

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова
Кафедра физиологии растений

Московская гимназия на Юго-Западе № 1543

**«Влияние эндогенного ауксина на развитие боковых корней
Arabidopsis Thaliana (L.)»**

Нестеренко А.

Научные руководители:
Т.Н. Бибилова
А.С. Кривобок

Москва 2018

Содержание

Введение.....	3
Обзор литературы.....	3
Что такое ауксин.....	3
Физиологические эффекты.....	3
IAA Биосинтез IAA.....	4
Транспорт IAA.....	5
Восприятие ауксинового сигнала клеткой.....	6
Стадии развития боковых корней.....	7
Цель работы.....	8
Задачи.....	8
Материалы и методы.....	8
Подготовка среды для выращивания растений.....	8
Условия выращивания растений.....	9
Подготовка посадочного материала.....	9
Порядок обработки графических изображений в программе GIMP 2.....	9
Результаты.....	10
Опыт 1.....	10
Опыт 2.....	13
Обсуждения.....	14
Выводы.....	16
Список литературы.....	16
Благодарности.....	18

Введение

Корень – важный для растения вегетативный осевой орган, обладающий в большинстве случаев положительным геотропизмом. По происхождению корень может быть главным (ГК), этот тип корней развиваются из зародышевого корешка, придаточным, развивающимся из стебля или листа, и боковым (БК) – берущим начало от других корней, развиваясь из клеток перицикла в зоне проведения. Совокупность корней растения формирует корневую систему. Развитие БК является неотъемлемой частью процесса образования разветвленной корневой системы, которая даёт огромные преимущества в поиске и потреблении ресурсов, а также обуславливает механическое закрепление в почве.

К настоящему моменту накопилась достаточная база знаний о физиологии ГК. Исследование БК происходит в основном в области инициации и их раннего развития, вплоть до момента выхода БК из ГК [7][11]. Интерес к дальнейшему развитию БК возрос лишь за последние 10-15 лет: были выявлены заметные отличия в функционировании корней первого и второго порядков, побуждающие к продолжению исследований.

Известно, что в БК, в отличие от ГК, гормоны ауксин и цитокинин стимулируют рост [6][14]. Также известно, что от момента выхода из ГК, у БК наблюдается постепенное увеличение скорости роста, а также изменение положения в пространстве [9][16][17]. Показано очевидное влияние ауксина на закладку БК. Однако нет полного представления о том, как конкретно влияет ауксин на прохождение дальнейших стадий развития БК. В частности нет данных о скорости развития БК в условиях измененной работы генов, ответственных за этапы биосинтеза, клеточной рецепции или транспорта ауксина.

Обзор литературы

Что такое ауксин

Ауксины являются наиболее известными растительными гормонами, оказывающими существенное влияние на развитие растения. Самым распространенным природным ауксином является индол-3-уксусная кислота (IAA). Вырабатывается IAA у всех растений и далее присутствует в растительном организме свободной или, в большинстве своем, в форме конъюгированной с сахаром, белком или аминокислотой для хранения, транспорта или деградации.

Физиологические эффекты IAA

Спектр физиологических эффектов IAA довольно широк: обуславливает явление апикального доминирования, стимулирует плодообразование, в том числе и бессемянных плодов, и разрастание завязи, ускоряет прорастание семени т.д. Также IAA, как и другие фитогормоны, обуславливает явление коррелятивного роста различных органов растения. Следует отметить, что действие ауксина на конкретный орган зависит от концентрации. Так, например, для стебля оптимальная

концентрация ауксина для стимуляции роста – 1,0 нМ, а для корня 0,1 нМ на кг массы растения, и при превышении этой концентрации происходит торможение роста, что связано, как правило, с возрастанием под действием IAA содержания другого фитогормона, тормозящего рост, а именно - этилена. [17]

Влияние ауксина на развитие корневой системы можно определить следующим образом [1][2][13]

- Аттрагирующая способность. Под влиянием IAA в клетки поступает больше питательных веществ за счет увеличения поглотительной способности самих клеток;
- Увеличения растяжимости клеточной стенки в фазе растяжения, за счет индукции закисления узкого пространства между плазмалеммой и клеточной стенкой;
- Формирование тропических откликов. Например, фототропизм -наклон верхушки растения в сторону освещения, геотропизм – расположение побегов и корней относительно вектора гравитации, хемотропизм – рост корней относительно градиента питательных веществ. Все эти реакции определяются неравномерным распределением IAA в радиальном направлении и, как следствие, неравномерным растяжением клеток и формированием изгиба корня;
- IAA способствует делению клеток апикальной меристемы ГК, а также индуцирует образование БК, что связано с активацией деления клеток перицикла и образованием корневых примордиев;
- IAA стимулирует дифференцировку специфических типов клеток, а именно сосудов ксилемы из клеток прокамбия, имеющегося в любом органе растения.

Биосинтез IAA

Для поддержания необходимой концентрации IAA в растительном организме необходим ее биосинтез. На начальных этапах развития растения IAA синтезируется в апексе побега, молодых листьях и примордиях листьев. Во взрослом растении IAA может синтезироваться и в других органах, в том числе и в корне. Известно два пути синтеза ауксина: триптофан-зависимый и триптофан-независимый. О последнем пути, в котором не участвует триптофан, несмотря на длительные исследования, на данный момент известно чрезвычайно мало, но его существование доказывает получение жизнеспособных мутантов *Arabidopsis*, дефектных по синтезу триптофана. [5]

Тем временем триптофан-зависимый путь, в отличие от триптофан-независимого, хорошо исследован. Он представляет собой синтез IAA в несколько стадий с использованием в качестве предшественника аминокислоту L-триптофан. Существует несколько вариантов триптофан-зависимого синтеза IAA, основными из которых являются – синтез через триптамин, через индол-3-ацетамид, через индол-3-ацетальдоксим и через индол-3-пируват. Наиболее важным из этих путей является синтез через индол-3-пируват, а остальные пути работают по-своему, параллельно или под влиянием каких-либо внутренних или внешних факторов. Этот путь

