

И. В. ЦИНГЕР, Т. П. ПЕТРОВСКАЯ-БАРАНОВА

**АВТОЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРОМОРОЖЕННЫХ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 29 XII 1969)

Уже в первой половине нашего века Шаффнитом было показано, что промораживанию растительных тканей сопутствует ферментативный распад содержащихся в них высокомолекулярных соединений⁽¹⁾. Этот факт был подтвержден рядом работ других авторов ((²⁻⁶) и др.). Вместе с тем, в криобиологической литературе стали в последнее время появляться указания на структурные изменения, возникающие в растительных тканях под действием отрицательных температур^(7, 8).

Наша работа является попыткой объединить при помощи цитохимической методики биохимический и структурный аспекты повреждаемости растений морозом. В качестве материала нами были взяты три сорта пшеницы с разными уровнями морозостойкости: один из наиболее устойчивых сортов — Лютесценс 329, менее стойкий к низким температурам пшенично-пырейный гибрид 48 и не выносящая условий зимовки пшеница яровая 56. Опыты были поставлены в двух вариантах: для Лютесценс 329 и гибрида 48 в лабораторных условиях и для всех трех сортов в условиях зимовки в поле. В первом случае двухдневные проростки, выращенные в чашках Петри при комнатной температуре, без предварительного закалывания помещали в холодильник, где выдерживали в течение суток при температурах -8 и -12° . Промороженные образцы немедленно фиксировали в смесях Карнуа или Бродского, охлажденных до температур холодильника. Проростки, развившиеся в полевых условиях, регулярно брали с поля в течение всего периода зимовки и подвергали фиксации в тех же жидкостях, причем температуру фиксаторов предварительно доводили до той температуры, при которой растения находились в поле в момент взятия проб. Из зафиксированных таким путем тканей обычным способом изготавливали постоянные микротомные препараты. Для выявления состояния в тканях белков препараты окрашивали проционовым хемо-ярко-красным или зеленым прочным при рН 2,2. Нуклеиновые кислоты окрашивали по Унна метиловым зеленым — пиронином или галлоцианином с хромовыми квасцами.

Проростки, пробывшие в течение суток в холодильнике при -12° , погибли все без исключения. При -8° гибрид 48 погиб, но проростки Лютесценс 329 остались живыми. При зимовке в поле проростки яровой 56 погибли, но растения обоих других сортов в большинстве своем выжили. Однако у всех цитологически исследованных экземпляров были обнаружены повреждения, причем пострадал от перезимовки не только пшенично-пырейный гибрид, но и Лютесценс 329.

Характер и природа повреждений во всех вариантах опыта — при этом как у погибших, так и у выживших экземпляров, — были, несмотря на значительные количественные различия, в основных чертах идентичными, так что полученные гистохимические картины могут быть описаны для всех изученных случаев совместно. В то же время, при детальном исследовании поврежденных тканей (изучалась главным образом паренхима молодых листьев и узла кушения) выяснилось, что эти повреждения —

даже в пределах одной и той же ткани — могут быть различными по своему цитологическому облику, и с этой точки зрения их можно разбить на следующие четыре типа:

1. Клетки (или группы клеток), приобретающие при окрашивании белковыми красителями вид массивных, гомогенных сгустков с гораздо более интенсивной, чем в норме, сплошной окраской (рис. 1, 1б). На препаратах, обработанных реактивами на нуклеиновые кислоты, в аналогичных клетках тоже наблюдаются сгущение окраски и сдвиг в сторону исчезновения нормальной структурированности (рис. 1, 2а) *.

2. Более или менее обширные участки тканей, превратившиеся в рыхлую, бесформенную, бледно окрашивающуюся цитохимическими реактивами массу, в которой отдельные клетки уже неразличимы; видны только фрагменты клеточных структур (рис. 1, 3).

3. Участки, представляющие собой полупустые полости, частично заполненные остатками клеточных фрагментов.

4. Пустые полости, лишь по краям которых лежат обрывки полураспавшихся клеток (рис. 1, 4).

Описанные четыре типа повреждений соответствуют четырем отдельным стадиям единого процесса распада, связанным между собой хронологической последовательностью. Однако факторы, ведущие к разрушению промороженных тканей, на разных этапах этого единого процесса не одинаковы.

