

На правах рукописи



СНЕГИРЁВА АНАСТАСИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**ИНТРУЗИВНЫЙ РОСТ ФЛОЭМНЫХ ВОЛОКОН
ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*Linum usitatissimum* L.)**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Горшкова Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Иванов Виктор Борисович

доктор биологических наук, профессор
Хохлова Людмила Петровна

Ведущая организация: Всероссийский НИИ Растениеводства
им. Н.И.Вавилова, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «27» июня 2008 г. в 11⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН (420111, г. Казань, а/я 30, ул. Лобачевского, 2/31, тел./факс: (843)2927347).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Рост растительных клеток разделяют на координированный, протрузивный и интрузивный. При интрузивном росте растущая клетка опережает рост клеток окружающих тканей и внедряется между ними по срединной пластинке (Эсау, 1980; Fahn, 1990; Лотова, 2001). Интрузивный рост характерен для клеток нескольких растительных тканей; при этом классическим примером служат волокна. Волокно, в ботаническом понимании, – индивидуальная клетка, элемент склеренхимы - наиболее распространенного типа механической ткани вегетативных органов сосудистых растений. Особое развитие волокна получают в лубоволокнистых и древесных культурах.

Интрузивный рост растительных клеток отчасти напоминает рост аксонов и дендритов животных (Lev-Yadun, 2001), однако очевидно, что механизмы его осуществления существенно иные, хотя бы из-за наличия клеточной стенки. Различаться могут и движущие силы, и способы регуляции, сведения о которых на сегодняшний день практически отсутствуют. Этот пробел во многом объясняется тем, что непосредственное наблюдение интрузивного роста затруднено, а выделение растущих интрузивно клеток в количествах, достаточных для биохимических и молекулярно-биологических анализов, практически невозможно. Причин для этого несколько. Во-первых, интрузивный рост осуществляется клетками, находящимися в толще других тканей. Во-вторых, клетки имеют на этой стадии биогенеза тонкую клеточную стенку при коэффициенте прозенхимности более 1000, что делает их чрезвычайно хрупкими. В-третьих, *in vitro* интрузивный рост воспроизвести не удается, что делает особенно важным поиск подходов для его характеристики *in situ*.

Для исследования интрузивного роста логично выбрать объект, в котором этот процесс наиболее выражен. К числу таких относятся флоэмные волокна льна (*Linum usitatissimum* L.). Временная и пространственная локализация стадий развития этих клеток легко определяется на стебле льна благодаря существованию «точки слома» - индикатора завершения интрузивного роста волокон и перехода к последующим стадиям дифференцировки (Горшкова с соавт., 2003; Gorshkova et al., 2003). Флоэмные волокна льна собраны в пучки и расположены вдоль всего длинного и тонкого стебля растения. Лен является классическим объектом для изучения формирования волокон, на его примере, в основном, сформированы представления о развитии этих клеток (Эсау, 1980). Тем не менее, к началу наших работ, об интрузивном росте флоэмных волокон льна было лишь известно, что он существует, и что этот процесс завершается выше «точки слома».

Цель и задачи исследований. Целью представляемой работы являлась характеристика интрузивного роста флоэмных волокон льна-долгунца. Были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать начало интрузивного роста флоэмных волокон.
2. Выявить тип удлинения флоэмного волокна (апикальный или диффузный).

3. Проанализировать субклеточную организацию волокон на стадии интрузивного роста.
4. Охарактеризовать формирование пучков в ходе интрузивного роста волокон.
5. Подобрать метод оценки интрузивного роста волокон *in situ*.

Научная новизна работы. В работе охарактеризован интрузивный рост флоэмных волокон льна-долгунца (*L. usitatissimum* L.). Впервые установлено, что интрузивный рост волокон начинается раньше, чем заканчивается координированный рост окружающих тканей, и продолжается несколько дней. За это время индивидуальная клетка достигает длины до 10 см. Охарактеризована субклеточная организация клетки на стадии интрузивного роста. Обнаружено, что число ядер в индивидуальном волокне составляет несколько десятков и положительно коррелирует ($r=+0.6$) с длиной клетки. Впервые получены данные о симпластической изоляции волокон на этой стадии удлинения. Впервые установлено, что волокна удлиняются всей поверхностью, а не кончиком, как предполагалось в ранних работах. Показано, что именно в ходе интрузивного роста происходит формирование пучков волокон. Впервые установлено, что увеличение числа волокон в ходе интрузивного роста можно охарактеризовать *in situ* с помощью метода ЯМР по увеличению доли медленной компоненты диффузионного затухания сигналов спинного эха.

Практическая ценность работы. Практическая значимость работы во многом определяется тем, что исследования проведены на хозяйственно ценной культуре – льне-долгунце. Использование и дальнейшее усовершенствование разработанных представлений и методов позволят целенаправленно изменять свойства и качество технического волокна. Полученные данные о положительной корреляции между длиной волокна и отрезком стебля от апекса до «точки слома» могут использоваться селекционерами для экспресс оценки длины формирующихся волокон. Материалы по характеристике особого типа роста растительных клеток (интрузивный рост) могут быть использованы в лекционных курсах в университетах, академических институтах и других научных заведениях.

Связь работы с научными программами. Исследования проводились в соответствии с планами НИР КИББ КазНЦ РАН (номер госрегистрации 0120.0408625); частично поддержаны грантами РФФИ № 05-04-48906; 06-04-48853; 06-04-81049; № 08-04-00845 а также грантом Фонда содействия отечественной науке «Лучшие аспиранты РАН» - 2008. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на V съезде Общества физиологов растений России (Пенза, 2003); VIII Молодежной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2004); на Международной научно-практической конференции (Торжок, 2004); на Международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (Казань, 2006); на I (IX) Международной конференции молодых ботаников (Санкт-

Петербург, 2006); на II Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006); на годовом собрании Общества физиологов растений России (Ростов-на-Дону, 2006); на VI съезде Общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007); на конференциях молодых ученых КИББ КазНЦ РАН (2003, 2004, 2005); на итоговой конференции КИББ КазНЦ РАН (2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста (включая иллюстрации и список цитируемой литературы) и состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 6 таблиц и 38 рисунков. Список литературы включает 178 источников, в том числе 32 - отечественных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Новоторжский, выращенные в условиях вегетационного опыта на открытом воздухе при естественном освещении. Исследования проводили на растениях в период быстрого роста (25-45 дней после посадки). Для определения длины индивидуальных волокон использовали чесаное волокно, предоставленное Всероссийским научно-исследовательским институтом льна (г. Торжок) и растения льна различных генотипов из коллекции Всероссийского института растениеводства им Н.И. Вавилова (г. Пушкин).

1.2. Электронная микроскопия. Отрезки стебля длиной 1-2 см предварительно фиксировали 0.5% глутаровым альдегидом на 0.05М фосфатном буфере (рН 7.3) 3 часа при комнатной температуре. Затем вырезали короткие участки из середины отрезка и фиксировали их в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1М фосфатном буфере в течение ночи. Постфиксацию проводили в 1% тетраоксиде осмия при комнатной температуре в течение 2 часов. После дегидратации ткань заливали в две различные смолы: Epon и LR White (Ted Pella Inc.). Срезы делали на ультратоме LKB 8800. Контрастирование проводили в 2% водном растворе уранилацетата в течение 20 минут при температуре 60°C и цитратом свинца в течение 10 минут. Образцы просматривали на электронном микроскопе Axiovert 200M (Zeiss).

1.3. Флюоресцентная микроскопия. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI (4'-6'-диамино-2-фенилиндол) (Serva). Индивидуальные волокна выделяли из стебля льна после частичной мацерации в 1% Macerozyme (Serva) в течение ночи и окрашивали DAPI в концентрации 0.5 мкг/мл в течение 5-20 мин.

При анализе пучков волокон использовали краситель Cellufluor (Polyscience, Inc.) Отрезки стебля ниже «точки слома» разделяли на ксилему и волокнистую часть. Волокнистую часть стебля окрашивали Cellufluor в концентрации 0.01% на 1.25 мМ боратном буфере, рН 10 в течение 5 минут при комнатной температуре.

Актиновые филаменты окрашивали красителем родамин-фалоидином на ASB (актин стабилизирующем) буфере. Из участка стебля выше «точки слома» (без фиксации) с помощью лезвия вырезали тонкую полоску ткани и окрашивали её родамин-фалоидином в концентрации 0.33мМ в течение 1 - 2 часов.

Для регистрации окрашивания использовали эпифлюорисцентный модуль микроскопа LSM-510 META (Carl Zeiss), фильтр для красителей DAPI и Cellufluor – FSET01 (365 нм), фильтр для родамин-фалоидина - FSET15 (546 нм)

1.4. Определение длины флоэмного волокна.

Пучки волокон из верхней, средней и нижней частей чесаного волокна помещали на ночь в 1-2% Macerozyme. Затем из пучка волокон выделяли 150 индивидуальных волокон. Выделенные волокна раскладывали на предметном стекле, проверяли целостность клеток под световым микроскопом NU-2 (Zeiss) и измеряли их длину.

При выделении индивидуальных волокон из растений льна различных генотипов, отрезок стебля помещали в 1-2% Macerozyme на ночь. Сначала выделяли пучки волокон, а затем индивидуальные волокна и измеряли их длину по методике, описанной выше. Проанализировали длину волокон в 25 образцах льна. Общее число выделенных из одного образца волокон - 150.

