

УДК 581

РОЛЬ ЭТИЛЕНА В АКТИВАЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ПОКОЯЩЕГОСЯ ЦЕНТРА В ОТРЕЗАННЫХ КОРНЯХ КУКУРУЗЫ

© 2015 г. Е. И. Быстрова, Н. В. Жуковская, В. Ю. Ракитин, В. Б. Иванов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

E-mail: ivanov_vb@mail.ru; zhukovskayanv@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.04.2014 г.
Окончательный вариант получен 24.10.2014 г.

В работе использованы два сорта кукурузы, у которых меристема по-разному реагировала на отрезание кончиков корней: у сорта Интеркрас-375 МВ вследствие активации деления клеток покоящегося центра (ПЦ) происходило открывание меристемы, а у сорта Краснодарский-194 МВ меристема оставалась закрытой. Показано, что отрезанные кончики корней у сорта Интеркрас-375 МВ выделяли больше этилена, чем у сорта Краснодарский-194 МВ. Ингибитор синтеза этилена L- α -2-амино-этоксивинил глицин-НСI (АВГ) и ингибиторы действия этилена AgNO₃ и 1-метил-циклопропен (МЦП) предотвращали открывание меристемы в отрезанных кончиках корней сорта Интекрас-375 МВ. Полученные результаты позволяют заключить, что этилен играет существенную роль в активации деления клеток ПЦ в отрезанных кончиках корней.

Ключевые слова: корень, меристема корня, покоящийся центр, ствольные клетки, пролиферация, этилен, L- α -2-амино-этоксивинил глицин-НСI, AgNO₃, 1-метил-циклопропен.

DOI: 10.7868/S0475145015020032

ВВЕДЕНИЕ

Покоящийся центр (ПЦ) располагается в апикальном конце меристемы корня и состоит из небольшого числа клеток, которые резко отличаются от остальных меристематических клеток (Slowes, 1975). Они редко делятся и в них замедлены все синтетические процессы. Однако под влиянием различных повреждающих воздействий, когда деления в меристеме практически прекращаются, клетки покоящегося центра начинают активно делиться. Активация делений нижнего слоя клеток покоящегося центра в сторону чехлика приводит к “открыванию” меристемы. При этом четкая граница между чехликом и меристемой (слой клеток ризодермы) прерывается. Тип меристемы — открытый или закрытый является одним из систематических признаков (Heimsch, Seago, 2008). Эти два типа меристемы отличаются наличием общих или отдельных инициальных клеток у разных тканей. Меристема злаков относится к закрытому типу.

Переход клеток ПЦ к активным делениям наблюдали в корнях кукурузы под влиянием радиоактивного облучения в умеренных дозах (Slowes, 1963), после выдерживания корней проростков при низких положительных температурах (Slow-

es, Stewart, 1967; Barlow, Rathfelder, 1985), а также после выращивания растений на растворах нитрата свинца в концентрациях умеренно ингибирующих рост (Нестерова, 1989; Кожевникова и др., 2007).

Изучение деления клеток ПЦ в изменяющихся условиях существования растения от нормальных до стрессовых является одним из подходов к выявлению, как их функциональной роли, так и механизмов, обуславливающих их относительный покой. Некоторые исследователи считают клетки ПЦ ствольными клетками в меристеме корня (Иванов, 2007, 2011). Другая точка зрения состоит в том, что клетки ПЦ обеспечивают ствольное состояние прилегающих к ним клеток, ингибируя их переход к дифференцировке (Laux, 2003; Scheres, 2005).

Ранее нами впервые была обнаружена вызываемая отрезанием активация клеток активация деления клеток ПЦ и перестройка меристемы из закрытой в открытую в кончиках корней проростков кукурузы. У изученных сортов кукурузы это явление было выражено в неодинаковой степени, а у некоторых не наблюдалось вообще (Иванов и др., 2011). На основании немногочисленных литературных сведений мы предположили, что стимулирующую роль в открывании меристемы

может играть этилен. Известно, что синтез этилена усиливается после поранений, механических и других повреждений (Abeles et al., 1992). Показано, что под влиянием этилена происходит активация деления клеток ПЦ в корнях арабидопсиса (Orthega-Martinez et al., 2007). Этилен вызывает перераспределение ИУК в кончике корня кукурузы и влияет на деление инициальных клеток чехлика и ризодермы, вызывая образование структур, сходных с чехликом (Ponce et al., 2005).

