

УДК 581.43(582.794.1+581.522.5)

Г. В. Шевченко, Е. Л. Кордюм

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ
e-mail: galina-shevchenko@yandex.ru

Влияние клиностатирования на рост корневых волосков проростков *Beta vulgaris* L.

Надійшла до редакції 26.10.06

Приведено дані про вплив клиностатування на послідовні стадії розвитку корневих волосків *Beta vulgaris* L. Вважається, що перебудова актинового цитоскелету та зміна концентрації іонів кальцію сприяють відновленню плагіотропності росту корневих волосків в умовах клиностатування.

ВВЕДЕНИЕ

Корневые волоски представляют удобную и информативную одноклеточную модель для изучения гравитависимости клеточного роста. Волоски образуются из клеток эпидермиса и растут плагиотропно — под углом 85—95° к продольной оси корня, т. е. почти параллельно поверхности земли. Рост волоска происходит в области верхушки и, как у всех клеток с верхушечным ростом (пыльцевые трубки, апикальные клетки протонемы мхов и папоротников и т. д.) осуществляется при наличии апикально-базального градиента ионов кальция, образованного разницей концентраций данного иона в области верхушки и основания волоска [4, 5]. Кальций регулирует полимеризацию актина и активность актин-связывающих белков, стабилизирующих сеть микрофиламентов и закрепляющих их на цитоплазматической мембране. Микрофиламенты в апикальной мембране волосков локализованы вблизи кальциевых каналов, что предполагает их взаимосвязь [10]. Такое взаимодействие чрезвычайно важно для регуляции верхушечного роста, так как цитоплазматическая мембрана является первичной мишенью для внешних стимулов и местом запуска сигнальных реакций с участием ионов кальция и актинового цитоскелета. Несмотря на довольно интенсивное изуче-

ние верхушечного роста, механизм регуляции его направленности до сих пор не установлен. Поскольку плагиотропизм постоянно осуществляется в гравитационном поле Земли, представляет интерес, каким образом отсутствие ориентирующего действия вектора силы тяжести может влиять на направленность роста волосков. Для выяснения этого вопроса мы исследовали образование и рост корневых волосков в условиях клиностатирования, т. е. постоянного изменения положения растения относительно направления гравитационного вектора. Основное внимание уделяли изучению организации актиновых микрофиламентов и распределению ионов Ca^{2+} в корневых волосках на последовательных стадиях их роста.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Соплодия столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) проращивали в темноте на фильтровальной бумаге, увлажненной дистиллированной H_2O в условиях стационарного контроля и горизонтального клиностатирования (2 об/мин). Апексы корней 3-суточных проростков отрезали и фиксировали в 3.7 % формальдегиде непосредственно после снятия с клиностата. Образцы заключали в спирторастворимый парафин, срезы тол-

щиной 10 мкм получали на микротоме. Для визуализации актина применяли антитела на актин (chicken gizzard actin, ICN Biochemicals, разбавление 1:200 в фосфатном буфере, pH 6.7). После промывания в фосфатном буфере образцы инкубировали с вторичными антителами (anti-mouse IgG raised in goat), конъюгированными с флуоресцирующей меткой флуоресцин-изотиоцианатом (FITC) (Sigma Chemical Co., разбавление 1:20) [3]. Цитохалазин D, соли кальция (CaCl_2) и гадолиния (GdCl_3) добавляли за 6 ч до фиксации в среду роста (смачивали фильтровальную бумагу) в концентрациях 10 мкМ, 10 мМ и 10 мкМ соответственно. Для определения концентрации цитозольного кальция использовали флуоресцентный индикатор indo-1 (Sigma Chemical Co., 50 мкМ в 10 мМ фосфатного буфера, pH 6.7) в течение 40—120 мин. Концентрацию кальция измеряли в апикальной и базальной частях корневого волоска на стадии инициации и у растущего волоска длиной 0.2—0.35 мм. Измерения проводили в люминисцентном микроскопе ЛЮАМ-ИУФ1 с количественной насадкой ФМЭЛ-1. Калибровочную кривую строили по смеси растворов 50 мкМ indo-1 и 50—500 нМ CaCl_2 [6]. Абсолютную концентрацию внутриклеточного кальция вычисляли по методу Grynkiewicz (1985) с помощью программы статистической обработки данных BIO [1]. Для визуализации корневых волосков использовали метод сканирующей электронной микроскопии с высушиванием в критической точке [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе формирования корневого волоска выделяют три стадии: 1) инициация волоска из клеток эпидермиса (трихобласты), 2) образование волоскового выступа длиной 20—40 мкм (рис. 1), и 3) активный полярный рост (рис. 2, а). Инициация волоска и формирование волоскового выступа у проростков *Beta vulgaris L.* в контроле происходили под углом 85—95° к продольной оси корня (рис. 1, а). В этом же направлении осуществлялся и рост зрелых волосков.

