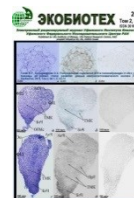




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



РОЛЬ ИУК В НАКОПЛЕНИИ МАССЫ КОРНЕЙ АРАБИДОПСИСА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ К ЭТИЛЕНУ

Коробова А.В.¹, Басырова Л.Х.², Ахтямова З.А.¹,
Васинская А.Н.¹, Зайнутдинова Э.М.², Иванов И.И.¹,
Кудоярова Г.Р.¹

¹Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа; ²Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа
E-mail: muksin@mail.ru

Работа посвящена исследованию взаимодействия этилена и ауксина в регуляции накопления массы корней. Для этого были использованы растения арабидопсиса исходного экотипа Columbia, их нечувствительные к этилену мутанты *etr1-1* и трансгенные растения, трансформированные чувствительной к ауксину конструкцией DR5::GUS. Снижение накопления массы корней у растений Columbia было зарегистрировано под влиянием обработки ИУК и ингибитором рецепции этилена 1-метилциклопропеном (1-МЦП). Корни нечувствительных к этилену мутантов имели меньшую массу, но при этом характеризовались повышенным содержанием ИУК по сравнению с Columbia. Сделан вывод о важной роли этилена в предотвращении чрезмерного накопления ИУК, что имеет значение для поддержания накопления массы корней. Обработка трансгенных DR5::GUS растений 1-МЦП приводила к усилению активности глюкоронидазы, что свидетельствует о повышении содержания ауксинов под влиянием ингибитора рецепции этилена и подтверждает ингибирующее влияние этилена на накопление ауксинов.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *etr1-1*, ИУК, чувствительность к этилену, масса корней, 1-МЦП, DR5::GUS

ROLE OF IAA IN THE ROOT MASS ACCUMULATION OF ARABIDOPSIS DEPENDING ON PLANT SENSITIVITY TO ETHYLENE

Korobova A.V.¹, Basyrova L.Kh.², Akhtyamova Z.A.¹,
Vasinskaya A.N.¹, Zaynutdinova E.M.², Ivanov I.I.¹,
Kudoyarova G.R.¹

¹Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa
²Ufa State Oil Technical University, Ufa
E-mail: muksin@mail.ru

The work is devoted to the study of interaction of ethylene and auxin in regulation of the root mass accumulation. For this, the Arabidopsis plants of the parent ecotype Columbia, their ethylene-insensitive *etr1-1* mutants, and transgenic plants transformed with auxin-sensitive DR5::GUS system were used. The root mass accumulation decreased in Columbia plants after treatments with IAA and an inhibitor of ethylene perception 1-methylcyclopropene (1-MCP). Roots of ethylene-insensitive mutants had a smaller mass, but at the same time they were characterized by a higher content of IAA compared with Columbia. It was concluded that ethylene plays an important role in maintaining of root mass accumulation by preventing excessive accumulation of IAA in roots. Treatment of transgenic DR5::GUS plants with 1-MCP resulted in an increase in the activity of glucuronidase, which indicates the up-regulation of auxin content by inhibitor of ethylene perception and confirms the inhibitory effect of ethylene on auxin accumulation.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *etr1-1*, IAA, ethylene sensitivity, root biomass, 1-MCP, DR5::GUS

Поступила в редакцию: 13.03.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-1-86-91](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-1-86-91)

ВВЕДЕНИЕ

Роль этилена в регуляции роста растений до сих пор однозначно не определена. По классическому представлению этилен является ингибитором роста растяжением [Abeles et al., 1992]. Однако, например, в условиях затопления этот гормон стимулирует удлинение междоузлий и черешков листьев, что помогает побегам растений подняться над

поверхностью воды [Voeselek et al., 2006]. У некоторых растений низкие концентрации этилена способны стимулировать даже удлинение корней [Pierik et al., 2007].

Сравнение нечувствительных к этилену растений арабидопсиса с их исходным экотипом показало также неоднозначные результаты. В разных исследованиях мутантные растения были крупнее исходных [Hua et al., 1995], не отличались от них по скорости роста [Tholen et al., 2004] или значительно отставали в накоплении биомассы от чувствительных к этилену растений [Pierik et al., 2003]. Было показано, что отсутствие чувствительности к этилену влечет за собой избыточное накопление цитокининов в корнях растений арабидопсиса, что может быть причиной снижения накопления биомассы корней мутантными растениями [Коробова и др., 2016].

