

Mirosława Górecka, Władysław Golinowski  
SGGW w Warszawie, Wydział Rolniczy, Katedra Botaniki

## Immunocytochemiczna lokalizacja kalretikuliny w syncytiach korzeni rzepaku porażonych mątwikiem burakowym (*Heterodera schachtii*)

Immunolocalisation of calreticulin in syncytia induced in roots  
of oil seed rape by sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*

Słowa kluczowe: kalretikulina, syncytium, endoplazmatyczne retikulum (ER)

Key words: calreticulin, syncytium, endoplasmic reticulum (ER)

Lokalizowano immunocytochemicznie występowanie kalretikuliny w syncytiach zaindukowanych w korzeniach rzepaku przez mątwika burakowego. W badaniach wykorzystano metodę znakowania złotem koloidalnym przeciwciał przeciwko kalretikulinie. W syncytiach kalretikulina była obecna na błonach endoplazmatycznego retikulum, otoczce jądrowej i w przyściennych warstwach cytoplazmy. Intensywność znakowania była zależna od stadium rozwojowego syncytium i stadium rozwojowego larwy nicienia.

Calreticulin was immunolocalised in syncytia induced in roots of oil seed rape by sugar beet cyst nematode. Primary antibodies against calreticulin were conjugated with colloidal gold. In syncytia, calreticulin was present in endoplasmic reticulum membranes, nuclear envelope and paramural layer of cytoplasm. Frequency of labelling depended on developmental stage of syncytium and juvenile of nematode.

### Wstęp

Larwy inwazyjne mątwika burakowego indukują w korzeniach porażonych roślin specyficzne struktury odżywcze — syncytia. Skład komórkowy i ultrastrukturę syncytiów badano u wielu gatunków roślin należących do rodzin *Brassicaceae* (Wyss i in. 1984, Golinowski i Magnusson 1991, Magnusson i Golinowski 1991, Grymaszewska i Golinowski 1998), *Fabaceae* (Endo 1991, Gipson i in. 1971), *Poaceae* (Grymaszewska i Golinowski 1991, Bleve-Zacheo i in. 1995), *Chenopodiaceae* (Yu i Steel 1981, Bleve-Zacheo i Zacheo 1987). Wyniki tych badań oraz badania przeprowadzone na roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* porażonej mątwikiem burakowym wykazały, że w komórkach wchodzących w skład syncytiów zachodzą zmiany świadczące o ich podwyższonej aktywności fizjologicznej (Sobczak 1996, Golinowski i in. 1996). Wyrażają się one zwiększeniem

gęstości cytoplazmy oraz wzrostem liczby mitochondriów, plastydów, diktiosomów. Obecne w syncytiach ameboidalne jądra znacznie się powiększają, co w połączeniu z silną kondensacją nukleoplazmy świadczy o ich wysokiej aktywności metabolicznej. Gładkie endoplazmatyczne retikulum ulega silnej proliferacji i tworzy dobrze rozwinięty system błon. Na jego błonach występują czasami pojedyncze rybosomy. Proliferacja gładkiego endoplazmatycznego retikulum jest charakterystycznym zjawiskiem zachodzącym u podatnych roślin podczas tworzenia syncytium (Golinowski i Magnusson 1991, Golinowski i in. 1996, Grymaszewska i Golinowski 1998, Sobczak i in. 1997). W syncytiach zaindukowanych w korzeniach rzepaku endoplazmatyczne retikulum (ER) występuje w dwóch formach — pęcherzyków oraz wydłużonych cystern często zwiniętych koncentrycznie (Górecka 2002). Przy użyciu metod immunocytochemicznych podjęto próbę scharakteryzowania zmian zachodzących w strukturze ER podczas rozwoju syncytiów, a szczególnie pochodzenia licznych pęcherzyków występujących na terenie jego cytoplazmy. W tym celu wykorzystano przeciwciała przeciwko kalretikulinie — rozpuszczalnemu białku występującemu we wnętrzu ER wyposażonemu na końcowym odcinku C w czteropeptyd HDEL, odpowiadający za retencję tego białka w świetle ER u roślin (Krause i Michałak 1997). Kalretikulina jest wysoce konserwatywnym białkiem wiążącym  $Ca^{2+}$ , powszechnie występującym w komórkach eukariotycznych. Wysoki stopień homologii (ok. 90%) pomiędzy formami wyizolowanymi z różnych gatunków zwierząt (Coppolino i Dedhar 1998), równie wysoki stopień homologii (80–90%) pomiędzy formami wyizolowanymi z różnych gatunków roślin oraz podobieństwo pomiędzy formami roślinnymi i zwierzęcymi ok. 50–70% (Li i Komatsu 2000) wskazują, że kalretikulina może pełnić ważne biologiczne funkcje (Crofts i Denecke 1998).

