

ОРИЕНТАЦИЯ ЦИТОКИНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ПРОТОПЛАСТОВ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS* ПРИ ВЕКТОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЛОСКО-ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА: НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ БИОФИЗИКИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

А.Ю. Скрипников, Д.Д. Шефер, Ж.-П. Зрид

ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва

Отдел молекулярной биологии растений, Лозаннский университет, Лозанна CH-1015, Швейцария

Ключевые слова и фразы: протопласт; поляротропизмФ; *Physcomitrella*; микротрубочки; фрагмопласт; развитие растений.

Аннотация: Протопласты мха *Physcomitrella patens* предложены в качестве биофизической модели для изучения механизмов ориентации цитокинетического аппарата растительной клетки. Впервые продемонстрирован непосредственный вклад дихроичных пигментных систем, веретена деления и фрагмопласта в клеточную поляризацию при воздействии электрического вектора поляризованного света.

Введение

Изучение взаимосвязи между пространственной организацией клеточных стенок, детерминацией плоскости деления клеток и формообразованием растений при воздействии факторов среды является важнейшей задачей современной биологии развития растений [1–4]. Понимание и раскрытие взаимосвязей между ориентацией плоскости деления отдельных клеток и морфогенезом целых растений осложняется и сдерживается трудностями, возникающими при разработке модельных систем в «размытой», без четких границ области экспериментального морфогенеза, которая начинается одной клеткой и заканчивается целым организмом [3]. В связи с разработкой новых и перспективных модельных систем для исследования клеточных и молекулярных механизмов развития растений при воздействии факторов среды особый интерес представляют культуры водорослей, мхов и папоротников [5–13]. Перспективность использования мхов в экспериментальном морфогенезе связана с четко выраженными реакциями их клеток в ответ на векторное воздействие электромагнитных и гравитационных стимулов [8, 14, 15]. Кроме того, мхи обладают важной особенностью клеток интегрировать генно-инженерные конструкции в ядерный геном по пути гомологичной рекомбинации. В связи с этим, мхи являются уникальными модельными растениями для изучения процессов развития методами обратной генетики [11, 16], а зеленый мох *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. был выбран в качестве значительного объекта биологии растений, такого как *Arabidopsis*, рис и тополь, с целью полной расшифровки нуклеотидной последовательности генома усилиями международного консорциума [17].

В настоящем исследовании мы предложили использовать протопласты мха *P. patens* в качестве биофизической модели для изучения механизмов ориентации и фиксации цитокинетического аппарата растительной клетки, которые в настоящее время остаются нераскрытыми и входят в ядро важнейших проблем биологии развития растений. Мы разработали новые экспериментальные подходы для наблюдения веретена деления и фрагмопласта в процессе первого деления протопластов, которые оставались неподвижными, механически зафиксированными в твердой агаризованной среде. В качестве внешнего

векторного биофизического фактора, непосредственно детерминирующего ориентацию цитокинетического аппарата, мы впервые использовали плоско-поляризованный свет. Нами было установлено, что поляризованный свет оказывает ориентирующее воздействие на веретено деления и фрагмопласт во время первого деления протопластов мха *P. patens*. Проведенные исследования дополняют современные представления о природе фотополяротропизма растений, который на клеточном уровне обычно описывается как совокупность ростовых процессов, связанных с аксиальным перераспределением клеточных компонентов и элонгацией клеток, то есть как ряд процессов, принципиально отличающихся по природе от митоза и цитокинеза. Нами впервые продемонстрирован непосредственный вклад веретена деления и фрагмопласта в клеточную поляризацию при воздействии электрического вектора.