представляет собой двухстадийную реакцию превращения триптофана с использованием в качестве промежуточного вещества индол-3-пирувата, который затем с помощью ферментов, кодируемых генами семейства YUCCA, превращается в IAA. Реакция же превращения триптофана в индол-3-пируват катализируется триптофан-аминотрансферазой (TAA1 - TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1), которую кодируют гены WEI8 (weak ethylene insensitive 8) и SAV3 (shade avoidance 3). *TAA1* относится к небольшому семейству генов, которое включает также гомологи TAR1-4 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 1-4), которые имеют перекрывающиеся функции. Как мутанты *sav3*, так и *wei8* содержат приблизительно 60% уровня IAA дикого типа (wt). [2][5]

Транспорт IAA

Важную роль в обеспечении правильного ответа на ауксиновый сигнал играет распределение IAA между клетками, тканями и органами растительного организма. Отличительной особенностью транспорта ауксина является наличие, помимо пассивного (диффузии), еще и активного транспорта. Отличительной особенностью активного транспорта является четко определенное направление переноса молекул ауксина, диктуемое ассиметричным расположением белков переносчиков в плазмалемме. [1]

Активный транспорт IAA в клетку осуществляют белок семейства AUXIN-INSENSITIVE1/LIKEAUX1 (AUX/LAX) – AUX1. Это трансмембранный полипептид, локализующийся на апикальной (верхней) стороне клетки при базипетальном (направленном к основанию) транспорте и на базальной (нижней) стороне при акропетальном (направленном к верхушке побега) транспорте. AUX1 обеспечивает вход IAA в клетку в режиме симпорта с протоном. Отток IAA из клетки обеспечивают белки семейства PIN-FORMED (PIN) и подсемейства ATP-BINDING CASSETTE GROUP B (ABCB), которые ассиметрично расположены в плазматической мембране клеток, и способны формировать направление потока и градиенты ауксина [20]. В результате по мере роста растения происходит образование локальных максимумов концентраций ауксина, необходимых для инициации органов и морфогенеза. Сам ауксин так же является важным регулятором экспрессии генов PIN, эта регуляция позволяет образовывать обратную связь между концентрацией ауксина в клетке и скоростью его оттока из клетки. Например, низкие концентрации ауксина активируют транскрипцию генов PIN1–4 и PIN7, тогда как высокие концентрации вызывают деградацию этих белков [19]. Интегральным примером ауксин-зависимой регуляции экспрессии PIN генов можно считать переход растения к отдельным типам распределения ауксина в зависимости от стадии развития и целостности меристемы корня. На основе экспериментальных данных и математического моделирования было выдвинуто предположение, что на самых ранних стадиях развития корневой системы ауксин распределяется по принципам механизма «обратной волны». Позднее, развитая анатомическая структура запускает работу механизма «обратного фонтана», который позволяет более надежно поддерживать локальные максимум ауксина в меристеме корня. В случае нарушения структуры меристемы корня, в работу снова вступает механизм «отраженной волны» [12].

Наиболее простым способом дополнительного привлечения ауксина в БК является удаление нижней части ГК. В результате образуется местный избыток ауксина и, как следствие, усиленный вертикальный рост близлежащих БК. По данным [16] локальный пул ауксина в месте абляции наблюдается в течение трех дней после процедуры. Вероятно, скорость роста БК после декапитации ГК зависит и от места его сечения, но подробные исследования в этой области отсутствуют.

Широкие возможности по использованию растений с модифицированной генетической конструкцией позволили получить много сведений о работе отдельных групп pin-белков. В настоящее время в лабораторных исследованиях часто используются как одиночные, так и множественные мутанты по работе PIN генов, что позволяет лучше изучить их функции и работу. В то же время известно, что у единичных pin-мутантов наблюдается изменения в работе других PIN генов, которые компенсируют потерю белка мутантного гена [4][8]. Это явление называют функциональной избыточностью [8]. В корне фенотипические дефекты были выявлены только у одного одиночного мутанта – pin2, который имеет agravитропический фенотип. Предположительно, это может быть связано с неспособностью других PIN белков компенсировать утраченные функции PIN2.

PIN2 формирует движение ауксина к кончику корня по коре и затем движение от кончика корня по эпидермису, формируя тем самым так называемую структуру “обратного фонтана”. [1]. В корне PIN2 локализуется на нижней стороне клеток коры, а также верхней стороне клеток эпидермиса и боковых клеток корневого чехлика. Такая организация белков переносчиков позволяет сначала доставить IAA из верхних органов растения, а затем перераспределить ее между БК. [1]

Восприятие ауксинового сигнала клеткой

Влияние определенного гормона на развитие растения зависит не только от его концентрации, но и от чувствительности клеток к этому гормону. Восприятие растительными клетками молекулы IAA происходит за счет рецепторов, локализующихся либо на мембране клетки мишени, либо в ее цитоплазме. Мембранный рецептор IAA у *A. thaliana* выявлен только один. Это трансмембранный белок ABP1 (Auxin-Binding Protein 1), взаимодействующий с G-белками. На данный момент этот путь рецепции IAA остается плохо изученным. Что касается внутриклеточных рецепторов IAA, то основным является ядерный рецептор TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE). Этот белок входит в состав белкового комплекса ко-рецепторов TIR1/AFBs (TRANSPORTINHIBITORRESPONSE 1/AUXINSIGNALINGF-BOXPROTEINS) и связывает молекулу IAA, когда ее концентрация в клетке повышается. Считывание РНК с ауксин-зависимых генов регулируется транскрипционными факторами ARF(AUXINRESPONSEFACTOR) семейства. При низких концентрациях ауксина транскрипционные факторы Aux/IAA (Auxin/INDOLEACETICACID) семейства образуют с ARF белками мультимеры, тем самым подавляя их транскрипционную активность. Связав IAA, TIR1/AFB комплекс связывается с комплексом SCF (E3 SKP1-Cull1-F-box), образуя новый комплекс, называемый SCF^{TIR1 / AFB}, являющийся убиквитин-лигазой. SCF^{TIR1 / AFB} навешивает на AUX/IAA белок убиквитин, являющийся сигнальной меткой для отправления AUX/IAA в протеасому для

дальнейшей деградации. После деградации AUX/IAA, активность ARF перестает тормозиться, вследствие чего запускается процесс транскрипции ауксин-зависимых генов [6][14].

