

Н. В. БЕЛИЦЕР

**ЛИЗОСОМАЛЬНАЯ И ЭКСТРАЛИЗОСОМАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В КЛЕТКАХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ
HAPLOPAPPUS GRACILIS (NUTT.) GRAY**

(Представлено академиком М. Х. Чайлаяном 8 IV 1974)

Хотя концепция лизосомальной природы растительных вакуолей получает все больше доказательств в работах по ультраструктурной морфологии (1-6), цитохимии (7-11) и биохимии (12, 13), часть исследователей ее не разделяют, продолжая считать функциональными эквивалентами лизосом сферосомы (12), микротельца (13) или органеллы с одинарной мембраной и зернистой стромой, не имеющие однозначной морфологической интерпретации (15, 16). Для успешной идентификации фитолизосом необходимо, по-видимому, не ограничиваясь констатацией наличия кислых гидролаз в определенных структурах, детально изучить те процессы, в которых наиболее ярко проявляется одна из основных функций лизосомального компартмента, — процессы локальной деструкции различных внутриклеточных компонентов и общего автолиза и гибели самой клетки.

В настоящем исследовании предпринята попытка проследить ход этих процессов посредством выявления особенностей ультраструктурной локализации маркерного лизосомного фермента — кислой фосфатазы (КФ). Объектом исследования служили клетки суспензионной культуры гаглопаннуса, *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray, выращиваемой на модифицированной среде Эрикссона (17). Материал фиксировали через 3; 6; 10; 14 и 18 суток после пересадки в свежую питательную среду. Фиксацию проводили очищенным 3% раствором глутаральдегида на фосфатном либо каодилатном буфере (рН 6,9) при 0—4° в течение 1 часа, промывали тем же или трис-малеатным буфером 4—48 час. Для выявления активности КФ применяли модифицированный метод Гомори (8). В качестве контролей использованы инкубирование материала в среде, лишенной β-глицерофосфата Na, 5-минутное кипячение, предшествующее инкубации в полной среде, и введение в инкубационную среду ингибитора NaF (0,01 M). После дофиксации 1% OsO₄ и обезвоживания материал заключали в эпон или в смесь эпоксидных смол (эпон+аралдит); срезы изучали в электронном микроскопе либо неокрашенными, либо контрастированными цитратом свинца по Рейнольдсу.

Активность КФ обнаружена как в мелких, так и в центральных вакуолях исследованных клеток. При этом в клетках «молодой» культуры (3 и 6 суток после пересадки в свежую питательную среду) осадок фосфата свинца выглядит более тонкодисперсным (рис. 1А) и обнаруживается реже, чем в культуре стационарной фазы роста (14 и 18 суток); в последнем случае продукт реакции Гомори образует массивные электронно-плотные отложения, локализованные, как правило, на внутренней поверхности вакуолярных мембран (рис. 1Б). Эти факты, возможно, свидетельствуют о возрастании активности кислых гидролаз в вакуолях-фитолизосомах по мере «старения» культуры.

При сближении мелких вакуолей с митохондриями (рис. 1В), пластидами, пероксисомами или липидными глобулами (рис. 1Б) ферментная активность нередко выявляется непосредственно в месте контакта мембраны,

ограничивающей вакуоль, с оболочкой соответствующей органеллы или включения (рис. 1*B*). Согласно нашим предыдущим морфологическим наблюдениям, подобные картины могут свидетельствовать о начальных стадиях лизиса индивидуальных органелл, что и подтверждается результатами цитохимического анализа. Морфологически интактные органеллы, как правило, не содержат фосфата свинца; в лизлируемых митохондриях и пластидах, напротив, выявляется продукт реакции Гомори, локализованный в основном по периферии электронно-прозрачных зон лизиса (рис. 1*Г*). Помимо истинных вакуолей активность КФ обнаружена и в иных элементах вакуолярной системы, что полностью согласуется с концепцией функционирования всей совокупности вакуолярных структур как единого лизосомного аппарата растительной клетки (¹).

Инкубация материала в присутствии NaF и инактивация фермента при кипячении полностью устраняют в клетке электронно-плотный преципитат. Исключение экзогенного субстрата из инкубационной среды дает возможность выявлять мелкие гранулы фосфата свинца преимущественно в тех локусах вакуолярной мембраны, которые, по-видимому, несут максимальную функциональную нагрузку, непосредственно обеспечивая осуществление литических процессов: например, на инактивации тонопласта, прилегающей к частично разрушенной митохондрии, захватываемой центральной вакуолью (рис. 1*Д*).

Изучение генерализованного автолиза клеточного содержимого показало, что процессы старения культуры сопровождаются появлением в отдельных клетках диффузной реакции цитоплазмы; при этом все внутриклеточные мембраны, включая тонопласт, могут сохранять морфологическую интактность (рис. 1*Е, Ж*). Подобные картины можно, по-видимому, объяснить избирательным нарушением физико-химических свойств вакуолярных мембран, ведущим к их лабилизации и последующему выходу наружу гидролитических ферментов, локализованных внутри лизосомальных структур. Остальные мембранные системы, например плазмалемма (рис. 1*Е*) и оболочка митохондрий (рис. 1*Ж*), остаются некоторое время относительно устойчивыми к действию кислых гидролаз, вследствие чего генерализованный автолиз клеточного содержимого распространяется в первую очередь по цитоплазматическому матриксу, лишь после этого захватывая и органеллы. Этот процесс длительное время остается локализованным в пределах, ограниченных плазменной мембраной, о чем свидетельствует отсутствие продукта реакции Гомори в клеточных оболочках.

