

22. Savage, D. C., Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., McGhee, J. R., Bienestock, J. (Eds.) (2005). *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, 2064.

23. Stebbins, C. E., Galán, J. E. (2001). Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature*, 412 (6848), 701–705. doi: 10.1038/35089000

24. Sizencov, A. H. (2009). Metody opredelenija antibiotikoproduktivnosti i antibiotikorezistentnosti [Methods for determination of antibiotic resistance and antibiotic efficiency]. Orenburg: SEIOSU, 102.

25. Pro zatverdzhennya metodychnyh vkazivok shhodo vyznachennya chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterialnyh

preparativ [Order of the Ministry of Health of Ukraine on approval of guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations] (2007). Ministry of Health of Ukraine, 167.

26. Cebra, J. J., Jiang, H.-Q., Boiko, N., Tlaskalova-Hogenova, H. (2005). The Role of Mucosal Microbiota in the Development, Maintenance, and Pathologies of the Mucosal Immune System. *Mucosal Immunology*, 335–368. doi: 10.1016/b978-012491543-5/50022-x

27. Bubnov, R. V., Spivak, M. Y., Lazarenko, L. M., Bomba, A., Boyko, N. V. (2015). Probiotics and immunity: provisional role for personalized diets and disease prevention. *EPMA Journal*, 6 (1). doi: 10.1186/s13167-015-0036-0

Рекоментовано до публікації д-р біол. наук Бойко Н. В.
Дата надходження рукопису 12.07.2016

Баті Вікторія Віталіївна, асистент, кафедра мікробіології, вірусології, імунології з курсом інфекційних хвороб, Державний вищий навчальний заклад "Ужгородський національний університет", вул. Народна, 3, м. Ужгород, Україна, 88000
E-mail: v.bati@mail.ru

Бойко Надія Володимирівна, доктор біологічних наук, професор, кафедра мікробіології, вірусології, імунології з курсом інфекційних хвороб, Державний вищий навчальний заклад "Ужгородський національний університет", вул. Народна, 3, м. Ужгород, Україна, 88000
E-mail: nadiya.boyko@gmail.com

УДК 579:672.35

DOI: 10.15587/2313-8416.2016.76711

ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК АУТОФАГІЇ ЯК ТИПУ ПРОГРАМОВАНОЇ СМЕРТІ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ ЗА УМОВ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ

© С. І. Шевченко, І. П. Аносов

Вивчено ультраструктуру руйнації протопласту рослинної клітини за умов бактеріальної інфекції. За аналогією до процесів аутофагії в тваринних клітинах визначено морфологічні шляхи аутофагії рослинних клітин - вакуолізація цитоплазми, конденсація та деконденсація ядерної маси, мультивезикулярну нуклеацію, експансію фагофора та дозрівання макроаутофагосом, утворення аутофаголізосом, утворення мікроаутофагосом шляхом інвагінації тонопласту, явище мітофагії. Показано місця кінцевої деградації зруйнованої цитоплазми у вакуолях уражених клітин

Ключові слова: аутофагія, аутофагосома, лізосома, аутолізосома, аутофаголізосома, некроз, тонопласт, гонофора, везикула

The ultrastructure of the destruction of the plant cells protoplast is studied under the condition of bacterial infection. According to the autophagy processes in animal cells, the morphological ways of plant cells autophagy – vacuolization of cytoplasm, condensation and decondensation of the nuclear mass, multivesicular nucleation, phagophore expansion and macroautophagosome ripening, autophagolysosome formation by the way of tonoplast invagination, mitophagy phenomenon are determined. The places of the final degradation of the ruined cytoplasm in the vacuoles of destroyed cells are shown

Keywords: autophagy, autophagosome, lysosome, autolysosome, autophagolysosome, necrosis, tonoplast, gonophore, vesicles

1. Вступ

Трансмісійний електронний мікроскоп (ТЕМ) є одним з найбільш раних інструментів, використовуваних для характеристики аутофагії, і він залишається одним з найнадійніших методів моніторингу аутофагії в клітинах і тканинах. Проте, інтерпретація даних ТЕМ вимагає спеціальних знань. Існує кілька критеріїв для точного опису аутофагосом і аутолізосом. Відмінною рисою аутофагосом є їх подвійні або мультимембранні структури, що містять електронно-щільний матеріал з щільністю, аналогічній цитоплазми [1].

Наявність в аутофагосомі органел, таких як мітохондрії, хлоропласти, що містять в собі аутофаголізосоми, мають більш темний колір, і нагадують лізосоми цитоплазми. Інші цитоплазматичні утворення можуть бути помилково описані як аутофагосоми і аутофаголізосоми.

Іноді типова подвійна структура мембрани аутофагосом може бути порушена, наприклад після інфікування деяких патогенних мікроорганізмів. Тому, неупереджена і чітка ідентифікація аутофагосом з використанням ТЕМ вимагає запобіжних заходів.

Використання величезного світового досвіду у вивченні ПКС тваринної клітини, рекомендацій NCCD (Номенклатурний комітет з клітинної смерті), проведення чіткої аналогії в ідентифікації отриманих результатів, поєднання методів біохімічних досліджень з методами мікрокопічних досліджень стане основним у вивченні смерті рослинної клітини [1–5].

