

О. М. Недуха

Ефекти дії помірного водного дефіциту на вміст іонів кальцію в клітинах листків *Sium latifolium* L.

(Представлено академіком НАН України Р. М. Ситником)

Методом лазерно-конфокальної мікроскопії вперше досліджено розподіл та зміни відносного вмісту Ca^{2+} у клітинних оболонках епідерми та органелах клітин мезофілу листків *Sium latifolium* на стадії бутонізації та плодоношення. Встановлено, що відносний вміст Ca^{2+} у клітинах змінюється залежно від стадії розвитку рослин та умов їх зростання. За помірного водного дефіциту на стадії бутонізації рослин вміст Ca^{2+} збільшується в хлоропластах і ядрах мезофілу та клітинних оболонках верхньої епідерми, а на стадії плодоношення — знижується в хлоропластах і цитоплазмі клітин мезофілу та клітинних оболонках епідерми. Зроблено припущення, що зміни відносного вмісту Ca^{2+} у клітинах листків відіграють істотну роль у адаптації рослин веху до помірного водного дефіциту.

Дослідження впливу помірного водного дефіциту на ріст та розвиток рослин у природних умовах показали прискорення росту, зміни гормонального комплексу, вмісту пігментів, а також ультраструктури клітин листків *Alisma plantago-aquatica* [1, 2]. Відомо, що Ca^{2+} бере участь у багатьох процесах, в яких Са-залежні білки активуються чи інгібуються залежно від вмісту цитоплазматичного кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) [3–5]. Це відбувається завдяки здатності Ca^{2+} координувати численні зв'язки з доменами білків та змінювати їх конформацію [3]. Ми припустили, що в рослинах, адаптованих до природного водного дефіциту, мають місце певні зміни вмісту та розподілу Ca^{2+} на рівні органел та клітинних оболонок залежно від стадії онтогенезу рослин.

У даному повідомленні наведено результати вивчення розподілу Ca^{2+} та здійснено їх кількісну оцінку в клітинах листків веху широколистої (*Sium latifolium* L.), який зростав за умов різного водозабезпечення.

Методи. Визначення локалізації та відносного вмісту Ca^{2+} у листових пластинках повітряно-водних та суходільних рослин веху широколистої проводили цитохімічним методом за Такахаші [6] з використанням ацетоксиметилефірної похідної флуоресцентного барвника Fluo-4. Рослини повітряно-водної форми зростали на річці Псьол (м. Велика Багачка Полтавської обл.), рослини суходільної форми — у прибережній смузі, де вологість ґрунту була вдвічі нижча, ніж у ґрунті, на якому зростали повітряно-водні рослини. Листки збирали на стадії бутонізації та початку плодоношення. З кожної рослини брали третій листок. Усього використано по шість рослин повітряно-водної та суходільної форм веху широколистої. Локалізацію Ca^{2+} визначали в конфокальному лазерному сканувальному мікроскопі LSM 5 Pascal ("Carl Zeiss", Німеччина) при довжині хвилі збудження 494 нм та довжині хвилі емісії 516 нм. Для ідентифікації ядер, фарбованих DAPI [7], та хлоропластів використовували по чергово інші два лазерних канали: канал при довжині хвилі збудження 405 нм і хвилі емісії 461 нм (для люмінесценції ДНК ядер) та канал при довжині хвилі збудження 520 нм і хвилі емісії 662 нм (для автолюмінесценції хлорофілів). Інтенсивність флуоресценції комплексу Fluo-4—кальцій визначали в 30 клітинах палісадної паренхіми

