

УДК 581. 633.311 + 631.527

*О. П. БУЛКО, В. Л. КАЛЕР, В. Н. РЕШЕТНИКОВ***СТРУКТУРА КЛЕТОК ПРОРОСТКОВ ЗЛАКОВ,  
ВЫРАЩЕННЫХ ИЗ СЕМЯН И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ,  
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДОМ***Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск**(Поступила в редакцию 03.05.2005)*

**Введение.** Изучение генома растений, его экспрессии и структурно-функциональной организации, несмотря на существенные достижения с применением биохимических, генно-инженерных, молекулярно-биологических подходов и классических цитологических методов, остается актуальным [1–3]. Одна из наиболее удобных экспериментальных систем для изучения геномных проявлений у растений – проросток на ранних этапах развития. В обеспечение надежности и оперативности реализации генетической информации в так называемый критический период жизни проростка вовлечены разнообразные генетические программы. Механизмы ферментного гидролиза запасных биополимеров в прорастающем семени и их синтеза в растущих органах зародыша достаточно ясны [4], однако реализация генетических программ развития проростков исследована недостаточно.

При изучении прорастания семени и дифференциации тканей применяют ингибиторы синтеза биополимеров ( $\alpha$ -аманитин, рифомицин В и D, рифомицин CV, актиномицин D), равно как и гормональные препараты – активаторы прорастания. Показано, что фитогормоны выступают в роли эффекторов в физиологических процессах и, по-видимому, преобразуют специфические сигналы окружающей среды в биохимическую информацию. Фитогормоны рассматривают как главные факторы прорастания, которые управляют переходом из одного физиологического состояния в другое. Они участвуют не только в транскрипции и трансляции при синтезе белков, но и в изменении проницаемости мембран. Действие каждого фитогормона узкоспецифично [5]. Новый класс физиологически активных веществ – brassinosteroidов – характеризуется широким спектром биологической активности в малых концентрациях и привлекает пристальное внимание исследователей различных направлений [6, 7].

Проросток на начальных этапах своего развития обладает повышенной чувствительностью к внешним воздействиям (упомянутый выше критический период). Представляет, поэтому, особый интерес изучение экзогенного действия brassinosteroidов на ювенильных стадиях прорастания злаков – от замачивания семян и до появления осевых частей проростков. Семя с его многочисленными органоидами образует сложную биологическую систему, все элементы которой морфологически различимы, но функционально связаны при прорастании. Зародыши семян злаковых, отделенные от эндосперма и помещенные на искусственную питательную среду при сохранении стерильности, прорастают и дают нормальные зрелые растения [8].

Цель работы – проследить действие brassinosteroidов как на проросток с эндоспермом, так и на зародыш в культуре при его развитии в проросток. В этом случае можно выявить изменения в отдельных клетках, связанные с действием эффектора непосредственно на зародыш, исключив опосредованное влияние эндосперма. Кроме того, мы можем наблюдать взаимодействие эндосперм – проросток в отсутствие brassinosteroidа.



**Объекты и методы исследования.** Семена злаковых (тритикале, ячменя, пшеницы) подвергали поверхностной обработке гипохлоритом натрия в течение 5 мин, промывали дистиллированной водой, помещали в стерильные чашки Петри и оставляли для набухания в воде на 24 ч. Зародыши набухших семян отделяли от эндосперма, дополнительно стерилизовали гипохлоритом, промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге на минеральной среде Мурасиге-Скуга (культура зародышей *in vitro*). В питательную среду для проращивания зародышей вводили 24-эпибрассинолид (ЭБ) до конечной концентрации 0,1 и 1,0 мкМ. ЭБ был синтезирован в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и любезно предоставлен нам для исследований. В параллельном опыте проращивали семена (6 тыс. лк, фотопериод 16 ч). Осевые части проростков без эндосперма взвешивали и их односантиметровые верхние части мацерировали по оригинальной методике [9] и получали суспензии разделенных клеток с четко выраженными ядрами и хлоропластами для цитометрического определения размера клеток и ядер, а также числа хлоропластов в клетке. Измерения проводили в камере Фукса-Розенталя. Ядра [10] и хлоропласты [11] выделяли центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и глицерина.

Показателем энергии прорастания семян принимали массу развивающихся органов – скutel- зародышей. Площадь сечения клетки в фокальной плоскости оценивали как произведение ее длины на ширину, которые измеряли с помощью объект-микрометра МОВ-1-15<sup>x</sup> под микроскопом МБИ-6 (ЛОМО). Объем рабочей выборки для статистической обработки был одинаков ( $n = 30$ ) для всех определений. Различия параметров по вариантам принимали как достоверные при уровне значимости  $P < 0,05$ . Результаты наблюдений обрабатывали в системах Statistica 5.0 и Statgraphics Plus.