Только первый этап, выражающийся в появлении густо окрашенных гомогенных сгустков, может расцениваться как прямой, непосредственный результат действия на растительные ткани отрицательной температуры. Образование этих сгустков есть, несомненно, следствие коагуляции и денатурации протопласта — в первую очередь его белковых компонентов (рис. 1, 1б, 2а). Что оба эти в большей мере взаимосвязанные процессы суть прямой результат промораживания — на это неоднократно указывали многие исследователи (9). Непосредственной причиной этих повреждений может быть как возникновение внутриклеточных кристаллов льда, так и обезвоживание протопласта при кристаллизации воды в межклетниках (10). Появление аномальной сплошной окраски повышенной интенсивности в клетках, обработанных реактивами на нуклеиновые кислоты (рис. 1, 2а), по-видимому, тоже вызывается первичными процессами, близкими к тем, которые ведут к коагуляции и денатурации белков: поскольку макромолекулы нуклеиновых кислот тоже окружены гидратными оболочками (11), поскольку разрушение этих оболочек при обезвоживании, обусловленном промораживанием, может, как и в случае белков, способствовать слипанию нуклеиновых компонентов клеточных нуклеопротеидов и исказить их нормальную структуру, делая нуклеиновые кислоты более доступными действию красителей. Дезорганизация этих высокополимерных соединений может быть равным образом вызвана и внедрением в плазму микрокристаллов льда.

Совсем иная причина лежит в основе повреждений второго, третьего и четвертого типов. Изображенные на рис. 1, 3, 4, этапы распада промороженных тканей не служат прямым непосредственным продолжением денатурации высокополимерных структур клетки. Этот первичный эффект промораживания связан с последующими деструктивными процессами лишь косвенно. Ближайшая же причина происходящих после денатурации разрушений сводится к биологически нецелесообразному возрастанию в тканях активности гидролитических ферментов (а вероятнее всего — и расщепляющих ферментов других типов). В пользу такого понимания этих явлений говорят, прежде всего, упомянутые выше биохимические данные, указывающие на усиление активности гидролитических фермен-

* Микрофотографии, документирующие цветные рисунки, не могли быть приведены за недостатком места.