Стадии развития боковых корней

Для определения роли ауксина в развитии БК прежде всего, необходима чёткая характеристики отдельных этапов формирования БК. Процессы, происходящие до прорезывания БК из ГК, относят к стадии инициации БК, и подробно исследованы ранее [9][13]. Дальнейшее развитие БК подразделяют на 6 стадий, в основе выделения которых лежат морфометрические характеристики (длина корня, угол наклона БК по отношению к вектору гравитации) и строение корневого чехлика (количество клеток в колумелле) *Arabidopsis thaliana* [10][11][16].

На первой стадии развития БК большинства растений прорастают под углом 90 градусов к ГК. На второй стадии развития, при длине БК более 100 микрон наблюдается ассиметричный рост клеток меристемы, в результате чего угол наклона БК к ГК постепенно уменьшается: среднее значение угла составляет уже порядка 64 градусов. Характерной особенностью третьей стадии является увеличение скорости роста корня и заметное повышение числа и размера амилопластов в колумелле, которая представлена уже двумя рядами клеток. При длине БК в диапазоне от 0,4 до 1 мм происходит врастание его флоремы в магистраль ГК. По данным полученным ранее [16], у 70-80% БК на 2-3 стадии величина угла наклона БК сохраняет стабильное значение в диапазоне от 51 до 70 градусов. На четвертой стадии скорость роста БК увеличивается почти в 2 раза, апекс заметно изгибается в сторону ГК. Средняя длина корня в этом периоде составляет $2,4 \pm 0,3$ мм, при угле наклона 30 ± 5 . Увеличение объема вакуолей колумеллы способствует перераспределению органоидов внутри клетки. Указанные тенденции сохраняются и на пятой стадии: корень достигает $4,5 \pm 0,5$ мм в длину, при угле наклона 5 ± 5 градусов, амилопласты визуализируются в дистальной части клеток. При длине БК более 10 мм и угле наклона равном 0 можно говорить о наступлении шестой, заключительной стадии развития БК, когда его физиология полностью эквивалентна физиологии ГК *A. thaliana* [1]. В дополнение отметим, что статус зрелых БК на поздних стадиях развития представляет особый интерес с практической точки зрения, так как они в большей степени определяют эффективность работы корневой системы у растений в генеративной фазе.

Одним из важных вопросов в физиологии растений остается регуляция темпов роста отдельных органов и растения в целом. Как известно, скорость роста органа растения изменяется по мере его развития, а также в зависимости от того, как растение реагирует на раздражители. Относительно ГК растений *Arabidopsis thaliana* известно, что при отсутствии ограничений со стороны окружающей среды, скорость роста корня равномерно возрастает в течение первых 14 суток после прорастания семени [3], полноценных данных об изменении скорости роста БК в литературе пока нет. Важно понимать, что средняя скорость роста корня является недостаточно информативным показателем с точки зрения онтогенеза корня. В частности, дифференциальная скорость роста БК может по-разному меняться на отдельных стадиях развития БК.

Цель работы:

Определение роли ауксина в развитии боковых корней различных стадий.

Задачи:

Выявить закономерности изменения скоростей роста БК у растений *Arabidopsis thaliana* wt, а также у мутантов с дефектной работой систем сигналинга, синтеза и транспорта ауксина: tir-1, wei8-1tar1-1, pin2.

Сопоставить особенности ростовой активности ГК и БК различных стадий у растений *Arabidopsis thaliana* wt, а также мутантов tir-1, wei8-1tar1-1, pin2.

Рассмотреть влияние мутаций pin2, tir1 и wei8-1tar1-1 на интенсивность закладки БК.

Исследовать реакцию БК на повышение уровня ауксина, поступающего в БК, в результате удаления кончика ГК.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* L. wt (экотип Colombia 0), используемые в качестве контроля во всех схемах экспериментов, и 3 типа мутантов: tir1, pin2 и wei8-1tar1-1.

Подготовка среды для выращивания растений

Растения выращивали на стерильной питательной агаризованной среде в круглых ($\Phi=150$ мм) чашках Петри. Для предотвращения углубления корней в толщу среды была использована тонкая гидратцеллюлозная пленка. Этот метод позволяет исследовать корневую систему растения, развернутую на плоскости пленки. Пленку нарезают на диски $\Phi=100$ мм и замачивают в дистиллированной воде на 10 мин для удаления остатков глицерина с поверхности пленки. По окончании процедуры диски разглаживают на поверхности стеклянной чашки Петри и перекладывают влажной фильтровальной бумагой. Стерилизацию материала можно проводить в автоклаве при температуре $+121^{\circ}\text{C}$ и давлении 1 атм. в течение 20 мин. Подготовленная таким образом пленка обладает достаточной адгезией для крепления как влажных, так и сухих семян.

Твёрдую питательную среду готовят из следующих компонентов (на 100 мл среды, масс./об.):

- Среда МурасигеСкуга (MS/2, Duchefa M0222) 0.2286 г;
- Сахароза (хч) 1 г;
- 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислота (MES) 50 мг;
- фитогель 0,5 г.

До внесения фитогеля остальные компоненты среды растворяют в соответствующем объеме дистиллированной воды и при помощи 1М раствора КОН доводят pH смеси

до значений 5.7-5.8. После коррекции pH к смеси добавляют фитогель. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре +121°C и давлении 1 атм. в течение 20 мин. По окончании стерилизации колбу с горячей питательной средой переносят в ламинарный шкаф, и распределяют жидкость по стерильным чашкам Петри для получения слоя среды толщиной 2-3 мм. Заполненные горячей средой чашки оставляют в открытом виде для предотвращения конденсации воды на внутренней поверхности крышки чашки Петри. На поверхность застывшего слоя среды стерильным пинцетом переносят и разглаживают диск из гидратцеллюлозной пленки.