**Результаты и их обсуждение.** Все 540 измеренных значений сырой массы 96-часовых проростков, выращенных как из целого семени либо из зародыша, отделенного от эндосперма, так и после обработки этих вариантов ЭБ, представлены на рис. 1. Наглядно выражен вклад эндосперма. Его отделение приводит к резкому подавлению ростовой функции зародыша. Влияние обработок ЭБ можно увидеть и без статистических расчетов по вариантам для проростков, выращенных из семени, но не из зародыша.

Накопление массы проростков из целых семян под влиянием ЭБ достоверно ( $P < 0,0005$ ) подавляется у всех изучавшихся злаков, тогда как у проростков из зародышей проявляется стимуляция роста при обработке 0,1 мкМ раствором ЭБ. Это следует из рис. 2, отображающего усредненные по трем злакам величины.

Можно, поэтому, предположить, что в культуре зародыша не созданы условия питания проростка, нужные для активного роста, которые в норме обеспечиваются эндоспермом. Оптимизацию условий культуры зародыша можно, по-видимому, проводить, минимизируя различия в ско-

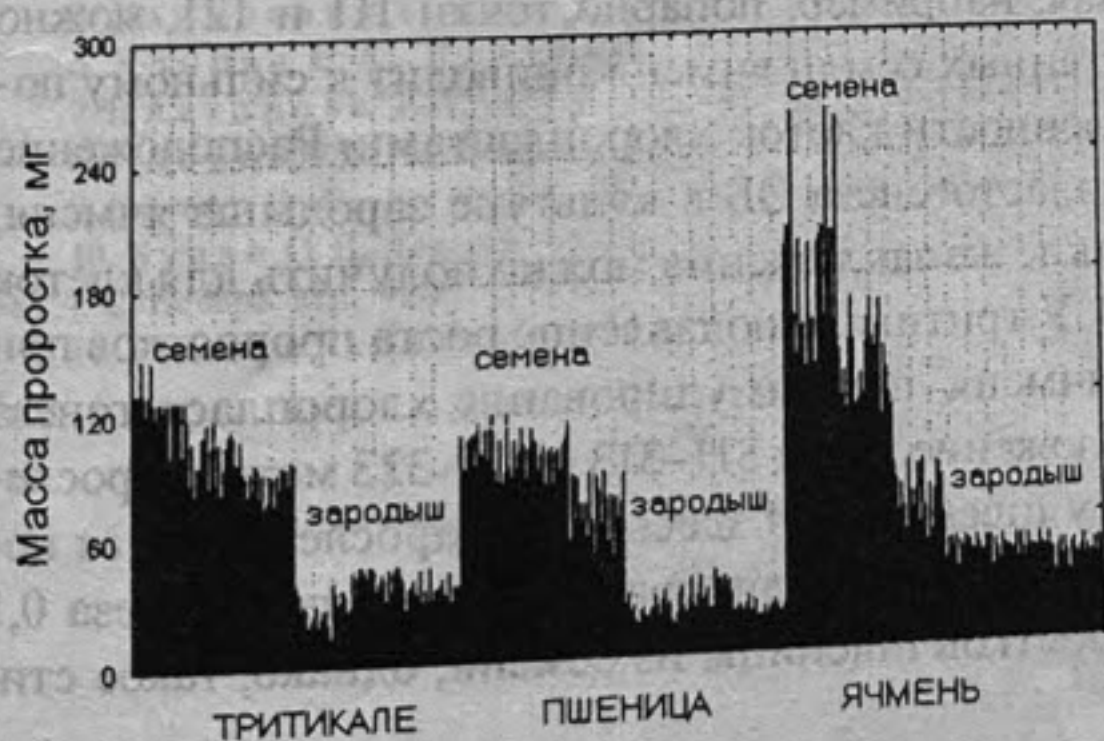


Рис. 1. Сырая масса проростков злаковых, выращенных из семян (семена) и в культуре зародышей (зародыш) на средах с раствором ЭБ