В условиях клиностаტიрования в большинстве случаев ($\approx 80\%$) выступ волоска формировался

под углом 40—60° к продольной оси главного корня с наклоном к апексу корня (рис. 1, б). Однако в процессе дальнейшего роста угол наклона волоска восстанавливался до 85—95°, из-за чего растущий волосок принимал дугообразную форму (рис. 2, а).

Показано, что скопление актина на внешней стороне трихобласта предшествует инициации волоска [2]. Как и в контроле, так и при клиностаტიровании, актин скапливался в области апикальной цитоплазматической мембраны при инициации волосков и формировании волоскового выступа. В субапикальной части волоска наблюдались отдельные пучки продольных микрофиламентов (рис. 3, а, б).

В растущих волосках уплотненная сеть актина наблюдалась в апексах клеток, в субапикальной части микрофиламенты располагались в виде продольных пучков различной толщины (рис. 2, б). Считается, что актин скапливается в местах доставки везикул Гольджи к цитоплазматической мембране и состоит из сети микрофиламентов, образующих треки для экзоцитозных везикул [11, 12].

Измерения содержания ионов кальция в трихобластах не выявили каких-либо изменений его концентрации перед инициацией волосков, что согласуется с наблюдениями [15]. Не наблюдались также колебания концентрации кальция на стадии инициации волосков ни в контроле, ни при клиностаტიровании. Напротив, у растущих корневых волосков в контроле отмечалась разница между концентрацией ионов кальция в основании волоска (96.5 ± 6.3 нМ) и его верхушечной части (240.8 ± 12.6 нМ), что и составляло апикально-базальный градиент ионов кальция. При клиностаტიровании концентрация Ca^{2+} в верхушке растущих волосков увеличивалась до 461.8 ± 31.4 нМ по сравнению с 145.1 ± 11.4 нМ в основании волоска. Эксперименты со специфическим блокатором механочувствительных кальциевых каналов — ионами гадолиния, показали незначительную разницу в концентрации кальция между волосками в контроле (апекс 286.1 ± 42.7 нМ, основание 156.7 ± 27.6 нМ) и при клиностаტიровании (апекс 300.4 ± 55.2 нМ, основание 145.3 ± 38.01 нМ), что говорит о том, что при данных условиях поступление Ca^{2+} извне происходит вследствие активации механочувствительных Ca^{2+} -каналов. Из-

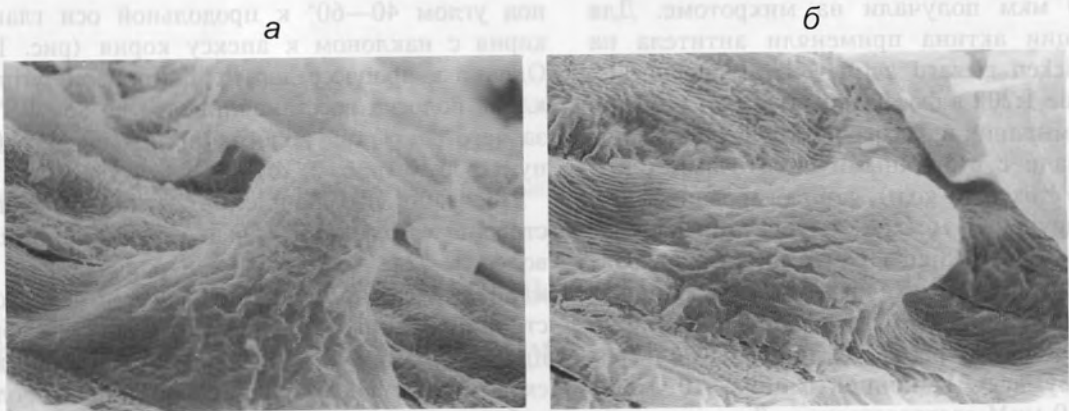


Рис. 1. Выступы корневых волосков *B. vulgaris L.* в контроле (а) и при клиностаტიровании (б). Масштаб 15 мкм