2. Літературний огляд

Програмована клітинна смерть (ПКС) – генетично детермінований процес, який описаний як для клітин еукаріот, так і для клітин прокаріот. У тваринних клітин тепер розрізняють три основних типи ПКС: апоптоз, аутофагію і некроз. На відміну від ссавців, у рослин досі існує плутанина в класифікації ПКС. Існування «класичного апоптозу» в рослинних клітинах в нині широко дискутується. Апоптоз у тварин супроводжується стисненням протопласту, конденсацією хроматину і фрагментацією ядра [1].

З моменту відкриття смерті клітини за морфологічними ознаками і втілення терміну «апоптоз» для цього процесу стало однією з найбільш привабливих і актуальних подій в сучасній біології [2].

Надмірна кількість публікацій застерігає стосовно неправильного використання термінів, що уповільнюють процес у галузі дослідження клітинної смерті. Виходячи з цього, було створено NCCD (Номенклатурний комітет з клітинної смерті) [3].

Користуючись рекомендаціями NCCD, можна визначити термін «апоптоз», створений Kerr *et al*, таким, що супроводжується округленням клітини, западанням псевдоподій, зменшенням кількісного об'єму, конденсацією хроматину, фрагментацією ядра; плазматична мембрана покрита пухирцями, зберігає свою цілісність до завершальних стадій процесу при поглинанні резидентними фагоцитами *in vivo*. Варто зазначити, що поняття «апоптоз» та «смерть клітини» не є синонімами, оскільки «апоптоз» розглядається на біохімічному рівні, а «смерть клітини» взагалі може розглядатися на механічному рівні. Некроз морфологічно характеризується приростом об'єму клітини, набуханням органел, розривом плазматичної мембрани і подальшою втратою внутрішньоклітинного вмісту [4].

Аутофагія – це деградація органел і цитоплазматичного матеріалу, яка відбувається за участю внутрішньоклітинних мембранних структур. Подібно до дріжджів та тваринних клітин, рослинні клітини демонструють декілька типів аутофагії. Мікроаутофагія – це поглинання клітинних компонентів вакуолярною мембраною. Макроаутофагія має місце подалі від вакуолі. В рослин вона здійснюється аутолізосомами, які значною мірою відрізняються від аутофагосом, знайдених у дріжджах та тваринних клітинах, так як містять гідролази від початку їхнього формування. Інший тип аутофагії у рослинних клітинах названий мегафагією або мегааутолізом – це масова деградація клітин наприкінці одного типу запрограмованої смерті клітин. Знайдено докази аутофагії специфічних білків при внутрішній дегенерації хлоропластів [5].

Процес утворення аутофагосом розпочинається в цитоплазмі з утворенням чашкоподібної (cave-

shape) мембранної структури, так званої фагофори або ізольованої мембрани, яка поступово розширюється, захоплює компоненти клітини і потім заклопується, утворюючи зрілу аутофагосому. Зовнішня мембрана аутофагосоми згодом зливається з тонопластом. При цьому в люмен вакуолі вивільняється так зване «аутофагічне тіло» – її вміст оточений однією мембраною, яка згодом деградується вакуолярними кислими гідролазами. Продукти деградації при цьому можуть знову транспортуватися в цитоплазму [6]. Деградація аутофагосомального вмісту може проходити і у самих аутофагосомах, оскільки вони містять гідролітичні ферменти. Таким чином, в ході аутофагії деградація клітинного вмісту може здійснюватися як шляхом злиття аутофагосом з центральною літичною вакуолою, так і в самих аутофагосомах [7, 8].

На сьогодні залишається невідомим взагалі, як проявляється апоптоз у рослин, що за своїми проявами досить схожий з апоптозом у тварин. Важливі компоненти апоптозного ланцюга у тваринній і рослинній клітинах можуть бути взаємно замінні: відбувається виражена конденсація хроматину за наступним розпадом ядра, клітинна мембрана стає пухирчатою, і утворюються гігантські вакуолі. У більшості випадків у рослин вакуолізація цитоплазми передують руйнуванню ядра і мітохондрій [9].

Нещодавно групою вчених встановлено, що використання терміну «апоптоз» для рослин не виправдано, було запропоновано відокремити такі її типи: вакуолярну загибель та некроз. Вакуолярна клітинна смерть розглядається як комбінація аутофагії, здійснюваної вакуолями і супроводжується збільшенням їх розмірів, і подальшого вивільнення гідролаз з літичних вакуолей в результаті розриву мембрани вакуолей (тонопласту). При цьому морфологія клітинних органел і цілісність плазматичної мембрани клітини зберігається до моменту розриву тонопласту. На противагу цьому, некротична смерть супроводжується швидким розривом плазматичної мембрани, стисненням протопласту, порушенням функціонування мітохондрій, активним накопиченням форм кисню і відсутністю характерних ознак вакуолярної смерті [4].

Вакуолі відіграють істотну роль в ПКС, яка відбувається не тільки в процесі розвитку рослинних організмів, але і при гіперчутливій відповіді (ГВ), викликаній зараженням рослин вірусними, бактеріальними або іншими патогенами. Описано два сценарії розвитку подій. При вірусній інфекції відбувається лізис тонопласту з вивільненням літичних ферментів вакуолей в цитоплазмі [10]. Це має біологічний сенс, так як переважна більшість вірусів рослин розмножується саме в цитоплазмі [11].

