

ЕКОЛОГІЯ

УДК 579.64:573.4

Н.І. АДАМЧУК-ЧАЛА

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д03680

ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* УКМ В-6035 НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ЯДЕРЦЕВИХ СУБКОМПОНЕНТІВ КЛІТИН АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКІВ СОЇ

Досліджено вплив інокуляції *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на структурно-функціональну організацію ядерцевих субкомпонентів клітин апікальних меристем проростків сої, культивованих в асептичних умовах.

Використано метод трансмісійної електронної мікроскопії та імуноцитохімічного аналізу з використанням мічених золотом антитіл до ДНК. За даними імуноцитохімічного аналізу показано, що за інокуляції збільшується щільність мітки в 3,7 разів у фібрилярних центрах ядерця в у 2,8 рази у щільному гранулярному компоненті. Встановлено підвищення функціональної активності ядерцевих рослинних клітин під впливом інокуляції, що свідчить про зростання рівня транскрипції ДНК та процесингу РНК в них.

Ключові слова: меристеми, ДНК, ядерце, фібрилярний центр, щільний фібрилярний компонент, інокуляція

За останні 20-25 років у провідних лабораторіях США, Канади, України було показано, що за умов інокуляції відбуваються суттєві зміни у функціонуванні та проходженні найважливіших процесів життєдіяльності рослинних клітин, у тому числі накопичення білка [2, 3].

Згідно загальноприйнятої точки зору, рівень клітинного метаболізму, ступінь експресії рибосомних генів пов'язаний з ультраструктурними змінами ядерця [1, 4]. Але існує дуже мало даних щодо впливу інокуляції на ядерце, як первинну ланку формування білоксинтезуючого апарату макросимбіонта.

Мета роботи – дослідити вплив інокуляції *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на структурно-функціональну організацію ядерцевих субкомпонентів клітин апікальних меристем проростків сої, що тісно пов'язаний з синтезом РНК і накопиченням білку у клітинах рослин.

Матеріал і методи досліджень

Для інокуляції стерилізованого за методом [2] насіння сої сорту Анжеліка використовували бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 – вискоелективний симбіонт сої з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ.

Штам вирощували на рідкому манітно-дріжджовому середовищі [2]. Бактеріальне інокуляційне навантаження складало 10^6 бактерій на насінину. Проростки сої із інокульованих насінин та контрольних без інокуляції культивували 10 діб в асептичних умовах. З апексів проростків сої готували препарати за стандартною методикою для електронно-мікроскопічних досліджень з використанням імуноцитохімічної реакції [1]. Препарати досліджували у

трансмсійному електронному мікроскопі JEOL JSM 1400-EX при 80 кВ. Щільність мічення над цитоплазматичними компартментами, ядерними структурами та субядерцевими компонентами вираховували, використовуючи програму «QWin Standard» (Leica) для автоматичного аналізу зображень. Контроль мічення проводили, випускаючи інкубацію в первинних антитілах.

Результати досліджень та їх обговорення

Із інокульованих і не інокульованих насінин сої на десяту добу експерименту розвивались проростки, що мали зародковий корінь, гіпокотиль, сім'ядолі та зачатки першої пари справжніх листків. Порівняльний структурно-функціональний аналіз виявив, що меристематичні клітини інокульованих проростків різних шарів мали більший об'єм – $493 \pm 72,0$ мкм³, порівняно з клітинами контрольного варіанту – $216,2 \pm 52,0$ мкм³. Нуклеоплазма та ядерця клітин експериментального варіанту на електронограмах мали гетерогенну гранулярну компоненту.

У контрольних проростків ультраструктурна організація меристематичних клітин апексу сої була характерною для клітин твірного типу. Проксимальну частину клітин посідало ядро хроманемно-хроматинового типу з ядерцем. Ядро було оточене цитоплазмою і органелами, переважну частку яких складали мітохондрії. В цитоплазмі формувалися невеликі вакуолі. Грудки конденсованого хроматину спостерігалися біля ядерної оболонки або в каріоплазмі. Поодинокі велике ядерце круглої або злегка овальної форми було розташовано в центрі ядра. Фібрилярні центри (ФЦ) розміщувалися по всьому ядерцевому об'єму. Щільний фібрилярний компонент (ЩФК) розміщувався навколо фібрилярних центрів або між ними. Гранулярний компонент (ГК) був розташований на периферії ядерця та навколо вакуолей. Широкий пухкий шар гранулярного компоненту на ядерцевій периферії може бути непрямим показником інтенсивного транспорту рибосомних субодиниць з ядерця в каріоплазму і потім в цитоплазму. Деякі кластери ГК виявлялися всередині ядерця.