Подготовка посадочного материала

Перед посадкой семена стерилизуют в течение 3 минут в растворе 75% этанола с добавлением 0.1% Тритон X100 и троекратно промывают стерильной водой. Стерилизованные семена пипетируют на поверхность стерильной фильтровальной бумаги и стерильной препаровальной иглой переносят в чашку Петри на место посадки. После посадки семян чашку заклеивают по краям слоем парафиновой ленты Parafilm и отправляют на стратификацию при температуре +4 С в течение 1-4 суток.

Условия выращивания растений

После стратификации чашки Петри с семенами переносили в климатическую камеру, где их закрепляли в вертикальном положении на стенде. Растения развивались при температурном режиме 20°C, освещенности до 10 кЛк и 24-часовом фотопериоде.

Для первого опыта было посажено 6 чашек Петри по 4 растения. В каждой чашке располагалось по одному представителю от каждой выбранной группы растений (wt Colombia 0, pin2, tir1, wei8-1tar1-1). Растения выращивали в течение 10 суток, вплоть до достижения кончиком ГК нижней боковой стенки чашки Петри. Начиная с 6го дня после прорастания семян, чашки с растениями сканировали 2 раза в сутки в равных временных интервалах. Сканирование проводили при помощи сканера HP ScanJet 2400C с разрешением изображения 900 dpi.

Для второго эксперимента было посажено 18 растений wt по одному на чашку: 9 из них использовали в качестве контроля, а другие 9 растений были декапитированы на 4 сутки после прорастания ГК. Сечение кончика ГК проводили на расстоянии 1 см от побега в стерильных условиях. После процедуры декапитации растения в герметичных чашках Петри возвращали в климатическую камеру ещё на 6 суток, сканируя чашки 2 раз в сутки (в равных временных интервалах). Полученные графические изображения обрабатывали при помощи программы GIMP 2.

Порядок обработки графических изображений в программе GIMP 2

Работу с изображениями проводят в режиме послойного наложения изображений.

Для этого открываем вкладки “Файл”, “Открыть как слои”- выбираем группу последовательных сканов одной чашки с растениями, “Открыть”. На панели “Слои-Текстуры” отменяем видимость всех слоев, кроме двух слоев с данными двух самых

ранних сканирований. Выделяем второй, более поздний слой, на той же панели “Слои-Текстуры” уменьшаем его непрозрачность и далее с помощью инструментов “Перемещение” и “Вращение” накладываем второе изображение на первое так, чтобы рассматриваемый корень на первом скане максимально совпадал с таким же корнем на скане более позднем. При наложении двух изображений одного и того же корня друг на друга, длина корня на более раннем скане имеет большую яркость и легко визуализируется. Фрагмент корня меньшей яркости является приростом данного корня за время, прошедшее между последовательными сканированиями чашки.

С помощью инструмента “Измеритель” находим длину нужного участка корня в пикселях, пересчитываем длину корня в микрометры с учетом разрешения изображения. Для этого длину в пикселях делим на 900 и умножаем полученное число на 25400 для получения длины корня в микрометрах.

Измерение длины БК или ГК на более раннем скане позволяет сделать выводы о стадии роста, которую проходит данный корень, а измерение прироста дает возможность рассчитать среднюю скорость роста корня во временном промежутке между сканированием чашки. Скорость роста в мкм/мин рассчитывали путем деления прироста корня в микрометрах на количество минут в данном временном промежутке. Аналогично обрабатывалась каждая последующая пара изображений.

Результаты

1 опыт.

Скорость главного корня во всех вариантах равномерно возрастала вплоть до 10 суток эксперимента, когда ГК достигал противоположной стенки чашки Петри. В ряде случаев это вызывало снижение скорости ГК. В силу неоднородных условий роста растений на 10 сутки, экспериментальные данные, полученные в этой точке, не учитывались в анализе.

На основании данных об изменении длин корней растений были построены графики зависимости скорости и длины главного и боковых корней от возраста растения с момента прорастания (рис 1, 2, 3). Сопоставление графиков зависимости длины ГК (рис 1) и скорости роста ГК (рис 2) от возраста растения оказалось достаточно информативным. Отношение длин ГК на 6 и 9 сутки меняется незначительно, в то время как в показаниях скорости роста растений происходят значительные изменения. Этот факт доказывает необходимость измерения не только средней, но и дифференциальной скорости роста корня в подобных исследованиях.

