

УДК 581.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭВАНСА ГОЛУБОГО И НЕЙТРАЛЬНОГО КРАСНОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Н.А. БУРМИСТРОВА¹, Н.Ф. ЛУНЬКОВА¹,
М.С. КРАСАВИНА¹, Л.А. ПАНИЧКИН²

(¹ ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН;
² РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Сравнивали окрашивание растительных тканей прижизненным красителем (нейтральный красный – НК) и красителем для поврежденных клеток (Эванс голубой – ЭГ). Объектами были корень зеленого редиса (*Raphanus sativus L. var. lobo Sazonova, Stank*), листья хлорофитума (*Chlorophytum sp Ker Gawl.*), корни сеянцев кукурузы (*Zea mays L.*) и водных растений *Trianea bogotensis Karst.*

В некоторых случаях оба красителя одинаково окрашивали как нативные, так и поврежденные ткани. И ЭГ, и НК окрашивали толстые блоки из корнеплодов редьки только на периферии, не задевая паренхиму центральной области. В центре блока в обоих случаях были окрашены только сосудистые пучки, которые, возможно, служили проводниками для проникновения обоих красителей в блоки. Однако химическое взаимодействие красителей с компонентами клеточных стенок затрудняло их поступление в окружающие клетки. Взаимодействие с клеточными стенками могло быть причиной окраски поврежденных клеток на поверхности блоков. Кроме того, ЭГ окрашивал слизь, окружающую кончик корня кукурузы. Таким образом, неспецифическое связывание красителей затрудняет их использование в качестве показателей жизнеспособности клеток.

Другая трудность использования НК и ЭГ для определения жизнеспособности клеток заключается в ограниченном проникновении красителей в ткани. Отсутствие окрашивания под интактной перидермой в корнеплодах зеленой редьки или под эпидермисом листьев хлорофитума обусловлено барьерной функцией интактных тканей для НК и ЭГ. Эндодермис кончика корня кукурузы также ограничивал проникновение НК в стель. Так, обработка кончика корня кукурузы НК в течение 30 мин приводила к окрашиванию только коры. Для проникновения красителя в стель требовалось более длительное время или использование срезов. В этих случаях ни НК, ни ЭВ не могут использоваться для оценки жизнеспособности тканей.

Даже когда отсутствуют тканевые барьеры для проникновения красителей и они проникают к клеткам, следует также быть очень осторожным при интерпретации результатов. Например, в проведенных экспериментах жизнеспособные корневые волоски кукурузы и *Trianea* окрашивались как НК, так и ЭГ. В корневых волосках наблюдался быстрый циклозис, что указывает на то, что оба красителя не были токсичными. Корневые волоски – это клетки с высокой поглощающей способностью. Общеизвестно, что плазматическая мембрана нативных клеток непроницаема для ЭГ, но поступление красителя в клетки корневых волосков могло осуществляться с помощью другого механизма, например эндоцитоза.

Сделан вывод, что при использовании НК и ЭВ для оценки жизнеспособности клеток или тканей необходимо обратить внимание на существование барьеров проникновения в

ткани для обоих красителей, их связывание с клеточными стенками и различия в механизмах поглощения.

Ключевые слова: зеленая редька, хлорофитум, кукуруза, трианея, корнеплод, листья, корни, Эванс голубой, нейтральный красный.

Введение

Неблагоприятные условия среды (экстремальные температуры, засуха, загрязнение тяжелыми металлами, заражение патогенами и т. д.) пагубно действуют на растения и нередко приводят к их гибели. Одним из способов оценки жизнеспособности клеток служит их прижизненное окрашивание различными красителями. В качестве агента, избирательно прокрашивающего живые клетки, часто используют нейтральный красный (НК). Этот феназиновый краситель благодаря своей липофильной природе легко проходит через нативные мембраны в непротонированной форме как свободное основание. В кислых компартментах (например вакуолях) НК присоединяет протон, превращаясь в непроникающую через мембраны катионную форму, и улавливается **ion-trapping механизмом**. Протонированная форма НК придает кислым компартментам интенсивный красно-малиновый цвет [1, 3, 17].

Для выявления мертвых или поврежденных клеток чаще всего используют диазокраситель Эванс голубой (ЭГ). Плазматическая мембрана живых клеток не пропускает крупные анионы этого красителя, и клетки остаются неокрашенными. Только после повреждения мембраны может входить в клетки [4, 9, 20]. Определение способности ЭГ поглощаться клетками может служить показателем расстройств функций растения. Описано много примеров, показывающих, что количество вошедшего в клетки красителя соответствует степени развития повреждений. Например, ингибирование роста корня ячменя или клеток табака под воздействием алюминия строго коррелирует с окрашиваемостью клеток ЭГ [7, 8].

