

М. ГОГОБЕРИДЗЕ, Г. ЗААЛИШВИЛИ,
М. РАМИШВИЛИ, М. ГОГАВА, Н. ЧЕЛИДЗЕ
Институт биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе,
Тбилиси, Грузия
E-mail: ghoghoberidze@hotmail.com,
E-mail: ghoghoberidze@mail.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТНТ НА КЛЕТКИ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ И ИНТАКТНОГО РАСТЕНИЯ *YUCCA GLORIOSA* L.



*Изучено внутриклеточное распределение усвоенного 2,4,6-тринитротолуола — (^{14}C) ТНТ в клетках каллусной ткани, бутонов и листьев интактного растения юкки славной (*Yucca gloriosa* L.) с использованием метода электронно-микроскопической радиоавтографии. Радиоактивная метка выявлялась в вакуолях, пластидах, митохондриях, эндоплазматической сети и цитоплазме. Установлено, что в недифференцированных каллусных клетках по сравнению с клетками интактного растения токсикант сравнительно в большом количестве накапливается в вакуолях, соответственно ультраструктурная целостность дедифференцированных клеток менее повреждена.*

© М. ГОГОБЕРИДЗЕ, Г. ЗААЛИШВИЛИ, М. РАМИШВИЛИ,
М. ГОГАВА, Н. ЧЕЛИДЗЕ, 2009

Введение. К антропогенным факторам, вызывающим загрязнение внешней среды, вследствие чего в почву и воду попадают химические токсиканты, относится 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), который используется в производстве оружия (бомбы и гильзы пуль) как одно из самых широко потребляемых взрывчатых веществ. При попадании из грунтовых вод в питьевую с уровнем эквивалента 20 мкг/л указанное вещество классифицируется как возможный канцероген [1]. Поэтому актуальным является разработка методов био- и фиторемедиации, которые активно применяются для обезвреживания разных токсикантов, в том числе и ТНТ [1, 2].

Каждое растение характеризуется индивидуальным потенциалом детоксикации ТНТ. Гонг и соавт. [3] установили, что у однодольных растений чувствительность к упомянутому веществу низка по сравнению с двудольными.

В Институте биохимии и биотехнологии имени С. Дурмишидзе (Грузия) вследствие многолетних экспериментальных исследований выявлены растения, имеющие высокую способность ассимилировать ряд токсикантов, и изучены клеточные и молекулярные механизмы их деградации. У выявленных растений для *in vivo* очистки загрязненной тринитротолуолом почвы основная часть вещества активно включается в состав биополимеров [4]. Однако надо отметить, что растения с высокой фиторемедиационной способностью, которые могут в полупустынных условиях давать большую биомассу и быстро расти, мало изучены. Важно, чтобы животные не употребляли их в пищу и таким образом токсиканты через пищевые цепи не попадали в организм человека. Условия полупустыни актуальны для Грузии ввиду того, что на этой территории находятся химически загрязненные почвы бывших мест дислокации военных частей и полигонов. Эта проблема особенно актуальна в настоящее время и для многих стран Ближнего Востока.

В данном аспекте изучение растения юкки славной было обусловлено следующими причинами: *Yucca gloriosa* L. — многолетнее травянистое растение из Северной Америки, хорошо размножается в средних, субтропических и полупустынных климатических условиях (по заказу Института фармакохимии АН Грузии в 70-х годах прошлого века на территории

Ширакской полупустыни были разведены плантации юкки славной как продуцента стероидных веществ); не нуждается для размножения в дорогостоящих процедурах культивирования; легко и быстро размножается отрезками; животные не употребляют его в пищу, поэтому ассимилированный растением токсикант не попадет в организм животного, а затем через пищевую цепь в организм человека; после среза наземной биомассы возможна ассимиляция токсиканта развитыми весной из корневищ отрезками; на модели каллусной культуры юкки славной была показана способность клеток растения активно ассимилировать 2,4,6-тринитротолуол из питательной среды [5].