Материалы и методы исследования

Выращивание протонемы мха, получение протопластов и инкубация протопластов. Протонему мха *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. выращивали на модифицированной агаризованной среде Кнопа [18] (среда PPNO3) при освещении белым светом от люминесцентных ламп (F96T12/GRO/VHO/WS – Sylvania, USA) с фотонным потоком $61 \text{ мкМ/м}^2 \cdot \text{с}$ в условиях 16 ч фотопериода при $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Для выделения протопластов из протонемы использовали 1 % раствор фермента Driselase (Fluka) в 0,48 М растворе маннитола (Fluka) [19]. Чашки Петри с протопластами, заключенными в агаризованную среду, устанавливали в горизонтальном положении и проводили инкубацию на белом поляризованном или неполяризованном свете, падающим вертикально от люминесцентных ламп Sylvania, расположенных над ними, с квантовым потоком $16 \text{ мкМ/м}^2 \cdot \text{с}$ при 16 ч фотопериода и $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Для изучения поляротропизма чашки Петри накрывали полимерными поляризационными фильтрами. В контрольном опыте протопласты инкубировали на «естественном» (неполяризованном) белом свете, квантовый поток которого регулировали с помощью стальной сетки.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Протопласты мха, регенерация которых проводилась в толще агаризованной среды, фиксировали через 1, 12, 24, 54, 66, и 96 ч после выделения. Фиксацию протопластов проводили в 4 % растворе Paraformaldehyde (Fluka, Швейцария) в течение 1 ч при $20 \text{ }^\circ\text{C}$. После трехкратной промывки препарата буферным раствором протопласты в агаровом слое обрабатывались 0,5 % раствором Driselase (Fluka). После этого протопласты промывали буферным «блокирующим» раствором с добавлением бычьего сывороточного альбумина и обрабатывались антителами к альфа-тубулину (Amersham Rahn, Великобритания). Затем после промывки препарат обрабатывали «вторичными» антителами к иммуноглобулинам, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (Amersham Rahn). После отмывки из препаратов антител протопласты обрабатывали 1 мкг/мл раствором Hoechst 33258 (Sigma, США). Препараты изучали под микроскопом Leitz Diaplan (Германия), оборудованным специальной охлаждаемой CCD видеокамерой AT200 (Photometrics, США). Изображения снимались и обрабатывались с использованием программы Photometrics Image Processing Software (Photometrics, США). С помощью этой же программы измеряли угол между экваториальной плоскостью веретена или фрагмопласта и откладывали на гистограмме с интервалом в 10 ° . В каждом эксперименте при наблюдении 10 тыс. протопластов в вариантах на поляризованном свете и на неполяризованном свете анализировали ориентацию не менее 60 митотических веретен и 190 фрагмопластов.

Результаты

Регенерация протопластов мхов во многом сходна с прорастанием спор [5–13] и существенно отличается от регенерации протопластов семенных растений. Из-за отсутствия обычной для регенерации протопластов семенных растений «калусной фазы», развитие протопластов мхов считают «истинной» регенерацией, в процессе которой начинает развиваться новый организм, находящийся в стадии протонемы [20]. В исследованиях,

проводившихся в других лабораториях, протопласты мхов изучались в основном на уровне морфологии, когда в качестве главного критерия поляризации клетки использовалось изменение сферической формы клетки на грушевидную [8, 21].

Для изучения деления сферических протопластов мха *P. patens* мы впервые подобрали условия для наблюдения веретена деления и цитокинетического аппарата в протопластах, которые не проявляют признаков морфологической поляризации и сохраняют сферическую форму до начала их первого деления.

Свежеизолированные протопласты через 1 ч после выделения из протонемы представляют собой сферические образования диаметром 25 мкм (рис. 1). В распределении хлоропластов, ядер, микротрубочек не выявляется признаков асимметрии и поляризации. На основании этих признаков протопласты можно считать аполярными сферическими образованиями. Ядра, как правило, занимают несколько смещенное от центра положение. Пучки микротрубочек равномерно распределены в цитоплазме. Микротрубочки могут располагаться вблизи поверхности ядра. В цитоплазме пучки микротрубочек образуют сетчатую конфигурацию, за счет того, что

