

УДК 581

СТИМУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЙ КЛЕТОК ПОКОЯЩЕГОСЯ ЦЕНТРА В ОТРЕЗАННЫХ КОНЧИКАХ КОРНЕЙ

© 2011 г. В. Б. Иванов, Е. И. Быстрова, М. М. Месенко, Л. М. Котова, А. А. Котов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

117276, Москва, ул. Ботаническая, д. 33

E-mail: ivanov_yb@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2010 г.

Окончательный вариант получен 11.02.2011 г.

В статье описана активация делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках корней, выдерживаемых на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Это явление наблюдалось у корней 8 из 14 изученных сортов кукурузы и не наблюдалось в отрезках корней арабидопсиса. Характер распределения делений в меристеме существенно варьирует в корнях разных проростков в одной и той же партии проростков и в корнях проростков разных сортов кукурузы. Открывание меристемы наблюдалось при отрезании как маленьких кусочков корней (до 3 мм), так и целых корней. ИУК (10^{-6} – 10^{-8} М) и сахароза (2%) не предотвращали открывание меристемы. Полученные данные показывают, что покоящееся состояние клеток покоящегося центра поддерживается системой межклеточных и межорганных взаимодействий.

Ключевые слова: корень, меристема, покоящийся центр, ствольные клетки.

Растущая часть корня состоит из меристемы, где сосредоточены деления клеток, и зоны растяжения, где они за счет быстрого роста достигают окончательной длины. Небольшая апикальная группа клеток меристемы резко отличается от остальных клеток. Они делятся примерно в 8–10 раз реже большинства клеток, слабо базофильны, у них мелкие ядрышки, замедлены синтезы белков и РНК. По этим признакам эта группа клеток была названа Clowes (1956) “покоящимся центром”. Он найден во всех корнях, за исключением корней с очень коротким периодом роста, например, некоторых кактусов (Rodriguez-Rodriguez et al., 2003). Изучению покоящегося центра посвящена большая литература, которую невозможно даже кратко рассмотреть в рамках этой статьи. Однако до сих пор неясно, какое функциональное значение имеют клетки покоящегося центра и какие механизмы определяют его образование на ранних стадиях развития корня и дальнейшее поддержание.

Одним из подходов к решению этой проблемы является анализ изменения клеток покоящегося центра и окружающих его клеток при разных воздействиях. Clowes (1963) показал, что после радиоактивного облучения корней в не слишком высоких дозах клетки покоящегося центра начинают активно делиться, тогда как деления большинства в норме активно делящихся клеток меристемы блокируются. Деления клеток покояще-

гося центра приводят к восстановлению меристемы и возобновлению нормального роста корня. Аналогичное явление наблюдалось после выдерживания корней проростков кукурузы при низких положительных температурах (Clowes, Stewart, 1967; Barlow, Rathfelder, 1985). После переноса корней в нормальные условия деления клеток покоящегося центра активизировались, а деления большинства меристематических клеток тормозились. В наших опытах (Нестерова, 1989; Кожевникова и др., 2007) мы наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра при выдерживании корней на растворах ряда токсикантов, например $Pb(NO_3)_2$, которая приводила к образованию нового чехлика взамен слушающегося после погружения корней в раствор токсиканта.

В ходе роста корней в нормальных условиях или при повышенной температуре также описаны случаи активации делений клеток покоящегося центра, что приводило к изменению структуры меристемы из закрытой в открытую (Clowes, Wadekar, 1989). Эти два типа меристемы отличаются наличием общих или отдельных инициальных клеток у разных тканей. Тип меристемы является одним из систематических признаков (Heimsch, Seago, 2008).