За умов зв'язування ДНК з антитілами до ДНК, міченими колоїдним золотом, в ядрі клітин контрольних проростків найбільш міченими виявились блоки гетерохроматину, значно менша кількість часток золота була виявлена над дифузним хроматином. В ядерці мітка антитіл до ДНК була локалізована над ФЦ та ЩФК. У ФЦ частки золота виявлені над кластерами конденсованого хроматину, над внутрішніми фібрилами неконденсованої ДНК та на межі ФЦ-ЩФК. ГК та ядерцеві вакуолі були позбавлені мітки.

У інокульованих проростків сої ядра та ядерця не відрізнялися від контролю за формою та положенням. Ядерця характеризувалися щільним пакуванням компонентів. Шар гранулярного компоненту розташовувався по периферії ядерця.

В ядерці меристематичних клітин інокульованих проростків сої мітка антитіл до ДНК у значно більшій кількості була локалізована над ФЦ та ЩФК. ФЦ вирізнялися наявністю в них мітки антитіл до ДНК. За кількісним розподілом мітки антитіл до ДНК в ядерці, найбільш міченими виявились ФЦ. Кількість гранул золота становила $97,05$ на мкм² (рис). ЩФК містив меншу кількість мітки гранул золота – $28,67$ на мкм². Так, у контрольних клітин щільність мітки становила: $26,02$ на мкм² – у ФЦ, та $10,17$ – у ЩФК.

Зважаючи на важливу функціональну роль ядерця у наших дослідженнях ми вивчали зміни саме в цій субструктурі ядерного компартменту клітини. Згідно прийнятої морфо-функціональної класифікації [4] ядерця можуть бути віднесені до компактного типу, для якого характерний високий рівень функціональної активності. Найбільш важливу роль у синтезі білку відіграють ФЦ і ЩФК, що складається із транскрипційно активних ділянок ДНК, зв'язаних з фібрилами новосинтезованої пре-РНК.

Нами продемонстровано, що за міченням антитіл до ДНК в фібрилярних центрах локалізовані кластери конденсованого хроматину, внутрішні фібрили деконденсованої ДНК, а також перехідна зона ФЦ-ЩФК. Кластери конденсованого хроматину в фібрилярних центрах утворені нуклеосомними фібрилами ДНК, тимчасово виведеної зі стану активації, та міжгенними нетранскрибованими слейсерними районами ДНК [5]. При підвищенні ядерцевої активності гетерохроматин фібрилярних центрів поступово деконденсується з утворенням тонких фібрил ДНК. Навпаки, при зниженні рівня функціонування ядерця ДНК всередині фібрилярних центрів поступово конденсується до утворення кластерів гетерохроматину [3]. Це приводить до висновку,

що конформаційні зміни фібрилярних центрів тісно пов'язані з транскрипційною активністю ДНК [5].

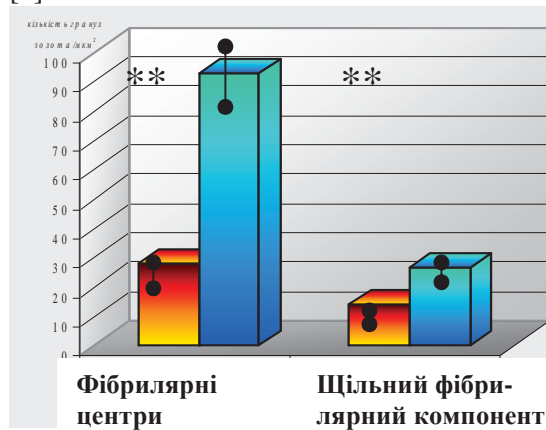


Рисунок. Гістограма щільності мічення антитілами до ДНК ядрця:
 - контроль;
 - інокуляція *B. japonicum* УКМ В-6035.