Выявление наиболее чувствительных к травмирующим воздействиям тканей необходимо для понимания механизма действия стрессов и путей активации защитных реакций. Например, локализация окрашивания при обработке ЭГ совпадает с местами аккумуляции алюминия в корнях люцерны и гороха [11, 13] и в клеточной культуре табака [8] и указывает на повреждаемые участки тканей. Недавно с помощью ЭГ был описан процесс нарушения роста корней гороха под влиянием алюминия и последующего его восстановления после переноса в среду, не содержащую этого элемента [11, 13]. Под воздействием алюминия в кончике корня образуются чередующиеся концентрические области сильно и слабее окрашенных клеток. В первых аккумулируется наибольшее количество алюминия. В результате неравномерного роста клеток коры и ризодермы индуцируется разрушение клеток. В них появляются разрывы, поврежденные клетки отшелушиваются. Возможно, участки корня, интенсивно окрашиваемые ЭГ, обеспечивают устойчивость растения к алюминию – быстрый turnover клеток ризодермы и наружной коры корня ускоряет детоксикацию, поэтому наиболее характерен для устойчивых сортов [2].

Широкое распространение явления апоптоза в растениях свидетельствует о важности адекватной оценки состояния тканей при различных условиях роста [21]. Так, окрашивание ЭГ широко используют при изучении патогенеза [10, 14]. В коре корня пшеницы окрашивание ЭГ позволило идентифицировать стадии развития

аэренхимы, облегчающей при гипоксии доступ кислорода к погруженным корням растений [6]. Быстрая оценка состояния клеток полезна также при изучении ответа культуры на воздействие антибиотиков, стимуляторов и других веществ, добавляемых в среду культивирования.

Повреждение и гибель клеток наблюдается не только в стрессовых ситуациях, но и в течение нормального развития растения. Поэтому определение ранних признаков нарушения жизнедеятельности клеток необходимо для понимания регуляции стадий развития. Генетическая программа клеточной смерти работает на всех этапах онтогенеза растения, реагируя на сигналы развития [21]. Это происходит, в частности, при ксилогенезе [18]. Окрашивание ЭГ позволило прояснить механизм развития адвентивных корней у глубоководного риса: выход корней на поверхность узла происходит не вследствие механического давления растущих клеток, ему предшествует локальная гибель эпидермальных клеток узла в местах будущего появления корня [12, 16].

Несмотря на многочисленные примеры, убеждающие в необходимости знания локализации повреждений, и на то, что красители давно и широко используются для оценки жизнеспособности тканей, на особенности их проникновения в разные клетки обращали недостаточно внимания. В данной работе сравнили поступление ЭГ и НК в функционально различные клетки – в клетки запасующих тканей и в отличающиеся интенсивной поглотительной активностью клетки корня.

Методика исследований

Объектами исследования были корни 4-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.), выращенных в термостате на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой, и трианеи (*Trianea bogotensis* Karst), растущей в аквариуме. Использовали как отделенные, так и неотделенные корни целого растения. Корни помещали в 0,15%-ный водный раствор ЭГ или свежеприготовленный 0,3 мкМ раствор НК на 15–30 мин. Затем их трехкратно отмывали от красителей, каждый раз по 10 мин. Бритвой от руки нарезали срезы. Целые корни и срезы просматривали под биноклем или микроскопом в проходящем или отраженном свете. Для изучения возможности эндоцитозного пути поглощения корни трианеи обрабатывали 1 мМ люцифером желтым и, непосредственно после обработки, наблюдали развитие флюоресценции. Фотографии делали при помощи фотокамеры JVC ТК-С1480Е, установленной на микроскоп Amplival (Carl Zeiss, Германия).

Поглощение красителей корнями сравнивали с окрашиваемостью клеток запасующих тканей корнеплода зеленой редьки (*Raphanus sativus* L. var. *lobo* Sazonova, Stank). Из тканей вырезали блоки размером около 1×1×2 см, помещали в растворы ЭГ на 30–60 мин или 24 ч, после чего блоки отмывали от излишка не вошедшей в ткани краски. Для сравнения окрашивали блоки из запасующих тканей после помещения в кипящую воду, 0,5н HCl или 85%-ный этанол на 10 мин. Нарезанные от руки срезы просматривали под биноклем МБС-1. В некоторых опытах использовали лист хлорофитума (*Chlorophytum* sp Ker Gawl.) Фотографировали цифровой фотокамерой Panasonic DMS-FS3. Растворы приготовлены на водопроводной воде. Анализировали около 30 корней и по 5–6 блоков из корнеплодов в каждом варианте.

Использованные реактивы: Evans blue (Sigma, Germany), neutral rot (Sigma, Germany), Lucifer yellow CH (Sigma, Germany).

