

УДК 581.144.2

Филин А.Н.*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН (г. Москва)***АНАЛИЗ РОСТА МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ,
КОНТРОЛИРУЮЩИМ СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ЦИТОКИНИНОВ**

Аннотация. В статье рассмотрено использование методики анализа роста корней на клеточном уровне у растений *Arabidopsis thaliana*. Для сравнения взяты растения дикого типа и мутант с нарушенной экспрессией генов, ответственных за синтез ферментов АТФ/АДФ-изопентилтрансераз, которые катализируют первый этап биосинтеза цитокининов. Эта мутация приводит к сокращению концентрации цитокининов в корне. Показана возможность использования данного мутанта для выяснения роли цитокининов в регуляции длительности клеточного цикла. По результатам эксперимента проведен расчет длительности клеточного цикла с использованием формулы В.Б. Иванова.

Ключевые слова: биология развития, клеточный цикл, фитогормоны, цитокинины, пролиферация, корень растения, *Arabidopsis thaliana*.

A. Filin*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow***ANALYSIS OF GROWTH OF *ARABIDOPSIS THALIANA* MUTANTS
WITH REDUCED RATE OF CYTOKININ SYNTHESIS**

Abstract. We report an example of applying the method for analyzing root growth at a cellular level in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced cytokinin concentration in roots due to impaired expression of the genes encoding the enzyme ATP/ADP isopentenyl transferase which catalyses the first reaction of cytokinin biosynthesis pathway, as well as in wild type plants. We prove the possibility of using this mutant to unravel the role of cytokinins in the regulation of cell cycle duration. A formula for calculating cell cycle duration is also provided.

Key words: developmental biology, cell cycle, phytohormones, cytokinins, proliferation, plant roots, *Arabidopsis thaliana*.

Введение новых генов или выключение работы существующих генов у трансгенных растений часто приводит к изменению скорости роста, в частности, к изменению скорости роста корней [3; 4; 6]. Выяснение механизмов этих изменений представляет большой интерес для понимания последствий трансгенеза. В последнее время большой интерес вызвало изучение роста

корней после изменения активности генов, определяющих активность изо-пентилтрансферазы [4-5]. Для того чтобы выяснить, как влияет на длительность клеточного цикла снижение синтеза цитокининов, вызванное уменьшением активности данных генов, необходимо провести детальный клеточный анализ. Нами рассмотрена методика проведения такого анализа, а также приведены результаты иссле-

дования корней мутанта с нарушенной экспрессией трех генов, ответственных за синтез цитокининов (ipt3, ipt5, ipt7).

Была поставлена задача определения прямым методом длительности циклов в корнях мутантов по синтезу цитокининов, в которых их концентрация была снижена, а также в корнях контрольных растений дикого типа. Для того чтобы изучить, как влияет на рост корня снижение концентрации цитокининов, мы использовали тройной мутант *Arabidopsis thaliana* по генам ATIP5-1, ATIP3-2, ATIP7-1 (ARABIDOPSIS THALIANA ISOPEN-TENYLTRANSFERASE 5/AT5G19040.1, ARABIDOPSIS THALIANA ISOPEN-TENYLTRANSFERASE 3/ AT3G63110.1, ARABIDOPSIS THALIANA ISOPEN-TENYLTRANSFERASE 7/ AT3G23630.1). Нарушение экспрессии этих генов, ответственных за синтез ферментов АТФ/АДФ-изоопентилтрансераз, ферментирующих первый этап биосинтеза цитокининов, приводит к снижению концентрации этой группы фитогормонов в растении [5], что в свою очередь оказывает влияние на развитие как побега, так и корня.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве контроля использовались растения дикого типа *Arabidopsis thaliana* экотип Columbia. Семена мутанта (ipt3, ipt5, ipt7) мы получили от С. Сабатини (S. Sabatini, Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare Laboratory of Functional Genomics and Proteomics of Model Systems Universita La Sapienza).

Условия выращивания. Перед посадкой семена *Arabidopsis thaliana* стерилизовались 70% спиртом в течение 5 мин. Семена высевались в чашки

Петри на питательную среду, содержащую 0,7% agar-agar 0,25 раствор солей «Murashige and Skooge», без добавления витаминов, 1% сахарозы, рН 5,6-5,8. После посадки проводилась стратификация при температуре 4°C в темноте в течение 3 суток. Культивирование проросших растений производилось при температуре 21°C длинного светового дня 16 часов.

Измерение длины корня. Для того чтобы измерить длину корней, чашки Петри с растениями документировались с помощью светового сканера (Epson Perfection V300 Photo): сканирование производилось с разрешением 1200 dpi.