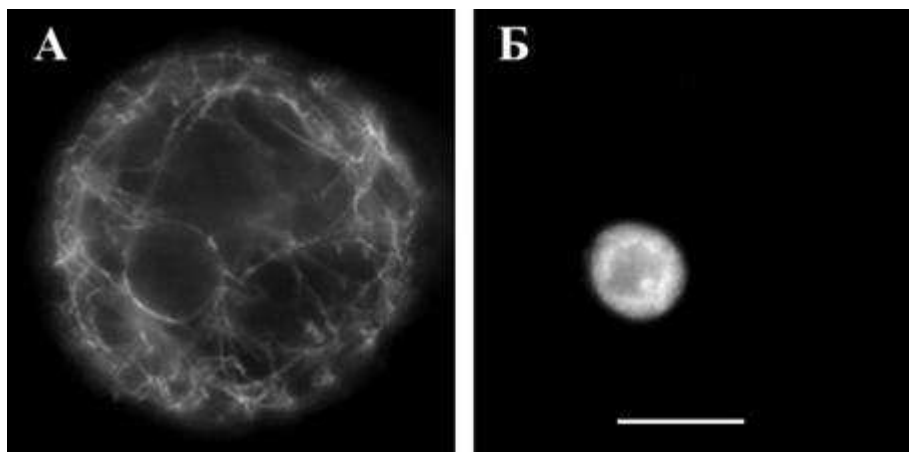


Рис. 1. Пучки микротрубочек в свежеизолированных протопластах проходят вблизи поверхности ядра и занимают кортикальный слой. А – микротрубочки (флуоресценция ФИТЦ), Б – ядро (флуоресценция Ноеchst). Масштабная линейка 10 мкм

они огибают многочисленные хлоропласты размером 5–6 мкм, иногда проходя в плотном контакте с ними. Пучки микротрубочек, как правило, обнаруживаются в кортикальном слое. В цитоплазме выделяются пучки микротрубочек, идущие из перинуклеарной области к цитоплазматической периферии (рис. 1).

В протопластах, регенерация которых проходит на поляризованном свете, микротрубочки не образуют структур, которые могли бы считаться ориентированными определенным образом по отношению к электрическому вектору. На неполяризованном свете, в контрольной культуре протопластов, пучки микротрубочек также не обнаруживают предпочтительной ориентации по отношению к какой-либо оси. Можно полагать, что на данном этапе развития с момента выделения, протопласты продолжают оставаться морфофизиологически аполярными структурами. Установлено, что в темноте протопласты *P. patens* не делятся.

Первые делящиеся протопласты обнаруживаются через 30 ч после их инкубации, как на естественном, так и на поляризованном свете в условиях 16 ч фотопериода. Наибольшее число митотических веретен («волну митозов») в культуре протопластов можно наблюдать через 54 ч после начала инкубации протопластов. Чашки Петри с протопластами помещали в инкубационный бокс в 21 ч, немедленно после энзиматического выделения и заливки в агаризованный слой на поверхности целлофанового диска. Свет отключался на 8 часов в 22 ч.

Именно в таких фотопериодических условиях, с 2 ч ночи до 4 ч утра в протонематических клетках *P. patens* наблюдалось наибольшее число митозов [22]. Во время перехода от интерфазы к митозу в протопластах *P. patens* не обнаруживаются препрофазные кольцевые пучки микротрубочек. Митотическое веретено, как правило, занимает центральную область сферического протопласта. Метафазная пластинка находится на равных расстояниях от полюсов веретена и ориентирована перпендикулярно по отношению к оси веретена. Метафазное веретено в протопластах, как правило, имеет широкие полюса.

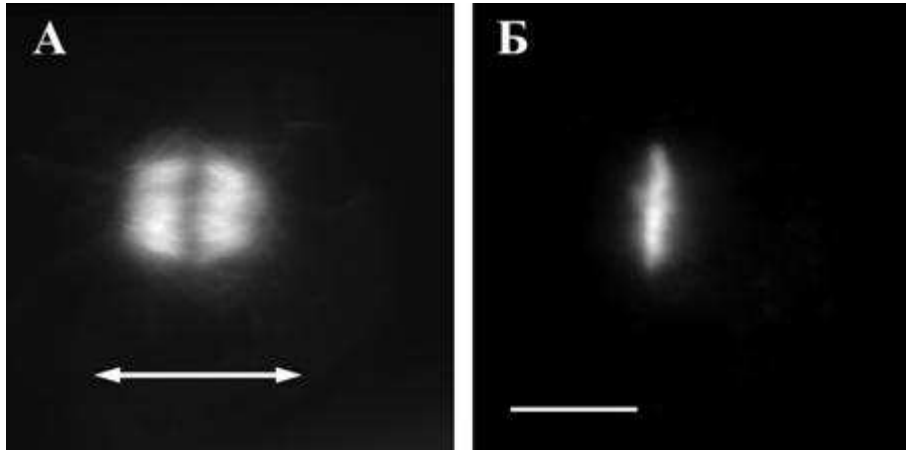


Рис. 2. Метафазное веретено в протопластах, регенерация которых проходит на поляризованном свете. Цитоплазматические микротрубочки элиминируются, центр клетки занят митотическим веретеном с темной экваториальной зоной (А), которой соответствует «ассамблея» хромосом, выстроенных в метафазной пластинке (Б). Двойная стрелка показывает направление колебаний электрического вектора. Масштабная линейка 10 мкм

