

УДК 57.012.4:581.43:582.683.2:537.533.35

С.М. РОМАНЧУК

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: svet-romanчук@yandex.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРА СТАТОЦИТІВ ТА КЛІТИН ДИСТАЛЬНОЇ ЗОНИ РОЗТЯГУ В *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА УМОВ КЛІНОСТАТУВАННЯ



Представлено результати електронно-мікроскопічних досліджень корневих апексів три-, п'яти- та семи-добових проростків *Arabidopsis thaliana*, які росли в умовах стаціонарного контролю та клінонотування. Показано як подібність до контролю, так і відмінність в ультраструктурі статоцитів та клітин дистальної зони розтягу в умовах клінонотування. Вперше встановлено чутливість ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, які містять фермент β -глюкозидазу, до впливу симульованої мікрогравітації, що проявилась у збільшенні кількості та площі ЕР-тілець на зріз клітини та варіабельності їх форми. Ступінь цих змін корелював з тривалістю клінонотування. На основі отриманих даних припускається захисна роль ЕР-тілець в адаптації рослин до мікрогравітації.

© С.М. РОМАНЧУК, 2010

Вступ. У дослідженнях структурно-функціонального стану клітин кореня в умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті та симульованої гравітації (клінонотування) основна увага приділялася клітинам кореневого чохла як гравірецепторному апарату кореня [1, 2]. Поза увагою лишалися клітини ростових зон власне кореня, таких як дистальна зона розтягу (ДЗР), яка розташовується безпосередньо за апікальною меристемою до центральної зони розтягу [3, 4] та має специфічну чутливість до впливу різних зовнішніх та внутрішніх сигналів, зокрема гравітації, сольового та водного стресу, етилену, алюмінію, фітогормонів, позаклітинного кальцію [5–8]. Клітини ДЗР збільшуються в розмірі за рахунок об'єму цитоплазми. Як відомо з літератури [1], генетично детерміноване диференціювання клітин в умовах клінонотування здійснюється так само, як і за стаціонарних умов, хоча відмінності, що спостерігаються в темпах росту та ультраструктурі клітин, свідчать про зміни в їх метаболізмі. Є припущення, що зміни метаболізму мають адаптивний характер та забезпечують життєдіяльність клітин в умовах клінонотування та мікрогравітації. Тому ми мали на меті дослідити ультраструктуру статоцитів та клітин ДЗР у *Arabidopsis thaliana* в стаціонарних умовах і при клінонотуванні, звертаючи особливу увагу на топографію ендоплазматичного ретикулуму та тільця, похідні гранулярного ЕР (ГЕР) (ЕР-тілець), які притаманні видам родини *Brassicaceae* [9, 10]. В останні роки в ЕР-тілцях виявлено фермент β -глюкозидазу, який виконує захисну функцію в організмі рослини [11, 12].

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження обрано апекси головного кореня три-, п'яти- та семи-добових проростків *A. thaliana*. Насіння, попередньо стерилізоване «білизною» та 70°-ним спиртом, поміщали в цукрові стаканчики висотою 9 см на агаризоване мінеральне середовище MS' [13], частину яких переносили на повільний горизонтальний клінонот (2 об./хв), іншу залишали у вертикальному положенні. Проростки росли в темряві при температурі 23 ± 1 °C та вологості 67 ± 1 %. Апекси головних коренів фіксували 2,5%-ним глутаровим альдегідом на 0,1 М какодилатному буфері (pH 7,3) з постфіксацією 1%-ним розчином OsO₄ на тому ж буфері. Дегідратацію зразків у серії спиртів висхідної концентрації та пропілен оксиді, а також насичення зразків сумішшю епоксидних смол вико-

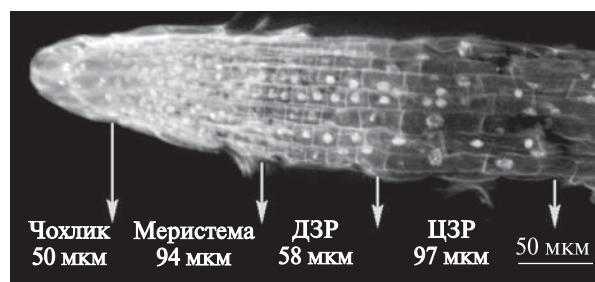


Рис. 1. Зони апекса головного кореня *A. thaliana*: ДЗР – дистальна зона розтягу, ЦЗР – центральна зона розтягу. Конфокальний мікроскоп, фарбування за Карнуа