В данной работе мы сравнили интенсивности выделения этилена отрезанными кончиками корней “открывающегося” сорта Интеркрас-375 МВ и “неоткрывающегося” сорта Краснодарский-194 МВ. Кроме того, было изучено влияние ингибитора синтеза L- α -(2-амино-этоксивинил)глицин-HCl (АВГ) и ингибиторов действия этилена AgNO₃ и 1-метил-циклопропена (МЦП) на активацию деления клеток ПЦ в отрезанных кончиках корней кукурузы сорта Интеркрас-375 МВ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Семена кукурузы стерилизовали 1% раствором формалина в течение 20 мин, промывали водой и проращивали в темноте при 27°C на стекле, обернутом фильтровальной бумагой, в кюветах с водопроводной водой. Через 3 суток проращивания у проростков, длина главного корня которых достигала 2.5–4 см, отрезали кончики длиной 1 см. В опытах по выяснению интенсивности выделения этилена, отрезанные кончики раскладывали на влажной фильтровальной бумаге в сосудики объемом 15 мл. Сосуды с кончиками корней герметически закрывали пробками из самоуплотняющейся резины и экспонировали в темноте при 27°C 30 минут. Затем по изменению содержания в атмосфере сосудиков определяли выделение этилена кончиками корней. Определение проводили на газовом хроматографе с пламенноионизационным детектором и устройством для концентрирования углеводородов, позволяющим в десятки раз повысить чувствительность прибора за счет использования для анализа всего воздуха, находящегося в сосудике (Ракитин В.Ю., Ракитина Т.Я., 2011). Сразу после проведения анализа сосудики с кончиками корней открывали, проветривали 30 секунд, снова закрывали пробками и через 1 ч использовали для следующего определения выделенного этилена.

В опытах по выявлению действия ингибиторов 1 см кончики раскладывали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водой или растворами AgNO₃ и АВГ в дистиллированной воде, и помещали на 24 ч в термостат при 27°C. В опыте использовали концентрации ингибиторов, при которых рост интактных корней подавлялся умеренно: AgNO₃ – 0.5×10^{-4} М, АВГ – 10^{-4} М. В случае

с МЦП, синтезированным по методу Сислера и Серека (Sisler, Serek, 1997), перед отрезанием кончиков чашки Петри с интактными проростками помещали в герметически закрытые пятилитровые стеклянные сосуды, в которые затем через шприцы с помощью шприца вводили разведенный в воздухе МЦП. Концентрация МЦП в сосудах составляла 50 нл/л. После 3.5 ч экспозиции при 27°C кончики корней отрезали. Часть из них размещали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водой, и оставляли в термостате на 24 ч при 27°C. Другую часть подвергали дополнительной обработке МЦП (50 нл/л) в течение 24 ч.

Кончики корней фиксировали по Бродскому смесью формалин: абсолютный спирт: ледяная уксусная кислота в соотношении 10 : 3 : 1 в течение часа. Фиксированные корни заключали в парафин по общепринятой методике. Продольные срезы кончиков корней толщиной 10 мкм окрашивали в основном по ШИК-методу с последующим подкрашиванием 0.15% раствором проционового яркоголубого 4RS в 0.2% растворе Na₂CO₃ в течение 30–40 мин при комнатной температуре. В некоторых случаях использовали реакцию Фельгена с последующим подкрашиванием 0.1% раствором алцианового синего 8GS в 3% уксусной кислоте в течение 30 мин при комнатной температуре. Из серии срезов каждого корня учитывали только центральные, на которых отчетливо просматривалась картина изменения структуры меристемы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У сорта Интеркрас-375 МВ спустя 24 ч наблюдали открывание меристемы практически по всех отрезанных корнях, а у сорта Краснодарский-194 МВ меристема ни в одном из отрезанных корней не открывалась. Сравнение интенсивности выделения этилена отрезанными кончиками обоих сортов показало, что корни сорта с открывающейся меристемой выделяют больше этилена (рис. 1). На основании полученного результата можно предположить, что степень пролиферации клеток ПЦ после раневой реакции в результате отрезания зависит от уровня образования этилена. Это предположение подтвердилось также в опытах с ингибиторами синтеза и действия этилена.