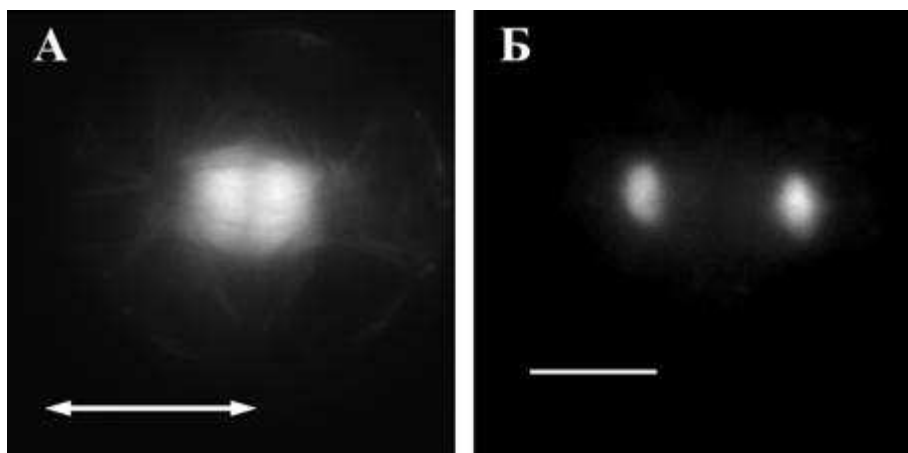


Рис. 3. Телофаза в протопластах, деление которых проходит на поляризованном свете. Темная полоса между «антипараллельными» пучками микротрубочек соответствует молодой клеточной пластинке (А), разделяющей дочерние ядра (Б) и ориентированной под прямым углом к длинной оси веретена и электрическому вектору (двойная стрелка). Масштабная линейка 10 мкм

Пучки микротрубочек, образующие веретено деления, образуют подгруппы, сходящиеся на «мини-полюсах» (рис. 2). Во время митоза веретено деления, как правило, занимает центральную область протопласта, который сохраняет сферическую форму.

Во время телофазы вокруг дочерних ядер формируются новые мембраны. В этот момент фрагмопласт располагается между двумя дочерними ядрами. Экватор фрагмопласта расположен под прямым углом к оси веретена. Микротрубочки идут от экваториальной зоны веретена и «опираются» на проксимальные поверхности молодых дочерних ядер. От других (дистальных и латеральных) поверхностей ядер немногочисленные микротрубочки радиально

отходят во всех направлениях (рис. 3). Телофазное веретено в большинстве случаев располагается в центре сферического протопласта. Ранний фрагмопласт обладает веретеновидной (бочковидной) формой. Затем диаметр фрагмопласта увеличивается. Микротрубочки фрагмопласта ориентированы под прямым углом к экватору, заметному как темная полоса, разделяющая микротрубочки противоположной полярности (рис. 3). Экваториальная плоскость фрагмопласта наследует ориентацию метафазной пластинки, равноудалена от дочерних ядер и перпендикулярна оси, соединяющей их. Во время цитокинеза фрагмопласт растет центробежно к клеточной периферии. Поздний фрагмопласт в некоторых протопластах делит цитоплазму практически сферической клетки на две половины (рис. 4).

В структурной организации тубулинового цитоскелета протопластов на поляризованном и неполяризованном свете, различия не обнаружено. Важным морфофизиологическим различием между контрольной и опытной культурой протопластов является ориентация веретена деления, фрагмопласта и плоскости клеточной стенки между дочерними клетками.

Метафазная пластинка ориентирована перпендикулярно по отношению к электрическому вектору поляризованного света. В протопластах, регенерирующих на неполяризованном свете, веретена ориентированы случайным образом во всех направлениях. Принимая во внимание то, что экваториальная плоскость веретена в делящемся протопласте мха перпендикулярна его оси (рис. 2), можно заключить, что ось веретена параллельна электрическому вектору поляризованного света.