Таким образом, проведенное ультраструктурно-цитохимическое исследование подтверждает лизосомальную природу вакуолярной системы растительных клеток и высказанные нами ранее предположения о возможности двух способов деструкции внутриклеточных компонентов: 1) автофагия центральной вакуолю и 2) разрушение в результате ассоциации с мелкими цитоплазматическими вакуолями. Подобные процессы локального лизиса и элиминации отдельных органелл прослеживаются на всех фазах роста пассируемой культуры. Не будучи непосредственно связанными со старением и гибелью клеток, эти процессы играют, по-видимому,

Рис. 1. *А, Б* — вакуолярная локализация активности КФ: *А* — 6-суточная, *Б* — 18-суточная культуры; *В-Д* — активность КФ, связанная с лизисом митохондрий: *В* — контакт митохондрии с мелкой вакуолью — фитолизосомой, *Г* — частично разрушенная митохондрия, *Д* — включение митохондрии в центральную вакуоль (инкубация без β-глицерофосфата Na); *Е-Ж* — генерализованный автолиз цитоплазмы: *Е* — диффузная реакция цитоплазмы на ранних стадиях автолиза, *Ж* — интенсивная реакция на более поздних стадиях (клетка справа). Продукт реакции Гомори указан стрелками. *в* — вакуоль, *ц. в.* — центральная вакуоль, *м* — митохондрия, *т* — тонопласт, *п.л.* — плазмалемма, *л. г.* — липидная глобула, *к. о.* — клеточная оболочка, *я* — ядро

