

Positional Effect on Columella Cells of Arabidopsis Primary Roots

Tian Wang, Huanhuan Yan, Lihua Chen, 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

Columella cells are one of the two cell types in the root cap of higher plants and are positioned at the forefront of a root tip. In the model plant Arabidopsis, the formation and differentiation of columella cells are highly synchronized, resulting in a typical layered structure. It is currently not clear whether there are any differences between columella cells. In this study, we analysed the division pattern and cellular arrangement of the columella cells in the main root of both wild-type and WOX5 over-expressing seedlings and found differences in the division pattern, cell morphology and cellular arrangement between columella cells in different positions. In wild-type seedlings, the columella cells in the peripheral zone were more likely to undergo irregular cell division or to have abnormal arrangement than those in the central zone. In WOX5 overexpressing seedlings, the division pattern, morphology and arrangement of columella cells in the central zone were similar to those in the normal columella stem cells, while columella cells in peripheral zone were more similar to those of the lateral root cap cells in the above-mentioned characteristics. The results of this study form a basis for a new experimental system and offer a new research strategy for studying the development and regulatory mechanisms of columella cells.

Keywords

Arabidopsis, Root Cap, Columella Cells, Positional Effect

位置效应对拟南芥根冠柱细胞的影响

王甜, 严欢欢, 陈丽华, 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

*通讯作者。

摘要

柱细胞是根冠中两种细胞类型之一，位于根尖的最前端。在模式植物拟南芥中，柱细胞的产生与分化过程高度同步，形成规则的层状结构。柱细胞之间是否存在差异目前并不清楚。本研究通过对野生型和WOX5过表达幼苗的主根中的柱细胞的分裂模式和排列方式的分析，发现不同位置的柱细胞在分裂模式，细胞形态和细胞排列方式等方面呈现出明显差异。在野生型幼苗中，外围区的柱细胞与中央区的柱细胞相比更容易出现不规则细胞分裂与不规则细胞排列。在WOX5过表达的幼苗中，中央区的柱细胞的分裂模式，细胞形态和细胞排列方式与正常柱干细胞接近，而外围区的柱细胞与侧根冠细胞更为接近。本研究的结果为进一步了解柱细胞的发育及其调控机理提供了一个新实验系统和一条新的研究思路。

关键词

拟南芥，根冠，柱细胞，位置效应

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

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

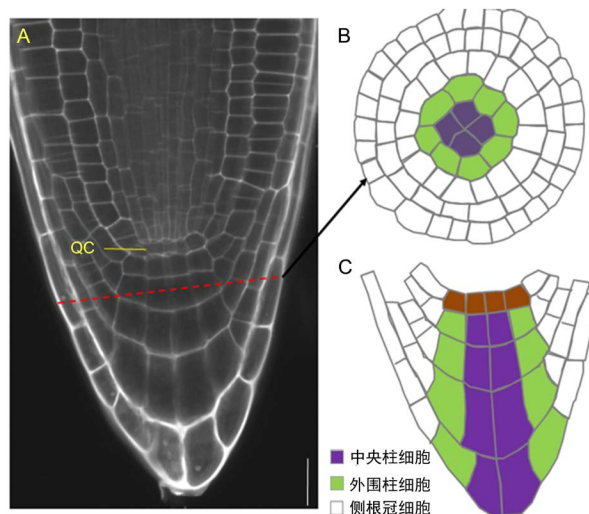
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

根冠(Root Cap)是陆生植物中的一个非常重要的器官，担负着保护根尖分生组织和从土壤中获得环境信息，包括地球重力信息等重要功能。根冠中含两种不同类型的细胞，称为柱细胞和侧根冠细胞，前者位于静止中心下方和根冠的中央，后者分布于根冠的侧面，成空心倒圆锥形状包裹在柱细胞和根尖分生组织的外围。柱细胞和侧根冠细胞来源于各自的干细胞[1] [2] [3] [4]。负责提供新的柱细胞的干细胞称为



