



УДК 576.31:582.536

## ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КАЛОЗИ У ПІДВОДНИХ ТА ПОВІТРЯНИХ ЛИСТКАХ *SAGITTARIA SAGITTIFOLIA* L.

ОЛЕНА М. НЕДУХА

**Анотація.** Методом лазерної скануючої мікроскопії досліджена локалізація та відносний вміст калози у клітинних оболонках епідерми, мезофілу та судин провідних пучків підводних та повітряних листків *Sagittaria sagittifolia* L. (стрілолиста звичайного) у фазі вегетативного росту. Встановлено, що ріст листків під водою супроводжується достовірним збільшенням вмісту калози в оболонках клітин епідерми, судин провідних пучків та фотосинтезуючої паренхіми у порівнянні із відповідними клітинами повітряних листків. Виявлені особливості розподілу калози в клітинних оболонках обумовлені фізико-екологічними характеристиками навколишнього середовища.

**Ключові слова:** *Sagittaria sagittifolia*, калоза, повітряні та підводні листки

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна; onedukha@hotmail.com

### Вступ

Затоплення – один із найважливіших факторів навколишнього середовища, яке за тривалої дії призводить до значних змін росту та розвитку вищих рослин, а іноді й до їхньої загибелі (CLARKE & STONE 1963; CHEN & КІМ 2009). В природних умовах гідрофіти, підводні листки яких ростуть і розвиваються постійно під водою, виробили захисні пристосування й адаптаційні механізми на рівні тканин і клітин до фізичних умов водного оточення, яке відрізняється вмістом та швидкістю транспортування газів, а також інтенсивністю та спектральним складом освітлення у порівнянні з наземними умовами (у повітрі) (Недуха 2011). У клітинних механізмах адаптації рослини до затоплення важлива роль відводиться полісахаридам клітинних оболонок, зокрема калозі, яка бере участь у регуляції водного транспорту по апопласту. Калоза – лінійний аморфний полісахарид клітинної оболонки, утворений кількома сотнями залишків глюкози, з'єднаних в основному  $\beta$ -1–3-глюкозидними зв'язками та 1–6-зв'язками, що можуть формувати незначні галузження

(CLARKE & STONE 1963). 1,3- $\beta$ -глюкан клітинних оболонок рослин відіграє ключову роль у міжклітинному транспорті води, рості та диференціюванні клітин, осмотичному розтязі клітин, захисті рослин при біотичних та абіотичних стресах (HONG *et al.* 2001; ДМИТРИЕВ 2003).

Ми припустили, що листки рослин, що постійно ростуть у воді, характеризуються підвищеним синтезом калози у порівнянні із надводними листками тих же особин, що допомагає зануреним у воду листкам, ефективно функціонувати у постійному водному середовищі. Метою нашої роботи було порівняльне вивчення локалізації та відносного вмісту калози у клітинних оболонках підводних та повітряних листків *Sagittaria sagittifolia* L. (стрілолист звичайний) у фазі вегетативного росту.

### Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження були повітряні (надводні) та підводні листки рослини стрілолиста звичайного (*S. sagittifolia*), які зростали на глибині від 80 до 120 см на березі Русанівського каналу (лівий берег р. Дніпро)

у Києві. Матеріал збирали у середині червня. Середня освітленість (опівдні) на час забору матеріалу на верхній поверхні надводних листків становила 1550 мкмоль квантів·м<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>, над підводними листками – від 13 до 20 мкмоль квантів·м<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>. Визначення локалізації та відносного вмісту калози у клітинних оболонках тканин середньої частини листових пластинок здійснювали цитохімічним методом відповідно протоколу Х. Сабінян та М. Сака (SUBVAIAN & SACHS 2001) із використанням 0,1% анілінового синього. Дослідження проводили за допомогою лазерного скануючого мікроскопа LSM 5 Pascal (Німеччина). Для ідентифікації калози та автофлюоресценції хлоропластів використовували по чергово два лазерних канали: канал за довжини хвилі збудження 405 нм і хвилі емісії – 461 нм (для люмінесценції калози); та канал за довжини хвилі збудження 520 нм і хвилі емісії – 662 нм (для автолюмінесценції хлорофілів). Відносний вміст калози за інтенсивністю флюоресценції комплексу калоза+аніліновий синій визначали із використанням програмного забезпечення "Pascal". Вимірювання проводили на трьох рослинах кожного виду, із кожної рослини брали по три надводних і три підводних листки, із кожного листка аналізували по 30-40 клітин епідермісу, 40 клітин мезофілу та 15-17 клітин судин провідних пучків, відповідно.