В этой статье описывается активация делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках главных корней проростков ряда сортов кукурузы, помещенных в разные условия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась с проростками кукурузы и арабидопсиса. Были изучены 13 сортов и гибридов кукурузы: Интеркрас-375, полученный из ГНУ Краснодарский НИИСХ Россельхозакадемии, и Харьковский-295 МВ, Кабардино-балкарская 38/12, Институтская, Сахарная белая K9615 и K23265, Сахарная желтая K20589 и K10828, Зубовидная белая K451 и K21518, Зубовидная желтая K18968 и 23215, Б272, Аргентина КОС, полученными из ВИР им. Н.И. Вавилова (номера указаны по коллекции ВИР). Семена трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* были получены от профессора Ben Scheres (Утрехтский университет, Голландия). Они содержали химерный ген, в котором промотор гена *WOX-5* слит с репортерным геном *GFP*. Ген *WOX-5* экспрессируется в клетках покоящегося центра и является одним из генов, активность которого необходима для формирования и поддержания покоящегося центра (Sarkar et al., 2007). В использованной конструкции экспрессия этого гена определялась по флуоресценции белка GFP, что позволяло выявлять места экспрессии гена *WOX-5*, которая наблюдается только в клетках покоящегося центра. Таким образом, по распределению флуоресценции можно выявить изменение размеров покоящегося центра и числа клеток, входящих в его состав.

Семена кукурузы стерилизовали 1% формалином в течение 20 минут и проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 27°C. У 2–3-дневных проростков отрезали в большинстве опытов 1-см кончики корней; в ряде опытов – целые корни или кончики длиной 5 и 3 миллиметра. Отрезанные кончики помещали на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами разных соединений в дистиллированной воде. Через 24 часа кончики корней фиксировали по Бродскому (формалин–96% спирт–ледяная уксусная кислота: 10 : 3 : 1).

Фиксированные корни заключали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 10 микрон окрашивали двумя методами: 1) ШИК реакция с последующим подкрашиванием срезов 0.15% раствором проционового яркоголубого 4RS в 0.2% растворе Na₂CO₃ в течение 40 минут при комнатной температуре, 2) ШИК реакция, затем реакция Фельгена с последующим подкрашиванием 0.1% раствором алцианового синего 8GS в 3% уксусной кислоте в течение 30 минут при комнатной температуре.

Проростки арабидопсиса выращивали в конструкции типа “сэндвич” с предварительной стерилизацией семян смесью перекиси водорода и этилового спирта (1 : 1), стратификацией 72 ч при 4°C и с последующим проращиванием в течение 7 дней в фитотроне при +22°C с освещением 10–15 тыс. лк и режимом день/ночь: 16/8 часов.

У корней семидневных проростков отрезали 5-мм кончики, которые помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой на 24 часа. Затем корни фиксировали свежеприготовленным 4% формалином с последующей проводкой через 5 растворов с возрастающей концентрацией глицерина по 5 минут до 50% глицерина, а затем просветлялись по методу Malamy и Benfey (1997). Корни просматривали на флуоресцентном микроскопе Olympus CX41. Совмещение нескольких фотографий разных оптических срезов для получения большей глубины резкости производили с помощью программы HeliconFocus 3.10 или на конфокальном микроскопе Leica TSC SPE (Германия) при длине волны 405 нм.

Все опыты были повторены не менее двух раз. В таблице указано число центральных срезов корней, на которых обсуждаемое явление отчетливо может быть установлено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отрезанные кончики корней, помещенные в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу, практически прекращают рост. Их длина возрастала за 24 часа не более, чем на 2–3 мм, тогда как контрольные корни в этих условиях удлинялись на 3–40 мм. Однако в отрезанных корнях не прекращалась закладка боковых корней, примордии которых были видны уже на расстоянии 4–5 мм от кончика корня. В нормальных корнях они находятся гораздо дальше (Дубровский, Иванов, 1984). Это приближение закладок боковых корней к кончику корня обусловлено прекращением роста и наблюдалось у всех сортов. Деления клеток в основной части меристемы и в чехлике практически прекращались. В отрезанных корнях проростков сорта Интеркрас-375 делений не было уже через 12 ч. В отрезанных целиком корнях деления клеток не прекращались после 24 ч, но число их было меньше, чем в контрольных корнях.