1.5. Культивирование отрезков стебля льна *in vitro*. Отрезки стебля льна, вырезанные из участка стебля выше «точки слома», культивировали на среде $\frac{1}{2}$ MS, которую готовили из стандартного порошка (Serva). Добавляли агар (0.8%) и сахарозу в различных концентрациях (5, 10, 20 мг/л); pH среды варьировал от 4.5 до 5.8. Среды автоклавировали, остужали и разливали в чашки Петри. Длина культивируемых отрезков стебля составляла от 2 до 6 см.

1.6. Подготовка растительного материала для метода ЯМР. В измерительную пробирку (\varnothing 1 см) наливали 2 мл воды и помещали срезанные стебли десяти растений. Для более плотной упаковки стеблей с целью повышения интенсивности сигнала удаляли все листья, за исключением тех, которые примыкают к растущей верхушке (верхний 1 см стебля). Измерения проводили выше и ниже «точки слома» сразу после приготовления образцов и через сутки. Перемещением пробирки с растениями в сквозном канале приемопередающего контура датчика ЯМР установки выбирали определенную зону измерения шириной 10 мм. В ходе эксперимента растения не теряли тургор и за сутки вырастали на 1 см.

1.7. ЯМР. Исследования проводили на установке спинового эха на частоте 16 МГц с использованием техники импульсного градиента магнитного поля. Для измерений использовали импульсную последовательность стимулированного эха. Регистрировали зависимости относительной амплитуды эха $A(g)/A(0)$ (фактор R) при постоянном времени диффузии (td) в зависимости от амплитуды импульсов градиента магнитного поля (g) при варьировании их длительности (δ) как параметра. Схема эксперимента была построена на регистрации диффузионных спадов только при одном предварительно оцененном времени диффузии td – 100 мсек. На

графиках представлены результаты одного из трех экспериментов с повторяющимися закономерностями.

Полученные данные обработаны статистически, при изложении данных приведены средние значения и их стандартные отклонения. Анализ корреляционных связей между различными параметрами выполнен при помощи пакетов программ «Анализ данных» Excel XP.

Выражаю искреннюю благодарность за методическую помощь сотрудникам лаборатории механизмов роста растительных клеток КИББ КазНЦ РАН д.б.н. В.В. Сальникову и к.б.н. М.В. Агеевой (электронномикроскопический анализ), сотрудникам лаборатории биофизики транспортных процессов д.ф.-м.н. А.В. Анисимову и к.б.н. Воробьеву В.Н. (ЯМР анализ). Приношу благодарность сотрудникам ВИР им Н.И. Вавилова (группе под руководством д.б.н. Н.Б. Брач) за предоставление образцов коллекции генотипов льна.

Огромное спасибо моему научному руководителю д.б.н. Татьяне Анатольевне Горшковой за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Идентификация начала интрузивного роста флоэмных волокон.

Известно, что интрузивный рост волокон заканчивается выше «точки слома» (Gorshkova et al., 2003). Чтобы идентифицировать начало интрузивного роста анализировали продольные срезы верхней части стебля. Интрузивный рост волокон может инициироваться по следующим сценариям: а - интрузивное удлинение волокон инициируется вследствие остановки роста клеток окружающих тканей при сохранении скорости роста волокон; б - волокна начинают интрузивно расти в зоне, где остальные клетки уже не растут; в - волокна начинают расти быстрее, чем окружающие клетки в зоне координированного растяжения стебля. Выяснение этого вопроса важно, потому что различные сценарии предполагают различия в способах регуляции. Для понимания того, как соотносится координированный рост соседних тканей и интрузивный рост волокон необходимо уметь идентифицировать конец координированного роста тканей и начало интрузивного роста волокон. Область координированного роста тканей достаточно легко выявляется визуально по уменьшенному расстоянию между листьями. Координированный рост происходит, в основном, в верхнем сантиметре стебля льна и отчасти захватывает второй (Ageeva et al., 2005).

Идентификация волокон на ранних стадиях развития на поперечных срезах стебля затруднена, однако на продольных срезах они выявляются как вытянутые прямоугольные клетки на расстоянии 0.3 мм - 0.4 мм от апекса, через 5 - 6 слоёв паренхимных клеток от эпидермиса (рис. 1 б). Ядра в волокнах имеют характерную вытянутую форму, тогда как клетки прилегающей паренхимы – овальную или круглую. Это ещё один показатель, по которому можно четко отличить волокна от

паренхимных клеток. В этой области волокна растут координированно с окружающими тканями и имеют тупые концы.

При идентификации начала интрузивного роста мы руководствовались тем, что при начале интрузивного удлинения тупые концы волокон должны трансформироваться в заостренные и сформировать характерное «колени» (рис. 2).

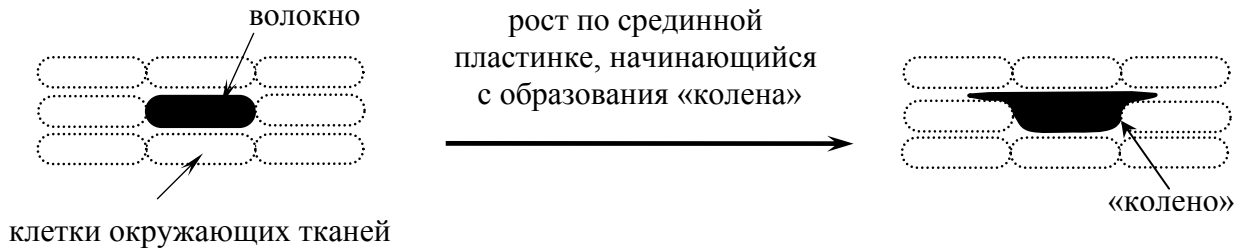


Рисунок 2. Схема, иллюстрирующая появление «колена» при инициации интрузивного роста.

Действительно, мы обнаружили формирование таких «колен» (рис. 1 в). Они выявляются на расстоянии 1-2 мм от апекса стебля. Важно отметить, что «колени» образуется на обоих концах клетки, что свидетельствует о том, что волокно в стебле удлиняется и в верхнем и в нижнем направлении.

Таким образом, интрузивный рост волокон начинается в области 1-2 мм от апекса стебля, т. е. значительно раньше, чем заканчивается координированный рост окружающих тканей. Маркером начала интрузивного роста служит образование характерного «колена».

2.2. Выявление типа удлинения флоэмных волокон льна в ходе интрузивного роста

Удлинение индивидуальной клетки может происходить двумя способами: апикально (растяжение только кончика клетки) и диффузно (растяжение всей поверхности клетки). Различия между концевым и диффузным типами роста выявляются при сопоставлении ультраструктуры кончика клетки и её срединной части. У клеток, растущих всей поверхностью, ультраструктура цитоплазмы не имеет серьёзных отличий по всей длине клетки, в то время как у клеток, растущих апикально, можно выделить несколько зон, различающихся по структуре цитоплазмы (Yang, 1998). В самом кончике клетки формируется так называемая «чистая» зона (3-5 мкм), в которой отсутствуют какие-либо крупные субклеточные структуры, за исключением пузырьков аппарата Гольджи. За чистой зоной располагается «актиновая шапочка», где сконцентрированы элементы цитоскелета. Субапикальная зона отличается плотной цитоплазмой, обогащенной различными органеллами. Микротрубочки организованы в тяжи, параллельные продольной оси клетки.