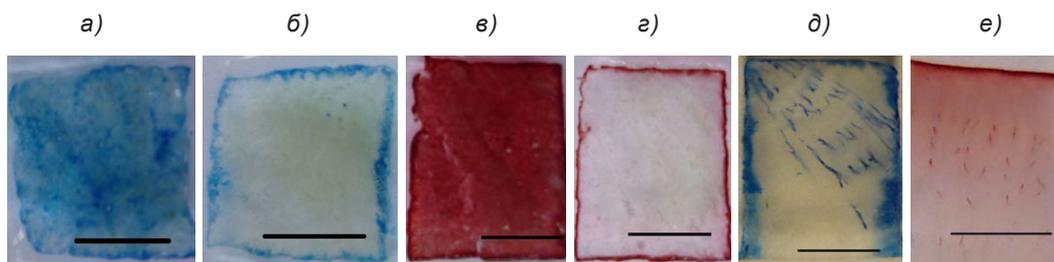


Рис 1. Толстые срезы блоков корнеплода зеленой редьки. Окрашивание 0,15%-ным раствором ЭГ (а, б) и 0,3 мкМ НК (в, з) в течение 30 мин с последующим отмыванием в нескольких сменах водопроводной воды в течение 30 мин: а, в – срезы наружного края блока; б, з – срезы из середины блока; д, е – соответственно продольный и поперечный срезы с участками окрашенных проводящих пучков

Результаты и их обсуждение

На окрашивание как ЭГ, так и НК преимущественно влияют два фактора: нативность тканей и проницаемость клеточных мембран для красителей. Разделить значение этих факторов при работе с тканями трудно. Если окрашивали раствором ЭГ вырезанные из корнеплода редьки блоки, отмывали их от красителя, а затем нарезали срезы, то синее окрашивание наблюдали только по периметру среза, т. е. в клетках, поврежденных при изготовлении блока до начала окрашивания (рис 1, а). На срезах, приготовленных из разных частей блоков, хорошо видно, что более интенсивным и однородным было окрашивание срезов, приготовленных из областей, наиболее близко расположенных к поверхности, при этом центральная часть блока была практически не окрашенной (рис 1, б). В этих опытах отсутствие окрашивания ЭГ внутри блоков из запасующей ткани могло свидетельствовать как о наличии живых, неповрежденных клеток, так и о том, что ЭГ не проникал внутрь блока из плотно упакованных паренхимных клеток. Однако похожую картину наблюдали и при окрашивании блоков НК (рис 1, в, з). По-видимому, отсутствие окраски внутри блоков свидетельствует о слабой проницаемости тканей для обоих красителей. В то же время можно было заметить тяжи окрашенных клеток, направленные вглубь тканей (рис. 1, д, е).

Расположение таких тяжей позволяет приурочить их к проводящим пучкам. Действительно, при большем увеличении были видны окрашенные как ЭГ, так и НК ксилемные тяжи на фоне неокрашенных клеток паренхимной ткани (рис. 2, а, б). Подобная картина имеет два возможных объяснения.

Во-первых, вероятно, что проводящие пучки служат путями проникновения красителей вглубь тканей, но красители выходят в окружающую паренхиму только при их повреждении. Во-вторых, окрашивание сосудов может объясняться химическим взаимодействием обоих красителей со стенками сосудов. Такое взаимодействие может быть причиной окрашивания клеточных стенок вблизи края среза (рис 2, в, з). В ряде работ показано, что оба красителя могут связываться с полисахаридами слизи, лигнином и суберином клеточных стенок, липидами плазматических мембран [3, 19]. Такое неспецифическое связывание определяет быстрое начальное окраши-

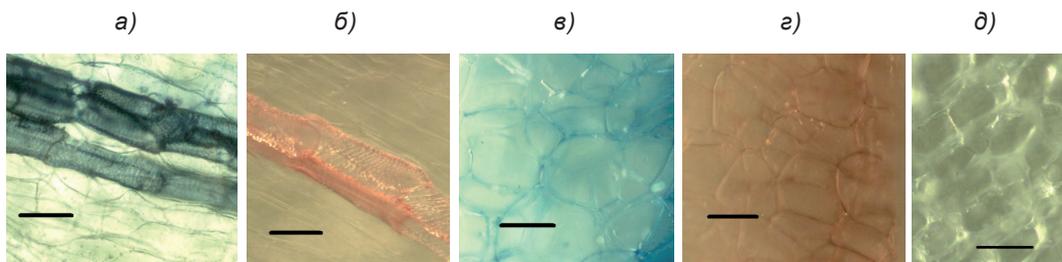


Рис 2. Окрашенные ЭГ (а) и НК (б) проводящие пучки и клеточные стенки (в, г) в корнеплоде редьки; д – неокрашенный контроль

вание поверхности корня, но затрудняет использование красителей для оценки нативности клеток.

