

Е. И. Шарова, А. А. Липчинский

ОСОБЕННОСТИ РОСТОВЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ У МУТАНТА АРАБИДОПСИСА *ABRUPTUS* С НАРУШЕННЫМ ТРАНСПОРТОМ АУКСИНА

Введение

Согласованное развитие и рост разных частей растения — результат положительных и отрицательных ростовых корреляций. Растущие органы обычно тормозят рост, ускоряют дифференцировку и старение себе подобных. Процессы, лежащие в основе отрицательных ростовых корреляций, наиболее полно изучены на примере явления апикального доминирования у побега и корня, состоящего в том, что растущая апикальная почка тормозит рост пазушных почек, а растущая верхушка корня тормозит заложение и рост боковых корней. Ростовые корреляции осуществляются благодаря трофической и гормональной системам регуляции целостности растений, причем в явлении апикального доминирования фитогормоны играют ведущую роль. Ауксин оказывает ингибирующее действие на рост пазушных почек только в том случае, если происходит его активный полярный транспорт из верхушки побега. В последние десятилетия роль полярного транспорта ауксина в различных ростовых корреляциях подтверждена благодаря использованию трансгенных растений и мутантов [1]. Предполагают, что важная информация заключена не только в уровне ауксина, но и в аксиальном градиенте его концентрации [2]. Пологий градиент продлевает фазу растяжения клетки, а крутой — ускоряет дифференцировку. Главный активный поток ауксина и в побегах, и в корнях направлен сверху вниз. Полярный транспорт ауксина из клетки в клетку лимитируется требующим больших энергетических затрат выходом ауксина из клеток при участии мембранных переносчиков. У арабидопсиса это семейство белков обозначено как PIN (pin-formed), так как у мутантов формировались шпильковидные побеги без листьев и цветков [3]. Белок PIN, как правило, находится только на одной из четырех сторон клетки, и его расположение четко соответствует направлению транспорта ауксина. Благодаря различной локализации белков семейства PIN возможен полярный транспорт ауксина не только сверху вниз, но и в других направлениях [4]. Локализация переносчиков семейства PIN зависит от степени фосфорилирования белков. В данной работе был изучен мутант *abruptus* (*abr*), у которого так же, как и у *pin1*, наиболее яркое фенотипическое проявление мутации состоит в формировании шпильковидных побегов, лишенных цветков и листьев [5]. Мутация *abr* — это аллельная мутация гена *PINOID* (*PID*). Мутация затрагивает ген, кодирующий серин-треониновую протеинкиназу семейства 23. Это точковая мутация, приводящая к замене остатка глицина на остаток глутаминовой кислоты в консервативном домене белка *PID* [6]. Фенотипическое сходство мутантов *pid* и *pin1* позволило предположить, что у *pid*, так же как и у *pin1*, подавлен полярный транспорт ИУК. Измерение скорости этого транспорта в побегах *abr* и других мутантов *pid* действительно показало, что базипетальный транспорт ауксина подавлен, однако в значительно

меньшей степени, чем у *pin1* [7, 8]. По современным представлениям основной физиологический способ регуляции роста состоит в изменении свойств клеточных стенок [9]. У быстро растущей клетки стенки очень эластичны и пластичны. В процессе торможения роста стенки теряют способность деформироваться. Снижение растяжимости клеточных стенок сопряжено со значительными и разнообразными изменениями их биохимических свойств. Наиболее изучена роль окислительных реакций, в которых участвует пероксид водорода. Он образуется в клеточных стенках благодаря активности ряда ферментов, главным образом, оксидазной активности пероксидаз [10, 11]. Высокий уровень пероксида водорода на фоне низкой пероксидазной активности пероксидаз может приводить к генерации кислородных радикалов, разрезанию полимеров стенки и ускорению роста [12–14]. Высокая пероксидазная активность, напротив, приводит к использованию пероксида водорода для образования окислительных поперечных связей между полимерами и к торможению роста [15–18]. Цель данной работы состояла в получении новых сведений о физиологии роста модельного растения *A. thaliana*, досконально изученного в генетическом отношении, но фрагментарно — в физиологическом [19]. Для этого у растений дикого типа (*wt*) и у мутанта *abr* с нарушенным полярным транспортом ауксина были изучены градиенты роста междоузлий цветоносного побега. Кроме того, было изучено, как скорость роста сегментов междоузлий связана с растяжимостью, пероксидазной и НАД·Н-оксидазной активностью клеточных стенок.