При бактеріальному або грибовому зараженні патоген перебуває поза клітиною рослини – в міжклітинній рідині, званою апопластом. Для боротьби з деякими не клітинними патогенами вакуолярна мембрана здатна зливатися з плазмалемою, дозволяючи гідролітичним ферментам вакуолі виходити в позаклітинний простір [12].

Залежно від способу видалення компонентів аутофагію поділяють на селективну і неселективну.

При селективній аутофагії цитоплазма та інші органи поглинаються аутофагосомами невибірково. У свою чергу, селективна аутофагія є цілеспрямованою і вимагає спеціальних білків-рецепторів для видалення певних компонентів. При селективній аутофагії білки сімейства Atg8 виступають як рецептори [13].

Що стосується рослин, то специфічні білки і фактори, залучені в аутофагію компонентів протоплазми клітин, виділяють: мітофагію, хлорофагію, ліпофагію, рибофагію, ліпофагію, ксенофагію [14].

Для вивчення ПКС а саме аутофагії, були використані різні методи трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ). Результати ТЕМ залишаються «золотим стандартом» і це, як і раніше, є найнадійнішим методом моніторингу аутофагії в клітинах і тканинах рослин. Для інтерпретації даних ТЕМ потрібна спеціальна кваліфікація для опису аутофагосом і аутолізосом [15, 16].

3. Мета та задачі дослідження

Основною метою роботи було проведення електронно-мікроскопічних досліджень меристемної зони та первинної кори молодих корінців вражених рослин для їх ідентифікації та встановлення деяких морфологічних етапів загибелі клітин як можливих типів програмованої загибелі рослинних клітин, що викликані присутністю фітопатогенних бактерій в цій зоні.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

- вивчити ультраструктуру руйнації протопласту рослинної клітини;

- за аналогією до процесів аутофагії в тваринних клітинах визначити морфологічні шляхи аутофагії рослинних клітин – вакуолізацію цитоплазми, конденсацію та деконденсацію ядерної маси, мультивезикулярну нуклеацію, експансію фагофора та дозрівання макроаутофагосом, утворення аутофаголізосом, утворення мікроаутофагосом шляхом інвагінації тонопласту, явище мітофагії;

- показати місця кінцевої деградації зруйнованої цитоплазми клітин.

4. Дослідження кореневої системи плодівих дерев черешні

Об'єктами досліджень була коренева система плодівих дерев черешні неінфікованих сортів: Мелітопольська рання, Францис та із симптомами опіку листків, вік яких не перевищував 3–6 років [17, 18].

Роботу проводили в приватних насадженнях черешні Мелітопольського, Якимівського районів Запорізької області. Відбір зразків вели у весняний період у фазі пробудження листових бруньок, коли проходив масовий розвиток кореневих відростків. З глибини 30–40 см від поверхні ґрунту і 60–80 см від штамба (залежно від віку дерева) збирали бічні корінці від кореневого розгалуження завдовжки 10–15 см з 2–3-ма відростками. Незадерев'янілі кінцеві відростки довжиною до 5 мм були світло-коричневого кольору, тоді як решта корінців була темно-коричневого кольору. Для ультрамікроскопічних досліджень відбирали зони кореневих відростків від кореневого чохла до

зони кореневих волосків. Фіксували протягом 2 год в 2,5 % глютарового альдегіду, приготованому на 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,2). Потім їх обробляли протягом 2 год в 1 % розчином OsO₄ (Serva), приготованому на тому ж буфері з додаванням сахарози (25 мг/мл). Дегідратацію препаратів проводили в розчинах етанолу зростаючої концентрації (30, 40, 50, 60, 70, 96 %), ацетону та окису пропілену. Зразки укладали в Епон-812(Serva) і полімеризували протягом 3 діб, збільшуючи температуру від 37 °С до 60 °С. Зрізи отримували на ультрамікротоме (LKB III, Sweden), контрастували насиченим водним розчином уранілацетату (60 °С, 10 хв), а потім водним розчином цитрату свинцю протягом 10хв. Ультраструктуру клітин меристемної зони корінців інфікованих рослин вивчали за допомогою електронного мікроскопа ЕМВ-100БР (Україна).

5. Результати досліджень та їх обговорення

На поздовжніх та поперечних ультратонких зрізах кореневих відростків дерев черешні з симптомами та без симптомів опіку листків спостерігали різний морфологічний стан протоплазми природно уражених клітин. Фрагменти зрізів меристемної зони не мають внутрішніх морфологічних ознак порушення її будови. Інтерфазні клітини містять в собі сформовані мембранні системи: ядро, ядерце, плазматичний ретикулум, мітохондрії, лейкопласти, вакуолі різної форми, прозору клітинну стінку первинної будови. В гранулярному протопласті зустрічаються окремі лізосоми (рис 1, а, 1–3, стрілка 4, 5).

Клітинні структури, представлені на рис 1, а, можна вважати «нормальними». Мембранні форми органел можна відрізнити від аутофагосомальних «анормальних», що подано в рекомендаціях NCCD [1–4].