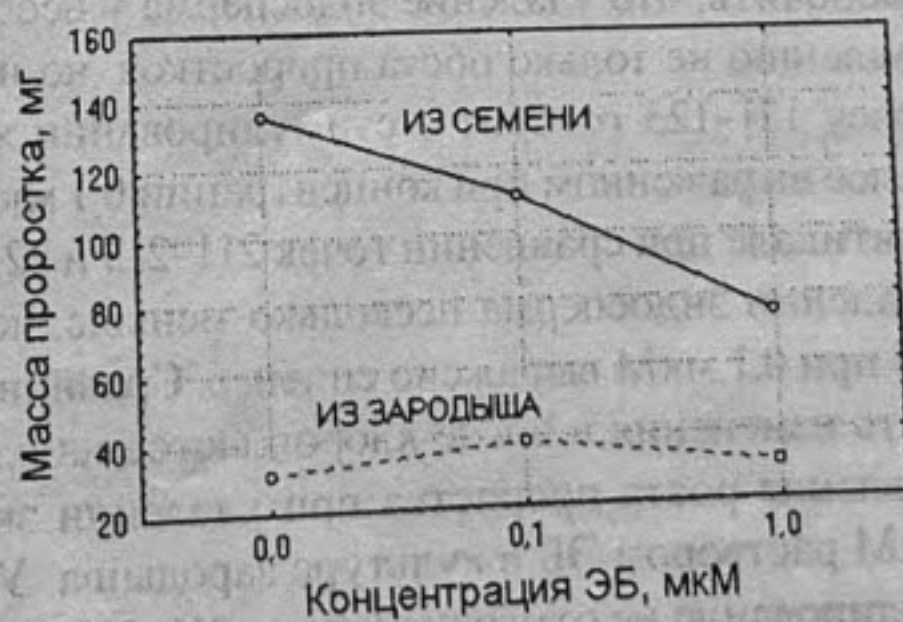


Рис. 2. Влияние ЭБ на массу 96-часовых проростков, полученных из целого семени и из зародыша. Приведены средние арифметические по всем видам злаков