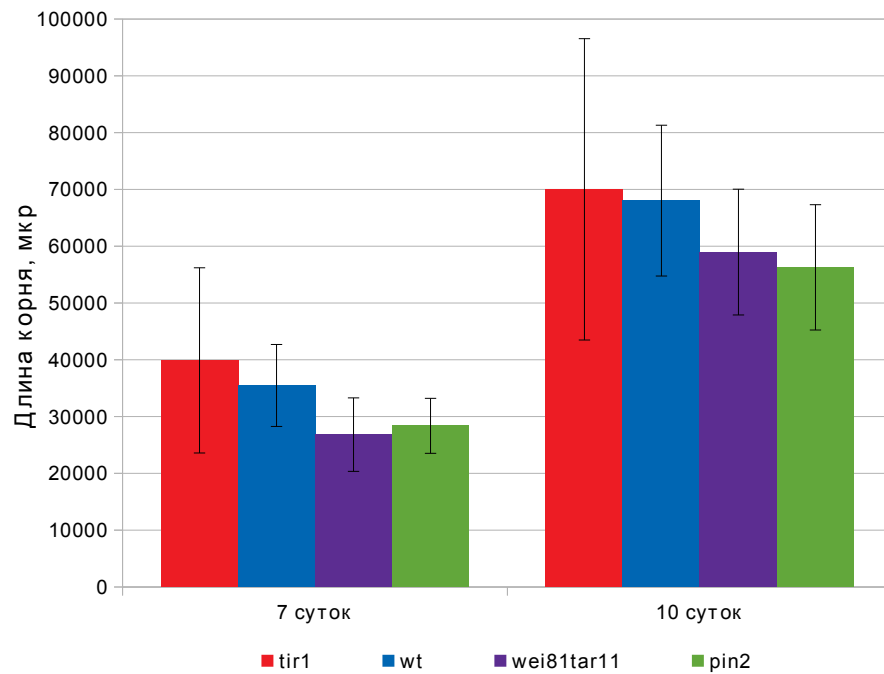


Рис. 1. Средняя длина главных корней *Arabidopsis thaliana* (L.) на 7 и 10 сутки роста. Синим цветом обозначен дикий тип, красным - мутант *tir1*, зеленым - мутант *pin2*, фиолетовым – мутант *wei8-1tar1-1*. Вертикальные линии обозначают величину стандартного отклонения от средней длины главного корня в рассматриваемой группе.

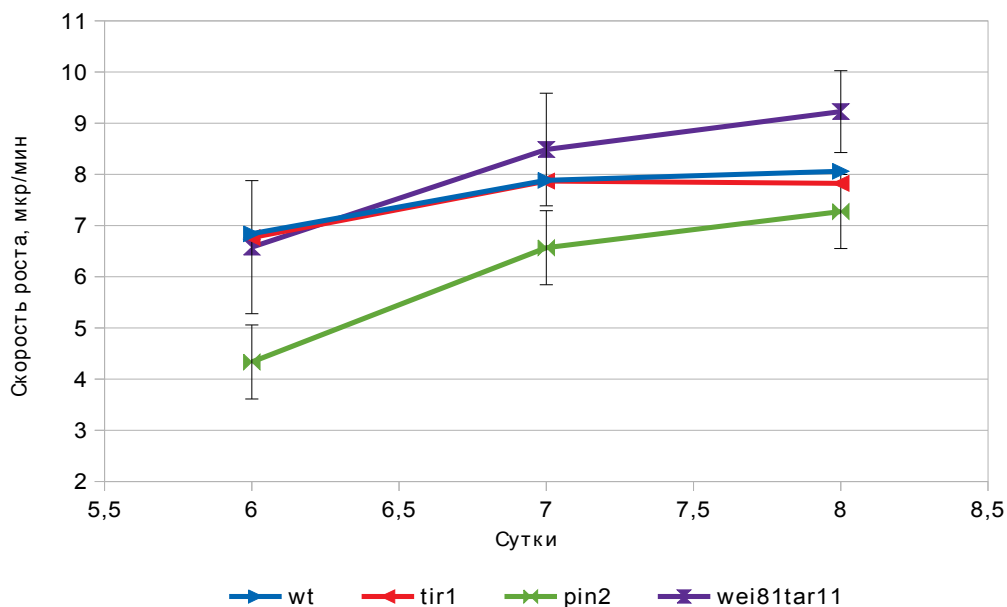


Рис. 2. Скорости роста (мкр/мин) главных корней *Arabidopsis thaliana* (L.) на 6, 7 и 8 сутки после прорастания. Синие линии соответствуют дикому типу, красные - мутанту *tir1*, зеленые - мутанту *pin2*, фиолетовые - мутанту *wei8-1tar1-1*. Вертикальными линиями обозначены значения стандартного отклонения для рассматриваемой группы.

Анализ данных о скорости роста БК (рис 3) выявил закономерности прохождения отдельных стадий развития у БК в рассмотренной группе растений. Во всех вариантах скорость роста БК постепенно возрастает при переходе от 3 к 6 стадии. На третьей стадии (первой из исследуемых в данной работе) заметна лишь небольшая разница в скоростях роста БК разных типов растений. У wt и мутанта *tir1* наблюдается в среднем примерно на 0,1 мкм/мин большая скорость роста, нежели у мутантов *pin2* и *wei8-1tar1-1*.

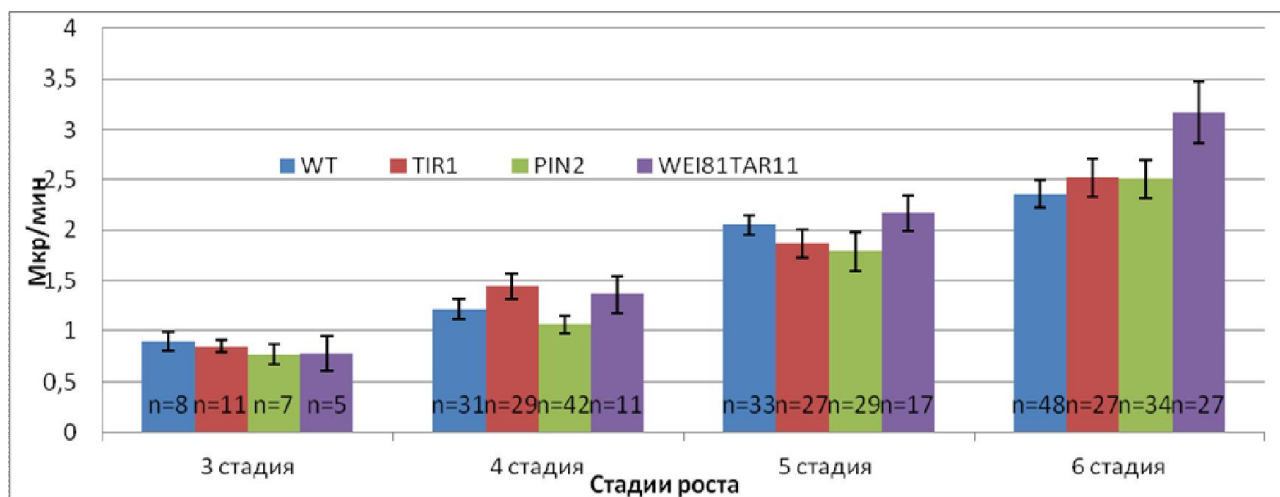


Рис. 3. Средние скорости роста (мкр/мин) боковых корней *Arabidopsis thaliana* (L.) 3, 4, 5 и 6 стадий развития. Синим цветом обозначен дикий тип, красным - мутант *tir1*, зеленым - мутант *pin2*, фиолетовым – мутант *wei8-1tar1-1*. Вертикальными линиями обозначены значения стандартного отклонения от среднего значения скорости в рассматриваемой группе. В основании столбцов указано число корней (n) исследованных групп

При переходе к 4 стадии развития наблюдается стремительное увеличение скорости роста БК мутанта *wei8-1tar1-1*; на 6 стадии средняя скорость роста БК мутанта *wei8-1tar1-1* практически в полтора раза превышает средние скорости роста БК других типов растений.