Если вырезанные из корнеплодов блоки предварительно кипятили в течение нескольких минут или промораживали при -20°C , то наблюдали усиление интенсивности окрашивания и увеличение глубины проникновения обоих красителей внутрь блока. При окрашивании ЭГ или НК блоков редьки, вырезанных таким образом, что с одного края оставался слой перидермы, ни сама перидерма, ни ткани под ней не окрашивались (рис. 3, а, б). Это свидетельствует о том, что наружные ткани перидермы являются препятствием для проникновения красителей. Барьерная функция перидермы сохраняется и после кипячения, воздействия спиртом и промораживания блоков (рис 3, в, г). Продемонстрированные сходные черты в окрашиваемости тканей корнеплода редьки красителями, используемыми для выявления поврежденных и неповрежденных тканей, свидетельствуют о невозможности их использования для оценки жизнеспособности тканей. Необходимо изучение возможности их проникновения в ткани.

Значение барьеров для проникновения красителей было продемонстрировано также на листьях традесканции (данные не приведены). Если содранные с белых участков листа хлорофитума полоски, содержащие эпидермис с подлежащей под ним паренхимой, помещали в раствор ЭГ, то можно было увидеть неокрашенный эпидермис. Под ним проявлялась ярко-синяя ткань паренхимы – окрашивались клетки, поврежденные в результате сдирания полосок. Эпидермис не прокрашивался и на целых кусочках листа, ткани между верхним и нижним эпидермисом в этих случаях также оставались бесцветными. Только под поврежденным или местами удаленным эпидермисом обнаруживали окрашивание клеток паренхимы. Вероятно, в этих случаях проявлялась барьерная функция эпидермиса листа традесканции.

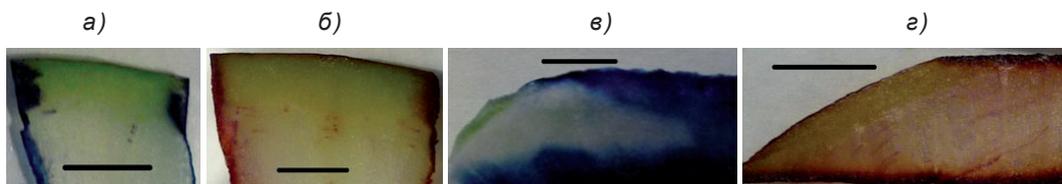


Рис 3. Срезы с перидермой (в не подвергнутых обработке (а, б) и подвергнутых замораживанию при -20°C (в, г) блоках редьки перидерма и подлежащие ткани не окрашены ни ЭГ (а, в), ни НК (б, г))

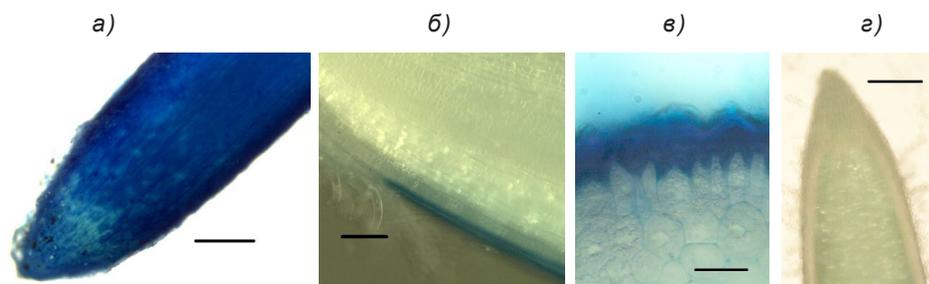


Рис 4. Окрашивание ЭГ кончика корня проростка кукурузы:
 а – вид с поверхности; б, в – соответственно продольный
 и поперечный срезы с окрашенной слизью; г – неокрашенный контроль

Кроме запасующих тканей, исследовали окрашиваемость ЭГ и НК тканей корня, характеризующегося интенсивной поглотительной активностью. Распределение окраски ЭГ и НК по поверхности неповрежденных корней кукурузы несколько различалось. Как и в работах ряда других исследователей [11, 13], при окрашивании кончика корня кукурузы ЭГ наблюдали неравномерную окраску – самый кончик окрашивался слабее остальной части корня (рис 4, а). Поскольку эта часть корня окружена отделившимися и готовыми отделиться клетками чехлика, некоторые из которых окрашиваются ЭГ, можно предположить, что интенсивность окраски кончика определяется их количеством. Расположенная выше зона, охватывающая, по-видимому, зрелую меристему и зону растяжения, окрашивалась ЭГ весьма интенсивно. Это, скорее всего, определяется наличием слизи, расположенной между телом корня и корневым чехликом (рис 4, б, в).