### Результати та їх обговорення

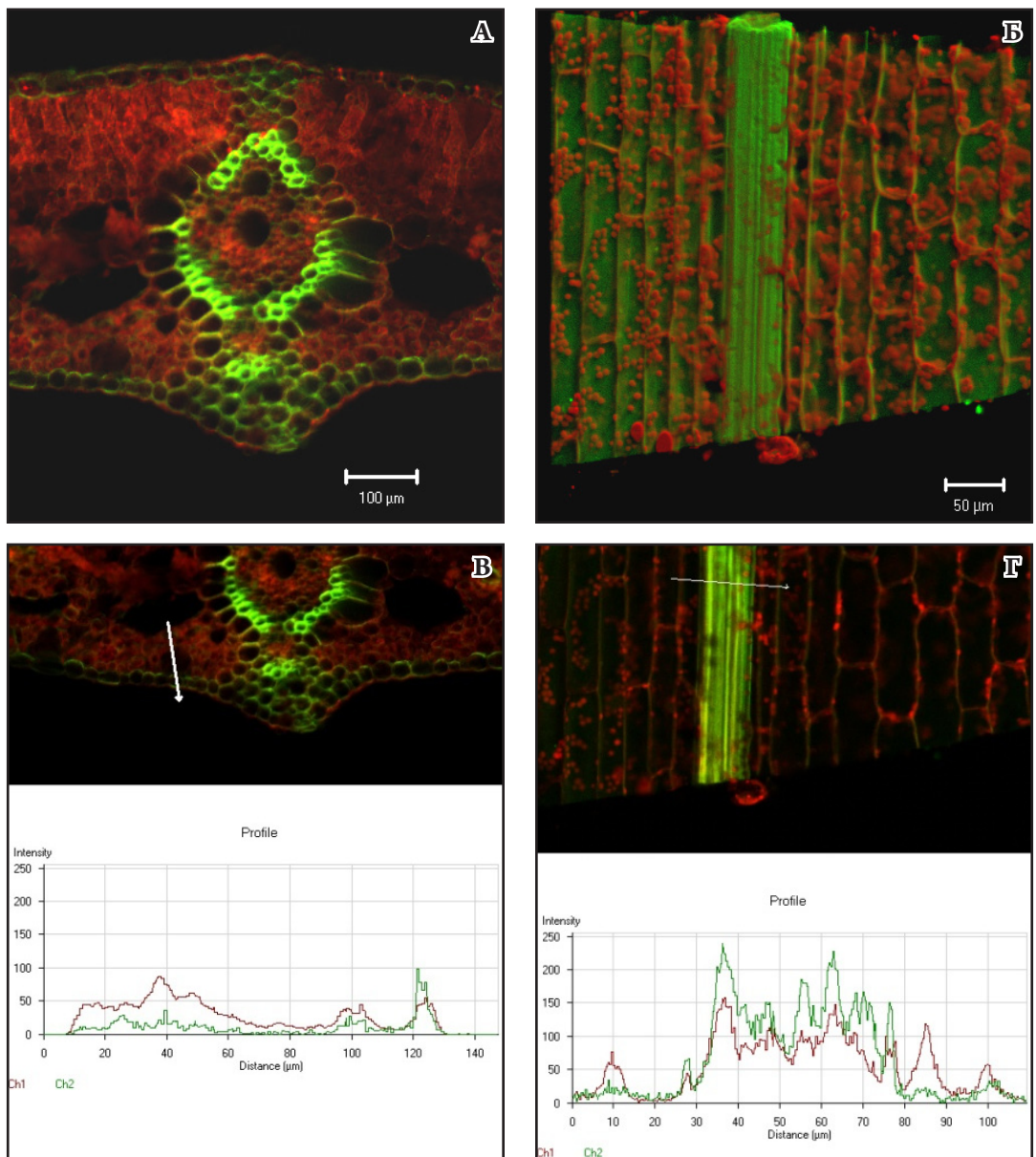
**Повітряні листки.** Цитохімічним методом із використанням лазерно конфокальної мікроскопії показано, що калоза локалізована у клітинних оболонках епідерми, мезофілу та судин провідних пучків стрілоподібних повітряних листків (Рис. 1 А). Комплекс аніліновий синій – калоза у досліджуваних тканинах флюоресціював яскраво-зеленим кольором. За допомогою програми "Pascal" визначили вміст калози у оболонках досліджуваних тканин (Табл. 1; Рис. 1 В). Встановлена наступна послідовність інтенсивності флюоресценції

калози: клітинні оболонки судин > антиклінальні оболонки нижньої і верхньої епідерми > палісадна паренхіма > губчаста паренхіма.

