 1968; Markgraf, 1936; Posluszny, Sattler, 1974; Цвелев, 1982; Kaul, 1993; Мавродиёв, Соколов, 1998). Гинецей состоит из свободных плодолистиков. Число плодолистиков в цветке варьирует в пределах рода от 2 до 19 (Kaul, 1993; Zhao, Wu, 2008), но часто их 4, в двух димерных кругах (рис. 1).

При предварительном изучении материала по *Ruppia maritima*, собранного на побережье Белого моря, были обнаружены соцветия, в которых два латеральных цветка колоса были в различной степени сросшимися между собой (Sokoloff et al., 2006). При небольшой степени срастания между цветками расположенные рядом друг с другом верхние тычинки двух соседних цветков срастались в единый орган (рис. 1, б). При значительной степени срастания двух цветков колоса формировалась структура, которая по своей морфологии напоминала единственный терминальный цветок (рис. 1, з). Такая терминальная цветкоподобная структура гомологична типичному соцветию из двух латеральных цветков, что доказывается наличием целого ряда переходных форм (например, рис. 1, в) среди соцветий, принадлежащих растениям из одной популяции (Sokoloff et al., 2006). В работе (Sokoloff et al., 2006) дано лишь краткое описание терминальных цветкоподобных структур у *Ruppia maritima*. В ней нет данных об анатомическом строении соцветий со сросшимися цветками, о частотах встречаемости таких соцветий и о некоторых деталях их морфологии. Ниже мы представляем данные о соцветиях *R. maritima* из других популяций с побережья Белого моря, восполняющие этот пробел. Следует отметить, что нам неизвестны работы других авторов, в которых было бы упомянуто явление срастания цветков у *Ruppia*, хотя цветкам и соцветиям представителей этого рода (в том числе – *R. maritima*) посвящено несколько детальных исследований (Gamerro, 1968; Posluszny, Sattler, 1974; Kaul, 1993; Lacroix, Kemp, 1997).

Формирование соцветий со сросшимися цветками у *Ruppia* – результат существенной модификации типичной для представителей данного рода программы морфогенеза репродуктивных структур. Срастание между цветками носит конгенитальный характер. Процесс конгенитального срастания как таковой в ходе морфогенеза не наблюдается, и о факте срастания можно судить лишь на основании построения морфологических рядов (Verbeke, 1992; Соколов и др., 2006). Поскольку процесс конгенитального срастания нельзя напрямую наблюдать в ходе морфогенеза, конгенитально сросшиеся структуры можно также рассматривать как “недоразделившиеся”. Поэтому процессы, ведущие к появлению терминальных цветкоподобных структур у *Ruppia* и ряда других расте-

ний, во многом близки к явлению фасциации (Sokoloff et al., 2006), которое связано со значительным увеличением объема апикальной меристемы.

Хотя анализ лабильности морфогенеза соцветий у беломорских растений *R. maritima* представляет очевидный интерес, его прямое изучение технически затруднено. Поскольку разные варианты морфогенеза могут реализовываться даже при развитии разных соцветий одного растения, невозможно предсказать судьбу каждого конкретного зачатка соцветия и, соответственно, выстраивать морфогенетические ряды из соцветий, зафиксированных на разных стадиях развития. Кроме того, ключевой этап морфогенеза – разметка положения органов цветка (Чуб, Пенин, 2004) – осуществляется, вероятно, у всех покрытосеменных, до того, как зачатки этих органов становятся заметны при изучении меристем с помощью сканирующего электронного микроскопа. О закономерностях морфогенеза можно судить ретроспективно – по числу и относительному расположению органов в дефинитивной структуре, а также – по пространственной организации проводящей системы. Тяжи прокампбия, из которых позже развиваются проводящие пучки, появляются вблизи апекса побега или цветка, следуя направлениям потоков ауксинов; при этом распределение потоков ауксинов играет ключевую роль и в определении позиции заложения примордиев (Чуб, 2009). Поскольку у растений, для которых отмечены терминальные цветкоподобные структуры, строение верхушки варьирует от соцветия к соцветию, прямое изучение закономерностей транспорта ауксина на самых ранних стадиях морфогенеза даст мало информации, так как не будет известна дефинитивная структура верхушки соцветия. В этой ситуации анализ васкулатуры сформированного соцветия позволит дать ретроспективное представление о потоках ауксинов в развивающемся соцветии.

Целью данной работы было изучить морфогенез и изменчивость дефинитивной структуры цветков и соцветий *R. maritima* на материале из нескольких природных популяций на побережье Белого моря, а также сравнить васкулатуру соцветий со свободными и в разной степени сросшимися цветками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Побеги с соцветиями *Ruppia maritima* L. собраны в июле 2006 и в июле 2008 гг. в четырех точках в окрестностях Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ (Лоухский район Республики Карелия, поселок Приморский): в соленом озере на Зеленом мысе, на верхней литорали острова Покормежный, на верхней лито-

рали Кислой губы и на верхней литорали Ермолинской губы.

Морфологическую изменчивость элементарных соцветий изучали с помощью стереомикроскопов МБР-1 и Olympus SZX-7; результаты оформляли путем зарисовки схем. По возможности для анализа использовали произвольно выбранные соцветия с разных экземпляров, хотя из-за густоты расположения разветвленных ползучих и укореняющихся побегов руппии трудно исключить возможность включения в анализ нескольких соцветий с одного экземпляра. Так как при раскрытии цветка руппии тычинки быстро опадают, а ножки плодолистиков сильно удлиняются, для изучения отбирали полностью сформированные соцветия на стадии непосредственно перед цветением. Для изучения морфогенеза и более наглядной документации дефинитивной структуры соцветий использован сканирующий электронный микроскоп CAMSCAN в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Для этого материал был проведен через две смены 96% спирта (по 30 мин каждая), три смены абсолютного ацетона (30 мин каждая) и высушен при критической точке с помощью аппарата Hitachi HCP-2. Материал смонтирован на столики для электронной микроскопии с помощью двусторонних дисков с клейкой поверхностью и напылен смесью платины и палладия с помощью установки Giko IB-3.

Для анатомических исследований сформированные соцветия на стадии непосредственно перед цветением заключали в парафин путем проводки через абсолютный спирт и хлороформ по стандартной методике (Барыкина и др., 2004), после чего также по стандартной методике (Барыкина и др., 2004) с помощью ротационного микротомы изготавливали серийные поперечные срезы соцветий толщиной 15 мкм. Окраску проводили пикроиндигокармином и карболовым фуксином (Аксенов, 1967). Окрашенные срезы заключали в среду Biount. Постоянные препараты изучали с помощью микроскопов Микромед-2 и Zeiss Axioplan-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология соцветий со свободными цветками

Соцветие руппии состоит из двух противоположных друг другу цветков (рис. 1, а). Цветок состоит из двух сидячих тычинок, расположенных медианно, и четырех или большего числа плодолистиков. Тычинка имеет две широко разнесенные теки (пары сросшихся микроспорангиев), так что если связник не попадает в поле зрения (заслонен другими структурами), то каждую теку можно ошибочно принять за отдельную тычинку. На абаксильной (наружной) стороне широкого связника у тычинки развит небольшой вырост. Плодолистики

составляют два или большее число димерных кругов: первая пара плодолистиков расположена трансверзально, вторая пара — медианно, следующие плодолистики возникают в косо расположенных кругах. Последний круг может иметь лишь один плодолистик. Плодолистики во время цветения почти сидячие, но при созревании плода у них образуются длинные ножки. Каждый плодолистик снабжен на спинной стороне под рыльцем небольшим выростом.

Среди 180 изученных соцветий типичного для данного вида строения (то есть с четко обособленными цветками) около 62% имели одинаковое число плодолистиков в двух цветках, а 38% — разное число плодолистиков (суммарные данные по всем популяциям, см. таблицу 1). Наряду с соцветиями, имеющими четыре плодолистика в каждом из двух цветков, встречались соцветия с 5 или 6 плодолистиками в двух цветках (см. таблицу 1). Из общего числа 360 цветков изученных соцветий с четко обособленными цветками почти половина (около 43%) имела 4 плодолистика, цветки с 5 и 6 плодолистиками встречались почти одинаково часто (около четверти цветков на каждый из случаев) и цветки с 7 плодолистиками были очень редки (см. таблицу 2). При этом цветки с разным числом плодолистиков были отмечены в разных популяциях с разной частотой (см. таблицу 2). Лишь в 2 из 4 изученных популяций чаще всего отмечали цветки с 4 плодолистиками. В популяции с острова Покормежной чаще всего отмечали цветки с 6 плодолистиками.

Морфология соцветий со сросшимися цветками

У части изученных экземпляров встречаются соцветия, в которых расположенные рядом друг с другом верхние медианные тычинки разных цветков конгенитально срастаются, образуя единую структуру (рис. 2–4). У такой сросшейся тычиночной структуры в одном пыльнике может быть три (например, рис. 3, А) или даже четыре (рис. 1, б) теки, а не две, как у нормальной тычинки, или, наоборот, только одна, но сильно увеличенная в размере тека. Если же “общая” для двух цветков тычинка имеет две теки, то каждая из этих тек нередко вскрывается двумя (а не одной, как в нормальной теке) продольными щелями (рис. 3, Б). Изредка верхняя тычинка нижнего цветка находится не в медианном, а в трансверзальном (или косом) положении (рис. 5, а).

Отмечены соцветия, в которых конгенитальное срастание цветков выражено еще сильнее. В них все плодолистики формируют единую группу, не разделенную тычинками, хотя по относительной ориентации брюшных и спинных сторон плодолистиков можно выявить их принадлежность к какому-либо из двух цветков (рис. 4, А–В). Плодоли-

Таблица 1. Встречаемость соцветий с одинаковым числом плодолистиков в двух цветках в популяциях *Ruppia maritima* из окрестностей Беломорской биологической станции МГУ. В таблицу не включены соцветия со сросшимися цветками

	Соленое озеро на Зеленом мысе	Лагуна на литорали острова Покормежный	Кислая губа, литораль	Ермолинская губа, литораль	Всего по 4 популяциям	
					абс.	%
число плодолистиков в каждом из двух цветков одного соцветия						
4	32	0	12	17	61	33.9
5	3	2	12	6	23	12.8
6	3	13	3	7	26	14.4
7	0	1	0	0	1	0.6
всего соцветий с одинаковым числом плодолистиков в цветках	38	16	27	30	111	61.7
сумма соцветий с разным числом плодолистиков в цветках	20	9	23	17	69	38.3
плодолистиков больше в верхнем цветке	4	4	8	6	22	12.2
плодолистиков больше в нижнем цветке	16	5	15	11	47	26.1

Таблица 2. Встречаемость различного числа плодолистиков в цветках *Ruppia maritima* в популяциях из окрестностей Беломорской биологической станции МГУ. В этой таблице цветки рассматриваются суммарно, без учета их положения в соцветии

	Соленое озеро на Зеленом мысе		Лагуна на литорали о-ва Покормежный		Кислая губа, литораль		Ермолинская губа, литораль		Всего по 4 популяциям	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
число плодолистиков в цветке										
4	77	63.4	4	8	34	34	42	44.7	157	43.6
5	23	19.8	9	18	42	42	28	29.8	102	28.3
6	15	12.3	33	66	21	21	24	25.5	93	25.8
7	1	0.9	4	8	3	3	0	0.0	8	2.2
среднее арифметическое	4.4		5.7		4.9		4.8		4.9	
всего цветков	116		50		100		94		360	

стики одного цветка ориентированы брюшными сторонами¹ друг к другу, то есть к центру цветка.

¹ Хотя плодолистик руппии – асцидиатный, то есть не имеет важнейшего маркера брюшной стороны – брюшного шва, полярность плодолистика легко установить по характерному выросту на спинной стороне. Именно на этом выросте размещены буквы “П” на рисунках 3 и 4. По данным R. В. Kaul (1993), этот вырост имеет на поверхности устьица, а образующиеся здесь пузырьки газа (предположительно кислорода) важны для поддержания плавучести соцветия во время цветения.

Иногда наблюдается конгенитальное срастание двух плодолистиков между собой (рис. 2, з, д). В соцветиях описываемого типа обычно 4 тычинки. Две из них по положению соответствуют нижним медианным тычинкам каждого цветка, а две другие расположены, чередуясь с ними, справа и слева от группы плодолистиков (рис. 1, в; 4, А–В). В тычинках, соответствующих нижним медианным тычинкам каждого из двух объединенных цветков, чешуйки на связнике расположены с наружной, то

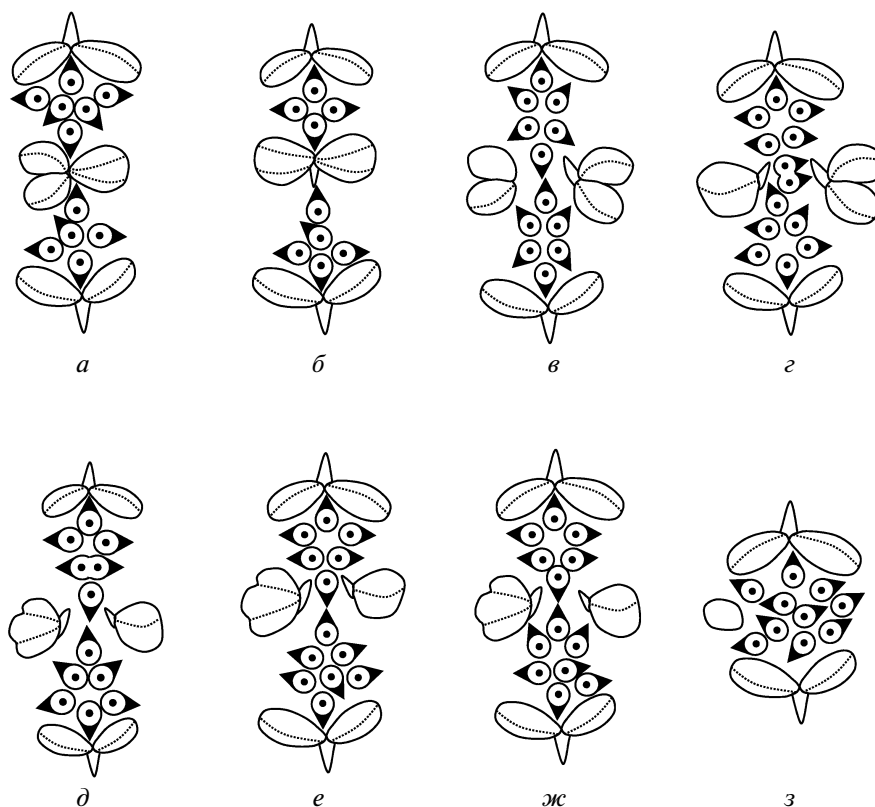


Рис. 2. Диаграммы некоторых из выявленных в данной работе соцветий *Ruppia maritima* с разной степенью срастания цветков (материал из популяции с острова Покормежный). Обозначения как на рисунке 1. Листья, предшествующие соцветию, не показаны.

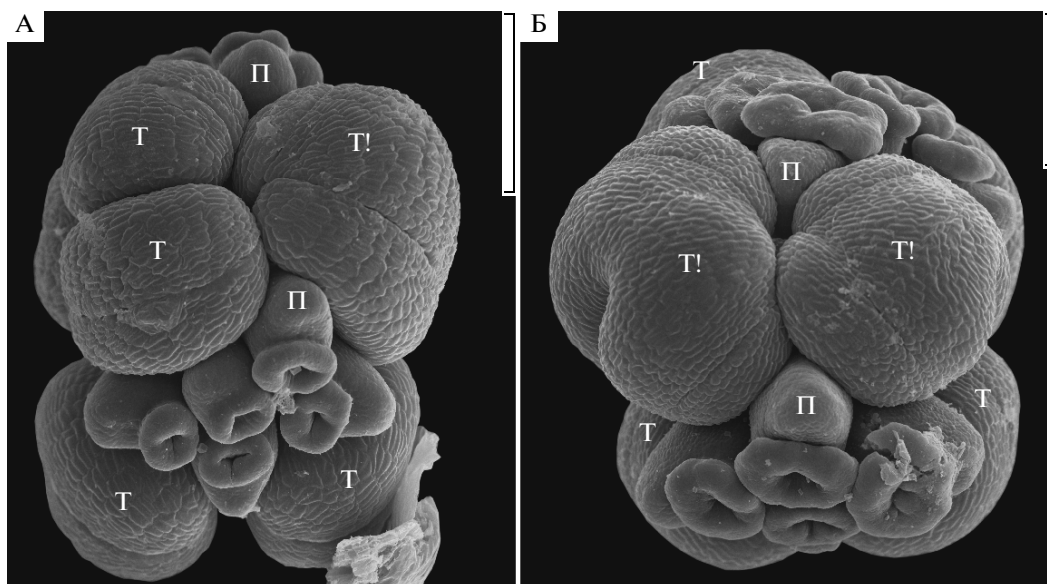


Рис. 3. Молодые соцветия *Ruppia maritima*, в которых верхние тычинки двух цветков формируют единую структуру, пространственно разделяющую гинецеи двух цветков (сканирующий электронный микроскоп). Материал из популяции с острова Покормежный. А – соцветие, в котором срастание верхних тычинок двух цветков захватило лишь по одной теке каждой из них; на переднем плане – нижний цветок в соцветии, имеющий 5 плодolistиков, связник его нижней тычинки не виден в данном ракурсе, и поэтому две ее теки производят впечатление обособленных друг от друга структур. Диаграмма этого соцветия дана на рис. 2, а. Б – соцветие, в котором срастание верхних тычинок двух цветков захватило обе теки, так что образовалась общая для двух цветков тычинка с двумя теками, каждая из которых будет вскрываться двумя щелями (а не одной, как тека нормального строения). Диаграмма этого соцветия дана на рис. 2, б. Масштабные отрезки соответствуют 300 мкм. Условные обозначения: П – плодolistик, Т – тека нормального строения, Т! – тека необычного строения, образованная за счет объединения двух тек, относящихся к тычинкам разных цветков.