Нейтральный красный окрашивает поверхность кончика корня более равномерно (рис 5, а). На продольных срезах видно, что ЭГ и НК по-разному проникали в ткани. Если ЭГ практически не окрашивал ни кору, ни стель корня (рис 4, в), то НК в течение 15–30 мин проникал вглубь интактного корня кукурузы и окрашивал клетки коры, при этом клетки стели оставались неокрашенными (рис 5, б). Однако при более длительных экспозициях в красителе (до 1,5–2 ч) или при помещении в раствор НК срезов корня наблюдали окрашивание всего среза, включая стель (рис 5, в). Можно заключить, что все клетки тканей корня способны окрашиваться НК. Но четкая граница между окрашенной корой и неокрашенной стелью (рис 5, б) может

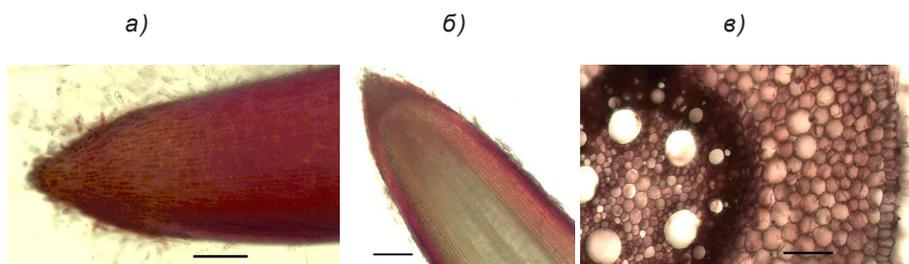


Рис 5. Окрашивание НК кончика корня кукурузы:
 а – вид с поверхности; б – продольный срез предварительно окрашенного целого корня;
 в – поперечный срез кончика корня (окрашивали сам срез)

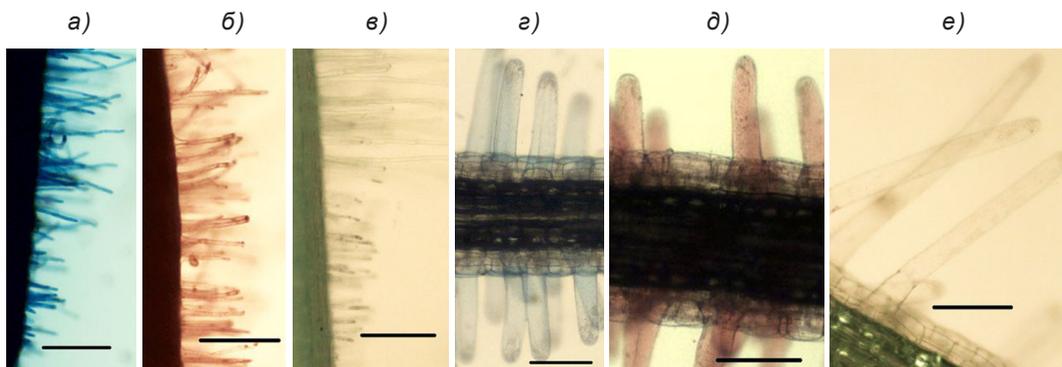


Рис 6. Корневые волоски кукурузы (а–в) и трианеи (г–е), окрашенные ЭГ (а, г) и НК (б, д); в, е – неокрашенный контроль

свидетельствовать о наличии некоего барьера, замедляющего распространение красителя. Таким барьером, по-видимому, является эндодерма. Похожее распределение окраски отмечали для НК в корнях кукурузы [3, 15], а для ЭГ – в корнях гороха [13] и пшеницы [2].

Оба красителя окрашивали клетки корневых волосков корня кукурузы (рис. 6, а, б) и трианеи (рис. 6, г, д). На крупных корневых волосках трианеи наблюдали интенсивное движение цитоплазмы как в неокрашенных, так и в обработанных красителями клетках. Наличие циклозиса свидетельствовало, что в обоих случаях клетки оставались живыми. При этом сохранение интенсивности движения указывает на то, что оба красителя нетоксичны при попадании внутрь клетки. При окрашивании НК заметна характерная хорошо описанная ранее исследователями последовательность поступления красителя – сначала окрашивался самый кончик волоска, затем вошедший в цитоплазму краситель перемещался в вакуоль. В случае ЭГ окрашивание сохранялось в цитоплазме и трудно было сказать, проникал ли краситель в вакуоль. Однако можно было заметить, что окрашенные обоими красителями частички перемещались в русле движущейся цитоплазмы, т. е. окрашивание объясняется поступле-

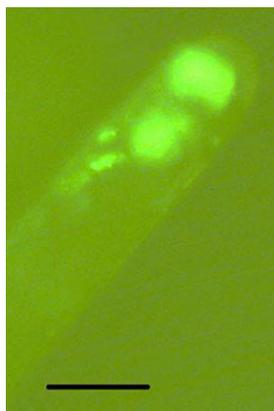


Рис 7. Люцифер желтый в корневом волоске трианеи

нием красителя внутрь корневого волоска, а не только связыванием с плазматической мембраной. Таким образом не только НК, но и ЭГ может поступать внутрь и окрашивать живые клетки. Fernandez-Da Silva с сотрудниками также отмечали появлявшееся иногда слабо-голубое окрашивание живых клеток в суспензии *Coffea arabica* cv. *Castimor*, но в погибших клетках окрашивание было более интенсивным [5]. Поскольку считается, что ЭГ не проникает через неповрежденные мембраны, то проникновение краски в корневой волосок может быть следствием эндоцитоза, который мы наблюдали в живых корневых волосках трианеи с помощью люцифера желтого (рис. 7).