Показано зміну локалізації ДНК та збільшення її кількості в 2,8 рази в щільному фібрилярному компоненті та в 3,7 рази в фібрилярних центрах у інокульованих проростків сої. Можемо припустити, що в інокульованих проростків сої біляядерцевий хроматин, який містить локуси активованих генів, входить в ядрець, готуючись до активації, водночас, ДНК з щільного фібрилярного компоненту входить до фібрилярних центрів, переходячи у потенційно-активний стан.

Таким чином, проведене нами комплексне дослідження дозволило виявити суттєві конформаційні зміни ФЦ і ЩФК ядрець порівняно з контролем і, таким чином, вперше встановити підвищення рівня їх функціональної активності під впливом інокуляції.

Висновки

З використанням імуноцитохімічного аналізу показано збільшення щільності мітки в 3,7 разів в ФЦ ядрця та у 2,8 рази у ЩФК за інокуляції, що свідчить про підвищення функціональної активності ядрець рослинних клітин під впливом інокуляції і зростання рівня транскрипції ДНК та процесингу РНК в них.

1. Адамчук-Чала Н.І. Вплив кліностатування на ультраструктурну організацію і функціонування меристематичних клітин проростків гороху / Н.І. Адамчук-Чала, М.А. Соболев // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. — 2007. — 768. — С. 166—173.
2. Експериментальна ґрунтова мікробіологія / [Волкогон В.В., Наджернична О.В., Токмакова Л.М. та ін.]; за наук. ред. В.В. Волкогона. — К.: Аграр. Наука. — 2010. — 464 с.
3. Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом / [Коць С.Я., Маліченко С.М., Кругова О.Д. та ін.]. — К.: Логос. — 2001. — 271 с.
4. Челідзе П.В. Морфофункціональна класифікація ядрешек / П.В. Челідзе, О.В. Зацепина // Успехи сучасної біології. — 1988. — 105. — С. 252—268.
5. Yano H. Ultrastructural localization of transcription sites, DNA, and RNA reveals a concentric arrangement of structural and functional domains in plant nucleonema / H. Yano, S. Sato // Protoplasma. — 2000. — 214. — P. 129—140.

Н.І. Адамчук-Чала

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины

ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯЦИИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* УКМ В-6035 НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЯДЕРНЫХ СУБКОМПОНЕНТОВ КЛЕТОК АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКОВ СОИ

Исследовали влияние инокуляции *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на структурно-функциональную организацию ядерных субкомпонентов клеток апикальных меристем проростков сои, культивируемых в асептических условиях. Использовали методы трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноцитохимический анализ с использованием меченых золотом антител к ДНК. По данным иммуноцитохимического анализа показано, что при инокуляции

увеличивается плотность метки в 3,7 раз в фибриллярных центрах ядрышка и в 2,8 раз в плотном гранулярном компоненте. Установлено повышение функциональной активности ядрышек растительных клеток под влиянием инокуляции, что свидетельствует о возрастании уровня транскрипции ДНК и процессинга РНК в них.

Ключевые слова: меристемы, ДНК, ядрышко, фибриллярный центр, плотный фибриллярный компонент, инокуляция

N.I. Adamchuk-Chala

Institute of Microbiology and Virology DC Zabolotnogo NAS Ukraine

EFFECT INOCULATION *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* UCM B- 6035 ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF NUCLEOLAR SUBCOMPONENTS CELL APICAL MERISTEM OF SEEDLINGS SOYBEAN

Aim of investigation was to discover effect of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* UCM B-6035 on the structural and functional organization of nucleolar subcomponents apical meristem cells of soybean seedlings cultured under aseptic conditions. Using methods were trasmission electron microscopy and immunocytochemichal analysis with gold-labeled antibodies to DNA. Immunotcytochemichal analysis shows that density increasing of 3.7 times the label in the fibrillar centers of the nucleoid and 2.8 times in dense granular component under inoculation. The functional activity of the nucleoid of plant cells under the influence of inoculation indicating that the increase in DNA transcription and RNA processing them.

Keywords: meristem DNA nucleoid, fibrillar cente, dense fibrillar component inoculation

Рекомендує до друку

Н.М. Дробик

Надійшла 07.05.2014