Объект и методы исследования

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа расы Dijon и мутанта *abruptus (abr)*. Мутант *abr* был получен из коллекции *A. thaliana* кафедры генетики МГУ им. М. В. Ломоносова. Семена дезинфицировали в течение 5 мин в растворе 70%-ного этанола и 1%-ного пероксида водорода и высевали в чашки Петри на поверхность геля из 1%-ного агар-агара, заполимеризованного на 1/10 (0,1 N) полного питательного раствора Чеснокова. Чашки с семенами в течение трех суток выдерживали при температуре 4 °С, затем переносили в стандартные условия (22–26 °С, 16-часовой фотопериод), в которых растения выращивали до получения зрелых семян. Для освещения использовали флуоресцентные лампы Osram L 36W/827, 200 Вт/м², расстояние до растений 10–20 см, освещенность 4000–4500 лк. Проростки пересаживали в готовый почвогрунт «Роза», когда у них формировался первый лист. Растения ежедневно поливали разбавленным (0,1 N) питательным раствором Чеснокова. В возрасте примерно трех недель растения начинали формировать цветоносы. Динамику роста междоузлий цветоноса прослеживали, ежедневно измеряя их длину. Для изучения динамики роста различных сегментов междоузлия, на него через каждые 2 мм наносили метки китайской тушью, когда междоузлие достигало длины 10 мм, и ежедневно измеряли расстояния между метками (рис. 1).

Эластические свойства клеточных стенок оценивали по степени эластической растянутости ткани. Для этого междоузлия нарезали на сегменты длиной 2–3 мм, которую измеряли при увеличении в 17 раз, используя «Микрофот 5ПО1». Затем сегменты замораживали при –30 °С. Через 1 ч их выкладывали на влажные предметные стекла и оставляли на 1 ч для оттаивания. Затем вновь измеряли длину сегментов междоузлий. Для расчетов эластической растянутости использовали следующее уравнение:

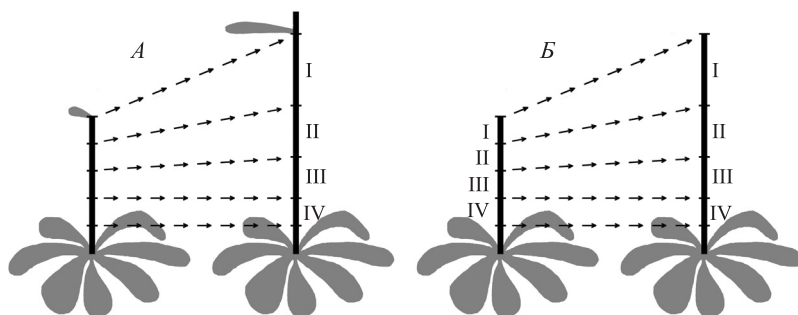


Рис. 1. Схема измерений кинетики роста сегментов (I–IV) 1-го междоузлия растений дикого типа и мутанта *abr* (А) и шпильковидного побега мутанта *abr* (Б)

$(L_i - L_f)/L_i$, %, где L_i — исходная длина; L_f — длина после потери тургора в результате замораживания/оттаивания.

Исследование пластической растяжимости клеточных стенок проводили по методу крипа с использованием механотрона 6MX1С — электронной лампы, преобразующей угловые смещения в изменения электрического тока [9]. В опытах использовали верхние отрезки (13 мм) растущих и закончивших рост междоузлий. Боковые поверхности отрезков потирали наждачной бумагой, для того чтобы кутикула не препятствовала поступлению в них буфера. Отрезок закрепляли между верхним и нижним зажимами установки, позволяющей непрерывно регистрировать крип. Длина отрезка между зажимами установки составляла 10 мм. В ячейку, образованную нижним зажимом установки после закрепления испытуемого образца, вносили ацетатный буфер (10 мМ). Эксперимент начинали в буфере с рН 6,0, прикладывая к отрезку нагрузку 5 г. Растяжение отрезков происходило с затухающей скоростью. Через 14–15 мин с момента приложения нагрузки, когда устанавливалась постоянная скорость растяжения (0,5–1 мкм/мин), раствор, омывающий растягивающийся отрезок, заменяли на более кислый (рН 4,8). «Кислый крип» клеточных стенок регистрировали в течение следующих 15 мин.

