

КОНТАКТЫ МЕМБРАНЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА С ПЛАЗМАЛЕММОЙ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© Г. А. Великанов,¹ А. А. Пономарева, Л. П. Белова, В. Ю. Леванов

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН;

¹ электронный адрес: velikanov@mail.knc.ru

Показано с помощью электронной микроскопии, что в клетках корня проростков пшеницы существуют близкие контакты мембраны эндоплазматического ретикулума с плазмалеммой. Предварительно установлена качественная аналогия этих контактов с высокопроницаемыми межклеточными контактами у животных.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., клетки корня, центральный цилиндр, паренхима, эндоплазматический ретикулум, плазмалемма, близкие контакты, электронная микроскопия.

С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в пластидах живых растительных клеток были обнаружены динамичные тонкие выступы (тяги) мембранной оболочки. Наблюдаемые выступы внешне были похожи на исходящие из органоида длинные извивающиеся щупальца, вытягивающиеся на расстояния, часто намного превышающие размеры самого органоида (Köhler et al., 1997). В последующих исследованиях такие динамичные выступы (трубочки, имеющие в диаметре 0.35—0.85 мкм) из-за предполагаемого заполнения их внутренней полости стромой пластид были названы стромулами и выявлены во многих типах растительных клеток. Изображения динамичных стромул в реальном времени, полученные с помощью конфокальной микроскопии или с помощью видеотехники, скомбинированной с дифференциальной интерференционной микроскопией при фазовом контрасте, сейчас доступны на DVD-дисках (Gunning, 2007). Много важных вопросов по структуре и функции стромул остаются без ответа (Hanson, Sattarzadeh, 2008). Однако в качестве важной функции стромул исследователи признают их транспортную функцию — способность транспортировать макромолекулы стромы между пластидами (Köhler et al., 1997; Gunning, 2005) и, возможно, в другие компартменты клетки и даже в соседние клетки (Kwok, Hanson, 2004).

В последнее десятилетие с новым интересом стали обсуждаться проблемы, связанные с природой мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР), а также с ролью пространства, ограниченного ретикулярной сетью, в формировании транспортной системы высших растений (Гамалей, 1997, 2004). По результатам соответствующих исследований было сделано предположение о том, что трубки эндоплазматического ретикулума, открытые с помощью электронной микроскопии, и трубчатые динамичные тонкие выступы мембранной оболочки пластид и митохондрий (stromules или митохондриальные эквиваленты стромул), наблюдаемые на прижизненных препаратах растительной клетки с помощью фазово-контрастной или

конфокальной микроскопии, — одна и та же внутриклеточная структура (Гамалей, 2006).

Главной причиной, по которой не удается надежно визуализировать стромулы на электронном микроскопе, исследователи считают очень малую вероятность того, чтобы в плоскость среза фиксированного материала попал достаточно длинный участок исходно динамичной извивающейся стромулы вместе с малой зоной непосредственного выхода тонкой трубочки-stromулы из органоида. Действительно, даже для получения изображения стромул с помощью конфокальной микроскопии часто возникала потребность сложения многочисленных оптических срезов до того, как стромулы станут видимыми. Фактически изображение приходится реконструировать из большого числа срезов, что легко осуществимо на современном конфокальном микроскопе и что проблематично для традиционного метода электронной микроскопии. Тем не менее в процессе многочисленных попыток изучения стромул на электронном микроскопе были представлены свидетельства существования близких контактов стромул с плазмалеммой и другими мембранами внутри клетки (Kwok, Hanson, 2004; Gunning, 2007; Hanson, Sattarzadeh, 2008). С использованием дифференциальной интерференционной микроскопии при фазовом контрасте, скомбинированной с видеосъемкой, были также получены свидетельства тому, что длинные динамичные стромулы пластид одной или несколькими точками вдоль их длины или на кончике могли надолго (часовые наблюдения) заякориваться на плазмалемме (Gunning, 2005, 2007; Hanson, Sattarzadeh, 2008). Недостаточная разрешающая способность использованного метода прижизненного наблюдения не позволяла идентифицировать природу мест заякоривания стромул. Неидентифицированные якоря (или места заякоривания) были способны продолжительное время удерживать пластиды от существенного смещения в быстром потоке движущейся цитоплазмы. Наблюдаемая картина имела качественное сходство с той, когда лодка в бурной и быстро текущей реке

привязана к пристани длинной эластичной веревкой (Gunning, 2007).

Природа заякоривания стромул на плазмалемме, равно как транспортные свойства и функциональное назначение близких контактов стромул с другими мембранами внутри клеток, остаются неизвестными (Hanson, Sattarzadeh, 2008). Однако нельзя исключать, что места заякоривания стромул, существование которых было выявлено в прижизненных опытах, и зоны близких контактов стромул с другими мембранами внутри клетки, обнаруженные с помощью электронного микроскопа и соответствующей фиксации растительного материала, фактически окажутся одной и той же внутриклеточной структурой, что различаются лишь слова — заякоривание и контакт.

Таким образом, на сегодняшний день сложилась следующая альтернатива: стромулы очень трудно визуализировать с помощью электронного микроскопа, но трубчатые элементы ЭР встречаются практически на любом ультратонком срезе растительной клетки. Вместе с этим существует гипотеза о тождестве стромул и трубчатых элементов ЭР. В такой ситуации будет весьма полезно выяснить, встречаются ли на ультратонких срезах контакты мембраны ЭР с плазмалеммой и что они собой представляют, или хотя бы обсудить вопрос о том, какова может быть роль таких контактов в клетке.

Руководствуясь этими соображениями, мы поставили задачу выявить и предварительно исследовать с помощью электронного микроскопа близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой. Если исходить из важной роли в формировании транспортной системы высших растений пространства, ограниченного эндомембранной сетью (Гамалей, 1997, 2004), и если иметь в виду приписываемые стромулам транспортные свойства, то наиболее вероятной функцией гипотетических (искомых нами) близких контактов мембраны ЭР с плазмалеммой целесообразно признать их транспортную функцию. По этой причине при поиске и изучении таких контактов предпочтение надо отдать поискам их в клетках с передаточными транспортными свойствами. Такие клетки, в частности, обеспечивают разгрузку флоэмы в окончании корня и в них а priori можно ожидать более высокую вероятность существования контактов мембраны ЭР с плазмалеммой, имеющих транспортные функции.