In vitro системы растений дают возможность при контролируемых условиях (температура, pH, состав питательной среды) независимо от микроорганизмов (бактерии, грибы, консорциум дрожжей) выявить деградационную способность ксенобиотиков и установить пути метаболизма. Метод *in vitro* позволяет изучать растительные клетки при непосредственном контакте с загрязнителями, когда они всасываются из питательной среды без прохождения тканевых систем корня. Такая модель максимально ускоряет деградацию ксенобиотика и позволяет характеризовать этот процесс как автономную систему растения. Сопоставление изменений метаболизма и ультраструктуры клеток дедифференцированной ткани и клеток интактного растения при усвоении из среды ТНТ дает возможность исследовать их эпигенетическую природу. Ранее было показано, что в клетках каллусной ткани и интактного растения юкки славной влияние ТНТ на активность нитроредуктазы, пероксидазы и фенолоксидазы различно [6]. После выявления различий по биохимическим показателям был проведен ультраструктурный качественный анализ.

В настоящей работе приводятся результаты изучения влияния ТНТ на ультраструктуру клеток каллусной ткани и интактного растения *Y. gloriosa*.

Материалы и методы. Объектом исследования служили листья и бутоны интактного растения и каллусная ткань, полученная из меристемы зачатков бутонов *Y. gloriosa*. Состав

питательной среды, режим культивирования и методы анализа роста культуры описаны ранее [7]. Для изучения ультраструктуры клеток материал готовили по стандартной методике [8]. Внутриклеточное распределение ТНТ изучали методом электронно-микроскопической радиоавтографии.

Каллусная ткань росла на модифицированной МС среде, содержащей (^{14}C) меченый ТНТ (50, 100, 200 мг/л) [9]. Листья и бутоны стерилизовали 1%-ным раствором сулемы (HgCl_2) 5 мин и промывали пятикратно стерильной водой, после чего инкубировали в течение пяти дней в стерильном растворе с (^{14}C) ТНТ (50, 100, 200 мг/л) в стерильной камере. По истечении пяти дней производили подготовку материала для анализа методом электронно-микроскопической радиоавтографии. Материал после фиксации и обезвоживания заливали эпоксидной смолой, затем полученные блоки резали на ультрамикротоме (LKB III). Ультратонкие срезы помещали на сетки, предварительно покрытые формваровой пленкой. Затем сетки со срезами помещали на каплю NiCl_2 (10^{-4}M) в течение 2×30 с. После экспозиции срезы переносили на каплю 1%-ного гидрохинона, pH 9,0, 2×40 с, и исследовали в электронном микроскопе Tesla (BS 500) [10].

Результаты исследований и их обсуждение. В клетках каллусной ткани метку выявляли в вакуолях (рис. 1, а), пластидах, клеточной стенке, эндоплазматической сети и гиалоплазме (рис. 1, б). Метка зафиксирована и в месте контакта митохондрии с плазмалеммой (рис. 1, в). В клетках основной ткани листьев интактного растения юкки славной ^{14}C -метка выявлена в виде глобул, которые были обнаружены в большом количестве в вакуолях (рис. 2, а), хлоропластах и митохондриях (рис. 2, б). Радиоактивная метка обнаружена и в ядре в отличие от каллусных клеток (рис. 2, в). Электронно-микроскопическое исследование показало, что ультраструктура митохондрии и ядер в клетках каллусной ткани и интактного растения схожи. Существенная разница состоит в том, что в каллусных клетках хлоропластов структура не вполне сформирована.

Установлена корреляция между концентрацией токсиканта и патологическими изменениями в растительной клетке. В каллусных клет-

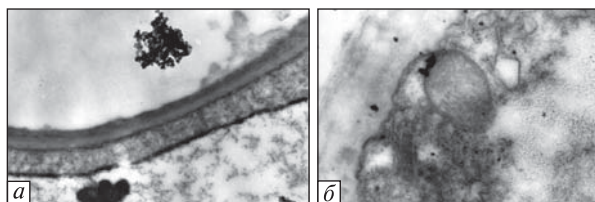


Рис. 1. Фрагменты каллусных клеток *Yucca gloriosa*: *a* – локализация ТНТ (100 мг/л) в вакуоли ($\times 30\ 000$); *б* – в месте контакта митохондрии с плазмалеммой ($\times 30\ 000$)

ках при воздействии 50 мг/л ТНТ большая часть эндоплазматической сети представлена агранулярными, расширенными цистернами. Отмечены многочисленные контакты митохондрий, служащие набухшими кристами с эндоплазматической сетью. Строма пластид электронно-светлая. Наблюдалась глобулярная организация на тонопласте и осмиофильные включения в ядре.