U roślin kalretikulina została wyizolowana i zsekwencjonowana między innymi u szpinaku (Menegazzi i in. 1993), kukurydzy (Napier i in. 1995), ryżu (Li i Komatsu 2000), rzodkiewnika pospolitego (Nelson i in. 1997). Na poziomie komórkowym kalretikulina została zlokalizowana w ER (Opas i in. 1996), otoczcze jądrowej (Denecke i in. 1995, Napier i in. 1995), plazmodesmach (Baluška i in. 1999). Dotychczasowe badania wykazały jej obecność we wszystkich organach roślinnych.

Ze względu na wymienione cechy: powszechność występowania, wysoki stopień homologii oraz retencję w ER kalretikulina wydaje się być dobrym markerem endoplazmatycznego retikulum na terenie syncytiów zaindukowanych przez mątwika burakowego w korzeniach rzepaku. Ponieważ kalretikulina rzepaku jest jak dotychczas słabo poznana i brak dla niej specyficznych przeciwciał, w tej pracy wykorzystano poliklonalne przeciwciała przeciw kalretikulinie kukurydzy.

## Materiały i metody

---

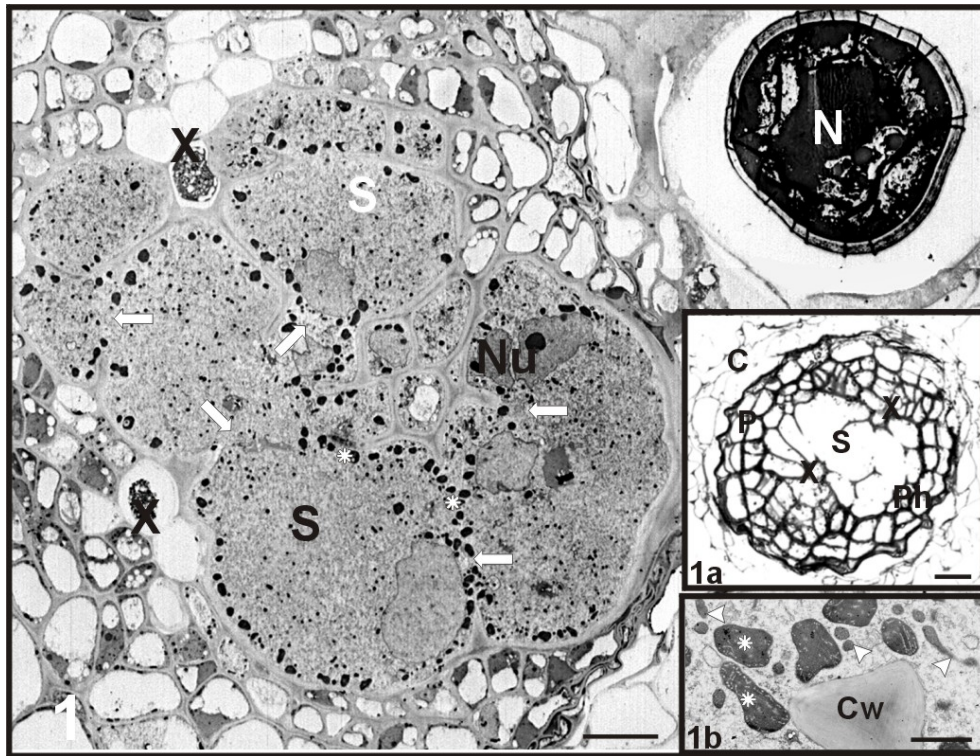
Nasiona rzepaku ozimego *Brassica napus* var. *oleifera* odmian Bor i Kana sterylizowano w 70% etanolu i w 5% podchlorynie wapnia i podkiełkowano przez 72 godz. w ciemności na 0,5% sterylnym agarze. Siewki przeniesiono na szalki Petriego zawierające sterylną zmodyfikowaną pożywkę mineralną 0,2 KNOP o pH 6,4, zestaloną 0,7% agarem, wzbogaconą 0,1% roztworem witamin Gamborg B5 i 2% sacharozą. Rośliny rosły w komorze hodowlanej (SANYO MLR 350) w temperaturze 20–22°C i 16-godzinnym fotoperiodzie przy świetle o natężeniu 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Dziesięciodniowe rośliny inokulowano larwami inwazyjnymi (stadium rozwojowe J2) mątwika burakowego *Heterodera schachtii* i hodowano w takich samych warunkach. Korzenie kontrolowano w mikroskopie świetlnym Axioscop (Zeiss), następnie pobierano fragmenty korzeni głównych i bocznych z syncytiami i żerującymi w nich larwami drugiego (J2), trzeciego (J3) i czwartego (J4) stadium.