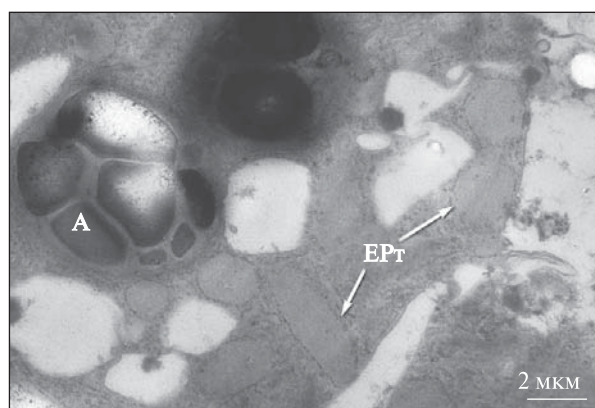


Рис. 2. Фрагмент статоциту кореня *A. thaliana*: ЕРт – ЕР-тільця, А – амілопласт

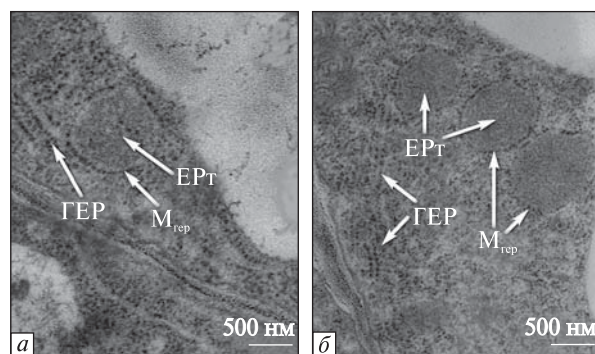


Рис. 3. ЕР-тільця та гранулярний ендоплазматичний ретикулум на зрізах клітин ДЗР семидобових проростків *A. thaliana*: ЕРт – ЕР-тільця, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, М_{гер} – мембрана ГЕР; а – контроль, б – кліностакування

нували за загальноприйнятою методикою [14]. Ультратонкі зрізи завтовшки 50–70 нм отримували на ультрамікромомі RMC MT-XL (США). Зрізи контрастували уранілацетатом та цитратом

свинцю [15] і досліджували в електронних мікроскопах JEM-1200 EX та JEM-1230 EX (Японія) при напруженні 60 кВ. Для морфометричного аналізу використовували негативні знімки клітин, сфотографовані зі збільшенням 5000×, 8000×, 15000× та 25000×. Негативи сканували за допомогою програми HP Precisionscan Pro 3.1. Отримані цифрові фотографії аналізували за допомогою програми UTHSCSA ImageTool version 3.00. Кількість структур підраховували на один зріз клітини. Вимірювали площу кожної структури та вираховували середнє значення із загальної площі структур. Експерименти проводили з трикратною повторюваністю. Для порівняльних досліджень брали по шість коренів кожного варіанту. Досліджували по чотири клітини центральної статенхіми та по чотири клітини кори ДЗР для кожного кореня. Отримані дані статистично опрацьовані за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0. Дані представлені у вигляді $M \pm m$ (де M – середнє арифметичне, m – середнє квадратичне відхилення).

Результати дослідження та їх обговорення. Показано, що ультраструктура статоцитів та клітин ДЗР коренів *A. thaliana* в контролі є подібною для такого типу клітин [16, 17]. Кореневий чохлак три-, п'яти- та семидобових проростків має однакову будову та в поздовжньому перерізі становить ~ 50 мкм (рис. 1).

Колумела зазвичай представлена шістьма рядами клітин. Перші два ряди складають зону меристематичних клітин, третій ряд – зона диференціюючих статоцитів, четвертий ряд – зона центральної статенхіми, п'ятий та шостий ряди – зона секретуючих клітин. Оскільки ультраструктура клітин кореня п'ятидобових проростків подібна до тридобових, ми описуємо їх разом. В стаціонарних умовах статоцити кореневого чохлака мають видовжену форму. Вони характеризуються полярністю: ядро, яке має лопатоподібну форму, знаходиться в проксимальній частині клітини, та амілопласти з щільно упакованими крохмальними зернами – в дистальній. Мітохондрії та диктіосоми розміщуються відносно рівномірно по всій цитоплазмі. ГЕР представлений невеликими цистернами та каналами, вміст яких заповнений тонкофібрилярною речовиною. В зоні профілів ГЕР зосереджені ЕР-тільця (рис. 2) за розміром $0,12 \pm 0,04 \text{ мкм}^2$ у тридобових та $0,14 \pm$

$\pm 0,03 \text{ мкм}^2$ у семидобових проростків, які оточені мембранами ГЕР (рис. 3).