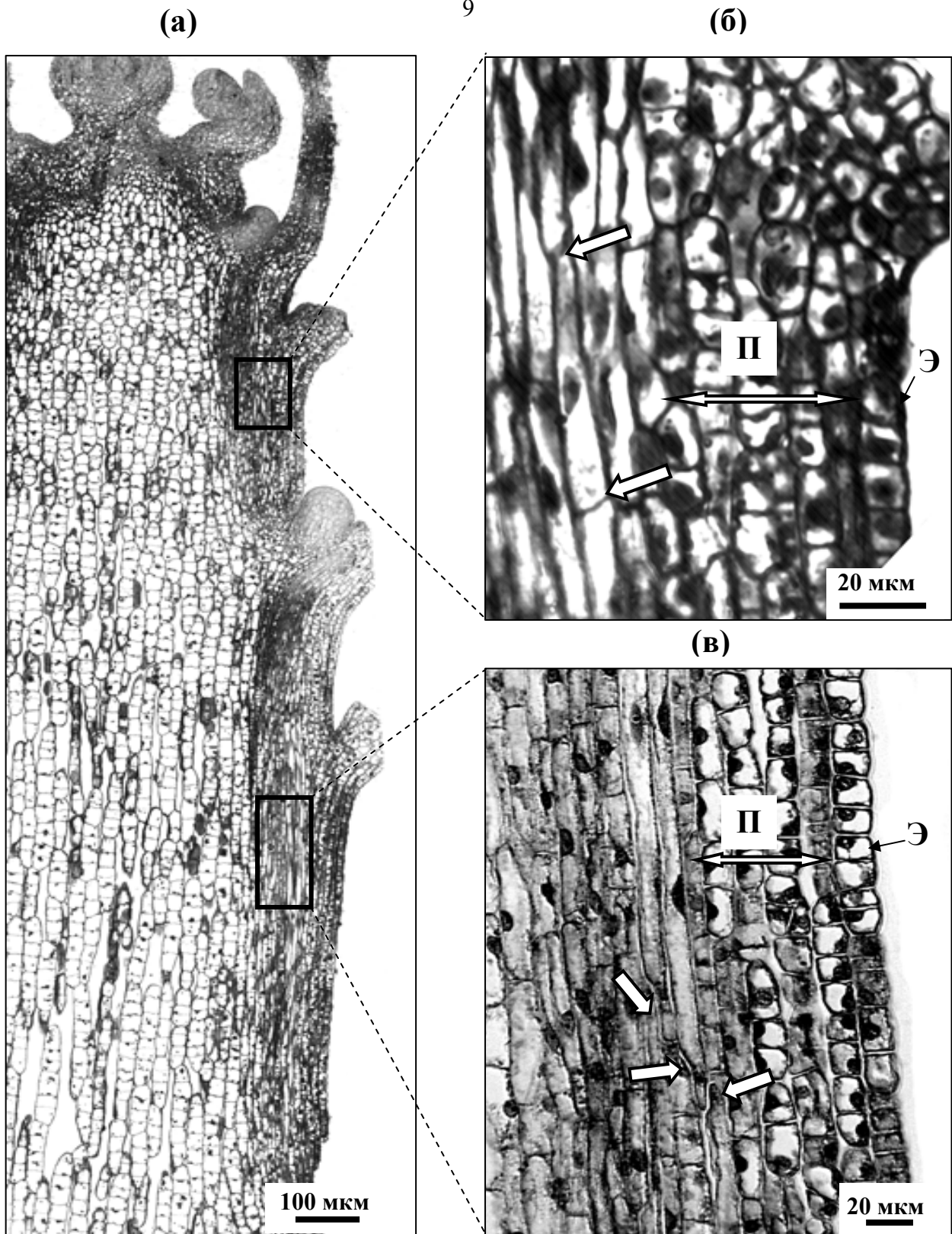


Рисунок 1. Продольные срезы стебля льна-долгунца. а – общий вид верхней части стебля; б – область координированного роста волокон, в – область интрузивного роста волокон. \blacktriangleright на фото (б) и (в) обозначены концы волокон, П – паренхима (\longleftrightarrow), Э – эпидермис (\rightarrow).

Провели сопоставление ультраструктуры кончика флоэмного волокна и его срединной части. В волокнах на стадии интрузивного роста не наблюдали зонального расположения органелл. В кончике клетки нет «чистой» зоны, так как в этой области присутствуют органеллы - например, митохондрии (рис. 3 в).

Диктиосомы и эндоплазматический ретикулум равномерно распределены в цитоплазме волокна (рис. 3 а, б). Микротрубочки в кончике волокна имеют поперечную ориентацию. Таким образом, анализ ультраструктуры интрузивно растущего волокна не выявил никаких признаков апикально растущей клетки.

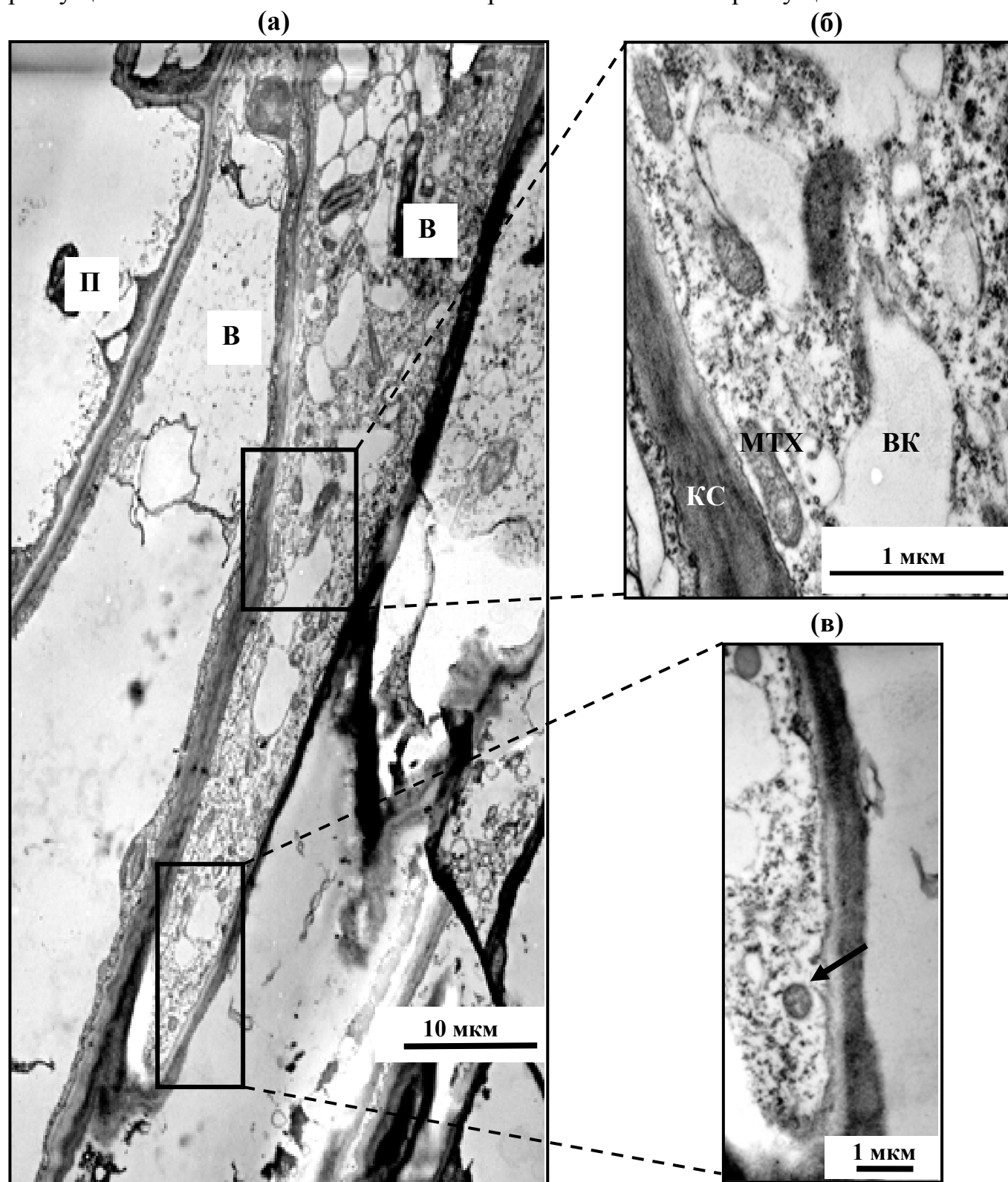


Рисунок 3. Продольные срезы стебля льна-долгунца в области интрузивного роста волокон. а - общий вид волокна, б - субапикальная зона клетки; в - апикальная зона клетки. В - волокно, П - паренхима, КС - клеточная стенка, МТХ - митохондрия, ВК - вакуоль. Стрелкой на фото (в) отмечена митохондрия.

Еще одним показателем, различающимся у клеток при концевом и диффузном росте, может быть распределение плазмодесм в клеточной стенке. При концевом интрузивном росте плазмодесмы в срединной части клетки должны сохраняться, а при диффузном интрузивном росте исчезать по всей поверхности клетки.

Провели оценку частоты встречаемости плазмодесм (число плазмодесм на 1 мкм клеточной клетки) в волокнах на разных стадиях удлинения волокна (табл. 1). На стадии координированного роста обнаружили плазмодесмы в клеточных стенках между волокнами и между волокнами и паренхимой. На стадии интрузивного роста плазмодесмы исчезают по всей поверхности клетки, что приводит к её симпластической изоляции. Это ещё один аргумент в пользу того, что волокно растёт всей поверхностью. Существуют также данные о равномерном включении метки в клеточную стенку по всей длине интрузивно растущего волокна (Ageeva et al., 2005), в отличие от клеток с концевым ростом, где включение вновь образующегося материала клеточной стенки осуществляется, в основном, в кончике клетки. На основании совокупности представленных данных можно сделать вывод о том, что в ходе интрузивного удлинения волокно растёт диффузно.

Таблица 1. Частота встречаемости плазмодесм на стадиях координированного и интрузивного роста флоэмного волокна.

Тип роста	Клеточная стенка между клетками	Длина клеточной стенки, мкм	Число плазмодесм	Частота встречаемости плазмодесм
Координированный рост	Волокно-волокно	982.7	35	0.036
	Волокно-паренхима	553.6	47	0.085
Интрузивный рост	Волокно-волокно	703.6	0	0
	Волокно-паренхима	502.2	0	0

2.3. Характеристика субклеточной организации волокон на стадии интрузивного роста

Субклеточная организация интрузивно растущего волокна, проанализированная нами, свидетельствует об активном метаболизме клетки (рис. 4). В волокне активизируются хлоропласты: на стадии интрузивного роста в них значительно сильнее развита система гран, чем при координированном росте; появляются крахмальные зерна. Активизация фотосинтетического аппарата может быть связана с симпластической изоляцией и необходимостью в большей мере переходить на самообеспечение ассимилятами. В цитоплазме наблюдаются скопления митохондрий и активный шероховатый эндоплазматический ретикулум.

Однако самой отличительной особенностью интрузивно растущих волокон является существенное возрастание числа ядер (рис. 5), которое происходит за счет асинхронных делений. Проанализировали число ядер в 36 волокнах различной длины (от 6 до 52 мм), предварительно убедившись в целостности клеток.