Для определения пероксидазной и НАД·Н-оксидазной активности клеточных стенок четырехмиллиметровые сегменты междоузлий (по 15–20 штук, 8–12 мг) растирали в 5 мл К-фосфатного буфера (1 мМ, рН 6,0). Осадок отделяли центрифугированием 10 мин при 1700 g. Далее его отмывали от мембранных компонентов встряхиванием в течение 30 мин в 5 мл К-фосфатного буфера, содержащего 0,2% детергента тритона X-100, затем отделяли центрифугированием при тех же условиях и вновь промывали буфером. Промытый осадок заливали 2 мл 1 М NaCl в буфере и выдерживали 30 мин для экстракции солерастворимых ферментов клеточной стенки. Экстракт отделяли центрифугированием в тех же условиях. Все процедуры проводили при 4 °С. Пероксидазную активность определяли в реакционной среде объемом 3 мл следующего состава: 27 мМ К-фосфатный буфер рН 6,0; 20 мМ гваякол; 4 мМ пероксид водорода; солевой экстракт клеточных стенок (1,4 мл). Оценивали скорость образования окрашенного продукта реакции — тетрагваякола ($E_{470\text{ нм}} = 0,0266 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) — на линейном участке кривой (2-я минута реакции). НАД·Н-оксидазную активность пероксидаз определяли в реакционной среде объемом 5 мл: К-фосфатный буфер рН 6,0 (20 мМ), 2,4-дихлорфе-

нол (0,05 мМ), $MnSO_4$ (0,1 мМ) и НАД·Н (0,2 мМ), солевой экстракт клеточных стенок (60 мкл). Оксидазную активность оценивали по количеству пероксида водорода, образующегося в ходе данной реакции. Для этого через 1, 2 и 3 мин после начала реакции отбирали порции реакционной среды, фиксировали в равном объеме чувствительного к H_2O_2 реагента FOX и через 45 мин измеряли экстинкцию при 560 нм [20]. Состав реагента FOX: сорбит (200 мМ), серная кислота (50 мМ), ксиленоловый оранжевый (0,2 мМ), сульфат железа (0,5 мМ) и сульфат аммония (0,5 мМ). Для расчета концентрации пероксида водорода использовали калибровочную кривую. Активность ферментов тестировали при комнатной температуре и выражали в Международных единицах (1МЕ = 1 мкмоль субстрата/мин) в 1 г сырой массы ткани. Анализы были проведены в трех биологических повторностях. Каждая биологическая повторность представляла собой результат измерений роста, растяжимости клеточных стенок и активности ферментов у 10–15 растений дикого типа или мутанта *abr*, семена которых замачивали одновременно. На рис. 2, 3 и в таблице приведены средние арифметические значения и стандартные ошибки средних.

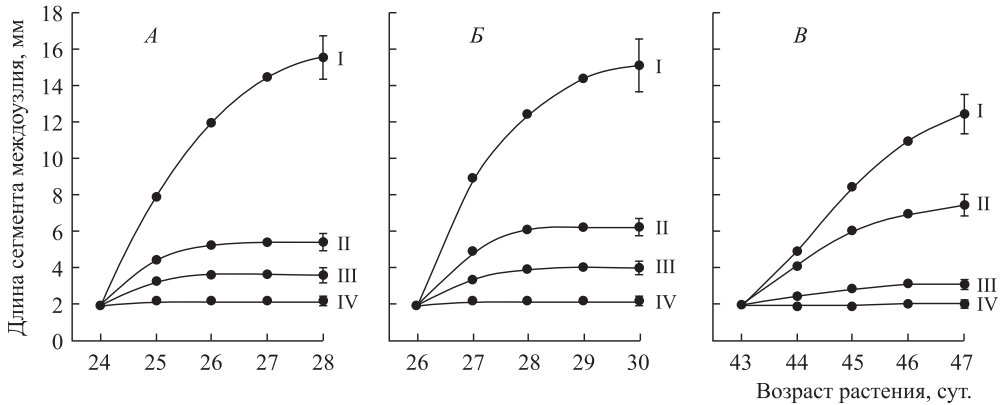


Рис. 2. Кинетика роста сегментов (I–IV) 1-го междоузлия цветоносного побега растений дикого типа (А), первого междоузлия цветоносного (Б) и шпильковидного побега мутанта *abr* (В)