В клітинах поверхневої зони кореня інфікованих рослин зустрічаються клітини з гіпертрофованим протопластом (рис. 1, б). Ядро (1) з ядерцем (стрілка 1) затиснуте до одного з боків клітини. Гіпертрофія центральної вакуолі (3) відбувається за рахунок злиття з нею дрібних вакуолей (стрілка 4). Притиснутий протопласт до клітинної стінки має вигляд електронно-щільної смуги (стрілки 5, 6).

На рис. 1 Б представлено гіпертрофію центральної вакуолі, але це не є доказом розвитку некрозу. Морфологічні характеристики розвитку об'єму клітини, набухання органел, розриву плазматичної мембрани і подальшої втрати внутрішньоклітинного вмісту не виявлено. Сам факт наявності в клітинах великих центральних вакуолей дає змогу свідчити про їх можливу лізосомальну активність [4, 5].

В інших клітинах цієї зони відбувається конденсація ядерного матеріалу та гранулярного протопласту у середній частині (рис. 1, в, 1). Поряд з цим у вільній зоні клітини відбувається утворення електронно-прозорих мембранних везикул, інші мембранні прозорі везикули охоплені електронно-щільним матриксом концентричної форми (стрілки 2, 3). Клітинна стінка набуває додаткової електронної щільності (стрілка 4).

Електронно-щільний матрикс концентричної форми, що охоплює прозорі мембранні везикули (рис. 1, стрілка 2, 3) може бути як мультивезикулярне тіло.

На відстані 1мм від апікальної меристеми зустрічаються клітини, в яких ядерний матеріал має вигляд деконденсованої гранулярної маси (рис. 1, з). Залишки ядерної мембрани (стрілка 1) утримують частину ядерної маси. Утворені одномембранні гранулярні везикули мають правильну округлу форму (стрілка 2).

На поверхні однієї з гранулярних везикул розміщена електронно-щільна смуга чашовидної форми (стрілка 3). В клітинному просторі зустрічаються сферичні двомембранні форми з різною електронною щільністю (стрілка 4) Смуга електронно-щільного протопласту щільно притиснена до клітинної стінки (стрілка 5, 6).

Наявність в клітинах мембранних гранулярних везикул з електронно-щільною смугою чашовидної форми (рис. 1, з, стрілка 3) можна вважати за фагофор, що є початковим етапом у формуванні аутофагосом в клітинах кореня уражених дерев черешні. Описана аналогічна чашовидна електронно-щільна смуга ініціює утворення двох мембран та «зрілих» аутофагосом при закритті цього фагофора у тваринних клітинах [5–7]. Такі структури подібні до виявлених нами сферичних двомембранних форм з різною електронною щільністю (рис. 1, з, стрілка 4).