У статоцитах тридобових проростків ЕР-тільца зустрічаються в кількості 1–2 штуки та мають загальну площу на зріз клітини $0,16 \pm 0,06 \text{ мкм}^2$, у семидобових – 1–3 штуки та $0,19 \pm 0,05 \text{ мкм}^2$ відповідно (табл. 1 та 2).

Зона розтягу власне кореня до центрального циліндра складається з трьох шарів клітин – епідермісу, одного шару кори та ендодерми. В шарі кори ДЗР до центральної зони розтягу налічується чотири клітини. Дві клітини на початку ДЗР мають ядро округлої форми, яке знаходиться в центрі клітини, в 3-й та 4-й клітині воно набуває лопатоподібної форми та поступово зміщується, як це видно з рис. 1. Мітохондрії варіюють за формою та розмірами, а також за кількістю та топографією крист. Значно розгалужені видовжені цистерни ГЕР простягаються вздовж клітинної стінки та тонопласта. ЕР-тільца (рис. 4) мають середній розмір $0,24 \pm 0,08 \text{ мкм}^2$ у тридобових та $0,25 \pm 0,11 \text{ мкм}^2$ у семидобових

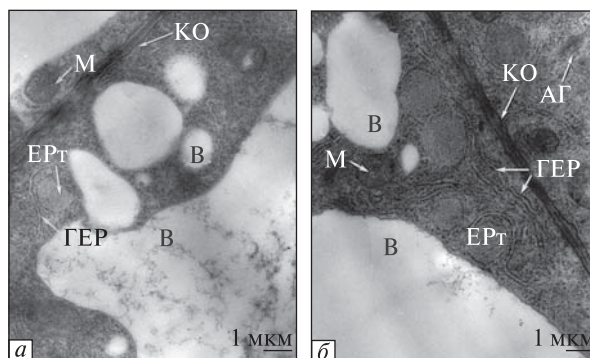


Рис. 4. Фрагменти клітин ДЗР тридобових проростків *A. thaliana*: ЕРт – ЕР-тільца, ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, М – мітохондрія, В – вакуоль, АГ – апарат Гольджі, КО – клітинна оболонка; а – контроль, б – кліностакування

Таблиця 1
Середня кількість ЕР-тілець на зрізі клітини в статоцитах та ДЗР кореня *A. thaliana* (шт., $M \pm m$; $n = 24$)

Клітини	Контроль	Дослід
Корені тридобових проростків		
Статоцити	$1,40 \pm 0,12^*$	$2,2 \pm 0,61^*$
ДЗР	$2,37 \pm 0,77^*$	$3,45 \pm 0,84^*$
Корені семидобових проростків		
Статоцити	$1,50 \pm 0,05^*$	$2,87 \pm 0,13^*$
ДЗР	$2,62 \pm 0,80^*$	$3,66 \pm 0,87^*$

* Достовірні зміни між контролем і дослідом ($< 0,05$).

Таблиця 2
Середній розмір ЕР-тілець на зрізі клітини в статоцитах та ДЗР кореня *A. thaliana* (мкм^2 , $M \pm m$; $n = 24$)

Клітини	Контроль	Дослід
Корені тридобових проростків		
Статоцити	$0,12 \pm 0,04^*$	$0,16 \pm 0,02^*$
ДЗР	$0,24 \pm 0,08^*$	$0,29 \pm 0,07^*$
Корені семидобових проростків		
Статоцити	$0,14 \pm 0,03^*$	$0,15 \pm 0,02^*$
ДЗР	$0,25 \pm 0,11^*$	$0,35 \pm 0,14^*$

* Див. табл. 1.