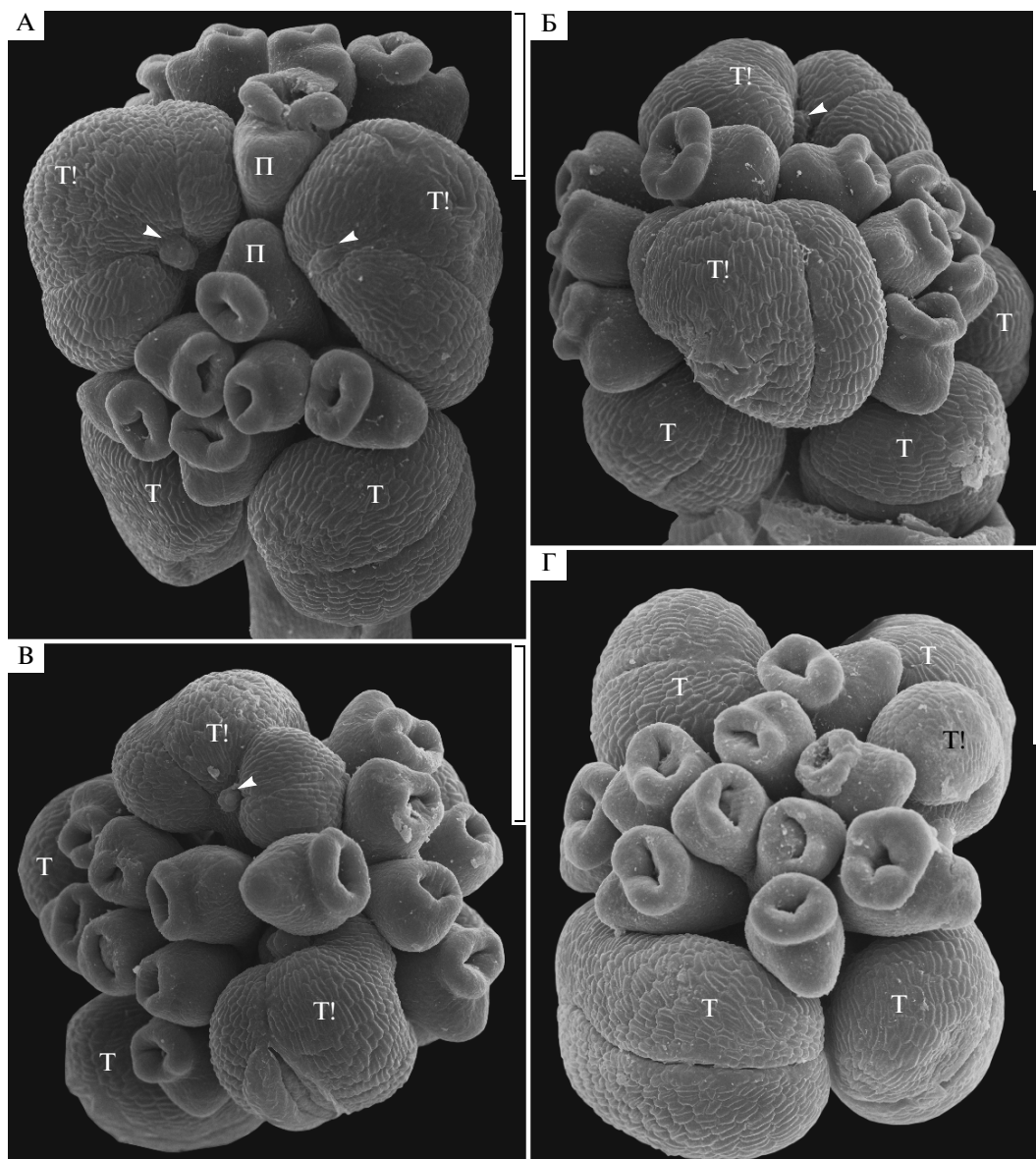


Рис. 4. Молодые соцветия *Ruppia maritima* с большей степенью срастания цветков, чем соцветия на рисунке 3 (сканирующий электронный микроскоп). Материал из популяции с острова Покормежный. Масштабные отрезки соответствуют 300 мкм. Стрелка указывает на придаток тычинки. Остальные обозначения – как на рисунке 3. Диаграмма соцветия с рис. 4, А изображена на рис. 2, е, с рис. 4, Б – на рис. 2, в, с рис. 4, В – на рис. 2, ж, с рис. 4, Г – на рис. 2, з.

есть морфологически абаксиальной, стороны (рис. 1, е). В трансверзальных тычинках часто удается наблюдать чешуйки на внутренней (обращенной к гинецею) стороне (рис. 4, А–В). Трансверзальные тычинки сильно варьируют по размерам. Большие тычинки имеют либо нормальное строение, либо у них только одна тека, но с тремя гнездами. У маленьких тычинок тека всегда одна и обычно состоит из одного микроспорангия, иногда у них может отсутствовать чешуйка (например, обозначенная как “Т!” тычинка на рисунке 4, Г состоит из одного микроспорангия и не имеет ни чешуйки, ни линии вскрывания).

Найдены случаи наиболее сильного конгениального срастания двух цветков, когда все соцветие представлено фактически только одним “цветком” с числом плодolistиков 7 и более. Все плодolistики ориентированы к центру “цветка”, и их невозможно разделить на две группы (рис. 4, Г).

Частота встречаемости соцветий со сросшимися цветками в разных популяциях представлена в табл. 3. Частота встречаемости (50%) соцветий руппий со сросшимися цветками в популяции из лагуны на литорали острова Покормежный сильно отличается от частоты встречаемости таких соцветий во всех других изученных популяциях, где со-

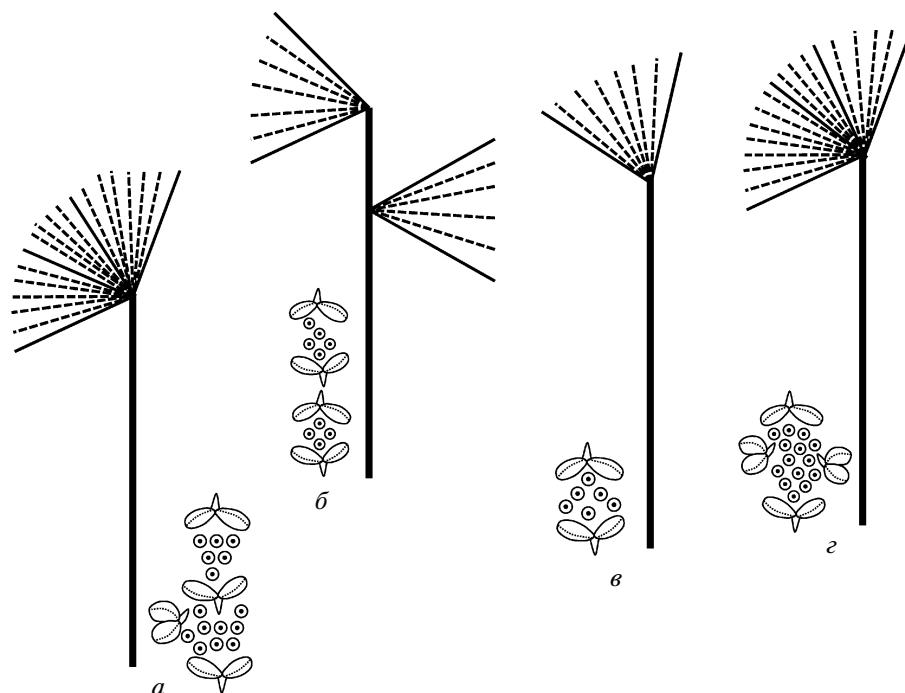


Рис. 5. Схемы васкулатуры соцветий *Ruppia maritima* со свободными и в разной степени сросшимися цветками. Рядом с каждой схемой изображена диаграмма соответствующего соцветия, зарисованная перед изготовлением микротомных срезов. Разделение единого пучка плодolistика на вентральный и дорзальный пучок не показано. Толстая сплошная линия – проводящий пучок оси соцветия, пунктир – проводящий пучок, идущий к плодolistику, тонкая сплошная линия – пучок тычинок.

цветия со сросшимися цветками были очень редки или не отмечены вовсе.

Иногда в цветках руппии встречаются стерильные плодolistики. Их встречаемость не зависит от степени срастания цветков, они бывают и в цветках, совершенно нормальных во всех прочих отношениях. Стерильные плодolistики не имеют рыльца, не подразделены явно на спинную и брюшную стороны (у них нет выроста на спинной стороне), они также гораздо более узкие, чем обычные плодolistики. Фертильность, по крайней мере в большинстве случаев, плодolistиков в соцветиях со сросшимися цветками доказывается тем, что в таких соцветиях, по нашим наблюдениям, развиваются нормальные плоды.

Васкулатура соцветий со свободными цветками

Проводящая система цветоноса представлена гаплостелой с несколькими трахеидами ксилемы, окруженными кольцом флоэмы. На части длины цветоноса трахеиды ксилемы разрушаются и развивается ксилемная лакуна. В этом участке при созревании плодов имеет место сильное интеркалярное удлинение цветоноса. От оси соцветия практически перпендикулярно отходит пучок в нижний цветок. От этого пучка отходят тяжи, идущие в плодolistики и тычинки. В связнике пучок тычинки может раздваиваться или расширяться. В плодolistике проводящий пучок раздваивается, образуя спинной и брюшной проводящие пучки

Таблица 3. Соотношение нормальных и аномальных соцветий в популяциях *Ruppia maritima* из окрестностей Беломорской биологической станции МГУ

	Соленое озеро на Зеленом мысе	Лагуна на литорали о-ва Покормежный	Кислая губа, литораль	Ермолинская губа, литораль
нормальные соцветия (цветки совершенно свободные)	58	25	50	47
соцветия со сросшимися в различной степени цветками	0	25	0	3
всего	58	50	50	50

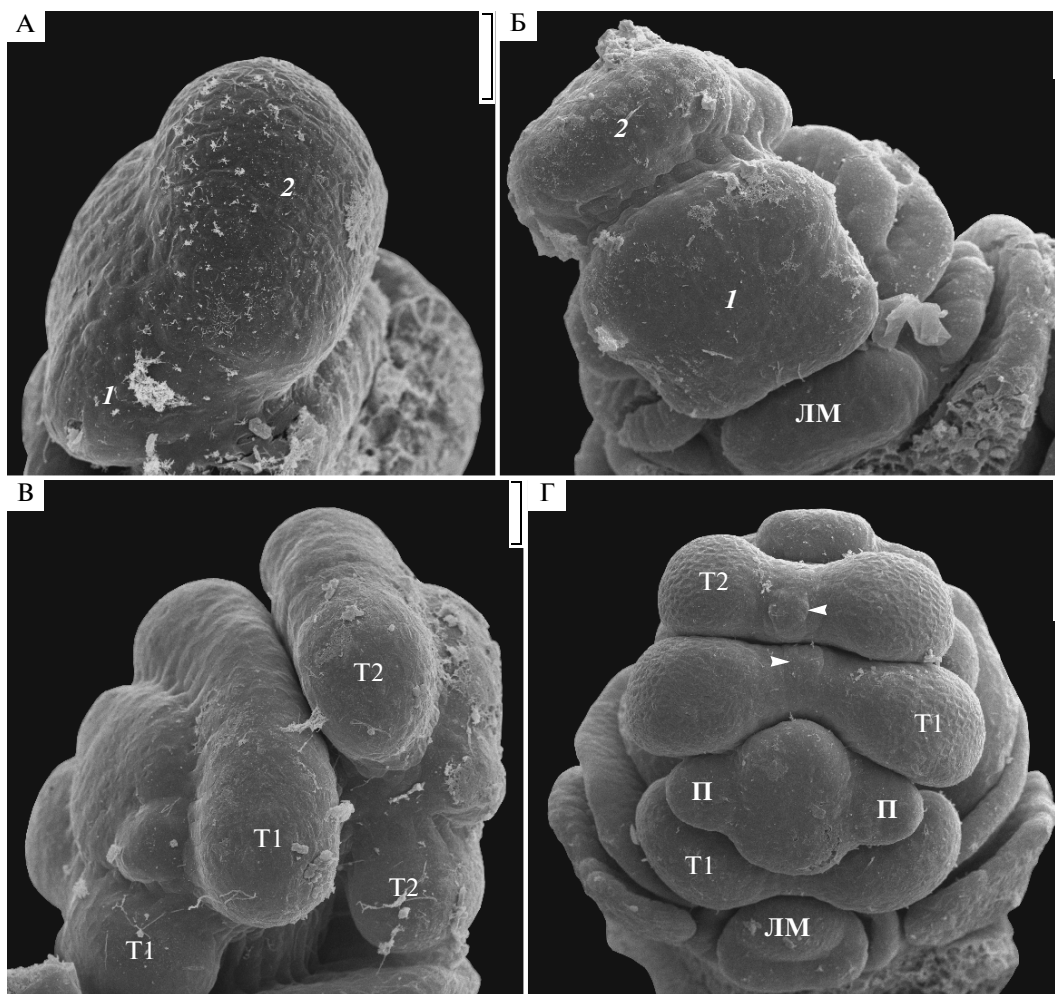


Рис. 6. Ранние стадии морфогенеза соцветий *Ruppia maritima* со свободными цветками (сканирующий электронный микроскоп). Материал из популяции с острова Покормежный. Масштабные отрезки соответствуют 30 мкм на А–В и 100 мкм на Г. Условные обозначения: 1 – нижний цветок соцветия, 2 – верхний цветок соцветия, ЛМ – апикальная меристема пазушного побега, Т1 – тычинка нижнего цветка соцветия, Т2 – тычинка верхнего цветка соцветия, стрелки – придатки тычинок, п - плодolistик.

плодolistика. Ось соцветия с проводящим пучком в центре продолжается выше места отхождения первого цветка и постепенно переходит в пучок, входящий в верхний цветок. Следов продолжения проводящей системы оси соцветия выше места отхождения второго цветка не отмечено. Васкуляризация верхнего цветка – такая же, как в нижнем цветке (рис. 5, б).

Васкулатура соцветий со сросшимися цветками

Во всех случаях, когда цветки в соцветии объединены друг с другом, проводящие пучки ко всем органам (тычинкам и плодolistикам) отделяются от общего проводящего пучка цветоноса на одном уровне (рис. 5, в, г). Это относится и к тем случаям, когда срастание захватывает цветки лишь в небольшой степени, и развита одна “общая” тычинка, расположенная между двумя соседними цветками. Особенность некоторых соцветий с одной

общей тычинкой состоит в том, что две теки этой тычинки сидят на отдельных ножках. В этом случае в каждую из таких ножек входит отдельный проводящий пучок. Впрочем, эту ситуацию можно интерпретировать как наличие двух сильно сближенных трансверзальных тычинок.

Данные по морфогенезу соцветий

На рис. 6 изображены ранние стадии морфогенеза соцветий со свободными цветками. На самой ранней из изображенных стадий (рис. 6, А) видны примордии нижнего и верхнего цветка. Судя по тому, что они достаточно хорошо отграничены друг от друга, далее из такой структуры должно развиваться соцветие со свободными цветками. Ни на этой, ни на более поздних стадиях нет никаких следов кроющихся листьев цветков. В соцветии, изображенном на рис. 6, Б, можно видеть стадию

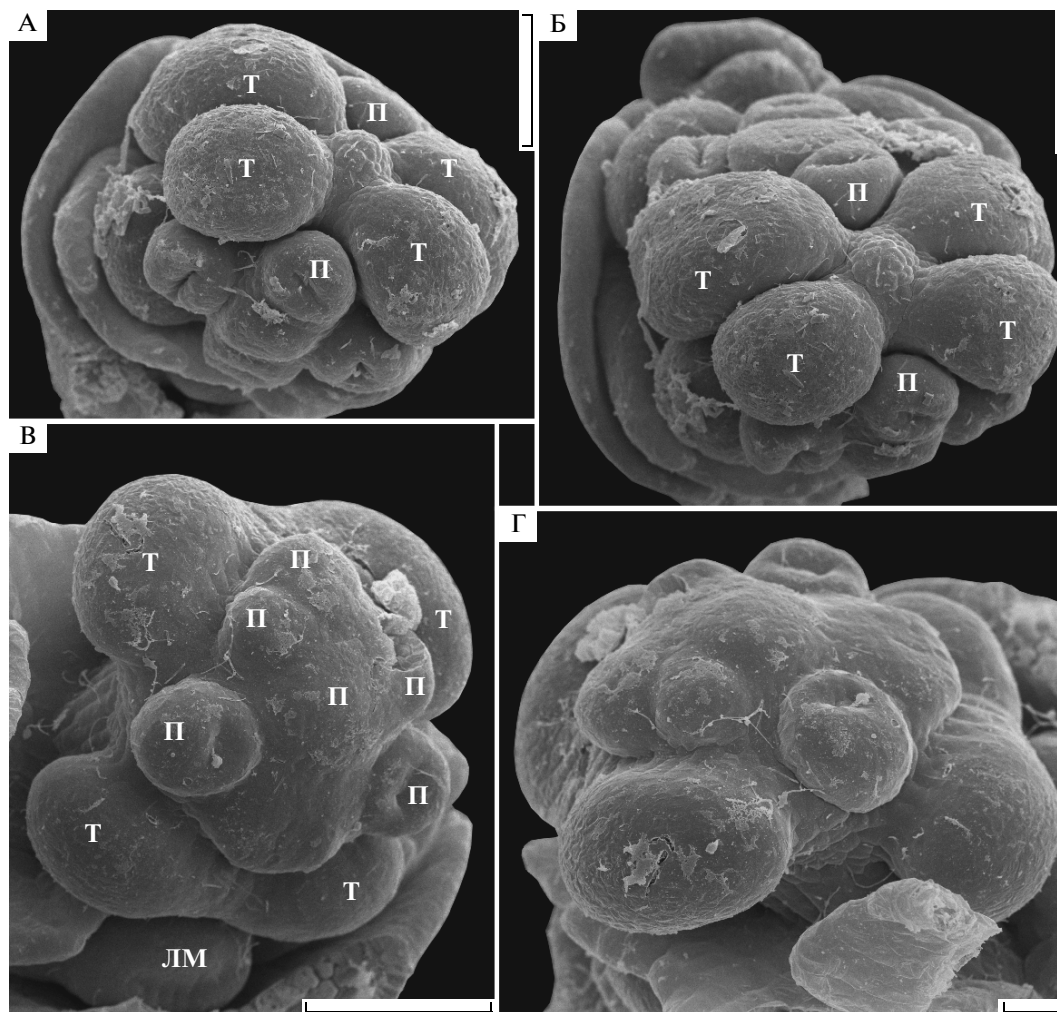


Рис. 7. Ранние стадии морфогенеза соцветий *Ruppia maritima* со сросшимися цветками (сканирующий электронный микроскоп). Материал из популяции с острова Покормежный. А и Б — разные виды одного и того же соцветия, в котором верхние тычинки двух цветков срослись только своими связниками и формируют единственный общий придаток в центре (теки при этом не срастаются). Не исключено, что такое соцветие на более поздней стадии развития, когда из-за увеличения размеров тек общий придаток и связник будут скрыты от наблюдателя, будет производить ложное впечатление типичного соцветия руппии со свободными цветками. В и Г — разные виды одного и того же соцветия с весьма полным срастанием двух цветков, каждый из которых имеет только одну, нижнюю тычинку. Масштабные отрезки соответствуют 100 мкм на А–В и 30 мкм на Г. Условные обозначения: ЛМ — апикальная меристема пазушного побега, П — пестик, Т — тека тычинки.

заложения тычинок. Молодой цветок на этой стадии имеет в плане почти четырехугольную форму. Примордии двух тычинок, которые пока еще только намечаются, расположены в медианной плоскости, сильно вытянуты в трансверзальном направлении и вместе занимают почти всю поверхность цветка. В соцветии, изображенном на рис. 6, В, тычинки уже ясно отграничены от других частей цветка. Здесь же видно заложение гинецея. Первыми закладываются два плодолостика, расположенные трансверзально (то есть, чередуясь с тычинками). В центре нижнего цветка находится еще не дифференцированная на примордии отдельных плодолостиков меристема цветка. На рис. 6, Г изображено соцветие, в котором тычинки диффе-

ренцированы на связник и две теки. У верхних тычинок с абаксиальной (наружной) стороны связника начал дифференцироваться придаток. У нижних тычинок на этой стадии придаток еще не заложен, он формируется немного позднее. На рис. 6, Г в гинецее нижнего цветка формируется 4 плодолостика. Два трансверзальных плодолостика находятся на более поздней стадии морфогенеза, чем два медианных плодолостика. Позже плодолостики принимают типично асцидиатную форму.

На рис. 7, А, Б изображено одно и то же молодое соцветие, в котором объединение двух цветков выражено только в частичном срастании их верхних тычинок. Это срастание особенно ярко проявляет-

ся в том, что у двух тычинок сформировался один общий придаток. Это соцветие по морфологии близко к изображенному на рис. 1, б. Соцветие, изображенное на рис. 7, В, Г, находится на немного более поздней стадии морфогенеза, чем соцветие на рис. 6, Г. В соцветии на рис. 7, В, Г два цветка почти полностью объединены друг с другом. У каждого из цветков развита только одна (нижняя) тычинка. На этой стадии морфогенеза тычинки еще не имеют придатков. В гинецее два плодolistиков (принадлежащих разным цветкам!), судя по всему, заложились первыми. Во всяком случае, они находятся на относительно поздней стадии морфогенеза, так как их асцидиатная природа уже хорошо выражена. Отнесение этих плодolistиков к одному из двух цветков едва ли возможно. В верхней части микрографии на рис. 7, В (=в левой части на рис. 7, Г) намечаются еще 4 плодolistика, характер расположения которых близок к расположению 4 плодolistиков в наиболее типичных цветках руппии (например, рис. 6, Г). В нижней части микрографии на рис. 7, В (=в правой части на рис. 7, Г) виден участок меристемы, на котором, вероятно, позже появятся дополнительные плодolistики, относящиеся к другому цветку.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение с результатами других исследований Ruppia

Данные по морфогенезу и васкулатуре были ранее известны лишь для соцветий *Ruppia* со свободными цветками (Uhl, 1947; Singh, 1965; Posluszny, Sattler, 1974; Tomlinson, 1982; Kaul, 1993; Lacroix, Kemp, 1997). Наши данные не противоречат описаниям этих авторов. Наши данные по морфогенезу соцветий со сросшимися цветками подтверждают тот факт, что срастание цветков носит конгениальный характер. Изучение васкулатуры соцветий со сросшимися цветками показало высокую степень интеграции сросшихся цветков. Показательно, что даже в тех случаях, когда по внешней морфологии частичная обособленность сросшихся цветков была очевидна (например, выявлялась по ориентации плодolistиков, расположенных в двух группах), она не проявлялась в особенностях проводящей системы. В целом, проводящая система соцветий *R. maritima* со сросшимися цветками устроена так же, как проводящая система одного цветка, причем ничто не противоречит гипотезе о терминальном положении этой структуры. Соцветие, изображенное на рис. 5, в, как по набору, строению и относительному положению органов, так и по характеру васкулатуры вполне может быть интерпретировано как единственный терминальный цветок типичного для *Ruppia* строения.