注：(A) 拟南芥根尖共聚焦照片展示根尖纵截面的典型细胞结构；(B) 静止中心以下根冠区横截面的典型细胞结构示意图(描自于本实验室自拍的野生型幼苗根尖横切片的显微镜照片)；(C) 根冠区纵截面细胞结构示意图(描自于(A))。注意(B)和(C)中的中央柱细胞和外围柱细胞用不同填充颜色标示。(A)中标尺为 10 μm

Figure 1. The cellular organisation of the Arabidopsis root cap

图 1. 拟南芥根冠细胞结构示意图

柱干细胞。在模式植物拟南芥中, 每个根尖含大约 12 个柱干细胞, 排列在同一层中。从纵截面上看为 4 个细胞, 成一排; 横截面可见所有 12 个柱干细胞, 按空间位置可分为两个区, 即中央区含 4 个细胞和外围区含 8 个细胞, 成一圈包围着中央区细胞(图 1)。柱干细胞定期进行水平方向的不对称分裂, 所产生的两个子细胞中, 位于上方的细胞维持干细胞特性, 位于下方的细胞则分化成柱细胞。由于柱干细胞的分裂与柱细胞的分化均高度同步, 导致柱细胞区内细胞按其世代顺序, 成层状排列, 同层细胞间形态与发育阶段相似, 而相邻两层细胞层间相差一个细胞分裂时代。除上述发育世代的差异以外, 柱细胞间是否存在其它差异, 是否受空间位置的影响目前尚不清楚。

本研究通过对野生型幼苗和 *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5*) 过表达幼苗[5]的主根根尖中柱细胞的分裂模式及细胞排列的观察, 发现位于中央区 and 外围区中的柱(干)细胞之间存在明显差异。如在野生型幼苗的主根中, 观察到的不规则细胞分裂绝大部分出现在外围柱细胞中, 极少出现在中央柱细胞中; 在 *WOX5* 过量表达幼苗的根尖中, 中央区和外围区的细胞的分裂方向明显不同, 中央区的细胞的分裂方向与柱干细胞相同, 与根的纵轴垂直, 而外围区的细胞的分裂方向更接近于侧根冠细胞的分裂方向, 有些与根的纵轴平行, 有些与根的纵轴呈小于 90 度的角度。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本实验所用的野生型(*Columbia*)拟南芥种子最初来源于欧洲拟南芥种子中心(<http://www.arabidopsis.org.uk>); 35SSGVG/UAS::*WOX5* 转基因株系[5]种子由日本奈良科技大学(Nara Institute of Science and Technology) Keiji Nakajima 教授赠与。地塞米松(英文名 dexamethasone, 简称 DEX)购自天根生化科技有限公司。

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[6] [7], 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 10cm × 10cm 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。地塞米松母液(10 mM)配置于水中, 用孔径为 0.2 微米的过滤膜过滤灭菌, 在培养基高温(121°C, 20 分钟)灭菌后冷却至 60°C 左右加入。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 12000 Lx。