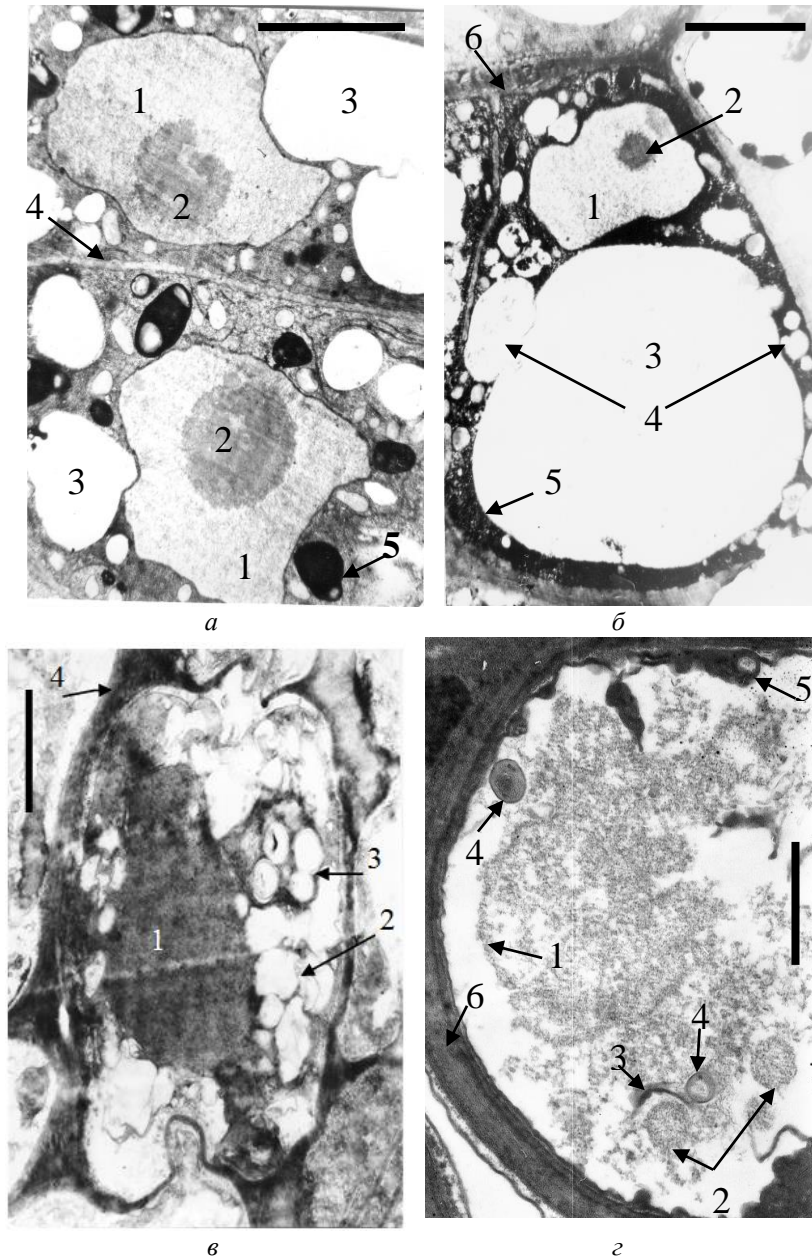


Рис. 1. Ультраструктура цитоплазми клітин молодих корінців зони ризоплану дерев черешні з симптомами опіку листків: *а* – Фрагменти інтерфазних клітин меристемної зони кореня: 1 – ядро; 2 – ядерце; 3 – вакуолі; 4 – клітинна стінка рослинної клітини первинної будови; 5 – лізосома (лінія 2 мкм); *б* – Утворення гігантської вакуолі в клітині: 1 – ядро; 2 – ядерце; 3 – центральна вакуоля; 4 - злиття малих вакуолей з центральною; 5 – протопласт рослинної клітини щільно притиснутий до її клітинної стінки (лінія 3 мкм); *в* – стадія конденсації ядерного матеріалу та фрагментація цитоплазми клітини на окремі електронно-прозорі везикули: 1 – ядро; 2 – окремі електронно-прозорі везикули; 3 – утворення мультивезикулярних форм (лінія 3 мкм); *з* – деконден-

сація ядерного матеріалу та формування аутофагосом: 1 – ядерна мембрана; 2 – гранулярні везикули; 3 – гонофора; 4 – сформовані аутофагосоми; 5 – смуга протопласту; 6 – клітинна стінка (лінія 3 мкм)

В збільшених фрагментах гранулярного матрикса цитоплазми продемонстровано етапи утворення двомембранних везикул (рис. 2, а, стрілка 1, 2). Збільшений вигляд двомембранної структури з гранулярним матриксом у середині (рис. 2, б, стрілка 1) та утворення двомембранної форми (стрілка 2) підкреслюють контакт їх з цитоплазматичним тяжем та клітинною стінкою (стрілки 3, 4).

На (рис. 2, в) зареєстровано факт контакту бактерій зони ризоплану з клітинною стінкою та

утворення везикул шляхом інвагінації тонопласту в люмен центральної вакуолі контактної клітини, що є доказом причетності бактерій в ініціації аутофагії в клітинах кореня ураженої рослини. На збільшеному фрагменті вакуолярної везикули продемонстровано формування внутрішніх шарів, що утворюють так зване аутофагічне тіло. Сам процес утворення аутофагосом шляхом інвагінації тонопласту можна характеризувати як тип мікроаутофагії [8, 9].