В.Р. Kaul (1993) изучил на материале из природных популяций Северной Америки изменчивость числа и положения органов цветка у двух видов *Ruppia*, в том числе — у *R. maritima* var. *rostrata* Agardh. Он не встретил вариативности в числе тычинок и их положении, константность этих признаков не зависела от числа и положения плодolistиков. Однако небольшую вариативность в андроее выявили U. Posluszny и R. Sattler (1974), также работавшие с американским материалом (*R. maritima* var. *maritima*): в одном из изученных цветков они наблюдали abortивную теку тычинки, а в другом цветке тычиночная нить имела, по-видимому, раздвоенный вырост связника. По нашим данным, как и по данным Sokoloff et al. (2006), достаточно большая вариативность в числе и строении тычинок, выявленная на беломорском материале, обусловлена степенью срастания цветков друг с другом.

Число плодolistиков варьирует у *Ruppia* в достаточно широких пределах. По данным В.Р. Kaul (1993), 72% изученных им цветков *R. maritima* имели 4 плодolistика, а все остальные — 3 плодolistика. Это существенно отличается от наших данных (табл. 1 и 2). Разброс в числе плодolistиков в цветках на нашем материале — от 4 до 7. В материале *R. maritima*, изученном В.Р. Kaul (1993), в 80% случаев оба цветка имели одинаковое число плодolistиков: из них в 78% соцветий каждый цветок имел по 4 плодolistика и в 22% — по 3 плодolistика. В 20% от общего числа изученных соцветий один цветок имел 4 плодolistика, а другой — 3. При этом примерно в двух третях случаев (68%), когда цветки имели разное число плодolistиков, цветок с 4 плодolistиками располагался ниже цветка с 3 плодolistиками (Kaul, 1993). По полученным нами результатам, около 62% изученных соцветий (суммарные данные по всем популяциям) имели одинаковое число плодolistиков в двух цветках. На нашем материале в случаях, когда цветки одного соцветия имели разное число плодolistиков, цветок с большим числом плодolistиков был чаще расположен ниже, чем цветок с меньшим числом плодolistиков. Как и в работе В.Р. Kaul (1993), таких соцветий оказалось 68%. Похожая тенденция отмечена и у *R. occidentalis* S. Watson (Kaul, 1993). По данным В.Р. Kaul (1993), внутри соцветия разница между числом плодolistиков у двух цветков не превышала 1 плодolistика у *R. maritima* и 2 плодolistиков у *R. occidentalis*. В нашем материале различие в числе плодolistиков между цветками одного соцветия достигает 3, хотя обычно разница именно в 1 плодolistик. По данным В.Р. Kaul (1993), среднее число плодolistиков в цветках *R. maritima* составило 3.7, а в цветках *R. occidentalis* — 6.0. В изученных нами популяциях *R. maritima* этот показатель варьировал от 4.4 до 5.7, а в среднем по всем популяциям составил 4.9.

V.R. Kaul (1993), хотя и выявил большую изменчивость структуры цветка у двух видов *Ruppia*, ни разу не наблюдал случаев срастания цветков. Насколько нам известно, срастание цветков у *Ruppia* было ранее описано только в работе Sokoloff et al. (2006). Возможно, эта особенность наблюдается только в некоторых популяциях руппии. В пользу такого предположения говорят установленные нами резкие различия в частотах встречаемости соцветий со сросшимися цветками в разных популяциях руппии. Требуются дальнейшие исследования для установления причин выявленных нами межпопуляционных различий (генетическая разнородность популяций, разные экологические условия и т.д.). Во всяком случае, мы не видим очевидных экологических факторов, объединяющих условия произрастания в популяции на острове Покормежный и в популяции на территории поселка Приморский, где терминальные структуры *R. maritima* были выявлены ранее (Sokoloff et al., 2006).

Сравнение данных по варьированию числа плодолистиков и частоте сросшихся цветков

Срастание цветков у руппии – конгенитальное. В процессе морфогенеза оно выражается в формировании объединенного зачатка двух цветков вместо обособленных примордиев цветков. Степень обособленности зачатков цветков зависит от 2 параметров: (1) расстояния между зачатками и (2) размера зачатка. Получить прямые количественные данные о варьировании размера флорального примордия непросто не только из-за большой трудоемкости такого исследования, но и из-за сложностей в подборе соцветий, находящихся на одной стадии морфогенеза. Об относительном размере зачатка цветка можно косвенно судить по числу развивающихся в нем плодолистиков. Следовательно, если размер примордиев цветков – ключевой фактор в их объединении, то увеличение размера примордиев должно способствовать их объединению. По нашим данным, среднее число плодолистиков в полностью обособленных цветках было максимальным в популяции с острова Покормежный (5.7), в то время как в других популяциях этот показатель варьировал от 4.4 до 4.9. Именно в этой популяции мы наблюдали большое число соцветий со сросшимися цветками. Не исключено, что в данной популяции средний размер флорального примордия выше, чем в других популяциях, и этот фактор действительно способствует объединению цветков. Однако это наблюдение носит предварительный характер и должно быть проверено на более обширном материале. Кроме того, очевидно, что срастание цветков зависит от целого комплекса факторов. Во всяком случае, у *R. occidentalis* с еще большим числом плодолистиков срастание цветков пока не отмечено.

Морфологический ряд, связывающий соцветия с разной степенью срастания цветков

На изученном нами материале выявляется достаточный полный ряд форм, связывающих соцветия со свободными цветками и соцветия с полностью объединенными цветками, которые вместе во всех отношениях соответствуют единственному терминальному цветку.

По степени срастания цветков можно построить следующий морфологический ряд: (1) два отдельных цветка (рис. 1, а), (2) два цветка с одной общей тычинкой (рис. 1, б), с большим числом гнезд, чем в нормальной тычинке; (3) два сросшихся цветка, у которых “общая” тычинка, по одной из интерпретаций (Sokoloff et al., 2006), “разделилась” на две части, располагающиеся трансверзально, плодолистики двух цветков составляют единую группу, но обращены к различным центрам своих цветков (рис. 1, в); (4) полностью сросшиеся цветки с двумя (или тремя, но тогда третья очень маленькая и абортивная) тычинками и плодолистиками, обращенными к единому центру (рис. 1, г).

Можно предложить другую интерпретацию морфологического ряда (рис. 8), которая не обсуждается в работе Sokoloff et al. (2006). Тычинки в трансверзальном положении у сросшихся цветков можно принимать за сместившиеся из медианного положения и уменьшившиеся в размере. Среди изученных нами соцветий есть такие, где верхний цветок имеет две обычные тычинки, в то время как нижний цветок имеет одну нормальную нижнюю тычинку и верхнюю тычинку, смещенную в трансверзальное положение. Поскольку морфологические ряды, изображенные на рис. 1 и 8, не интерпретируются нами как эволюционные, а представляют собой попытки упорядочить внутривидовую (в отдельных случаях – даже эндогенную) изменчивость, эти два ряда не следует противопоставлять. Напротив, они дополняют друг друга.

Инверсия тычинок в соцветиях со сросшимися цветками

Мы выявили необычную особенность трансверзальных тычинок в соцветиях *Ruppia* со сросшимися цветками. Если такие тычинки имеют придаток в виде чешуйки на связнике, то эта чешуйка расположена адаксиально (на внутренней стороне тычинки, обращенной к гинецею). В типичных тычинках руппии придаток связника находится с наружной (абаксиальной) стороны. Это позволяет говорить о своеобразной инвертированности трансверзальных тычинок. Данное наблюдение представляет, на наш взгляд, большой интерес, поскольку хорошо документированные случаи изменения полярности органов цветка

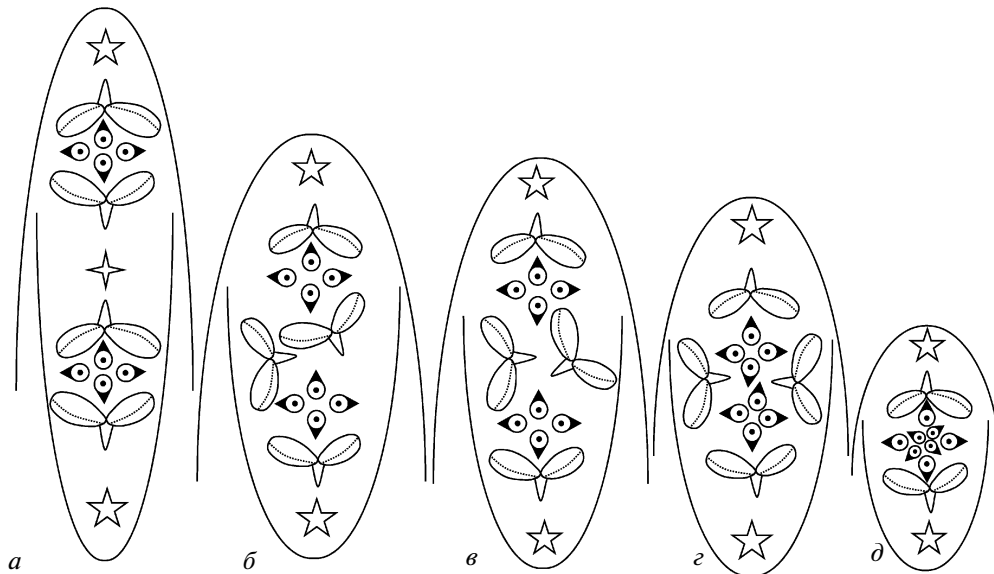


Рис. 8. Альтернативный вариант морфологического ряда, связывающего соцветия *Ruppia maritima* типичного строения и соцветия с терминальной цветкоподобной структурой. В отличие от морфологического ряда, изображенного на рисунке 1, этот ряд не включает соцветия, где объединены тычинки, принадлежащие к соседним цветкам.

исключительно редки у покрытосеменных растений в целом. Изучение этого вопроса отчасти осложняется тем, что в большинстве случаев тычинки покрытосеменных растений не имеют надежных морфологических маркеров их наружной и внутренней стороны (каковым в случае руппии можно считать придаток связника)². Как известно, пыльники покрытосеменных растений могут вскрываться как по направлению к центру цветка (интрорзные), так и по направлению наружу (экстрорзные), но эволюционный переход от одного типа вскрывания пыльников к другому не требует обязательного предположения об изменении их морфологической полярности, он вполне может быть постепенным и осуществляться через промежуточный вариант — латрорзные пыльники. Что касается плодолистиков покрытосеменных растений, то в большинстве случаев они имеют надежный маркер полярности — брюшной шов, который практически всегда направлен к центру цветка. Исключение составляют растения, у которых цветоложе имеет складчатое строение (немногие представители порядка Pandanales из однодольных растений и *Tupidanthus calyptratus* из семейства Agaliaceae — Ambrose et al., 2006; Sokoloff et al., 2007; Rudall, 2008). Складчатость цветоложа приводит, формально говоря, к “развороту” плодолистиков на угол до 90 градусов. Однако в обоеполых складчатых цветках *Tupidanthus* относительная ориентация плодолистиков и расположенных рядом с ни-

ми тычинок — такая же, как в типичных цветках. *Lacandonia* (Triuridaceae, Pandanales) широко известна как пример покрытосеменного растения с инвертированным положением плодолистиков и тычинок. Важно, что у *Lacandonia* полярность плодолистиков инвертирована на 180 градусов по отношению к их ориентации у родственных форм, и поэтому ориентация плодолистиков по отношению к тычинкам приближается к таковой у прочих покрытосеменных растений (Ambrose et al., 2006; Rudall, 2008). Таким образом, наш пример с *Ruppia* — чуть ли не единственный документально зафиксированный случай инверсии относительной ориентации тычинок и плодолистиков у покрытосеменных растений. Следует, однако, отметить, что, принимая морфологический ряд, изображенный на рис. 1, мы не должны считать трансверзальные тычинки в терминальных цветкоподобных структурах руппии вполне гомологичными обычным тычинкам. Скорее их следует рассматривать как сросшиеся попарно теки (т.е. половины) двух разных тычинок.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости соцветий со сросшимися цветками сильно варьирует у *Ruppia maritima* от популяции к популяции.

2. Не исключено, что предпосылкой к слиянию цветков служит увеличение размеров флоральных примордиев.

3. Проводящая система соцветий *R. maritima* со сросшимися цветками устроена так же, как проводящая система одного цветка, причем ничто не

² Представляет несомненный интерес изучение молекулярных маркеров абаксиально-адаксиальной полярности латеральных структур, таких как ген INO (Bowman, 2000).

противоречит гипотезе о терминальном положении этой структуры.

4. В соцветиях *R. maritima* со сросшимися цветками в трансверзальном положении нередко встречаются “инвертированные” тычинки, у которых придаток расположен не на наружной, а на внутренней (обращенной к гинецею) стороне связника.

Благодарности. Авторы благодарны Р. J. Rudall за полезное обсуждение, сотрудникам Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ за помощь в работе, руководству Беломорской биологической станции имени Н. А. Перцова МГУ за содействие в сборе материала. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МД-2644.2009.4, гранта РФФИ № 09-04-01155 и Федеральной Целевой Программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (НК-541П/П314 от 07.05.2010).

ЛИТЕРАТУРА

- Аксенов Е. С. Новый метод окрашивания растительных тканей для приготовления постоянных анатомических препаратов // Биол. науки. 1967. № 11. С. 125–126.
- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. 311 с.
- Ежова Т. А., Пенин А. А. Новый ген *BRACTEA* (*BRA*) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., отвечающий за формирование открытого абрактеезного соцветия // Генетика. 2001. Т. 37. № 7. С. 935–938.
- Кузнецова Т. В. Морфология соцветий: современное состояние // Итоги науки и техники. Сер. Ботаника. Т. 12. М., 1991. С. 51–174.
- Кузнецова Т. В., Пряхина Н. И., Яковлев Г. П. Соцветия: морфологическая классификация. СПб: Химико-фармацевтич. ин-т, 1992. 126 с.
- Мавродиев Е. В., Соколов Д. Д. О морфологии европейских видов *Zannichelliaceae*, *Ruppiceae* и *Zosteraceae* // Бюл. МОИП, отд. биол. 1998. Т. 103, Вып. 5. С. 49–50.
- Пенин А. А., Чуб В. В., Ежова Т. А. Принципы формирования терминального цветка // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 2. С. 92–95.
- Соколов Д. Д., Ремизова М. В., Тимонин А. К., Осольский А. А. Срастания органов в цветках покрытосеменных растений: типология, таксономическое и филогенетическое значение // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. Материалы международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (23–27 января 2006 г.). Часть 1. Казань, 2006. С. 99–101.
- Цвелев Н. Н. Сем. *Ruppiceae* // Жизнь растений. Т. 6: Цветковые растения. М.: Просвещение, 1982. С. 34–35.
- Чуб В. В. Роль позиционной информации в регуляции развития органов цветка и листовых серий побегов: дисс. ... док. биол. наук. М., 2009. 231 с.
- Чуб В. В., Пенин А. А. Структура цветка *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: разметка положения органов // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 280–284.
- Alvarez J., Guki C. L., Yu X.-H., Smyth D. R. *TERMINAL FLOWER*: A gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana* // Plant Journ. 1992. V. 2. № 2. P. 103–116.
- Ambrose B. A., Espinosa-Matías S., Vázquez-Santana S. et al. Comparative floral developmental series of the Mexican triurids support a euanthial interpretation for the unusual floral structures of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae) // Amer. Journ. Bot. 2006. V. 93. P. 15–35.
- Bowman J. L. Axial patterning in leaves and other lateral organs // Curr. Opin. Genet. Devel. 2000. V. 10. № 4. P. 399–404.
- Bradley D., Carpenter R., Copsey L. et al. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum* // Nature. 1996. V. 379. P. 791–797.
- Bradley D., Ratcliffe O., Vincent C. et al. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis* // Science. 1997. V. 275. P. 80–83.
- Buzgo M., Endress P. K. Floral structure and development of Acoraceae and its systematic relationships with basal angiosperms // Int. J. Plant Sci. 2000. V. 161. № 3. P. 23–41.
- Buzgo M., Soltis D. E., Soltis P. S., Ma H. Towards a comprehensive integration of morphological and genetic studies of floral development // Trends Plant. Sci. 2004. V. 9. P. 164–173.
- Coen E. S., Nugent J. M. Evolution of flowers and inflorescences // Development. 1994. V. 120. P. 107–116.
- Dahlgren R. M., Clifford H. T., Yeo P. F. The families of the monocotyledons. Berlin: Springer, 1985. 520 p.
- Gamerro J. C. Observaciones sobre la biología floral y morfología de la Potamogetonacea “*Ruppia cirrhosa*” (Petag.) Grande (= “*R. spiralis*” L. ex Dum.) // Darwiniana. 1968. T. 14. № 4. P. 575–607.
- Kaul B. R. Meristic and organogeneitic variation in *Ruppia occidentalis* and *R. maritima* // Int. J. Plant Sci. 1993. V. 154. № 3. P. 416–424.
- Lacroix C. R., Kemp J. R. Developmental morphology of the androecium and gynoecium in *Ruppia maritima* L.: considerations for pollination // Aquatic Bot. 1997. V. 59. P. 253–262.
- Liljegren S. J., Gustafson-Brown C., Pinyopich A. et al. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate // Plant Cell. 1999. V. 11. № 6. P. 1007–1018.
- Lock I. E., Ashurkova L. D., Belova O. A. et al. A continuum between open and closed inflorescences? Inflorescence tip variation in *Potamogeton* (Potamogetonaceae: Alismatales) // Wulfenia. 2009. V. 16. P. 33–50.
- Markgraf F. Blütenbau und Verwandtschaft der einfachen Helobiae // Ber. dt. Bot. Ges. 1936. Bd. 54. S. 191–229.
- Ordidge M., Chiurugwi T., Tooke F., Battey N. H. *LEAFY*, *TERMINAL FLOWER1*, and *AGAMOUS* are functionally conserved but do not regulate terminal flowering and floral determinacy in *Impatiens balsamina* // Plant Journ. 2005. V. 44. P. 1077–1082.

- Posluszny U., Sattler R.* Floral development of *Ruppia maritima* var. *maritima* // *Can. J. Bot.* 1974. V. 52. P. 1607–1612.
- Rudall P.J.* Fascicles and filamentous structures: Comparative ontogeny of morphological novelties in Triuridaceae // *Int. Journ. Plant Sci.* 2008. V. 169. P. 1023–1037.
- Singh V.* Morphological and anatomical studies in Helobiae. II. Vascular anatomy of the flower of Potamogetonaceae // *Bot. Gaz.* 1965. V. 126, № 2. P. 137–144.
- Sokoloff D.D., Oskolski A.A., Remizowa M.V., Nuraliev M.S.* Flower structure and development in *Tupidanthus calyptratus* (Araliaceae): An extreme case of polymery among asterids // *Plant Syst. Evol.* 2007. V. 268. P. 209–234.
- Sokoloff D.D., Rudall P.J., Remizowa M.V.* Flower-like terminal structures in racemose inflorescences: a tool in morphogenetic and evolutionary research // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57, № 13. P. 3517–3530.
- Tomlinson P.B.* Anatomy of the Monocotyledons. VII. Helobiae (Alismatidae) (including the seagrasses). Oxford: Clarendon Press, 1982. 522 p.
- Troll W.* Die Infloreszenzen. Typologie und Stellung im Aufbau des Vegetationskörpers. Jena: Fischer, 1964. 615 S.
- Uhl N.W.* Studies in the floral morphology and anatomy of certain members of the Helobiae: Ph.D. dissertation. Ithaca: Cornell University, 1947. 137 p.
- Verbeke J.A.* Fusion events during floral morphogenesis // *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992. V. 43. P. 583–589.
- Weberling F.* Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 423 p.
- Zhao L.-C., Wu Z.-Y.* A review on the taxonomy and evolution of *Ruppia* // *Journ. Syst. Evol.* 2008. V. 46. P. 467–478.