Материал и методика

Использовали корни 5-суточных проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Люба, выращенные на дистиллированной воде с добавкой CaCl_2 (0.25 мМ). Применяли два варианта выращивания: первый — при люминесцентном освещении 10 тыс. лк с фотопериодом 16 ч (световой вариант); второй — в темноте с переносом этиолированных проростков на свет (люминесцентный, 10 тыс. лк) за 16 ч до опытов (режим темнота—свет).

Для электронно-микроскопических исследований брали отрезки корней длиной 1—2 мм, отступая на 7—10 мм от кончика корня. В этой зоне корня осуществляется разгрузка флоэмы. Образцы фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида (Serva, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (0.2 мМ NaH_2PO_4 и 0.2 мМ, Na_2HPO_4 pH 7.3) в течение 2 ч. Постфиксацию осуществляли в 1%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере с добавлением сахарозы (25 мг/мл) в течение 2 ч. Затем образцы дегидрировали, используя этиловый

спирт, ацетон и окись пропилен, и полимеризовали в эпоксидной смоле Эпон-812 (Serva, Германия) при 37, 45 и 60 °С в течение 3 сут. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-III и контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата 10 мин при 60 °С, а затем цитратом свинца 10 мин при комнатной температуре. Препараты просматривали на электронном микроскопе Jem-1200EX (Joel Ltd., Япония).

Перед приготвлением препаратов для электронной микроскопии отсеченные корни (длиной 40 мм от кончика) в течение 1—4 ч преинкубировали на качалке в дистиллированной воде с добавлением CaCl_2 (0.25 мМ), в 1/4 среды Хогланд—Арнона или в растворах одного из ингибиторов энергетического метаболизма, приготовленного на дистиллированной воде с добавлением CaCl_2 (0.25 мМ). В качестве таких ингибиторов использовали ингибитор дыхания — антимицин А (Serva, Германия), а также протонаторы — КЦХФГ (карбонилцианид 3-хлорфенил гидразон) (Serva, Германия) и ДНФ (2, 4-динитрофенол) (Sigma, США).

Повторность опытов была трехкратной. Вероятность обнаружения контактов мембраны ЭР с плазмалеммой в клетках для каждого варианта опытов (доля клеток, в которых были выявлены такие контакты) высчитывали по следующей схеме. Во всех повторях каждого опыта из образца (отрезка корня) было сделано по 15—20 поперечных ультратонких срезов. На каждом срезе просматривали все клетки, образующие центральный цилиндр, а из количественного учета исключали клетки метаксилемы и ситовидных элементов с клетками обкладки. Общее количество просматриваемых на каждом единичном срезе клеток, относящихся к паренхиме центрального цилиндра, составляло от 100 до 140 шт. Далее от суммарного (для трех повторов) количества клеток паренхимы центрального цилиндра вычисляли долю клеток, на срезе которых были обнаружены близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой.

Результаты

На рис. 1, а представлен типичный фрагмент ультраструктуры клеток паренхимы центрального цилиндра в исследуемой зоне корня у проростков пшеницы, выращенных на свету. В этом варианте опыта ни в одной из просмотренных клеток нам не удалось обнаружить контакты мембраны ЭР с плазмалеммой. Однако такие контакты мы обнаружили после предварительной 1—4-часовой инкубации отсеченных корней в растворе ингибитора дыхания — антимицина А. Идея использования ингибитора дыхания при поиске контактов мембраны ЭР с плазмалеммой возникла у нас потому, что описанная в литературе и представленная на видеосюжетах картина заякоренных стромул наблюдалась, как это отмечено во вводном разделе настоящей статьи, в прижизненных опытах, т. е. когда имело место ротационное движение цитоплазмы (Gunning, 2005, 2007; Hanson, Sattarzadeh, 2008). Мы предположили, что искомые нами контакты могут лучше сохраниться в процессе фиксации растительного материала, если перед процедурой фиксации остановить или замедлить (с помощью ингибитора дыхания) ротационное движение цитоплазмы, вызывающее механическое натяжение мембран в зоне контакта. Механическое напряжение в этой зоне, возможно, и препятствует сохранению контакта в процессе фиксации.