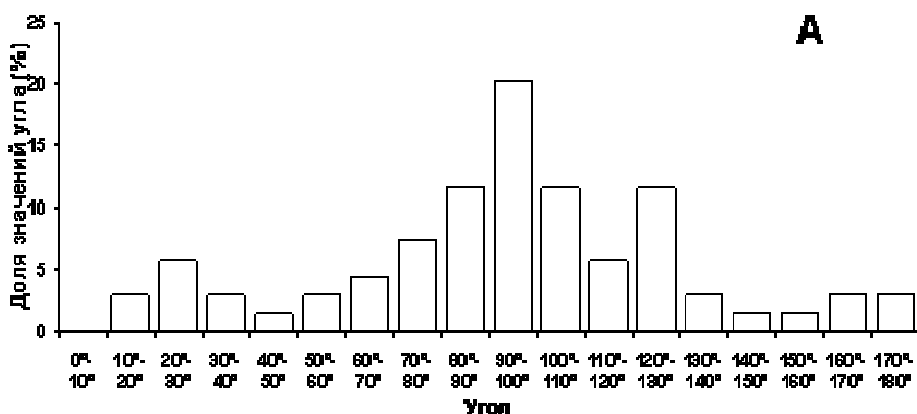
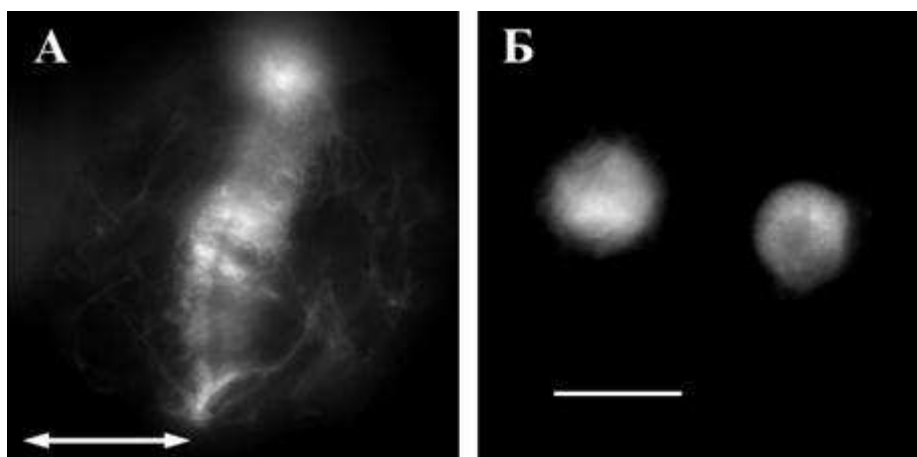


Рис. 4. Поздний фрагмопласт (А) делит цитоплазму сферической клетки на две половины, в которых находятся дочерние ядра (Б). На поляризованном свете экватор фрагмопласта находится под прямым углом к электрическому вектору (двойная стрелка). В цитоплазме вновь появляются пучки микротрубочек. Масштабная линейка 10 мкм

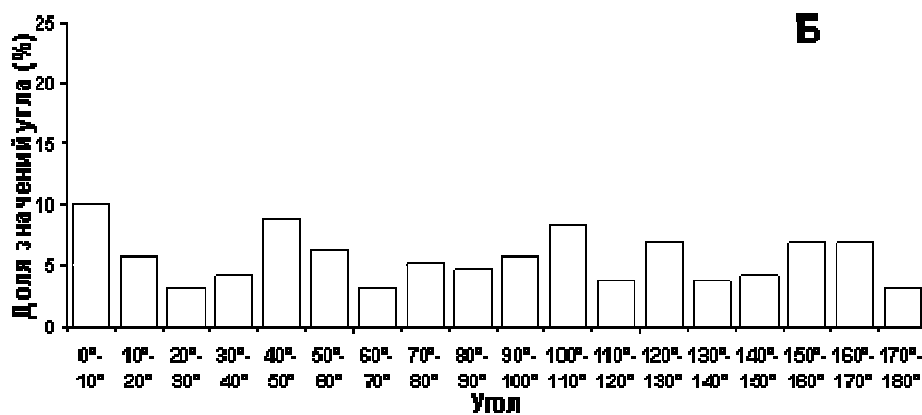


Рис. 5. Распределение значений угла между экваториальной плоскостью фрагмопласта и электрическим вектором в протопластах, регенерация которых проходит на поляризованном свете (А) и на неполяризованном свете (Б)