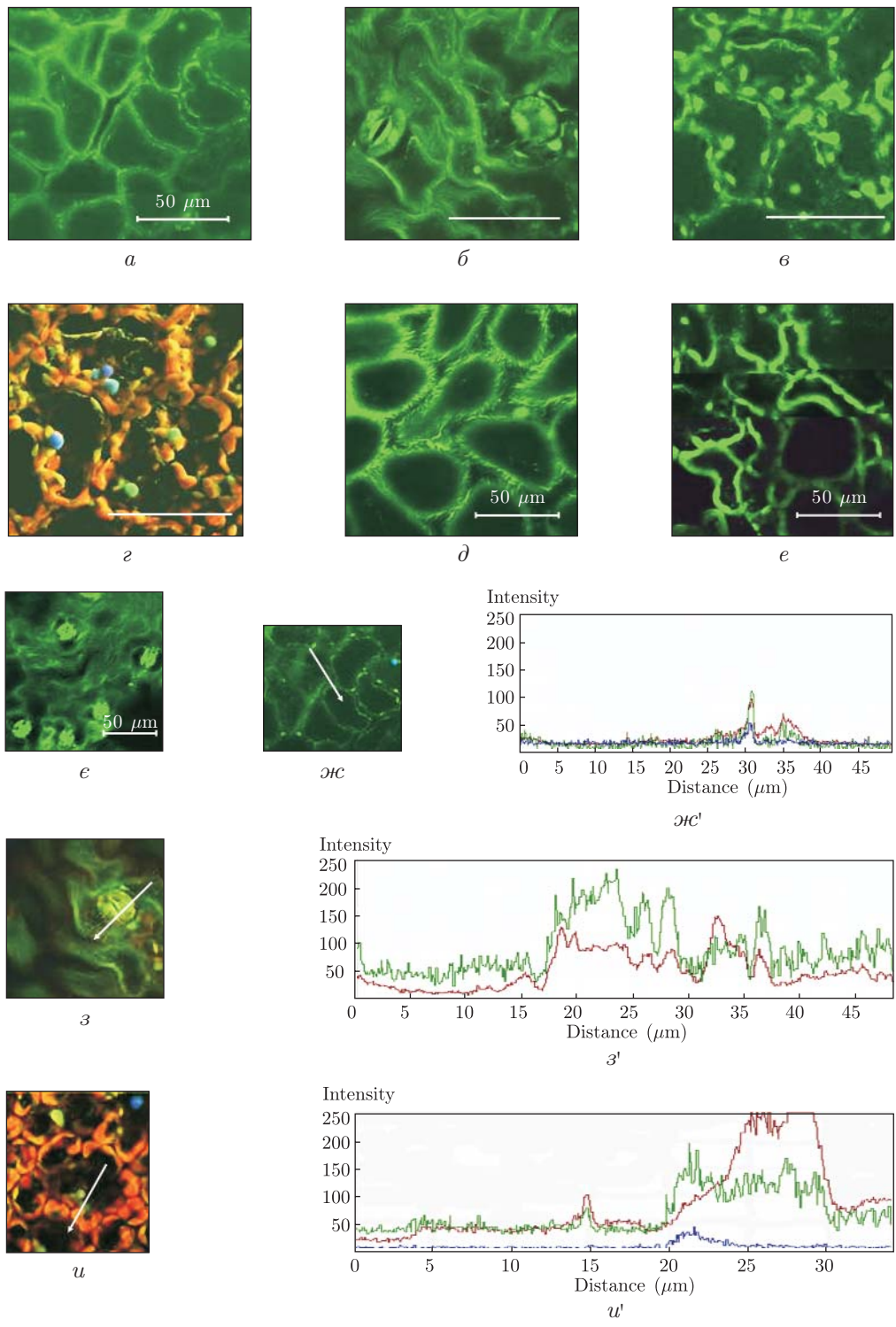


Рис. 1. Клітини епідерми (а, б, д, е-з) та мезофілу (в, з, е, u) листків повітряно-водних (а-з, жс, u) та суходільних (д, е, е, з) рослин *Sium latifolium* після інкубації в розчині Флюо-4 (комплекс Флюо-4—кальцій флуоресцює зеленим кольором) та після інкубації в розчині DAPI (z, жс, u) (ДНК ядер флуоресцює блакитним кольором), автофлуоресценція хлорофілу має червоний колір (z, u). Об'ємне (3-D) зображення клітин мезофілу. з' та u' — гістограми інтенсивності флуоресценції комплексу Флюо-4—кальцій у клітинах епідерми та мезофілу. По горизонталі — відстань (мкм), яка була просканована, позначена білою стрілкою на рисунках жс, з та u, по вертикалі — інтенсивність флуоресценції комплексу Флюо-4—кальцій, ум. од. Масштаб — 50 мкм