Определение числа клеток в меристеме и длины клеток, закончивших рост. Для просветления корней производилась мацерация корней. Растения фиксировались в 4% формалине в фосфатном буфере рН7,2 в течение суток при $t = 4^\circ\text{C}$. Затем корни переносились в раствор 30% глицерина, приготовленного на фосфатном буфере с добавлением 2% DMSO. В этом растворе корни выдерживались 30 мин при комнатной температуре. Далее корни переносились в 65% раствор глицерина, содержащего 35% просветляющего раствора. Для приготовления 100 мл просветляющего раствора использовались: 100 мл 2% DMSO; 69,72 г KI и 198 мг Na₂S₂O₃. В данной жидкости корни выдерживались минимум 90 мин. Затем из полученного материала монтировались препараты в 50% глицерине. Изготовленные препараты документировались с помощью микроскопа (Carl Zeiss Imager D.2). Для измерения длины клеток использовалась программа «Carl Zeiss ZAxio Vision». Длительность клеточного цикла (T) рассчитывалась

по формуле, разработанной В.Б. Ивановым (1974):

$$T = \frac{\ln 2 * Nm * l}{v},$$

где: Nm – число меристематических клеток в одном ряду, l – длина заканчивающих рост клеток и v – скорость роста корня [1; 4]. Применимость этой формулы для вычисления средней длительности циклов в меристемах корней доказана в ряде работ [2; 4].

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента (см. табл.) указывают, что снижение содержания цитокинина в корнях мутанта с нарушенной экспрессией трех генов, ответственных за синтез цитокининов (ipt3, ipt5, ipt7), приводило к сокращению длительности клеточных циклов, увеличению числа клеток меристемы и скорости роста корней по сравнению с корнями дикого типа.

Таблица

Измеренные и вычисленные параметры роста у корней *Arabidopsis thaliana* дикого типа и корней мутанта

	Контроль (wt)	ipt3, ipt5, ipt7
Длина корня (мм)	15,4	42,4
Число клеток в меристеме (Nm) на 7 день	21	33
Длина клеток, закончивших рост (l) в м (на 7 день)	116,7	130,5
Длительность клеточного цикла (T) в часах (между 5-7 днями)	15,7	10,4
Скорость роста корней (v) м/час (между 5-7 днями)	151,4	385

Как показали наши результаты, мутанты с измененной активностью синтеза фитогормонов могут быть применены для оценки воздействия нехватки фитогормонов на рост и развитие корня растения, что помогает понять, как осуществляется регуляция пролиферации и перехода клеток меристем к дифференциации. Данная проблема является одной из важнейших в биологии развития. Используемая нами методика мацерации и анализа корней, а также использованная нами методика для вычисления продолжительности клеточного цикла, являются эффективными инструментами для анализа влияния фитогормо-

нов на клеточном уровне. Методики в совокупности могут быть применены во всех исследованиях, направленных на понимание роли фитогормонов в регуляции пролиферации и перехода к дифференциации. Данный метод можно применять для выяснения механизмов изменения скорости роста корней трансгенных растений в зависимости от введенного гена. Также представляют большой интерес вопросы – как повышение концентрации цитокининов в корнях влияет на вышеупомянутые процессы, для чего можно использовать трансгенные растения с гиперэкспрессией генов, ответственных за синтез фитогормонов, а также прямую

обработку корней экзогенными фитогормонами.

Автор выражает благодарность В.Б. Иванову за руководство данной работой. Работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 15-04-02502а.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. – М.: Наука, 1974. – 223 с.
2. Beemster G.T.S., Baskin T.I. STUNTED PLANT 1 Mediates Effects of Cytokinin, But not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of Arabidopsis // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 124 (№ 4). – P. 1718-1727.
3. Casamitjana-Martinez E. Root-Specific CLE19 Overexpression and the sol1/2 Suppressors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of Arabidopsis Root Meristem Maintenance / E. Casamitjana-Martinez, H.F. Hofhuis, Jian Xu et al. // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13 (№ 16). – P. 1435-1441.
4. Ioio R. D. Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation / R.D. Ioio, F.S. Linhares, E. Scacchi et al. // *Current Biology*. – 2007. – Vol. 17 (№ 8). – P. 678-682.
5. Ivanov V.B., Dubrovsky J.G. Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of root growth // *International J. of Plant Sciences*. – 1997. – Vol. 158 (№ 6). – P. 757-763.
6. Satbhai S.B., Ristova D., Busch W. Underground tuning: quantitative regulation of root growth // *J. of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 66 (№ 4). – P. 1099-1112.