В таблице приведены данные по действию ингибиторов синтеза (АВГ) и действия этилена (AgNO₃, МЦП) на активацию деления клеток ПЦ в отрезанных кончиках корней сорта Интеркрас-375 МВ. У интактных проростков меристема практически всех корней (97%) была закрыта. После 24 ч выдерживания отрезанных кончиков корней на воде их меристема в большинстве случаев перестраивалась из закрытой в открытую и

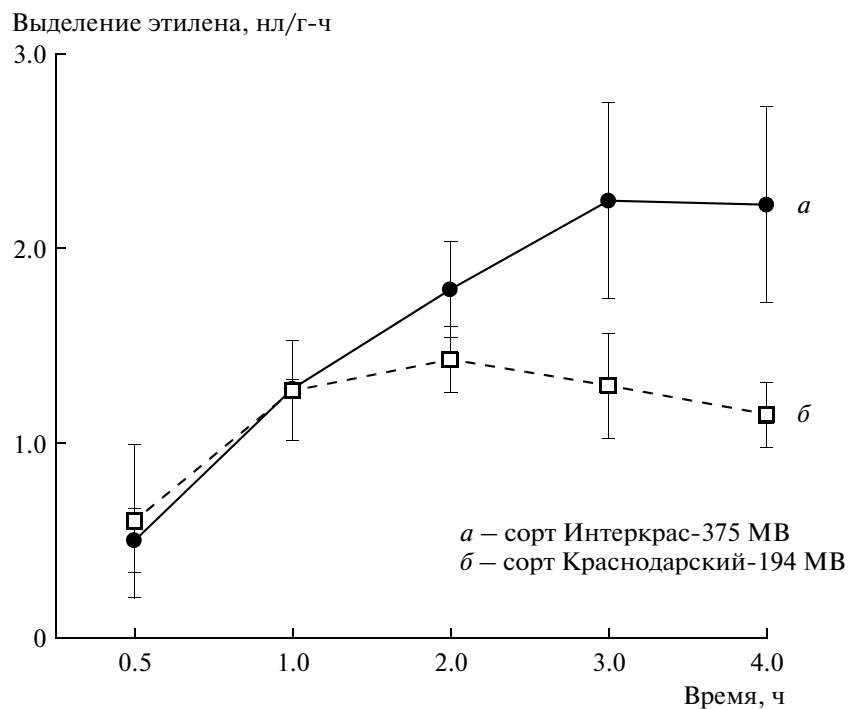


Рис. 1. Интенсивность выделения этилена отрезанными кончиками корней кукурузы.

лишь у 28% корней она оставалась закрытой. Используемые нами ингибиторы тормозили или полностью предотвращали процесс открывания меристемы, стимулируемый отрезанием. После 24 ч инкубирования на растворе АВГ (10^{-4} М) меристема оставалась закрытой у 94% корней, а на растворе AgNO_3 (0.5×10^{-4} М) открывания меристемы вообще не происходило. После первоначальной 3.5 ч инкубации интактных проростков в атмосфере МЦП (50 нл/л) открывание меристемы ингибировалось в 86% отрезанных кончиках корней, помещенных затем на 24 ч в атмосферу с чистым воздухом и в 100% отрезанных кончиках корней, подвергшихся дополнительной 24 ч обработке в воздухе с МЦП (50 нл/л). На продоль-

ных срезах кончиков корней показана закрытая меристема у корней интактных проростков и у корней, обработанных растворами АВГ, AgNO_3 и находившихся в атмосфере МЦП (рис. 2а, 2в, 2г, 2д), а также открытая меристема после отрезания у кончиков корней, необработанных ингибиторами (рис. 2б).

Таким образом, проведенные опыты показали, что ингибиторы, как синтеза, так и действия этилена резко ослабляли активацию деления клеток ПЦ, стимулируемую отрезанием. На основании этих и описанных выше результатов мы можем с большой степенью вероятности полагать, что в активации деления клеток ПЦ этилен играет немаловажную роль.