Минимальное количество ядер в индивидуальной клетке было равно 29, максимальное – 175; средняя длина выделенных в этом эксперименте волокон составила 17 ± 8 мм, число ядер в одной клетке - 77 ± 29 штук. Такое количество ядер не имеет аналогов среди других типов клеток вегетативных органов растений. Его можно было бы объяснить необходимостью масштабной своевременной доставки

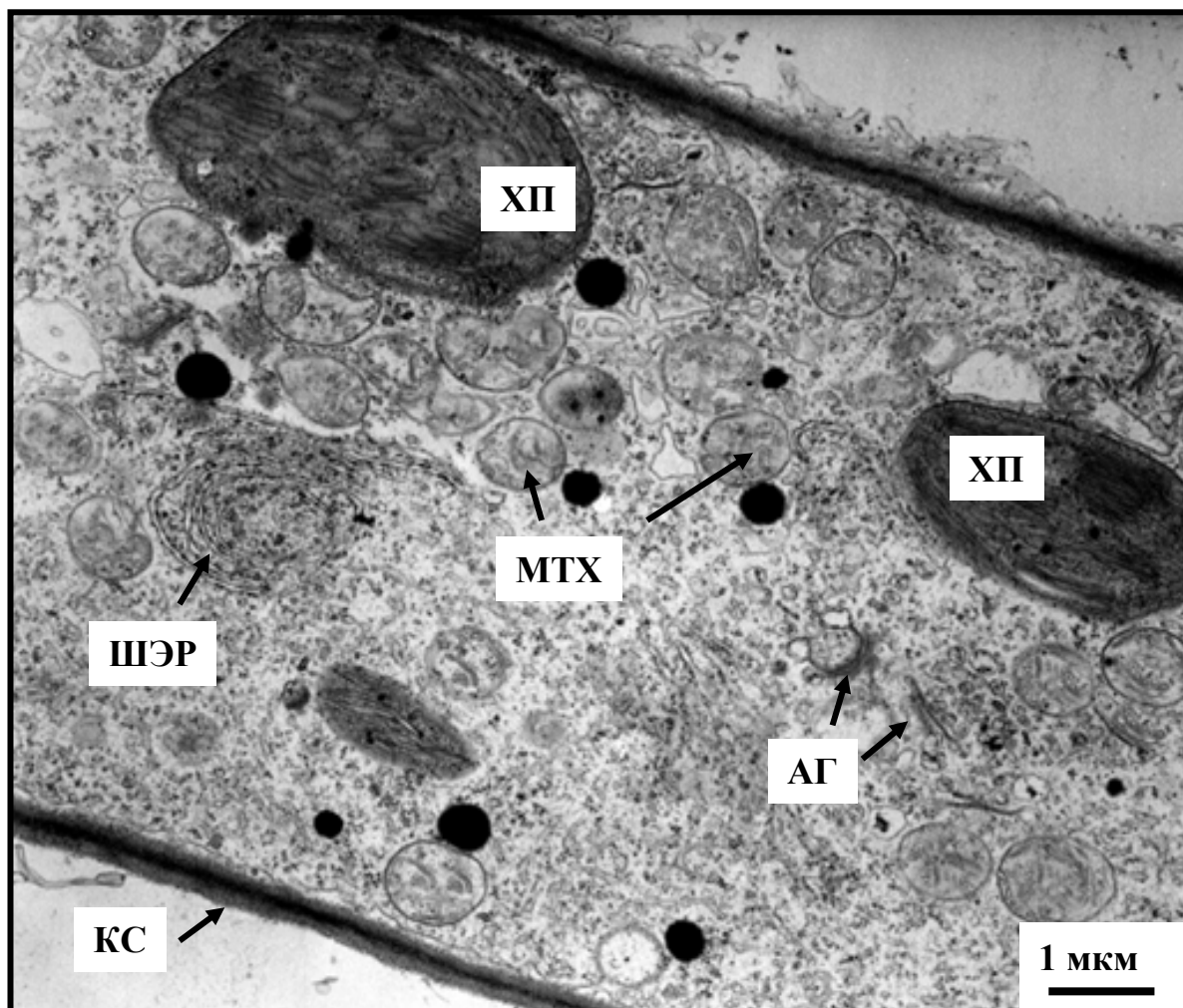


Рисунок 4. Продольный срез волокна льна-долгунца на стадии интрузивного роста. На фотографии представлены скопления митохондрий (МТХ), хлоропласты (ХП), аппарат Гольджи (АГ), шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР). КС - клеточная стенка.

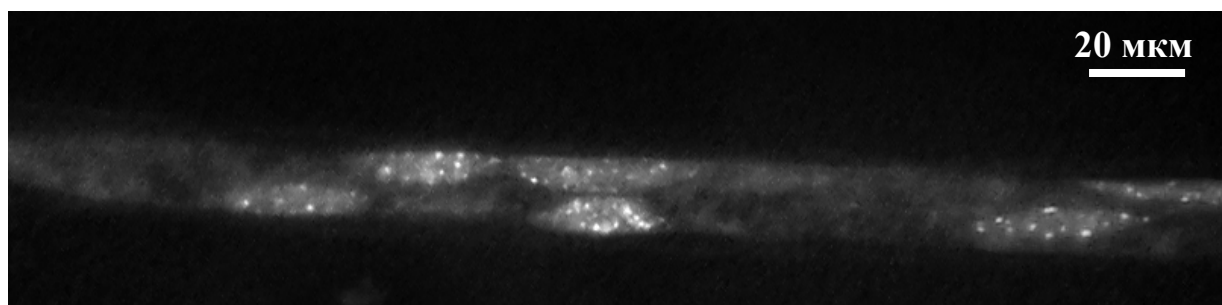


Рисунок 5. Группа ядер, окрашенных DAPI, в интрузивно растущем волокне льна-долгунца.

транскриптов для обеспечения высокой скорости роста. Однако известны другие типы клеток (трихомы, растущие протрузивно), достигающие сходной длины, но имеющие одно ядро (Ryser, 1999). В наших исследованиях между длиной волокон и числом ядер обнаружена положительная корреляция ($r=+0.6$), означающая, что связь между длиной волокон и количеством в них ядер все-таки существует. Возможно, столь значительное количество ядер в индивидуальной клетке связано именно с интрузивным характером роста и необходимостью, например, интенсивного синтеза осмотически активных веществ для обеспечения повышенного тургорного давления в растущем волокне.

2.4. Формирование пучков волокон

Ниже «точки слома», когда волокна перестают удлиняться и переходят к формированию вторичной клеточной стенки, на поперечном срезе стебля хорошо видны пучки волокон. Они разделены радиальными прослойками паренхимы, а с наружной стороны ограничены слоем клеток обкладки. Число волокон в пучке на поперечном срезе может колебаться от 10 до 30; количество пучков на срезе – от 20 до 40. Таким образом, число волокон на поперечном срезе ниже «точки слома» обычно составляет - 600-700.

В ходе исследований формирования пучков провели анализ последовательных поперечных срезов апикальной части стебля льна-долгунца. Обнаружили, что на расстоянии 2 мм от апекса (рис. 6 а), когда координированный рост завершен и начинается интрузивный, пучки волокон почти не визуализируются. Видны лишь единичные интрузивно растущие волокна. Слой клеток, который можно было бы идентифицировать как обкладку, отсутствует. Но уже на расстоянии 15 мм от апекса волокна образуют пучки с хорошо заметными клетками обкладки (рис. 6 б). В этой области число волокон на поперечном срезе уже составляет 80% от числа волокон на поперечном срезе ниже «точки слома». Это означает, что формирование пучков происходит именно в ходе интрузивного роста волокон, и что основная часть волокон удлиняется тогда, когда идет координированный рост окружающих тканей.

Флоэмные волокна льна образуются из прокамбия (Эсау, 1943). Они возникают на границе листового примордия; затем прокамбий по мере дальнейшего роста распространяется к верхушке листового зачатка и вниз по стеблю. При этом молодой прокамбиальный пучок сливается с другими пучками, возникшими ранее, образуя непрерывную сеть. Подобную анастомозную сеть формирует и первичная флоэма. Так как волокна образуются из прокамбия, можно было предположить, что пучки флоэмных волокон также формируют похожую непрерывную сеть.

Чтобы решить этот вопрос, использовали тангентальные срезы стебля выше «точки слома», а также отделенную от ксилемы волокнистую часть стебля ниже «точки слома» (рис. 7). Проанализировали двадцать трёхсантиметровых отрезков волокнистой части стебля. Обнаружили, что пучки волокон располагаются отдельно друг от друга, формируя «столбы»; при этом клеточные анастомозы отсутствовали.

Выросты индивидуальных волокон за пределы пучков не наблюдали; их наличие было бы неизбежно, если бы каждое волокно росло, самостоятельно прокладывая свой путь. Судя по полученным данным, волокна растут в тесной взаимосвязи друг с другом и используют при интрузивном проникновении пути, проложенные ранее удлинившимися волокнами.