Экваториальная плоскость фрагмопласта (рис. 5) перпендикулярна электрическому вектору, когда протопласты регенерируют на поляризованном свете. В контрольной культуре протопластов на неполяризованном свете фрагмопласты ориентированы беспорядочно во всех направлениях. Ось, соединяющая дочерние ядра, разделенные ранним фрагмопластом логически должна быть параллельна электрическому вектору поляризованного света, поскольку комплекс раннего фрагмопласта с дочерними ядрами, как и веретено, образует симметричную конфигурацию, а прямая, соединяющая ядра, перпендикулярна экватору фрагмопласта в начале цитокинеза (рис. 3, 4).

Обсуждение результатов

Исследование навигации фрагмопласта проводится обычно в клетках в составе интактных тканей или органов высших растений. Нам неизвестны работы других авторов, в которых ориентация цитокINETического аппарата при воздействии внешних векторных факторов изучалась бы в протопластах высших растений с использованием методов иммунофлуоресценции. Возможно, это связано с рядом проблем, возникающими в процессе подбора условий иммобилизации протопластов, их химической фиксации и обработки антителами для изучения процесса регенерации при биофизическом воздействии внешних векторных полей в одном опыте. В нашей работе мы разработали уникальный подход, впервые позволивший изучать ориентированную реорганизацию цитоскелета в протопластах, иммобилизованных в агаризованной среде.

Проведенное нами сочетание трех экспериментальных подходов – культуры протопластов, иммунофлуоресценции и поляротропизма – в одном эксперименте позволило изучить реорганизацию элементов цитоскелета в процессе ориентированной регенерации протопластов мха *P. patens* и впервые продемонстрировать векторное воздействие плоско-поляризованного света на навигацию веретена деления и фрагмопласта высшего растения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что первое деление протопластов мха является значительным этапом развития организма, во время которого происходит ориентация цитокINETического аппарата при участии дихроичных пигментных систем. Известно, что поляротропические реакции в клетках мхов [12, 23, 24] и папоротников [7, 25] могут регулироваться фитохромом. Полученные нами результаты открывают перспективу для исследования новых функций дихроичных фоторецепторных систем, включая фитохром, которые связаны с ориентацией цитокINETического аппарата – процессом, играющим ведущую роль в формообразовании высших растений. На основе разработанной модели мы

планируем создать новые клеточные тест-системы для определения и детального изучения цитокинетической активности новых регуляторных соединений прежде всего пептидной природы.

Работа выполнена при поддержке гранта Швейцарского фонда научных исследований FNRS №7GUPJ04517.

Список литературы

1. Green P.B. Connecting gene and hormone action to form, pattern and organogenesis: biophysical transductions // *Journal of Experimental Botany*. – 1994. – V.45 Special Issue. – P. 1775–1788.
2. Yuan, M. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells / M. Yuan, P.J. Shaw, R.M. Warn, C.W. Lloyd // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – V.91. – P. 6050–6053.
3. Lloyd C. Plant morphogenesis - life on a different plane // *Current Biology*. – 1995. – V.5. – P. 1085–1087.
4. Smith L.G. Plant cell division: building walls in the right places // *Nature*. – 2001. – V.2. – P. 33–39.
5. Goodner, B. Fucus embryogenesis: a model to study the establishment of cell polarity / B. Goodner, R.S. Quatrano // *Plant Cell*. – 1993. – V.5. – P. 1471–1481.
6. Galway, M.E. Capacity for microtubule reorganization and cell wall synthesis in cytoplasts of the green alga *Mougeotia* / M.E. Galway, G.J. Hyde, A.R. Hardham // *Protoplasma*. – 1994. – V.178. – P. 11–17.
7. Wada, M. Photobiology of ferns // *Photomorphogenesis in plants – 2nd Edition* / M. Wada, M. Sugai ; Eds. R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg. – Dordrecht : Kluwer, 1994. – P. 783–802.
8. Cove, D.J. The alignment of the axis of asymmetry in regenerating protoplasts of the moss, *Ceratodon purpureus*, is determined independently of axis polarity / D.J. Cove, R.S. Quatrano, E. Hartmann // *Development*. – 1996. – V.122. – P. 371–379.
9. Furuya, M. Control of mitosis by phytochrome and blue-light receptor in fern spores / M. Furuya, M. Kanno, H. Okamoto, et al. // *Plant Physiol*. – 1997. – V.113. – P. 677–683.
10. Hughes, J. Photomorphogenesis in lower plants / J. Hughes, E. Hartmann // *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*. – New Delhi : Narosa Publishing House, 1998. – P. 805–837.
11. Schaefer, D. The moss *Physcomitrella patens*, now and then / D. Schaefer, J.-P. Zryd // *Plant Physiology*. – 2001. – V.127. – P. 1430–1438.
12. Mittmann, F. Targeted knockout in *Physcomitrella* reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm / F. Mittmann, G. Brucker, M. Zeidler, et al // *PNAS*. – 2004. – V.101. – P. 13939–13944.
13. Frank, W. Molecular tools to study *Physcomitrella patens* / W. Frank, E.L. Decker, R. Reski // *Plant Biology*. – 2005. – V.7. – P. 220–227.
14. Демкив, О.Т. Морфогенез архегоният / О.Т. Демкив, К.М. Сытник. – Киев : Наукова думка, 1985. – 204 с.
15. Cove, D.J. The moss *Physcomitrella patens* / D.J. Cove // *Annual Review of Genetics*. – 2005. – V.39. – P. 339–358.
16. Schaefer, D.G. Gene targeting in *Physcomitrella patens* / D.G. Schaefer // *Current opinion in plant biology*. – 2001. – V.4. – P. 143–150.
17. Rensing, S.A. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants / S.A. Rensing, D. Lang, A.D. Zimmer, et al // *Science*. – 2008. – V.319. – P. 64–69.
18. Ashton, N.W. The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens* / N.W. Ashton, D.J. Cove // *Mol Gen Genet*. – 1977. – V.154. – P. 87–95.