В каллусных клетках при воздействии 100 мг/л ТНТ наблюдаются инвагинации оболочки ядра, большое количество электронно плотных включений в вакуолях и на тонопласте (рис. 3).

Под воздействием 50 мг/л ТНТ на клетки основной ткани листьев юкки славной строма хлоропластов уплотняется, расширяется внутритилакоидное пространство. Отмечены плотные контакты между митохондриями и хлоропластами (рис. 4, *a*). Под воздействием ТНТ в концентрации 100 мг/л происходит набухание хлоропластов, иногда повышается количество электронно плотных глобул, нарушается целостность тонопласта. Наблюдала картину экзоцитозной секреции (контакт везикулы с плазмалеммой) (рис. 4, *б*).

При изучении влияния ТНТ (50 мг/л) на клетки меристемы зачатков бутонов юкки славной отмечалось большое количество митохондрий. Цистерны эндоплазматической сети расширены, они контактируют с митохондриями (рис. 5, *a*). В некоторых клетках набухшие митохондрии симметрично расположены в периферической цитоплазме и контактируют с плазмалеммой. Плазмалемма сильно извилиста, по-видимому, в результате активного экзоцитоза.

При воздействии 100 мг/л ТНТ на клетки меристемы бутонов юкки славной цитоплазма уплотняется. Отмечаются митохондрии больших размеров, в большинстве случаев контактирующие с расширенными цистернами эн-

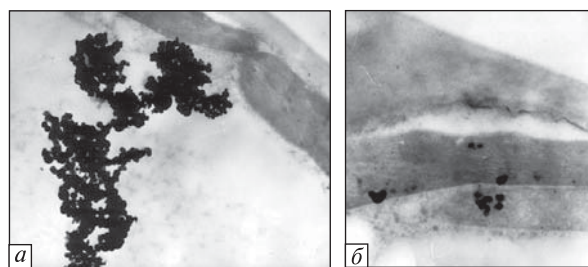


Рис. 2. Фрагменты клеток основной ткани листьев интактного растения *Yucca gloriosa*: *a* – локализация ТНТ (100 мг/л) в вакуоли ($\times 25\ 000$); *б* – в хлоропласте и митохондрии ($\times 25\ 000$); *в* – в ядре ($\times 30\ 000$)

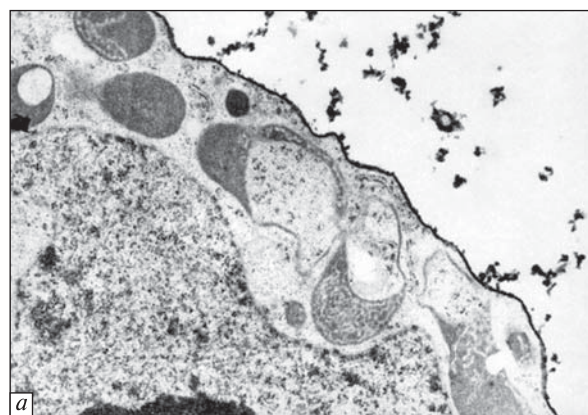
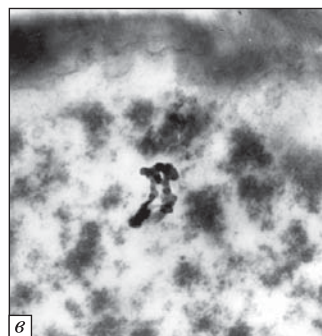


Рис. 3. Фрагмент клетки каллуса *Yucca gloriosa*. Концентрация ТНТ 100 мг/л ($\times 25\ 000$)