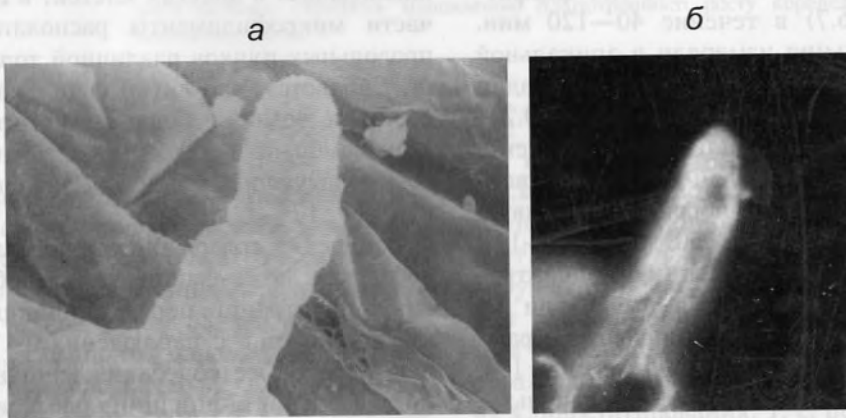


Рис. 2. Общий вид (а), и организация актинового цитоскелета (б) растущего корневого волоска *B. vulgaris L.* при клиностаტიровании. Масштаб 15 мкм

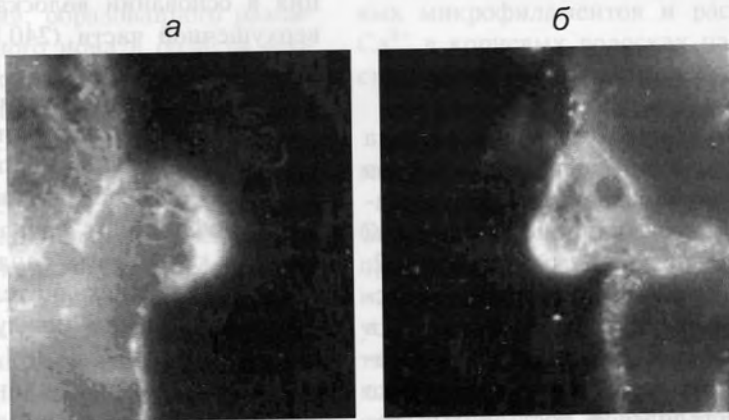


Рис. 3. Организация актинового цитоскелета в выступах корневых волосков *B. vulgaris L.* в контроле (а) и при клиностаტიровании (б). Масштаб 10 мкм

вестно, что повышенная концентрация кальция в верхушке волоска обусловлена скоплением большого количества кальциевых каналов в цитоплазматической мембране [9]. Поскольку активность белков, закрепляющих микрофиламенты и локализирующих экзоцитоз в определенной точке цитоплазматической мембраны апекса [11], это определяет рост клетки строго по градиенту кальция. Так, при искусственно вызванном повышении концентрации Ca^{2+} в точке апекса, удаленной от точки роста, удлинение волоска начинается осуществляться в области повышенной концентрации Ca^{2+} , изменяя при этом общее направление роста [4, 5]. Мы предполагаем, что отсутствие градиента кальция в трихобластах и на стадии инициации волоска означает отсутствие фиксированного направления роста волоска. Вероятно, на данной стадии в апикальной мембране корневого волоска отсутствуют каналы ионов кальция или они не активированы. Известно, что каждая стадия развития волоска характеризуется определенными физиологическими процессами, в результате которых диффузный рост трихобластов эпидермиса меняется на полярный рост корневых волосков [15]. Так, при переходе волоскового выступа к активному росту темпы удлинения клеток значительно замедляются из-за перестроек цитоскелета, регулирующих поступление экзоцитозных везикул в точку роста [4]. Логично предположить, что доставка и встраивание белков кальциевых каналов в апикальную цитоплазматическую мембрану происходит с содержанием первых экзоцитозных везикул на стадии инициации. Отсутствие активных кальциевых каналов в апексе волоска означает отсутствие четкого направления роста, что делает стадию инициации наиболее уязвимой к внешним воздействиям, и такой стимул как дезориентация растения относительно вектора гравитации приводит к изменению направления роста корневых волосков. Начало функционирования каналов кальция и установление градиента ионов характеризует переход от волоскового выступа к активному полярному росту.

