УДК 581.143.27 Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2012. Вып. 3

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

© Е. И. Шарова, А. А. Липчинский, 2012

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/м^2, 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:

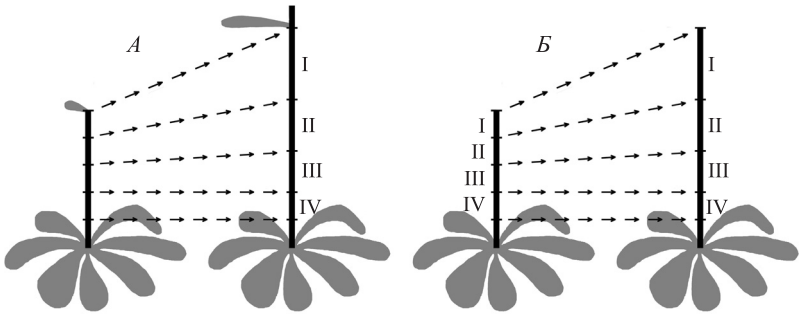


Рис. 1. Схема измерений кинетики роста сегментов (I–IV) 1-го междоузлия растений дикого типа и мутанта *abr* (*А*) и шпильковидного побега мутанта *abr* (*Б*)

(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 6МХ1С — 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 pH 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 (pH 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, pH 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 Х-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 pH 6,0; 20 мМ гваякол; 4 мМ пероксид водорода; солевой экстракт клеточных стенок (1,4 мл). Оценивали скорость образования окрашенного продукта реакции — тетрагваякола ($E_{470\ нм} = 0{,}0266$ мкМ$^{-1}$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 pH 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.

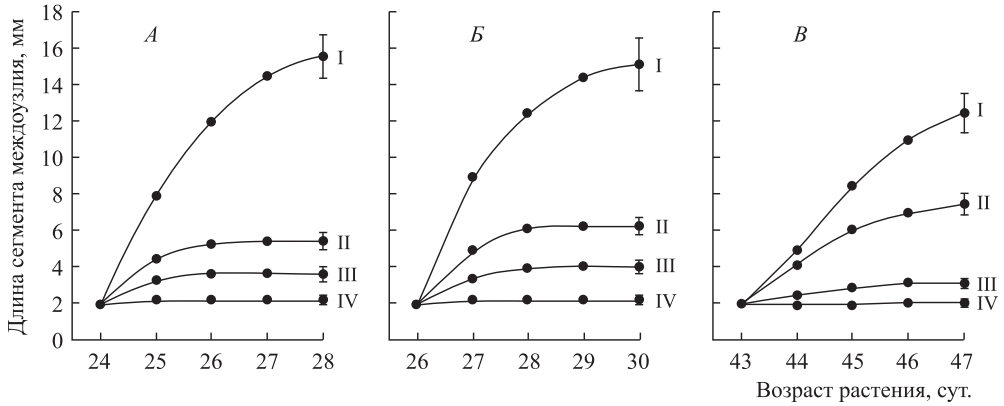


Рис. 2. Кинетика роста сегментов (I–IV) 1-го междоузлия цветоносного побега растений дикого типа (*А*), первого междоузлия цветоносного (*Б*) и шпильковидного побега (*В*) мутанта *abr*

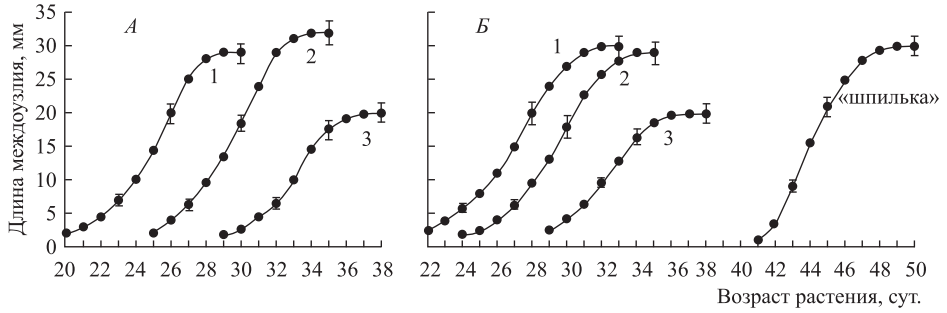


Рис. 3. Кинетика роста (1–3-го) междоузлий цветоносного побега растений дикого типа (*А*) и мутанта *abr* (*Б*), шпильковидного побега мутанта *abr* (*Б*, «шпилька»)

Растяжимость клеточных стенок и их пероксидазная и НАД·Н-оксидазная активностиь 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-четверо 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.-Петерб. ун-та. Сер. 3. 2000. Вып. 1. С. 42–49.

9. *Шарова Е. И.* Клеточная стенка растений. СПб: Изд-во С.-Петерб. 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., Liszkay A., Bechtold M., Frahry 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 H_2O_2-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-xylenol 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: Camridge University Press, 1991. 234 p.

Статья поступила в редакцию 15 марта 2012 г.