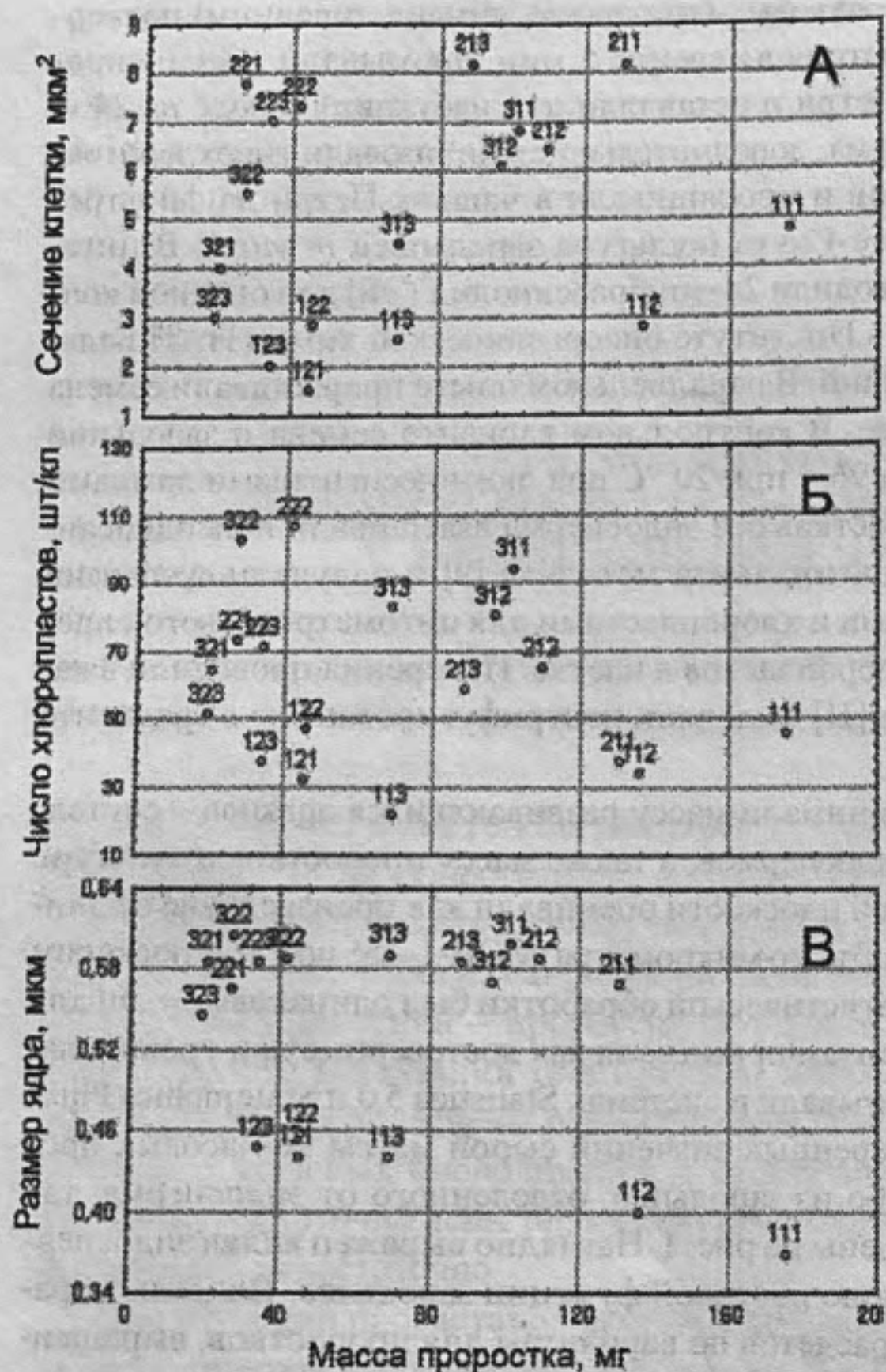


Рис. 3. Рассеяние средних значений сечения клеток в фокальной плоскости микроскопа относительно средних значений массы проростков (А), рассеяние среднего числа хлоропластов в клетке относительно средних значений массы проростков (Б), рассеяние средних значений размера ядра в фокальной плоскости микроскопа относительно средних значений массы проростков (В). Каждая точка отражает среднее арифметическое при  $n = 30$

является некая видоспецифическая связь. Сравнивая, например, попарно точки 111 и 121, можно заключить, что удаление эндосперма у необработанных семян ячменя приводит к сильному подавлению не только роста проростков, но и заселенности клеток хлоропластами. Расположение точек 121–123 говорит о стимулировании хлоропластогенеза ЭБ в культуре зародыша ячменя, более выраженном при концентрации 0,1 мкМ. Такие же заключения можно получить для клеток тритикале при сравнении точек 211–213 и 221–223. У тритикале подавление роста проростков при удалении эндосперма несколько меньше, чем у ячменя, но стимулирование хлоропластогенеза ЭБ при 0,1 мкМ выражено сильнее. Сравнивая положение точек 311–313 и 321–323 можно проследить изменения в числе хлоропластов на клетку у пшеницы. И здесь четко прослеживается подавление роста проростка при удалении эндосперма и стимулирование хлоропластогенеза 0,1 мкМ раствором ЭБ в культуре зародыша. У проростков пшеницы из семени, однако, такое стимулирование не отмечено (точки 311–313).

Интересные результаты удалось получить по размерам ядра клетки (рис. 3, В). У проростков ячменя, полученных из семени (точки 111–113), размер ядра при действии ЭБ увеличивается, тогда как масса проростка уменьшается. В культуре зародыша (точки 121–123) влияние ЭБ не прояв-

рости роста проростков из целого семени и из зародыша. ЭБ может использоваться для такой оптимизации только при малых концентрациях.

Эти наблюдения позволили использовать массу проростка как стандарт для сопоставления эффектов эндосперма и ЭБ на функции проростков, проявляющиеся в изменении цитологических параметров. Рассмотрение графика разброса значений средних величин сечения клетки в фокальной плоскости микроскопа относительно массы проростка (рис. 3, А) позволяет заключить, что области распределения точек отражают видоспецифичность злаков. Здесь и далее цифры возле точек означают: первая – вид злака (1 – ячмень, 2 – тритикале, 3 – пшеница), вторая – из чего получен проросток (1 – из семян, 2 – из зародыша), третья – концентрация раствора ЭБ (1 – водный контроль, 2 – 0,1 мкМ, 3 – 1,0 мкМ). Клетки ячменя (точки 111–113 и 121–123) самые мелкие, их размер, как и масса проростка, уменьшается под влиянием ЭБ у проростков, выращенных из семени, но оба параметра малы и мало изменяются при обработке ЭБ у клеток в культуре зародыша. Клетки тритикале (точки 211–213 и 221–223) самые крупные и их распределение на графике в принципе аналогично распределению у ячменя. Клетки пшеницы (точки 311–313 и 321–323), область расположения точек для которых лежит между ячменем и тритикале, подтверждают это заключение.