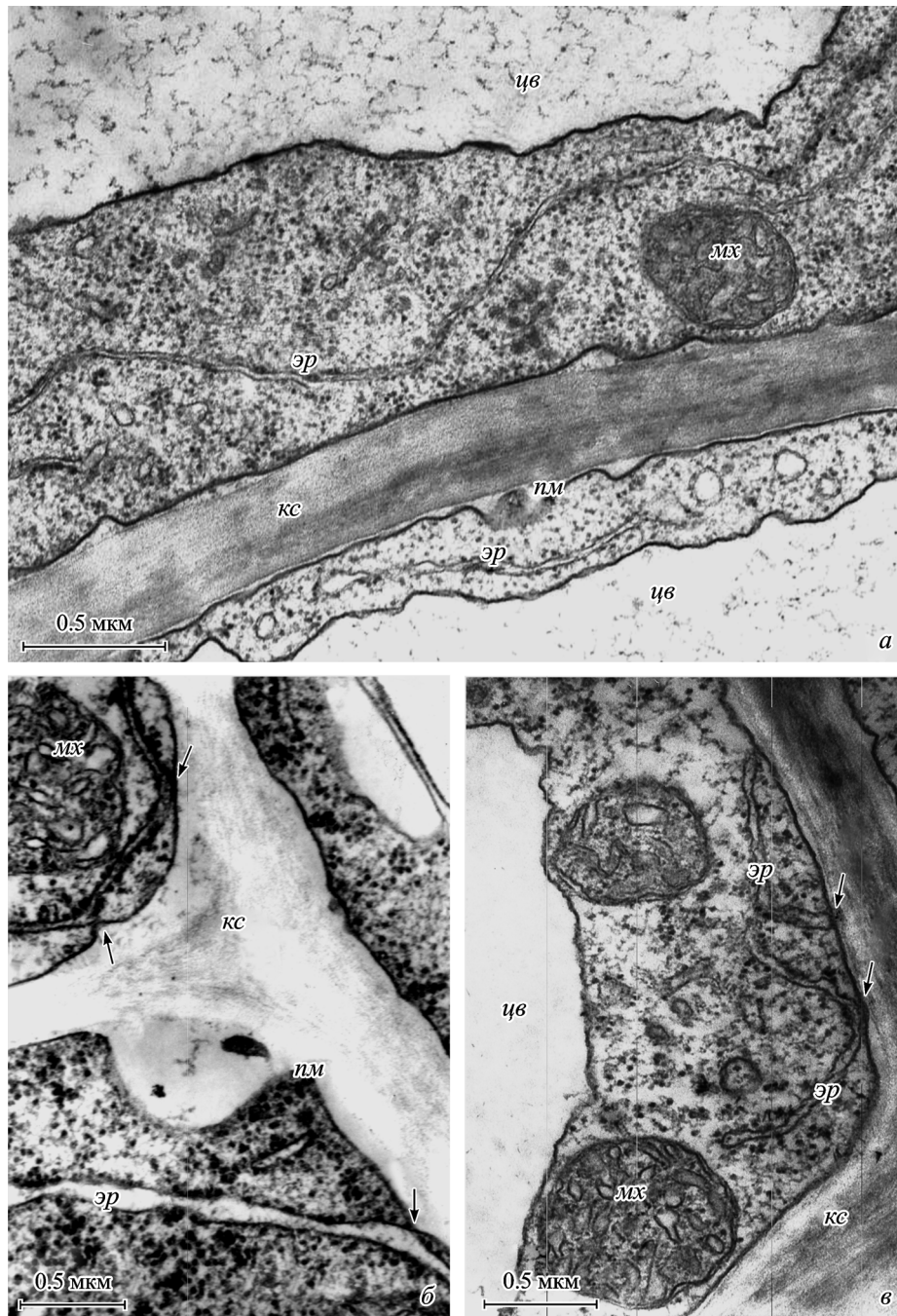


Рис. 1. Фрагменты ультраструктуры клеток исследуемой зоны корней проростков пшеницы, выращенных на свету.

a — фиксация после предварительной 2-часовой инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ); *б, в* — фиксация после предварительной инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ) плюс ингибитор дыхания антимицин А (20 мкМ): *б* — 2 ч инкубации, *в* — 4 ч инкубации. Стрелки указывают на области контактов мембраны ЭР с плазмалеммой. *пм* — плазматическая мембрана, *кс* — клеточная стенка, *мх* — митохондрии, *цв* — центральная вакуоль, *эр* — эндоплазматический ретикулум.

Действительно, после предобработки корней антимицином А в 12 % просмотренных клеток были обнаружены близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой. Фрагменты ультраструктуры некоторых из просмотренных клеток после такой предобработки показаны на рис. 1, *б, в*. Трубки ЭР контактировали с плазмалеммой как своими торцевыми участками, так и участками в промежуточных зонах по длине трубок (соответственно *верхняя* и *нижняя стрелки* на рис. 1, *в*). Понятно, что деление на торцевые и промежуточные зоны контакта весьма услов-

но, поскольку торцевой контакт на срезе в действительности может быть местом изгиба трубки в плоскости, перпендикулярной плоскости среза. Часто можно было наблюдать, что обе контактирующие мембраны в зоне контакта находятся предположительно в состоянии частично сохранившегося упругого натяжения. На такие упруго натянутые места указывают *правая* и *нижняя стрелки* на рис. 1, *б*.

Близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой были выявлены во многих клетках исследуемой зоны кор-