У надводних листках стрілолиста у антиклінальних оболонках верхньої та нижньої епідерм, а також замикаючих клітин продихів інтенсивність флюоресценції калози була достовірно вища, ніж у периклінальних оболонках цих клітин (Табл. 1). Вміст калози у периклінальних оболонках нижньої епідерми у шість разів вищий, ніж у відповідних оболонках верхньої епідерми. В оболонках клітин палісадної паренхіми вміст калози також був більшим, ніж у клітинах губчастого мезофілу.

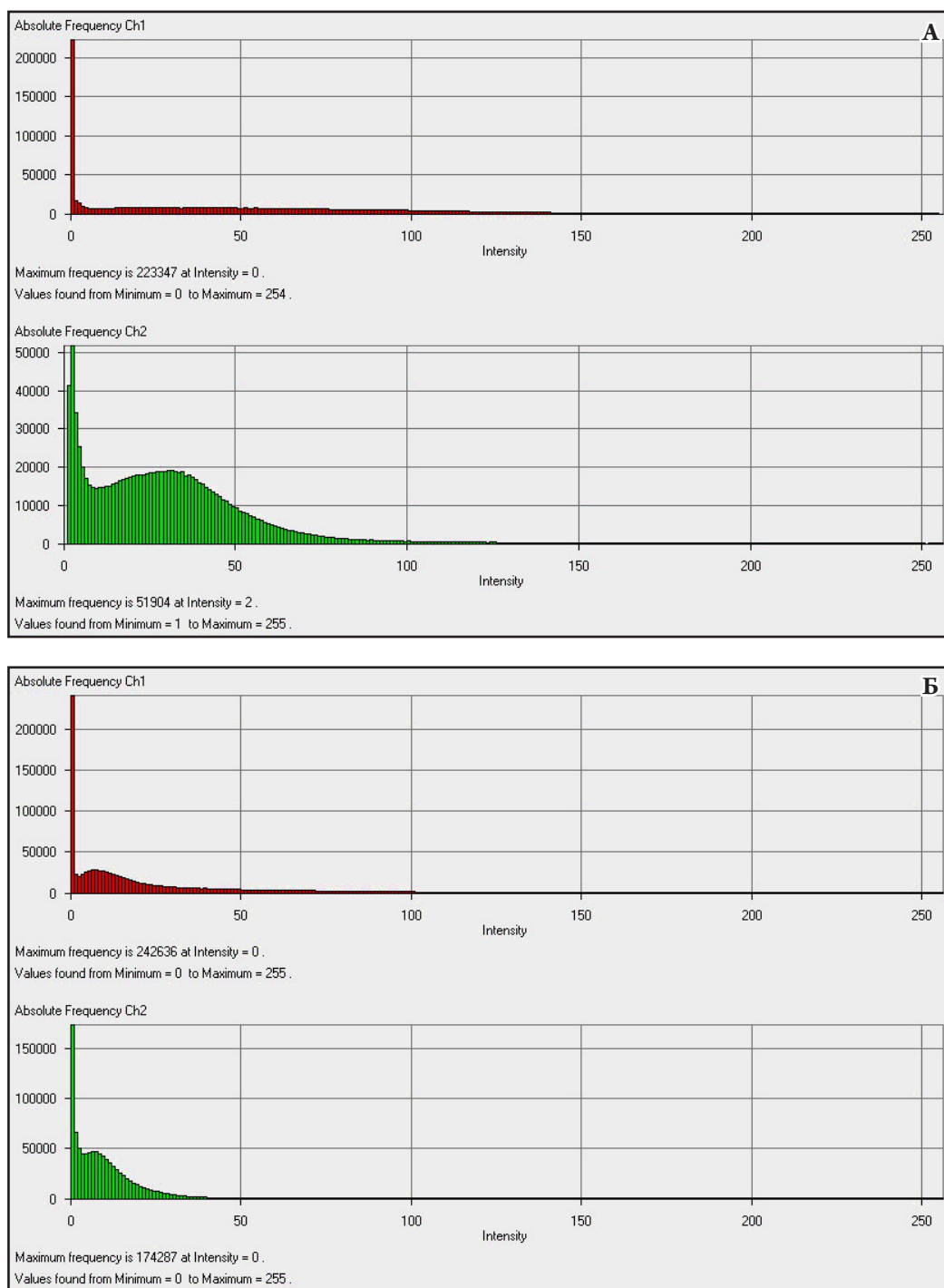
Встановлено, що максимальна інтенсивність флюоресценції калози в епідермі та провідних пучках становила 51804 пікселів (Рис. 2 А; зелена, нижня частина графіка), максимальна інтенсивність флюоресценції хлорофілів в клітинах мезофілу була досить високою і становила 223347 пікселів (верхня, червона частина графіка).