Materiał utrwalano w mieszaninie 2% paraformaldehydu i 2,5% glutaraldehydu w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,9 przez 2,5 godziny w 4°C, przepłukiwano 4  $\times$  15 min. 0,1 M buforem fosforanowym o pH 6,9, odwadniano w etanolu i zatapiano w żywicy akrylowej LR White. Polimeryzację przeprowadzano w temperaturze 36°C przez 72 godziny. Ultracienkie skrawki krojone na ultramikrotomie (Reichert Ultracut E, Leica) zebrano na siatki niklowe.

Kalretikulinę lokalizowano immunocytochemicznie, stosując dwustopniowe znakowanie na siatkach zgodnie z procedurą opisaną przez Baluška (1999). W badaniach użyto poliklonalne przeciwciała przeciwko kalretikulinie z kukurydzy (uzyskane dzięki uprzejmości dr Richarda Napiera z Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick UK). Wszystkie używane odczynniki dozowano w 50  $\mu\text{l}$  kroplach na siatkę w temperaturze pokojowej. Blokowanie niespecyficznych epitopów (30 min.) przeprowadzono w buforze TBS (bufor Tris + 0,9% NaCl o pH 7,5) z dodatkiem 2% albuminy wołu (BSA bovine serum albumin) i 0,8% surowicy koziej (NGS normal goat serum). Następnie inkubowano materiał z I-rzędowym specyficznym przeciwciałem (1 godz.) i płukano w buforze TBS o pH 7,5 z 2% BSA (4  $\times$  15 min.). Do wizualizacji przeciwciał zastosowano II-rzędowe przeciwciała (goat anti-rabbit) sprzężone ze złotem koloidalnym 20 nm, rozpuszczone w buforze TBS (pH 8,2) z 0,8% NGS i 2% BSA. Materiał płukano następnie w buforze TBS (pH 8,2) z NGS i BSA (4  $\times$  15 min.), kontrastowano w 2% wodnym roztworze octanu uranylu (10 min.) i płukano w wodzie destylowanej (5  $\times$  2 min.). Równocześnie wykonano kontrolę negatywną. W miejsce I-rzędowego przeciwciała podano 1% roztwór BSA. Analizę materiału przeprowadzono przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego JOEL 100C.

## Wyniki i dyskusja

Syncytia z larwami w stadium J3 (fot. 1 i 1a) zajmują centralną część walca osiowego. Komórki do nich włączone ulegają hipertrofii, a ściany pomiędzy nimi zostały rozpuszczone. W gęstej cytoplazmie widoczne są liczne plastydy, mitochondria (fot. 1b) i silnie rozwinięty system ER występujący w dwóch formach: pęcherzyków i wydłużonych cystern często ułożonych koncentrycznie (fot. 2).



Fot. 1. Syncytium z larwą nicienia w stadium J3/J4 — *Syncytium of J3/J4 juvenile*. Bar — 10  $\mu$ m

Fot. 1a. Syncytium z larwą nicienia w stadium J3/J4. Bar — 20  $\mu$ m

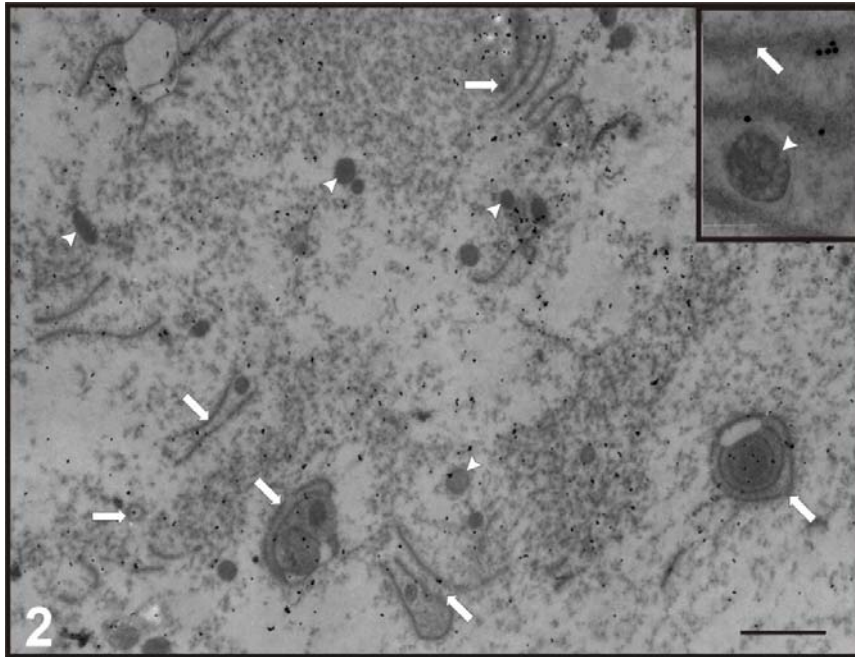
Fot. 1b. Powiększony fragment syncytium z fot. 1. Bar — 2  $\mu$ m