Сопоставление данных по числу хлоропластов в клетке с данными по массе проростка, представленное на рис. 3, Б, позволяет предположить, что между ними тоже прояв-



ляется, а размер ядра существенно больше, чем у проростков из семян. Близкое размещение точки 113 и группы 121–123 позволяет предположить, что торможение роста массы проростка после обработки ЭБ и увеличение размера ядра при удалении эндосперма у ячменя имеют общую причину. Рассматривая положение точек на рис. 3, В, легко убедиться, что размер ядра клетки тритикале и пшеницы изменяется при удалении эндосперма и при обработке ЭБ несущественно. Со- поставление убеждает также, что ячмень отличается от тритикале и пшеницы по реакции разме- ра ядра на выбранные нами факторы. ЭБ может, по-видимому, влиять на размер ядра клетки яч- мени через подавление функции гетеротрофного питания проростка от эндосперма.

Вклады факторов наличия эндосперма и воздействия ЭБ в изменения исследуемых ростовых и морфометрических параметров проростков оценивали методом главных компонент дисперсион- ного анализа. Дисперсия ростовых параметров проростков определяется главным образом целост- ностью семени (у ячменя на 62%, у тритикале на 85% и у пшеницы на 90%). Число хлоропластов в клетке, сечение клетки и размер ядра связаны с наличием эндосперма несущественно. Изменения числа хлоропластов в клетке определяются в основном влиянием ЭБ (у ячменя на 81%, у тритикале на 85% и у пшеницы на 74%). Дисперсии результатов измерения площади сечения клетки и размера ядра определяются во многом влиянием неучтенных, случайных факторов, наиболее вероятно не- достаточной точностью измерения линейных размеров клетки и ядра. Лишь у ячменя проявилось слабое влияние наличия эндосперма на дисперсию морфометрических показателей клетки и ядра.

**Заключение.** Из полученных результатов следует, что отделение эндосперма от зародыша, как и следовало ожидать, резко подавляет накопление массы в критический период жизни про- ростков, но проросток при этом сохраняет всю генетическую программу развития растения. Между вариантами опыта различий по размерам ядра в этот период не выявлено, а у тритикале и пшеницы ядра в пределах ошибки эксперимента равны по размеру. Часто используемая в куль- туре растительных органов и тканей минеральная среда Мурасиге-Скуга не обеспечивает нуж- ный уровень гетеротрофного питания проростков злаков в этот период. ЭБ можно отнести к мощным факторам увеличения числа хлоропластов в клетке проростков злаков в ювенильном состоянии. ЭБ не ведет в пределах изучавшихся концентраций к гибели растений. Биотехнологи- ческие экспериментальные системы «эндосперм–зародыш–эпибрасинолид» и «зародыш–про- росток–эпибрасинолид» (системы *in vitro*) физиологически существенно различаются, а ЭБ, оче- видно, модифицирует сопряжение биохимических процессов взаимодействия зародыша с эн- доспермом, в результате чего изменяются эффективность накопления массы проростка и число хлоропластов в клетке проростка.

### Литература

1. Ко на ре в В. Г. // С.-х. биол. 1985. № 5. С. 20–31.
2. Ти ш ен ко Е. Н. // Физиол. биох. культ. растен. 1998. Т. 30, № 5. С. 380–385.
3. Молекулярная генетика и биотехнология. Материалы междунар. конф. 6–8 апреля 1998, г. Минск. Мн., 1998.
4. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. М., 1985.
5. Данилович К. Н., Соболев А. М., Жданова Л. П. Физиология семян. М., 1982.
6. Хрипач В. А., Лахвич Ф. А., Жабинский В. Н. Брассиностероиды. Мн., 1993.
7. Платонова Т. А., Кораблёва Н. П. // Физиол. растен. 1998. Т. 45, № 6. С. 870–881.
8. Дибовой В. Н., Хамула П. В. // Физиол. биох. культ. растен. 1998. Т. 30, № 5. С. 391–396.
9. Вечер А. С., Булко О. П. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1985. № 3. С. 104–105.
10. Булко О. П. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / Под ред А. С. Вечера. Мн., 1986. С. 11–15.
11. Р е ш е т н и к о в В. Н. Там же. С. 19–24.

BULKO O. P., KALER V. L., RESHETNIKOV V. N.

### CELL STRUCTURE OF CEREAL SEEDLINGS GROWN FROM SEEDS AND ISOLATED EMBRYOS BY 24-EPIBRASSINOLIDE TREATMENT

#### Summary

Growth rate and some cytological characteristics of barley, wheat and triticale seedlings, cultured both from seeds and embryos, as well as 24-epibrassinolide influence on their growth and cell structure were compared. Endosperm detachment does not disturb seedlings development from embryo. 24-epibrassinolide was shown to modify depending on its concentration, the biochemical coupling between embryo and endosperm, to stimulate chloroplasts accumulation in a cell and to change growth of seedlings mass and its cell morphology.