

Longitudinal Divisions in Root Cap Cells of Arabidopsis Primary Roots

Lihua Chen, Huanhuan Yan, Tian Wang, Hanma Zhang*

Chongqing Key Laboratory of Molecular Adaptations of Plants, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing

Email: *hanmazhang@126.com

Received: Apr. 15th, 2020; accepted: May 19th, 2020; published: May 26th, 2020

Abstract

Cell division in Arabidopsis root cap is thought to be strictly regulated. It is generally believed that columella stem cells only divide horizontally and are highly synchronized in time, resulting in well organized cell layers. The division orientation of lateral root cap stem cells is about 90 degrees to that of columella stem cells, and their daughter cells mainly divide horizontally. In this study, we found longitudinal divisions in the collumella stem cells, collumella cells and lateral root cap cells of the primary roots of wild-type seedlings. In addition, we also observed a phenomenon that a columella stem cell in the central region expanded abnormally into and squeezed the outer layer of columella stem cells, but did not have an obvious impact on either the normal function of columella stem cells or the overall cellular structure of the root cap. The results of this study laid a foundation for further study on the regulation of root cap cell division in Arabidopsis.

Keywords

Arabidopsis, Root Cap, Columella Cells, Longitudinal Divisions

拟南芥根冠细胞中的纵向分裂

陈丽华, 严欢欢, 王甜, 张汉马*

重庆师范大学植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室, 重庆

Email: *hanmazhang@126.com

收稿日期: 2020年4月15日; 录用日期: 2020年5月19日; 发布日期: 2020年5月26日

摘要

拟南芥根冠中的细胞分裂被认为受到严格的调控。一般认为柱干细胞只进行水平方向的分裂, 且在时间

*通讯作者。

上高度同步,由此产生排列规则的柱细胞层,而侧根冠干细胞的分裂方向与柱干细胞的分裂方向相差约90度,其子细胞则以水平方向分裂为主。本研究中,我们通过对根冠区横切片的观察,发现在野生型幼苗根中柱干细胞,柱细胞均和侧根冠细胞均可进行纵向分裂。同时还观察到柱干细胞膨大挤压外围柱细胞圈的现象,但对其正常的功能以及根冠的结构无明显影响。本研究的结果为进一步研究拟南芥根冠细胞的分裂调控奠定了一定的基础。

关键词

拟南芥, 根冠, 柱细胞, 纵向分裂

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

根冠为陆生植物根尖分生组织的保护性器官,其型如帽状包裹在根尖分生组织的顶端与外围。根冠中含两种不同的细胞类型,称之为柱细胞和侧根冠细胞。柱细胞由柱干细胞的不对称性分裂而产生,后者位于静止中心下方。每个拟南芥幼苗的主根中含12个柱干细胞,排成一层[1] [2] [3] [4]。柱干细胞层可细分为两个区,即中央区 and 外围区,前者含4个细胞,其形状与空间排列方式与静止中心细胞相似;后者含8个细胞,成一圈包裹在中央区的外围。柱干细胞的分裂高度同步,且方向一致,沿水平方向横裂成两层,上层(又称近端层)细胞保留柱干细胞的特性,下层(又称远端层)细胞分化成柱细胞。柱细胞的分化过程也高度同步,由此导致该细胞区内呈现出按世代顺序排列的层状结构,同层细胞形态与分化程度相似,不同层中的细胞其年龄与分化程度按世代顺序逐层递增,直至最终在顶端脱落。侧根冠细胞由侧根冠干细胞平周分裂而成,其方向与柱干细胞的分裂方向接近垂直。侧根冠干细胞由侧根冠/表皮干细胞纵向分裂而来,共16个细胞,成一圈排列。侧根冠细胞每次分裂后,位于外侧的子细胞进入分化,同时可进行数轮水平方向的分裂,按世代顺序逐步向外移与向上延伸,最终从外层剥离[1] [2] [3]。

在根生长过程中,根冠的形状虽然维持恒定,但其内的细胞则在不断更新,因此根冠中的细胞分裂无论在速度还是分裂方式上均受到严格控制。正因如此,根冠是研究植物细胞分裂调控的理想材料[1] [2] [3] [4]。此外拟南芥的根冠由于结构简单,易于生长与观察,遗传与分子资源丰富等优点备受青睐。即便如此,我们对拟南芥根冠细胞的分裂的许多调控细节仍然知之甚少。例如目前并不清楚柱干细胞是否进行纵向分裂,侧根冠细胞分裂除在水平方向外是否在其它方向也进行分裂等。

