

ТЕХНИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СКОРОСТИ РОСТА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНЕГО ПОВЫШЕННОГО ДАВЛЕНИЯ

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе представлен технический и методический подход для исследования скорости роста растительных клеток под воздействием внешнего гидростатического давления, как одного из важных термодинамических параметров роста. Данный подход включает использование оригинальной камеры давления, адаптированной под оптический микроскоп и газовую систему для подачи и сброса давления. В работе приведена подробная конструкция и чертёж разработанной камеры, а также схема проведения эксперимента с её использованием, включая описание дополнительных технических и программных средств. Использование данной камеры позволяет исследовать изменение размеров и скорость роста растительных клеток в динамике непосредственно при изменении внешнего давления в диапазоне от 0,1 до 1 МПа. Представлены некоторые результаты исследования воздействия повышенного гидростатического давления на рост растительных клеток, полученные с использованием данного технического и методического подхода. В частности, на примере корней проростков кукурузы показано, что повышение внешнего давления до 0,3 МПа вызывает ускорение роста растяжением в клетках эпидермиса корня. Оценены перспективы дальнейшего использования разработанной системы применительно к исследованиям ростовых процессов в растительных тканях.

Ключевые слова: камера давления, растительные клетки, рост растяжением.

Рост растений – это сложный физиологический процесс, который часто является чувствительным индикатором воздействия окружающей среды [1]. Влияние абиотических факторов на ростовые процессы в растениях, таких как температура, влажность, освещение и т.д. привлекает внимание многих исследователей и является важным направлением биологических исследований [2-5], а изучение ростовых процессов в динамике и непосредственно под воздействием внешних факторов представляет особый интерес. Рост растяжением является отличительной особенностью растительных клеток. В результате роста растяжением длина клеток может увеличиваться в десятки и в сотни раз, что обеспечивает высокие темпы роста растений. При этом важную роль в данном процессе играет фактор давления [6]. В первую очередь это тургорное давление (гидростатическое давление внутри клеток), которое является механическим стимулом растяжения клеточной стенки и, соответственно, увеличения длины клеток [7]. Величина тургорного давления в клетках растений может достигать нескольких атмосфер. Предполагается, что кроме тургорного давления важным параметром в процессе роста клеток растяжением является внеклеточное давление в растительных тканях (апопластное давление), которое обычно отличается от атмосферного давления и может изменяться в пределах суток [8-10]. Результаты математического моделирования роста клеток в тканях растений показывают, что изменения внеклеточного давления могут модулировать скорость роста клеток растяжением. В частности, согласно модели, резкое увеличение внеклеточного давления должно приводить к увеличению скорости роста клеток в зоне растяжения [8]. Экспериментальное подтверждение роли фактора давления в ходе роста клеток растяжением, очевидно, предполагает воздействие на исследуемый образец внешнего давления различной величины в пределах физиологических значений. Для реализации данной задачи в лабораторных условиях была разработана и изготовлена камера давления, позволяющая проводить непрерывное измерение скорости роста клеток в тканях растений непосредственно при воздействии внешним давлением до 1 МПа. На рисунке 1 представлен чертёж поперечного сечения камеры.

Камера имеет цилиндрическую форму с диаметром основания 80 мм и высотой 35 мм. Корпус камеры изготовлен из алюминиевого сплава (Al-Cu-Mg). В нижнем и в верхнем основании камеры на резиновые прокладки (2) устанавливаются съёмные, прозрачные, кварцевые стёкла марки КУ-1. Диаметр стёкол 65 мм, толщина нижнего стекла (1) составляет 6 мм, толщина верхнего стекла (5), через которое осуществляется наблюдение за образцом, составляет 2 мм. Таким образом, камера имеет прозрачное дно и верх. Для герметизации камеры стекла снизу и сверху прижимаются с помощью винтов к основному корпусу камеры алюминиевыми дисками (3) с круглыми центральными отверстиями диаметром 50 мм для нижнего диска и 30 мм для верхнего. Данная конструкция позволяет измерять скорость роста отдельных клеток в тканях с помощью оптического микроскопа. Стоит отметить, что вышеуказанная толщина стёкол обеспечивает оптимальное значение требуемой величины давления и приближения к объективу микроскопа. В боковой части алюминиевого корпуса выполнено отверстие диаметром 1,5 мм с тонкой иглой для медленной подачи и сброса давления. Через штуцер (4) камера подсоединяется с помощью пневмомагистрали к газовой системе, состоящей из баллонов с воздухом, манометров, редукторов и электроклапанов для подачи и сброса давления.