Взаимодействие этилена и ауксинов в регуляции роста корней неоспоримо, однако его механизм остается не ясным до сих пор. Так, с одной стороны, ауксины способны стимулировать продукцию этилена [Woeste et al., 1999] и тем самым ингибировать удлинение корней. Этилен, с другой стороны, влияет на синтез и распределение ауксинов в растениях [Ruzicka et al., 2007], поэтому можно предполагать, что этилен тормозит рост корней через стимуляцию накопления ауксинов в зоне роста корней. Нами недавно получены данные о том, что изменение длины корней в ответ на действие ауксина зависит от нормальной рецепции этилена, поскольку экзогенная ИУК не вызывала ингибирования роста в длину корней нечувствительных к этилену растений в отличие от растений исходного экотипа [Korobova et al., 2018]. Остается непонятным, как происходит взаимодействие ауксина и этилена в регуляции накопления массы корней. В получении ответа на этот вопрос и состояла цель настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* [L.] Heynh.) исходной линии Columbia (Col-0) и их нечувствительный к этилену мутант *etr1-1*, а также трансгенные растения, несущие чувствительную к ауксину репортерную конструкцию DR5::GUS [Ulmasov et al., 1997]. После стратификации на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение трех дней при температуре 4°C, семена Col-0 и *etr1-1* переносили в 100-миллилитровые сосуды с песком, насыщенным раствором Хогланда–Арнона, и выращивали в климатической камере (MLR-350H, “Sanyo”, Япония) при температуре 23°/19°C (день/ночь), 80% относительной влажности воздуха, освещенности 120 мкмоль/(м² с) ФАР и 16-часовом фотопериоде, как описано в работе [Shtratnikova et al., 2015]. Растения ежедневно получали 3 мл раствора Хогланда–Арнона и дистиллированную воду по весу сосудов для поддержания оводненности песка на уровне 70% от полной влагоемкости, как описано ранее [Arkhipova et al., 2007]. Через 3 недели после переноса в климатическую камеру у растений Col-0 и *etr1-1* определяли чувствительность роста корней к добавлению экзогенной ИУК. Для этого в питательный раствор ежедневно добавляли

свежеприготовленный раствор ИУК до конечной концентрации $5,7 \times 10^{-6}$ М. Через 4 дня после начала обработки растений ауксином регистрировали массу корней и производили фиксацию корней Col-0 и *etr1-1* для количественного определения ИУК.

Экстракцию, очистку и метилирование ИУК проводили как описано ранее [Высоцкая и др., 2007]. Иммуноферментный анализ проводили с использованием специфических антител к ИУК [Высоцкая и др., 2007].

Для изучения влияния ингибитора рецепции этилена на накопление массы корней трехнедельные растения Col-0 обрабатывали раствором 1-метилциклопропеном (1-МЦП), как описано в работе [Vysotskaya et al., 2011]. Раствор 1-МЦП получали из предшественника, полученного в качестве подарка от “SmartFresh, AgroFresh Inc.” (США). Предшественник растворяли в 0.05% растворе смачивающего агента (Silwett L-77, “De Sangosse Ltd.”, Великобритания) из расчета 0.1 г на 1 л раствора. Полученным раствором (в дозе, обеспечивающей полное смачивание поверхности листьев) опрыскивали листья экспериментальных растений не позже, чем через 5 мин после приготовления раствора, в течение которых образовывался газообразный 1-МЦП. Вторую часть растений (контроль) обрабатывали раствором смачивающего агента. Обработку 1-МЦП повторили через 4 дня. Сразу после опрыскивания растения накрывали полиэтиленовым мешком для ограничения диффузии газообразного 1-МЦП и помещали в темноту в закрытый ящик, поскольку по данным Sisler и Serek [1997] необратимое связывание 1-МЦП с рецепторами этилена происходит в темноте. Утром растения возвращали в климатическую камеру. Через 7 суток после начала обработки 1-МЦП у растений измеряли массу всех корней.

Для гистохимического анализа активности глюкуронидазы четырехнедельные трансгенные растения арабидопсиса после двукратной обработки 1-МЦП инкубировали ночь при 37°C в растворе субстрата 5-бром-4-хлор-3-индолил-*b*-D-глюкуронида (0.5 мг/мл в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7) как описано [Пожванов, Медведев, 2008]. Интенсивность окрашивания была оценена с помощью программы ImageJ (ver. 1.49a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным программам MS Excel. Представлены стандартные ошибки средних, рассчитанные для *n* биологических повторений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Масса корней нечувствительных к этилену мутантных растений арабидопсиса была существенно ниже, чем у растений исходного экотипа Columbia (рис. 1). Причиной такого отставания могла быть мутация, приводящая к потере чувствительности растений к этилену, поскольку обработка растений Columbia ингибитором рецепции этилена 1-метилциклопропеном (1-МЦП) приводила к такому же результату, т.е. к резкому снижению накопления массы корней (рис. 1).