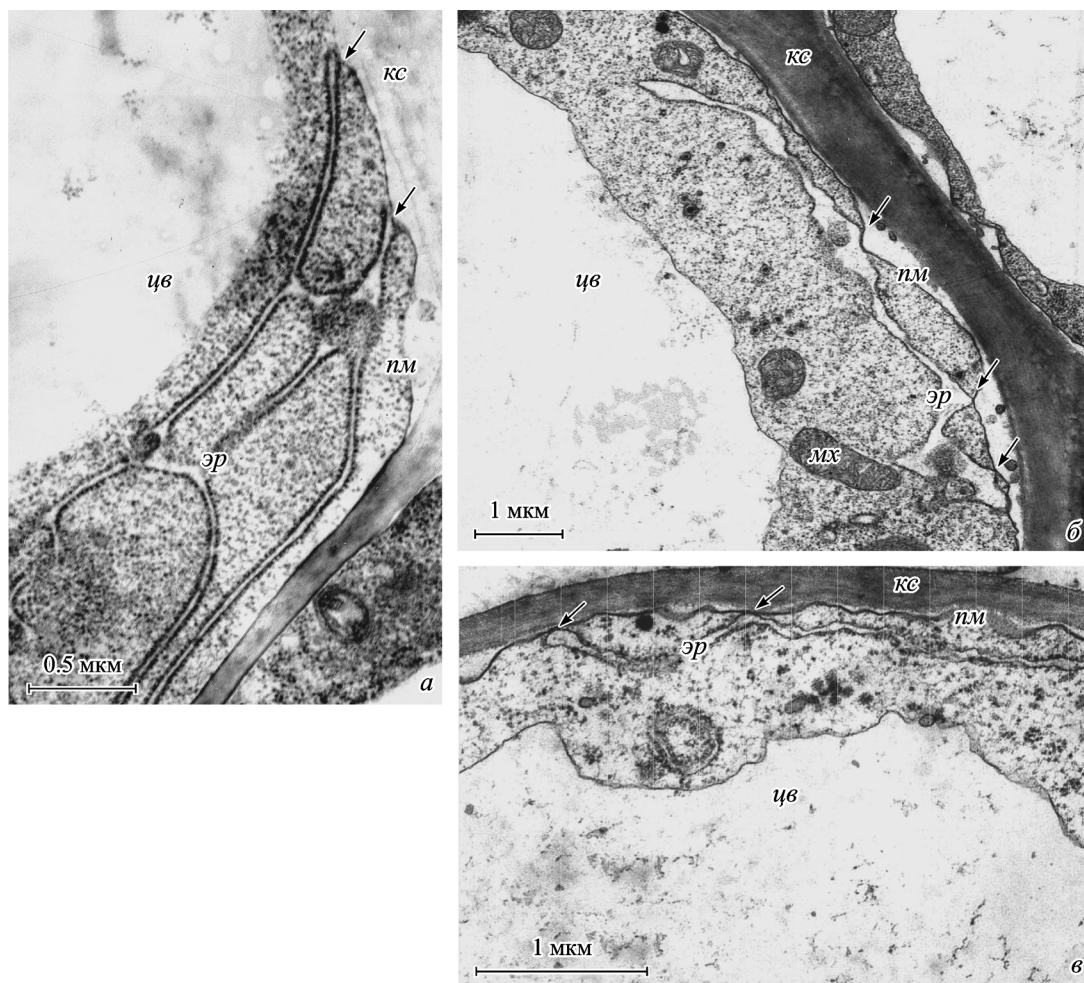


Рис. 2. Фрагменты ультраструктуры клетки из исследуемой зоны корня проростка пшеницы.

а — выращенного на свету и зафиксированного после 3 ч инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ) плюс 5 мкМ протонофора КЦХФГ (карбонилцианид 3-хлорфенил гидразон); *б* — выращенного в режиме темнота—свет и зафиксированного после 1 ч инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ) плюс 100 мкМ протонофора ДНФ (2,4-динитрофенол); *в* — выращенного на свету и зафиксированного после 1 ч инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ) плюс 20 мкМ ингибитора дыхания антимицина А. Стрелки указывают на области контактов мембраны ЭР с плазмалеммой. Обозначения те же, что и на рис. 1.

ня у растений, выращенных на свету, и в случае использования нами в качестве предобработки раствора протонофора — другого ингибитора энергетического метаболизма клеток (рис. 2, *а*). При таком воздействии разветвленная сеть каналов ЭР часто значительно расширялась — происходило набухание ретикулума.

После предобработки ингибиторами корней растений, выращенных в режиме темнота—свет, в ультраструктуре клеток исследуемой зоны корня мы наблюдали примерно такую же картину контактов ЭР с плазмалеммой, как и у растений, выращенных на свету. Так, при использовании в качестве предобработки антимицина А хорошо выявлялись контакты мембраны ЭР с плазмалеммой как на торцевых, так и на промежуточных участках по длине трубок (рис. 2, *в*). Картину, подобную световому варианту, наблюдали и после предобработки этих корней протонофором. ЭР набухал и во многих местах близко контактировал с плазмалеммой (рис. 2, *б*). При этом вероятность обнаружения клеток с контактами практически соответствовала таковой в соответствующих опытах у световых растений — контакты выявляли у 9—11 % просмотренных клеток в опытах с протонофорами.

Однако в отличие от светового варианта в клетках растений, выращенных в режиме темнота—свет, контакты ЭР с плазмалеммой были выявлены и без использования ингибиторов (рис. 3). Контакты наблюдали в клетках исследуемой зоны корней, зафиксированных как сразу после отсечения их от проростков (рис. 3, *а*), так и после предварительной 1-часовой инкубации отсеченных корней в растворе 0.25 мМ CaCl_2 (контроль к соответствующим опытам с ингибиторами на рис. 3, *б*) или после 1 ч преинкубации в 1/4 среды Хогланда—Арнона (рис. 3, *в*). Контакты ЭР с плазмалеммой существуют, по-видимому, и в «физиологических» условиях пребывания растений, а не только после обработки последних ингибиторами энергетического метаболизма. Отличие результатов опытов с ингибиторами для растений, выращенных в режиме темнота—свет, от результатов, полученных нами для физиологических условий пребывания таких растений, состояло в заметно большем числе клеток с контактами в общем числе просмотренных клеток. В физиологических условиях контакты выявляли не более чем в 1.2—1.5 % просмотренных клеток (1.2 % — в питательном растворе, 1.5 % — в растворе 0.25 мМ CaCl_2).