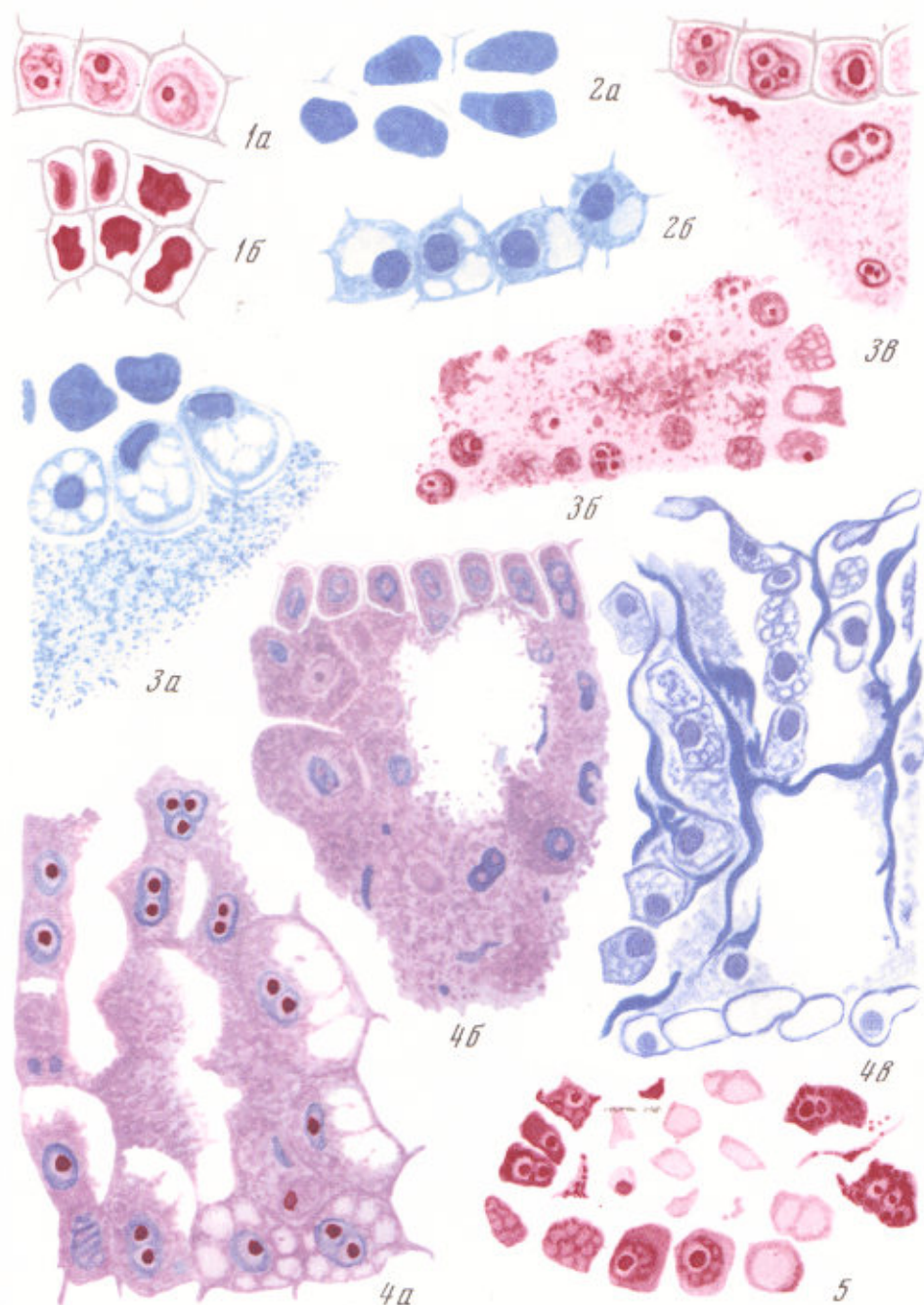


Рис. 1. 1 — однородные сгустки клеточного содержимого в молодых листьях пшеницы Лютеценс 329 после осенних заморозков (ноябрь): а — неповрежденный наружный лист, б — поврежденный внутренний (хемо-ярко-красный, увел. 5×90); 2 — сильно поврежденные (а) и слабо поврежденные (б) клетки листовой паренхимы пшенично-пырейного гибрида 48 в полевых условиях (январь) (галлоцианин, увел. 5×90); 3 — бесструктурные массы поврежденных клеток хлоропластов молодых листьев различных сортов пшеницы: а — пшенично-пырейный гибрид (январь) (галлоцианин, увел. 5×90), б — яровая 56 (январь) (хемо-ярко-красный, увел. 5×90), в — Лютеценс 329 (апрель) (хемо-ярко-красный, увел. 5×90); 4 — полости в замороженных молодых листьях пшеницы: а — Лютеценс 329 после суточного промораживания при -8° (метилловый зеленый — пиронин, увел. 5×90), б — то же при -12° (увел. 3×90), в — то же в полевых условиях (январь) (галлоцианин, увел. 3×90); 5 — постепенное ослабление окраски в ходе протеолиза в молодом листе яровой пшеницы 56, погибшем в полевых условиях (январь) (хемо-ярко-красный, увел. 5×90)

тов как на характерный эффект промораживания. Об этом же убедительно свидетельствует и более детальный анализ сделанных нами цитохимических наблюдений.

Разрыхленные участки разрушенных тканей (рис. 1, 3) по своей консистенции и окраске имеют очень мало общего с картиной коагуляции плазменных белков, представленной на рис. 1, 1. В одном случае перед нами плотные гомогенные сгустки, в другом — рыхлые груды разнообразных фрагментов клеточного «инвентаря», находящихся на разных стадиях распада, — картина, свидетельствующая о том, что сущность происходящих здесь событий (в противоположность тому, что мы видели на рис. 1, 1б) не в резком коагулирующем воздействии на клетки мороза, а в постепенном, все прогрессирующем распаде тканей, ход которого характерен именно для деятельности гидролитических ферментов: разрушаемая этими ферментами ткань является по существу не чем иным, как автолитической смесью.

В пользу такой трактовки наблюдаемых разрушений говорит также сравнительно очень слабая окраска разрыхленных зон, резко контрастирующая с интенсивно окрашенными плазменными белками, денатурированными при промораживании. Постепенно осуществляющийся в ходе протеолиза разрыв пептидных связей нарушает компактность белковых макромолекул, а разрыхление их приводит к тому, что химические группировки, с которыми связываются белковые красители, как бы расплываются, отделяясь друг от друга, что и приводит, по мере распада белков, ко все большему ослаблению окраски.

На ферментативный характер наблюдаемых разрушений указывает и тот факт, что на препаратах, окрашенных смесью Унна, обнаруживается постепенный переход окраски ядер из зеленовато-синей в красную, которая затем все больше и больше бледнеет, так что ядра в конце концов становятся незаметными (рис. 1, 4б). Этот процесс указывает на постепенную деполимеризацию ДНК, осуществляемую, без сомнения, гидролазами нуклеинового обмена.

Постепенное таяние целых участков тканей (рис. 1, 5) вплоть до полного их исчезновения не может быть объяснено ничем иным, кроме лизирующей работы ферментов.

Помимо полостей, образование которых является результатом работы гидролаз, в замороженных тканях встречаются иногда полости, образованные давлением на клетки кристаллов льда. Но в этих случаях края полости окружены обычно нормальными клетками, не несущими признаков гидролитического распада.