Однако уже в первых опытах с отрезанными кончиками корней проростков кукурузы гибрида Интеркрас-375 длиной 1 см наблюдались деления клеток покоящегося центра, и в особенности самого внешнего слоя клеток, с образованием выростов, состоящих из большого числа клеток в сторону чехлика (рис. 1). У некоторых корней открывание меристемы и образование таких “выростов” в сторону чехлика наблюдалось уже через 12 ч. Степень выраженности пролиферации клеток покоящегося центра сильно варьировала в разных корнях. Аналогичное явление наблюдалось в отрезках как меньшей длины (3 и 5 мм), так и в целых корнях длиной 10–12 см, отрезанных около семени. Подобное открывание меристемы и заметное образование протуберанцев клеток из покоящегося центра в сторону чехлика не наблю-

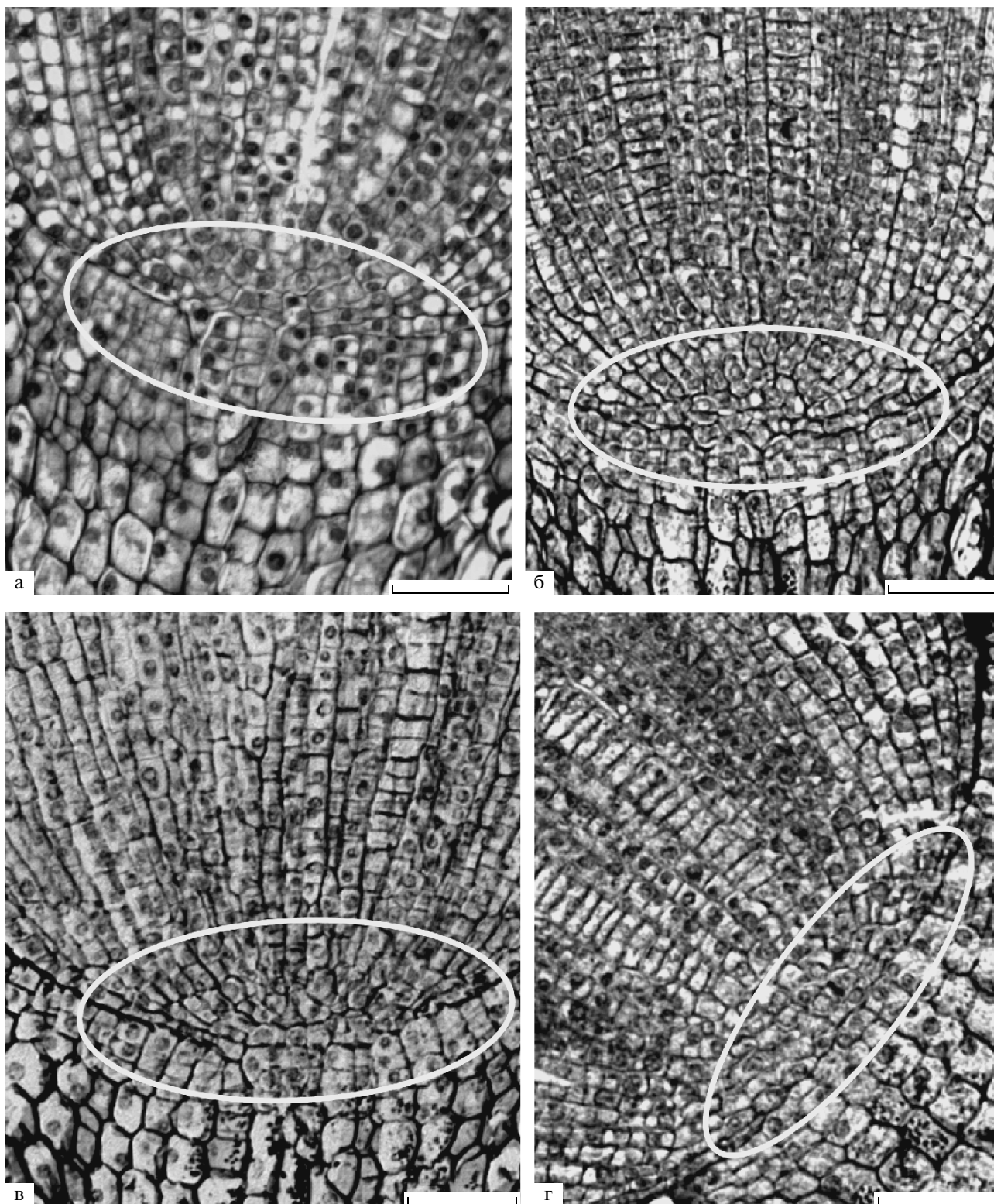
Перестройка меристемы из закрытой в открытую через 24 часа после изоляции корней (в скобках указано число корней с открытой меристемой от общего числа корней)