本研究通过对根冠区的横切片的观察,发现在部分野生型幼苗的主根中,柱干细胞和柱细胞均可进行纵向分裂,侧根冠细胞中可出现在平周和垂周方向的纵向分裂。同时还观察到一例柱干细胞向外围膨大,由此挤断外围柱干细胞圈的现象,该形态异常可在多代子细胞中维持,对柱干细胞功能和根冠的整体结构无明显影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本实验所用的材料为野生型(Columbia)拟南芥种子,其最初来源为英国诺丁汉大学的欧洲拟南芥种子中心(<http://www.arabidopsis.org.uk/>)。

2.2. 植物的培养和生长条件

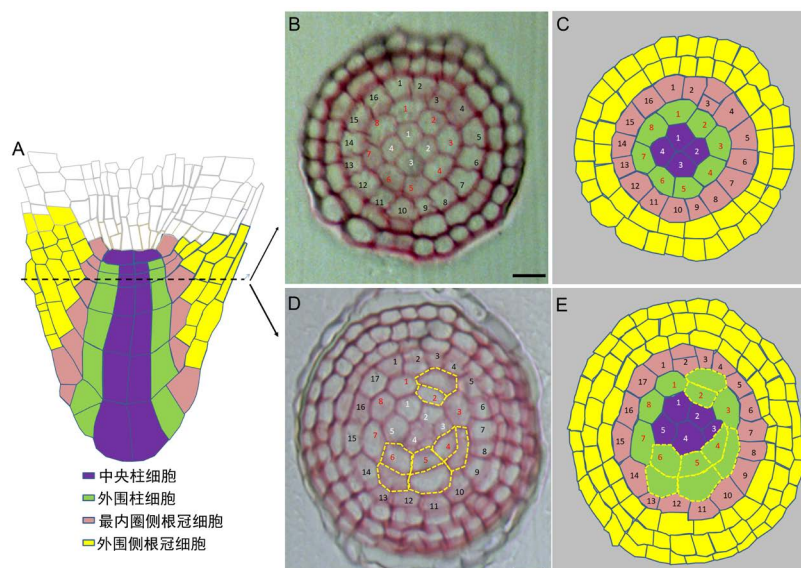
种子消毒和培养方法如前报道[5] [6], 种子用 10% 次氯酸 + 90% 酒精混合溶液浸泡 10 分钟灭菌消毒, 用酒精洗 3~4 遍, 在无菌台吹干后点种于配制在 10 cm × 10 cm 方形塑料无菌培养皿中固化的 1/2 MS 琼脂(1%, w/v)培养基上。点种后的培养皿用 Nescofilm 封口膜密封, 在上方封口膜的中央打开 1~2 个小开口允许培养皿内外空气交换, 将培养皿垂直放置于 22°C, 16 h 光照/8 h 黑暗周期的培养箱中萌发, 光照强度为 12,000 LX。

2.3. 根切片

幼苗根切片制备方法参照文献记载[7]。幼苗根先用固定液(含 1% 戊二醛, 4% 多聚甲醛溶解于 50-mM, pH 7.0 的磷酸缓冲液中)固定, 后用 Technovit 7100 树脂包埋, 切片, 具体操作方法参照树脂供应商 Technovit 的说明书。切片厚度为 5~6 微米, 用 0.05% 钨红(Sigma)染色, DePeX (BDH)装片, Nikon ECLIPSE 80i 微分干涉相差显微镜观察, DS-Ri1 数码相机+NIS-Elements 软件拍照和图像处理。

3. 结果与分析

本研究中我们共观察了 15 个野生型幼苗的主根根冠区的横切片, 幼苗的年龄为萌发后 7 天。其中 11 个幼苗(76%)的切片中的细胞结构与细胞排列方式与文献[2]和教科书上的描述基本相吻合, 未发现纵向分裂的痕迹。图 1(B), 图 1(C)展示该类切片中的典型细胞排列模式。在切片的中央区有 4 个细胞(本文中称之为中央区柱细胞), 紧贴其外围的一圈中有 8 个细胞(本文中称之为外围柱细胞), 该两区中的细胞依据截面的具体位置或为柱干细胞, 或为柱细胞(见图 1(A))。紧贴在外围柱细胞外侧的一圈细胞在本文中称之为第一圈侧根冠细胞, 依据具体位置可能为侧根冠干细胞, 或为它们分裂产生的子细胞, 是每层侧根冠中的首个子细胞, 其数目基本固定为 16。上述细胞区内相对固定的细胞数目为确定细胞类别提供了重要依据。