Morphogenetic Lability of Reproductive Structures in *Ruppia maritima* (Ruppiaceae, Alismatales): From Two Lateral Flowers to a Terminal Flower

I. E. Lock, D. D. Sokoloff, M. V. Remizowa

Faculty of Higher Plants, Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ingridlock@rambler.ru, sokoloff-v@yandex.ru, remizowa@yahoo.com

Abstract—Flowers of *Ruppia* are normally arranged into an open two-flowered spike, but sometimes the two lateral flowers are congenitally united with each other and form a terminal flower-like structure. This developmental abnormality resembles those described in well-investigated mutants of model organisms of developmental genetics such as *Arabidopsis* и *Antirrhinum*. A study of *Ruppia* allows investigating morphogenetic lability of this feature in natural populations. These data will be important for understanding evolutionary transitions between open and closed inflorescences. This paper presents first data on frequencies of terminal flower-like structures in natural populations of *Ruppia maritima* and first observations of their development. Vascular supply of inflorescences with free and united flowers is compared for the first time. Strong differences in frequencies of occurrence of terminal flower-like structures among examined natural populations are revealed. Data on variation of organ numbers in flowers of plants from different populations allow hypothesizing that increased size of floral primordia is a factor that plays a role in their amalgamation into a joint primordium of a terminal structure. Vascular system of inflorescences of *R. maritima* with united flowers is quite similar to the vascular system of a flower and nothing contradicts a hypothesis on terminal position of this structure. Transversally inserted stamens in inflorescences with united flowers are usually of inverted polarity. This appears to be the first documented example of an inversion of relative polarity of stamens and carpels in angiosperms.

Keywords: development, inversion of polarity, congenital fusion, inflorescence, terminal flower-like structure, fasciation, flower, *Ruppia*

УДК 591.3:598.2

РАЗВИТИЕ И МЕТАБОЛИЗМ ЗАРОДЫШЕЙ КУРИЦЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ПРИ ЗВУКОВОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2011 г. И. Б. Солдатова

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: ira-soldatova@mail.ru

Поступила в редакцию: 12.10.10

Окончательный вариант получен: 20.01.11

Выявлено влияние акустического воздействия на процессы метаболизма в последние сутки инкубации эмбрионов домашней курицы. Показано, что возникающие под действием акустических сигналов изменения приводят к сокращению времени инкубации. В результате акустической гиперстимуляции газообмен и рост эмбриона продолжают следовать степенной зависимости, характерной для более раннего периода эмбриогенеза, т.е. снимается депрессия, свойственная этим процессам в конце инкубации. У акустически стимулированных эмбрионов наблюдается тенденция к снижению суммарных затрат энергии на прирост и метаболизм в период с 17 суток инкубации и до вылупления, но суточные затраты на энергетический обмен и прирост при акустическом воздействии больше, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: онтогенез птиц, метаболизм, акустическая стимуляция

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появляется все больше свидетельств о влиянии внешней среды в целом и акустической сенсорной стимуляции в частности на развитие эмбрионов птиц (Тихонов и др., 1985, 1988; Голубева, 1993; Golubeva, 1997a; Голубева, 2006; Vince, 1966).

Анализ ранних поведенческих реакций птиц с различными типами онтогенеза показывает, что акустическая стимуляция при коммуникации как родителей и эмбрионов, так и sibлингов, является пусковым и ведущим стимулом целого ряда функциональных систем, обеспечивающих поддержание гомеостаза организма, и которые условно можно обозначить как системы “достижения комфортного состояния”. Эти системы включают пищевое поведение, дыхание, терморегуляторное поведение и т.д.

Влияние акустической стимуляции проявляется в формировании слуховой системы на всех уровнях слухового анализатора (Голубева, 1980, 1984, 1987, 2006; Александров и др., 1994; Golubeva, 1997a, b) и сказывается на общем развитии организма (Тихонов и др., 1985; 1988).

Естественная акустическая стимуляция является необходимым условием нормального течения раннего онтогенеза. Акустические влияния в норме обеспечивают родители и сами эмбрионы. В процессе становления чувствительности слуха птиц особенно значимыми оказываются появления собственной громкой вокализации, необходи-

мой для нормального развития слуха (Gottlieb, 1965, 1971) и усиление акустической коммуникации с родителями. Это событие знаменует начало интенсивного и, одновременно, сенситивного периода развития слуха, в течение которого происходит настройка слуховой системы на видоспецифическую акустическую среду. У выводковых этот период приходится на время с момента выхода клюва в воздушную камеру яйца и до вылупления.

Первый акустический сигнал эмбриона – писк. Почти одновременно с первыми писками в репертуаре эмбрионов появляются щелчки. Уже давно обнаружено, что щелчки играют значимую функциональную роль в обеспечении синхронизации вылупления у выводковых (Vince, 1966, 1969, 1973; Ильичев, Тихонов, 1979; Golubeva, Tikhonov, 1985). Эмбрионы способны подстраивать дыхательный ритм под ритм излучения щелчков, превышающий их собственный. Увеличение ритма ведет к интенсификации дыхания (Vince, 1966) и метаболизма в целом.

Первые писки, а затем и щелчки появляются еще до выхода клюва эмбриона в воздушную камеру яйца (за счет образующихся в амнионе пузырьков газа). Они имеют очень низкую интенсивность, весьма нерегулярны и вряд ли способны оказывать влияние на других эмбрионов. После выхода клюва эмбриона в воздушную камеру яйца вокализация эмбриона выводковых резко активизируется. Возрастает громкость писков и щелчков, увеличивается частота их издавания. С момента проклева скорлуповой оболочки и перехода эм-

бриона к дыханию атмосферным воздухом, акустические сигналы приобретают ритмическую организацию, образуют серии, состоящие из нескольких импульсов. Щелчки становятся регуляторами.

Инкубация в искусственных условиях лишает эмбриона полного объема естественной акустической стимуляции, доступна только собственная вокализация. Поэтому использование щелчков является одним из способов восполнить дефицит акустической стимуляции. Однако до сих пор не ясно, как влияют на развитие эмбрионов стимуляция, отличающаяся по интенсивности от естественной.

Цель нашей работы – изучение влияния акустической стимуляции, которая по интенсивности и суммарной длительности превышает значения параметров, имеющих место в естественных условиях, на развитие, рост и уровень метаболизма эмбрионов курицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы эмбрионы кур кросса Беларусь-9 – гибрид серой калифорнийской курицы и леггорна. Инкубацию яиц с первого дня проводили в термостатах ТС-80 при температуре 37.5°C и влажности 70%. Яйца поворачивали не менее двух раз в сутки. Свежий воздух подавали в термостат компрессором МК-Л1М. Определение массы тела и уровня метаболизма проводили ежедневно в контрольной и экспериментальной группах, используя по 8–9 эмбрионов в каждой (всего было 90 эмбрионов).

Для расчета скорости роста в период с 6-х по 17-е сутки инкубации применяли формулу:

$$M_{(t)} \approx (mNt)^{1/m}, \quad (1)$$

где $M_{(t)}$ – масса особи в любой момент времени t в (граммах сырой массы); N , m – параметры роста (см. Солдатова, 2004).

За четыре дня до вылупления (на 17-й день инкубации) эмбрионов разделяли на две группы. Опытную группу яиц инкубировали в отдельном термостате и подвергали непрерывному акустическому воздействию вплоть до вывода птенцов. В качестве раздражителей применяли щелчки (3 импульса в минуту, давление 80 дБ), имитирующие щелкающие звуки эмбрионов, но по интенсивности значительно их превышающие. Для генерации сигналов использовали систему из электростимулятора ЭСЛ-3 и акустической колонки IAC, размещенной в термостате.

В контрольной группе искусственной акустической стимуляции не проводили. Эмбрионов инкубировали в условиях, когда источником акустического воздействия были только они сами (без родителей).

С помощью газового хроматографа ЛХМ-8МД определяли выделение углекислого газа ежедневно у всех эмбрионов с 13-х суток до вылупления. Для этого эмбриона помещали в замкнутый сосуд, в котором определяли содержание газов в момент помещения в него эмбриона и через 15 минут.

Достоверность различий в контрольной и опытной группах проверяли тестом Манна-Уитни в программе Statistica 6.0.

Для обеих групп эмбрионов определяли коэффициент K_2 , предложенный Ивлевым (1939) и часто используемый в работах разных авторов (Винберг, 1966). Коэффициент рассчитывают как отношение прироста в мерах энергии к сумме энергетических эквивалентов прироста и уровня газообмена или к величине ассимилированной пищи. Энергетическую ценность эмбрионов и желточных мешков определяли по М.Д. Ильину (1917) и А. Романову (Romanoff, 1932). Для перехода к энергетическим единицам использовали следующие коэффициенты перехода: дыхательный коэффициент 0.7 (Каменский, 1988; Needham, 1931) и оксикалорийный коэффициент, равный 20.36 кДж/л, энергетическая ценность сухой массы в среднем 25.14 кДж/г, и отношение сухой массы эмбриона к сырой массе – 0.19. Для желточных мешков отношение сухой массы к сырой на 17-е сутки эмбриогенеза составляет 0.651, на 18-е – 0.595, на 19-е – 0.5807, на 20-е – 0.571. Калорийностьграмма сухой массы желточного мешка равна 7 ккал.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Энергетический уровень метаболизма эмбрионов курицы. Известно, что для описания зависимости энергетического уровня метаболизма от массы тела для особей из различных систематических групп применяют степенную функцию (Винберг, 1956; Ивлев, 1966; Зотин, Зотина, 1993). Это относится как к эмбриональному развитию разных видов птиц (Болотников и др., 1985; Зотин, Зотина, 1993; Ricklefs, Starck, 1998; Ricklefs, 2006), так и к постнатальному развитию птиц (Зотин, Зотина, 1993; Gavrilov, Dolnik, 1985). Эта зависимость подтвердилась (как по поглощению кислорода, так и по выделению углекислого газа) и при обработке нами данных по газообмену эмбрионов кур, приводимых другими авторами (Romanoff, 1941, 1943, 1967; Рольник, Портенко, 1964). Однако в последние дни инкубации отмечены заметные отклонения от степенной зависимости, связанные с уменьшением уровня метаболизма. Это явление называют фазой плато (Vleck, Bucher, 1998) или депрессией (Рольник, 1968). После проклева уровень метаболизма резко возрастает.

На основании наших данных по газообмену, мы рассчитали зависимость выделения углекислого газа от времени инкубации. Для периода с 13-х по

Таблица 1. Уровень метаболизма (по выделению CO₂ мл/час) куриных эмбрионов в контроле и при акустическом воздействии

В контроле					При акустическом воздействии			
<i>t</i> , сут	<i>M</i> , г	CO _{2и} ¹	CO _{2р} ²	CO _{2и} /CO _{2р}	<i>M</i> , г	CO _{2и}	CO _{2р}	CO _{2и} /CO _{2р}
17	21.3	18.56	20.20	91.9%	21.3	19.17	20.20	94.9%
18	26.5	18.76	23.04	81.4%	27.3	23.62	23.45	100.7%
19	30.2	22.66	24.92	90.9%	32.9	34.75	26.23	132.5%
20	34.7	32.54	27.09	120.1%	—	—	—	—

M, г – сырая масса в граммах.

¹ – измеренное значение.

² – рассчитанное по формуле (2).

Таблица 2. Характеристики роста массы тела эмбрионов кур в последние дни инкубации в контроле и при акустическом воздействии

В контроле							При акустическом воздействии			
<i>t</i> , сут	<i>M</i> _и ¹ , г	<i>M</i> _р ² , г	<i>M</i> _и / <i>M</i> _р %	<i>P</i> _и , г	<i>P</i> _р , г	<i>P</i> _и / <i>M</i> _и	<i>M</i> _и , г	<i>M</i> _и / <i>M</i> _р %	<i>P</i> _и , г	<i>P</i> _и / <i>M</i> _и
17	21.3	22.1	96.5	—	—	—	21.3	96.5	—	—
18	26.5	27.3	97.2	5.2	5.2	0.22	27.8	101.8	6.5	0.26
19	30.2	33.3	90.7	3.7	6.1	0.13	33.2	99.7	5.4	0.16
20	34.7	40.2	86.2	4.5	6.9	0.14	—	—	—	—

¹ – измеренное значение массы в граммах.

² – рассчитанное по формуле (1) значение массы.

P – прирост в граммах.

P/*M* – удельный прирост.

16-е сутки уровень выделяемого углекислого газа имеет тенденцию следования параболической зависимости: в логарифмическом масштабе зависимость приобретает линейный характер.

Расчеты показали следующую зависимость уровня выделяемого углекислого газа (*Q*) от массы тела эмбриона (*M*) в исследуемом интервале (13–16 суток инкубации):

$$Q = 3.21 M^{0.601} \text{ мл/час}^* . \quad (2)$$

На 17-е сутки отмечено незначительное (8%) уменьшение уровня газообмена относительно расчетной величины (табл. 1). Максимальное понижение уровня газообмена проявляется на 18 сутки инкубации (19%). Эффект снижения уровня выделения углекислого газа от расчетной величины сохраняется и на 19-е сутки, но он менее выражен – 9%. На 20-е сутки инкубации выделение углекислого газа превышает предсказываемое значение на 20%.

Вылупление куриных эмбрионов, подвергающихся акустическому воздействию щелчками (с 17-х суток инкубации), происходит на 20-е сутки

инкубации – на сутки раньше, чем в контрольных условиях. Метаболизм озвученных эмбрионов отличается от такового в контроле. Отличие состоит в том, что выделение углекислого газа на 18-е сутки инкубации сходно с его расчетным значением по формуле, т.е. скорость метаболизма не замедляется. В последний день инкубации у озвученных эмбрионов (на 19-е сутки) также отмечается превышение уровня выделения углекислого газа относительно расчетной величины, но в большей степени – на 32% (табл. 1). Уровни выделения CO₂ в опыте и контроле достоверно отличаются (*u*-тест Манна-Уитни для 18-х суток эмбриогенеза $z = 2.3, p = 0.02; n = 9$; для 19-х суток $z = 3.13, p = 0.001; n = 9$).

Изменение скорости роста массы тела эмбрионов. Прирост массы тела эмбрионов в последние трое суток инкубации в контрольных условиях имеет тенденцию к снижению.

По нашим данным на 17–18 сутки инкубации снижение скорости роста только намечается (табл. 2), составляя лишь несколько процентов от величины, которая была рассчитана нами по фор-

Таблица 3. Энергетические затраты на прирост и уровень метаболизма в последние дни инкубации в норме и при акустическом воздействии (кДж)

Показатель	В контроле		При акустическом воздействии	
	Суммарные траты 17–20 сут, кДж	Среднесуточные траты, кДж	Суммарные траты 17–19 сут, кДж	Среднесуточные траты, кДж
Прирост	63.77 ($n = 9$)	21.24	58.87 ($n = 9$)	29.43
Энергетический метаболизм	64.61	21.54	54.13	27.07
Энергетическая ценность эмбриона на момент вылупления	165.13		158.97	
Энергетическая ценность желточного мешка на момент вылупления	112.92		122.14	
K_2	0.497		0.521	

муле роста (1), полученной для 6–17 суток инкубации. На 19-е сутки инкубации отмечено явное снижение темпа роста массы эмбриона (на 10%), а в последний день инкубации (20-е сутки) спад достигает 14%.

Оценить степень изменения скорости роста можно по таким его характеристикам как прирост (P) и относительный прирост (P/M). В контрольной группе средняя величина прироста с 17-х по 20-е сутки эмбриогенеза на 26% ниже расчетной, а относительный прирост – на 18% ниже.

При акустическом воздействии щелчками в период с 17-х по 19-е сутки инкубации, величины всех характеристик роста отличаются от контроля. На 18-е сутки эти различия еще не достоверны, на 19-е сутки массы эмбрионов достоверно отличаются (u -тест Манна-Уитни: $z = 2.3, p = 0.018; n = 7$). Из данных таблицы 2 следует, что прирост и относительный прирост массы близки к расчетным значениям по формулам роста (1). Небольшие наблюдаемые различия статистически незначимы. Следовательно, рост массы эмбрионов при акустическом воздействии щелчками в последние дни инкубации продолжает следовать зависимости (1), определенной для периода с 6-х по 17-е сутки инкубации.

Итак, принципиальное отличие уровня метаболизма и характера роста эмбрионов в последние дни инкубации при акустическом воздействии состоит в отсутствии замедления, свойственного процессам развития эмбрионов курицы при искусственной инкубации в конце эмбрионального периода. При акустическом воздействии, проводимом нами, эмбрионы вылупляются на сутки раньше.

Результатом изменения продолжительности инкубации и уровня метаболизма у эмбриона является то, что суммарные траты на обмен, определяемые нами по выделению CO_2 , при акустическом воздействии с 17 дня инкубации до проклева скорлупы равны 1.880 л, а в контроле – 2.221 л (по u -тесту Манна-Уитни различия достоверны: $z = 2.88, p = 0.004$).

Используя дыхательный коэффициент 0.7, получаем, что за рассматриваемый период потребление O_2 озвученными и контрольными эмбрионами составляет 2.680 и 3.173 л соответственно.

Соотношение между процессами роста и метаболизма. Как следует из таблицы 3, экспериментальный эмбрион затрачивает на прирост при акустическом воздействии на 4.9 кДж, а в целом на метаболизм на 10.48 кДж меньше энергии, чем в контроле. Энергетическая ценность эмбриона к моменту вылупления при акустическом воздействии на 6.76 кДж ниже, чем в контроле, а энергетическая ценность желточного мешка выше. Эти данные показывают, что акустически стимулированные эмбрионы к моменту вылупления (к 20-му дню инкубации) в меньшей степени растравили запасы желтка, чем контрольные эмбрионы (к 21-му дню инкубации). Среднее значение коэффициента K_2 за период наблюдений имеет тенденцию к некоторому повышению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При инкубации эмбрионов курицы в нормальных условиях в конце эмбрионального периода отмечено снижение интенсивности метаболизма и роста. Скорость газообмена растет примерно в течение 80% инкубации по степенной зависимости.

Затем эта зависимость нарушается – уровень газообмена снижается.

Данная особенность отмечена как у куриных эмбрионов, так и у эмбрионов других видов выводковых птиц (Romanof, 1967; Каменский, 1988; Болотников и др., 1985; Astheimer, 1991; Prinzing et al. 1995; Pearson et al., 2002). После выхода клюва в воздушную камеру метаболизм резко возрастает. Эффект снижения характерен и для процесса роста, но он продолжается вплоть до вылупления птенца.

В течение 17–18 суток инкубации, когда начинает снижаться скорость газообмена (табл.1), дыхание эмбриона осуществляется хориоаллантоисом посредством диффузии, на 19-е сутки происходит некоторое увеличение уровня метаболизма, что обусловлено проколом подскорлуповой оболочки и возможностью получения кислорода из воздушной камеры яйца. С этого момента осуществляется постепенный переход от газообмена с помощью хориоаллантоиса к легочному дыханию, переход от пассивного к активному транспорту газов (Ран, Паганели, 1983). Резкий подъем скорости газообмена на 20-е сутки инкубации связан с проколом скорлупы и доступом эмбриона к атмосферному воздуху.