X — naczynia, S — syncytium, Nu — jądro komórkowe, Cw — ściana komórkowa, P — perycykl, Ph — floem, C — kora pierwotna, N — nicien

Otwory w ścianach komórkowych — strzałki, plastydy — gwiazdki, mitochondria — groty strzałek.

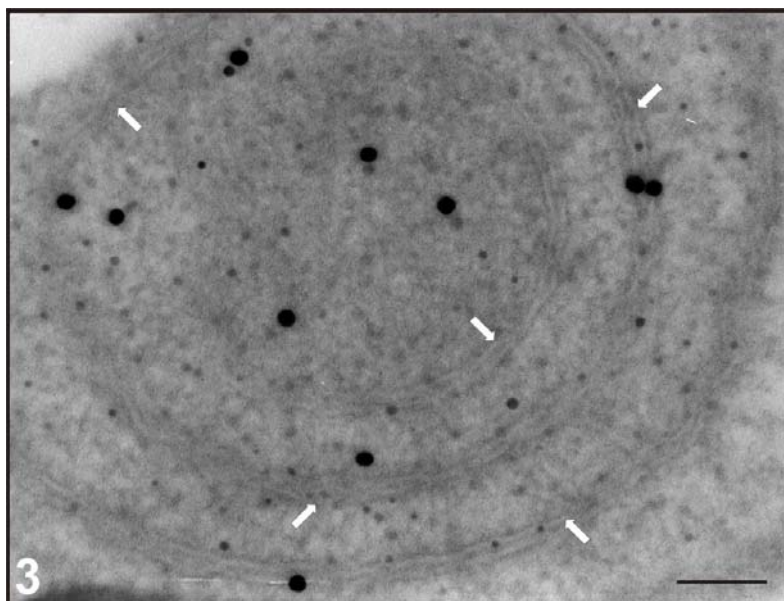
X — xylem, Ph — phloem, S — syncytium, Nu — nucleus, P — pericycle, C — cortex, N — nematode, Cw — cell wall

Arrows point to the cell wall openings, plastids — stars, mitochondria — arrow head.

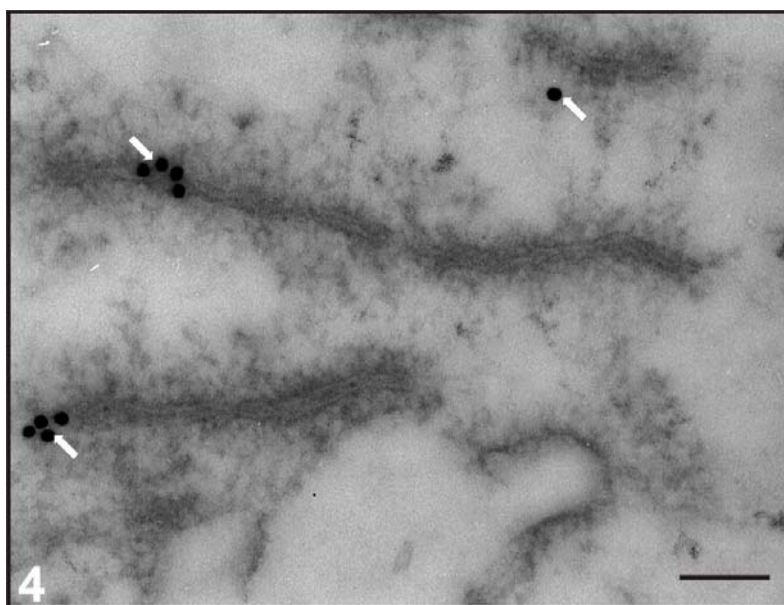


Fot. 2. Immunocytochemiczna lokalizacja kalretikuliny z zastosowaniem specyficznych przeciwciał i złota koloidalnego w syncytiach z larwami w stadium J3. Odmiana Kana. Strzałkami oznaczono ER, mitochondria — groty strzałek. W cytoplazmie i na błonach ER widoczne liczne ziarna złota koloidalnego — *Immunogold labelling of calreticulin in syncytia of J3 juvenile. Arrows point to ER, mitochondria — arrow heads. Numerous colloidal gold grains present in cytoplasm and ER membranes. Bar — 2 μm*