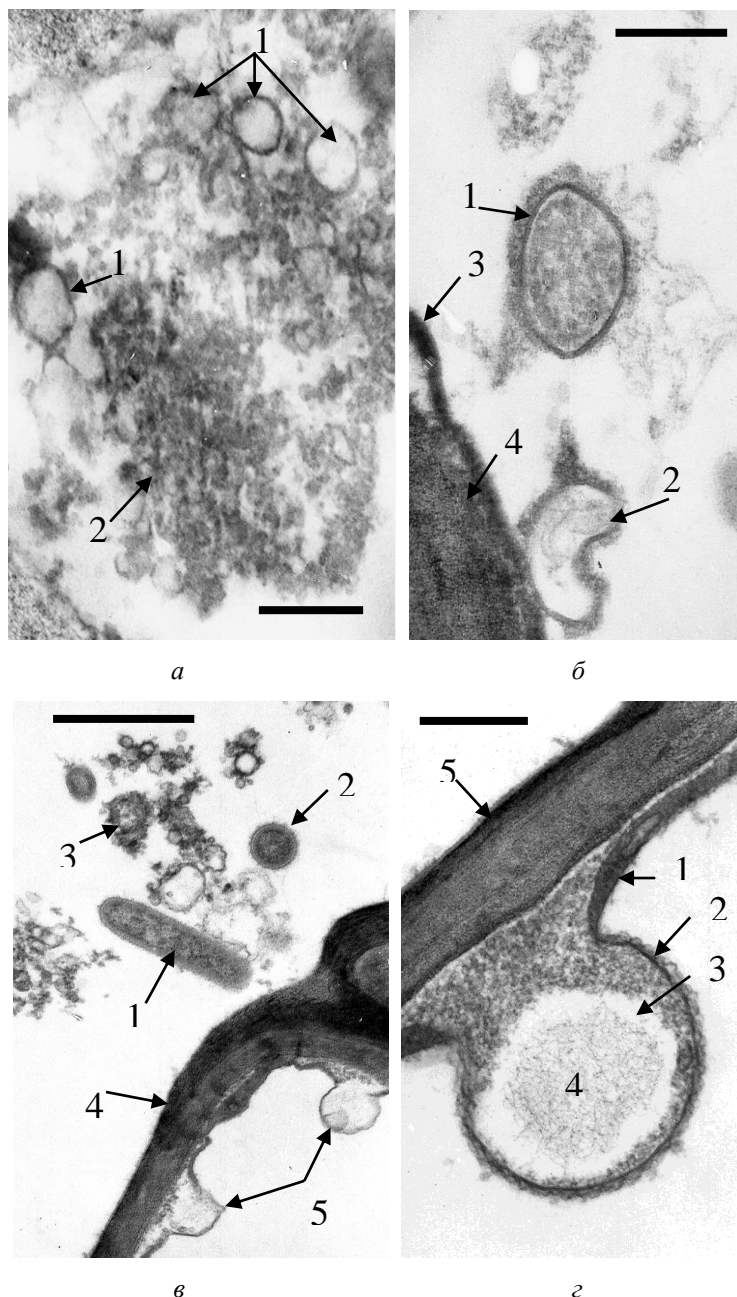


Рис. 2. Етапи формування аутофагосом у клітинах молодих корінців в зоні ризоплану: а – збільшений фрагмент формування аутофагосом у деконденсованому ядерному матриксі: 1 – сформовані двомембранні аутофагосоми; 2 – гранулярний ядерний матрикс (лінія 0,8 мкм); б – збільшений фрагмент двомембранної аутофагосоми (1); 2 – утворення двомембранної фагофори; 3 – смуга протопласту; 4 – клітинна стінка (лінія 0,6 мкм); в – факт контакту бактерій зони ризоплану з клітинною стінкою: 1 – поперечний розтин бактеріальної клітини; 2, 3 – поперечні розтини бактеріальних залишків клітин в деградованих залишках клітин кореня; 4 – клітинна стінка; 5 – утворення мікроевезикул шляхом інвагінації вакуолярної мембрани – тонопласту; з – збільшений фрагмент вакуолярної ве-

зикули: 1 - сконденсовна протоплазма клітини; 2 – стан мембранної структури везикули; 3 – електронно-прозорий шар; 4 – дрібнодисперсний матеріал центральної зони везикули (лінія 0,2 мкм)

За рахунок інвагінації тонопласту процесами аутофагії локалізуються окремі та групи мітохондрій, що може свідчити про селективний тип аутофагії - мітофагії [13, 14]. Електронно-щільний ланцюг, що бере участь в інвагінації, утворений гранулярними залишками продуктів метаболізму, сконденсованих на тонопласті (рис. 3, а, стрілки 1-3). Контакт аутофагосоми з лізосомою, зміна електронної щільності в середині можна віднести до морфологічного типу - аутофаголізосоми

(рис. 3, б, стрілка1). Відбувається деградація її нутроців, оскільки вони містять в собі гідролітичні ферменти [4, 10, 11]. Кінцевим етапом деградації протопласту рослинної клітини, що відбувалася шляхом інвагінації тонопласту та аутофагії, є заповнення везикулами та аутофагосомами всього простору центральної вакуолі. В цьому випадку центральна вакуоль уражених клітин кореня черешні виконує роль центральної лізосоми (рис. 3, з).