| Сорт кукурузы | Меристема открыта | | | Меристема закрыта практически у всех корней |
|------------------------------|---|---|------------|---|
| | Практически у всех корней | Не у всех корней | | |
| | Активация делений многих клеток покоящегося центра (образование "выростов" в сторону чехлика) | Активация делений единичных клеток покоящегося центра | | |
| Интеркрас-375 | (18 из 18) | | | |
| Харьковский 295МВ | | (6 из 13) | | |
| Сахарная белая К9615 | | (7 из 13) | | |
| Зубовидная белая К21518 | | (8 из 10) | | |
| Зубовидная желтая К18968 | | | (8 из 12) | |
| Сахарная белая К23265 | | | (4 из 5) | |
| Зубовидная белая К451 | | | (11 из 16) | |
| Институтская | | | | (19 из 21) |
| Кабардино-балкарская 38/12 | | | | (24 из 26) |
| Сахарная желтая К10828 | | | | (5 из 5) |
| Зубовидная желтая 23215.Б272 | | | | (7 из 7) |
| Аргентина КОС | | | | (11 из 11) |

далось нами у интактных корней. Чтобы проверить, происходит ли такое открывание меристемы у отрезанных кончиков корней проростков других сортов кукурузы, мы изучили корни проростков 12 сортов. Полученные данные представлены в табл. 1. Оказалось, что подобное открывание меристемы наблюдалось в большей или меньшей степени не у всех изученных сортов, а у корней проростков ряда сортов мы его не наблюдали. Степень выраженности активации делений покоящегося центра заметно варьировала в разных корнях из одной и той же партии проростков, выращенных в одной и той же кювете и после отрезания помещенных в одну и ту же чашку. В некоторых случаях наблюдались большие комплексы клеток, а в других деления небольшого числа клеток один-два раза в сторону чехлика, однако при этом четкая граница (слой клеток дерматогена) между чехликом и основным телом корня прерывалась (рис. 1). Причины такой вариабельности неясны, однако они отмечались и другими авторами, которые описывали открывание меристемы в корнях кукурузы в других случаях (например, Clowes, Wadekar, 1989). Они наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра с образованием протуберанцев в сторону чехлика у ряда корней целых проростков с возрастом, что особенно проявлялось при температуре 30°C. Аналогичное явление описано у некоторых интактных корней при более низких температурах, которое чаще наблюдалось у корней большей длины.

На корнях арабидопсиса, в которых покоящийся центр четко выявлялся по свечению *GFP*, мы не наблюдали подобного явления и размер покоящегося центра не менялся за 24 часа выдерживания изолированных кончиков корней на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри. Таким образом, в отрезанных корнях арабидопсиса не происходит активация делений клеток покоящегося центра, которая наблюдалась нами у корней ряда (но не всех) сортов кукурузы.

Таким образом, у корней проростков ряда сортов кукурузы отрезание корня и его выдерживание во влажной среде на бумаге, смоченной фильтровальной водой, вызывает активацию делений клеток покоящегося центра, что приводит к изменению структуры меристемы из закрытой в открытую. Сходные изменения наблюдались ранее у корней проростков кукурузы с возрастом особенно при выращивании корней при высоких температурах (Clowes, Wadekar, 1989) и как реакция на охлаждение корней, облучение или обработку токсикантами, о чем мы упоминали выше. "Открывание" меристемы наблюдалось Демченко и др. (2010) у отдельных контрольных и выращиваемых в растворе нитрата никеля корней проростков пшеницы. Интересно отметить, что все авторы наблюдали большое разнообразие реакции отдельных корней в одной и той же партии проростков. Эта вариация наблюдается при отрезании кончика корня на большом расстоянии от покоящегося центра или всего корня у семени. Поэтому такая вариабельность не может быть



Продольные срезы кончиков корней разных сортов кукурузы после однодневной инкубации на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри.