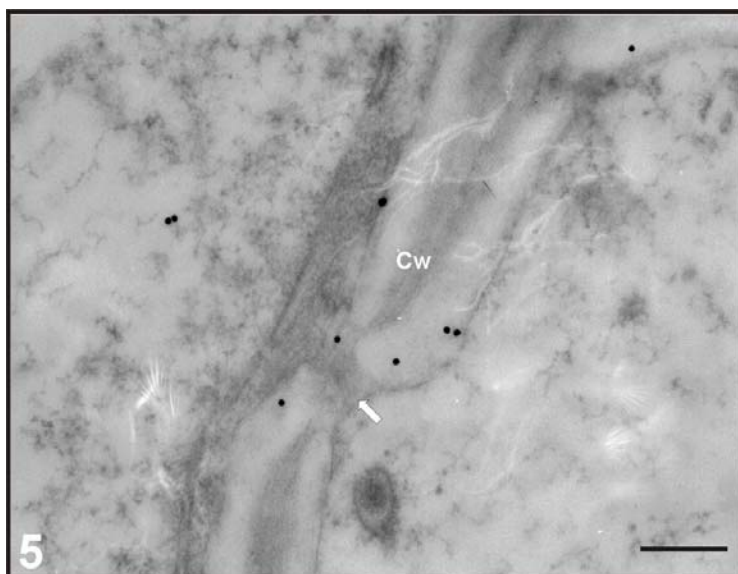
W regionach zawierających zwarte obszary tubularnego ER (fot. 4) oraz na błonach kolistego ułożonego ER (fot. 3) występują liczne ziarna złota koloidalnego. W pobliżu tworzących się otworów w przyściennych warstwach cytoplazmy, jak również na terenie ściany komórkowej obserwowano znakowanie złotem koloidalnym (fot. 5). W sąsiedztwie elementów trachealnych formują się wrosty transferowe, pomiędzy którymi w cytoplazmie widoczne są liczne ziarna złota (fot. 6). Obserwowano również pojedyncze znakowania w otoczce jądrowej (fot. 7). W syncytiach odżywiających larwy w późnym stadium J4 cytoplazma jest elektronoprzezierna, wzrasta liczba wakuol. Ziarna złota są mniej liczne. Obserwowano je w rozrzedzonej cytoplazmie i przy pęcherzykach ER (fot. 8). Nie znaleziono istotnych różnic w lokalizacji kalretikuliny pomiędzy odmianami Bor i Kana. Wiarygodność metody immunolokalizacji potwierdzono wykonując kontrolę negatywną. Zastąpiono I-rzędowe przeciwciało 1% roztworem BSA. Na tak potraktowanych skrawkach korzeni nie obserwowano żadnego znakowania. Dowodzi to, że przy zastosowaniu standardowego protokołu wykrywane są epitopy kalretikuliny.



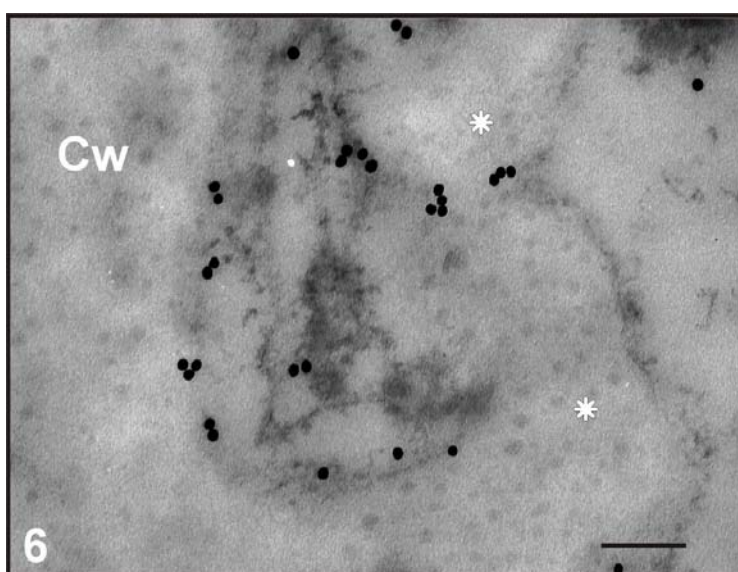
Fot. 3. Ziarna koloidalnego złota widoczne na błonach kolistego ER i w cytoplazmie. Strzałki wskazują ER — *Colloidal gold grains present on the swirls of ER membranes and in cytoplasm. Arrows point to ER. Bar — 0,25  $\mu$ m*