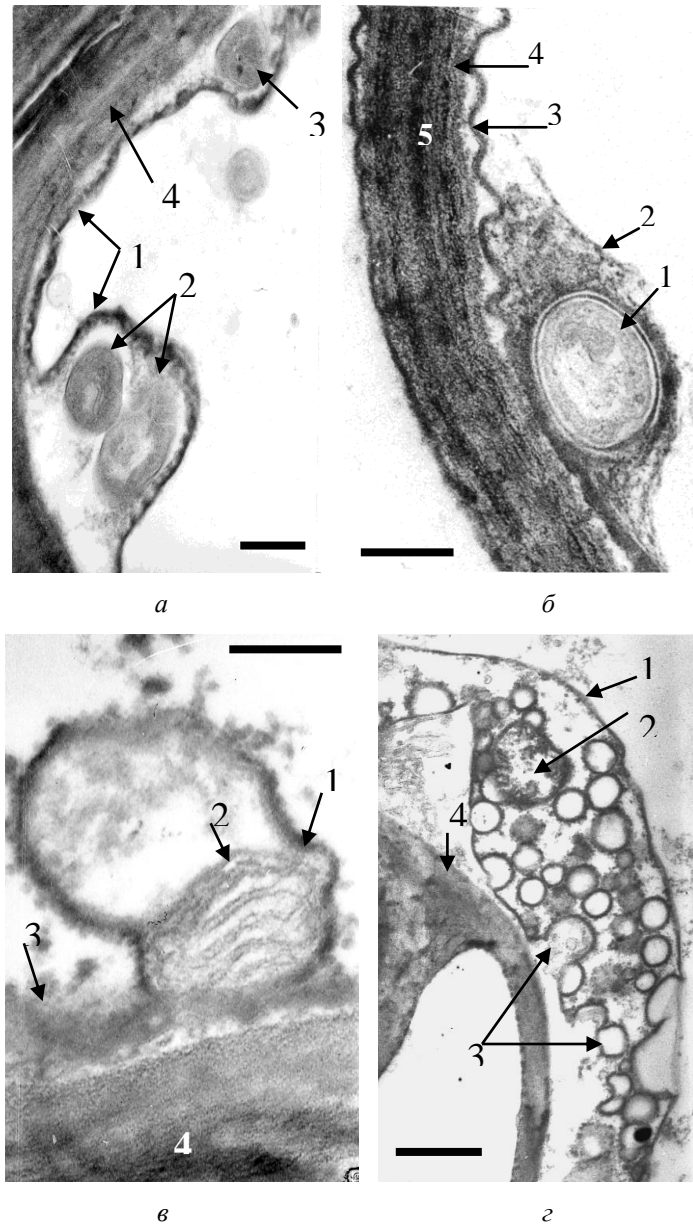


Рис. 3. Етапи формування аутофагосом за рахунок вакуолярної мембрани: а – різні форми інвагінації тонопласту в бік нутроців вакуолі: 1 – електронно-щільний цитоплазматичний ланцюг; 2 – дві мітохондрії, охоплені щільним ланцюгом в бік центральної вакуолі; 3 – окрема органела у фазі аутофагії (лінія 1.0 мкм); б – Сформована аутофагосома у вакуолярному просторі: 1 – аутофагосома; 2 – залишки гранулярної цитоплазми; 3 – вакуолярна мембрана; 4 – гранулярна цитоплазма; 5 – клітинна стінка (лінія 0.8 мкм); в – Етап формування аутофаголізосоми: 1 – до аутофагосоми щільно притиснена лізосома; 2 – деструкція крист мітохондрії; 3 – залишки цитоплазми; 4 – клітинна стінка (лінія 0.6 мкм); з – кінцевий етап знищення протопласта клітини шляхом інвагінації вакуолярної мембрани та аутофагією. Везикули заповнюють весь простір центральної вакуолі ураженої клітини кореня: 1 – вакуолярна мембрана; 2 – гранулярні залишки ядра; 3 – кінцеві фази процесу інвагінації; 4 – клітинна стінка (лінія 3.0 мкм)

Отримані нами дані підтверджують дослідження групи авторів про вирішальну роль вакуолі в літичних процесах у рослинній клітині і за аналогією з лізосомами у тваринних клітинах пропонуємо виділити поряд з некротичною смертю окремих типів клітинної смерті – «вакуолярну клітинну смерть». Також отримані дані про остаточну роль вакуолі в аутофагії підтверджують консервативний механізм деградації клітинного вмісту для того, щоб переробити поживні речовини або зруйнувати пошкоджені чи токсичні матеріали. Це відбувається за рахунок поглинання цитоплазматичних компонентів до вакуолі, де вони розкладаються за рахунок вакуолярних гідролаз [4, 10].

6. Висновки

1. В результаті електронномікроскопічних досліджень визначено етапи деградації протопласту клітин та утворення аутофагосом в природно інфікованих рослинах бактеріями опіку листків черешні.

2. За аналогією з апоптозом у тваринних клітинах кореневої системи черешні відбувається: виражена гіпервакуолізація центральної вакуолі, конденсація хроматину ядра з наступним його розпадом і утворення в його фрагментах електронно-прозорих везикул та електронно-щільних мультивезикулярних форм; деконденсація ядерного матеріалу і утворення в його матриксі одномембранних гранулярних везикул та двомембранних аутофагосом за рахунок чашовидних фагофор. Наступним етапом деградації протопласту є локалізація частин цитозолу або його окремих фрагментів шляхом інвагінації тонопласту в середину центральної вакуолі, також визначено місця остаточної деградації цитозолу – в середині аутофагосом, аутофаголізосом та поглинутих вакуолями таких форм, де присутні вакуолярні гідролази.

3. Отримані дані будуть корисними при діагностиці бактеріальних форм хвороби на деревах черешні та інших кісточкових культур.

Література

1. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [Text] / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiological Reviews*. – 2007. – Vol. 87, Issue 1. – P. 99–163. doi: 10.1152/physrev.00013.2006

2. Kerr, J. F. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics [Text] / J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // *British Journal of Cancer*. – 1972. – Vol. 26, Issue 4. – P. 239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33

3. Kroemer, G. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 [Text] / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke et. al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2008. – Vol. 16, Issue 1. – P. 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150

4. Van Doorn, W. G. Morphological classification of plant cell deaths [Text] / W. G. van Doorn, E. P. Beers, J. L. Dangel, V. E. Franklin-Tong, P. Gallois, I. Hara-Nishimura et. al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2011. – Vol. 18, Issue 8. – P. 1241–1246. doi: 10.1038/cdd.2011.3

5. Van Doorn, W. G. Ultrastructure of autophagy in plant cells [Text] / W. G. van Doorn, A. Papini // *Autophagy*. – 2013. – Vol. 9, Issue 12. – P. 1922–1936. doi: 10.4161/auto.26275

6. Bassham, D.C. Function and regulation of macroautophagy in plants [Text] / D. C. Bassham // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 2009. – Vol. 1793, Issue 9. – P. 1397–1403. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.001