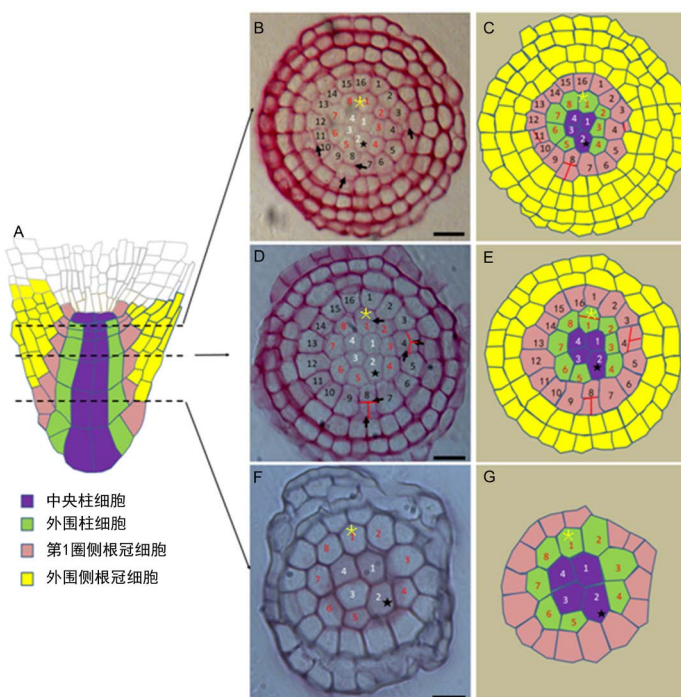
注: (A) 野生型拟南芥幼苗主根根冠区纵截面细胞结构示意图及颜色标注说明。(B) & (D) 来自不同根的根冠区横切片照片, 其中标尺 = 10 μm; (C), (E) 为分别描自(B)和(D)的细胞结构图。(A), (C), (E)中使用了同样的颜色方案标注不同种类的细胞, 中央区柱细胞, 外围柱细胞, 第 1 圈侧根冠细胞和外围侧根冠中的细胞分别用紫色, 绿色, 粉红色和黄色填充。非正常纵向细胞分裂在(B) & (D)中用箭头标示, 在(C) & (E)中用红色线条分隔壁标示。为方便比较和辨认, (B)~(E)中的中央区柱细胞, 外围柱细胞, 第 1 圈侧根冠细胞层中的细胞数分别用白色, 红色和黑色数字依顺序标示, 各层中标示的起始位置大致相同。(B), (C)中异常纵向分裂的外围柱细胞用黄色虚线标示其外围轮廓和分隔壁

Figure 1. Cellular structures in root cap cross-sections from two different wild type *Arabidopsis* seedlings

图 1. 两个不同野生型拟南芥幼苗主根根冠区横切片的细胞结构

在其余的 4 个幼苗(26%)的根冠横切片中, 我们在上述 3 个细胞区内发现了异常细胞分裂。图 1(D), 图 1(E)展示了其中的一个幼苗的根冠横切片的显微镜照片及依据照片描成的细胞结构示意图, 其中央区多出一个细胞, 表明出现了一次纵向分裂。在外围柱细胞圈中, 有 4 个细胞出现了纵向分裂。因为同一个幼苗的所有根冠区的切片均呈现同样的纵向分裂, 出现在同样位置的细胞中, 表明这些分裂应该出现在柱干细胞中, 而且已维持了多个分裂世代。

图 2 展示另一个具异常细胞分裂和细胞形态的根冠的 3 个在不同部位的横切片。这些不同位置的切片不仅可展示细胞分裂和细胞形态异常, 同时还可提供有关异常出现的位置和时间的信息。如切片的中央区可见一个形态异常的细胞(用★标注), 向外扩展将外围柱细胞圈挤断。该异常细胞在 3 个切片中均可见, 表明其最先出现的位置在柱干细胞, 并且经数轮分裂后仍然能够维持。值得注意的是该细胞形态异常并未对根冠的整体细胞结构, 柱干细胞的正常分裂活动或柱细胞的分化进程造成明显影响, 显示拟南芥根冠细胞结构具有较大的可塑性。在中间的横切片中(见图 2(D), 图 2(E))可见一个外围柱细胞(标注为 1, 同时用黄色*加注)进行了一次纵向分裂, 在其上方或下方的切片中均未分裂, 据此可推断该分裂应该出现在幼苗取材前不久, 出现的位置应该是柱细胞中, 而不是柱干细胞。此外, 在该根冠的切片的第 1 圈侧根冠细胞(编号分别为“4”和“8”)中还发现了两组平周+垂周纵向分裂, 表明侧根冠细胞可以在不同方向进行纵向分裂, 且这些分裂可相继出现在同一组细胞中。



注: (A) 如图 1, 野生型拟南芥幼苗主根根冠区纵截面细胞结构示意图及颜色标注说明。(B), (D), (F) 为来自同一个幼苗主根根冠中 3 个不同部位的横切片的显微镜照片; (C), (E), (G) 为分别描自(B), (D), (F)的细胞结构示意图, 其中的细胞类型与填充颜色间的关系, 以及中央区柱细胞, 外围柱细胞, 第 1 圈侧根冠细胞层中的细胞数的标注方法与图 1 中相同。★标注中央区膨大的细胞, *标注切片中呈现纵向分裂差异的外围柱细胞。(B), (D), (F)中标尺 = 10 μ m