Установлено, что такие механические воздействия, как касание и ранение, также увеличивают концентрацию кальция в апексах корневых волосков [11], а повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} изменяет направление

их роста [5]. Мы предполагаем, что активация механочувствительных кальциевых каналов и последующее повышение концентрации ионов кальция меняют направление роста волосков, что в конечном счете приводит к восстановлению их плагитропности. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} в апексе волоска частично разрушает сеть апикальных микрофиламентов [14], нарушая тем самым слияние экзоцитозных везикул с мембраной в точке роста. Поскольку система поддержания кальциевого градиента у клеток с верхушечным ростом является самовосстанавливающейся и саморегулирующейся [4], градиент ионов кальция восстанавливается, что приводит к восстановлению сети микрофиламентов и возобновлению экзоцитоза. В свою очередь, самовоспроизведение кальциевого градиента может быть частично обусловлено генетически детерминированной регуляцией де/полимеризации микрофиламентов [13], которые контролируют доставку белков каналов кальция на апикальную мембрану. Возможно, что кальций, как сигнальная молекула, активирует в мембране каскад реакций, ведущих к синтезу новых микрофиламентов. Не исключено, что передача сигнала при этом осуществляется по фосфатидил-инозитольному пути, так как профилин, белок, регулирующий полимеризацию актина, имеет сайт связывания с кальцием и фосфоинозитолами [14]. Появление сети новых микрофиламентов возобновляет экзоцитоз в новой точке цитоплазматической мембраны, определяя тем самым новое направление роста. К сожалению, имеющаяся на сегодняшний день микроскопическая техника не позволяет выявить тонкие перестройки актинового цитоскелета в апексах клеток с верхушечным ростом. Предположительно, через регулируемый микрофиламентами, последовательный сдвиг точки выхода экзоцитозных везикул на апикальную цитоплазматическую мембрану, угол роста волосков с $40\text{--}60^\circ$ снова изменяется на $85\text{--}95^\circ$. Наши наблюдения согласуются с результатами других исследователей, отмечавших способность корневых волосков восстанавливать угол роста после механической ориентации параллельно оси корня [4]. Таким образом, полученные данные показывают, что градиент ионов кальция и актиновый цитоскелет являются определяющими элементами генетически детерминированного механизма ре-

гуляции направленности роста корневых волосков.

1. Кордюм Е., Даневич Л. Влияние клинотатирования на концентрацию ионов кальция в корневых волосках кресс-салата // Цитология.—1996.—38.—С. 765—769.
2. Шевченко Г. Функціонування епідермісу кореня *Beta vulgaris* в умовах зміненої гравітації // Доп. Нац. академії наук України.—2001.—№ 6.—С. 50—54.
3. Baluska F., Samaj J., Kendrick-Jones J., et al. Tissue- and domain-specific distribution and redistribution of actin filaments, myosins, and profilin isoforms in cells of root apices // Cell Biology Intern.—1997.—21.—P. 852—854.
4. Bibikova T., Gilroy S. Root hair development // J. Plant Growth Regul.—2003.—21.—P. 383—415.
5. Bibikova T., Zhigilei A., Gilroy S. Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity // Planta.—1997.—203.—P. 495—505.
6. Felle H., Hepler P. The cytosolic Ca^{2+} concentration gradient of *Sinapsis alba* root hairs as revealed by Ca^{2+} -selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging // Plant Physiology.—1997.—114.—P. 39—45.
7. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem.—1985.—260.—P. 3400—3450.
8. Harris N., Oparka K. J. Plant Cell Biology. A practical approach. — Oxford: Univ. Press, 1994.—329 p.
9. Levina N., Lew R., Heath I. Cytoskeletal regulation of ion channel distribution in the tip-growing organism *Saprolegnia ferax* // J. Cell Sci.—1994.—107.—P. 127—134.
10. Malho R., Read N. D., Pais M. S., Trewavas A. J. Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth // Plant J.—1994.—5.—P. 331—341.
11. Miller D., de Ruijter N., Emons A. From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips // J. Exp. Bot.—1997.—48.—P. 1881—1896.
12. Ryan E., Steer M., Dolan L. Cell biology and genetics of root hair formation in *Arabidopsis thaliana* // Protoplasma.—2001.—215.—P. 140—149.
13. Schmidt A., Hall M. Signaling to the actin cytoskeleton // Annu. Rev. Cell Dev. Biol.—1998.—14.—P. 305—338.
14. Staiger C. Signaling to the actin cytoskeleton in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.—2000.—51.—P. 257—288.
15. Wymer C., Bibikova T., Gilroy S. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana* // Plant J.—1997.—12.—P. 427—437.

CLINOROTATION INFLUENCE ON THE GROWTH OF ROOT HAIRS IN *BETA VULGARIS* L. SEEDLINGS

G. V. Shevchenko, E. L. Kordyum

It is shown that clinorotation affects the angle of *Beta vulgaris* L. root hair growth and changes it from 85—95° to 40—60° at the stage of hair initiation. Our investigations of actin cytoskeleton arrangement and tip-based gradient of calcium ions proved the involvement of above components in the maintenance of the directed growth in simulated microgravity (clinorotation).