Заключение

Эванс голубой – один из самых используемых исследователями красителей, позволяющих выявить поврежденные ткани [20]. Крупные анионы краски не проникают в живые клетки. Для проникновения через клеточную мембрану необходимо нарушение ее проницаемости, поэтому ЭГ используют как тест на проницаемость мембран. В отличие от ЭГ, НК может проникнуть через плазматическую мембрану живых клеток, при физиологических значениях pH клетки окрашиваются в интенсивно красно-малиновый цвет. Простота реакции, устойчивость красителей при физиологических значениях pH, быстрота окрашиваемости и отсутствие токсичного действия на живые клетки делают оба красителя удобными маркерами жизнеспособности клеток. Спектроскопия экстрактов из окрашенных тканей и клеток [7] позволяет различать степень их поврежденности и отмечать тонкие сдвиги в функциональном состоянии.

В то же время необходимо принимать во внимание и ряд ограничений при трактовке результатов. Так, сходные черты в окрашивании ЭГ и НК тканей блока из корнеплода зеленой редьки не позволяют использовать их для оценки нативности таких тканей. Не случайно большинство работ с использованием этих красителей проводили на суспензионной культуре или выделенных протопластах. Однако и в этом случае пригодность такого теста должна зависеть от структуры и состава мембран различных клеток, сродства красителя к составляющим их сложным углеводам, белкам и липидам. Так, высокое сродство обоих красителей к суберину и лигнину ограничивает их проникновение через богатые этими компонентами клеточные стенки, которые при этом окрашиваются.

Следует учитывать ограничения в проникновении красителей в ткани. Например, ЭГ практически не проникает через перидерму корнеплода и не поступает вглубь корня кукурузы. Для НК временным барьером для вхождения в стель, по-видимому, служит эндодерма. Различается распределение красителей по поверхности корня кукурузы. Так, НК, как правило, равномерно окрашивает поверхность всех зон кончика корня, а при окраске ЭГ зоны окрашиваются несколько различно. В последнем случае интенсивно окрашенная слизь придает ярко-синюю окраску зоне, приуроченной к растяжению клеток, затем на некотором участке окраска менее интенсивна, а в зоне корневых волосков усиливается. Такие различия могут объясняться различным сродством ЭГ и НК к компонентам слизи, окружающей кончик корня проростков кукурузы. В то же время сродство красителей к клеточным стенкам паренхимы корнеплода и ксилеме проводящих пучков, по-видимому, одинаково.

Неожиданными были результаты опытов на корневых волосках кукурузы и трианеи. При явном отсутствии тканевых барьеров и непосредственном контакте клеток

корневых волосков с раствором красок оба красителя интенсивно окрашивали волоски. В случае трианеи, обладающей крупными корневыми волосками, явственно видно движение цитоплазмы, т. е. при окраске обоими красителями клетки волосков были живыми и сохраняли интенсивный циклозис. Несмотря на это и ЭГ, и НК поглощались этими клетками. Возможно, что при этом не имеет значения разная проницаемость мембраны для этих красителей. Важное значение приобретает наличие дополнительных путей проникновения красителя, минуя транспорт через плазматическую мембрану, которые могут привести к окрашиванию и живых, и поврежденных клеток. Такими путями могут быть апопласт для тканей и эндоцитоз для клеток. И чем активнее использование этих путей для транспорта красителей, тем менее достоверны тесты на жизнеспособность клеток с использованием красителей ЭГ и НК.