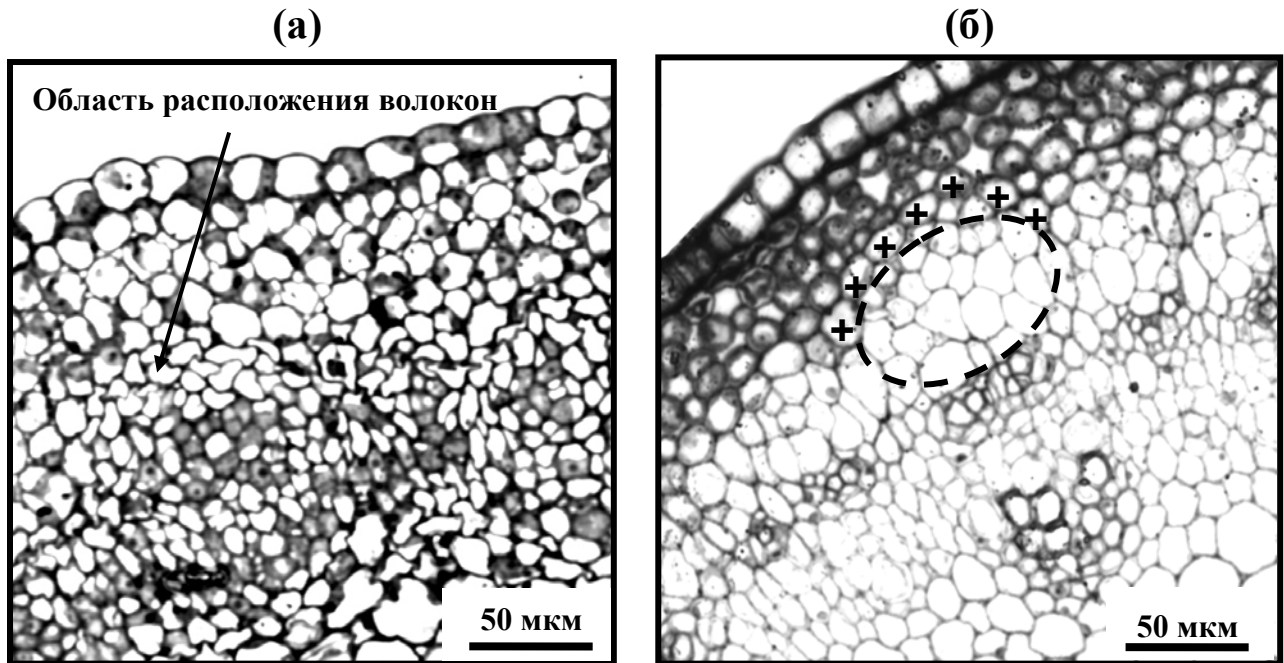


Рисунок 6. Поперечные срезы стебля льна-долгунца в области интрузивного роста волокон. а - 2 мм от апекса, б - 15 мм от апекса. Пунктиром на фото (б) обозначены волокна. ...+.- на фото (б) обозначены клетки обкладки.

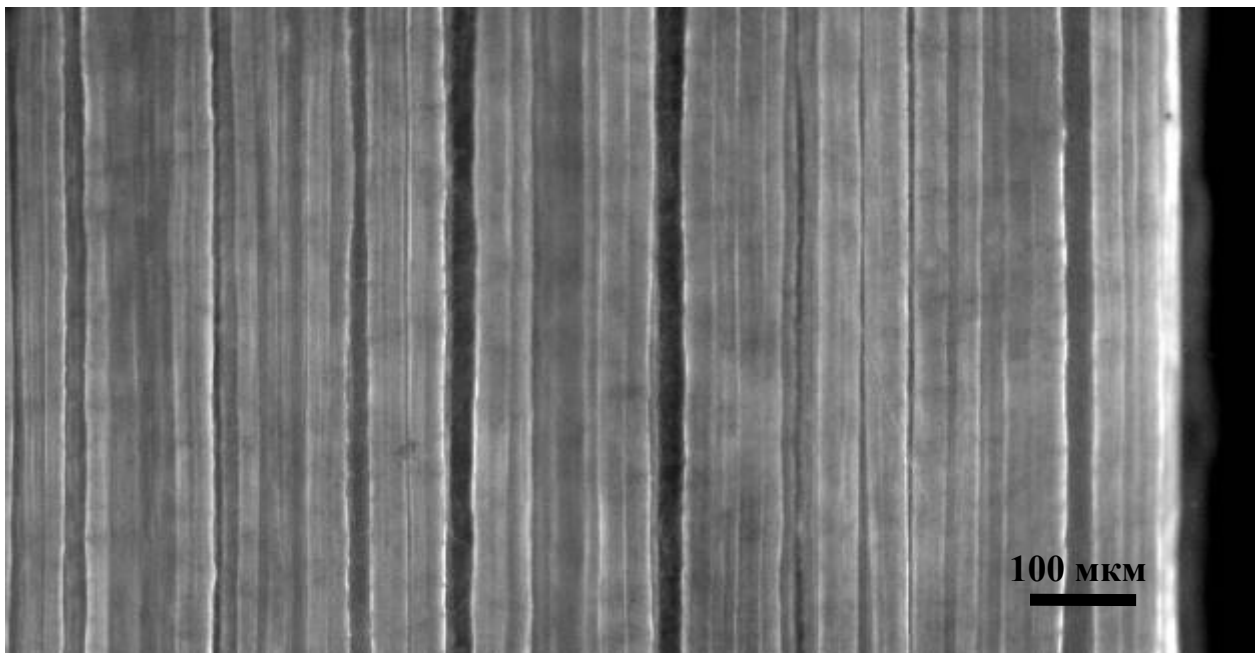


Рисунок 7. Пучки волокон, отделенные от ксилемы после мацерации стебля льна-долгунца и окрашенные Cellofluor.

2.5 Определение длины индивидуальных флоэмных волокон и расчет скорости их интрузивного удлинения

Для определения скорости роста индивидуальных клеток обычно измеряют под микроскопом их длину и оценивают её изменения за определенные промежутки времени (Иванов, 1974). В случае волокон задача усложняется, поскольку измерить их длину становится невозможным уже вскоре после начала интрузивного роста. В связи с этим размеры этих клеток оценивали в конце онтогенеза растения, когда все волокна уже имеют хорошо сформированную клеточную стенку, становясь достаточно прочными, что делает возможным выделение индивидуальных неповрежденных волокон для репрезентативной выборки. Установив в наших исследованиях среднюю длину волокон (20 мм), отрезок стебля, где интрузивный рост идет с высокой эффективностью (верхние 20 мм стебля) и скорость роста стебля (10 мм/сутки), можно рассчитать среднюю (формула 1) и относительную (формула 2) скорость (Иванов, 1974) интрузивного роста волокон.

К началу интрузивного удлинения волокна имеют длину около 0.1мм – (l), которую они достигают за счет координированного с окружающими тканями роста. Конечная длина клетки (L) составляет, в среднем, 20 мм. Среднее время интрузивного роста (Δt) 48 часов. Соответственно средняя скорость (формула 1) интрузивного роста волокон составляет $V(cp) = (20 - 0.1) / 48 = 0.4$ мм/ч.

Относительная скорость роста по формуле (2) $k = 1/48 \times \ln(20/0.1) = 0.11$ час⁻¹; эта цифра означает, что за час интрузивно растущее волокно удлиняется на 11% своей длины.

Определить скорость удлинения волокон во время координированного

роста пока не представляется возможным; поскольку неизвестна ни исходная длина клеток, ни время осуществления процесса. Известно лишь, что он продолжается не более нескольких часов, а конечная длина клеток 100 мкм. Можно предположить, что скорость координированного роста волокон такая же, как и для окружающих тканей и лежит в пределах величин, характерных для растущих клеток апикальной части двудольных растений, т.е. порядка 0.006 - 0.009 час⁻¹ (Иванов, 1997).

2.6. Длина участка стебля до «точки слома» как индикатор длины флоэмных волокон

Нами установлено, что длина отрезков стебля от апекса до «точки слома» у разных генотипов рода *Linum* варьирует от 50 до 190 мм. Этот показатель может быть связан с длиной формируемых волокон, поскольку интрузивный рост волокон льна осуществляется только выше «точки слома» (Gorshkova, 2003).

$$(1) \quad V(cp) = (L - l) / \Delta t,$$

где Δt - время роста клетки,
 l - начальная длина клетки,
 L - конечная длина клетки,

$$(2) \quad k = 1 / \Delta t \times \ln \frac{l(t + \Delta t)}{l(t)},$$

где l - начальная длина клетки,
 Δt - время роста клетки,
 $l(t + \Delta t)$ - конечная длина клетки,
 $l(t)$ - начальная длина клетки.

Для проверки этого предположения провели анализ длин волокон в 25 образцах льна из коллекции ВИР, включавших представителей долгунцов и масличных культур вида *L. usitatissimum*, а также два диких вида - *L. flavum*, и *L. perenne*. Выделение неповрежденных интрузивно растущих волокон практически невозможно из-за тонкой клеточной стенки. Для анализа длин волокон использовали отрезки стеблей растений на стадии желтой спелости, когда волокна сформировали вторичную клеточную стенку. Этот отрезок по месторасположению соответствовал участку стебля от апекса до «точки слома», отмеченному в период быстрого роста. Средняя длина волокон у долгунцов составила 24 ± 2 мм, при средней длине отрезка стебля от апекса до «точки слома» - 130 ± 30 мм, тогда как у масличных сортов - 18 ± 2 мм и - 77 ± 12 мм, соответственно.