Рис. 2. Відносний вміст Ca^{2+} у клітинних оболонках верхньої (e) та нижньої (n) епідерми листків повітряно-водних та суходільних рослин *Sium latifolium* на стадії бутонізації (a) та початку плодоношення (б). 1 — зовнішня оболонка основних клітин епідерми; 2 — антиклінальна оболонка; 3 — оболонки замикальних клітин продохів

та 30 клітинах верхньої та нижньої епідерми з кожного листка з використанням програмного забезпечення Pascal. Вміст пігментів у листках обчислювали спектрофотометричним методом за формулами Робелена та Ветштейна [8].

Результати дослідження та їх обговорення. Стадія бутонізації. Мікроскопічний аналіз флуоресценції Ca^{2+} у листках *S. latifolium* повітряно-водних рослин показав наявність зеленої флуоресценції комплексу Fluo-4—кальцій у оболонках клітин верхньої та нижньої епідерми (рис. 1, a, б), у хлоропластах, ядрах, цитоплазмі клітин мезофілу (див. рис. 1, в). При ідентифікації ядер та хлоропластів з використанням відповідних лазерних каналів ДНК ядер флуоресціювала блакитним кольором, хлоропласти — червоним (див. рис. 1, г), а при використанні каналу для комплексу Fluo-4—кальцій ці органели флуоресціювали зеленим кольором (див. рис. 1, в), що свідчило про присутність в них Ca^{2+} .

За даними аналізу флуоресценції комплексу Fluo-4 — кальцій у листках веху суходільної форми, зелена флуоресценція в клітинних оболонках верхньої та нижньої епідерми, а також в органелах клітин мезофілу ідентична такій у листках повітряно-водної форми веху (див. рис. 1, д, е).

Використання програмного забезпечення Pascal дало можливість виявити залежність вмісту Ca^{2+} в органелах клітин листків веху від умов зростання рослини. Рівень інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} у клітинних структурах наведено на рис. 1, жс', з', 2, a, 3, a. Помірний водний дефіцит на стадії бутонізації викликав зміни відносного вмісту Ca^{2+} . У зовнішніх оболонках епідермальних клітин, антиклінальних оболонках та оболонках замикальних клітин продохів верхньої епідерми відмічено збільшення інтенсивності флуоресценції комплексу Fluo-4—кальцій на 89, 136 та 143% відповідно порівняно з повітряно-водними рослинами (див. рис. 2, a). В оболонках нижньої епідерми виявлено зниження інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} , зокрема в антиклінальних оболонках та оболонках замикальних клітин продохів — на 45 та 50% відповідно (див. рис. 2, a). У клітинах палисадної паренхіми мезофілу відносний вміст Ca^{2+} збільшився: у хлоропластах на 48%, у ядрах на 55% (див. рис. 3, a).