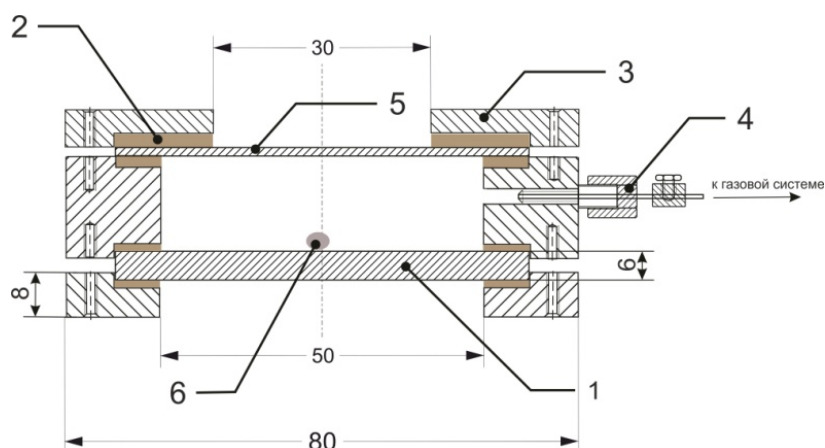


Рисунок 1. Поперечное сечение камеры давления: 1 – кварцевое прозрачное стекло марки КУ-1, 2 – резиновые уплотнительные прокладки, 3 – диск из алюминиевого сплава (Al-Cu-Mg), 4 – штуцер с встроенной иглой для подачи и сброса давления, 5 – верхнее, тонкое кварцевое стекло марки КУ-1, 6 – исследуемый растительный образец

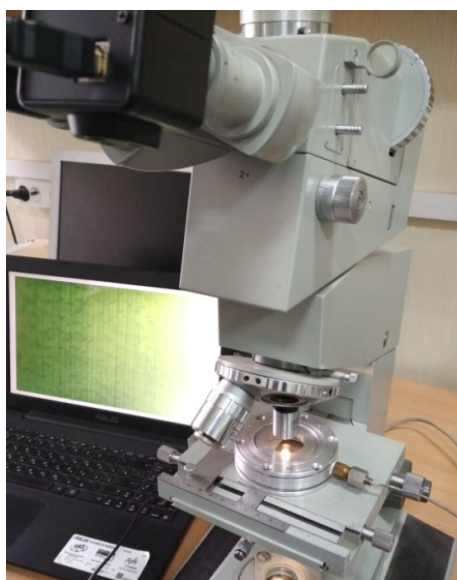


Рисунок 2. Фотография камеры давления, установленной под объектив оптического микроскопа, оснащённого цифровой видеокамерой

Ход эксперимента по воздействию внешнего избыточного давления на скорость роста растительных клеток осуществляется следующим образом: исследуемый образец, в частности сегмент корня растений, содержащий зону растяжения, укладывается на прозрачное дно камеры и частично накрывается слоем фильтровальной бумаги для фиксации. Далее, камера закрывается прозрачным верхним стеклом, которое через резиновую прокладку герметично зажимается алюминиевым диском с помощью винтов. После помещения образца камера устанавливается под объектив оптического микроскопа, оснащённого цифровой видеокамерой (рис. 2) и подсоединяется к газовой системе для подачи и сброса давления.