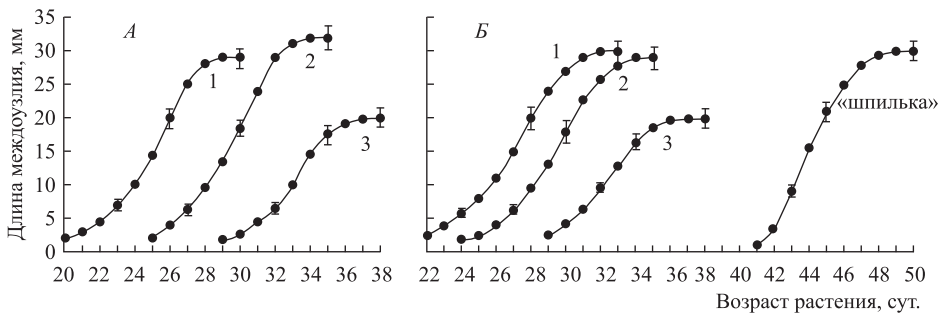


Рис. 3. Кинетика роста (1–3-го) междоузлий цветоносного побега растений дикого типа (А) и мутанта *abr* (Б), шпильковидного побега мутанта *abr* (Б, «шпилька»)

Растяжимость клеточных стенок и их пероксидазная и НАД-Н-оксидазная активности у растущих и закончивших рост («зрелых») сегментов междоузлий *A. thaliana* дикого типа

Вариант	Растяжимость клеточных стенок			Пероксидазная активность, МЕ/г сырой массы	НАД-Н-оксидазная, МЕ/г сырой массы
	Эластическая растянутость, %	«Кислый крип», мкм			
		Первые 5 мин реакции	Вторые 5 мин реакции		
Растущий сегмент	16,4 ± 0,5	21,2 ± 0,8	3,3 ± 0,2	5,43 ± 0,29	1,56 ± 0,16
«Зрелый» сегмент	12,1 ± 0,4	20,1 ± 1,2	1,7 ± 0,2	7,26 ± 0,32	1,57 ± 0,11

Результаты исследования и их обсуждение

Физиология развития *A. thaliana*, включая кинетику роста его междоузлий, по мнению специалистов [21], изучена недостаточно. Одно из положений физиологии роста, основанное преимущественно на изучении развития проростков бобовых и злаковых, состоит в наличии у междоузлий крутых аксиальных градиентов роста, которым соответствуют градиенты растяжимости клеточных стенок. Эти градиенты зависят от полярного транспорта фитогормона ауксина. Чтобы проверить справедливость данного положения в отношении *A. thaliana*, мы изучили аксиальные градиенты роста и растяжимости клеточных стенок цветоносного побега этого растения. Рост цветоноса у wt растений начинался в возрасте 18–20 сут. У растений мутанта *abr* выход в стрелку происходил на 1–2 сут. позднее. Когда длина 1-го междоузлия цветоносного побега достигала 10 мм, на междоузлие наносили метки тушью и в течение недели ежедневно измеряли длину каждого сегмента для того, чтобы оценить аксиальный градиент роста. На рис. 2 видно, что у wt растений и растений мутанта *abr* крутизна градиента роста по длине междоузлия была примерно одинаковой. Очевидно, что рост междоузлия происходил только за счет удлинения верхнего, четырехмиллиметрового сегмента. Формирование лишенных цветков и листьев шпильковидных побегов у растений мутанта *abr*, выращиваемых при 22–24 °С, начиналось на 7–9 суток позднее выхода в стрелку. Шпильковидные побеги возникали в основном как боковые побеги укороченных метамеров розетки. Значительно реже они формировались из пазушных почек цветоносного побега. У шпильковидного побега аксиальный градиент роста был несколько более пологим, чем у 1-го междоузлия цветоносного побега (см. рис. 2).