На рисунке 8 приведены графики распределения длин волокон льна-долгунца (сорт ВИР-9), масличного (сорт К3002) и дикого вида льна *L. flavum*. У льна-долгунца длина отрезка стебля до «точки слома» составляла 190 ± 8 мм, средняя длина волокон - 27 ± 13 мм, самое длинное волокно - 90 мм. Доля волокон длиннее 35 мм составила 25%. У масличного сорта длина отрезка стебля от апекса до «точки слома» составляла 65 ± 5 мм, средняя длина волокон - 15 ± 8 мм, самое длинное волокно - 74 мм. Доля волокон длиннее 35 мм составила 7%, что в несколько раз меньше, чем у льна-долгунца. Длина отрезка стебля от апекса до «точки слома» у *L. flavum* составляла 58 ± 10 мм, средняя длина волокон - 4 ± 3 мм, самое длинное волокно - 30 мм.

Во всех исследованных 25 образцах средняя длина волокон, а особенно, доля длинных волокон, положительно коррелировала с размером отрезка стебля от апекса до «точки слома» ($r=+0.6$ и $r=+0.7$ соответственно). Таким образом, положение на стебле «точки слома» может служить индикатором длины формирующихся волокон.

2.7. Поиск метода для оценки интрузивного роста волокон *in vitro* и *in situ*

Исследования механизмов и регуляции интрузивного роста флоэмных волокон могло бы значительно продвинуться при постановке методов культивирования волокон. Индивидуальные волокна можно было бы использовать для биохимических и молекулярно-генетических анализов. К сожалению, воспроизвести интрузивный рост волокон *in vitro* пока никому не удалось. С целью не воспроизвести, а поддержать интрузивный рост волокон, мы культивировали отрезки стебля льна, надеясь, что концы не задеты при срезании растущих интрузивно клеток появятся на поверхности среза стебля. Варьировали многочисленные параметры культивирования. Отрезки стебля растения в большинстве случаев не теряли тургор и вырастали, в среднем, на 1 см в сутки, однако, выросших волокон ни в одном варианте не обнаружили. Мы предположили, что интрузивный рост чувствителен к стрессу и быстро останавливается при повреждении стебля, что получило подтверждение в дальнейших исследованиях с

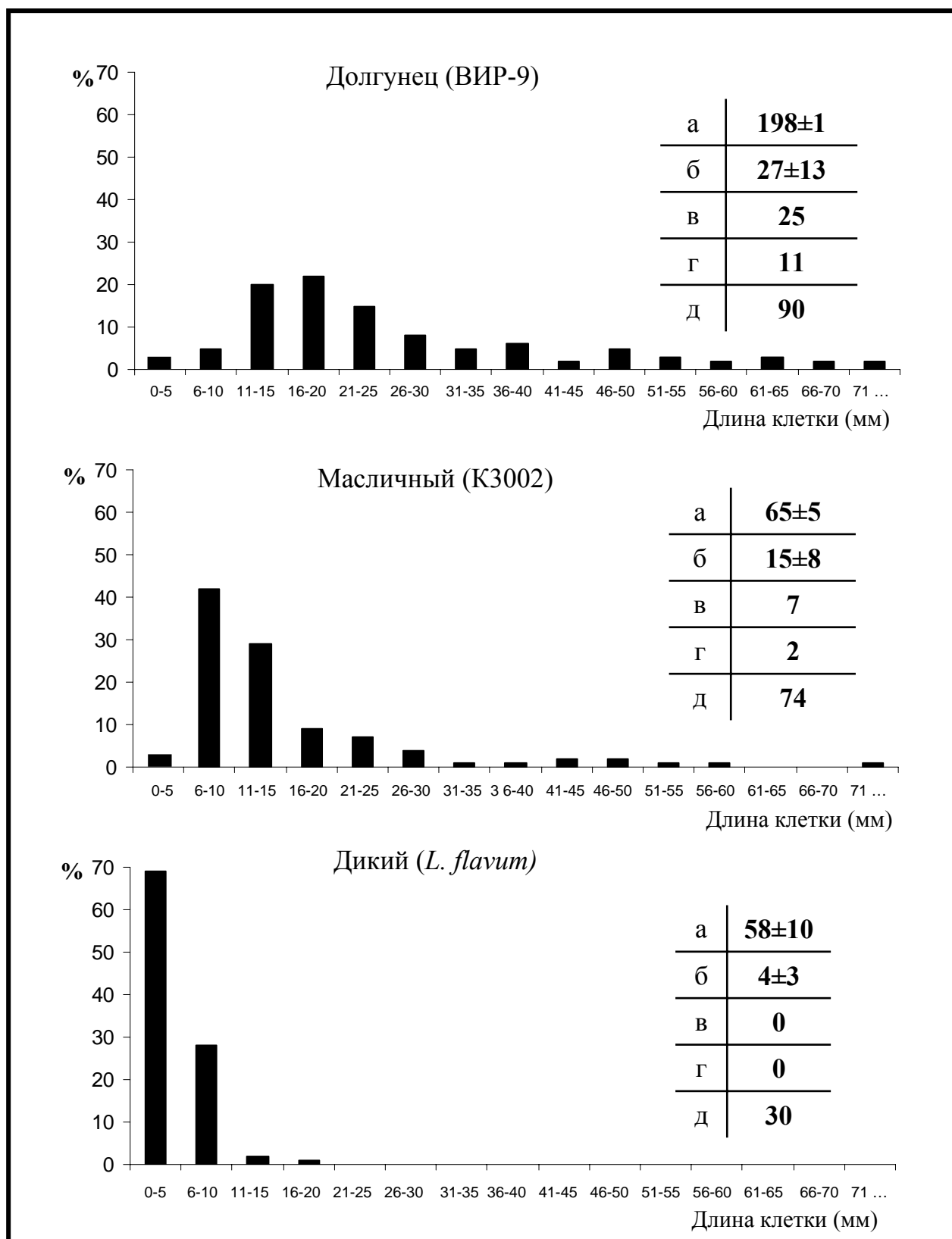



Рисунок 8. Распределение длин индивидуальных волокон у различных генотипов рода *Linum*. В таблицах обозначены следующие параметры: а - средняя длина отрезка стебля от апекса до «точки слома» (мм), б - средняя длина волокон (мм), в - доля волокон длиннее 35 мм в %, г - доля волокон длиннее 50 мм в %, д - самое длинное волокно.

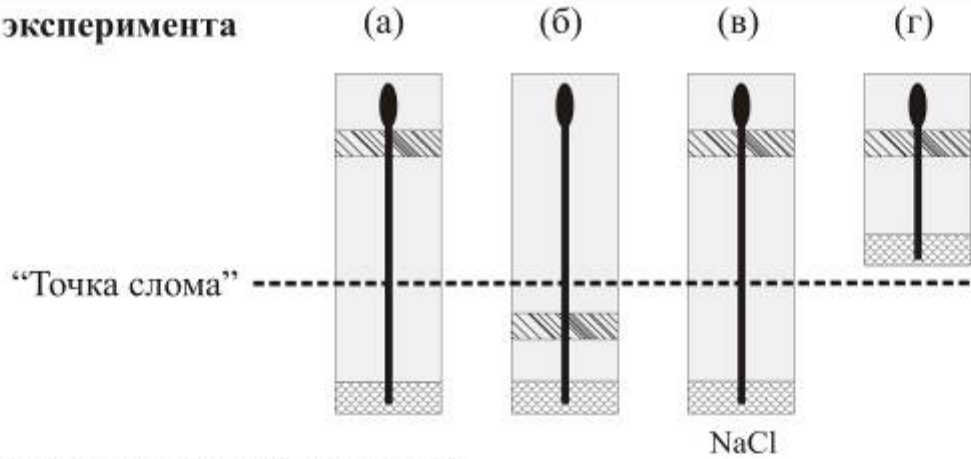
использованием метода ЯМР. При интрузивном росте волокна внедряются между окружающими клетками; это значит, что число клеток на поперечном срезе должно увеличиваться. Следовательно, интрузивный рост волокон можно оценить с помощью метода световой микроскопии, определяя число волокон на поперечном срезе стебля в ходе онтогенеза растения. Именно с помощью этого метода в нашей лаборатории были охарактеризованы стадии развития волокна и установлено, что волокно растёт интрузивно только до «точки слома» (Gorshkova et al., 2003). Но у этого метода есть недостатки: низкая пропускная способность, длительность анализа, сложность идентификации волокон в области, где интрузивный рост наиболее интенсивен.

Увеличение числа барьерных структур (клеточных стенок, мембран и т. д.) на поперечном срезе растения может быть охарактеризовано методом спинового эха ЯМР, который активно применяется для исследования транспорта воды в растительных объектах. Этот метод, в сочетании с импульсным градиентом магнитного поля, позволяет регистрировать трансляционное диффузионное перемещение молекул. Наличие в образце барьерных структур создает ограничения для диффузионного перемещения молекул воды, что отражается в изменениях формы и скорости диффузионного затухания эха. Причем при минимально достижимом времени диффузии при анализе диффузионного затухания в диапазоне 2-3 порядков величины проявляется медленно затухающая компонента, обязанная ограничениям пристеночных молекул диффузанта. При постоянном времени диффузии и прочих равных условиях доля медленной пристеночной компоненты увеличивается с ростом числа ограничивающих структур. Эти соображения свидетельствуют о возможности использования метода ЯМР для оценки интрузивного роста волокон *in situ*.