7. Takatsuka, C. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: isolation of the autolysosome and its characterization [Text] / C. Takatsuka, Y. Inoue, T. Higuchi, S. Hillmer, D. G. Robinson, Y. Moriyasu // *Plant and Cell Physiology*. – 2011. – Vol. 52, Issue 12. – P. 2074–2087. doi: 10.1093/pcp/pcr137

8. Rose, T. L. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis [Text] / T. L. Rose, L. Bonneau, C. Der, D. Marty-Mazars, F. Marty // *Biology of the Cell*. – 2006. – Vol. 98, Issue 1. – P. 53–67. doi: 10.1042/bc20040516

9. Hailey, D. W. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation [Text] / D. W. Hailey, A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim, J. Lippincott-Schwartz // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, Issue 4. – P. 656–667. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009

10. Hatsugai, N. A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death [Text] / N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Apoptosis*. – 2006. – Vol. 11, Issue 6. – P. 905–911. doi: 10.1007/s10495-006-6601-1

11. Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death [Text] / I. Hara-Nishimura, N. Hatsugai, S. Nakaune, M. Kuroyanagi, M. Nishimura // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – Vol. 8, Issue 4. – P. 404–408. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.016

12. Hatsugai, N. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death [Text] / N. Hatsugai // *Science*. – 2004. – Vol. 305, Issue 5685. – P. 855–858. doi: 10.1126/science.1099859

13. Noda, N. N. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy [Text] / N. N. Noda, H. Kumeta, H. Nakatogawa, K. Satoo, W. Adachi, J. Ishii et. al. // *Genes to Cells*. – 2008. – Vol. 13, Issue 12. – P. 1211–1218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x

14. Kissova, I. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria [Text] / I. Kissova, M. Deffieu, S. Manon, N. Camougrand // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, Issue 37. – P. 39068–39074. doi: 10.1074/jbc.m406960200

15. Mitou, G. Techniques to Study Autophagy in Plant [Text] / G. Mitou, H. Budak, D. Gozuacik // *International Journal of Plant Genomics*. – 2009. – Vol. 2009. – P. 1–14. doi: 10.1155/2009/451357

16. Galluzzi, L. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [Text] / L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny et. al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2011. – Vol. 19, Issue 1. – P. 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96

17. Гвоздяк, Р. И. Изучение возбудителя ожога листьев черешни [Текст] / Р. И. Гвоздяк, С. И. Шевченко, Ю. П. Садовский // *Микробиол. журн.* – 1990. – Т. 52, № 2. – С. 70–77.

18. Шевченко, С. І. Біологічні властивості бактерій опіку листків черешні [Текст] / С. І. Шевченко // *Вісник ЗДУ*. – 2002. – № 2. – С. 178–187.

References

1. Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87 (1), 99–163. doi: 10.1152/physrev.00013.2006

2. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4), 239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33

3. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. et al. (2008). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16 (1), 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150
4. Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I. et al. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18 (8), 1241–1246. doi: 10.1038/cdd.2011.3
5. Van Doorn, W. G., Papini, A. (2013). Ultrastructure of autophagy in plant cells. *Autophagy*, 9 (12), 1922–1936. doi: 10.4161/auto.26275
6. Bassham, D. C. (2009). Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1793 (9), 1397–1403. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.001
7. Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D. G., Moriyasu, Y. (2011). Autophagy in Tobacco BY-2 Cells Cultured under Sucrose Starvation Conditions: Isolation of the Autolysosome and its Characterization. *Plant and Cell Physiology*, 52 (12), 2074–2087. doi: 10.1093/pcp/pcr137
8. Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., Marty, F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biology of the Cell*, 98 (1), 53–67. doi: 10.1042/bc20040516
9. Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*, 141 (4), 656–667. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009
10. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis*, 11 (6), 905–911. doi: 10.1007/s10495-006-6601-1
11. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. (2005). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (4), 404–408. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.016
12. Hatsugai, N. (2004). A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death. *Science*, 305 (5685), 855–858. doi: 10.1126/science.1099859
13. Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J. et al. (2008). Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*, 13 (12), 1211–1218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x
14. Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., Camougrand, N. (2004). Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (37), 39068–39074. doi: 10.1074/jbc.m406960200
15. Mitou, G., Budak, H., Gozuacik, D. (2009). Techniques to Study Autophagy in Plants. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 1–14. doi: 10.1155/2009/451357
16. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V. et al. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
17. Gvozdzjak, R. I., Shevchenko, S. I., Sadovskij, Ju. P. (1990). Izuchenie vzbuditelja ozhoga list'ev chershni. *Mikrobiol. zhurn.*, 52 (2), 70–77.
18. Shevchenko, S. I. (2002). Biologichni vlastyvoli bakterij opiku lystkiv chershni. *Visnyk ZDU*, 2, 178–187.

*Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Станішевська Т. І.
Дата надходження рукопису 12.07.2016*

Шевченко Сергій Іванович, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра анатомії і фізіології людини і тварин, Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького, вул. Леніна, 20, м. Мелітополь, Україна, 72312
Е-пошта: Dr.shev2@yandex.ua

Аносов Іван Павлович, доктор педагогічних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра анатомії і фізіології людини і тварин, Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького, вул. Леніна, 20, м. Мелітополь, Україна, 72312
Е-пошта: Dr.shev2@yandex.ua