**Підводні листки.** Флюоресценція калози виявлена в клітинних оболонках епідермісу, фотосинтезуючої паренхіми та судин провідних пучків (Рис. 1 Б). Встановлено, що умови занурення листків у воду спричиняли достовірне підвищення вмісту калози у периклінальних та антиклінальних оболонках епідерми, в оболонках судин провідних пучків, а також в оболонках фотосинтезуючої паренхіми підводних листків досліджуваних видів рослин у порівнянні із аналогічними клітинними оболонками надводних листків. Відмінності в інтенсивності флюоресценції комплексу аніліновий синій – калоза показані у Табл. 1 та на Рис. 1 Г (діаграма). Необхідно відмітити, що максимальна інтенсивність флюоресценції калози у клітинних оболонках провідних пучках та епідермісу була втричі вища (див. Рис. 2 Б), ніж у надводних листках, і становила 174287 пікселів (Рис. 2 Б; зелена нижня частина графіка). Максимальна інтенсивність хлорофілів у клітинах паренхіми та епідермісу становила 242056



**Рис. 1.** Зрізи надводних (повітряних) (А, В) та підводних листків (Б, Г) *Sagittaria sagittifolia* після інкубації у розчині анілінового синього (комплекс калоза + аніліновий синій флюоресцює зеленим кольором); автофлюоресценція хлорофілу має червоний колір. На В та Г – діаграми інтенсивності флюоресценції калози (зелена нижня лінія) та автофлюоресценції хлорофілу (червона верхня лінія) в надводних (В) та підводних (Г) листках. Ордината – інтенсивність флюоресценції, (відносні одиниці). Абсциса – віддаль (мкм), що була просканована на зрізі клітини.

**Fig. 1.** The sections of *Sagittaria sagittifolia* aerial (A, B) and submerged leaves (B, Γ) after incubation with aniline blue (complex of callose + aniline blue is fluorescing with green color); chlorophyll auto fluorescence is red. The diagrams of callose fluorescence intensity (green lower line) and chlorophyll auto fluorescence (red upper line) are presented on B (air leaf) and Γ (submerged leaf). Ordinate – fluorescence intensity, relative units. Abscissa – distance (μm), which was scanned on B and Γ.



**Рис. 2.** Діаграми максимальної частоти (у пікселях) флюоресценції калози (зелена нижня зона) та автофлюоресценції хлорофілу (верхня червона зона) в оболонках провідного пучка надводного листка (А) та в судинах провідного пучка підводного листка (Б), відповідно.

**Fig. 2.** The diagrams of maximal frequency (in pixels) for callose fluorescence (green lower part) and for auto fluorescence of chlorophyll (red upper part) are presented on **A** (for air leaves) and on **B** (for submerged leaves) correspondingly.

**Табл. 1.** Інтенсивність флюоресценції калози у листках *Sagittaria sagittifolia*.**Table 1.** The intensity of callose fluorescence in *Sagittaria sagittifolia* leaves.

Тканина/клітинна оболонка	Інтенсивність флюоресценції калози, відн. од.	
	У повітряних листках	У підводних листках
Адаксіальний епідерміс (або епідерміс підводного листка)		
– периклінальна оболонка	5±0,09	76±5,3*
– антиклінальна оболонка	102±9,3	133±7,7*
Продихи		
– оболонка пори	Не виявлено	Відсутні продихи
– периклінальна оболонка замикаючих клітин	Сліди	-
– антиклінальна оболонка замикаючих клітин	10±0,7	-
Абаксіальний епідерміс		
– периклінальна оболонка	30±3,7	80±5,9*
– антиклінальна оболонка	111±6,1	130±8,7*
Продихи		
– оболонка пори	49±3,8	Відсутні продихи
– периклінальна оболонка замикаючих клітин	36±3,1	-
– антиклінальна оболонка замикаючих клітин	107±17	-
Палісадний мезофіл (чи 1-ий шар фотосинтезуючої паренхіми підводного листка)	106±11	117±10
Губчастий мезофіл (чи 2-3-ій шари фотосинтезуючої паренхіми підводного листка)	23±2,5	37±2,9*
Судини провідного пучка	177±11	225±12*

\*  $p \leq 0.05$ 

пікселів (Рис. 2 Б; верхня червона частина графіка).