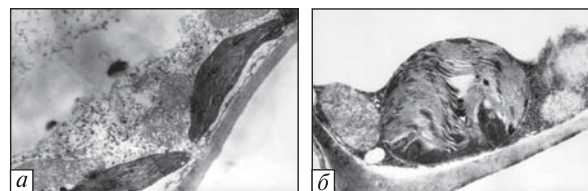


Рис. 4. Фрагменты клеток основной ткани листьев интактного растения *Yucca gloriosa*. Концентрация ТНТ 50 мг/л: *a* – хлоропласты с расширенными тилакоидами, контакты между митохондриями и хлоропластами ($\times 20\ 000$); *б* – разбухшие хлоропласты, контакт везикулы с плазмалеммой ($\times 20\ 000$)

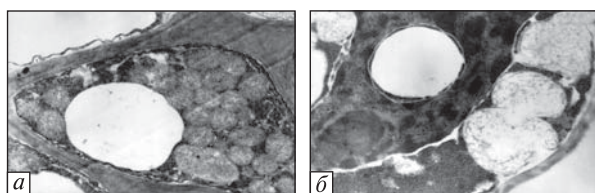


Рис. 5. Фрагменты клеток меристемы зачатков бутонов интактного растения *Yucca gloriosa*. Концентрация ТНТ 50 и 100 мг/л: *a* – большое количество митохондрий, эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами, контактирующими с митохондриями ($\times 20\,000$); *б* – разбухшие митохондрии, электронно плотная гиалоплазма ($\times 28\,000$)

доплазматической сети и между собой. Ядро перфорировано с ярко выраженной «хроматиновой коагуляцией», что указывает на нарушение синтеза ДНК. В описанном варианте в отличие от каллусных клеток (рис. 3) вакуоли и тонопласт полностью лишены осмиофильных включений (рис. 5, б).

ТНТ в количестве 200 мг/л вызывал полную деструкцию клеток как каллусной ткани, так и интактного растения. В дифференцированных и каллусных клетках юкки степень ультраструктурных изменений коррелировала с повышенной концентрации ТНТ в среде.

По литературным данным в растительных клетках происходит детоксикация ксенобиотиков тремя основными путями: конъюгация, экскреция и ферментная деградация. По данным авторов [11, 12], экскреция токсиканта или его метаболитов протекает следующим образом: цистерны эндоплазматической сети контактируют с вакуолью, в результате чего, по-видимому, происходит перенос части содержимого вакуоли в цистерны эндоплазматической сети, что сопровождается фрагментацией цистерн. Образованные мелкие везикулы перемещаются к плазмалемме, и вследствие слияния их мембран происходит высвобождение содержимого везикул во внеклеточное пространство. В наших экспериментах наблюдали экскрецию ТНТ как дифференцированными, так и каллусными клетками юкки славной.

Выводы. Методом электронно-микроскопической радиоавтографии установлено включение (^{14}C) ТНТ почти во все органеллы клеток каллусной ткани, бутонов и листьев интактного растения *Yucca gloriosa*. В клетках интактно-

го растения в отличие от каллусных клеток радиоактивная метка обнаружена и в ядре. Под влиянием ТНТ степень процесса деструкции клеток интактного растения юкки славной и каллусных клеток различна. Ультраструктурная целостность дедифференцированных клеток менее изменена. В каллусных клетках основная часть ТНТ накапливается в вакуолях в виде конъюгатов. В дифференцированных клетках ультраструктура значительно изменена, что должно быть результатом более активного протекания процесса деградации активной реакции клеток на действие токсиканта.

*M. Ghoghoberidze, G. Zaalishvili,
M. Ramishvili, M. Gogava, N. Chelidze*

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF TNT EFFECT ON THE CALLUS CELLS AND THE CELLS OF INTACT PLANTS OF *YUCCA GLORIOSA* L.