Снижение уровня метаболизма с 17-х по 19-е сутки и роста по 20-е сутки инкубации обусловлено накоплением углекислого газа и снижением парциального давления кислорода в воздушной камере яйца и в крови эмбриона (Рольник, 1968). Кроме того, замедление темпов роста связано с относительно малой подвижностью эмбрионов на этой стадии, поскольку они обладают уже весьма развитой мышечной системой, но скованы в движениях пространством яйца (Windle, 1940). Зависимость роста от мышечной активности в постнатальном эмбриогенезе млекопитающих показал Аршавский (1967).

В последние дни инкубации включаются новые каналы афферентации, прежде всего, зрительного анализатора, активизируется мозговая деятельность, начинается этап быстрого развития слуха. Пороги слуховой чувствительности в это время стремительно понижаются, слуховая система оказывается очень чувствительна к любому акустическому воздействию. Работа различных функциональных систем замедляет темпы роста (Coper, Vakhuis, 1969; Хаютин, Дмитриева, 1991; Голубева, 1994). Аналогичную точку зрения высказал ранее И.И. Шмальгаузен (1935). Анализируя связь между процессами роста и дифференцировки морфологических и гистологических структур самых различных систематических групп животных, в том числе и эмбрионов кур, И.И. Шмальгаузен пришел к выводу, что в периоды усиленной дифференцировки рост оказывается заторможенным.

При акустическом воздействии щелчками в период с 17-х суток эмбриогенеза до ускоренного вылупления на 20-е сутки снижения уровня газообмена и темпов роста не отмечено. Прирост массы и скорость метаболизма на 18-сутки соответствует зависимостям, определенным для 6–17-х суток инкубации. На 19-е сутки эмбриогенеза происходит резкое возрастание процессов метаболизма.

Известно, что акустическая стимуляция щелчками ускоряет частоту дыхания эмбрионов (Vince, 1973; Vince et al., 1976). Поэтому одну из причин повышения темпа роста массы тела и уровня обмена по сравнению с контролем мы видим именно в этом. Дополнительный приток видоспецифической афферентации способствует ускоренному развитию сенсорных механизмов и моторных координаций. Следствием этого являются сдвиги критических периодов развития на более ранние сроки и сокращение их продолжительности (Хаютин, Дмитриева, 1991).

Таким образом, выявлено заметное влияние акустического воздействия на все изученные процессы в последние сутки инкубации. Возникающие под действием акустических сигналов изменения приводят к сокращению времени инкубации. Газообмен и рост эмбриона продолжают следовать степенной зависимости, характерной для более раннего периода эмбриогенеза, т.е. снимается депрессия, свойственная этим процессам в конце инкубации. В результате этих изменений наблюдается тенденция к снижению суммарных затрат энергии на прирост и метаболизм в период с 17-х суток инкубации и до вылупления, но суточные затраты на энергетический обмен и прирост при акустическом воздействии больше, чем в контрольной группе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров Л.И., Хаютин С.Н., Корнеева Е.В.* Влияние видовой песни на формирование слуховой чувствительности птенцов мухоловки-пеструшки. // Орнитология. М.: изд-во МГУ, 1994. В. 26. С. 200–201.
- Аршавский И.А.* Очерки по возрастной физиологии. М.: Медицина, 1967. 476 с.
- Болотников А.М., Шураков А.И., Каменский Ю.Н., Добринский Л.Н.* Экология раннего онтогенеза птиц. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1985, 228 с.
- Винберг Г.Г.* Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1956. 253 с.
- Винберг Г.Г.* Скорость роста и интенсивность обмена у животных // Успехи соврем. биологии, 1966. Т. 61. Вып. 2. С. 274–293.
- Голубева Т.Б.* Развитие слуха птиц в онтогенезе // Сенсорные системы и головной мозг птиц. М.: Наука, 1980. С. 113–138.

- Голубева Т.Б.* Этапы развития чувствительности слуха // Орнитология. М.: Изд-во МГУ, 1984а. Вып. 19. С. 158–163.
- Голубева Т.Б.* Роль акустической стимуляции в развитии слуховой чувствительности и поведении птиц в раннем онтогенезе // Роль сенсорного притока в созревании функций мозга, М.: Наука, 1987. С. 183–188.
- Голубева Т.Б.* Диапазон слуха и количество стереоцилий на волосковых клетках слухового эпителия развивающейся улитки птиц // ДАН. 1993. Т. 332. № 2. С. 261–263.
- Голубева Т.Б.* Задержка в развитии слуха и смена ведущих афферентаций в раннем онтогенезе поведения птиц // Журн. ВНД. 1994. Т. 44. Вып. 6. С. 992–1003.
- Голубева Т.Б.* Сенсорное обеспечение ранней акустической коммуникации выводковых и птенцовых птиц // Развитие современной орнитологии в Северной Евразии. Труды XII международной орнитологической конференции Северной Евразии. Ставрополь: СГУ, 2006. С. 600–625.
- Зотин А.И., Зотина Р.С.* Феноменологическая теория развития, роста и старения организмов. М.: Наука, 1993. 364 с.
- Ильин М.Д.* Исследования по развитию зародыша куриного яйца. Петроград: Сельский вестник, 1917. 115 с.
- Ильичев В.Д., Тихонов А.В.* Биологические основы управлением поведения птиц. Куриные (Galliformes) // Зоол. журн. 1979. Т. 58. Вып. 7. С. 1021–1032.
- Каменский Ю.Н.* Газообмен и особенности энергетических реакций на температуру в раннем онтогенезе птиц. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Свердловск, 1988. 33 с.
- Ран Г. Ар. Ф., Паганелли Ч.* Как дышат яйца птиц // Птицы. М.: Мир, 1983. С. 230–242.
- Рольник В.В.* Биология эмбрионального развития птиц. Л.: Наука, 1968. 424 с.
- Рольник В.В., Портенко Э.Л.* Газообмен развивающегося куриного эмбриона // Общ. биол. Т. 25. С. 2–133.
- Солдатова И.Б.* Описание закономерностей роста эмбрионов птиц (на примере домашней курицы) при помощи модели Берталанфи // Орнитология. М.: Изд-во МГУ, 2004б. Вып. 31. С. 200–210.
- Тихонов А.В., Моренков Э.Д., Кравченко Н.П., Савицкий С.С.* Факторы и механизмы ускорения эмбрионального развития и синхронизация вылупления птенцов при естественной и искусственной инкубации // Экология и управление поведением птиц. М.: 1985. С. 99–121.
- Тихонов А.В., Солдатова И.Б., Моренков Э.Д.* Влияние акустической стимуляции на физиологические процессы в плодный период эмбриогенеза выводковых птиц // Биологические науки, МГУ, 1988. № 7. С. 58–62.
- Хаяутин С.Н., Дмитриева Л.П.* Организация раннего видоспецифического поведения. М.: Наука, 1991. 229 с.
- Шмальгаузен И.И.* Рост и дифференцировка // Рост животных. М.: Биомедгиз, 1935. С. 74–84.
- Astheimer L.B.* Embryo metabolism and egg neglect in Cassin's Auklets // Condor. 1991. V. 93. P. 486–495.
- Corner M.A., Bakhuis W.L.* Developmental patterns in the central nervous system of birds. V. Cerebral electrical activity, forebrain function and behavior in the chick at the time of hatching // Brain Res. 1969. V. 13. P. 541–555.
- Gavrilov V.M., Dolnik V.R.* Basal metabolic rate, thermoregulation and existence energy in birds: world data // Acta XVIII Congressus Internationalis Ornithologici. 1985. P. 412–466.
- Golubeva T.B.* Type of ontogeny and species-specific stimulation in the development of auditory sensitivity in birds // Phisyology and General Biology Revue. Amsterdam, L.: Harwood Academic Publishers. 1997a. V. 12. Part 1. P. 1–106.
- Golubeva T.B.* Development of the basilar papilla and hearing sensitivity in birds // Phisyology and General Biology Revue. L.: Harwood Academic Publishers. 1997b. V. 12. P. 107–201.
- Golubeva T.B., Tikhonov A.V.* The voice and hearing of birds in onthogeny // Acta XVIII Congressus Internationalis Ornithologici. M.: Nauka, 1985. V. 1. P. 259–274.
- Gottlieb G.* Prenatal auditory sensitivity in chickens and ducks // Science. 1965. V. 147. № 3665. P. 1596–1598.
- Gottlieb G.* Development of Species Identification in Birds. An Inquiry Into the Prenatal Determinants or Perception. Chicago, L.: University of Chicago Press, 1971. 176 p.
- Needham J.* Chemical embryology. Cambridge, University Press. 1931. V. 1–2. 1253 p.
- Pearson J.T., Seymour1 R.S., Baudinette1 R.V., Runciman S.* Respiration and energetics of embryonic development in a large altricial bird, the Australian pelican (*Pelecanus conspicillatus*) // J. Exper. Biol. 2002. V. 205. P. 2925–2933.
- Prinzinger R., Schmidt M., Dietz V.* Embryogeny of oxygen consumption in 13 altricial and precocial birds // Respiration Physiology. 1995. V. 100. № 3. P. 283–287.
- Ricklefs R.E.* Embryo development and ageing in birds and mammals // Proc. R. Soc. B. 2006. V. 273. P. 2077–2082.
- Ricklefs R.E., Starck J.M.* Avian embryonic growth. Avian Growth and Development. Evolution within the Altricial-Precocial Spectrum. Oxford University Press, N.Y., 1998. P. 31–58.
- Romanoff A.L.* Fat Metabolism of the Chick Embryo under Standard Conditions of Artificial Incubation. // Biol. Bull. 1932. V. 62. № 1. P. 54–62.
- Romanoff A.L.* Biochemistry of the avian embryo. A Quantitative Analysis of Prenatal Development. John Wiley and Sons. N.Y., 1967. 397 p.
- Vince M.* Potential stimulation produced by avian embryos // Anim. Behav. 1966. V. 14. P. 34–40.
- Vince M.* Embryonic communication, respiration and the synchronization oh hatching // Bird Vocalization. Cambridge Univ. Press. 1969. P. 233–260.
- Vince M.* Some environmental effects on the activity and development of the avian embryo // Behavioral embryology. Academic Press. 1973. V. 1. P. 268–321.
- Vince M., Reader M., Tolhurst B.* Effect stimulation on embryonic activity in the chick // J. Comp. Physiol. Psychol. 1976. V. 90. P. 221–236.
- Windle W.F.* Physioldogy of the fetus. Philadelphia, Saunders Co. 1940. 249 p.
- Vleck C.M., Bucher T.L.* Energy metabolism, gas exchange, and ventilation // Avian growth and development. N.Y., Oxford, 1998. P. 89–116.

Development and Metabolism of Chicken Embryos in the Prenatal Period under Acoustic Stimulation

I. B. Soldatova

*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ira-soldatova@mail.ru*

Abstract—Acoustic influence on the metabolic process in the last days of incubation of embryos of domestic chicken was found. It was shown that the changes that appear under the influence of acoustic signals lead to a decrease in incubation time. As a result of acoustic hyperstimulation, gaseous exchange and growth of the embryo continue to follow a power dependence characteristic of an earlier period of embryogenesis, i.e., the depression typical of these processes in the end of incubation is arrested. In acoustically stimulated embryos, a tendency toward a decrease in the total energy expenses on growth and metabolism is observed in the period from 17 days of incubation up to hatching, but the daily expenses on energetic exchange and growth are higher under acoustic influence than in the control group.

Keywords: ontogenesis of birds, metabolism, acoustic stimulation

УДК 575.16:581.44:573.22

РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *APETALA1* НА РАЗВИТИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ В ЦВЕТКАХ МУТАНТА

abruptus Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.¹

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол, Е. В. Куприянова*, Т. А. Ежова*

Тывинский государственный университет

667000 Кызыл, ул. Ленина, д. 36

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: arabidopsis2004@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.09

Окончательный вариант получен 25.02.10

Ген *A. thaliana APETALA1 (AP1)* кодирует белок MADS-белок типа II с доменами MADS, I, K и C. Роль K- и C-доменов в функционировании белка AP1 исследована недостаточно. Анализ фенотипического проявления мутаций, нарушающих активность разных доменов белкового продукта, позволяет получать информацию о функции доменов, а, значит, и о структурно-функциональной организации гена. Нами проведено изучение влияния на морфологию цветка мутанта *abr* (аллель гена *ABRUPTUS/PINOID*) мутантных аллелей гена *AP1*, белковые продукты которых предположительно лишены функционально активного домена K (*ap1-20*), доменов K и C (*ap1-1* и *ap1-6*), домена C (*ap1-3*). Обнаружено, что в отличие от *ap1-20*, аллели *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-1* приводят к редукции числа генеративных органов в цветках двойных мутантов *abr ap1-3*, *abr ap1-6* и *abr ap1-1*. Высказано предположение, что C-домен белка AP1 предотвращает нарушение детерминации типа репродуктивных органов при эктопической экспрессии гена *AP1* во внутренних мутовках цветка мутанта *abr*.

Ключевые слова: развитие цветка, взаимодействие генов *APETALA1* и *ABRUPTUS/PINOID*, мутанты, *Arabidopsis thaliana*.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие органов цветка – сложный процесс, который начинается с этапа детерминации типа органов и следующего за ним этапа разметки их положения (Скрябин и др., 2006). У модельного растения *A. thaliana* тип органов цветка определяется экспрессирующимися в перекрывающихся участках флоральной меристемы гомеозисными генами ABC-классов. Продукты генов A-класса *APETALA1* и *APETALA2 (AP1 и AP2)* детерминируют развитие чашелистиков и, взаимодействуя с продуктами генов B-класса *APETALA3* и *PISTILLATA (AP3 и PI)*, – лепестков. Ген C-класса *AGAMOUS (AG)* детерминирует репродуктивные органы внутренних мутовок, причем при развитии тычинок белок AG взаимодействует с белками AP3 и PI (Соен, Meyerowitz, 1991).

Ген *AP1* кодирует MADS-ген типа II, продукт которого содержащие домены MADS, I, K и C (Mandel et al., 1992). Функциональная специфич-

ность белка AP1 в регуляции развития органов околоцветника определяется главным образом MADS- и I-доменами, причем MADS-домен участвует в связывании с ДНК и, вместе с I-доменом, в димеризации MADS-белков. Домены K и C также важны для функционирования AP1, хотя их роль менее ясна (Krizek, Meyerowitz, 1996). K-домен участвует в димеризации ряда MADS-белков и/или стабилизации взаимодействия между ними, однако его функция в димеризации AP1 не является обязательной (Riechmann et al., 1996). C-домен белка AP1 в системе *in vitro* проявляет функцию транскрипционного активатора (Cho et al., 1999). Недавно показано также, что C-домен AP1 участвует в образовании комплекса с белками SEUSS (SEU) и LEUNIG (LUG), который репрессирует транскрипцию *AG* в наружных мутовках, обеспечивая нормальное развитие околоцветника (Sridhar et al., 2006).

Место положения органов цветка определяется скоплением локальных концентраций ауксина, которые создаются благодаря активности генов, контролирующих полярный транспорт ауксина, в том числе гена *ABRUPTUS/PINOID*

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований.

(*ABR/PID*), кодирующего серин-треаниновую протеинкиназу (Christensen et al., 2000). Ген *ABR/PID* комплементарно взаимодействует с геном *API* при образовании чашелистиков и лепестков и ограничивает транскрипцию гена *API* органами околоцветника. В цветках мутанта *abr* ген *API* экспрессируется не только в околоцветнике, но и в репродуктивных органах. Цветки двойного мутанта *abr ap1-1* практически не имеют околоцветника и характеризуются существенной редукцией числа репродуктивных органов. Предполагается, что редукция числа тычинок и плодоловостиков связана с нарушением определения типа органов во внутренних мутовках из-за эктопической транскрипции мутантного аллеля в репродуктивных органах двойного мутанта (Кавай-оол и др., 2010).

В данной работе продолжено изучение влияния мутантных аллелей гена *API* на развитие репродуктивных органов цветка мутанта *abr* и приведены результаты изучения структуры цветка еще трех двойных мутантов *abr ap1-3*, *abr ap1-6* и *abr ap1-20*. Показано, что редукция репродуктивных органов в цветке не наблюдается только в цветках двойных мутантов, содержащих аллель *ap1-20* с функционально активным С-доменом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и анализ морфологии цветка. В работе использовали мутанты *abr* (линия К-150, полученная на основе расы Dijon-M) и *ap1-20* (линия К-200) из коллекции кафедры генетики МГУ, а также мутанты *ap1-3* и *ap1-6* из коллекции *Arabidopsis* Biological Resource Centre (<http://arabidopsis.org/abrc/>), которые трижды скрещивали с растениями расы Dijon-M для получения однородного генотипического фона. Двойные мутанты, получали от скрещиваний мутанта *abr* с растениями аллельных мутантов *ap1-20*, *ap1-3* и *ap1-6*. Анализ проводили на 5-ти нижних цветках растений двойных мутантов поколений F₃–F₅, выращенных в условиях теплицы. Среднее число органов цветка рассчитывали на выборке из 10 растений, анализируя с 1-го по 5-й цветки на главном цветonoсе. Сканирующее электронное микроскопирование проводили как описано ранее (Ондар и др., 2008).

Анализ последовательности ДНК и кДНК гена API у мутанта ap1-6

Выделение ДНК проводили из соцветий дикого типа и мутанта *ap1-6* (по Dellaporta et al., 1983, с модификациями). Для амплификации ДНК использовали следующие праймеры: 5'-GCTCAT-TGATGGACTCGTACA-3', 5'-СТТАТТГСАСТ-GAGTCCGA-3'. Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной обработкой ДНКазой с помо-

щью RNase-Free DNase Set (Qiagen, Германия). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15Т праймером (Silex, Россия). Для выявления альтернативно сплайсированных форм проводили ПЦР-анализ полученной кДНК с использованием следующей пары праймеров: 5'-САТСТ-ТСТТГАТАСАГАСАССАТ-3' и 5'-ГТАТАА-САГГСТТААГГСТААГАТТГАГ-3'.

Положение праймеров указано на рис. 2. Продукты ПЦР анализировали в агарозном геле (рис. 3) Анализ проводили в 2-х повторностях. Полученные после амплификации фрагменты ДНК и кДНК очищали, клонировали в рAL-TA вектор и далее секвенировали. Секвенирование последовательностей клонированных ПЦР-продуктов проводилось в ЦКП "Геном".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цветки исходных одиночных мутантов характеризуются изменением числа органов околоцветника. В цветках мутанта *abr* среднее число чашелистиков ниже (3.0), а лепестков – выше (5.3), чем у дикого типа (по 4 органа в I и II-ой мутовке). Мутанты *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-20* имели сниженное число органов во I-ой и II-ой мутовках (рис. 1а). В цветках двойных мутантов редукция органов околоцветника, которые были представлены в основном листьями и брактееми (как и у одиночных мутантов *ap1*), выражена сильнее, чем в родительских формах (рис. 1а). Эти данные находятся в соответствии с выявленной ранее редукцией органов околоцветника у двойного мутанта *abr ap1-1* (Кавай-оол и др., 2010) и подтверждают вывод о комплементарном взаимодействии генов *API* и *ABR/PID* в контроле развития околоцветника.

Отметим, что во II-ой мутовке у всех двойных мутантов среди единичных органов преобладали лепестки и лепесткоподобные органы, доля которых была выше, чем у исходных одиночных мутантов (рис. 1а). Даже у ранее исследованного *abr ap1-1* лепестки, которые вообще не развивались у одиночного мутанта *ap1-1*, составляли 16% от всех органов (рис. 1б). Эти данные свидетельствуют о частичном восстановлении в цветках двойного мутанта функции определения типа органов околоцветника гена *API*, которое связано главным образом с функциональной активностью MADS и I доменов (Krizek, Meyerowitz, 1996; Riechmann et al., 1996) и, по-видимому, объясняется выявленным ранее усилением экспрессии этого гена при нарушении работы гена *ABR* (Кавай-оол и др., 2010).