БК мутантов *pin2* и *tir1* на 3, 5 и 6 стадиях растут в среднем одинаково; лишь на 4 стадии заметно явное расхождение в скоростях роста БК – корни мутанта *tir1* растут в среднем примерно в полтора раза быстрее корней *pin2*.

Корни же *wt* растут в среднем быстрее корней других типов растений только на 3 стадии. При прохождении последующих стадий скорость БК *wt* увеличивается гораздо менее стремительно, чем у корней *wei8-1tar1-1*, и примерно так же как и у *tir1* и *pin2*. На последней, 6 стадии скорость роста корней *wt* вообще оказывается ниже, чем всех рассмотренных групп растений.

В работе было оценено количество БК на растениях исследуемых типов на 9 сутки после прорастания (рис 4). Полученные данные позволяют выявить определенные закономерности образования БК у растений различных групп.

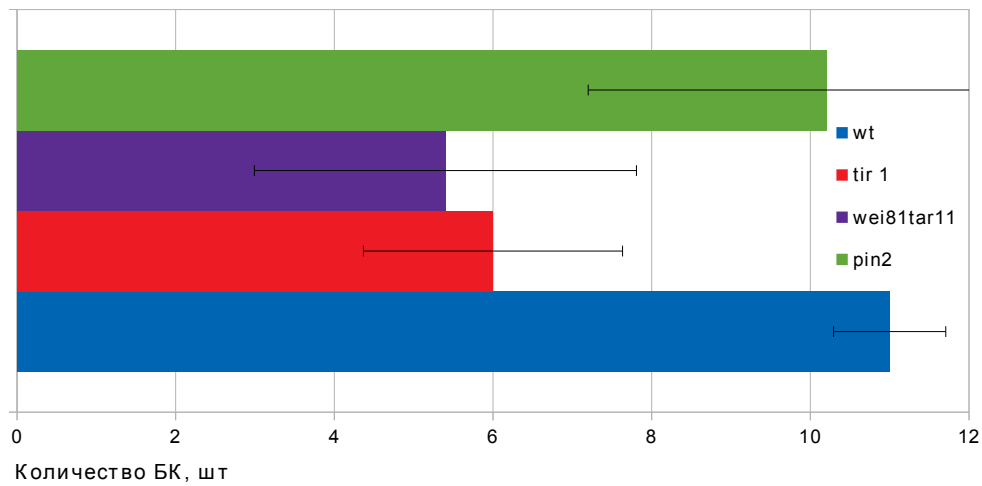


Рис. 4. Среднее количество боковых корней на одном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) на 9 сутки после прорастания. Синим цветом обозначены значения для дикого типа, красным для мутанта *tir1*, зеленым для мутанта *pin2*, фиолетовым для мутанта *wei8-1tar1-1*. Горизонтальными черными линиями обозначена величина стандартного отклонения от среднего количества боковых корней в рассматриваемой группе.

Так у *wt* и мутанта *pin2* наблюдается высокая интенсивность образования БК, в то время как у *tir1* и *wei8-1tar1-1* корней образовалось в среднем в половину меньше.

Опыт 2

В опыте 2 была проведена оценка скорости роста БК у растений *wt* (Colombia 0) с обрезанным и полноценным ГК (контроль) (рис 5). Очевиден ускоренный рост БК в группе с обрезанным ГК на всем протяжении эксперимента. При этом характер линии тренда для рассмотренных групп растений принципиально не меняется.

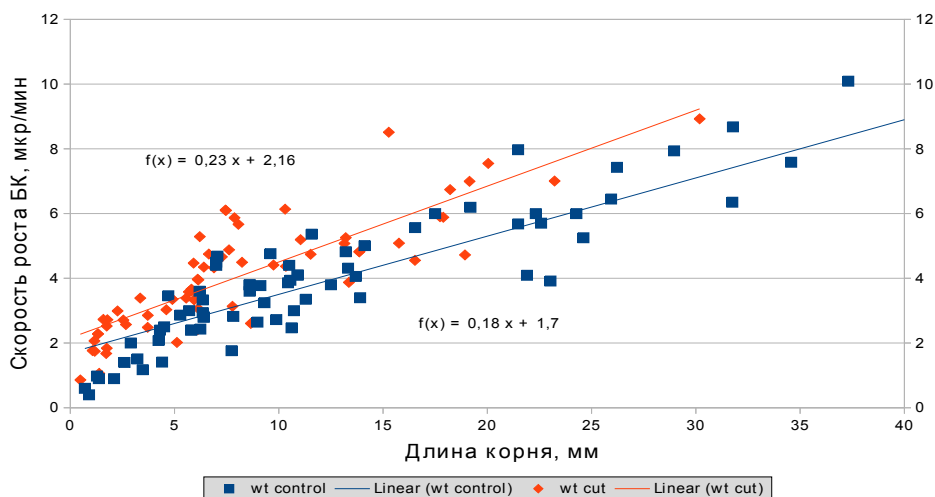


Рис. 5. Зависимость скорости роста боковых корней *Arabidopsis thaliana* (L.) дикого типа от их длины в контроле и эксперименте (после декапитации ГК на расстоянии 1 см от побега на четвертые сутки после прорастания). Красным цветом обозначены значения в контроле, синим цветом — значения в эксперименте. Прямыми отмечены линии тренда для рассмотренных групп точек.