Сравнение растяжимости клеточных стенок у растущих и только что закончивших рост (см. разд. «Объект и методы исследования») сегментов междоузлий арабидопсиса в целом подтверждает представление о том, что скорость растяжения клеток определяется растяжимостью клеточных стенок (см. таблицу). Эластическая растянутость у растущих сегментов составляла 16–17%, у достигших окончательной длины — 12%. Различия в «кислом крипе», по которому судят о пластической растяжимости стенок, были не такими значительными и проявлялись не столько в силе реакции, сколько в большей ее продолжительности у растущих междоузлий. Подоб-

ные изменения растяжимости стенок наблюдались у цветоносных и шпильковидных побегов мутанта *abr* (данные не приведены). У ряда растений было показано, что базипетальное снижение растяжимости клеточных стенок в междоузлиях связано с увеличением пероксидазной активности [15, 16]. В научной литературе мы не нашли сведений об аксиальном градиенте активности пероксидаз клеточных стенок у растений арабидопсиса. Поэтому нами была изучена оксидазная и пероксидазная активность этих ферментов у верхнего быстрорастущего четырехмиллиметрового сегмента первого междоузлия растений дикого типа и у расположенного ниже медленнорастущего сегмента. В результате было показано, что пероксидазная активность медленнорастущего сегмента была на 35% выше, чем у быстрорастущего, а по НАД·Н-оксидазной активности эти сегменты не отличались (см. таблицу). Таким образом, у междоузлий арабидопсиса снижение скорости удлинения клеток и растяжимости клеточных стенок было связано с увеличением пероксидазной активности на фоне неизменной НАД·Н-оксидазной активности пероксидаз и, по-видимому, обусловлено образованием окислительных поперечных сшивок между полимерами клеточных стенок, которое катализируют пероксидазы [22].

Обычно у растений быстрый рост верхнего междоузлия сопровождается снижением скорости роста и ускорением дифференцировки нижележащего междоузлия. В научной литературе имеются единичные сведения о том, что соотношение скорости роста последовательных междоузлий побега регулируется базипетальным потоком ауксина [23]. Поэтому мы сравнили кинетику роста трех последовательных междоузлий цветоносного побега растений мутанта *abr* и растений *wt*, предполагая, что нарушение транспорта ауксина у мутанта может отразиться на корреляциях роста междоузлий. Рост 1-го междоузлия *wt* растений начинался через 18–20 сут. после замачивания семян и продолжался приблизительно 10 сут. Рост 2-го междоузлия начинался на четверо суток позднее роста 1-го междоузлия, а рост 3-го междоузлия — на 4–5 сут. позднее 2-го междоузлия. Таким образом, когда длина 1-го междоузлия составляла 85% своей конечной длины, длина 2-го междоузлия составляла только 20% своей конечной длины. Аналогичные соотношения роста наблюдались между 2-м и 3-м междоузлиями: когда длина 2-го междоузлия достигала 90% своей конечной длины, длина 3-го междоузлия составляла 35% своей конечной длины. У растений мутанта *abr* кинетика роста междоузлий цветоносного побега и кинетика роста шпильковидного побега имели такую же сигмовидную форму, как и у *wt* растений. Однако соотношение скорости роста последовательных междоузлий существенно отличалось. Рост 2-го междоузлия начинался на трое суток позже роста 1-го междоузлия, а рост 3-го междоузлия на трое-четыре суток позднее роста 2-го междоузлия. Таким образом, когда 1-е междоузлие достигало 90% своей окончательной длины, длина 2-го междоузлия составляла 60% своей окончательной длины. Аналогичное соотношение роста наблюдалось между 2-м и 3-м междоузлиями: когда длина 2-го междоузлия составляла 90% своей окончательной длины, длина 3-го междоузлия составляла 50% своей окончательной длины. Таким образом, мы обнаружили, что у мутанта *abr* с нарушенным транспортом ауксина был значительно снижен градиент роста в ряду последовательных междоузлий цветоносного побега.