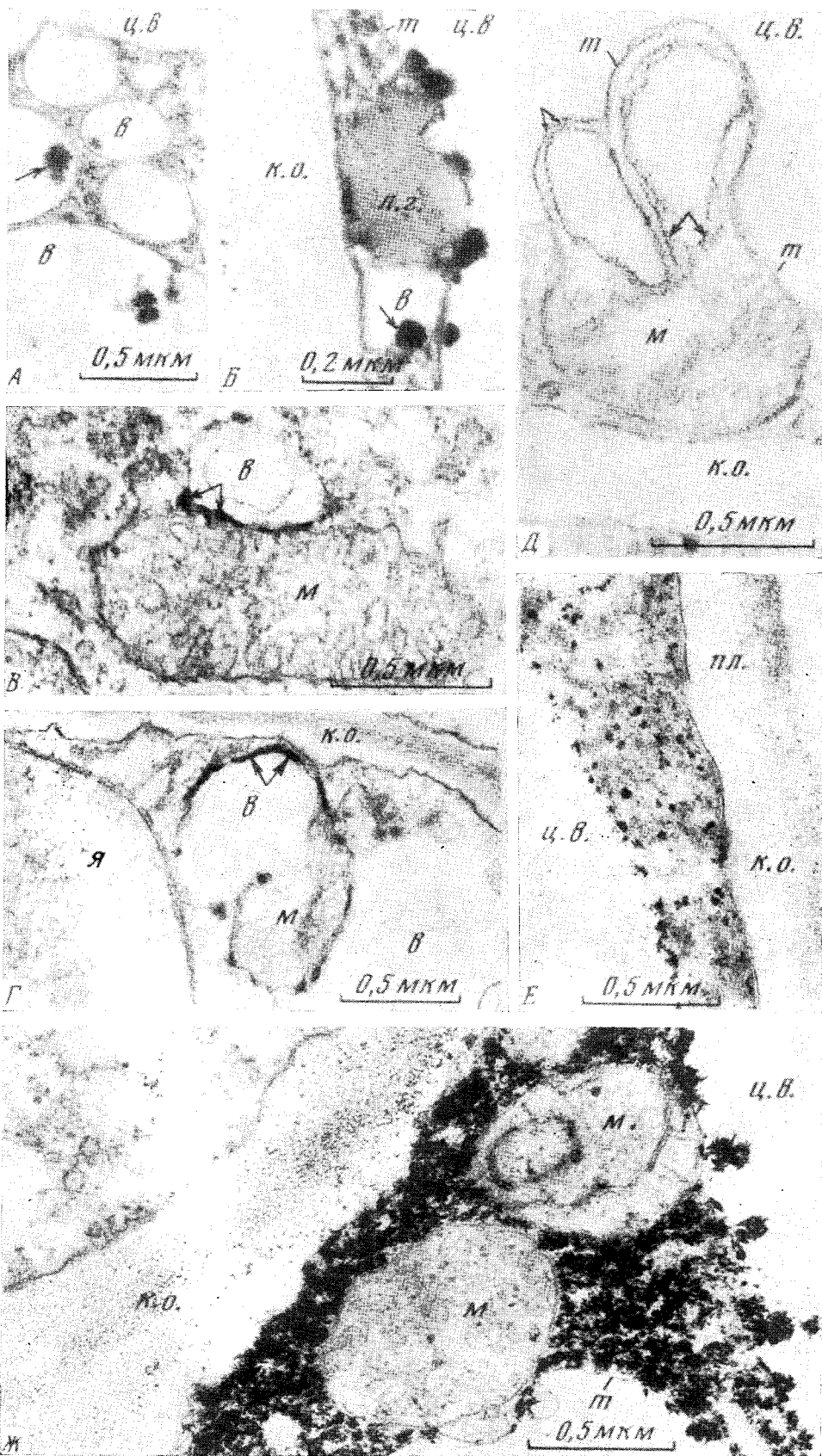


Рис. 1.



Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Транслокация между IV и 3R хромосомами. *a* – гомолог IV хромосомы занимает положение у хромоцентра; *б* – гомолог IV хромосомы транслоцирован на 3R хромосому.

Рис. 2. Автограф клетки с меткой H^3 -тимидином над некоторыми участками хромосом по типу «discontinuous»

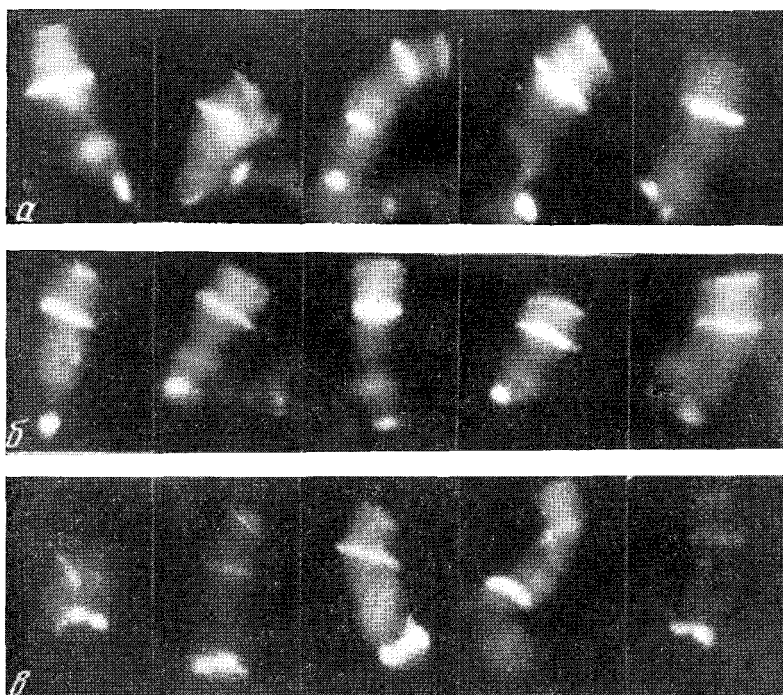


Рис. 3. Флюоресценция IV хромосомы в норме и при транслокации. *a* – IV хромосома в норме, светящиеся полосы в локусах 101F, 102D, 102EF; *б* – яркое свечение в локусе 101F транслоцированного гомолога IV хромосомы; *в* – гомолог IV хромосомы у хромоцентра

важнейшую роль в кругообороте составных частей клетки и поддержании внутриклеточного гомеостаза.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
Академии наук УССР
Киев

Поступило
21 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Белицер, ДАН, т. 203, № 1, 211 (1972). ² Н. В. Белицер, Цитология, т. 14, 7, 836 (1972). ³ Н. В. Белицер, Цитология, т. 14, 11, 1309 (1972). ⁴ Н. В. Белицер, Г. Г. Мартин, О. М. Недуха, Укр. бот. журн., т. 29, 1, 14 (1972). ⁵ В. А. Fineran, Protoplasma, v. 72, 1, 1 (1974). ⁶ P. Berjak, Ann. Bot., v. 36, 144, 73 (1972). ⁷ М. П. Салеева, Тез. докл. IX Всесоюз. конфер. электрон. микроскоп., М., 1971. ⁸ N. Roux, J. Microscopie, v. 9, 3, 407 (1970). ⁹ J. Figier, Planta, v. 108, 245 (1972). ¹⁰ F. Marty, C. R., D, v. 276, 1549 (1973). ¹¹ J. Cronshaw, I. Charvat, Canad. J. Bot., v. 51, 1, 97 (1973). ¹² Ph. Matile, In: Lysosomes in Biology and Pathology, v. 1, 1969, p. 406. ¹³ D. Pitt, M. Galpin, Planta, v. 109, 233 (1973). ¹⁴ А. Е. Васильев, В сборн. Ультраструктура растительных клеток, «Наука», 1972. ¹⁵ М. А. Проценко, ДАН, т. 211, № 1, 243 (1973). ¹⁶ G. Truchet, Ph. Coulomb, J. Ultrastruct. Res., v. 43, 36 (1973). ¹⁷ Д. М. Гродзинский, Н. В. Викторова, Физиол. раст., 18, 4, 823 (1974).