а – сахарная белая K9615, б – зубовидная белая K18968, в – Интеркрас-375, г – Кабардино-Балкарская 38/12. а, б, в – меристемы открываются, г – закрытая меристема. Белым овалом обведен центр меристемы, в котором видно прерывание наружного слоя клеток ризодермы производными клетками покоящегося центра, возникающими после их делений. Бар – 50 мкм.

обусловлена случайными причинами при отрезании корня.

Несомненно, что отрезание корня и прекращение притока в корень соединений является сильным стрессирующим фактором. Почему это приводит в ряде случаев к активации делений клеток покоящегося центра, неясно. В опытах, поставленных с отрезками корней Интеркрас-375, открывание меристемы не останавливалось при помещении отрезанных корней на 2% раствор сахарозы, которая является основным углеводом, притекающим в корень сверху. ИУК (10^{-6} – 10^{-8} М) также не предотвращала открывания меристемы. Оно наблюдалось также при помещении отрезанных кончиков корней кукурузы на среду Стрита без или с 2% сахарозы в стерильных условиях (Быстрова и др., 2008), хотя корни заметно удлинялись в среде с сахарозой и практически не росли без нее.

Какие процессы вызывают активацию делений клеток покоящегося центра после отрезания корня, пока неясно. Возможно, что это связано с выделением этилена, которое неоднократно наблюдалось на разных объектах после механических или других повреждений (Abeles et al., 1992). Корни разных сортов кукурузы могут отличаться по степени выделения этилена. Ortega-Martinez et al. (2007) наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра в корнях арабидопсиса этиленом. Однако в отрезанных корнях арабидопсиса мы не наблюдали активации делений клеток покоящегося центра. Роль этилена в активации делений клеток в корнях проростков кукурузы пока не изучена и ее изучение представляет большой интерес.

Таким образом, наблюдения, описанные в настоящей статье, показывают, что функциональное состояние клеток покоящегося центра может резко меняться при нарушении связей кончика корня с основной частью растения. Механизмы этого явления пока неясны. Интересно, что это явление наблюдается как при отрезании очень малых кусочков корня, так и целых корней.

Клетки покоящегося центра при обычных условиях находятся в покоящемся состоянии. Данные этой статьи показывают, что оно зависит от целостности корня и, возможно, притока к покоящемуся центру сверху каких-то соединений, природа которых пока неясна. Описанная реакция клеток покоящегося центра в корнях ряда сортов кукурузы показывает, что хотя функциональное значение ствольных клеток у растений и животных в принципе одинаково, но в растениях ствольные клетки имеют свою специфику, состоящую в том, что они поддерживаются системой взаимосвязей, а не являются заложенной в раннем онтогенезе популяцией клеток.

Авторы благодарят проф. Бен Шереса (университет Утрехта) за семена трансгенных растений арабидопсиса.