Таким чином, встановлено, що природне занурення листків у воді, за умов якого підводні листки ростуть і функціонують, викликає достовірне підвищення відносного вмісту калози у клітинах епідерми та судин провідних пучків *S. sagittifolia*. Одержані дані щодо підвищення вмісту калози в епідермісі підводних листків добре узгоджуються з даними про підвищення синтезу калози у ситовидних трубках флоєми під час диференціації та дії спеки, коли клітинні оболонки знижують чи тимчасово припиняють апопластний водний транспорт (McNAIRN 1972; СНЕН & КІМ 2009; ХІЕ & НОНГ 2011). Це відбувається завдяки здатності цього полісахариду перешкоджати транспорту водних розчинів по апопласту, змінювати еластичність та швидкість розтягу

клітинних оболонок, а також завдяки швидкій взаємодії калозо-синтетази із вільними іонами кальцію, що змінюють конформацію білка та сприяють його активації (KAUSS & JEWICK 1991).

Ми вважаємо, що наявність великої кількості калози в епідермісі підводних листків є структурно-функціональною ознакою як для збереження оптимального тургору підводних клітин, так й інгібування апопластного водного транспорту по епідермісу, що оберігає підводні листки від проникнення води із оточуючого водного середовища всередину клітини, так і з клітин у водне середовище. Крім цього, відомо, що калоза епідермальних клітин захищає поверхню органів від проникнення металів та дії патогенів, що було встановлено на клітинах коренів суходольних рослин (НОФМАНН *et al.* 2010; KRZESŁOWSKA 2011),



а також збільшує еластичність та гнучкість листків і стебел (PARRE & GEITMANN 2005).

Враховуючи вищезазначені дані літератури та результати наших експериментів можна припустити, що підвищений вміст калози у епідермісі підводних листків збільшує їх еластичність у воді та сприяє оптимальній життєздатності підводних органів під дією сильних течій води та її тиску. Питання про клітинні та молекулярні механізми посиленого синтезу калози в епідермісі та судинах провідних пучків підводних листків гідрофітів лишається відкритим.

### Використані джерела

- ДМИТРИЕВ А.П. 2003. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс. *Физиология растений* 50: 465–474.
- НЕДУХА О.М. 2011. Гетерофілія у рослин. Альтерпрес, Київ.
- CHEN X.Y., KIM J.Y. 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav.* 4: 489–492.
- CLARKE A.E., STONE B.A. 1963. Chemistry and biochemistry of  $\beta$ -1,3-glucans. *Rev. Pure Appl. Chem.* 13: 134–156.
- HOFMANN J., YOUSSEF-BANORA M., DE ALMEIDA-ENGLER J., GRUNDLER F.M.W. 2010. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 549–557.
- HONG Z., DELAUNEY A., VERMA D. 2001. A cell plate specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* 13: 755–768.
- KAUSS H., JEBLICK W. 1991. Induced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and callose synthesis in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* are decreased by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Physiol. Plant.* 81: 309–312.
- KRZESŁOWSKA M. 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol. Plant.* 33: 35–51.
- McNAIRN R.B. 1972. Phloem translocation and heat-induced callose formation in field-grown *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiol.* 50: 366–370.
- PARRE E., GEITMANN A. 2005. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol.* 137: 274–286.
- SUBBAIAH CH.C., SACHS M. 2001. Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiol.* 125: 585–594.
- XIE B., HONG Z. 2011. Unplugging the callose plug from sieve pores. *Plant Signal. Behav.* 6: 491–493.

### COMPARATIVE STUDY OF CALLOSE IN *SAGITTARIA SAGITTIFOLIA* L. SUBMERGED AND AERIAL LEAVES

OLENA M. NEDUKHA

**Abstract.** The localization and relative content of callose in *Sagittaria sagittifolia* L. cell walls of epidermis, mesophyll and vessels of submerged and air leaves in vegetative phase of growth have been investigated with laser confocal microscopy. The reliable increase of callose content in cell walls of epidermis and vessels of submerged leaves was confirmed in comparison with those in aerial leaves. The revealed peculiarities in callose distribution in cell walls are caused by physico-ecological peculiarities of environment.

**Key words:** *Sagittaria sagittifolia*, callose, air and submerged leaves

M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS Ukraine, 2 Tereschenkivska str., Kiev 01601, Ukraine; onedukha@hotmail.com