Сравнили динамику диффузионного затухания в участках стебля выше и ниже «точки слома». При этом использовали растения, срезанные существенно ниже «точки слома». Анализ кривых, характеризующих диффузионное затухание, для участка стебля выше «точки слома» (рис. 9.3 а) показал последовательное увеличение доли медленной компоненты. Ниже «точки слома» (рис. 9.3 б) увеличение доли медленной компоненты отсутствовало. Число волокон на поперечных срезах стебля в зоне интрузивного роста составило 514 ± 9 и за сутки возросло до 640 ± 8 (рис. 9.2 а). Число волокон на поперечных срезах стебля ниже «точки слома» было равно 740 ± 14 и не изменялось со временем (рис. 9.2 б). По-видимому, увеличение доли медленной компоненты диффузионного затухания

Рисунок 9 (справа). Применение метода ЯМР для оценки интрузивного роста волокон *in situ*. Измерение диффузионного затухания сигналов спинового эха проводили: а, в, г - выше «точки слома», б - ниже «точки слома», при условии, что растения срезаны а, б, в - ниже «точки слома», г - выше «точки слома»,  область измерения диффузионного затухания сигналов спинового эха и подсчета числа волокон на поперечном срезе стебля. Цифрами на графиках (3) обозначена населённость медленной компоненты диффузионного затухания.

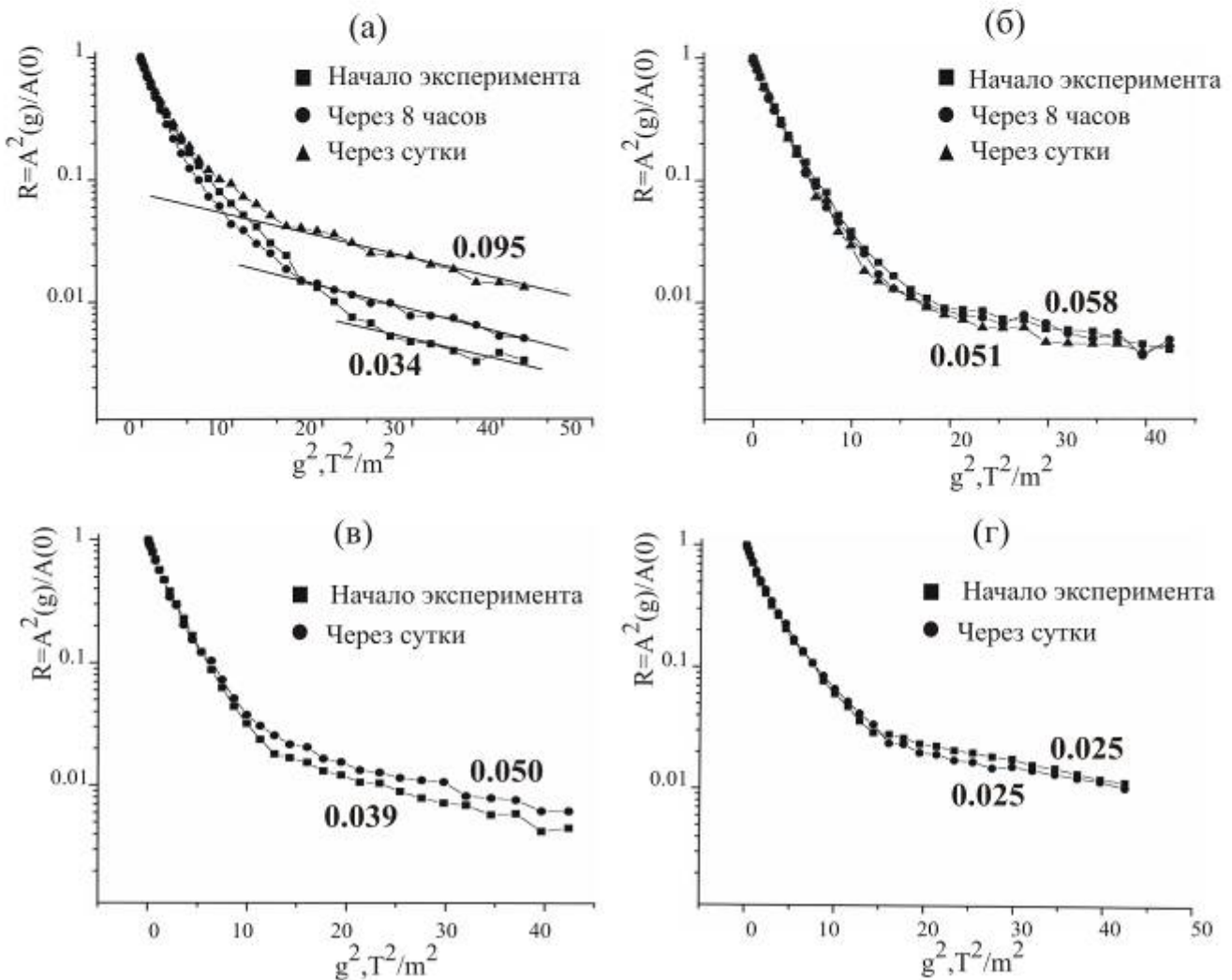
1) Схема эксперимента



2) Число волокон на поперечном срезе

	(а)	(б)	(в)	(г)
Начало эксперимента	514 ± 9	740 ± 14	514 ± 9	514 ± 9
Через сутки	640 ± 8	738 ± 17	550 ± 12	522 ± 11

3) Графики диффузионного затухания сигналов спинового эха



связано с возрастанием числа волокон на поперечном срезе стебля, поскольку оно отсутствовало в участке стебля, где волокна перестают интрузивно удлиняться. Подобную закономерность мы наблюдали при любой длине исследуемого участка стебля (при условии, что он срезан ниже «точки слома»).

Для подтверждения связи между наличием интрузивного роста и ЯМР-характеристиками, использовали искусственное торможение удлинения волокон. Для этого помещали отрезки стебля в раствор 1 М NaCl. Подобное воздействие резко снижало прирост числа волокон на поперечном срезе (рис. 9.3 в); доля медленной компоненты практически не увеличивалась (рис. 9.2 в). Совокупность полученных данных свидетельствует, что характер изменений медленной компоненты диффузионного затухания в ходе эксперимента совпадал с изменением числа волокон на поперечных срезах, а значит, метод ЯМР может быть использован для характеристики интрузивного роста волокон *in situ*.

Отсутствие прироста со временем числа волокон на поперечном срезе стебля обнаружено и в том случае, когда стебель срезали в районе «точки слома» или выше (рис. 9.2 г). При этом полностью исчезало и повышение доли медленной компоненты (рис. 9.3 г). Важно отметить, что во всех представленных экспериментах отрезки стеблей, на которых проводили измерения, за сутки вырастали, в среднем, на 1 см. Такая скорость роста характерна в наших условиях для интактных растений льна-долгунца. Это означает, что в эксперименте, в котором стебель срезали в районе «точки слома» или выше, остановкой роста на механическое повреждение отвечают только волокна, тогда как остальные ткани отрезка стебля продолжают расти. Интрузивный рост волокон реагировал не просто на поранение стебля (оно происходило и при срезании стебля ниже «точки слома», и при подготовке образца для анализа ЯМР, в ходе которой у отрезков стебля удаляли листья, задевая эпидермис стебля), а именно на повреждение интрузивно растущих волокон. Таким образом, повреждение части интрузивно растущих волокон останавливает интрузивное удлинение волокон, расположенных на значительном расстоянии от места повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе охарактеризован один из трёх типов роста растительных клеток – интрузивный рост. Для характеристики этого процесса были выбраны первичные флоэмные волокна льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) - клетки, достигающие за счет интрузивного роста длины в несколько сантиметров. Сложности в изучении интрузивного роста волокон приводят к необходимости нетривиальных подходов даже для получения простейших характеристик, таких как скорость и продолжительность, локализация в стебле, соотношение с ростом сопредельных тканей, тип удлинения клетки и т.д.

Полученные данные свидетельствуют, что интрузивный рост флоэмных волокон льна-долгунца инициируется раньше, чем заканчивается координированный рост

окружающих клеток, что предполагает персональную регуляцию скорости их роста. Известно, что растяжение любой растительной клетки определяется дисбалансом между растяжимостью клеточной стенки и величиной тургорного давления (Cosgrove, 2005). Соответственно, увеличение размеров клетки может инициироваться как возрастанием тургорного давления, так и изменением свойств клеточной стенки. Волокно расположено в толще других растущих тканей; в такой ситуации для клетки остается только одна возможность инициировать интрузивный рост – повысить тургорное давление. Поэтому можно предположить, что ключевым процессом, инициирующим интрузивный рост волокон, служит накопление в них осмотика. Для установления его природы целесообразно попытаться точно отбирать пробы из волокон и окружающих клеток для сопоставления их содержимого методами, позволяющими выявлять микроскопические количества таких потенциальных осмотиков как ионы и сахара. Повышение тургора может быть связано и с увеличением проницаемости мембран для воды за счет, например, активной работой аквапоринов (Kjellbom, 2000; Tyerman, 2002) – еще одно из возможных направлений дальнейших исследований.