Intracellular distribution of assimilated 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in callus cells, flower buds and leaves of intact *Yucca gloriosa* L. plants using electron microscope radioautography. The radiotracer was detected in vacuoles, plastids, mitochondrion, endoplasmic reticulum and cytoplasm. It was found that in dedifferentiated callus cells TNT was incorporated in the vacuoles in greater quantities in comparison with the cells of intact plant. Correspondingly the ultrastructural integrity of the dedifferentiated cells is less damaged.

*M. Гогоберидзе, Г. Заалишвили,
М. Рамишвили, М. Гогва, Н. Челидзе*

УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТНТ НА КЛІТИНИ КАЛУСНОЇ ТКАНИНИ ТА ІНТАКТНОЇ РОСЛИНИ *YUCCA GLORIOSA* L.

Вивчали внутрішньоклітинний розподіл засвоєного 2,4,6-тринітротолуолу – (^{14}C) ТНТ в клітинах калусної тканини, бутонів та листя інтактної рослини юкки славної (*Yucca gloriosa* L.) з використанням методу електронно-мікроскопічної радіоавтографії. Радіоактивну мітку виявляли у вакуолях, пластидах, митохондріях, ендоплазматичній сітці та цитоплазмі. Встановили, що в недиференційованих калусних клітинах порівняно з клітинами інтактної рослини токсикант більше накопичується у вакуолях. Відповідно ультраструктурна цілісність диференційованих клітин менш пошкоджена.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mueller W.F., Bedell G.W., Shojaee S., Jackson P.J. Bioremediation of TNT wastes by higher plants // Proc. 10th Ann. Conf. on Hazardous Waste Res., 1999. – P. 222–230.

2. *Khatisashvili G., Kvesitadze G., Adamia G., Gagelidze N., Sulamanidze L., Ugrehelidze D., Zaalishvili G., Ghoghoberidze M., Ramishvili M.* Bioremediation of contaminated soil on the former military locations and proving grounds in Georgia // *J. Biol. Phys. and Chem.* – 2004. – **4**. – P. 162–168.
3. *Gong P., Wilke B.M., Fleischmann S.* Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plant // *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* – 1999. – **36**. – P. 152–157.
4. *Adamia G., Ghoghoberidze M., Graves D., Khatisashvili G., Kvesitadze G., Ugrehelidze D.* Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants // *Ecotoxicol. and Environm. Safety.* – 2006. – **64**. – P. 36–145.
5. *Ramishvili M., Gogava M., Chelidze N., Ghoghoberidze M.* Study of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) assimilation ability of cells of *Yucca gloriosa* L. *in vitro* culture // *Proc. Georgian Acad. Sci. B.* – 2005. – **3**, № 2. – P. 21–25.
6. *Gogava M., Ramishvili M., Ghoghoberidze M., Kurashvili M., Pruidze M., Chelidze N.* TNT effect on the Nitroreduktase, Peroksidase and Phenoloxidase activities *in vitro* cultures of *Yucca gloriosa* and *Glycine max* // *Proc. Georgian Acad. Sci. B.* – 2006. – **4**, № 4. – P. 1–5.
7. *Месхи А.Б., Гогоберидзе М.К., Кацмадзе К.П.* Культура тканей юкки славной – *Yucca gloriosa* L. // *Изв. АН ГССР. Сер. биол.* – 1978. – **4**, № 1. – С. 182–186.
8. *Гайер Г.* Электронная гистохимия. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
9. *Murashige T., Skoog F.A* Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – **15**. – P. 473–497.
10. *Buadze O.A., Durmishidze S.V., Apakidze A.V.* Ultrastructural aspects of herbicide 2,4-D movement and localization in plant cells // *Bull. Georg. Acad. Sci.* – 1985. – **119**. – P. 4009–4411.
11. *Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J.J.* Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants : Basis of phytoremediation. – Berlin : Springer, 2006. – P. 262–267.
12. *Залишвили Г.В., Варашвили Т.Г., Аниашвили Т.И., Хатисашвили Г.А., Квеситадзе Э.Г.* Ультроструктурная реорганизация растительной клетки в процессе метаболизма ксенобиотиков // *Изв. аграр. науки.* – 2005. – **3**, № 3. – С. 117–122.

Поступила 22.06.07