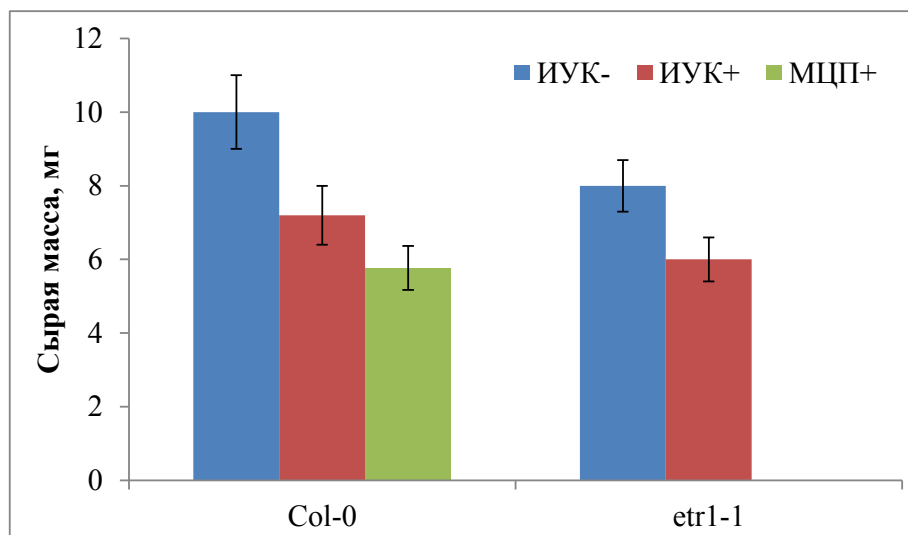


Рис. 1. Сырая масса корней растений арабидопсиса исходной линии *Columbia* (Col-0) и нечувствительных к этилену мутантных растений *etr1-1* после обработки ИУК или ингибитором рецепции этилена 1-МЦП (n = 30).

Хорошо известно, что этилен часто выполняет свою функцию, взаимодействуя с другими гормональными сигналами [Stepanova et al., 2005; Шарипова и др., 2012; Коробова и др., 2016]. Оценка содержания ауксина ИУК показала более выраженное накопление этого гормона в корнях мутантных растений по сравнению с исходными ($327,44 \pm 28,6$ и $195,2 \pm 22,3$ нг/г сырой массы корней *etr1-1* и *Columbia*, соответственно; n = 9). В высоких концентрациях ауксины способны подавлять рост корней, поэтому причиной снижения массы корней у нечувствительных к этилену растений мог быть высокий уровень в них ИУК. Однако необходимо было проверить, влияет ли ИУК на накопление массы корней у растений, потерявших чувствительность к этилену.

Как видно из рисунка 1, введение ИУК в среду приводило к снижению массы корней как у исходных, так и у мутантных растений. Ауксин, по-видимому, напрямую влияет на накопление массы корнями, не задействуя этиленовый сигналинг.

Иную картину мы обнаружили при исследовании взаимодействия ауксина и этилена в регуляции удлинения корней. ИУК тормозила рост корней в длину у исходного экотипа *Columbia*, тогда как удлинение корней у *etr1-1* мутанта под влиянием экзогенной ИУК оставалось неизменным [Korobova et al., 2018]

Поскольку мы не обнаружили зависимости влияния ИУК на накопление массы корней от чувствительности растений к этилену, можно предполагать, что формирование у мутантных растений корней с меньшей массой по сравнению с *Columbia* является прямым следствием высокого содержания в них ИУК.

Данные о влиянии этилена на уровень ауксинов довольно противоречивы, и можно встретить сведения как о повышении уровня ауксинов [Ruzicka et al., 2007], так и их снижении под влиянием этилена [Pacheco-Villalobos et al., 2013]. Поэтому важно было убедиться в правильности наших результатов, которые были получены с помощью иммуноанализа. С этой целью мы использовали альтернативный подход для оценки уровня ауксинов с помощью чувствительной к ауксину репортерной конструкции DR5::GUS. Обработка трансгенных растений, трансформированных с помощью такой конструкции, 1-МЦП приводила к усилению окрашивания корней (рис.2), что подтверждает повышение уровня ауксинов при потере чувствительности к этилену.