Плодотворным подходом для изучения интрузивного роста может стать анализ профиля экспрессии генов с помощью микрочипов ДНК, хотя исследование интрузивного роста этим методом также сопряжено с рядом сложностей. Наиболее однозначно интерпретируются результаты в том случае, если выявляются изменение профиля экспрессии при запуске процесса. Однако собрать в достаточном для выделения РНК количестве участки стебля, в которых волокна уже существуют, но еще не растут интрузивно, да еще отделить их от апикальной меристемы, практически невозможно, поскольку размер этого участка, согласно полученным в работе данным, менее 1 мм. Можно попытаться выявить гены, содержание мРНК которых снижается при остановке интрузивного роста. Подобный подход был предложен для изучения протрузивного удлинения волосков семян хлопчатника (Zhu et al., 2003; Wilkins et al., 2004) и недавно использован канадскими коллегами для выявления дифференциальной экспрессии генов на разных стадиях развития флоэмных волокон льна (Roach, Deyholos, 2007). Эти авторы использовали в своих исследованиях экспериментальную систему, разработанную в нашей лаборатории (Gorshkova et al., 2003), и провели сравнение профиля экспрессии генов в участках стебля льна, расположенных выше и ниже «точки слома». Полученные результаты представляют безусловный интерес; хотя анализ не затронул участка стебля, в котором, судя по нашим данным, интрузивный рост происходит наиболее интенсивно. После установления полных нуклеотидных последовательностей генов, содержание мРНК которых в наибольшей степени снижается при остановке интрузивного удлинения волокон, можно будет связать эту информацию с рассуждениями о физиологических процессах, обеспечивающих интрузивный рост.

Исключительный интерес представляет изучения механизма и роли возрастания числа ядер в волокне. Понимание механизма разобщения кариокинеза и цитокинеза

в растущих волокнах может существенно расширить представления об особенностях деления растительных клеток и его регуляции. В интрузивно растущих волокнах льна при делении ядер выявлено образование на месте фрагмопласта неких вакуолеподобных структур, охарактеризованных пока только на уровне светового микроскопа (Ageeva et al., 2005).

Установленный диффузный характер удлинения волокна в ходе интрузивного роста позволяет сосредоточиться на анализе характерных для этого процесса механизмов. Можно предполагать наличие в волокнах специфичных изоформ ферментов и белков, обеспечивающих растяжение клеточной стенки, например экспансинов и ксилоглюкантрансгликозилаз.

Выявлена возникающая на стадии интрузивного роста симпластическая изоляция волокон, которая должна приводить к особенностям их метаболизма и субклеточной организации. Вместе с тем, при отсутствии плазмодесм, волокна хорошо “взаимодействуют” между собой: в сериях экспериментов с использованием методов культивирования *in vitro* и ЯМР было обнаружено, что механическое повреждение части интрузивно растущих волокон останавливает интрузивное удлинение волокон, удаленных от места повреждения. Вероятно, именно поэтому нам не удалось поддержать интрузивный рост волокон при культивировании отрезков стебля. Такое поведение волокон свидетельствует, что должна существовать система передачи сигнала между этими клетками. Природу сигнала можно пока лишь предполагать, но ясно, что он передаётся не по симпласту, так как, судя по нашим результатам, в ходе интрузивного роста волокна становятся симпластически изолированными.

По полученным результатам составлена таблица, суммирующая характеристики волокон на стадии координированного и интрузивного роста (табл. 2).

Таблица 2. Сопоставление характеристик волокон на стадии координированного и интрузивного роста.

Параметр \ Стадия	Координированный рост	Интрузивный рост
Положение на стебле	0.3- 1 мм от апекса	1 мм от апекса –до «точки слома»
Продолжительность	Менее суток	2-3 суток
Форма клетки	Вытянутая с тупыми концами	Вытянутая с заострёнными концами
Длина клетки	0.1-0.2 мм	0.2-<100 мм
Ширина клетки	4-7 мкм	7-20 мкм
Деление ядер	Синхронное	Асинхронное
Расположение микротрубочек	Поперечное	Поперечное Спиральное
Ориентация актиновых филаментов	Продольная	Продольная
Активность хлоропластов	Неактивные	Активные
Присутствие плазмодесм	есть	нет

ВЫВОДЫ

1) Интрузивный рост флоэмных волокон льна-долгунца инициируется раньше, чем заканчивается координированный рост окружающих клеток, и продолжается у большинства волокон до конца области координированного растяжения тканей стебля; ниже этой области лишь доля волокон продолжает удлиняться до «точки слома».

2) Интрузивный рост флоэмных волокон льна осуществляется всей поверхностью клетки, о чем свидетельствуют, в частности, отсутствие зональности в расположении органелл и поперечная ориентация микротрубочек в кончике клетки.

3) Плазмодесмы, присутствующие в клеточной стенке волокон льна на стадии координированного роста, в ходе интрузивного удлинения исчезают по всей поверхности клетки, что приводит к симпластической изоляции волокон.

4) На стадии интрузивного роста в волокнах резко возрастает количество ядер, число которых в индивидуальной клетке может достигать 175. Установлена положительная корреляция между длиной волокна и количеством ядер в клетке.

5) Длина волокон у различных генотипов льна колеблется в диапазоне от 3 до 100 мм; существует положительная корреляция между средней длиной волокон, а особенно долей длинных волокон, и размером отрезка стебля от апекса до «точки слома».

6) Формирование пучков волокон происходит именно в ходе интрузивного роста. Отсутствие выростов индивидуальных волокон за пределы пучков свидетельствует о том, что в ходе интрузивного роста волокна растут в тесной взаимосвязи друг с другом и используют при интрузивном проникновении пути, проложенные ранее удлинившимися волокнами.

7) Метод ЯМР может быть использован для характеристики интрузивного роста волокон *in situ*. Увеличение доли медленной компоненты диффузионного спада в ходе эксперимента связано с увеличением числа волокон на поперечных срезах.

8) Механическое повреждение части интрузивно растущих волокон останавливает интрузивное удлинение других волокон, расположенных на значительном расстоянии от места повреждения, что позволяет предполагать наличие системы передачи сигнала между волокнами.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Стадии формирования лубяных волокон *Linum usitatissimum* L. / Т.А. Горшкова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Н.В. Павленчева, **А.В. Снегирева**, Т.Е. Чернова, С.Б. Чемикосова // Бот. журн. - 2003. - Т 88. - N. 12. - С. 1-11.

2. Intrusive growth of flax phloem fibers is of intercalary type./ Ageeva M.V., Petrovská B., Kieft, H., Salnikov V.V., **Snegireva A.V.**, van Dam J.E.G., Emons, A.M.C., Gorshkova T.A., van Lammeren A.A.M. // *Planta*. - 2005. - V. 222. - P. 565-574.

3. Использование метода ЯМР для характеристики интрузивного роста растительных волокон / **А.В. Снегирёва**, М.В. Агеева, В.Н. Воробьев, А.В. Анисимов, Т.А. Горшкова // *Физиология растений*. - 2006. - Т 53. №2. - С. 1-7.

4. Ультраструктурная характеристика роста и развития лубяных волокон льна. / М.В. Агеева, **А.В. Снегирева**, Т.Е. Чернова, Т.А. Горшкова // V Всероссийского съезда физиологов растений: Сб. тезисов. – Пенза, 2003. - С. 369.

5. Волокна склеренхимы: стадии развития. / Т. Е. Чернова, **А. В. Снегирева**, М.В. Агеева, Т.А. Горшкова, А.П. Ситников // *Материалы VIII Молодежной конференции ботаников*. - Санкт-Петербург, 2004. - С. 114.

6. Исследование волокон склеренхимы как предпосылка улучшения качества волокон льна / С.Б. Чемикосова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Н.В. Павленчева, Т.Е. Чернова, **А.В. Снегирева**, Т.А. Горшкова // *Материалы международной научно-практической конференции. Вопросы улучшения качества льна-долгунца*. – Торжок, 2005. - С. 20-32.

7. Характеристика интрузивного роста флоэмных волокон льна-долгунца *Linum usitatissimum* L. / **А.В. Снегирева**, М.В. Агеева, В.В. Сальников, А.В. Анисимов, В.Н. Воробьев, Т.А. Горшкова // *Материалы международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы. Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы*. Сб. тезисов. Ч.1. – Казань, 2006. - С. 159.

8. Диффузный характер удлинения флоэмных волокон льна-долгунца *Linum usitatissimum* L. / **А.В. Снегирёва**, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Т.А. Горшкова // *Материалы I(IX) Международной конференции молодых ботаников*. - Санкт-Петербург, 2006. - С. 199.

9. Использование метода ЯМР для характеристики интрузивного роста растительных волокон. / **А.В. Снегирёва**, М.В. Агеева, А.В. Анисимов, В.Н. Воробьев, Т.А. Горшкова // 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН. Сб. тезисов.– г. Пущино, 2006. – С. 119.

10. Биоэлектрическая составляющая сигнальных систем в координации развития растительных волокон. / **А.В. Снегирева**, Т.Е. Чернова, А.В. Анисимов, В.Н. Воробьев, Т.А. Горшкова // Второй международный симпозиум. Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете. Сб. тезисов. - Казань, 2006. - С. 207.

11. Биогенез волокон склеренхимы / Т.Е. Чернова, **А.В. Снегирёва**, Н.Е. Мокшина, Т.А. Горшкова // *Материалы годовичного собрания физиологов растений*. - Ростов на Дону, 2006. – С. 159-160.

12. Интрузивный рост растительных волокон. / **А.В. Снегирёва**, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Т.А. Горшкова, А.В. Анисимов, В.Н. Воробьев // *Материалы VI съезда Общества физиологов растений России*. – Сыктывкар, 2007. –С. 366.

13. Биогенез растительных волокон / Т.Е. Чернова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, **А.В. Снегирева**, С.Б. Чемикосова, О.П. Гурьянов, Т.А. Горшкова // *Материалы VI съезда Общества физиологов растений России*. – Сыктывкар, 2007. - С. 168.