Естественно встает вопрос о ближайшей причине возрастания в замороженных тканях активности гидролитических ферментов и неупорядоченного характера этой активности. За последние годы в литературе появились многочисленные сообщения о существовании органелл типа лизосом (¹²) в тканях не только животных, но и растений ((¹³⁻¹⁵) и др.). Гидролазы постушают в клетки в биологически нецелесообразных количествах только при тех или иных воздействиях патологического характера, вызывающих нарушение целостности мембран этих органелл. К числу таких повреждающих факторов относится и промораживание (^{12, 15}). Первичные повреждения, непосредственно наносимые тканям растения промораживанием, ведут не к распаду клеточных полимеров на более низкомолекулярные вещества, а лишь к искажению структуры высокополимерных соединений. Однако такие структурные нарушения могут затрагивать — и, по-видимому, неизбежно затрагивают — те образования типа лизосом, с которыми связано нормальное функционирование гидролитических ферментов. Каждое такое нарушение ведет к освобождению ферментов от структурных ограничений, контролирующих их деятельность, и является толчком к развертыванию все нарастающих процессов автолитического характера. Денатурированные белки, как известно, менее устойчивы к протеолизу,

чем белки нативные. Поэтому описанные выше полости, образующиеся в замороженных тканях, служат, по-видимому, исходными очагами первичных повреждений, из которых автолитические процессы распространяются по всем направлениям, захватывая и участки тканей, не пострадавшие от прямого воздействия промораживания. Об этом свидетельствует постепенное убывание интенсивности разрушений в центробежных по отношению к полостям направлениях (см., например, рис. 1, 4б, 5).

Приведенные данные указывают на то, что автолитический распад тканей усугубляет губительное действие иногда сравнительно узко локализованных первичных повреждений. Этот распад может в одних случаях представлять собой влияние постмортального характера, тогда как в других он обнаруживается и у растений, сохраняющих после промораживания свою жизнеспособность. Например, в случае яровой пшеницы 5б, у которой автолитические процессы были выражены в наших опытах наиболее ярко, гибель растения всецело определяется, вероятно, уже одним только первичным эффектом денатурации клеточного содержимого. Автолитический распад клеток играет здесь главным образом роль сопутствующего явления. Это относится в известной мере и к более морозостойким формам, в частности к Лютеценс 329, в тех случаях, когда температура среды достаточно низка для того, чтобы первичный денатурирующий эффект промораживания сказался если не на всех, то на большинстве клеток (см., например, рис. 1, 4б).

Более важное, а возможно и решающее значение процессы автолиза могут приобретать в тех случаях, когда первичная денатурация тканей носит локальный, очаговый характер и когда возникающая в этих очагах бурная и беспорядочная деятельность гидролаз, выходя за пределы очага, распространяется на окружающие клетки, поврежденные в значительно меньшей степени или даже вообще не затронутые первичным эффектом промораживания (рис. 1, 4а, 4в). При таких условиях судьба растения определяется, с одной стороны, количеством первичных очагов денатурации, с другой — уровнем интенсивности автолитических процессов. Скорость их распространения находится в обратном соотношении с активностью защитных физиологических механизмов, которую растение способно противопоставить нарастающей волне автолизиса, захватывающей при своем распространении все новые территории. Вопрос о сущности этих защитных механизмов подлежит дальнейшему изучению.

Главный ботанический сад
Академии наук СССР
Москва

Получило
16 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Schaffnit, Mitteilungen des K. W. Inst. f. Landwirtschaft in Bromberg, 3, 93 (1910). ² K. Mothes, Planta, 12, 686 (1931). ³ А. Г. Михайловский, И. В. Борзаковская, В сборн. Приемы повышения устойчивости озимых пшениц и клевера против неблагоприятных условий внешней среды, Киев, 1954. ⁴ U. Heber, Planta, 52, № 4 (1958). ⁵ A. M. Le Scint-Quervel, C. R., 251, 14 (1960). ⁶ M. Wilding, M. Stahmann, S. Dale, Plant Physiol., 35, № 5 (1960). ⁷ Ch. R. Olien, Ann. Rev. Plant Physiol., 18, 387 (1967). ⁸ A. Sakai, K. Otsuka, Plant Physiol., 42, № 12 (1967). ⁹ О. Библь, Цитологические основы экологии растений, М., 1965. ¹⁰ И. И. Гуманов, Физиол. раст., 14, в. 3, 520 (1967). ¹¹ N. Hanafusa, Intern. Conf. on Low Temperature Science, Hokkaido University, 1967. ¹² C. De Duve, In: Lysosomes, Ciba Foundation Symp., J. and A. Churchill, London, 1963, p. 1. ¹³ K. Beneš, Z. Loyda, B. Horavka, Histochemie, 2, 31 (1961). ¹⁴ J. F. Harrington, A. M. Altschul, Federat. Proc., 22, 475 (1963). ¹⁵ P. B. Cahalan, J. Exp. Bot., 16, № 47, 350 (1965).