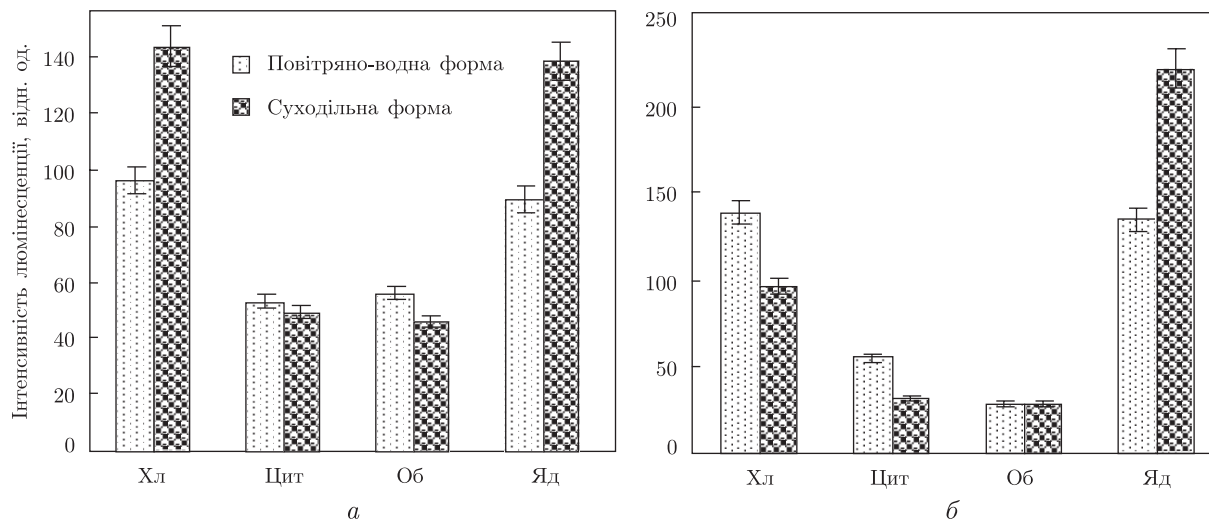


Рис. 3. Відносний вміст Ca^{2+} в хлоропластах (Хл), цитоплазмі (Цит), клітинних оболонках (Об) та ядрах (Яд) клітин мезофілу листків повітряно-водних та суходільних рослин *Sium latifolium* на стадії бутонізації (а) та початку плодоношення (б)

За результатами визначення вмісту пігментів у листках веху на стадії бутонізації встановлено, що вміст суми хлорофілів ($a+b$) був вищим у листках суходільної форми, ($2,098 \pm 0,19$) мг/г сирої маси, порівняно з листками повітряно-водної форми, ($0,842 \pm 0,06$) мг/г сирої маси.

Стадія плодоношення. Лазерно-конфокальна мікроскопія локалізації Ca^{2+} в клітинах листків веху показала наявність зеленої флуоресценції комплексу Fluo-4—кальцій в оболонках клітин епідерми (див. рис. 1, е) та в органелах і оболонках клітин мезофілу листків обох екологічних форм веху аналогічно флуоресценції Ca^{2+} у клітинах листків на стадії бутонізації. Рівень інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} наведено на рис. 1, а', рис. 2, б та 3, б. За умов помірного водного дефіциту на стадії плодоношення веху суходільного виявлено достовірно менший відносний вміст Ca^{2+} у клітинних оболонках верхньої та нижньої епідерми листків (див. рис. 2, б) порівняно з таким у епідермі листків повітряно-водних рослин. Крім того, у хлоропластах мезофілу листків суходільних рослин за помірного водного дефіциту вміст Ca^{2+} знижувався на 31%, а в ядрах цих клітин — навпаки, збільшувався майже на 50 % (див. рис. 3, б). Порівняльний аналіз вмісту хлорофілів у листках веху на стадії плодоношення та стадії бутонізації виявив істотні відмінності. На стадії плодоношення вміст пігментів у листках суходільних рослин зменшився порівняно з таким на стадії бутонізації на 87% і становив ($1,838 \pm 0,09$) мг/г сирої маси, а в листках повітряно-водних рослин — збільшився майже втричі і становив ($2,587 \pm 0,17$) мг/г сирої маси.

Таким чином, згідно з даними флуоресцентних досліджень, Ca^{2+} є чутливим іоном, відносний вміст якого в органелах мезофілу та клітинних оболонках епідерми змінюється в процесі розвитку рослин (від стадії бутонізації до початку плодоношення) та залежить від екологічної форми рослини. Відомо, що синтез хлорофілу є Ca -залежним процесом [9, 10]. У фотосинтезуючих клітинах Ca^{2+} активує НАД-кіназу, ферменти циклу Кальвіна та беруть участь у репарації реакційних центрів ФС II [10, 11]. Враховуючи ці дані та результати наших експериментів, можна припустити, що зниження вмісту пігментів у листках веху при

дії помірного водного дефіциту на стадії плодоношення є наслідком зниження чи порушення транспорту Ca^{2+} у хлоропласти.