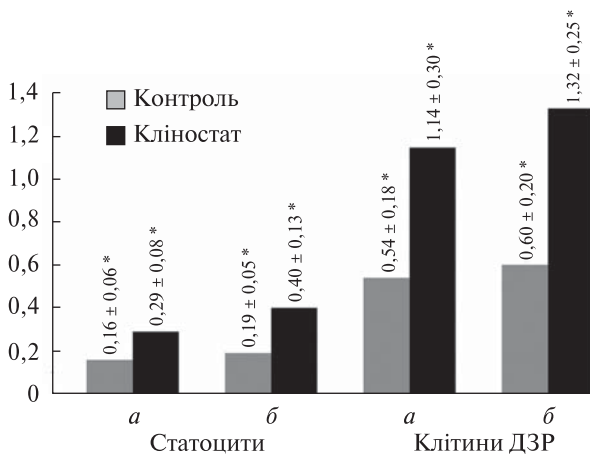


Рис. 5. Загальна площа ЕР-тілець (по вертикалі, мкм^2) на зрізі клітини коренів проростків *A. thaliana*: а – тридобові корені; б – семидобові корені. *Достовірні зміни між контролем і дослідом ($< 0,05$)

вих проростків, загальна площа на зріз клітини при цьому становить $0,54 \pm 0,18$ та $0,60 \pm 0,20 \text{ мкм}^2$ відповідно (рис. 5).

Пластиди розташовуються навколо ядра, нечисленні та гетерогенні за формою. Апарат Гольджі знаходиться в активному стані, про що свідчать продукування диктіосомами численних везикул. Дрібні вакуолі, похідні апарату Гольджі та ГЕР, поступово збільшуються в об'ємі та зливаються, утворюючи центральну вакуоль. Агранулярний ендоплазматичний ретикулум на зрізах представлений різними за формою та розмірами розширеними цистернами і везикулами.

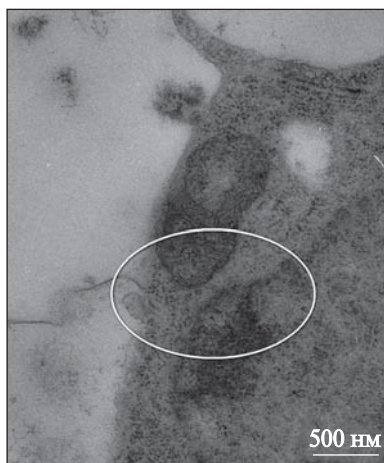


Рис. 6. Перехід від гранулярного ендоплазматичного ретикулуму до ЕР-тілця на зрізі клітини *A. thaliana*

При постійному горизонтальному обертанні на кліностації ультраструктура статоцитів та клітин ДЗР у загальних рисах залишається такою, як у контролі [17–19], проте нами виявлено і певні відмінності. За умов всіх строків кліностакування в статоцитах ядро займає, як і в контролі, проксимальне положення, аміопласти-статоліти не осідають в дистальній частині клітин. Зафіксовано зріст кількості профілів цистерн ГЕР на зрізі клітин від 1–3 у контролі до 5–10 у досліді. Вони порівняно з контролем є більш довгими та розміщуються паралельно одна одній та ядерній оболонці. Загальна площа ЕР-тілець на зрізі клітини у коренях тридодових рослин зростає у 1,8 рази і становить $0,29 \pm 0,008$ мкм², а семидобових рослин – у 2 рази і становить $0,40 \pm 0,13$ мкм² (рис. 5).

При цьому середня площа окремої органели у тридодових дещо збільшується до $0,16 \pm 0,02$ мкм², у семидобових подібна до контролю та має $0,15 \pm 0,02$ мкм² (табл. 2), тому зростання загальної площі відбувається за рахунок збільшення кількості ЕР-тілець (табл. 1).

У клітинах ДЗР коренів ГЕР зосереджений в просторі між мембраною клітини та тонопластом. Він представлений довгими тяжами розширених цистерн, які мають здатність до галузнення. Візуально можна спостерігати збільшення профілей ГЕР порівняно з контролем (рис. 4). На деяких зрізах видно, що ЕР-тілця являють собою локальні розширення ГЕР (рис. 6).

Загальна площа ЕР-тілець на зрізі клітини у коренях рослин всіх строків порівняно з контролем зростає у понад два рази: у тридодових вона становить $1,14 \pm 0,30$ мкм², у семидобових – $1,32 \pm 0,25$ мкм² (рис. 5). Таке збільшення пов'язане зі зростанням кількості та розмірів ЕР-тілець. Нами виявлено гетерогенність ЕР-тілець, особливо вона притаманна семидобовим кореням. Найменші ЕР-тілця мають середній розмір площею від 0,7 до 0,14 мкм². Окремі ЕР-тілця досягають $\sim 0,49$ мкм² та на зрізах вони мають дещо видовжену форму.