Заключение

Для *A. thaliana* впервые было показано, что аксиальным градиентам роста междоузлий соответствуют градиенты эластической и пластической растяжимости клеточных стенок. Базипетальное снижение растяжимости клеточных стенок может быть связано с образованием окислительных сшивок между полимерами, о чем свидетельствует значительное увеличение активности локализованных в клеточных стенках пероксидаз. Аксиальные градиенты роста междоузлий цветоносных побегов не различались у растений дикого типа и мутанта *abr* с нарушенным транспортом ауксина. Шпильковидные побеги мутанта имели более пологий градиент роста. У растений *wt* в каждый момент времени быстро удлинялось только одно междоузлие цветоносного побега, тогда как у мутанта *abr* одновременно удлинялись два междоузлия. Таким образом, подавление полярного транспорта гормона ауксина уменьшало коррелятивное торможение роста в ряду последовательных междоузлий цветоноса арабидопсиса.

* * *

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04-00701-а).

Литература

1. Boutte Y., Ikeda Y., Grebe M. Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. Vol. 10. P.616–623.
2. Friml Y. Auxin transport — shaping the plant // *Curr Opin. Plant Biol.* 2003. Vol. 6. P. 7–12.
3. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue / Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. // *Science*. 1998. Vol. 282. P.2226–2230.
4. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport / Reinhardt D., Pesce E.-R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. // *Nature*. 2003. Vol. 426. P.255–260.
5. Янушкевич С. И. Использование арабидопсиса в практических занятиях по общей генетике. М: Изд-во МГУ, 1985. 61 с.
6. Влияние гена *ABRUPTUS/PINOID Arabidopsis thaliana* на экспрессию гена *LEAFY* / Лебедева О. В., Ондар У. Н., Пенин А. А., Ежова Т. А. // *Генетика*. 2005. Т. 41. С. 559–565.
7. Bennett, S. R. M., Alvarez J., Bossinger G., Smyth D. R. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1995. Vol. 8. P. 505–520.
8. Полярный транспорт ауксина у мутанта *abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / Калинина А. Ю., Ежова Т. А., Голубева Н. В., Донец И. С., Маркова И. В., Медведев С. С. // *Вестн. С.-Петербург. ун-та. Сер. 3*. 2000. Вып. 1. С. 42–49.
9. Шарова Е. И. Клеточная стенка растений. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 2004. 156 с.
10. Gross G. G., Janse C., Elstner E. F. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) // *Planta*. 1977. Vol. 136. P.271–276.
11. The Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance / Bindschedler L. V., Dewdney J., Blee K. A., Stone J. M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D. R., Ausubel F. M., Bolwell G. P. // *Plant J.* 2006. Vol. 47. P.851–863.
12. Miller A. R. Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 141. P.238–244.
13. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth / Schopfer P., Liszak A., Bechtold M., Frahy G., Wagner A. // *Planta*. 2002. Vol. 214. P.821–828.

14. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth / Müller K., Linkies A., Vreeburg R. A. M., Fry S. C., Krieger-Liszkay A., Leubner-Metzger G. // *Plant Physiol.* 2009. Vol. 15. P.1855–1865.
15. MacAdam J. W., Nelson C. J., Sharp R. E. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P.872–878.
16. MacAdam J. W., Sharp R. E., Nelson C. J. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P.879–885.
17. Hohl M., Greiner H., Schopfer P. The cryptic-growth response of maize coleoptiles and its relationship to H₂O₂-dependent cell wall stiffening // *Physiol. Plant.* 1995. Vol. 94. P.491–498.
18. Schopfer P. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening *in vitro* in maize coleoptiles // *Planta.* 1996. Vol. 199. P.43–49.
19. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants / Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A. J., Hoffman N. E., Davis K. R., Görlach J. // *Plant Cell.* 2001. Vol. 13. P.1499–1510.
20. Gay C., Gebicki J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay // *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 284. P.217–220.
21. Quantitative modeling of Arabidopsis development / Mundermann L., Erasmus Y., Lane B., Coen E., Prusinkiewicz P. // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. P.960–968.
22. Iiyama K., Lam T. B.-T., Stone B. A. Covalent cross-links in the cell wall // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 104(2). P.315–320.
23. Sachs T. Pattern formation in plant tissues. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 234 p.

Статья поступила в редакцию 15 марта 2012 г.