Через определённые временные интервалы происходит фотографирование клеток эпидермиса корня при нормальном давлении (контроль), а затем при повышении внешнего давления в диапазоне от 0,1 до 1 МПа. Полученные изображения клеток обрабатываются с помощью программного обеспечения MacBiophotonics ImageJ. Для вычисления скорости роста на первом полученном изображении выбирается некоторое количество хорошо просматриваемых клеток и вычисляются их исходные размеры. Далее производится сравнение со следующими изображениями, сделанными при одном и том же разрешении, и определяется изменение размеров исходно выбранных клеток в ходе роста растяжением (рис. 3).

Инструменты программы MacBiophotonics ImageJ позволяют производить вычисление размеров клеток как вручную (по проставленным меткам, соответствующим границам клеток), так и автоматически путём вычитания изображений.

На рисунке 4 показано изменение длины и ширины клеток эпидермиса корня из зоны растяжения 7-ми дневных проростков растений кукурузы в контроле (при нормальном атмосферном давлении) и после 5-ти часов воздействия внешним давлением величиной 0,3 МПа. Как видно из рисунка повышение внешнего давления вызывает заметное увеличение длины клеток по сравнению с контролем, что свидетельствует об ускорении роста

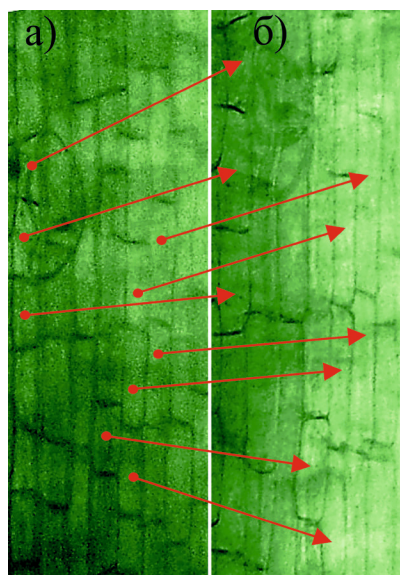


Рисунок 3. Фотографии клеток эпидермиса корня кукурузы из зоны растяжения: а) – контроль (до повышения давления), б) – те же клетки через 5 часов после повышения давления до 0,3 МПа

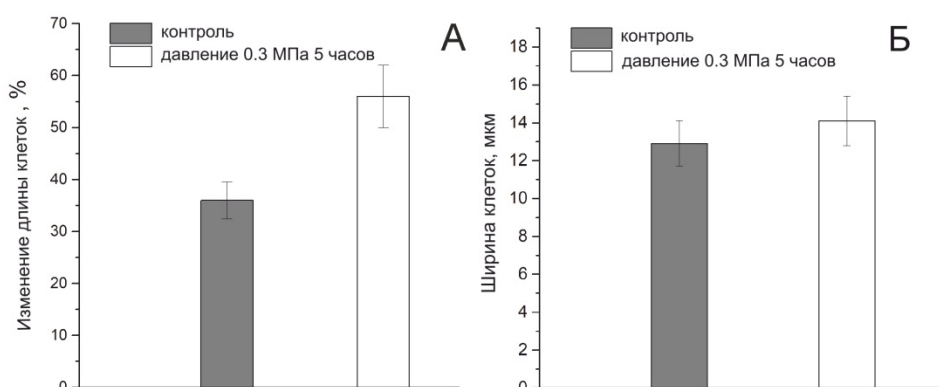


Рисунок 4. Изменение длины клеток (в процентах по отношению к начальному значению) и ширины клеток эпидермиса корня кукурузы из зоны растяжения через 5 часов роста при нормальном атмосферном давлении (контроль) и при повышенном давлении 0,3 МПа

клеток растяжением. Стоит отметить, что данный эффект ускорения роста наблюдается практически сразу после повышения давления (данные не приведены). При этом, воздействие давлением на клетки, прошедшие стадию роста растяжением, не вызывает увеличения прироста длины (данные не приведены). Предположительно, причиной данного эффекта может быть компенсация внешним давлением внеклеточного (апопластного) давления в тканях корня, сброшенного в результате отсечения сегмента корня.