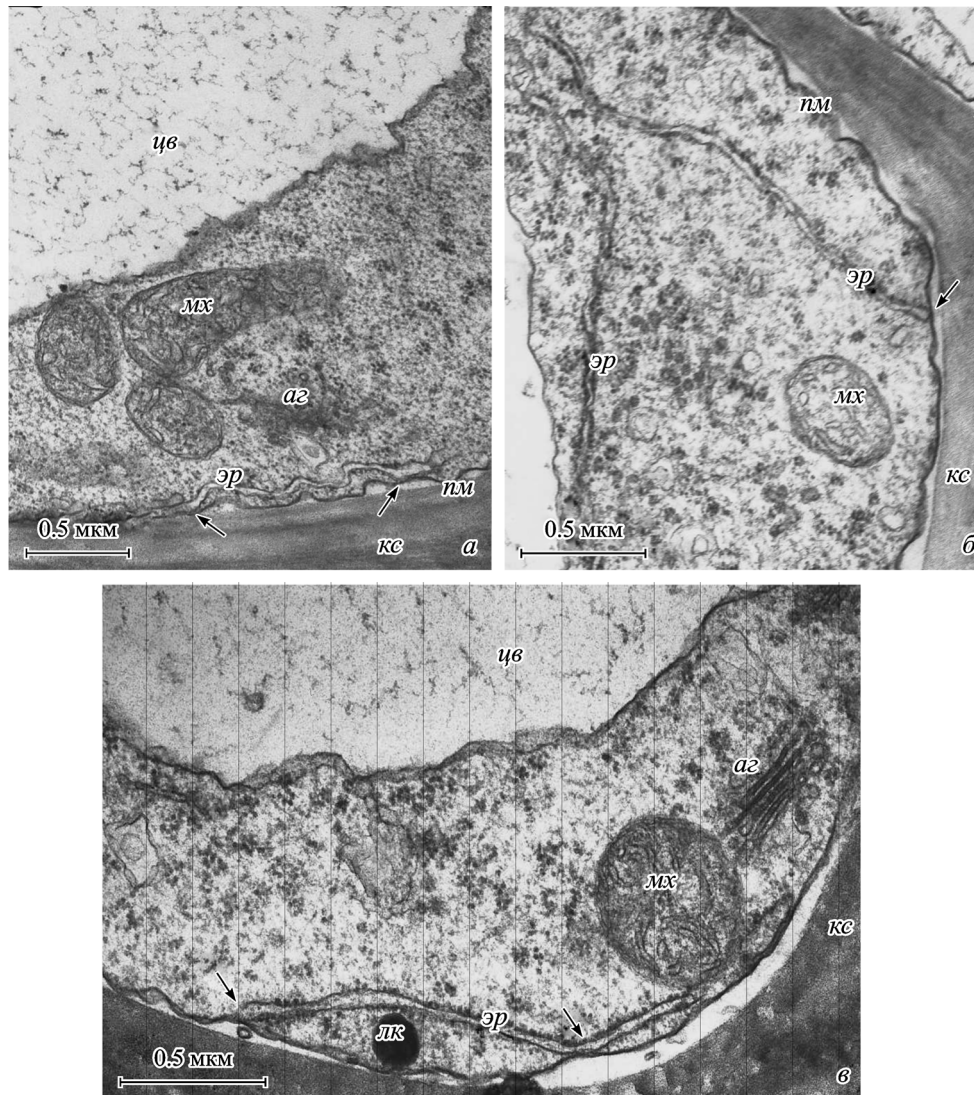


Рис. 3. Фрагменты ультраструктуры клеток исследуемой зоны корней проростков пшеницы, выращенных в режиме темнота—свет и зафиксированных сразу после отсечения или после 1 ч инкубации в растворах разного состава.

а — сразу после отсечения корней от проростков; *б* — после 1 ч инкубации отсеченных корней в растворе 0.25 мМ CaCl₂; *в* — после 1 ч инкубации в 1/4 среды Хогланда—Арнона. Стрелки указывают на области контактов мембраны ЭР с плазмалеммой. аг — аппарат Гольджи, лк — липидная капля; остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Снимок, представленный на рис. 4, позволяет более детально наблюдать зону контакта мембраны ЭР с плазмалеммой. Можно предполагать, что обе контактирующие мембраны в зоне контакта испытывают механическую нагрузку, поскольку каждая из этих мембран вогнута навстречу другой и растянута какой-то силой. Рибосомы шероховатого ЭР в зоне контакта отсутствуют. Непосредственно в зоне контакта просматривается соизмеримая с толщиной мембраны щель, переходящая в зону более плотного контакта. Отмеченная межмембранная щель имеет умеренную прозрачность для электронов.

Обсуждение

Несмотря на то что исследуемые нами клетки находились в той зоне корня, где осуществлялась разгрузка флоэмы в апопласт и где мы посчитали наиболее целесообразным искать контакты мембраны ЭР с плазмалеммой, в нормальных условиях в клетках у растений светового

варианта нам не удалось выявить присутствие таких контактов.

Для продолжения поиска мы изменили условия выращивания проростков, с тем чтобы реализовать временную активацию транспорта ассимилятов в клетках исследуемой зоны корня за счет переноса этиолированных проростков на свет. Результат (рис. 3) оправдал наше рабочее предположение о целесообразности поиска контактов или мест закоривания мембраны ЭР на плазмалемме именно в клетках с максимально активным транспортом ассимилятов. В 1.2—1.5 % просмотренных клеток для растений, выращенных в режиме темнота—свет (физиологические условия без добавки ингибиторов), нам удавалось обнаруживать контакты ЭР с плазмалеммой.

Такой результат предположительно может быть связан с тем, что переходная (темнота—свет) активация транспорта ассимилятов фотосинтеза в исследуемых клетках вызвала необходимость увеличения количества контактов ЭР с плазмалеммой из-за необходимости транспортировать возросшее количество ассимилятов в

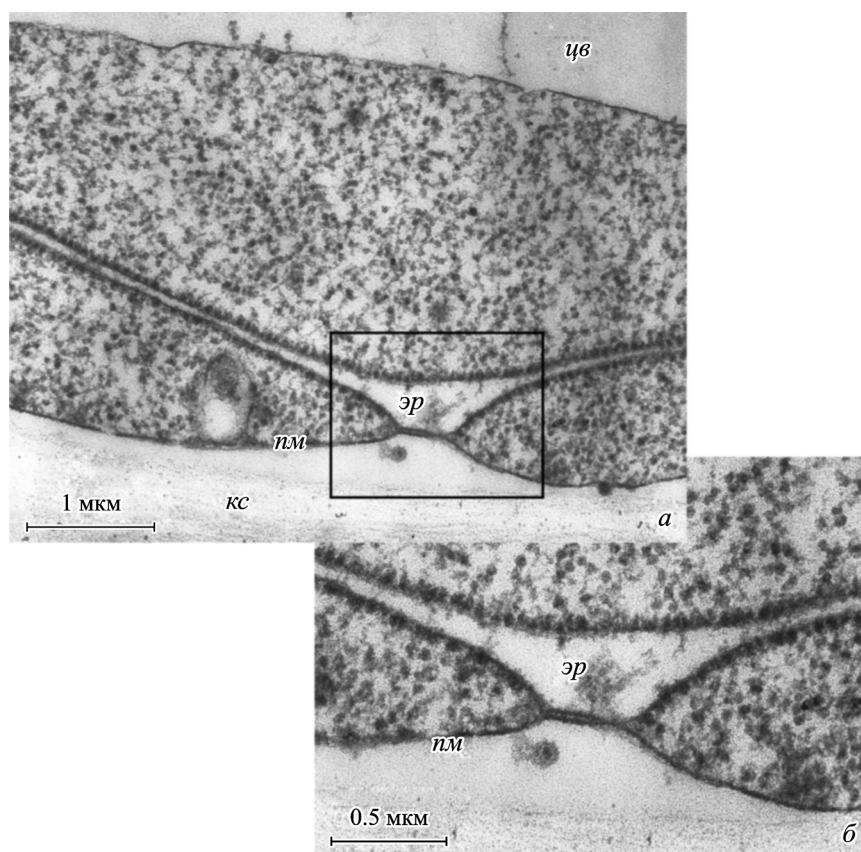


Рис. 4. Фрагмент ультраструктуры клетки исследуемой зоны корня проростка пшеницы, выращенного на свету и зафиксированного после 3 ч инкубации отсеченных корней в растворе CaCl_2 (0.25 мМ) плюс 5 мкМ протонофора КЦХФГ (карбонилцианид 3-хлорфенил гидразон), при разном увеличении (а, б).

