

Morfologická charakteristika rastlín vystavených Ni

Alexandra Lešková¹, Ricardo F.H. Giehl², Agáta Fargašová¹, Nicolaus von Wirén²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra environmentálnej ekológie, Mlynská dolina B-2, 84215, Bratislava 4, Slovenská republika;

leskovaa@fns.uniba.sk

²Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Department of Plant Physiology and Cell Biology, Correnstrasse 3, 06466, Gatersleben, Spolková republika Nemecko

Abstract

Root morphology of Ni-treated plants

Plant roots are very important organs in terms of nutrient and water acquisition but they also serve as anchorages for the aboveground parts of the plants. The roots display extraordinary plasticity towards stress conditions as a result of integration of environmental cues into the developmental processes of the roots. Our aim was to investigate the root morphology of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to a particular stress condition, excess Ni supply. We aimed to find out which cellular processes – cell division, elongation and differentiation are affected by Ni, thereby explaining the seen root phenotype. Our results reveal that a distinct sensitivity exists between roots of different order and interference with various cellular processes is responsible for the effects of Ni on roots. We also show that Ni-treated roots have several auxin-related phenotypes.

Keywords: root morphology; primary root; lateral root; cell division; nickel

Úvod a formulácia cieľa

Korene sú dôležitými orgánmi rastlín, slúžia na získavanie vody a živín pre rast, a zároveň poskytujú fyzickú podporu pre nadzemné časti rastlín. Rast a vývin koreňov sú ovplyvnené procesmi ako sú delenie, predlžovanie a diferenciácia buniek. Delenie a predlžovanie buniek sú nevyhnutné pre správny rast hlavného koreňa aj bočných koreňov, kým diferenciácia umožňuje bunkám získať špecifické črty a funkcie (koreňové vlásky, bunky s Caspariho pásikmi) [1]. Tieto procesy sú regulované primárne rastlinným hormónom – auxínom. Korene rastlín sú v priamom kontakte s pôdou a s jej abiotickými a biotickými zložkami. Reagujú na podnety prostredia a sú schopné prekonať rôzne nepriaznivé podmienky. V stresových podmienkach, keď je obsah živín limitovaný, korene reagujú zmenou svojej morfológie, čo im uľahčí prístup k živinám, ktorých majú nedostatok [2].

Morfológia koreňov pri iných typoch stresov, ako je napríklad nadbytok ťažkých kovov, je málo preštudovaná. Komplexná charakterizácia účinku ťažkých kovov na rast je doposiaľ limitovaná len na kovy ako sú Al, Cu alebo Cd [3 - 6]. Vplyv ťažkých kovov na rast koreňov je často dôsledok narušenej syntézy alebo distribúcie rastlinných hormónov [3 - 4]. Keďže rastlinné hormóny a to predovšetkým auxín, regulujú aj gravitropické reakcie rastlín,

porucha ich syntézy alebo transportu sa môže prejavovať defektom v gravitropizme koreňov [7].

Naším cieľom bolo preto preskúmať morfológické črty modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana*, kultivovanej v nadbytku niklu, ťažkého kovu, ktorý na rastliny pôsobí dokázateľne toxicky. Ďalej nás zaujímalo, či sú zmeny v raste príčinou ovplyvnenia fyziologických procesov ako sú delenie, predlžovanie a diferenciácia buniek a či Ni spôsobuje defekty, ktoré sú charakteristické pre zmenu v homeostáze hormónov – stratu gravitropizmu.

Materiál a metódy

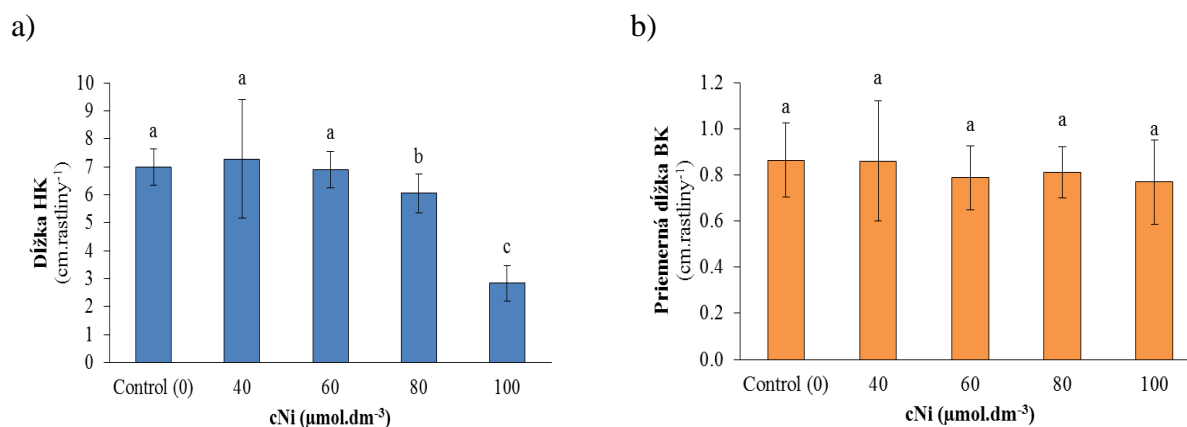
Rastliny sme pestovali 7 dní v ½ Murashige a Skoog (MS) agarovom médiu v Petriho miskách spôsobom popísaným v Lešková a kol. [8]. Po uplynutí tejto doby sme rastliny preniesli znova do ½ MS kontrolného média alebo do zvyšujúcich sa koncentrácií niklu uvedených v legendách obrázkov časti „Výsledky a diskusia“. Po 3 dňoch kultivácie sme rastliny otočili o 90° do horizontálnej polohy a každé 4 hodiny až do 24 hodín sme merali uhol sklonu hlavných koreňov. Uhly sklonu koreňov od pôvodnej polohy sme kvantifikovali v programe ImageJ. Pre mikroskopickú vizualizáciu intaktných koreňov sme rastliny pestovali 7 dní. Obrázky vznikli prostredníctvom optického mikroskopu Leica. V záujme kvantifikácie dĺžky koreňov sme rastliny kultivovali 10 dní. Dĺžky hlavných a bočných koreňov sme kvantifikovali pomocou softwaru WinRHIZO Pro V. 2009c. Po Kultivačná doba a popis metodiky gravistimulácie koreňov sú popísané v časti „Výsledky a diskusia“.