2.3. 显微镜观察

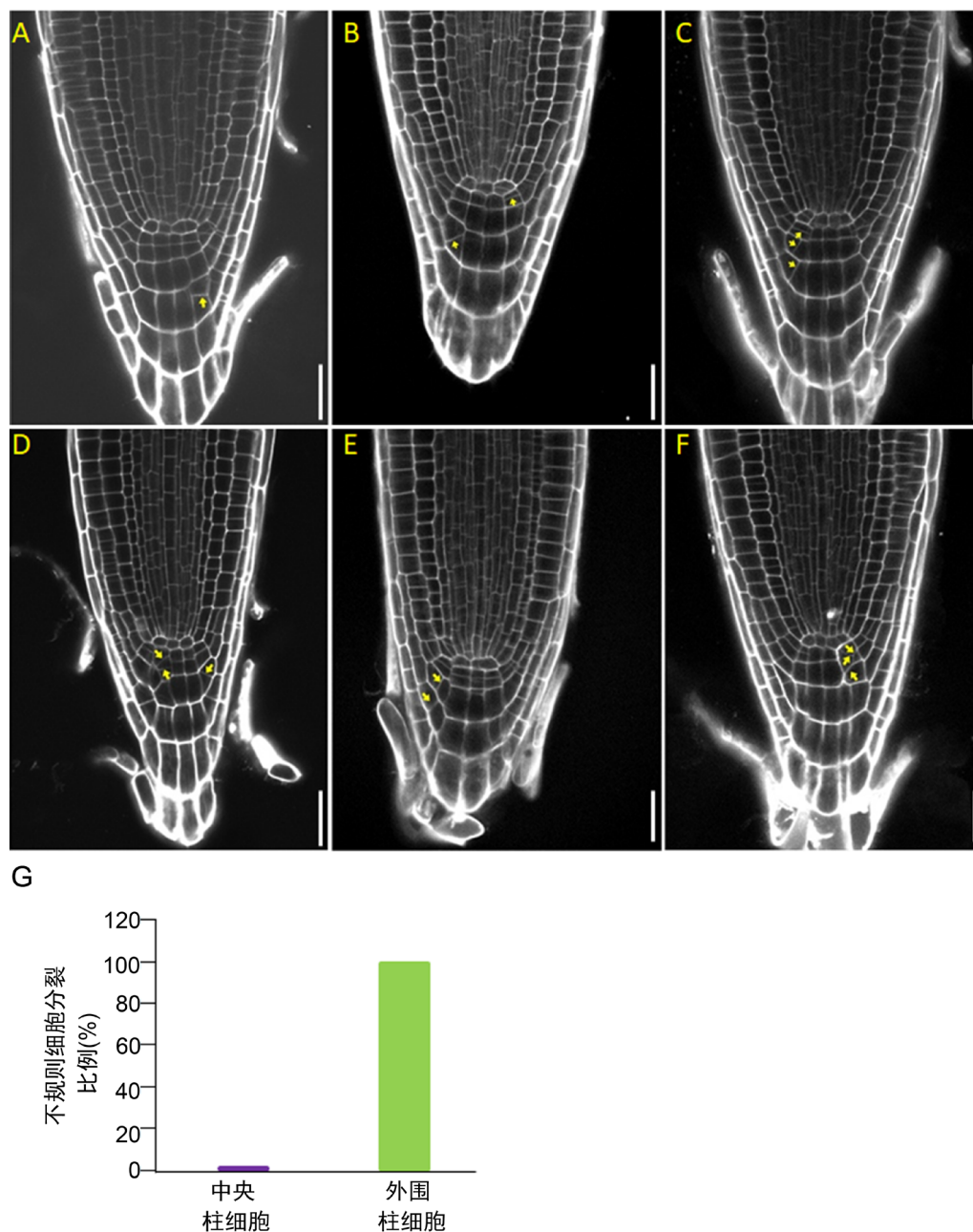
共聚焦显微镜观察: 将幼苗根浸于滴加在载玻片上的 10 μg/ml 碘化丙啶(propidium iodide)溶液中, 轻轻盖上盖玻片, 用奥林巴斯 FV1200 共聚焦显微镜观察和拍照, 波长设置为激发光 488nm, 检测波长 510 nm。

3. 结果与分析

3.1. 野生型柱干细胞/柱细胞中不规则细胞分裂集中于外围柱细胞

在本实验室的培养条件下, 大多数野生型(*Columbia*)幼苗主根根尖的细胞结构与图 1(A)所示的相近, 在柱细胞区纵向可见典型的 4 细胞, 横向可见规则的层状排列, 无额外(不规则)分裂。但少数幼苗的根中在柱细胞区出现不规则细胞排列或不规则细胞分裂。本实验中我们观察了 526 个野生型(*Columbia*)幼苗的主根的细胞结构, 在 86 个幼苗的主根柱细胞区中发现有不规则细胞排列或不规则细胞分裂现象(图 2),

如柱细胞分裂(2(A)), 柱细胞分裂 + 柱干细胞分裂不同步(2(B)), 柱细胞列数减少及柱细胞形状异常(2(C)、2(E)), 柱干细胞分裂 + 柱细胞分裂(2(D), 2(F))等。值得注意的是在所观察到的 86 个不规则细胞分裂中有 83 个出现在外围区的细胞中, 只有 3 个不规则细胞分裂出现在中央区的细胞中, 表明这些不规则分裂与细胞所在的位置(区)有明显的对应关系。