Рамкой выделена область близкого контакта мембраны ЭР с плазмалеммой; в позиции б эта область дана при большем увеличении электронного микроскопа — просматривается щель между контактирующими мембранами. Обозначения те же, что и на рис. 1.

апопласт. Именно количественное увеличение контактов и могло привести к повышению вероятности попадания их в плоскость ультратонкого среза. Однако делая такое предположение, мы автоматически должны признать существование какого-то количества контактов ЭР с плазмалеммой и в клетках исследуемой зоны корня у световых растений в нормальных условиях (без предобработки ингибиторами), поскольку фотосинтез, хотя и в стационарной фазе, заведомо существовал и должен был продуцировать прохождение ассимилятов через исследуемые клетки по тому же принципу, что и у клеток с переходной активацией фотосинтеза (при переходе от темноты к свету). Возможно, причина неуспеха выявления нами контактов в нормальных клетках световых растений кроется исключительно и только в существенно меньшем их количестве, а значит, и существенно меньшей вероятности появления контактов в плоскости ультратонкого среза. Другими словами, просто чрезвычайно мала вероятность попадания контакта в плоскость среза (значительно меньше 1 %).

Предварительная инкубация корней в питательном растворе Хогланда—Арнона мало изменила вероятность выявления контактов ЭР с плазмалеммой по сравнению с преинкубацией в 0.25 мМ CaCl_2 (1.2 и 1.5 % соответственно). Следовательно, можно предполагать, что именно активация транспорта фотоассимилятов, а не реализация потребности в элементах минерального питания способствовала выявлению мембранных контактов в плоскости среза у исследуемых клеток корня.

В этой связи очень интересны результаты опытов с ингибиторами энергетического метаболизма. Как у световых растений, так и у растений, выращенных в режиме темнота—свет, вероятность обнаружения мембранных контактов в плоскости ультратонкого среза после предобработки ингибиторами значительно возросла (до 10—12 %) по сравнению с физиологическими условиями. Само применение ингибиторов стимулировало образование контактов или применение ингибиторов лишь способствовало выявлению контактов, существовавших в норме?

Возможны два несколько различающихся варианта интерпретации результатов наших опытов с ингибиторами. Первый из них заключается в том, что в подвижности и закоривании стромул, а также в подвижности ЭР, несомненно, важная роль принадлежит цитоскелету (Гамалей, 2006; Hanson, Sattarzadeh, 2008). В работах (Gunning, 2005, 2007) были представлены данные о том, что зоны закоривания стромул ассоциированы с цитоскелетными фибриллами, а внешняя мембрана стромулы в местах закоривания, как и в местах выхода стромулы из органоида, находится в состоянии упругого натяжения. После того как этиолированные гипокотили растений табака были обработаны ингибиторами актиновых микрофиламентов, выявляемость стромул даже в прижизненных наблюдениях клеток с помощью конфокального микроскопа существенно уменьшалась, а комбинированная обработка как актиновым, так и тубулиновым ингибиторами приводила к

почти полной потере выявляемости стромул (Kwok, Hanson, 2003; Hanson, Sattarzadeh, 2008).

Эти факты достаточно убедительно свидетельствуют о том, что весомой причиной нашей неудачи в выявлении контактов ЭР с плазмалеммой в нормальных условиях у световых растений может явиться неадекватность способов фиксации и контрастирования растительного материала нормальному состоянию цитоскелета в местах формирования соответствующих контактов. Возможно, выявляемость таких контактов, как и выявляемость самих стромул, зависит от состояния цитоскелета вблизи контакта. В этой связи вполне вероятно, что соединив условия фиксации и контрастирования растительного материала с условиями, принесенными некоторой дополнительной предобработкой исходного материала (в нашем случае — ингибиторами), нам удалось сохранить элементы цитоскелета, задействованные в создании контакта двух мембран, в состоянии, близком к нормальному, или по крайней мере в состоянии, обеспечивающем сохранность контакта в процессе фиксации растительного материала. Другими словами, результат, возможно, оказался подобен тому случаю, когда два заведомо «плохих» воздействия случайно дали «хороший» результат. Это один вариант интерпретации результатов опытов с ингибиторами.

Однако более реалистичным нам представляется другой вариант, который и был положен нами в основу более удачного поиска контактов мембраны ЭР с плазмалеммой методом электронной микроскопии. В этой связи вспомним сравнение мест закрепления стромул на плазмалемме с якорями, способными длительное время удерживать пластиды на одном месте в быстром потоке движущейся цитоплазмы. Возможно, что именно с этим обстоятельством — наличием цитоплазматического течения, генерируемого цитоскелетом, и связано появление в зоне закоривания стромул механического натяжения мембраны. Влияние на метаболизм исследуемых нами клеток, оказываемое антимицином А и протонофорами, может существенно не различаться по конечному результату. Это влияние связано с ингибированием количества АТФ в клетках корня (Гордон, 1976). Если мембраны в зоне контакта исходно находились в состоянии механического натяжения, то уменьшение энергетического обеспечения цитоскелета и соответственно уменьшение интенсивности цитоплазматического течения могло снять или существенно уменьшить механическое напряжение (натяжение) мембран в зоне контакта перед процедурой фиксации растительного материала. Предшествующее снятие или существенное уменьшение механического напряжения, вероятно, и могло обеспечить адекватную фиксацию зоны контакта и соответствующий успех наблюдения контактов ЭР с плазмалеммой на электронном микроскопе в опытах с ингибиторами.