Výsledky a diskusia

Sledovali sme morfológiu koreňov rastlín *Arabidopsis thaliana* vystavených zvyšujúcim sa koncentráciám Ni. Z **Obr. 1a** je zrejmé, že dĺžka hlavných koreňov bola negatívne ovplyvnená od 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrácie Ni, kde jej hodnoty klesli síce mierne, ale štatisticky významne. Pri najvyššej koncentrácii Ni (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) sa dĺžka hlavných koreňov významne znížila, až o 59 % v porovnaní s kontrolou. Avšak dĺžka bočných koreňov ostala nezmenená aj pri najvyššej koncentrácii Ni (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) (**Obr. 1b**). Znamená to, že rast hlavných koreňov je oveľa citlivejší na prítomnosť Ni ako rast bočných koreňov. Hlavný koreň a bočné korene sa síce podobajú anatomicky a morfológicky, ale zistenia naznačujú, že ich citlivosť na prítomnosť stresových faktorov sa odlišuje. Korene reagovali odlišnou citlivosťou aj na prítomnosť nadbytku Mn [8] alebo na nedostatok vápnika [2].

Dôvody kontrastnej citlivosti koreňov, až na niektoré výnimky (nedostatok P, N), nie sú doposiaľ známe. Je možné, že senzitivita koreňov na Ni spočíva v pokročilosti vývinového

štádia koreňov. Hlavný koreň je „starším“ orgánom, keďže je prítomný už počas embryogenézy rastlín, kým bočné korene sa vyvíjajú postembryonálne. Vývinovo staršie orgány sa javia byť citlivejšie na prítomnosť Ni ako mladšie orgány. Prípadne sa môže Ni prednostne akumulovať v hlavných koreňoch rastlín.



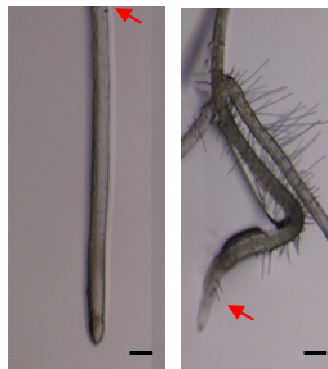
Obr. 1. a) Dĺžka hlavných koreňov, b) priemerná dĺžka bočných koreňov rastlín *A. thaliana* vystavených zvyšujúcim sa koncentraciám Ni. HK – hlavný koreň, BK - bočné korene. V grafe sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. Písmená demonštrujú štatisticky významné rozdiely pri $p < 0,05$.

V snahe získať detailnejšie informácie o vplyve Ni na morfológiu hlavných koreňov, sme skúmali korene rastlín pod mikroskopom. **Obr. 2** znázorňuje hlavné korene intaktných rastlín pestovaných v kontrolných podmienkach alebo vystavených nadbytku Ni.

Šípky naznačujú výskyt prvých viditeľných koreňových vláskov, ktoré lemujú začiatok zóny diferenciácie buniek. Z polohy šípok je zrejmé, že na rozdiel od kontrolných rastlín, zóna diferenciácie buniek koreňov rastlín vystavených nadbytku Ni začína veľmi blízko pri koreňovej špičke. Z toho vyplýva, že negatívny vplyv Ni na rast hlavného koreňa spočíva v inhibícii delenia a/alebo predlžovania buniek. Kvantifikácia počtu deliacich a predlžujúcich sa buniek ďalej potvrdzuje negatívny vplyv Ni na obidva procesy (nepublikované výsledky).

Hlavný koreň rastliny vystavenej Ni navyše vytvára záhyb, čo sa neprejavuje pri kontrolnej rastline (**Obr. 2**). Podobný fenotyp koreňov sa prejaví aj v mutantoch s defektom v gravitropizme koreňov [1], čo naznačuje, že Ni spôsobuje poruchu v gravitropickej odpovedi koreňov.