Таким образом, приведённый в данной работе оригинальный технический и методический подход позволяет исследовать ростовые процессы в растительных тканях при изменении внешнего давления, как одного из важных термодинамических параметров роста и развития растений. Представленную в работе камеру давления можно использовать для исследования роста не только отдельных клеток в тканях, но и целых небольших проростков растений. По сравнению с другими способами измерения скорости роста с использованием механических и инфракрасных датчиков смещения [11], метод, описанный в настоящей работе, обеспечивает бесконтактное измерение и позволяет одновременно исследовать рост клеток в нескольких растительных образцах одновременно. В перспективе предполагается оснастить камеру системой термостабилизации и использовать её для исследования скорости роста растительных клеток при одновременном изменении внешнего давления и температуры.

Исследование проведено в рамках работы по гос. заданию для ФИЦ Казанского научного центра РАН.

Список литературы / References:

1. Braidwood L., Breuer C., Sugimot K. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, 2014, vol. 201, pp. 388-402.
2. Nagel K. A., Schurr U., Walter A. Dynamics of root growth stimulation in nicotiana tabacum in increasing light intensity. *Plant Cell Environ.*, 2006, vol. 29, no. 10, pp. 1936-1945.
3. Wraith J.M., Wright K.W. Soil water and root growth. *Hort Science*, 1998, vol. 33, pp. 951-959.

4. Madhu M., Hatfield J.L. Dynamics of Plant Root Growth under Increased Atmospheric Carbon Dioxide. *Agronomy Journal*, 2013, vol. 105, pp. 657-669.
5. Judd L.A., Jackson B.E., Fonteno W.C. Advancements in Root Growth Measurement Technologies and Observation Capabilities for Container-Grown Plants. *Plants*, 2015, vol. 4, pp. 369-392.
6. Christmann A., Grill E., Huang J. Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current opinion in Plant Biology*, 2013, vol. 16, pp. 293-300.
7. Kroeger J.H., Zertzour R., Geitmann A. Regulator or driving force? *The role of turgor pressure in oscillatory plant cell growth PLoS one*, 2011, vol. 6, no. 4, e18549.
8. Ortega J. Plant cell growth in tissue. *Plant physiology*, 2010, vol. 154, pp. 1244-1253.
9. Pessoa J., Calbo A. Apoplasm hydrostatic pressure on growth of cylindrical cells. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 16, no. 1, pp. 17-24.
10. Wieggers B.S., Cheer A.Y., Silk W.K. Modeling the hydraulics of root growth in three dimensions with phloem water sources. *Plant Physiology*, 2009, vol. 150, pp. 2092-2103.
11. Galbraith D.W.; Bohnert H.J.; Bourque D.P. *Methods in cell biology*, Academic Press Inc, San Diego, 1995, part A, vol. 49, 573 p.

THE TECHNIQUE OF THE PLANT CELLS GROWTH RATE STUDY UNDER IMPACT OF ELEVATED EXTERNAL PRESSURE

Suslov M.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences
Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru

Abstract. The work presents a technical and methodological approach for studying the growth rate of plant cells under influence of external hydrostatic pressure, as one of the important thermodynamic growth parameters. This approach involves the using of original pressure chamber adapted to optical microscope and gas system for supplying and releasing pressure. The paper contains the detailed design and drawing of the chamber, as well as the scheme of experiment conducting with chamber using, including a description of additional hardware and software. The use of this chamber makes it possible to investigate the changes in the size and growth rate of plant cells in dynamics directly with the change in external pressure in the range from 0,1 to 1 MPa. The main results of the external hydrostatic pressure impact study, obtained using this technical and methodological approach, are presented. In particular, on example of the roots of corn seedlings, it was shown that increasing of external pressure up to 0,3 MPa causes acceleration of elongation growth in the cells of the root epidermis. Prospects for the further using of the developed system as applied to studies of growth processes in plant tissues are presented.

Key words: *pressure chamber, plant cells, elongation growth.*