Як відомо з літературних джерел, ЕР-тілця присутні також в клітинах сім'ядоль і гіпокотилів проростків різних видів родини *Brassicaceae* [20–22]. Показано, що ЕР-тілця характеризуються високою лабільністю і чутливістю до поранення органів, механічного тиску, впливу токсичних речовин, ураження патогенами та поїдання комахами [23–25]. Під час дії таких чинників кількість та розмір ЕР-тілець збільшується [11]. Виявлення в ЕР-тілцях ферменту β -глюкозидази обумовило підвищення інтересу до утворення та ролі цих структур в клітині [26, 27]. β -Глюкозидаза – це загальна назва класу гідролаз (КФ 3.2.1.21), які каталізують гідроліз β -глюкозидного зв'язку в природних і синтетичних β -глюкозидазах та олігосахаридах [28–30]. Оскільки вважається, що головним компонентом ЕР-тілець є фермент β -глюкозидаза, ми припускаємо, що ЕР-тілця є своєрідним депо для зберігання цього білка до моменту дії стресового чинника.

Зміни у кількості та розмірах ЕР-тілець в умовах кліностакування демонструють їх чутливість до дії симульованої мікрогравітації. Збільшення майже в два рази середньої площі ЕР-тілець на зрізі клітини та їх варіабельності за формою і розмірами в клітинах кореня при кліноставанні можна розглядати як прояв адаптивної реакції клітин на дію несприятливого чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах.

Висновки. Вперше виявлено вплив кліностакування на динаміку утворення ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, в статоцитах та клітинах дистальної зони розтягу коренів проростків *Arabidopsis thaliana*. Встановлено збільшення загальної площі ЕР-тілець на зрізі клітини з тривалістю клі-

ностатування. Припускається, що зростання обсягу ЕР-тілець, які містять фермент β -глюкозидазу, є адаптивною реакцією клітин на дію симульованої гравітації.

S.M. Romanchuk

ULTRASTRUCTURE STATOCYTES AND CELLS OF DISTAL ELONGATION ZONE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER CLINOROTATION

Results of the electron-microscopic investigation of root apices of *Arabidopsis thaliana* 3-, 5- and 7-days-old seedlings grown in the stationary conditions and under clinorotation are presented. It was shown the similarity in the root apex cell ultrastructure in control and under clinorotation. At the same time there were some differences in the ultrastructure of statocytes and the distal elongation zone under clinorotation. For the first time the sensitivity of ER-bodies, which are derivatives of GER and contain β -glucosidase, to the influence of simulated microgravity was demonstrated by increased quantity and area of ER-bodies at the cell section as well as by higher variability of their form under clinorotation. A degree of these changes correlated with the duration of clinorotation. On the basis of experimental data a protective role of ER-bodies in adaptation of plants to microgravity is supposed.

C.M. Романчук

УЛЬТРАСТРУКТУРА СТАТОЦИТОВ И КЛЕТОК ДИСТАЛЬНОЙ ЗОНЫ РАСТЯЖЕНИЯ У *ARABIDOPSIS THALIANA* В УСЛОВИЯХ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ

Представлены результаты электронно-микроскопического исследования корневых апексов трех-, пяти- и семисуточных проростков *Arabidopsis thaliana*, которые росли в условиях стационарного контроля и клинотатирования. Показано как сходство с контролем, так и различия в ультроструктуре статоцитов и клеток дистальной зоны растяжения в условиях клинотатирования. Впервые установлена чувствительность ЭР-телец, производных ГЭР и содержащих фермент β -глюкозидазу, к влиянию симулированной микрогравитации, что проявлялось в увеличении количества и площади ЭР-телец на срез клетки и вариабельности их формы. Степень этих изменений коррелировала с длительностью клинотатирования. На основании полученных данных предполагается защитная роль ЭР-телец в адаптации растений к микрогравитации.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кордюм Е.Л., Мартын Г.И., Овчаренко Ю.В. Рост и дифференцировка клеток колумеллы корневого чехлика и собственно корня в стационарных условиях и при клинотатировании // Цитология и генетика. — 2008. — 42, № 1. — С. 3–12.

2. Wendt M., Sievers A. The polarity of statocytes and the gravisensitivity of roots are dependent on the concentration of calcium in statocytes // Plant Cell Physiol. — 1989. — 30. — P. 929–932.