Библиографический список

1. Шпругер З. Практикум по физиологии растительных клеток и тканей. Москва: ИЛ, 1953. 277 с.
2. Delisle G., Champoux M., Houde M. Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots // *Plant Cell Physiol.* 2001. Vol. 42. P. 324–333.
3. Dubrovsky J.G., Guttenberger M., Saralegui A. et al. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots // *Ann. Bot.* 2006. Vol. 97. P. 1127–1138.
4. Evans H.M., Schulemann W. The action of vital stains belonging to the benzidine group // *Science.* 1914. Vol. 39. P. 443–454.
5. Fernandez-Da Silva R., Menéndez-Yuffá A. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor // *Electronic J. Biotechnol.* 2006. Vol. 9. P. 593–597.
6. Haque M.E., Abe F., Kawaguchi K. Formation and extension of lysigenous aerenchyma in seminal root cortex of spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Bobwhite line SH 98 26) seedlings under different strengths of waterlogging // *Plant Root.* 2010. Vol. 4. P. 31–39.
7. Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium // *Protoplasma.* 2010. DOI: 10.1007/s00709-009-0097-9.
8. Ikegawa H., Yamamoto Y., Matsumoto H. Cell death caused by a combination of aluminum and iron in cultured tobacco cells // *Physiol. Plant.* 1998. Vol. 104. P. 474–478.
9. Kato Y., Miura E., Matsushima R., Sakamoto W. White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 144. P. 952–960.
10. Kim K.S., Min J.-Y., Dickman M.B. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. Vol. 21. P. 605–612.
11. Matsumoto H., Motoda H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress // *Plant Sci.* 2012. Vol. 185–186:1–8. DOI:10.1016/j.plantsci.2011.07.019.
12. Mergemann H., Sauter M. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 124. P. 609–614.
13. Motoda H., Kano Y., Hiragami F. et al. Changes in rupture formation and zony region stained with evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex // *Plant Signal. Behavior.* 2011. Vol 6. P. 98–102.

14. Pogány M., von Rad U., Grün S. et al. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria pathosystem* // Plant Physiol, 2009. Vol. 151. P. 1459–1475.
15. Soran V., Lazar G. Some data concerning the accumulation of neutral red in various tissues and regions of the maize root // Physiol. Plant. 1965. Vol. 18. P. 329–336.
16. Steffens B., Sauter M. Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway // Plant Cell. 2009. Vol. 21. P. 184–196.
17. Svendsen C., Spurgeon D.J., Hankard P.K., Weeks J.M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm bio-marker? // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2004. Vol. 57. P. 20–29.
18. Takatsuka H., Umeda M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots // J. Exp. Bot. 2014. DOI: 10.1093/jxb/ert485.
19. Tamás L., Šimonovičová M., Huttová J., Mistrík I. Changes in the composition of cell wall proteins in barley roots during germination and growth in aluminium presence // Plant Soil Environ. 2003. Vol. 49. P. 327–331.
20. Taylor J.A., West T.D.W. The use of Evan's Blue stain to test the survival of plant cells after exposure to high salt and high osmotic pressure // J. Exp. Bot. 1980. Vol. 31. P. 571–576.
21. Wright H., van Doorn W.G., Gunawardena A.H.L.A.N. In vivo study of developmental programmed cell death using the lace plant (*Aponogeton madagascariensis*; Aponogetonaceae) leaf model system // Amer. J. Bot. 2009. Vol. 96. P. 865–876.

USING EVANS BLUE AND NEUTRAL RED TO EVALUATE CELL VIABILITY

N.A. BURMISTROVA¹, N.F. LUNKOVA¹,
M.S. KRASAVINA¹, L.A. PANICHKIN²

(¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences;
² Russian Timiryazev State Agrarian University)

The authors have compared the results of plant tissues staining with a vital dye (neutral red, NR) and a dye for damaged cells (Evans blue, EB) by examples of green radish taproot (Raphanus sativus L. var. lobo Sazonova, Stank), leaves of chlorophytum (Chlorophytum sp Ker Gawl.), roots of maize seedlings (Zea mays L.) and aquatic plants Trianea bogotensis Karst.

Examples of the similar coloration of both native and damaged tissues have been observed with both dyes. Both Evans blue and neutral red stained thick blocks of radish taproot only on the periphery without any effect on parenchyma in the central part where only vascular bundles have been stained in both cases. The vascular bundles may have served as pathways for penetrating of both dyes into blocks. However, chemical interaction of the dyes with the components of cell walls hampered the dye penetration into surrounding cells. The interaction with cell walls could be the reason of coloration of the damaged cells on the surface of blocks. Moreover, EB stained mucilage surrounding the maize root tip as well. Thus, unspecific binding of the dyes makes it difficult to use them as indicators of cell viability.

Another difficulty of the NR and EB application to determine cell viability is their limited penetration into tissues. The lack of staining under the intact periderm in green radish taproots or below the epidermis of chlorophytum leaves may be caused by a barrier function of intact tissues for EB and NR. The endodermis of maize root tips has also limited the NR penetration into the stele. So treating maize root tips by NR for 30 min has led to staining of the cortex only. For the dye penetration into the stele, longer staining or slice-based staining are required. The authors emphasize that in these cases neither NR nor EB can be used to evaluate the viability of tissues.

But even if individual cells are treated with dyes when there are no tissue barriers for the penetration of dyes, one should also be very careful in interpretation of the results of such experiments. For example, in the considered experiments, viable root hairs of maize and trianea were stained with both NR and EB. Rapid cyclosis observed in the root hairs has indicated that both dyes used are not toxic. Root hairs are cells with a high absorbing ability. It is generally accepted that the plasma membrane of native cells is impermeable to EB, but other mechanisms, such as endocytosis, could be used for the penetration of this dye into root hair cells.