Наиболее интересные отличия между двойными мутантами наблюдали по числу репродуктивных органов. Как и у ранее изученного мутанта *abr ap1-1*, у *abr ap1-3* и *abr ap1-6* наблюдали редукцию числа тычинок и плодоловостиков не только по сравнению с мутантами *ap1* (у *ap1-20* несколь-

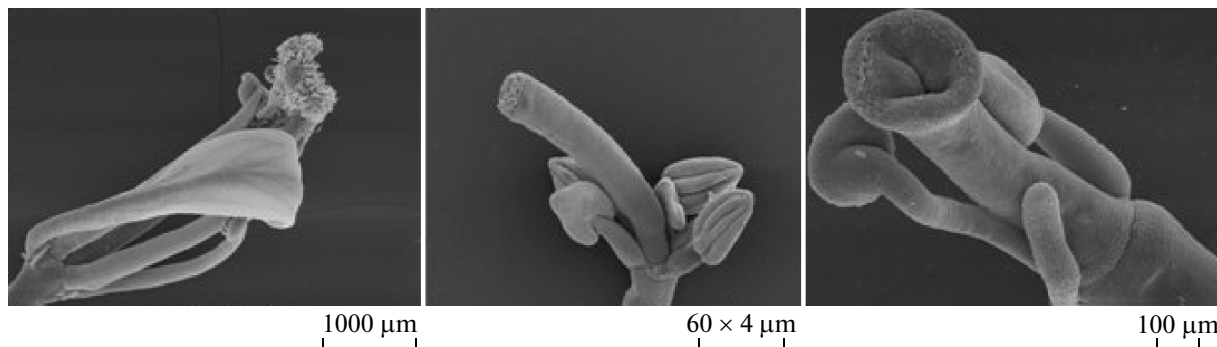
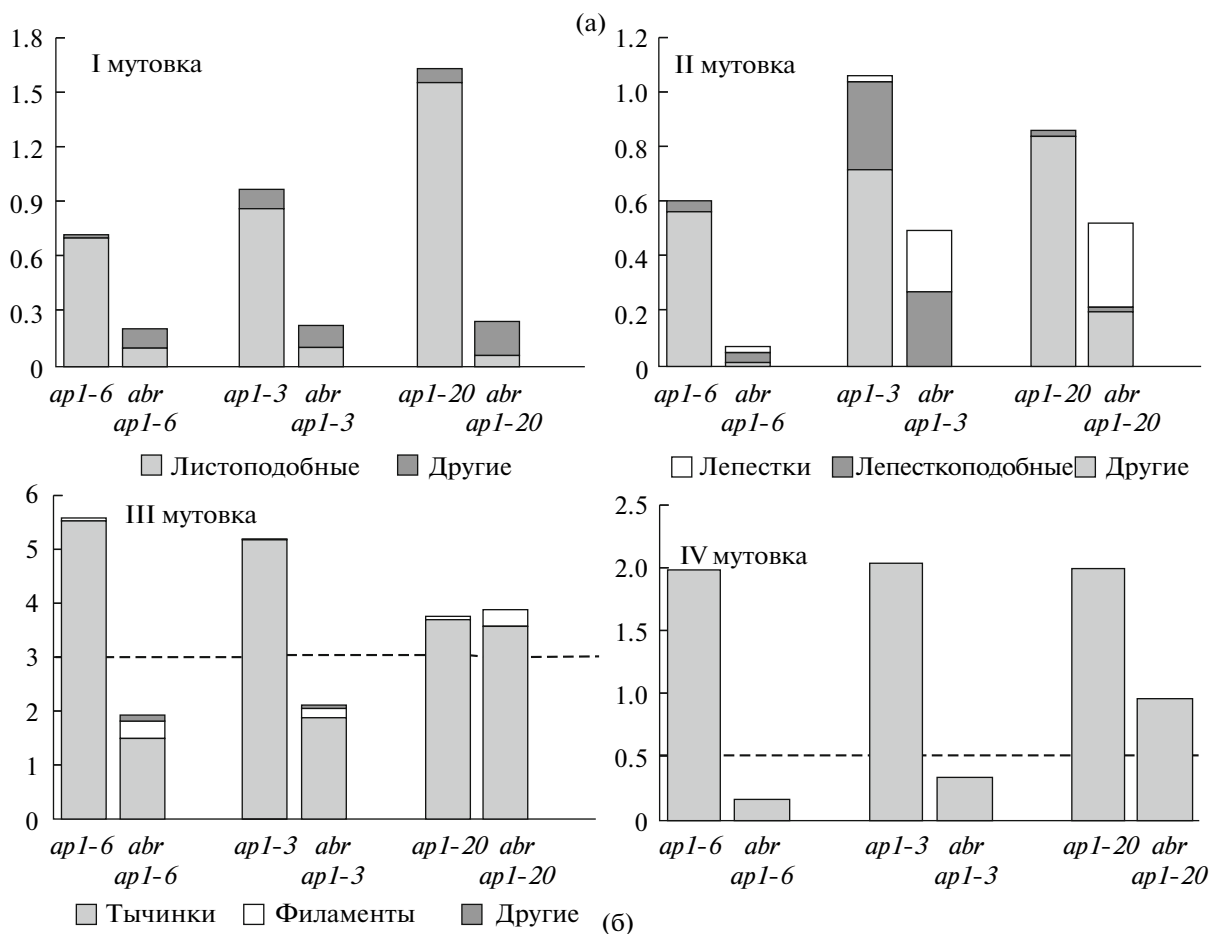


Рис. 1. Структура цветка двойных и одиночных мутантов *A. thaliana*.
 а – Среднее число и тип органов цветка в I–IV мутовках у одиночных и двойных мутантов. Пунктиром на нижних рисунках обозначено среднее число органов в цветках мутанта *abr*. В IV мутовке показано число плодолистиков.
 б – Цветки двойных мутантов: слева *abr ap1-1* (виден нормально развитый лепесток, аномальный пестик и 3 тычинки), в центре *abr ap1-20* (околоцветник отсутствует, 5 тычинок, пестик из 2-х плодолистиков) и справа *abr ap1-6* (филаментоподобный орган, 2 тычинки и аномальный пестик).

ко снижено число тычинок по отношению к дикому типу, у *ap1-3* и *ap1-6* редукции репродуктивных органов не наблюдается), но и по сравнению с мутантом *abr* (рис. 1а, б). Наименьший уровень редукции наблюдали у двойных мутантов по мягкому аллелю *ap1-3*, средний – по аллелю *ap1-6*, а наибольший выявлен ранее (Кавай-оол и др., 2010) по аллелю с самой высокой экспрессивностью (жесткому аллелю) *ap1-1*. В отличие от *abr ap1-1*, *abr ap1-3* и *abr ap1-6*, в цветках мутанта *abr*

ap1-20 число репродуктивных органов было даже несколько выше (3.8 тычинок и 0.96 плодолистиков), чем у мутанта *abr* (в среднем, 3 тычинки и 0.5 плодолистиков). Очевидно, разное влияние мутантных аллелей гена *AP1* на развитие репродуктивных структур цветка связано с их структурными особенностями.

Аллели *ap1-1* и *ap1-3* имеют мутации в акцепторных сайтах сплайсинга в 3 и 5-м экзонах соответственно (Mandel et al., 1992), что, по-видимо-

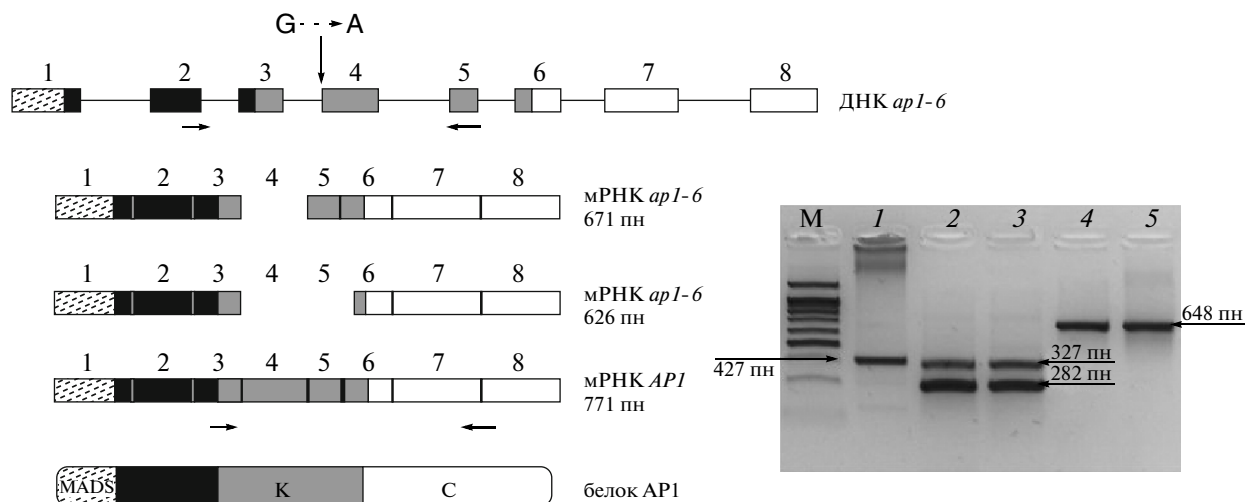


Рис. 2. Структура аллеля *ap1-6* и кодируемых им альтернативно сплайсированных форм мРНК.

Положение мутации *ap1-6* в геномной копии гена (вверху, стрелка) и образующиеся у мутанта *ap1-6* формы мРНК. Под ними – мРНК и белок AP1 из растений исходной линии Ler. Горизонтальными стрелками показано положение праймеров для амплификации ДНК и кДНК. Разными цветами показаны участки гена и мРНК, кодирующие разные домены белка. Справа показана электрофореграмма продуктов амплификации кДНК. М – маркер молекулярного веса; 1 – кДНК дикого типа, 2,3 – кДНК *ap1-6*; 4 – ДНК дикого типа Ler; 5 – ДНК *ap1-6*.

му, приводит к нарушению функции К и С доменов у мутанта *ap1-1* и С-домена у *ap1-3*. Мутант *ap1-20* имеет делецию 7 аминокислот в К-домене; функция С-домена у него не затронута (Онгар и др., 2008). Природа мутации *ap1-6* не известна. Поэтому нами проведен анализ последовательности ДНК и кДНК у этого мутанта. Как и у *ap1-1*, у мутанта *ap1-6* выявлено нарушение в акцепторном сайте сплайсинга 3-го интрона (рис. 2): наблюдается замена динуклеотида АГ на АА, приводящая к нарушению правила сплайсинга ГТ/АГ. Анализ кДНК показал наличие у мутанта *ap1-6* двух альтернативно сплайсированных форм (размеры амплифицированных фрагментов составили 327 и 282 пн), отсутствующих у дикого типа (один фрагмент 427 пн, рис. 2).

Секвенирование клонированных фрагментов показало, что у более протяженной формы кДНК отсутствует 4-й экзон, а у короткой формы – 4-й и 5-й экзоны и короткая последовательность GAG от 6-го экзона. Нуклеотидные последовательности, соответствующие эксонам 6–8, есть у обеих форм кДНК, однако из-за отсутствия 4-го экзона происходит сдвиг рамки считывания (вместе с двумя последними нуклеотидами 3-го экзона первый нуклеотид 4-го экзона составляет один триплет). Стоп-кодон при обоих вариантах сплайсинга образуется раньше на 42 нуклеотида. С учетом участков кДНК, соответствующих доменам MADS и I, которые не амплифицировались при использовании наших праймеров, общий размер альтернативно сплайсированных форм мРНК должен составлять 626 и 671 пн (полноразмерная мРНК *AP1* дикого типа имеет размер 771 пн).

То. мРНК мутанта может транслироваться с образованием форм белка, которые кодируют домены MADS и I, а также часть К-домена. Образование функционального С-домена в результате сдвига рамки считывания невозможно.

Таким образом, *ap1-20* отличается от *ap1-1*, *ap1-3* и *ap1-6* нормально функционирующим С-доменом. Следовательно, именно в этом структурном различии аллелей кроется причина различий по числу репродуктивных органов, которые обнаружены у двойных мутантов. В растениях *35S::API*, эктопически экспрессирующих ген *API* во всех мутовках, морфогенез цветка не нарушен, и развитие репродуктивных органов происходит нормально. При эктопической экспрессии в III и IV мутовках цветка мутанта *abr* аллеля *ap1-20* с делецией в К-домене развитие репродуктивных органов также практически не нарушено. В то же время, эктопическая экспрессия аллелей *ap1-1*, *ap1-3* и *ap1-6*, общим для которых является отсутствие функционирующего С-домена, приводит к существенной редукции числа репродуктивных органов у двойных мутантов.

Согласно предсказаниям математической модели, описывающей развитие цветка *A. thaliana* (Скрябин и др., 2006), определение типа органов цветка предшествует разметке их будущих позиций. Можно предполагать, что отсутствие С-домена у мутантов *ap1-3*, *ap1-1* и *ap1-6* нарушает детерминацию типа органов в репродуктивной части цветка, а значит и разметку их будущих позиций, что является причиной редукции числа репродуктивных органов. Наличие функционального С-домена в белке AP1 (у аллелей дикого типа и *ap1-20*) предотвращает нарушение процес-

са детерминации тычиной и плодolistиков при эктопической экспрессии во внутренних мутовках мутанта *abr*.

Недавно установлено, что С-домен белка AP1 обеспечивает взаимодействие с белком SEU, который в свою очередь взаимодействует с транскрипционным репрессором LUG. Образовавшийся белковый комплекс подавляет транскрипцию гена *AG* в органах околоцветника, где *AP1* в норме экспрессируется (Sridhar et al., 2006). В растениях *35S::AP1* развитие репродуктивных органов происходит нормально, несмотря на транскрипцию *AP1* во всех мутовках (Gustafson-Brown et al., 1994; Mandel, Yanofsky, 1995), т.е. репрессии *AG* не наблюдается. Присутствие репрессорной активности комплекса AP1/SEU/LUG только в наружных мутовках цветка объясняют тем, что в 3 и 4 мутовках существуют антогонисты, препятствующие осуществлению этой репрессии. В качестве таких антогонистов могут выступать активаторные белки, которые поддерживают необходимый для нормального развития репродуктивной сферы уровень транскрипции *AG* (Sridhar et al., 2006). Проведенное в нашей работе сравнение разных аллелей гена *AP1* свидетельствует о том, что ограничение функционирования репрессорного комплекса AP1/SEU/LUG в III и IV мутовках может быть связано с взаимодействиями С-домена белка AP1 с другими белками, разрушающими или дестабилизирующими комплекс AP1/SEU/LUG.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кавай-оол У.Н., Карпенко О.Ю., Ежова Т.А. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *APETALA1* в

- регуляции развития цветоноса *Arabidopsis thaliana*. Генетика. 2010. № 3 (в печати).
- Ондар У.Н., Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala 1-20 Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 6. С. 430–436.
- Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. № 5.
- Christensen S.K., Dagenais N., Chory J., Weigel D. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID // Cell. V. 2000. № 100. P. 469–478.
- Cho S., Jang S., Chae S. et al. Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana APETALA1* as a transcription activation domain // Plant Mol. Biol. 1999. V. 40. P. 419–429.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // Nature. 1991. V. 353. P. 31–37.
- Gustafson-Brown C., Savidge B., Yanofsky M.F. Regulation of the arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1* // Cell. 1994. V. 76. P. 131–143.
- Krizek B.A., Meyerowitz E.M. Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the Arabidopsis MADS domain organ-identity proteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4063–4070.
- Mandel M.A., Gustafson-Brown C., Savidge B. et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* // Nature. 1992. V. 360. P. 273–277.
- Mandel M.A., Yanofsky M.F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* // Nature. 1995. V. 377. P. 522–524.
- Riechmann J.L., Wang M., Meyerowitz E.M. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS // Nucleic Acids Research. 1996. V. 24. № 16. P. 3134–3141.
- Sridhar V.V., Surendrarao A., Liu Z. APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development // Development. 2006. V. 133. P. 3159–3166.

Different Action of the *APETALA1* Gene on the Development of Reproductive Organs in Flowers of the *abruptus* Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

U. N. Kavai-ool^{a, b}, E. V. Kupriyanova^c, and T. A. Ezhova^c

^a Tyva State University, Department of General Biology, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia

^b Vavilov Institute of General Genetics, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

^c Moscow State University, Department of Genetics, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119992 Russia

e-mail: arabidopsis2004@mail.ru

Abstract—The *APETALA1* (*AP1*) gene of *A. thaliana* codes type II MADS protein with domains MADS, I, K, and C. The role of K- and C-domains in the functioning of AP1 protein is poorly investigated. The analysis of phenotypic manifestation of mutations disrupting the activity of various domains of the protein product allows us to obtain information on the function of domains and, thereby, on the structural-functional organization of the gene. We investigated the action of mutant alleles of the *AP1* gene whose protein products are probably lacking the functionally active domains K (*ap1-20*), K- and C-domains (*ap1-1* and *ap1-6*), and C-domain (*ap1-3*) on the flower morphology in *abr* mutant (the *ABRUPTUS/PINOID* gene allele). It was detected that, unlike the *ap1-20* allele, the presence of *ap1-3*, *ap1-6*, and *ap1-1* alleles results in reduction of a number of the generative organs in the flowers of the double mutants *abr ap1-3*, *abr ap1-6*, and *abr ap1-1*. It was suggested that C-domain of the AP1 protein prevents the alteration of determination of the type of reproductive organs at ectopic expression of the *AP1* gene in the inner whorls of a flower in the *abr* mutant.

Keywords: floral development, interaction between the *APETALA1* and *ABRUPTUS/PINOID* genes, mutants, *Arabidopsis thaliana*

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

САМОСИНХРОНИЗАЦИЯ РИТМА СИНТЕЗА БЕЛКА В КУЛЬТУРАХ NaCaT КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА¹

© 2011 г. В. Я. Бродский, В. В. Терских, А. В. Васильев, Н. Д. Звездина, Е. А. Воротеляк, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию: 31.05.10

Окончательный вариант получен: 17.06.10

В культурах кератиноцитов человека NaCaT, содержащихся в бессывороточной среде на стеклах, обнаружен окологосовый ритм синтеза белка, сходный с ритмом в гепатоцитах *in vitro*. Интенсивность синтеза определяли по включению ³H-лейцина с поправкой на пул свободного меченого лейцина. Ритм изучали в отмытых 1- или 2-суточных культурах после смены среды. Среда, кондиционированная кератиноцитами NaCaT, синхронизировала разреженные несинхронные в контроле культуры гепатоцитов. Следовательно, кератиноциты выделяют в среду синхронизирующие факторы. Хелатор ионов кальция ВАРТА-АМ ликвидирует ритм синтеза белка как в плотных синхронных в контроле культурах гепатоцитов, так и в культурах кератиноцитов NaCaT. Аналогичным был эффект ингибитора протеинкиназ Н7. Таким образом, в кератиноцитах, как и в гепатоцитах, происходит самосинхронизация колебаний интенсивности синтеза белка. Механизм самосинхронизации – кальций-зависимое фосфорилирование клеточных белков.

Ключевые слова: прямые межклеточные взаимодействия, ритм синтеза белка, фосфорилирование белков, окологосовые ритмы, кератиноциты, гепатоциты, клеточные культуры, ганглиозиды, мелатонин

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами выявлен механизм кооперации гепатоцитов *in vitro* и *in vivo* в формировании ритма синтеза белка (обзор: Brodsky, 2006). Ритм использовали как маркер прямых межклеточных взаимодействий, приводящих к самосинхронизации колебаний интенсивности синтеза белка. Сигнальными факторами, взаимодействующими с рецепторами клеточной мембраны и запускающими цепь процессов в цитоплазме, в наших опытах были ганглиозиды и трансмиттеры – норадреналин и серотонин, а также мелатонин. Как мишень действия сигнала определили внутриклеточный кальций, а ключевым процессом организации ритма синтеза белка оказалась активация протеинкиназ и, соответственно, фосфорилирование белков. Возник вопрос: только ли гепатоцитам свойственен протеинкиназный механизм организации ритма синтеза белка в клеточных популяциях?