3. Ishikawa H., Evans M.L. Specialized zone of development of roots // Plant Physiol. — 1995. — 109. — P. 725–727.

4. Baluska F., Kubica S., Hauskrecht M. Postmitotic «isodiametric» cell growth in the maize root apex // Planta. — 1990. — 181. — P. 269–274.

5. Ishikawa H., Evans M.L. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity // Plant Physiol. — 1993. — 102. — P. 1203–1210.

6. Bjrkman T., Cleland R.E. The role of extracellular free calcium gradients in gravitropic signaling in maize roots // Planta. — 1991. — 185. — P. 379–384.

7. Baluska F., Barlow P.W., Kubica S. Importance of postmitotic isodiametric growth (PIG) region for growth and developmental of roots // Plant Soil. — 1994. — 167. — P. 31–41.

8. Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W. A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: cytoskeletal and developmental implications // J. Plant Growth Regul. — 2001. — 20. — P. 170–181.

9. Bonnett H.T.J., Newcomb E.H. Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish // J. Cell Biol. — 1965. — 27. — P. 423–432.

10. Bones A.M., Evjen K., Iversen T.-H. Characterization and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in intact plants, protoplasts, and calli of *Brassicaceae* // Isr. J. Bot. — 1989. — 38. — P. 177–192.

11. Matsushima R., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis* // Plant J. — 2003. — 33. — P. 493–502.

12. Ogasawara K., Yamada K., Christeller J.T., Kondo M., Hatsugai N., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases // Plant Cell Physiol. — 2009. — 50, № 3. — P. 480–488.

13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15, № 13. — P. 473–497.

14. Weigel D., Glazebrook J. *Arabidopsis: a laboratory manual*. — New York Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. — P. 354.

15. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17, № 1. — P. 169–170.

16. Moore R., Fondren W.M., McClelen C.E., Wang C.L. Influence of microgravity on cellular differentiation in root caps of *Zea mays* // Amer. J. Bot. — 1987. — 74. — P. 1006–1062.

17. Тарасенко В.А. Ультроструктура клеток колумеллы в корневом чехлике арабидопсиса в условиях клино-

- статирования и микрогравитации : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1985. — 35 с.
18. *Kordyum E.L.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — **171**. — P. 1–72.
 19. *Kordyum E.L.* Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostatic experiments // *Adv. Space Res.* — 1994. — **14**, № 8. — P. 77–85.
 20. *Iversen T.-H.* The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the *Cruciferae* // *Protoplasma.* — 1970. — **71**. — P. 467–477.
 21. *Behnke H.-D., Eschlbeck G.* Dilated cisternae in *Capparales* — an attempt towards the characterization of a specific endoplasmic reticulum // *Protoplasma.* — 1978. — **97**. — P. 351–363.
 22. *Matsushima R., Hayashi Y., Kondo M., Shimada T., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**. — P. 1807–1814.
 23. *Hayashi Y., Yamada K., Shimada T., Matsushima R., Nishizawa N.K., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — **42**. — P. 894–899.
 24. *Nagano A.J., Fukao Y., Fujiwara M., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* — 2008. — **49**. — P. 969–980.
 25. *Atsushi J., Nagano A.J., Maekawa A., Nakano R.T., Miyahara M., Higaki T., Kutsuna N., Hasezawa S., Hara-Nishimura I.* Quantitative analysis of ER body morphology in an *Arabidopsis* mutant // *Plant Cell Physiol.* — 2009. — **50**, № 12. — P. 2015–2022.
 26. *Matsushima R., Fukao Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I.* NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure the ER body // *Plant Cell.* — 2004. — **16**. — P. 1536–1549.
 27. *Nitz I., Berkefeld H., Puzio P.S., Grundler F.M.* Pyk 10 a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* — 2001. — **161**. — P. 337–346.
 28. *Rask L., Andreasson E., Ekblom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J.* Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae* // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **42**. — P. 93–113.
 29. *Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S., Schulze-Lefert P.* Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis* // *Science.* — 2005. — **310**. — P. 1180–1183.
 30. *Xu Z., Escamilla-Trevino L., Zeng L., Lalgondar M., Bevan D., Winkel B., Mohamed A., Cheng C.L., Shih M.C., Poulton J., Esen A.* Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1 // *Plant Mol. Biol.* — 2004. — **55**. — P. 343–367.

Надійшла 09.02.10