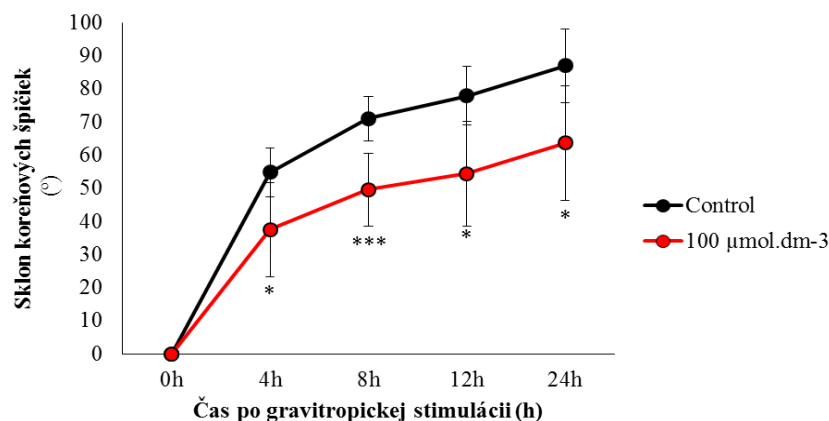
Kontrola $100 \mu\text{mol.dm}^{-3}$



Mierka: 1 mm

Obr. 2. Snímka hlavného koreňa rastlín *A. thaliana* kultivovaných v kontrolných podmienkach a nadbytku Ni. Vybrala sa reprezentatívna snímka. Mierka má 1 mm. Červené šípky označujú začiatok zóny diferenciácie buniek.

Túto hypotézu sme testovali vystavením rastlín gravistimulácii. Rastliny sme pestovali 3 dni vertikálne v kontrolných podmienkach alebo v podmienkach nadbytku Ni, a po uplynutí tejto doby sme ich otočili o 90° do horizontálnej polohy. Každé štyri hodiny až do 24 hodín sme zaznamenávali uhol sklonu hlavného koreňa. Kým kontrolné rastliny do 24 hodín dosiahli takmer 90° uhol sklonu od pôvodnej polohy, korene rastlín pestované v nadbytku Ni v čase významne zaostávali za kontrolou, a do 24 hodín dosiahli len 64° uhol sklonu (**Obr. 3**). Výsledky teda jednoznačne ukazujú, že Ni spôsobuje gravitropický defekt koreňov.



Obr. 3 Vplyv Ni na gravistimuláciu koreňov *A. thaliana*. V grafe sú uvedené aritmetické priemery so štandardnými odchýlkami. *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$

Znížená gravitropická odpoveď koreňov je často príčinou poruchy syntézy a/alebo transportu rastlinného hormónu - auxínu v koreňoch. Mutanty akropetálneho (v smere ku koreňovým špičkám) alebo bazálneho (v smere ku výhonkom) transportu auxínu sa vyznačujú stratou gravitropizmu koreňov (zhrnuté v Petrasek a Friml [9]). Preto by sme v budúcnosti chceli zistiť, či je negatívny vplyv Ni na rast a gravitropickú odpoveď koreňov dôsledkom interferencie Ni s transportom, prípadne syntézou auxínu.

Záver

V práci sme sledovali zmeny v morfológii koreňov rastlín *Arabidopsis thaliana* vystavených nadbytku Ni. Kým Ni neovplyvnil rast bočných koreňov, spôsobil významnú redukciu rastu hlavného koreňa. Inhibícia rastu bola spôsobená inhibičným vplyvom Ni na delenie a predlžovanie buniek. Ni navyše pôsobí negatívne na gravitropizmus koreňov.

PodĎakovanie

Výskum bol realizovaný za finančnej podpory VEGA 1/0098/14 a UK/40/2015.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Petricka J. J., Winter C. M., Benfey P. N. (2012) *Annu. Rev. Plant Biol.* 63(1), p. 563
- [2] Gruber B., Giehl R. F. H., Friedel S., et al. (2013) *Plant Physiol.* 163(1), p. 161
- [3] Yuan H. M., Xu H. H., Liu W. C., et al. (2013) *Plant. Cell. Physiol.* 54(5), p. 766
- [4] Hong S., Hou N. Y., Schlicht M., et al. (2008) *Chinese Sci. Bull.* 53(16), p. 2480
- [5] Illes P., Schlicht M., Pavlovkin J., et al. (2006) *J. Exp. Bot.* 57(15), p. 4201
- [6] Lux A., Martinka M., Vaculik M., et al. (2011) *J. Exp. Bot.* 62(1), p. 21
- [7] Swarup R., Kramer E. M., Perry P., et al. (2005) *Nat. Cell. Biol.* 7(11), p. 1057
- [8] Lešková A., Giehl R. F. H., Fargašová A., et al. (2013) Študentská vedecká konferencia Prif UK 2013, Bratislava, p. 1635
- [9] Petrasek J., Friml J. (2009) *Development.* 136(16), p. 2675