Мы рассмотрели два варианта интерпретации результатов таких опытов. Какой бы из них ни оказался соответствующим объективной реальности, оба они а priori предполагают существование контактов ЭР с плазмалеммой и в нормальных физиологических условиях. Применение ингибиторов, вероятно, лишь способствовало выявлению контактов, существовавших в норме. Это положение находит фактическое подтверждение результатами, представленными на рис. 3. По-видимому, в клетках исследуемой зоны корня контакты ЭР с плазмалеммой существуют и в нормальных физиологических условиях выращивания растений, а не являются исключительно следствием предобработки растений ингибиторами.

Сделав такой вывод, попытаемся понять природу и назначение наблюдаемых внутриклеточных контактов двух мембран. Интересно отметить, что изображения близких контактов мембраны ЭР с плазмалеммой, наблюдаемые на многих представленных нами электронно-микроскопических снимках (например, рис. 1, б), весьма похоже воспроизводят картину, наблюдавшуюся исследователями при использовании оптики с фазовым контрастом, когда длинные стромулы одной или несколькими точками вдоль их длины или на кончике могли заякориваться на плазмалемме (Gunning, 2005, 2007).

Возможно, что наблюдаемые нами заякоренные колена трубочек эндоплазматического ретикулума, которые расположены, например, в правом верхнем углу на рис. 1, б, и являются загадочными местами закоривания стромул. Можно сравнить изображения заякоренных стромул, представленные в работах (Gunning, 2005, 2007), с картиной контактов мембраны ЭР с плазмалеммой на рис. 1, б. На этом рисунке хорошо видно, что трубки ЭР в зоне колена именно заякорены и прочно удерживаются на плазмалемме, поскольку обе мембраны натянуты в местах соответствующего контакта (*стрелки*). Создается впечатление, что эти места и являются якорями, которые удерживали органоиды-лодки в потоке движущейся цитоплазмы.

Изображения трубочек ЭР, контактирующих с плазмалеммой, полученные нами с помощью электронного микроскопа, очень похожи на изображения заякоренных стромул, наблюдаемых с помощью дифференциальной интерференционной оптики при фазовом контрасте (Gunning, 2005, 2007). Гипотеза о тождестве стромул и трубчатых элементов ЭР находит в этих фактах дополнительное подтверждение.

Близкие контакты мембран внутри растительных клеток наблюдали с помощью электронного микроскопа и другие исследователи. Так, сообщалось о «смыкании» тонопласта и плазмалеммы в клетках-спутниках флоэмы после введения в транспирационный ток нитрата калия (Абдрахимов и др., 2008). К сожалению, авторы не сопроводили это наблюдение какими-либо комментариями, касающимися природы наблюдаемого «смыкания». А интересно здесь то, что в рассматриваемой зоне листа — зоне загрузки флоэмы — весьма оправданно присутствие в рассматриваемых клетках именно высокопроницаемого контакта двух названных мембран. Только такой тип взаимодействия этих мембран способен обеспечить необходимую здесь высокую проницаемость при выходе ассимилятов в апопласт у растения с апопластным типом загрузки флоэмы. К тому же за смыкание тонопласта с плазмалеммой здесь фактически может быть принято смыкание мембраны ЭР с плазмалеммой, поскольку значительное набухание цистерн ЭР исследователи нередко наблюдали при различных воздействиях, изменяющих нормальное функционирование клеток (Пономарева, Полыгалова, 2006), как это, возможно, имеет место и в рассматриваемом случае. Имеются также работы, авторы которых наблюдали близкий контакт стромул с ядерной и клеточной мембранами (Kwok, Hanson, 2004; Hanson, Sattarzadeh, 2008).

Проблема существования высокопроницаемых контактов мембран внутри растительных клеток в практическом плане не обсуждалась в литературе. Поэтому интересно было более внимательно посмотреть на выявленные нами близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой. На рис. 4, а представлен фрагмент ультраструк-

туры клетки (после предобработки отсеченного корня протонофором) с областью близкого контакта мембраны ЭР с плазматической мембраной. Обе контактирующие мембраны вблизи контакта вогнуты навстречу друг другу. На рис. 4, б представлена зона контакта (рис. 4, а, в рамке), снятая при большем увеличении электронного микроскопа. На снимке с увеличением просматривается щель в зазоре между двумя мембранами с умеренной прозрачностью для электронов. Рибосомы в зоне контакта отсутствуют. При этом контакт со щелью, возможно, переходит в более плотный контакт. Вид области контакта двух мембран на снимке с увеличением вполне соответствует описаниям высокопроницаемых щелевых контактов (gap junction), наблюдаемых с помощью электронного микроскопа, между клетками на объектах животного происхождения (Архипенко и др., 1975; Беркинблит и др., 1981). Интересно, что зоны контактов со щелью на таких объектах тоже часто соседствуют с зонами плотных контактов (tight junction).

Имеются и дополнительные основания для предварительной идентификации некоторых из наблюдаемых нами близких контактов двух мембран с высокопроницаемыми щелевыми контактами. Дело в том, что природу межклеточных щелевых контактов у животных связывают с наличием специализированных белковых каналов (коннексинов), формирующихся из пары идентичных белковых полуканалов, находящихся в каждой из контактирующих мембран (Obaid et al., 1983). Показательно, что из клеток мезокотила кукурузы был выделен белок, который был идентифицирован как перекрестно реагирующий с аффинноочищенными антителами, выращенными к животному коннексину — белку, формирующему коннексоны щелевых контактов (Yahalom, 1991). Подобный результат в том же году был получен другими исследователями — в корневых клетках *Arabidopsis* был идентифицирован белок, гомологичный коннексину из печени мыши (Meiners, Schindler, 1991). Однако среди исследователей до сих пор не существует надежного представления о том, зачем коннексин в растениях, в которых роль межклеточных контактов принято отводить плазмодесмам.