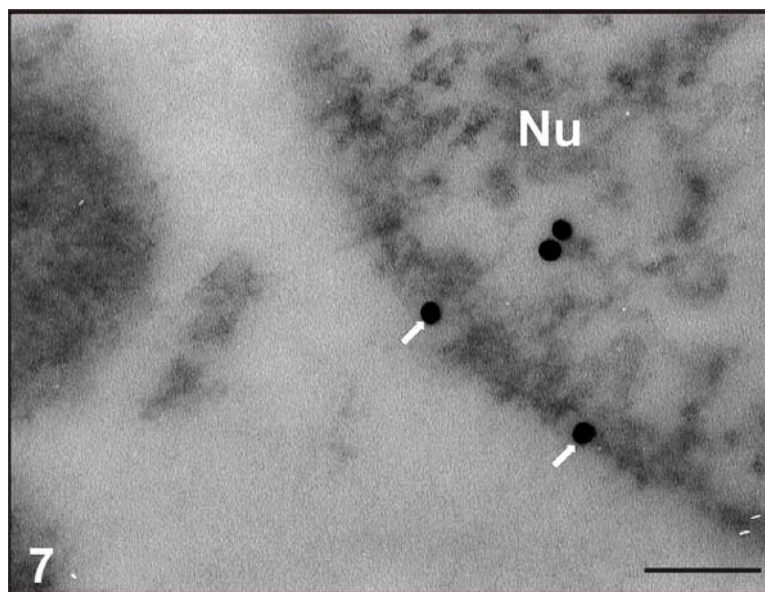
Fot. 4. Ziarna koloidalnego złota widoczne na błonach tubularnego ER i w cytoplazmie. Strzałki wskazują ziarna złota — *Colloidal gold grains present on the tubular ER membranes and in cytoplasm. Arrows point to colloidal golds grains. Bar — 0,25  $\mu$ m*



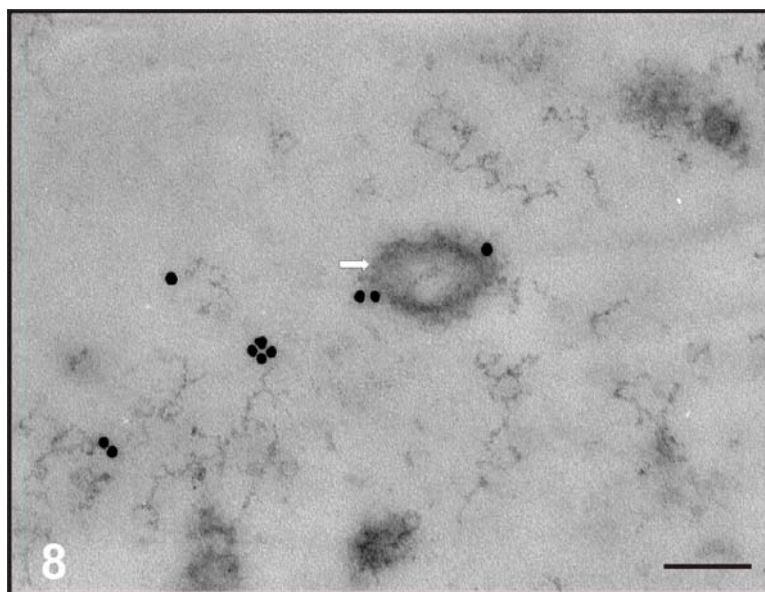
Fot. 5. Lokalizacja kalretikuliny w syncytium z larwą w stadium J3. Odmiana Kana. Ziarna złota koloidalnego na ścianie komórkowej i w pobliżu otworu (strzałka) w ścianie komórkowej (Cw)  
*Immunogold labelling of calreticulin in syncytia of J3 juveniles (cv. Kana). Colloidal gold grains present on the cell wall and near to cell wall opening (arrow). Cw – cell wall. Bar — 0,5  $\mu$ m*