It is concluded that when using NR and EB to evaluate cell or tissue viability it is necessary to pay attention to the existence of penetration barriers in the analyzed tissues for both dyes, their binding by cells and, to take into account differences in the absorption mechanisms.

Key words: green radish taproot, leaf, roots, chlorophytum, maize, trianea, Evans blue, neutral red.

References

1. *Strugruer Z.* Praktikum po fiziologii rastitel'nykh kletok i tkaney [Workshop on the physiology of plant cells and tissues]. M.: IL, 1953. 277 p.
2. *Delisle G., Champoux M., Houde M.* Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots // *Plant Cell Physiol.* 2001. Vol. 42. P. 324–333.
3. *Dubrovsky J.G., Guttenberger M., Saralegui A.* et al. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots // *Ann. Bot.* 2006. Vol. 97. P. 1127–1138.
4. *Evans H.M., Schulemann W.* The action of vital stains belonging to the benzidine group // *Science.* 1914. Vol. 39. P. 443–454.
5. *Fernandez-Da Silva R., Menéndez-Yuffá A.* Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor // *Electronic J. Biotechnol.* 2006. Vol. 9. P. 593–597.
6. *Haque M.E., Abe F., Kawaguchi K.* Formation and extension of lysigenous aerenchyma in seminal root cortex of spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Bobwhite line SH 98 26) seedlings under different strengths of waterlogging // *Plant Root.* 2010. Vol. 4. P. 31–39.
7. *Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P.* Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium // *Protoplasma.* 2010. DOI: 10.1007/s00709-009-0097-9.
8. *Ikegawa H., Yamamoto Y., Matsumoto H.* Cell death caused by a combination of aluminum and iron in cultured tobacco cells // *Physiol. Plant.* 1998. Vol. 104. P. 474–478.
9. *Kato Y., Miura E., Matsushima R., Sakamoto W.* White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 144. P. 952–960.
10. *Kim K.S., Min J.-Y., Dickman M.B.* Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. Vol. 21. P. 605–612.

11. *Matsumoto H., Motoda H.* Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress // *Plant Sci.* 2012. Vol. 185–186:1–8. DOI:10.1016/j.plantsci.2011.07.019.
12. *Mergemann H., Sauter M.* Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 124. P. 609–614.
13. *Motoda H., Kano Y., Hiragami F.* et al. Changes in rupture formation and zony region stained with Evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex // *Plant Signal. Behavior.* 2011. Vol. 6. P. 98–102.
14. *Pogány M., von Rad U., Grün S.* et al. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria pathosystem* // *Plant Physiol.* 2009. Vol. 151. P. 1459–1475.
15. *Soran V., Lazar G.* Some data concerning the accumulation of neutral red in various tissues and regions of the maize root // *Physiol. Plant.* 1965. Vol. 18. P. 329–336.
16. *Steffens B., Sauter M.* Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway // *Plant Cell.* 2009. Vol. 21. P. 184–196.
17. *Svendsen C., Spurgeon D.J., Hankard P.K., Weeks J.M.* A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 2004. Vol. 57. P. 20–29.
18. *Takatsuka H., Umeda M.* Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots // *J. Exp. Bot.* 2014. DOI: 10.1093/jxb/ert485.
19. *Tamás L., Šimonovičová M., Huttová J., Mistrik I.* Changes in the composition of cell wall proteins in barley roots during germination and growth in aluminium presence // *Plant Soil Environ.* 2003. Vol. 49. P. 327–331.
20. *Taylor J.A., West T.D.W.* The use of Evan's Blue stain to test the survival of plant cells after exposure to high salt and high osmotic pressure // *J. Exp. Bot.* 1980. Vol. 31. P. 571–576.
21. *Wright H., van Doorn W.G., Gunawardena A.H.L.A.N.* In vivo study of developmental programmed cell death using the lace plant (*Aponogeton madagascariensis*; Aponogetonaceae) leaf model system // *Amer. J. Bot.* 2009. Vol. 96. P. 865–876.

Бурмистрова Наталья Анатольевна – науч. сотрудник ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Красавина Марина Сергеевна – к. б. н., ст. науч. сотрудник ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Луныкова Нина Федоровна – к. б. н., науч. сотрудник ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Паничкин Леонид Александрович – д. б. н., профессор РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 49; e-mail: leon.pani4kin09@yandex.ru).

Natalia A. Burmistrova – Researcher of the Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences (127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Marina S. Krasavina – Senior Researcher of the Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences (127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Nina F. Lunkova – PhD (Bio), Researcher of the Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences (127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35; e-mail: krasavina@ippras.ru).

Leonid A. Panichkin – DSc (Bio), Professor of the Department of Plant Physiology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: leon.pani4kin09@yandex.ru).