Figure 2. Timing and location of abnormal divisions and morphology changes in *Arabidopsis* root cap

图 2. 拟南芥根冠中异常分裂和形态变化出现的时间与位置

4. 结论与讨论

高等植物的根冠由于其快速的细胞更新频率, 高度同步的分裂和分化过程, 排列规则和简单的细胞

结构等诸多优点,是研究细胞分裂模式与调控机理的理想器官。但即使在简单的模式植物拟南芥中,有关根冠细胞的分裂模式的信息目前都不很完整。如有关拟南芥根中的柱干细胞的分裂方式几乎所有教科书和文献中基本一致,认为柱干细胞沿水平方向(即与根纵轴垂直的方向)分裂[1][2][3][4]。柱干细胞是否进行纵向分裂目前并无明确记载。另外目前的另一个普遍共识是在拟南芥根冠中柱细胞不进行细胞分裂[1][2]。本研究中我们通过对野生型幼苗主根根冠区切片的观察,发现柱干细胞和柱细胞中都可出现纵向分裂[1][2],出现的频率也不是太低(26%)。这一发现至少表明我们目前有关柱干细胞和柱细胞的分裂模式并不完全准确。当然我们目前观察的幼苗数量非常有限,了解柱干细胞和柱细胞纵向分裂出现的真实频率还需要更多的实验数据。此外,本研究的数据还无法判断柱干细胞和柱细胞的纵向分裂是否与培养条件有关,这些分裂对根的生长和功能有什么意义。回答这些问题更需要进一步的研究。无论如何本研究的结果为开展这些研究提供了依据。

了解高等植物器官发育过程中细胞分裂的准确位置和时间信息是植物发育生物学研究的重要内容[8],但获得这些信息常常受实验材料和实验方法上的限制。拟南芥根冠由于其简单细胞结构和易于观察的优点,为研究细胞分裂、分化的时间与空间提供了一个理想实验材料。本研究通过对不同部位的横切片的观察,可比较准确地推测出特定细胞分裂或细胞形态变化出现的时间和位置,如将此研究方法与共聚焦显微技术结合可望获得更为准确的信息。

同一类型的细胞间是否存在差异是研究多细胞生物发育中的一个有意义的问题。如每个拟南芥根尖分生组织中有16个柱干细胞[3],它们的空间位置可以明显分成两个区,即中央区和外围区,这两个区中柱干细胞间是否有差别目前并不清楚。我们最近的研究发现中央区和外围区的柱干细胞或柱细胞间在细胞分裂模式上存在明显差异,中央区的柱细胞的分裂模式与调控更接近于柱干细胞,比较规则,而外围区的柱干细胞或柱细胞的分裂模式更接近于侧根冠细胞[9]。本研究发现中央区柱细胞膨大扩展到外围柱细胞区,并打乱原来外围柱细胞的细胞排列方式,此种细胞形态变化为研究柱细胞的位置效应提供了一个有价值的研究系统。

基金项目

本研究得到了重庆师范大学人才基金(12XLR36)的资助。

参考文献

- [1] Kumpf, R.P. and Nowack, M.K. (2015) The Root Cap: A Short Story of Life and Death. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 5651-5662. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv295>
- [2] Wenzel, C.L. and Rost, T.L. (2001) Cell Division Patterns of the Protoderm and Root Cap in the "Closed" Root Apical Meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, **218**, 203-213. <https://doi.org/10.1007/BF01306609>
- [3] Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B. (1993) Cellular Organisation of the *Arabidopsis thaliana* Root. *Development*, **119**, 71-84.
- [4] Scheres, B., Benfey, P. and Dolan, L. (2015) Root Development. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, **1**, 1-18. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>
- [5] 陈玉洁, 严欢欢, 陈丽华, 王甜, 张汉马. WOX5 过量表达和秋水仙素处理对拟南芥根冠柱细胞与侧根冠细胞的影响差异[J]. 植物学研究, 2019, 8(3): 212-217.
- [6] 陈月琴, 严欢欢, 陈玉洁, 陈丽华, 王甜, 张汉马. 拟南芥静止中心细胞特异性基因表达系统的构建及功能验证[J]. 植物学研究, 2019, 8(3): 181-189.
- [7] Beeckman, T. and Viane, R. (2000) Embedding Thin Plant Specimens for Oriented Sectioning. *Biotech. Histochem*, **75**, 23-26. <https://doi.org/10.3109/10520290009047981>
- [8] Scheres, B. (2007) Stem-Cell Niches: Nursery Rhymes across Kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 345-354. <https://doi.org/10.1038/nrm2164>
- [9] 王甜, 严欢欢, 陈丽华, 张汉马. 位置效应对拟南芥根冠柱细胞的影响[J]. 植物学研究, 2020, 9(3): 262-267.