Обсуждения

Растения wt *Colombia 0* рассматриваются как пример сбалансированной и отлаженной работы всех участников ауксинового ответа, направленного на поддержание определенного жизненного цикла растения. Растения *tir1* дефектны в области работы рецепторов ауксина, т.е. обладают меньшей чувствительностью к этому гормону. При одной и той же концентрации ауксина в клетке, информационная роль ауксина для растений *tir-1* будет ниже, чем для wt. Мутанты *pin2* имеют дефектное распределение ауксина: нарушена система снабжения ауксином колумеллы ГК, а также БК в целом. Растения *wei8-1tar1-1* — в принципе обладают более низким уровнем ауксина, имея лишь 60% концентрации ауксина по сравнению с wt.

Сперва рассмотрим, как проявили себя эти растения в области хорошо изученных объектов, а именно как происходило развитие ГК и закладка БК в рассматриваемых вариантах.

Растения *tir1* по длине ГК достоверно не отличаются от wt с учетом погрешности измерения, однако имеют гораздо больший разброс экспериментальных значений. Растения *pin2* и *wei8-1tar1-1* к 6 и 9 суткам эксперимента имеют ГК меньшей длины. Для более полного объяснения полученных результатов, рассмотрим график изменения скорости роста ГК в интервале 6-9 сутки. Как видно по рис. 2, распределение ростовой активности среди участников здесь имеет некоторые отличия: растения *tir1* и wt по-прежнему близки между собой, заметно опережая мутанта *pin 2*, но *wei8-1tar1-1* стремительно набирают темпы роста на всем рассмотренном интервале, а на 9 сутки уже заметно опережают wt и другие растения по величине скорости роста. Таким образом, в нашем эксперименте уменьшение сигналинга ауксина принципиально не повлияло на активность ГК, но привело к большему разбросу измеряемых величин. Возможно, растения *tir1* имели небольшие преимущества в темпах роста в начале эксперимента, но затем выровнялись по сравнению с wt. Видимых отличий в фенотипе *tir1* при росте на стандартной солевой среде не обнаружено.

Меньшее количество ауксина в растениях *wei8-1tar1-1* существенно замедлило начальное развитие ГК, в том числе и за счет задержки прорастания семян. Подобный результат хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными относительно роста *wei8-1tar1-1* [5]. Стремительное увеличение скорости роста на более поздних этапах может быть связано со снятием ауксинового ингибирования ростовых процессов ГК, описанного в литературе (http://Project_Auxin_Testing). Либо имеет более сложное объяснение, например, в свете изменения продолжительности циклов развития растения и «отложенной зрелости». Растения *pin2* растут слабее всех рассмотренных вариантов, что подтверждает незаменимую роль *pin2* — транспортеров ауксина не только для гравитропической ориентации [1], но и для ростовой активности ГК корня в целом.

Несмотря на слабый рост ГК растения *pin2* имели такое же количество БК, что и wt (график 3). В то время как *tir1* и *wei8-1tar1-1* сформировали вдвое меньшее количество БК. Этот результат так же хорошо согласуется с имеющимися литературными данными о том, что и концентрация, и сигналинг ауксина имеют

большое значение для закладки БК: чем выше уровень ауксина, тем большее количество БК образуется [7][11]. Дефекты перераспределения ауксина в кончике ГК и недостаток базипетального потока ауксина не оказали влияние на формирование БК, т. е. уровень ауксина в области примордиев БК у растений *pin2* оказался достаточным для их нормального прорастания из ГК.

Рассмотрим дальнейшее развитие БК (рис 4). С учетом погрешности измерений, можно утверждать, что все растения с измененным аппаратом функционирования ауксина (*tir 1* и *wei8-1tar1-1*, *tir-1*, *pin2*) имеют небольшое отставание от *wt* на 3 стадии развития. Дальнейшее увеличение скорости в вариантах происходит по-разному: наибольшее увеличение скорости у *wt* наблюдается при переходе от 4 к 5 стадии развития БК, в то время как для *tir-1* более существенными оказались переход от 3 к 4 и от 5 к 6 стадии развития БК. Согласно классификации стадий развития БК [10], на четвертой стадии скорость роста БК *wt* должна увеличиваться почти в 2 раза, апекс заметно изгибается в сторону ГК. В нашем случае, указанное изменение скорости отмечено как раз у растений *tir-1* и *wei8-1tar1-1*, в то время как *wt* и *pin2* на 4 стадии ускоряются только в 1,3-1,4 раза. Трудно сказать связаны ли эти расхождения с физиологическими особенностями растений, либо с недостаточно точным выделением этих двух стадий. При переходе от 4 к 5 стадии, несмотря на исходно разные значения скорости, *wt* и *pin2* сохраняют одинаковые темпы роста с увеличением скорости в 1,7 раз, в то время как *tir-1* сбавляет темпы до 1,3, а *wei8-1tar1-1* ускоряется в 1,5 раза. На 6 стадии *tir1* и *pin2* и *wt* имеют схожие значения как скорости, так и темпов роста, с небольшим отставанием от *wt*. А *wei8-1tar1-1* продолжает ускоряться, и на 6 стадии увеличивает скорость почти в 2,2 раза.

Феномен, который наблюдался у растений *wei8-1tar1-1* при развитии ГК, аналогично повторяется и при развитии БК. Снижение общего уровня ауксина на 40% ускоряет развитие ГК и БК поздних стадий развития.

Сходство темпов роста *wt* и *pin2* и одновременное их отличие от растений *tir 1* указывает на заметную роль системы TIR1/AFBs на ранних стадиях развития БК. Примечательно, что в литературе имеются подтверждение активной роли TIR1/AFBs в молодых БК, при формировании так называемого антигравитропного сдвига - AGO (*antigravitropic offset*) на 2-3 стадии развития БК [15].

Растения *pin2* оказались наиболее близкими к *wt* по темпам роста и количеству БК, но имеют равномерное отставание от *wt* как в скорости роста ГК, так и в зрелых БК. Т.е. недостаточное снабжение ауксином апексов обоих типов корней существенно замедляет развитие корневой системы.