Изучали перевиваемую культуру NaCaT кератиноцитов человека (Boucamp et al., 1988). NaCaT – линия иммортализованных клеток, не обладающих туморогенностью и инвазивностью. Взаимо-

действуют ли кератиноциты друг с другом, синхронизируя колебания синтеза белка, т.е. свойствен ли им общий популяционный ритм синтеза? При положительном ответе, каков механизм межклеточной кооперации: влияет ли на кинетику синтеза белка в кератиноцитах NaCaT блокада изменений цитоплазматического кальция и ингибирование протеинкиназ, как это наблюдали в культурах гепатоцитов?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Линия NaCaT кератиноцитов кожи человека выделена более 20 лет назад (Boucamp et al., 1988). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамин (ПанЭКО), снимали смесью 0.25% трипсин-ЭДТА (Gibco). Пассировали раз в 3–5 дней в соотношении 1 : 4–1 : 6. Для целей наших опытов суспензию клеток переносили в бессывороточную среду (Бродский, Терских и др., 1996): среда 199 с 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma); газовая фаза содержала 95% воздуха и 5% CO₂. Суспензию, содержащую 4–5 × 10⁶ клеток в 1 мл среды, вносили

¹ Авторы благодарят РФФИ за поддержку (проекты 09-04-00116, 08-04-00144, 09-04-12132).

в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Площадь каждого стекла примерно 1 см^2 . Получали плотные культуры с близко расположенными клетками (рис. 1). Через сутки культуры отмывали и переносили в свежую среду.

Исследование кинетики синтеза белка. Пробы, по три стекла с культурами каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2–3 ч. Каждую пробу инкубировали отдельно в течение 10 мин при 37°C в среде с ^3H -лейцином (25–30 мкCi/мл, специфическая радиоактивность 70–100 Ci/ммоль). Культуры промывали холодной средой и для экстракции не включившегося в белки лейцина переносили в холодную 5% хлорную кислоту на 60 мин. Затем культуры промывали этиловым спиртом и белки растворяли гиаминном (бензетониум гидроксид, Sigma). Радиоактивность лейцина в белках и в небелковой кислоторастворимой фракции измеряли в каждой культуре (на отдельном стекле), используя сцинтилляционный счетчик TRJ-CARB, модель 2810-TR фирмы Perkin Elmes. Рассчитывали относительное включение лейцина $I_{\text{сорт}}$ в белки с поправкой на пул свободного лейцина

$$I_{\text{сорт}} = I_i \times P_m / P_i \text{ (срм)},$$

где I_i – измеренное включение в определенной культуре, а $P_i = I_i + p_i$ – общая радиоактивность клеток культуры, p_i – радиоактивность свободного (не включившегося в белки) ^3H -лейцина в той же культуре, P_m – средняя радиоактивность всех культур данного опыта. В отношении $I_{\text{сорт}}$ нивелируются вариабельность пула свободного лейцина, а также различное число клеток в разных культурах. Детальнее метод изложен ранее (Brodsky et al., 1992, 2000).

Каждый опыт ставили на культурах, полученных из одной и той же суспензии клеток NaCaT. Условия использования ингибиторов отмечены при описании соответствующих опытов в тексте и подробнее в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В культурах клеток NaCaT обнаружен ритм синтеза белка (рис. 2). В течение 160 мин обнаружены три периода колебаний интенсивности синтеза, нерегулярные, как обычно в околочасовых ритмах (обзор: Brodsky, 2006). Примечательное отличие клеток NaCaT от гепатоцитов *in vitro* – в огромном пуле не включившегося в белки ^3H -лейцина. В гепатоцитах радиоактивность пула свободного лейцина обычно 2–3 раза больше радиоактивности белков; иногда эти величины даже равны. В клетках NaCaT это отношение 12–15, т.е. относительное (к свободному пулу) включение лейцина в белки в этих клетках значительно ниже, чем в гепатоцитах. Основной вывод опыта рис. 2: клетки NaCaT самосинхронизируются в свежей

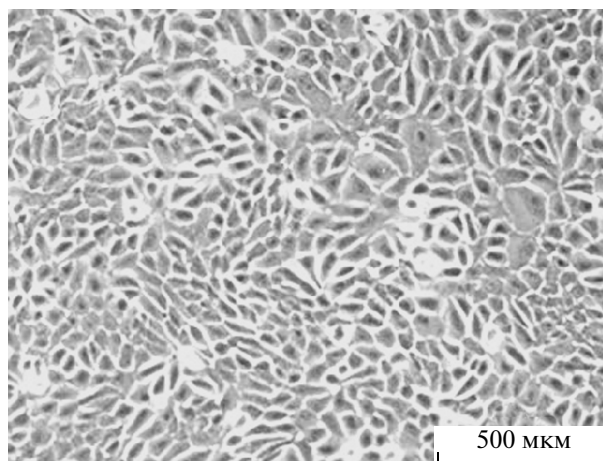


Рис. 1. Культура кератиноцитов человека (линия NaCaT).

бессывороточной среде и в результате формируется общий популяционный ритм синтеза белка.

Синхронизация активности клеток в пределах популяции может быть дистантной через среду или же прямой через клеточные контакты. В опи-

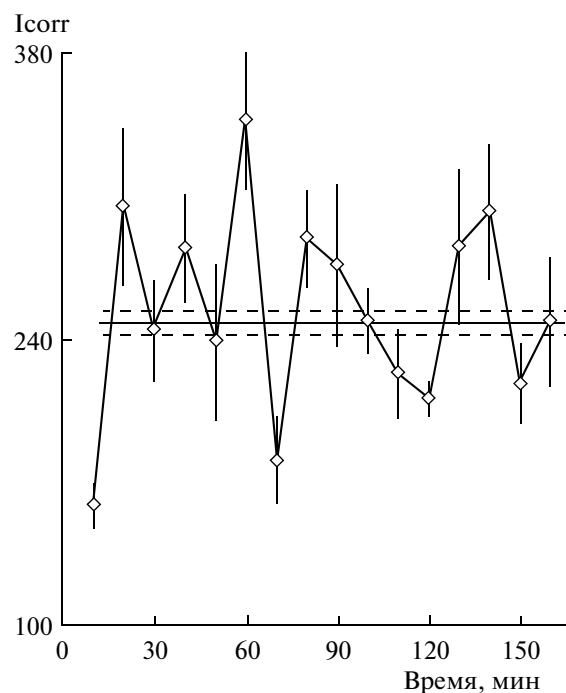


Рис. 2. Кинетика синтеза белка в суточных культурах кератиноцитов человека NaCaT. Суточные культуры отмывали и переносили в свежую бессывороточную среду. Через 30 мин, не меняя среду, каждые 10 мин брали пробы по 3 культуры и в течение 160 мин в каждой культуре отдельно исследовали кинетику синтеза белка; $I_{\text{сорт}}$ (срм) – включение ^3H -лейцина с поправкой на пул лейцина, не включившегося в белки (см. Методы). Прямая линия (здесь и на графиках рис. 3 и 4) – средний уровень синтеза белка для всех культур данного опыта, пунктир – ошибка этой средней.

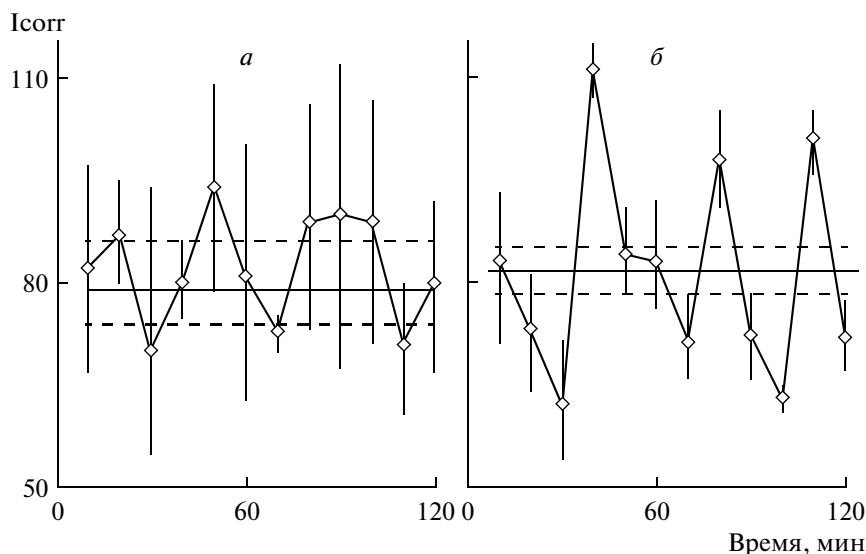


Рис. 3. Кинетика синтеза белка в суточных разреженных культурах гепатоцитов в свежей среде и в таких же культурах, содержащихся в среде, кондиционированной кератиноцитами HaCaT. Получение кондиционированной среды: суточные культуры HaCaT содержали в бессывороточной среде 20 часов, затем собрали среду, отцентрифугировали 3 мин при 1500g и налили в чашку с разреженными (в контроле несинхронными) культурами гепатоцитов: *a* – контроль, культуры гепатоцитов отмыли, перенесли в свежую среду и через 15 мин в течение следующих 120 мин исследовали кинетику синтеза белка; *б* – такие же культуры из той же суспензии гепатоцитов после отмытки перенесли в среду, кондиционированную HaCaT, и в этой среде в культурах исследовали кинетику синтеза белка.

санных нами межклеточных взаимодействиях в культурах гепатоцитов клетки выделяют в среду ганглиозиды, которые воспринимаются другими клетками той же популяции. Включается цепь процессов, приводящих к согласованной синхронной активности клеток. Другой возможный вариант межклеточных взаимодействий в плотном эпителиальном монослое – нерцепторный, путем перехода из клетки в клетку некоторого синхронизатора, который включает ту же или иную цепь процессов, приводящих к синхронизации клеток. Распространяющиеся через щелевые контакты волны кальция давно и хорошо описаны, но их влияние на какие-либо тканевые функции и, тем более, их синхронность пока не изучены.

Выделяют ли клетки HaCaT некие факторы, синхронизирующие ритм синтеза белка?

Ранее мы исследовали два типа культур гепатоцитов (Бродский и др., 1997; Brodsky et al., 2000). Плотные культуры с близко расположенными клетками быстро самосинхронизируются, что обосновывается обнаружением в них ритма синтеза белка практически сразу же после смены среды. В разреженных культурах с далеко отстоящими друг от друга клетками ритм долго не выявляется, т.е. такие культуры исходно не синхронны. В среде, кондиционированной плотными культурами, в разреженных культурах сразу выявлялся ритм синтеза белка. К тому же эффекту приводило добавление в свежую среду с разреженными культурами ганглиозидов или норадреналина, серотонина, ме-

латонина (см. также Бродский и др., 2006, 2008; Звездина и др., 2008).

Как и во всех предыдущих наших работах (ссылки выше), в отмытых суточных разреженных культурах гепатоцитов через 15 мин после смены среды ритм синтеза белка не был обнаружен (рис. 3). Если такие же культуры перенести после отмыывания в среду, кондиционированную 20 часов кератиноцитами HaCaT, в разреженных культурах гепатоцитов выявляется четкий ритм синтеза белка. Следовательно, кератиноциты выделяют в среду фактор (или факторы), синхронизирующий ритм синтеза белка.

Каков механизм синхронизации кератиноцитов при формировании общего популяционного ритма синтеза белка?

Как уже отмечалось, в культуре гепатоцитов эндогенным синхронизирующим сигнальным фактором являются ганглиозиды (Бродский и др., 1997; Звездина и др., 2000; Brodsky et al., 2000). Блокирование синтеза ганглиозидов, прекращение их выделения в среду останавливало синхронизацию клеток, что выражалось в ликвидации ритма синтеза белка в плотных в контроле синхронных культурах гепатоцитов (Brodsky et al., 2003). Аналогичные результаты получены при исследовании культур HaCaT.

Для блокирования синтеза ганглиозидов в клетках HaCaT использовали PPPP – [d-1-трео-1-фенил-2-гексадекананоиламино-3-пирролидино-1-пропанол-HCL] (Li, Ladisch, 1996; Olshefski, La-

disch, 1998), ингибитор гликозил-церамид синтазы, ключевого фермента синтеза ганглиозидов. По данным авторов препарата и нашим наблюдениям, действие PPPP обратимо. В первые часы после обработки культур ингибитором в среде практически не остается ганглиозидов.

В контрольных 2-суточных культурах кератиноцитов NaCaT, содержащихся все время в нормальной среде, выявлен четкий ритм синтеза белка с двумя периодами в течение 2 ч наблюдений (рис. 4). После блокады синтеза ганглиозидов ритм не обнаруживается: все точки графика входят в пределы средней интенсивности синтеза белка для всего опыта и ошибки этой средней. Если в среду с такими же культурами после PPPP добавить на 5 мин 5 нМ мелатонина, ритм синтеза белка восстанавливается. Размах колебаний заметно меньше, чем в контроле, но максимумы 30, 70 и 120 мин достоверно и значительно выше соответствующих минимумов.

Из наших опытов с блокированием синтеза ганглиозидов следует, что ганглиозиды являются единственным адекватным эндогенным фактором самосинхронизации клеток NaCaT, как и гепатоцитов. Действительно, если бы клетки NaCaT или гепатоциты выделяли в среду, кроме ганглиозидов, еще и другие синхронизаторы, например, норадrenalин или мелатонин, ритм синтеза белка после действия PPPP выявлялся бы.

В следующем опыте (рис. 5) исследовали влияние блокирования изменений уровня свободного кальция в цитоплазме или ингибирования активности протеинкиназ на кинетику синтеза белка в суточных культурах, полученных из одной суспензии кератиноцитов NaCaT. Вариантом контроля в этом опыте было действие мелатонина на кератиноциты. В контрольных культурах, как и ранее, наблюдали ритм синтеза белка. Более высокий уровень синтеза белка и значительно больший размах его колебаний наблюдали после воздействия на такие же нормальные культуры мелатонина. Подобные эффекты мы наблюдали и после воздействия мелатонина на гепатоциты (Бродский и др., 2008, 2009, 2010а, б). Блокирование изменений внутриклеточного кальция хелатором ВАРТА-АМ ликвидировало ритм синтеза белка в кератиноцитах: все 12 временных точек были в пределах среднего для всего опыта синтеза с ошибкой. Также и подавление активности протеинкиназ ингибитором Н7 — [1-(5-изохинолинсульфонил)-5-метилпиперазин дигидрохлорид] ликвидировало ритм в культурах кератиноцитов NaCaT.

Основной вывод опыта с блокированием кальция и протеинкиназ: самосинхронизация ритма синтеза белка в кератиноцитах NaCaT осуществляется тем же способом, что в гепатоцитах. Синхронизация клеток в обоих случаях зависит от увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме

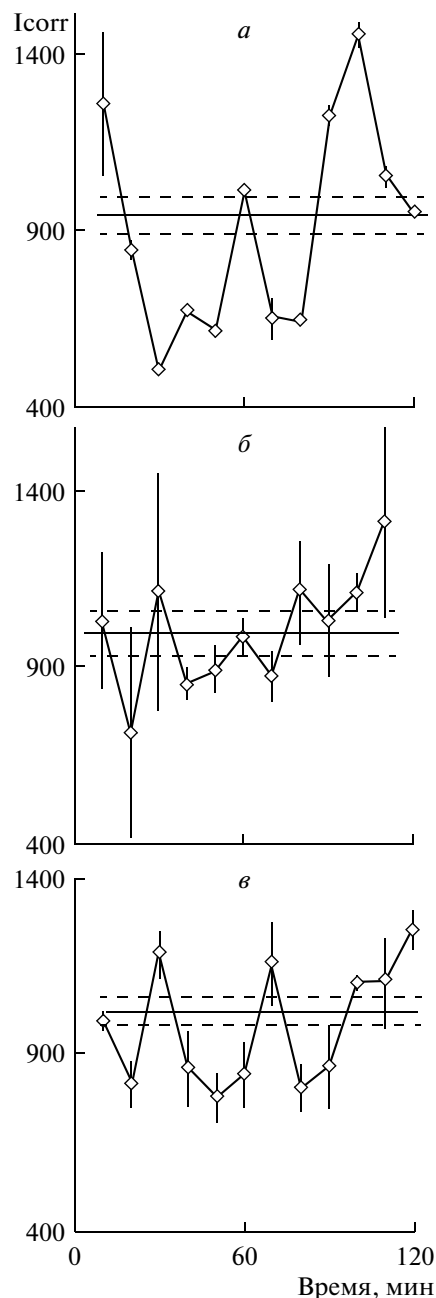


Рис. 4. Кинетика синтеза белка в двухсуточных культурах NaCaT после блокирования синтеза ганглиозидов: *а* — контроль, культуры инкубировали сутки в нормальной бессывороточной среде; затем культуры отмывали и инкубировали еще сутки; двухсуточные культуры отмывали, сменили среду, через 35 мин еще раз отмывали, сменили среду и через 20 мин, не меняя среду, в культурах исследовали кинетику синтеза белка; *б* — суточные отмывые культуры NaCaT инкубировали сутки в среде с ингибитором синтеза ганглиозидов — PPPP (1.5 мкМ); затем культуры отмывали и перенесли в свежую среду без PPPP; через 35 мин культуры вновь отмывали и через 20 мин, не меняя среду, в культурах исследовали кинетику синтеза белка; *в* — культуры, сутки предобработанные PPPP, отмывали и перенесли в среду без PPPP, через 30 мин в среду внесли мелатонин в конечной концентрации 5 нМ на 5 мин, затем культуры отмывали и через 20 мин, не меняя среду, в этих культурах исследовали кинетику синтеза белка.

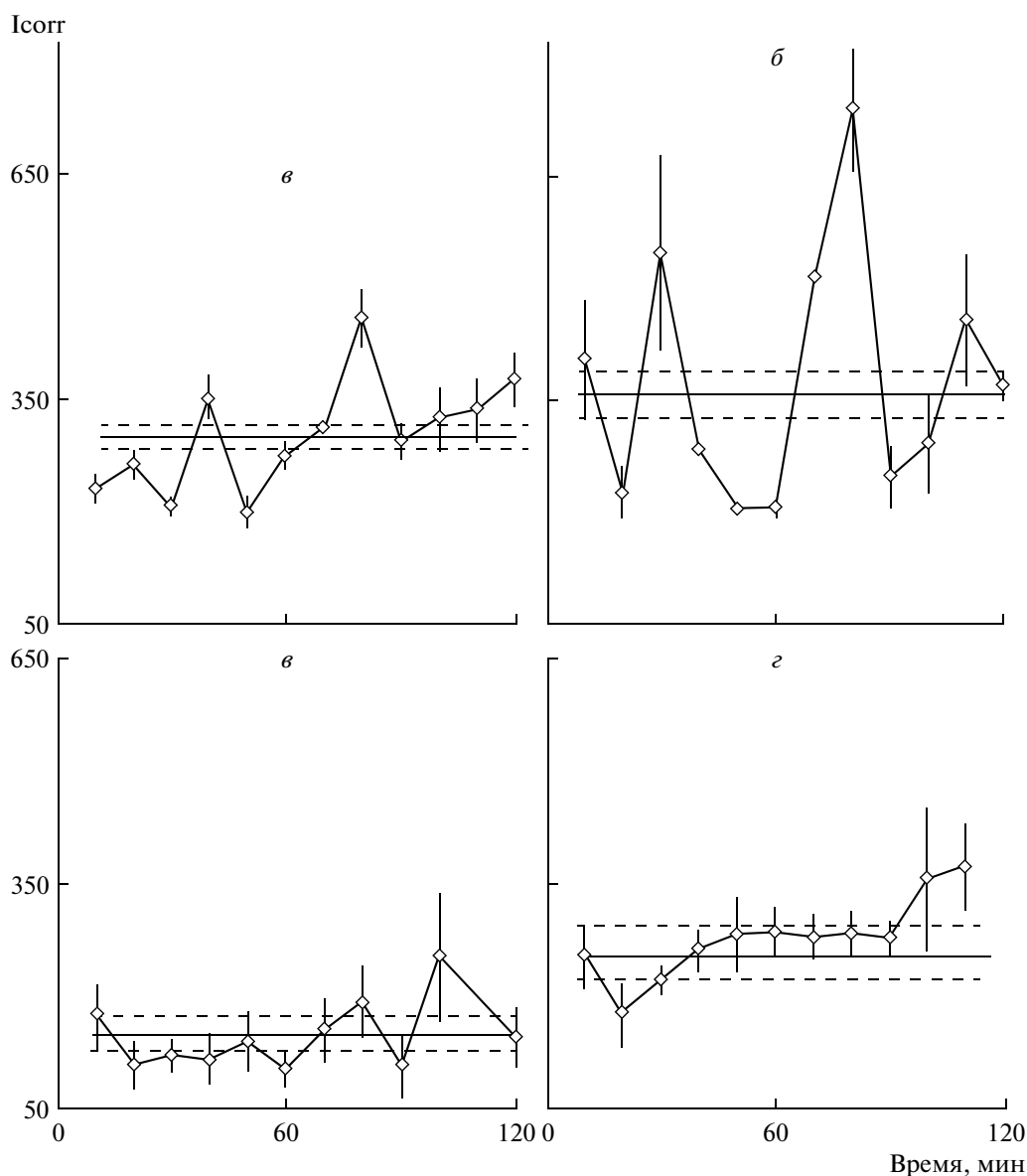


Рис. 5. Кинетика синтеза белка в суточных культурах NaCaT после действия мелатонина, хелатора кальция ВАРТА-АМ или ингибитора протеинкиназ Н7: *a* – контроль, отмытые культуры инкубировали в нормальной среде 60 мин, еще раз отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *б* – в среду отмытых культур через 55 мин внесли мелатонин в конечной концентрации 5 нМ на 5 мин, затем культуры отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *в* – отмытые культуры перенесли на 60 мин в среду с 20 мкМ хелатора цитоплазматического кальция ВАРТА-А, затем культуры отмыли, перенесли в чистую свежую среду и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка; *г* – отмытые суточные культуры перенесли на 60 мин в среду с 40 мкМ ингибитора протеинкиназ Н7, затем культуры отмыли и через 15 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка.