19. Grimsley, N.H. The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss *Physcomitrella patens* / N.H. Grimsley, N.W. Ashton, D.J. Cove // *Mol Gen Genet.* – 1977. – V.154. – P. 97–100.
20. Hohe, A. From axenic spore germination to molecular farming. One century of bryophyte in vitro culture / A. Hohe, R. Reski // *Plant Cell Reports.* – 2005. – V.23. – P. 513–521.
21. Wagner, T.A. Gravitropism and gravitropism during regeneration from protoplasts of the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. / T.A. Wagner, F.D. Sack // *Planta.* – 1998. – V.205. – P. 352–358.
22. Reski, R. Genome analysis of a moss, *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. / R. Reski, M. Faust, X.-H. Wang, et al // *Mol Gen Genet.* – 1994. – V.244. – P. 352–359.
23. Hartmann, E. Photomorphogenesis of mosses and liverworts / E. Hartmann, G.I. Jenkins ; Eds. A.F. Dyer, J.G. Duckett // *The experimental biology of bryophytes.* – New York, London: Academic Press, 1984. – P. 203–228.
24. Esch, H. Phytochrome-controlled phototropism of protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*: physiology of the wild type and class 2 ptr- mutants / H. Esch, E. Hartmann, D. Cove, et al // *Planta.* – 1999. – V.209. – P. 290–298.
25. Kadota, A. Phytochrome-mediated polarotropism of *Adiantum capillus-veneris* L. protonemata as analysed by microbeam irradiation with polarized light / A. Kadota, M. Wada, M. Furuya // *Planta.* – 1985. – V.165. – P. 30–36.

Orientation of Cyto-Kinetic Apparatus of Moss Protoplasts *PHYSCOMITRELLA PATENS* under Direct Beam Influence of Plane-Polarized Light: New Model of Plant Development Biophysics

A.Yu. Skripnikov, D.D. Shefer, Zh.-P. Zrid

Biological Department of MSU named after M.V. Lomonosov, Moscow; Department of Molecular Biology of Plants, Lausanne University, Lausanne CH-1015, Switzerland

Key words and phrases: protoplast; polar tropism F; *Physcomitrella*; microtubules; phragmoplast; plant development.

Abstract: Moss protoplasts *Physcomitrella patens* are proposed as biophysical model for examination of orientation techniques of cyto-kinetic apparatus of plant cell. The direct contribution of dichroic pigment systems, cleavage spindle and phragmoplast into cell polarization under the effect of electric vector of polarized light is shown for the first time.

© А.Ю. Скрипников, Д.Д. Шефер, Ж.-П. Зрид, 2009