Fot. 6. Lokalizacja kalretikuliny w syncytium z larwą w stadium J3. Odmiana Kana. Ziarna złota koloidalnego w cytoplazmie pomiędzy wrostami transferowymi – gwiazdki. Cw – ściana komórkowa  
*— Immunogold labelling of calreticulin in syncytia of J3 juveniles (cv. Kana). Colloidal gold grains in cytoplasm between cell wall ingrowths (asterisks). Cw – cell wall. Bar — 0,25  $\mu$ m*



Fot. 7. Lokalizacja kalretikuliny w syncytium z larwą w stadium J3. Odmiana Kana. Ziarna złota koloidalnego w otoczce jądrowej (strzałki) Nu – jądro — *Immunogold labelling of calreticulin in syncytia of J3 juveniles (cv. Kana). Colloidal gold grains in nuclear envelope (arrows). Nu – nucleus.* Bar — 0,2  $\mu$ m



Fot. 8. Lokalizacja kalretikuliny w syncytium z larwą w stadium J4. Odmiana Bor. Ziarna złota koloidalnego w cytoplazmie i ER. ER – strzałka — *Immunogold labelling of calreticulin in syncytium of J4 juvenile (cv. Bor). Colloidal gold grains in cytoplasm and ER. ER – arrow.* Bar — 0,25  $\mu$ m



Dotychczas nie badano lokalizacji kalretikuliny w syncytiach inicjowanych przez mątwika burakowego w korzeniach roślin. Nasze znakowanie wykazało jej obecność w membranach kolistych i wydłużonych form ER w całej cytoplazmie syncytium. Obecność ziaren złota koloidalnego na terenie pęcherzyków potwierdziło tezę, że jest to jedna z form, w jakiej ER występuje na terenie syncytiów. Lokalizacja ziaren na błonach ER i w otoczce jądrowej jest zgodna z danymi opisanymi przez Napier (1995) dla siewek kukurydzy i tytoniu (Denecke 1995). Widoczne różnice w liczbie ziaren złota koloidalnego na poszczególnych etapach rozwoju syncytium są prawdopodobnie związane ze stopniem proliferacji i aktywności ER. Gładkie ER występuje w komórkach o wysokiej aktywności metabolicznej i wysokim poziomie biosyntezy związków nie będących proteinami, na przykład w komórkach wydzielniczych (Kronsted-Robards i Robards 1991). Syncytium będące jedynym źródłem pokarmu dla rozwijającej się larwy nicienia, ze swoim silnie rozbudowanym systemem gładkiego ER wykazuje pewne podobieństwo do komórek wydzielniczych. Jednakże na stopień organizacji protoplastu syncytium, w tym również ilość ER ma wpływ stadium rozwojowe nicienia, miejsce inicjacji syncytium i podatność porażonej rośliny (Golinowski i in. 1996, Sobczak 1996, Sobczak i in. 1997, Grymaszewska i Golinowski 1998). W opisywanym przypadku różnica wynika ze stadium rozwojowego larwy nicienia. W syncytiach z larwami w stadium późne J3 znakowanie jest silniejsze niż w syncytiach z larwami w stadium późne J4. Obecność ziaren złota pomiędzy wrostami transferowymi jest związane z występowaniem w tych miejscach licznych struktur ER (Górecka 2002).

Występowanie kalretikuliny w pobliżu tworzących się otworów w ścianie komórkowej może mieć ścisły związek z opisywaną przez Baluška i in. (1999) lokalizacją kalretikuliny w plazmodesmach. Opisywane bowiem przez Golinowskiego i in. (1996) oraz Sobczaka i in. (1997) powstawanie pierwszych otworów w ścianach komórkowych pomiędzy komórkami włączanymi do syncytium odbywa się w oparciu o plazmodesmy.

Dalsze badania powinny dotyczyć lokalizacji kalretikuliny w korzeniach roślin odpornych na porażenie mątwikami, jak również stwierdzenie, jaką rolę pełni to białko podczas indukcji i rozwoju syncytiów.

## Wnioski

---

1. Przeciwciała przeciwko kalretikulinie kukurydzy wykrywają kalretikulinę rzepaku
2. Kalretikulina lokalizowana w syncytiach jest związana z błonami endoplazmatycznego retikulum.

3. Intensywność znakowania zależy od stadium rozwojowego syncytium.
4. Pęcherzyki obecne w syncytium stanowią część systemu błon endoplazmatycznego retikulum.

## Conclusion

---

1. Antibodies against maize calreticulin recognise molecules of calreticulin in oilseed rape.
2. In syncytia, calreticulin was present in endoplasmic reticulum membranes.
3. Frequency of labelling depended on developmental stage of syncytium.
4. Vesicles in syncytium are part of endoplasmic reticulum membranes.