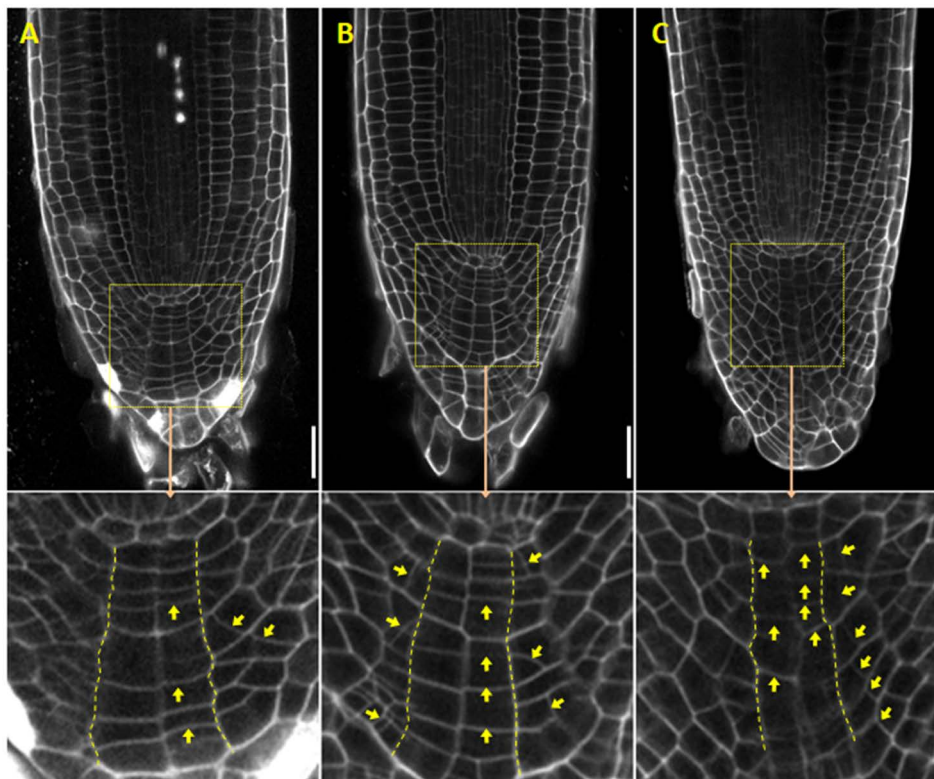
注: (A)~(F) 野生型拟南芥幼苗主根根尖共聚焦照片展示柱细胞中的不规则细胞分裂/排列(黄色箭头表示), 如柱细胞分裂(2(A)), 柱细胞分裂+柱干细胞分裂不同步(2(B)), 柱细胞列数减少或形状异常(2(C)、2(E)), 柱干细胞分裂异常+柱细胞分裂与形态异常(2(D), 2(F))等。注意不规则细胞分裂/细胞形态出现在外围区细胞。标尺线为 30 μm ; (G) 不规则细胞分裂/形态出现的频率与细胞的位置间的关系。数据代表 86 个在柱干细胞/柱细胞区出现不规则分裂/形态的幼苗, 所观察的幼苗总数为 526

Figure 2. Irregular cell divisions/arrangement in columella cells in the primary root of wild type *Arabidopsis* seedlings

图 2. 野生拟南芥幼苗根尖柱细胞的不规则细胞分裂

3.2. 在 *WOX5* 过量表达的幼苗根尖中，柱细胞区中细胞的分裂模式受其空间位置的影响

为了进一步验证柱细胞间的差异，我们观察了 *WOX5* 过量表达(35S::*GVG/UAS::WOX5*)的幼苗中柱细胞的分裂模式。此前已报道 *WOX5* 过量表达可导致未分化细胞在根冠中积累，且这些细胞可持续分裂 [4] [5]。图 3 展示 3 个典型的 35S::*GVG/UAS::WOX5* 幼苗的根尖共聚焦照片，从中可见中央区和外围区的细胞在细胞分裂模式上存在明显差异。中央区的细胞排列规则，分裂方向与正常柱干细胞的分裂方向基本一致，与根的纵轴大致垂直；外围区的细胞分裂排列相对较乱，细胞分裂方向有的与根的纵轴平行，有的与根的纵轴呈 $<90^\circ$ 的角度，与侧根冠的细胞分裂模式比较接近。