и активации протеинкиназ (Бродский и др., 2002, 2006; Звездина и др., 2003). Ингибитор Н7 действует в основном на кальций-зависимую протеинкиназу С. В гепатоцитах мы индуцировали ритм синтеза белка форбол 12-мирикат 13-ацетатом, который активирует главным образом протеинкиназу С. Но ритм индуцировал и форсколин, который активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу А. Отметим, что ранее мы нашли окологасовой ритм цАМФ (Ярыгин и др., 1979) и такой же

ритм АТФ (Brodsky et al., 1992). Таким образом, основное событие организации ритма синтеза – фосфорилирование белков, которое, очевидно, может осуществляться различными протеинкиназами, хотя основными являются кальций-зависимые ферменты. Какие именно белки фосфорилируются, пока не известно.

Фосфорилирование белков синхронизирует окологасовые ритмы и в некоторых других клетках, кроме гепатоцитов и кератиноцитов. Так, в ра-

ботах лаборатории Гилберта и Хэммонд (Bhoola and Hammond, 2000; Calvert-Evers and Hammond, 2000; Hammond et al., 2000), проведенных одновременно с нашими исследованиями сигнальных факторов-агонистов кальция, нашли ритм активности нескольких ферментов после фосфорилирования белков эритролейкемических клеток *in vitro*. Авторы не изучали влияния кальция и протеинкиназ. Они оценивали фосфорилирование белков по метке ^{32}P . После введения в культуральную среду инсулина или ретиноевой кислоты уровень фосфорилированных белков существенно повышался и колебания активности изученных ферментов синхронизировались. Среди выявленных околочасовых ритмов были ритмы тирозиновой протеинкиназы и фосфатазы.

Цепь процессов, приводящих к фосфорилированию белков, включается через рецепторы сигнальных факторов. Блокирование рецепторов норадреналина ликвидировало индуцирующее ритм синтеза белка действие этого трансммиттера (Звезда и др., 2008). Особенно ярко зависимость от состояния рецепторов проявлялась в случае мелатонина. В отличие от норадреналина, мелатонин легко проникает в клетку через плазматическую мембрану (Sjoblom et al., 2003; Кветная и др., 2005; Анисимов, 2008). Тем не менее, блокирование рецепторов мелатонина в гепатоцитах лузиндолом ликвидировало синхронизирующий эффект мелатонина (Бродский и др., 2009).

Обратимое фосфорилирование-дефосфорилирование — распространенный механизм изменения активности ферментов и, соответственно, функционального состояния клеток (Lehninger, 1982; Marks, 1996; Carlson, 2004). При изучении кератиноцитов, также как гепатоцитов, нами показано участие фосфорилирования в самосинхронизации клеточных популяций, в организации кинетики синтеза белка. Среди сигнальных факторов, стимулирующих эту функцию в гепатоцитах, мы определили трансммиттеры. Известно, что трансммиттеры — норадреналин, серотонин и дофамин — организуют (в образовании колоний) и бактерии (Олескин и др., 1998; Олескин, 2001; Freestone et al., 2007). Среди сигнальных факторов трансммиттерной природы, влияющих на развитие, обнаружен серотонин, выделяемый нейронами эмбриона и влияющий на организацию дефинитивного нервного органа (Ugrumov, 2002; Pronina et al., 2003; Mirochnik et al., 2005). Воронежская с соавторами (Voronezhskaya et al., 2004) показала, что трансммиттеры влияют на темп развития личинок некоторых беспозвоночных. Первичная организующая клеточные популяции функция трансммиттеров может быть одним из механизмов эволюции многоклеточных (Brodsky, Lloyd, 2008; Бродский, 2009).

Прямые межклеточные взаимодействия могут дополнять центральные регуляции в физиологии. Это было обосновано опытами с денервацией печени (Бродский и др., 1995), после чего на срезах печени и в культурах гепатоцитов был определен ритм синтеза белка, в этом случае, результат межклеточной кооперации *in vivo* и *in vitro*. Синтез специфических белков (плазмы крови, ферментов детоксикации и др.) — основная функция печени. Кинетика этой функции, по нашим данным, определяется прямыми межклеточными взаимодействиями, причем их механизм — кальций-протеинкиназный — сходен, по новым данным, с механизмом в других изученных клетках. Всегда ли используется такая регуляция или возможны и иные пути организации клеточных популяций? Что, например, определяет околочасовой ритм дыхания клеток? Интересные данные относятся к влияниям на некоторые звенья цикла Кребса (Lloyd, Murray, 2005; Lloyd, 2005, 2006). Влияние фосфорилирования белков этими работами не исключается. Анализ различных околочасовых ритмов в метаболизме дрожжей (Kippert, 2001) привел к выводу об участии в организации таких ритмов MAP-киназ и cAMP-зависимой протеинкиназы А. Наши наблюдения участия протеинкиназы А (как и других протеинкиназ) в организации ритма синтеза белка отмечены выше, также как и данные об околочасовом ритме цАМФ и АТФ. Сведения литературы, как и наши опыты, приводят к перспективе изучения продуктов, выделяемых клетками в среду на организацию межклеточной кооперации в физиологических функциях.

Изучение состава межклеточной среды продуктивно в решении многих проблем биологии развития и медицины. Так, стоит углубить данные о снижении уровня межклеточных взаимодействий вследствие изменений свойств межклеточной среды у старых животных (Бродский и др., 2005). Возможно, наиболее существенный результат этой работы — выяснение возможности усилить кооперацию клеток старых животных, меняя свойства межклеточной среды. Введение в сыворотку крови старых крыс ганглиозидов повышало показатели синтеза белка в гепатоцитах старых крыс до уровня молодых животных.

Процессы развития и регенерации регулируются множеством сигнальных факторов, среди которых выделяются факторы роста и транскрипционные факторы. Лишь в редких случаях известно, какие именно клетки выделяют такие факторы. Так, при трансдифференцировке пигментного эпителия тритона процесс зависит от фактора роста (FGF2), выделяемого клетками сосудистого слоя и влияющего на дедифференцировку и преобразование пигментного эпителия в клетки сетчатки (Susaki, Chiba, 2007; Авдонин и др., 2008). Выяснение вклада фосфорилирования-дефосфорилирования белков в механизмы действия факторов ро-

ста — существенная задача. Другая задача — дальнейшее изучение участия трансмиттеров и их производных в процессах развития и регенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдонин П.П., Маркитантова Ю.В., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Исследование экспрессии регуляторных факторов Pax6, Otx2, Six3, FGF2 в ходе регенерации у тритонов // Известия АН (Сер. Биол.). 2008. № 4. С. 355–361.
- Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма // Успехи физиол. наук. 2008. Т. 39. № 4. С. 52–76.
- Бродский В.Я. Прямые межклеточные взаимодействия и социальное поведение клеток млекопитающих, протистов и бактерий. Возможные причины многоклеточности // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 2. С. 97–111.
- Бродский В.Я., Дубовая Т.К., Нечаева Н.В., Фатеева В.И., Новикова Т.Е. Ритм синтеза белка в денервированной печени // Известия АН (Сер. Биол.). 1995. № 2. С. 133–137.
- Бродский В.Я., Терских В.В., Нечаева Н.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Бессывороточная среда, сохраняющая нормальную морфологию и высокий уровень синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* // Известия АН. 1996. № 4. С. 398–401.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Синхронизация ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов происходит при кондиционировании среды с накоплением ганглиозида GM1 в клетках: Иммуноцитохимическое исследование // Известия АН (Сер. Биол.). 1997. № 4. С. 389–399.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Авдонин П.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И. Изменения концентрации ионов кальция и ритм синтеза белка в культуре гепатоцитов // Известия АН. 2002. № 1. С. 10–16.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Возрастные особенности ритма синтеза белка в гепатоцитах. Влияние межклеточной среды // Онтогенез. 2005. № 1. С. 9–17.
- Бродский В.Я., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Механизм прямых межклеточных взаимодействий. Самоорганизация ритма синтеза белка // Онтогенез. 2006. № 5. С. 384–393.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Дубовая Т.К., Фатеева В.И., Мальченко Л.А., Бурлакова О.В., Беспятовых А.Ю. Мелатонин усиливает синтез белка и синхронизирует ритм синтеза в культурах гепатоцитов старых крыс // Онтогенез. 2008. № 6. С. 443–447.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов как агонист внутриклеточного кальция и протеинкиназ // Онтогенез. 2009. № 3. С. 231–236.
- Бродский В.Я., Рапопорт С.И., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин, введенный крысам внутрибрюшинно, эффективно синхронизирует ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов // Онтогенез. 2010а. № 2. С. 101–106.
- Бродский В.Я., Дубовая Н.Д., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин модифицирует ритм синтеза белка // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2010. Т. 149. № 1. С. 45–48.
- Звездина Н.Д., Грачева Е.В., Голованова Н.К., Проказова Н.В., Нечаева Н.В., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Накопление ганглиозида GM1 в среде, кондиционированной культурой гепатоцитов крысы // Известия АН (Сер. Биол.) 2000б. № 1. С. 405–412.
- Звездина Н.Д., Нечаева Н.В., Грачева Е.В., Новикова Т.Е., Гвазава И.Г., Фатеева В.И., Мальченко Л.А., Бродский В.Я. Нарушение кооперации гепатоцитов в ритме синтеза белка хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ // Известия АН. 2003. № 1. С. 14–19.
- Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Сигнальные факторы саморганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов — ганглиозиды и катехоламины — функционируют независимо друг от друга // Онтогенез. 2008. № 3. С. 198–207.
- Кветная Т.В., Князькин И.В., Кветной И.М. Мелатонин — нейроэндокринный маркер возрастной патологии. СПб.: ДЕАН, 2005.
- Олескин А.В. Биополитика. М.: МГУ, 2001.
- Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференцировку организмов. Микробиология. 1998. 67. № 3. 305–312.
- Ярыгин К.Н., Нечаева Н.В., Фатеева В.И., Новикова Т.Е., Бродский В.Я. Околочасовой ритм концентрации цАМФ в срезах околоушной железы крысы // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 1979. № 12. С. 711–712.
- Bhoola R., Hammond K. Modulation of the rhythmic patterns of expression of phosphoprotein phosphatases in human leukaemia cells // Cell Biology International 2000. V. 24. P. 539–547.
- Boucamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // J. Cell Biol. 1988. V. 106. P. 761–771.
- Brodsky V.Y. Direct cell–cell communication. A new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circahoralian) intracellular rhythms // Biological Reviews of Cambridge Philosophical Soc. 2006. V. 82. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Lloyd D. Self-organized intracellular ultradian rhythms provide direct cell–cell communication. In: Ultradian rhythms from molecules to mind. Springer, 2008. P. 85–104.
- Brodsky V.Y., Boikov P.Y., Nechaeva N.V., Yurovitsky Y.G., Novikova T.E., Fateeva V.I., Shevchenko N.A. The rhythm of protein synthesis does not depend on oscillations of ATP level // J. Cell Science. 1992. V. 103. P. 363–370.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I. Gangliodide-mediated synchronization of the protein synthesis rhythm in cultured hepatocytes // Cell Biology International 2000. V. 24. P. 211–222.

- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D., Nechaeva N.V., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Gracheva H.* Loss of the hepatocyte co-operative activity after inhibition of ganglioside synthesis and shedding // *Cell Biology International*. 2003. V. 27. P. 935–942.
- Calvert-Evers J.L., Hammond K.D.* Temporal variations in protein tyrosine phosphatase activity during cell proliferation and differentiation // *Cell Biology International* 2000. V. 24. P. 559–567.
- Carlson B.M.* Human embryology and developmental biology. Mosby. Elsevier. Philadelphia. 2004.
- Freestone P.P.E., Haigh R.D., Lyte M.* Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. V. 269. P. 221–228.
- Hammond K.D., Bhoola R., Bodalina U., Gilbert, D.A.* Dynamic cells: Temporal organisation and control of phosphorylation // *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. 2000. V. 4. P. 75–88.
- Kippert F.* Cellular signaling and the complexity of biological timing: insights from the ultradian clock of *Schizosaccharomyces pombe* // *Phil. Trans. Royal Soc. London*. 2001. V. 356. P. 1725–1733.
- Lehninger A.L.* Principles of biochemistry. NY. Worth. 1982.
- Li R., Ladisch S.* Abrogation of shedding of immunosuppressive neuroblastoma gangliosides // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 4602–4605.
- Lloyd D.* Systems dynamics in biology // *J. Appl. Med.* 2005. V. 3. P. 1–12.
- Lloyd D.* Ultradian rhythms and clocks in plants and yeast // *Biol. Rhythms Res.* 2006. V. 37. P. 281–297.
- Lloyd D., Murray D.B.* Ultradian metronome: timekeeper for orchestration of cellular coherence // *Trends Biochem. Sci.* 2005. V. 30. P. 373–377.
- Marks F.* Protein phosphorylation. Wiley InterScience. 1996.
- Mirochnik V., Bosler O., Calas A., Ugrumov M.* Long-lasting effects of serotonin deficiency on differentiating peptidergic neurons in the rat suprachiasmatic nucleus // *Int. J. Develop. Neurosci.* 2005. V. 23. P. 85–91.
- Olshefski R., Ladisch S.* Synthesis, shedding, and intracellular transfer of human medulloblastoma gangliosides: abrogation by a new inhibitor of glycosylceramide synthase // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 467–472.
- Pronina T., Adamskaya E., Ugrumov M., Kuznetsova T., Shishkina I., Babichev V., Calas A., Tramu G., Maily P., Makarenko I.* Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurons in rat fetuses // *J. Neuroendocrinol.* 2003a. V. 15. P. 549–558.
- Pronina T., Ugrumov M., Calas A., Seif I., Tramu G.* Influence of monoamine of differentiating gonadotropin-releasing hormone neurons in foetal mice // *J. Neuroendocrinol.* 2003b. V. 15. P. 925–932.
- Sjoblom M., Safsten B., Flemstrom G.* Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes // *Am. J. Physiol.* 2003. V. 284. P. G1034–1044.
- Susaki K., Chiba C.* MEK mediates in vitro neural transdifferentiation of the adult newt retinal pigment epithelium cells: Is FGF2 an induction factor? // *Pigment Cell Res.* 2007. V. 20. P. 364–379.
- Ugrumov M.V.* Magnocellular vasopressin system in ontogenesis: Development and regulation // *Microsc. Res. Tech.* 2002. V. 56. P. 164–171.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P.* Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // *Development*. 2004. V. 131. P. 3671–3680.

Self-Synchronization of the Protein Synthesis Rhythm in HaCaT Cultures of Human Keratinocytes

V. Ya. Brodskii, V. V. Terskikh, A. V. Vasilyev, N. D. Zvezdina, E. A. Vorotelyak, V. I. Fateeva, and L. A. Mal'chenko

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: brodsky.idb@bk.ru

Abstract—In cultures of human keratinocytes HaCaT contained in a serum-free medium on glass, a circadian rhythm of protein synthesis was found similar to the one in hepatocytes in vitro. The intensity of the synthesis was determined by the inclusion of ^3H -leucine corrected for the pool of free marked leucine. Rhythm was studied in washed 1- or 2-day cultures after the change of the medium. The medium conditioned with keratinocytes HaCaT synchronized the rarefied hepatocyte cultures nonsynchronous in the control. Therefore, the keratinocytes liberate synchronizing factors into the medium. A BAPTA-AM chelator of calcium ions eliminates the protein synthesis rhythm both in dense hepatocyte cultures synchronous in the control and in the HaCaT keratinocyte cultures. The effect of the H7 inhibitor of protein kinases was analogous. Thus, both in keratinocytes and hepatocytes, self-synchronization of fluctuations of the intensity of protein synthesis takes place. The mechanism of self-synchronization is the calcium-dependending phosphorylation of cell proteins.

Keywords: direct cell-to-cell communication, rhythm of protein synthesis, phosphorylation of proteins, circadian rhythms, keratinocytes, hepatocytes, cell cultures, gangliosides, melatonin

“ОТ МИКРОСПОРЫ – К СОРТУ”

**Т. Б. Батыгина, Н. Н. Круглова, В. Ю. Горбунова, Г. Е. Титова,
О. А. Сельдимирова (М.: Наука, 2010. 174 с.)**

В книге изложены теоретические основы репродукции растений, среди которых особое внимание уделено новой категории вегетативного размножения растений – флоральной и вегетативной эмбриодогении, т.е. размножению путем образования соматических зародышей. Приводится сводка доказательств существования в природе разных типов и способов эмбриодогении, которые могут сочетаться с традиционными способами семенного и вегетативного размножения. Если соматические зародыши образуются в семенах вместе с половыми зародышами, возникает феномен дополнительной генетической гетерогенности семян, в результате которого новое поколение будет представлено не только особями, сочетающими гены обоих родителей, но и клонами материнского растения.

Важное внимание уделено теории и практике андроклиной гаплоидии. Явление андроклинии, в основе которого лежит переключение программы развития гаплоидных микроспориальных клеток пыльника с гаметофитного пути на спорофитный, широко используется в сельскохозяйственной биотехнологии растений для получения гомозиготных линий. В монографии представлены результаты исследования стадий развития пыльника, оптимальных для индукции морфогенеза *in vitro* по спорофитному пути. Установлено,

что морфогенетическая компетентность к переключению программы развития с гаметофитного на спорофитный присуща микроспорам с выраженной полярностью (сильновакуолизированные, с ядром в противоположной стороне клетки), которые структурно сходны со зрелой яйцеклеткой. Триггером спорофитного пути морфогенеза для таких микроспор является стрессовое воздействие холодом и оптимальная концентрация экзогенного ауксина в культуральной среде, что приводит к запуску программ эмбриодогенеза или гемморизогенеза.

В приложении содержатся подробные методические рекомендации по получению андроклиных гаплоидов яровой мягкой пшеницы, рассмотрены методы приготовления временных и постоянных цитозембриологических препаратов для контроля за процессами морфогенеза, методы подготовки материала для сканирующей электронной микроскопии, а также принципы работы с микроскопической техникой.

Нет сомнений, что эта монография будет интересна как научным работникам, преподавателям, аспирантам и студентам, так и селекционерам и биотехнологам.

Т. А. Ежова

Сдано в набор 14.03.2011 г.	Подписано к печати 10.06.2011 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈		
Цифровая печать	Усл. печ. л. 10.0 + цв. вкл.	Усл. кр.-отт. 1.1 тыс.	Уч.-изд. л. 10.0	Бум. л. 5.0
	Тираж 104 экз.	Зак. 1545		

Учредитель: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6