Подавление открывания меристемы в отрезанных кончиках корней сорта Интеркрас-375 МВ ингибиторами синтеза и действия этилена

Варианты	% корней с закрытой меристемой
Интakтные корни проростков кукурузы	97
Отрезанные кончики, инкубированные 24 ч:	
на воде	28
на растворе АВГ, 10^{-4} М	94
на растворе AgNO_3 , 0.5×10^{-4} М	100
После 3.5 ч обработки интактных проростков МЦП, 50 нл/л:	
в воздухе без МЦП	86
в воздухе с МЦП	100

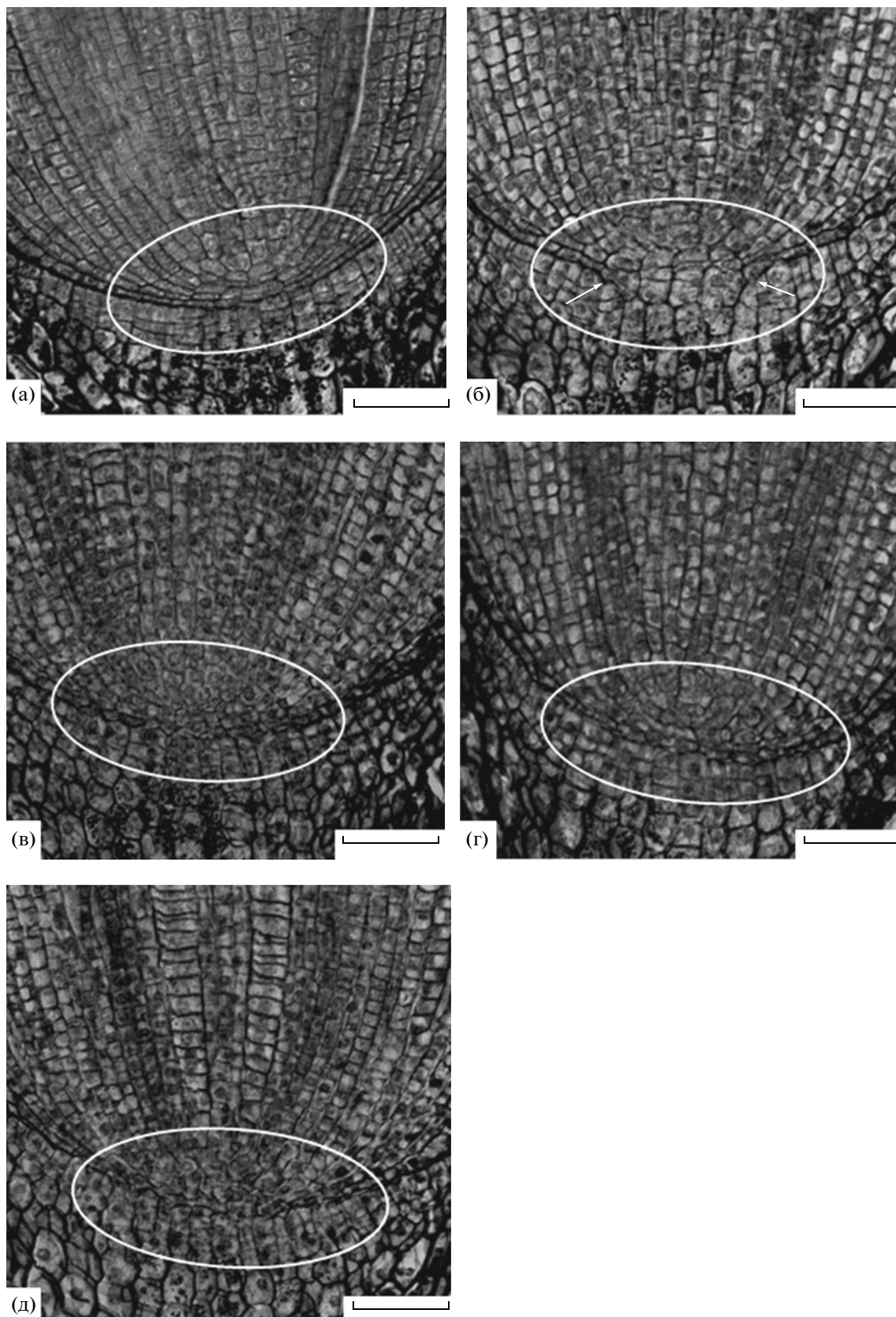


Рис. 2. Продольные срезы кончиков корней кукурузы сорта Интеркрас-375 МВ после 24 ч инкубации: (а) – intactные корни проростков; кончики после отрезания: (б) – на воде, (в) – на растворе AgNO₃, (г) – в атмосфере МЦП, (д) – на растворе АВГ. Овалом выделен участок границы между чехликом и меристемой корня. Стрелками показана открытая меристема. Бар – 50 мкм.