С учетом существования близких контактов мембраны ЭР с плазмалеммой представление о функциональном назначении коннексина в растениях, возможно, обретает вполне реальный смысл. Действительно, в рассматриваемой нами зоне корня заканчивается симпластный домен и осуществляется выход ассимилятов в апопласт (Гамалей, 1997, 2004). По-видимому, в этой зоне становится оправданным существование соответствующего высокопроницаемого транспортного русла, реализующего выход ассимилятов из эндопласта в апопласт. В данном случае термин «эндопласт» заимствован из работ Гамалея (1997, 2004) для обозначения внутреннего пространства ЭР. Из всех известных типов близких контактов мембран только щелевые контакты в этом случае способны обеспечить высокую проницаемость канала связи для ассимилятов, поскольку через контакты такого типа могут свободно диффундировать не только мелкие молекулы воды, сахаров, аминокислот, но и крупные молекулы многих флуоресцирующих красителей (Архипенко и др., 1975; Safarynost, Caveney, 1983).

Чтобы понять, являются ли наблюдаемые в растительных клетках близкие контакты мембран высокопроницаемыми контактами, формирующимися посредством специфических белков, нужны решающие эксперименты как по идентификации белков непосредственно в зоне

контакта, так и по дополнительному изучению структуры близких контактов мембран внутри растительных клеток с применением электронного микроскопа. Необходимо также предвидеть возможность структурных особенностей таких контактов у растений по сравнению с межклеточными у животных. Известно, что коннексоны щелевых соединений позвоночных образуются белковыми субъединицами мультигенного семейства коннексинов. Спектр молекулярных масс коннексинов весьма широк (предполагаемая мол. масса от 26 до 60 кДа). У беспозвоночных коннексоны собираются из белков совсем другого семейства — иннексинов (invertebrate connexins). Поэтому вполне возможно, что среди многих еще функционально не идентифицированных белков в растениях могут быть обнаружены специфические растительные коннексины.

Таким образом, в результате проведенных исследований в клетках паренхимы центрального цилиндра корня выявлены близкие контакты мембраны ЭР с плазмалеммой, для которых предварительно установлена качественная аналогия с высокопроницаемыми межклеточными контактами у животных, имеющими транспортное назначение. Хотя полученные данные и дают некоторые дополнительные аргументы в пользу аналогии между стромулами и трубчатыми элементами ЭР, основной результат этой статьи следует рассматривать прежде всего в аспекте нового понимания механизмов, реализующих транспортную функцию пространства, ограниченного ЭР растительной клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48519).

Список литературы

- Абдрахимов Ф. А., Баташева С. Н., Бакирова Г. Г., Чуиков В. И. 2008. Динамика изменения ультраструктуры листовых пластинок льна-долгунца при торможении транспорта ассимилятов анионом нитрата. Цитология. 50 (8) : 700—710.
- Архипенко В. И., Гербильский Л. В., Черченко Ю. П., Чуич Г. А. 1975. Структура и функции межклеточных контактов. В кн.: Структура и функции биологических мембран. М.: Наука. 77—95.
- Беркинблит М. Б., Божкова В. П., Бойцова Л. Ю., Миттельман Л. А., Потапова Т. В., Чайлахян Л. М., Шаровская Ю. Ю. 1981. Высокопроницаемые контактные мембраны. М.: Наука. 464 с.
- Гамалей Ю. В. 1997. Надклеточная организация растений. Физиол. раст. 44 (6) : 819—846.
- Гамалей Ю. В. 2004. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та. 424 с.
- Гамалей Ю. В. 2006. Подвижная сетевая организация пластид и митохондрий в клетках растений. Цитология. 48 (4) : 271—282.
- Гордон Л. Х. 1976. Дыхание и водно-солевой обмен растительных тканей. М.: Наука. 118 с.
- Пономарева А. А., Польшагова О. О. 2006. Влияние высокой концентрации протонофора на структуру и функцию клеток корней пшеницы. Цитология. 48 (3) : 199—207.
- Gunning B. E. S. 2005. Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging, and tip-shedding. Protoplasma. 225 : 33—42.
- Gunning B. E. S. 2007. Plant cell biology on DVD: information for students and a resource for teachers, July 2007. www.plant-cellbiologyondvd.com.
- Hanson M. R., Sattarzadeh A. 2008. Dynamic morphology of plastids and stromules in angiosperm plants. Plant Cell and Environment. 31 : 646—657.

Köhler R. H., Cao J., Zipfel W. R., Webb W. W., Hanson M. R. 1997. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*. 276 : 2039—2042.

Kwok E. Y., Hanson M. R. 2003. Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 35 : 16—26.

Kwok E. Y., Hanson M. R. 2004. Plastid and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Rep.* 23 : 188—195.

Meiners S., Xu A., Schindler M. 1991. Gap junction protein homologue from *Arabidopsis thaliana*: evidence for connexin in plants. *Proc. NAS of the USA*. 88 : 4119—4122.

Obaid A. L., Socolar S. J., Rose B. 1983. Cell-to-cell channels with two independently regulated gates in series: analysis of junctional conductance modulation by membrane potential, calcium and pH. *J. Membr. Biol.* 73 : 69—89.

Safranyost R. G., Caveney S. 1983. Rates of diffusion of fluorescent molecules via Intercellular membrane channels. *J. Cell Biol.* 97 : 82.

Yahalom A. 1991. Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *Plant Cell*. 3 : 407—417.

Поступила 23 VI 2009

MEMBRANE CONTACTS OF ENDOPLASMIC RETICULUM WITH PLASMALEMMA IN PLANT CELLS

G. A. Velikanov,¹ A. A. Ponomareva, L. P. Belova, V. Yu. Levanov

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Centre;
¹ e-mail: velikanov@mail.knc.ru

Close contacts of endoplasmic reticulum membrane with plasmalemma have been shown in common wheat root cells by means of electron microscopy. Qualitative analogy of these contacts with high-permeable intercellular contacts in animals has been preliminary established.

Key words: *Triticum aestivum* L., root cells, central cylinder, parenchyma, endoplasmic reticulum, plasmalemma, close contacts, electron microscopy.