## Literatura

---

- Baluška F., Šamaj J., Napier R., Volkmann D. 1999. Maize calreticulin localizes referentially to plasmodesmata in root apex. *The Plant Journal*, 19 (4): 481-488.
- Bleve-Zacheo T., Zacheo G. 1987. Cytological studies of the susceptible reaction of sugarbeet roots to *Heterodera schachtii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 30: 13-25.
- Bleve-Zacheo T., Melillo M.T., Andres M., Zacheo G., Romero M.D. 1995. Ultrastructure of initial response of graminaceous roots to infection by *Heterodera avenae*. *Nematologica*, 41 (1): 80-97.
- Coppolino M.G., Dedhar S. 1998. Calreticulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30: 553-558.
- Crofts A.J., Denecke J. 1998. Calreticulin and calnexin in plants. *Trends in Plant Science*, 3 (10): 396-399.
- Denecke J., Carlsson L.E., Vidal S., Hoglund A.S., Ek B., van Zeijl M.J., Sinjorgo K.M., Palva E.T. 1995. The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complex in vivo. *Plant Cell*, 7: 391-406.
- Endo B.Y. 1964. Penetration and development of *Heterodera glycines* in soybean roots and related anatomical changes. *Phytopathology*, 54: 79-88.
- Endo B.Y. 1991. Ultrastructure of initial responses of susceptible and resistant soybean roots to infection by *Heterodera glycines*. *Rev. Nématol.*, 14 (1): 73-94.
- Golinowski W., Magnusson C. 1991. Tissue response induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars. *Can. J. Bot.*, 69 (1): 53-62.
- Golinowski W., Grundler F.M.W., Sobczak M. 1996. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma*, 194: 103-116.
- Górecka M. 2002. Histogeneza korzenia rzepaku *Brassica napus* w warunkach infekcji mątwikiem burakowym *Heterodera schachtii*. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa.
- Grymaszewska G., Golinowski W. 1991. Structure of syncytia induced by *Heterodera avenae* Woll. in roots of susceptible and resistant wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Phytopathol.*, 133: 307-319.

- Grymaszewska G., Golinowski W. 1998. Structure of syncytia induced by *Heterodera schachtii* Schmidt in roots of susceptible and resistant radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis*). Acta Soc. Bot. Pol., 67 (3-4): 207-216.
- Krause K.H., Michalak M. 1997. Calreticulin. Cell, 88: 439-443.
- Kronstedt-Robards E., Robard A.W. 1991. Exocytosis in gland cells. In: Hawes CR, Coleman JOD, Evans DE. Eds. "Endocytosis, Exocytosis and Vesicle Traffic in Plants." Cambridge University Press, Cambridge, UK, 199-232.
- Li Z., Komatsu S. 2000. Molecular cloning and characterization of calreticulin, a calcium-binding protein involved in the regeneration of rice cultured suspension cells. Eur. J. Biochem., 267: 737-745.
- Magnusson C., Golinowski W. 1991. Ultrastructural relationships of the developing syncytium induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in root tissue of rape. Can. J. Bot., 69 (1): 44-52.
- Menegazzi P., Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Treves S. 1993. Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun., 3: 1130-1135.
- Napier R.M., Trueman S., Henderson J., Boyce J.M., Hawes C., Fricker M.D., Venis M.A. 1995. Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. J. Exp. Bot., 46: 1603-1613.
- Nelson D.E., Glaunsinger B., Bohnert H.J. 1997. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., 114: 29-37.
- Opas M., Tharin S., Milner R.F., Michalak M. 1996. Identification and localization of calreticulin in plant cells. Protoplasma, 191: 164-171.
- Sobczak M. 1996. Investigations on the structure of syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana* induced by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* and its relevance to the sex of the nematode. Ph. D Thesis, University of Kiel, Germany.
- Sobczak M., Golinowski W., Grundler F.M.W. 1997. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* roots induced during development of males of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Europ. J. Plant Pathol., 103: 113-124.
- Yu M.H., Steele A.E. 1981. Host-parasite interaction of resistant sugarbeet and *Heterodera schachtii*. J. Nematol., 13: 206-212.
- Wyss U., Stender C., Lehmann H. 1984. Ultrastructure of feeding sites of the cyst nematode *Heterodera schachtii* Schmidt in roots of susceptible and resistant *Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers. cultivars. Physiol. Plant Pathol., 25: 21-37.