注：(A)~(C) 35S::*GVG/UAS::WOX5* 幼苗根尖共聚焦照片展示 *WOX5* 该表达的幼苗的主根中细胞分裂模式。幼苗先在 1/2MS 琼脂培养基萌发，萌发 3 天后转移至含 $5.0 \mu\text{M}$ DEX 的 1/2MS 培养基诱导 3 天后通过共聚焦显微镜观察，拍照。上排为原照片，标尺 = $30 \mu\text{m}$ ；下排为相对应上排照片的区位放大图。下排图中纵向黄色线标示根冠中央区与外围区的边界，中央区位于两黄线之间。黄色箭头标示分隔细胞的细胞壁，其方向代表该细胞与其相邻的细胞分裂时的方向。注意为了简洁，只标明了部分细胞的细胞壁

Figure 3. Cell division patterns in root caps of the primary root of 35S::*GVG/UAS::WOX5* seedlings

图 3. 35S::*GVG/UAS::WOX5* 幼苗主根冠中的细胞分裂模式

4. 讨论与结论

植物细胞无法在器官内部自由移动，其分裂，分化活动及形态变化必须与其所在的空间位置，以及其相邻细胞的相关活动相匹配。了解植物体内的位置信息，植物细胞感知与传导这些信息的机理以及它们对细胞分裂，分化活动及形态变化的影响及其调控途径等是植物发育学研究的重要内容。本实验对拟南芥根冠柱细胞的分裂模式与空间位置之间的关系进行了初步分析，发现在野生型和 *WOX5* 过表达幼苗的主根中位于中央区的柱细胞与外围区中的柱细胞间存在明显差异。在野生型幼苗的主根中，外围区的柱细胞与中央区的柱细胞相比更容易出现不规则细胞分裂与不规则细胞排列。在 *WOX5* 过表达的幼苗的主根中，中央区和外围区柱细胞在细胞分裂模式，细胞形态和细胞排列方式上都呈现出明显差异，中央

区的细胞的分裂模式, 细胞形态和细胞排列方式与正常柱干细胞非常接近, 而外围区的细胞在这些特征上与侧根冠细胞更为接近。由于柱细胞的规则排列, 高度同步化的分裂分化活动以及易于观察等特点, 本研究的结果为研究组织细胞位置信息及其传导机理提供了一个比较合适的实验系统与研究对象。

造成中央区和外围区柱细胞间差异的原因可能包括: 1) 不同的相邻细胞环境。比如外围区的细胞直接与侧根冠细胞接触, 可能从后者获得某些信息, 从而导致这些细胞的活动模式与细胞形态学特征更接近于侧根冠细胞。中央区的柱干细胞直接与静止中心细胞接触, 可从后者获得某些信息, 导致其活动模式与细胞形态学特征与后者类似; 2) 不同的细胞发育来源。按照目前的理解, 中央区与外围区的柱细胞均来自于静止中心细胞[2] [3]。但有可能柱干细胞的形成并不是按照上述方式, 可能只有中央区的柱细胞来源于静止中心细胞, 而外围区的柱细胞则来源于静止中心外围的细胞, 如此中央区与外围区的柱细胞间的差别可能归结于它们的不同发育来源。如果后一种假设成立, 对柱细胞间的位置效应的研究有可能为柱干细胞的发育途径提供新的实验证据。

致 谢

感谢日本奈良科技大学(Nara Institute of Science and Technology) Keiji Nakajima 教授提供的35SSGVG/UAS::WOX5 种子。

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.
- [2] 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.
- [3] Scheres, B., Benfey, P. and Dolan, L. (2015) Root Development. The *Arabidopsis* Book/American Society of Plant Biologists, **1**, 1-18.
- [4] 赵中华, 南文斌, 梁永书, 张汉马. 植物干细胞调控研究新进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(7): 1021-1028.
- [5] Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R. and Laux, T. (2007) Conserved Factors Regulate Signalling in *Arabidopsis thaliana* Shoot and Root Stem Cell Organizers. *Nature*, **446**, 811-814.
- [6] 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.
- [7] 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.