В опыте 1 нами было установлено, что изменение уровня сигналинга ауксина не оказывает заметного влияния на скорость роста ГК после формирования БК, в то время как недостаточное снабжение клеток ауксином со временем может вызывать ускорение роста ГК. В БК изменение сигналинга ауксина также не ограничивает скорость роста зрелых БК, а дефекты в работе синтеза ауксина вызывают ускоренный рост корней 6 стадии всех мутантов по сравнению с *wt*. Таким образом, недостаток ауксина в ряде случаев может стимулировать рост как ГК, так и зрелых БК.

В опыте 2 нами было смоделировано увеличение притока ауксина к БК за счет декапитации ГК (рис 4). Установлено, что скорость роста БК в таком случае пропорционально увеличивается на всех стадиях развития БК. К сожалению, в литературе недостаточно данных о влиянии избытка только ауксина на развитие боковых корней,

В работе (Debi, 2004) было отмечено, что совместное экзогенное применение ауксина и цитокинина способствовало формированию длинных боковых корней у растений дикого типа *Arabidopsis thaliana*, и тормозило развитие ГК. С учетом этих данных ускорение БК в опыте 2 может быть связано не столько с увеличением притока чистого ауксина, сколько с увеличением потока, сбалансированного по составу ряда гормонов, в первую очередь - ауксина и цитокинина. Продолжая подобную цепочку рассуждений, можно предположить, что избыток ауксина ингибирует зрелые БК так же как и ГК, но при определенном балансе ауксина и цитокинина рост БК ускоряется. Однако, это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

Выводы

- Установлено, что по мере увеличения длины БК происходит увеличение его скорости роста как для растений дикого типа, так и для мутантов *pin2*, *tir1* и *wei8-1tar1-1*.
- Уменьшение сигналинга ауксина не оказывает принципиального воздействия на активность ГК и развитие зрелых БК, но влияет на прохождение 3-4 стадии развития БК.
- Низкий уровень ауксина в мутантах *wei8-1tar1-1* замедляет начальное развитие ГК и БК, но ускоряет рост обоих типов корней на более поздних этапах развития растения.
- Дефекты в работе транспортера ауксина *pin2* снижают скорость роста ГК и скорость роста БК на всех стадиях, пропорционально с растениями дикого типа.
- Концентрация и сигналинг ауксина оказывают значительное влияние на количество БК.
- Декапитация главного корня ускоряет рост БК на всех исследованных стадиях развития.

Список литературы

1. Коврижных В.В., Омелянчук Н.А., Пастернак Т.П., Миронова В.В. Ключевая роль PIN белков в транспорте ауксина в корне *Arabidopsis thaliana* L. Вавиловский журнал генетики и селекции растений, 2014, т. 18, № 4/1, с. 797-806.
2. Медведев С.С. Физиология растений. – СПб.: Издательство С.-Петербургского университета, 2004, 336 с.

3. Beemster G., Baskin T. Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 1998, v. 116, №4, p. 1515-26.
4. Blilou I, et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 2005, v. 433, p. 39-44.
5. Damilola Olatunji, Danny Geelen, Inge Verstraeten. Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, v.18, №12, p. 2587.
6. Debi R.B, Taketa S., Ichii M. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 2005, v.162, №5, p.507-15.
7. Dubrovsky J.G., Forde B.G. Quantitative Analysis of Lateral Root Development: Pitfalls and How to Avoid Them. *The Plant Cell*, 2012, v.24, №1, p.4 -14.
8. Friml J, et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 2003, v. 426, p.147-53.
9. Guyomarc'h S., L'éran S., Auzon-Cape M., Perrine-Walker F., Lucas M., Laplaze L. Early development and gravitropic response of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, v.367, №1595, p.1509-16.
10. Kiss, J.Z., Miller, K.M., Ogden, L.A., Roth, K.K. Phototropism and Gravitropism in Lateral Roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 2002, v.43, №1, p.35–43.
11. Malamy J.E., Benfey P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1997, v.124, №1, p.33-44.
12. Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova, et al. Combined in silico in vivo analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance. *Annals of Botany*, 2012, v. 110, №2, p. 349–60.
13. Renhou Wang, Mark Estelle. Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current opinion in plant biology*, 2014, v.21, p. 51-58.
14. Rosquete M.R., Wangenheim D., Marhavý P., Barbez E., Stelzer E.H., Benková E, Maizel A., Kleine-Vehn J. An auxin transport mechanism restricts positive orthogravitropism in lateral roots. *Current Biology*, 2013, v.23, №9, p.817-22.

15. Rosquete M., et al. PIN7 Auxin Carrier Has a Preferential Role in Terminating Radial Root Expansion in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, v. 19, № 4, p. 1238.
16. Roychoudhry S., Kepinski S. Shoot and Root Branch Growth Angle Control - The Wonderfulness of Lateralness. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, v.23, p.124-31.
17. Roychoudhry S, Kieffer M., Del Bianco M., Liao C.Y., Weijers D., Kepinski S. The developmental and environmental regulation of gravitropic setpoint angle in *Arabidopsis* and bean. *Scientific Reports*, 2017, v.7, p.426-64.
18. Sack F.D., Kiss J.Z. Rootcap structure in wild type and in a starchless mutant of *Arabidopsis*. *American journal of botany*, 1989, v.76, №3, p.454-64.
19. Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J. et al. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 2005, v. 132, № 20, p. 4521–4531.
20. Wisniewska, et al. Polar PIN Localisations Directs Auxin Flow in Plants. *Science*, 2006, v. 312, p. 883.

Благодарности

Я благодарю доцента кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова Бибикову Татьяну Николаевну и научного сотрудника ГНЦ РФ ИМБП РАН Анну Святославовну Кривобок за чуткое руководство и всестороннюю помощь в проведении экспериментов и написании работы, а также Сергея Менделевича Глаголева за ценные советы и организацию научной практики.