Работа проведена при частичной поддержке РФФИ (Грант № 09-04-00919а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Быстрова Е.И., Месенко М.М., Грачева В.В., Иванов В.Б. Активация делений клеток покоящегося центра после отрезания корня // Тезисы докладов Международной научной конференции “Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений”. Екатеринбург: Изд. Уральского унив., 2008. С. 102–103.
- Демченко Н.П., Калимова И.Б., Демченко К.Н. Влияние никеля при высокой концентрации на пролиферацию клеток покоящегося центра и инициацию примордиев боковых корней в корнях проростков пшеницы // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 467–477.
- Дубровский И.Г., Иванов В.Б. Некоторые закономерности закладки боковых корней в корнях кукурузы при прорастании // Физиология и биохимия культурных растений. 1984. Т. 16. № 3. С. 279–284.
- Иванов В.Б. Особенности организации пролиферации клеток в растениях в связи с проблемой ствольных клеток // Цитология. 1986. Т. 28. С. 295–302.
- Иванов В.Б. Проблема ствольных клеток у растений // Онтогенез. 2002. Т. 34. С. 253–261.
- Иванов В.Б. Меристема как самоорганизующаяся система: поддержание и ограничение пролиферации клеток // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 926–941.
- Кожевникова А.Д., Серегин И.В., Быстрова Е.И. и др. Влияние тяжелых металлов и стронция на деление клеток корневого чехлика и структурную организацию меристемы // Физиология растений. 2007. Т. 54.
- Нестерова А.Н. Воздействие ионов свинца, кадмия и цинка на клеточную организацию меристемы и рост проростков кукурузы // Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1989. 194 с.
- Abeles F., Morgan P., Saltveit M. Ethylene in Plant Biology. San Diego, California: Academic Press, 1992. 414 p.
- Barlow P.W. The Concept of the Stem Cell in the Context of Plant Growth and Development // Stem Cells and Tissue Homeostasis / Eds. B.I. Lorel, C.S. Potten and R.J. Cole. Cambridge: Cambridge. Univ., 1978. P. 87–113.
- Barlow P.W., Rathfelder E.L. Cell division and regeneration in primary root meristems of *Zea mays* recovering from cold treatment // Environ. and Exp. Bot. 1985. V. 25. P. 303–314.
- Baum S.F., Dubrovsky J.G., Rost T.L. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots // Am. J. Bot. 2002. V. 89. P. 908–920.
- Clowes F.A.L. Nucleic acid in root apical meristems of *Zea* // New Phytologist. 1956. V. 55. P. 29–35.

- Clowes F.A.L.* The quiescent center in meristems and its behaviour after irradiation // *Meristems and Differentiation / Brookhaven Symp. Biol.* 1963. V. 16. P. 46–58.
- Clowes F.A.L., Stewart H.E.* Recovery from dormancy in roots // *New Phytologist.* 1967. V. 66. P. 115–125.
- Clowes F.A.L., Wadekar R.* Instability in the Root Meristem of *Zea mays* during growth // *New Phytol.* 1989. V. 111. № 1. P. 19–24.
- Jiang K., Feldman L.J.* Regulation of root apical meristem development // *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 2005. V. 21. P. 485–509.
- Rodriguez-Rodrigues J.F., Shishkova S., Napsucialy-Mendivil S., Dubrovsky J.* Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in cactaceae roots with determinate growth // *Planta.* 2003. V. 217. P. 849–857.
- Heimsch C., Seago J.L. Jr.* Organization of the root apical meristem in angiosperm // *Am. J. Bot.* 2008. V. 95. P. 1–21.
- Laux T.* The Stem cells concept in plants: A matter of debate // *Cell.* 2003. V. 113. P. 261–263.
- Malamy J.E., Benfey P.N.* Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* // *Development.* 1997. V. 124. 33–44.
- Ortega-Martinez O., Pernas M., Rachel R.J. et al.* Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // *Science.* 2007. V. 317. P. 507–510.
- Sarkar A.K., Luiten M., Miyashima S. et al.* Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem organizers // *Nature.* 2007. V. 446. P. 811–814.
- Scheres B.* Stem cells: a plant biologic perspective // *Cell.* 2005. V. 122. P. 499–504.

Activation of Cell Division in the Quiescent Center of Excised Maize Root Tip

V. B. Ivanov, E. I. Bystrova, M. M. Mesenko, L. M. Kotova, and A. A. Kotov

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 33, Moscow, 117276 Russia
e-mail: ivanov_yb@mail.ru

Abstract—The phenomenon of activation of cell proliferation in the quiescent center of excised maize roots is described. The root tips were grown on wet filter paper in Petri dishes. This phenomenon was observed in 8 to 14 maize cultivars and was absent in excised *Arabidopsis* root tips. The distribution of mitoses in meristems greatly varied in roots of individual seedlings from the same seed lot and seedlings of different cultivars. Meristem opening was observed after the removal of small root tips not longer than 3 mm and intact seminal roots. Sucrose (2%) and 10^{-6} – 10^{-8} M indole-3-acetic acid did not prevent meristem opening. These findings indicate that the state of quiescent center is maintained by a system of intercellular and interorgan relations, which are to be clarified.

Keywords: root, meristem, quiescent center, stem cells