Виявлене збільшення відносного вмісту Ca^{2+} у клітинних оболонках верхньої епідерми листків веуху широколистоного за умов водного дефіциту є істотним (див. рис. 2, а). Раніше встановлено, що в суходільних рослин веуху на стадії бутонізації активність гваякол-пероксидази збільшується в 1,4 раза, а вміст лігніну — удвічі порівняно з повітряно-водною формою [12]. Іони кальцію, як відомо, стабілізують не тільки структурованість пектину клітинних оболонок, а й з'єднують молекули лігніну з молекулами геміцелюлоз [13]. На підставі цих даних та одержаних нами результатів можна припустити, що збільшення вмісту Ca^{2+} у клітинних оболонках верхньої епідерми призводить до їх лігніфікації за умов природного водного дефіциту вже на стадії бутонізації веуху.

Дія водного дефіциту викликала достовірне збільшення відносного вмісту Ca^{2+} у ядрах мезофілу листків веуху. Відомо, що при дії посухи Ca^{2+} у ядрах клітин діє як сигнал експресії Ca^{2+} -залежних протеїніназ та білків, які мають захисну функцію [14]. Ми можемо говорити, що зміни відносного вмісту Ca^{2+} в ядрах мезофілу допомагають надземним органам рослин веуху адаптуватись до помірного водного дефіциту.

1. Кордюм Е. Л., Сьтнік К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 277 с.
2. Веденичева Н. П., Генералова В. Н., Мусатенко Л. И., Сьтнік К. М. Гормональный комплекс частухи подорожниковой, адаптированной к разным условиям водного режима // Доп. НАН України. — 1995. — № 12. — С. 100–102.
3. Bush D. S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology. — 1995. — **46**. — P. 95–122.
4. Sanders D., Brownlee C., Harper J. F. Communication with calcium // Plant Cell. — 1999. — **11**. — P. 691–706.
5. Knight H. Calcium signaling during abiotic stress in plants // Int. Rev. Cytol. — 2000. — **195**. — P. 269–324.
6. Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J. D., Herman B. Measurement of intracellular calcium // Physiol. Rev. — 1999. — **79**, No 4. — P. 1089–1125.
7. Coleman A. W., Maguire M. J., Coleman J. R. Mythramycin- and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)–DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles // J. Histochem. and Cytochem. — 1981. — **29**, No 8. — P. 959–968.
8. Гавриленко В. Ф., Ладьгичина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. — Москва: Высш шк., 1975. — 390 с.
9. Sai J., Johnson C. H. Dark-stimulated calcium ion in the chloroplast stroma and cytosol // Plant Cell. — 2002. — **14**. — P. 1279–1291.
10. Charles S. A., Halliwell B. Action of calcium ions on *Spinacia oleracea* chloroplast fructose biphosphatase and other enzymes of Calvin cycle // Biochem. J. — 1980. — **188**, No 3. — P. 775–779.
11. Grove G. N., Brudvig G. W. Calcium binding studies of photosystem II using a calcium-selective electrode // Biochemistry. — 1998. — **37**. — P. 1532–1539.
12. Nedukha O. M. The influence of water deficit on the structural and functional organization of *Sium latifolium* leaf cells // Adv. Agr. Sci. Probl. Issues. — 2006. — Issue 509. — P. 75–86.
13. Jarvis M. C. The proportion of calcium-bounded pectin in plant cell walls // Planta. — 1982. — **154**. — P. 344–346.
14. Knight H., Trewavas A. J., Knight M. R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity // Plant J. — 1997. — **12**. — P. 1067–1078.

O. M. Nedukha

Effects of the action of moderate water deficit on the ions calcium content in *Sium latifolium* L. leaf cells

*The distribution and relative content of Ca^{2+} in organelles, cytoplasm, cell walls of mesophyll, and cell walls of epidermis of *Sium latifolium* on the stages of flowering and seedling are first investigated. It is established that the relative content of ions Ca^{2+} in cells is changed according to the growth stage and environmental conditions of plant. Moderate water deficit leads to an increase of the Ca^{2+} content in chloroplasts and nuclei of mesophyll and in cell walls of adaxial epidermis of plants that were in the flowering stage. In the seedling stage, the water deficit leads to a decrease of the Ca^{2+} content in chloroplasts and in cytoplasm of mesophyll cells and in cell walls of epidermis. The change of the calcium content in cells of *S. latifolium* leaves can help the essential role in adaptation of *S. latifolium* plant to moderate water deficit.*