Авторы благодарят д.б.н. Н.В. Обручеву за ценные замечания при написании данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванов В.Б.* Стволовые клетки в корне и проблема стволовых клеток у растений // *Онтогенез*. 2007. Т. 38. С. 406–419.
- Иванов В.Б., Быстрова Е.И., Месенко М.М., Котова Л.М., Котов А.А.* Стимуляция делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках корней // *Онтогенез*. 2011. Т. 42. С. 357–362.
- Иванов В.Б.* Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука, 2011. 104 с.
- Кожевникова А.Д., Серегин И.В., Быстрова Е.И., Иванов В.Б.* Влияние тяжелых металлов и стронция на деление клеток корневого чехлика и структурную организацию меристемы // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. С. 290–299.
- Нестерова А.Н.* Воздействие ионов свинца, кадмия и цинка на клеточную организацию меристемы и рост проростков кукурузы // *Дис. ... канд. биол. наук*. М.: МГУ, 1989. 194 с.
- Ракитин В.Ю., Ракитина Т.Я.* Определение выделения и содержания этилена в растениях // *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. М.: БИНОМ, 2011. 487 с.
- Abeles F., Morgan P., Saltveit M.* Ethylene in Plant Biology. Academic Press. San Diego. 1992. 414 с.
- Barlow P.W., Rathfelder E.L.* Cell division and regeneration in primary root meristems of *Zeamays* recovering from cold treatment // *Environ. and Exp. Bot.* 1985. V. 25. P. 303–314.
- Clowes F.A.L.* The quiescent center in meristems and its behavior after irradiation // *Meristems and Differentiation / Brookhaven Symp. Biol.* 1963. V. 16. P. 46–58.
- Clowes F.A.L.* The quiescent center // *The development and function of roots / Eds. Torrey J.D., Clarkson D.T. L.: Acad. Press*, 1975. P. 3–19.
- Clowes F.A.L., Stewart H.E.* Recovery from dormancy in roots // *New Phytologist*. 1967. V. 66. P. 115–125.
- 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.
- Ortega-Martinez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L.* Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // *Science*. 2007. V. 317. P. 507–510.
- Ponce G., Barlow P.W., Feldman L., Cassab G.I.* Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize // *Plant, Cell and Environment*. 2005. V. 28. P. 719–732.
- Scheres B.* Stem cells: a plant biology perspective // *Cell*. 2005. V. 122. P. 499–504.
- Scheres B.* Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007. V. 8. P. 345–354.
- Sisler E.C., Serek M.* Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments // *Physiol. Plant*. 1997. V. 100. P. 577–582.

The Role of Ethylene in Activation Division Cell Quiescent Center in the Cut Maize Roots

E. I. Bystrova, N. V. Zhukovskaya, V. J. Rakitin, V. B. Ivanov

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

e-mail: ivanov_yb@mail.ru; zhukovskayanv@rambler.ru

Received April 22, 2014; in final form, October 24, 2014

In the present work we used two maize cultivars in which root meristem responded differently to root tip excision: in Interkras-375 MW we observed meristem opening due to the activation of cell divisions in the quiescent center (QC), while in Krasnodar-194 MW the meristem remained closed. Excised root tips of Interkras MB-375 were shown to produce much more ethylene than excised root tips of Krasnodar-194 MW. The inhibitor of ethylene biosynthesis L- α -ethoxyvinyl 2-amino-glycine-HCl (AVG) and inhibitors of ethylene action AgNO₃ and 1-methyl-cyclopropene (MCP) prevented meristem opening in excised root tips of Interkras-375 MW. The obtained results allow us to conclude that ethylene plays an important role in the activation of cell divisions in the QC of excised root tips.

Keywords: root, root meristem, the quiescent center, stem cells, proliferation, ethylene, L- α -2-amino-ethoxyvinyl glycine-HCl, AgNO₃, 1-methyl-cyclopropene