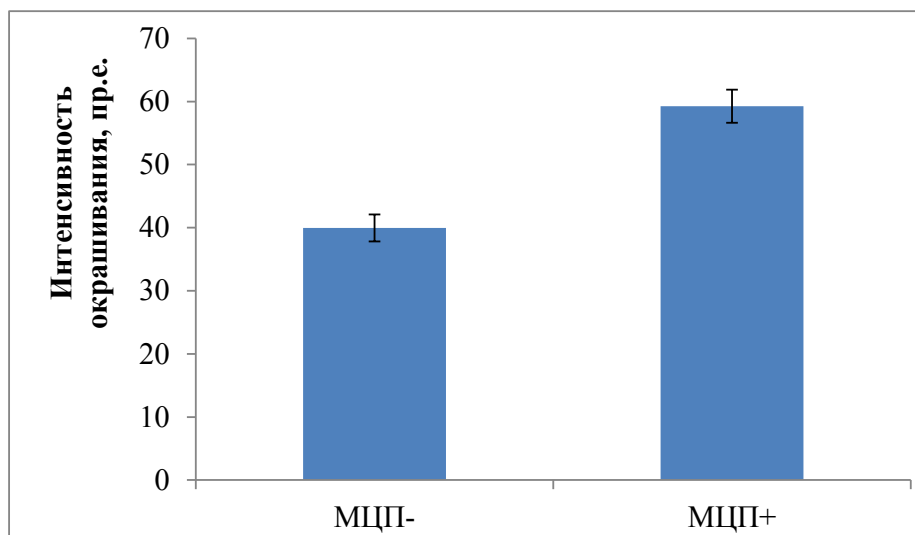


Рис. 2. Средняя интенсивность окрашивания кончиков корней трансгенных растений, несущих чувствительную к ауксину репортерную конструкцию DR5::GUS через 7 дней после начала обработки 1-МЦП (n = 30).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют в пользу важной роли этилена в поддержании накопления массы корнями растений. По нашим данным, потеря чувствительности к этилену влечет за собой повышенное накопление ИУК в корнях, что отрицательно сказывается на их массе. И наоборот, у растений с нормальной рецепцией этилена уровень ИУК в корнях поддерживается на более низком уровне, что обеспечивает большее накопление их массы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6 при частичной поддержке (Ахтямова З.А. и Васинская А.Н.) Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 18-34-00239).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высоцкая Л.Б., Черкозьянова А.В., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Роль ауксинов и цитокининов в формировании боковых корней у растений пшеницы с частично удаленными первичными корнями // Физиология растений. 2007. Т. 54. №3. С. 455–460.
2. Пожванов Г.А., Медведев С.С. Метод количественной оценки содержания ауксина по гистохимическому окрашиванию на активность GUS под контролем ауксин-чувствительного промотора // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 586–592.
3. Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Тимергалин М.Д., Wilkinson S. Влияние ингибитора рецепции этилена на рост, водный обмен и содержание абсцизовой кислоты у растений пшеницы при дефиците воды // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 4. С. 619–626.
4. Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit Jr M.E. Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego: Academic Press, 1992.
5. Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.Yu., Martinenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R. Cytokinin producing bacteria enhances plant growth in drying soil // Plant and Soil. 2007. V. 292. P. 305–315. DOI: 10.1007/s11104-007-9233-5

6. Hua J., Chang C., Sun Q., Meyerowitz E.M. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene // *Science*. 1995. V. 269. P. 1712–1714.
7. Korobova A.V., Vasinskaya A.N., Kirpichnikova A., Shishova M., Kudoyarova G.R. Cross-regulation of Arabidopsis root growth by plant hormones auxins and ethylene // *Biological Communications*. V. 63. I. 4. P. 256–260.
8. Pacheco-Villalobos D., Sankar M., Ljung K., Hardtke C.S. Disturbed local auxin homeostasis enhances cellular anisotropy and reveals alternative wiring of auxin-ethylene crosstalk in *Brachypodium distachyon* seminal roots // *PLoS Genet*. 2013. V. 9. e1003564. DOI: [10.1371/journal.pgen.1003564](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003564)
9. Pierik R., Visser E.J.W., de Kroon H., Voeselek L.A.C.J. Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours // *Plant Cell Environ*. 2003. V. 26. P. 1229–1234. DOI: [10.1046/j.1365-3040.2003.01045.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01045.x)
10. Pierik R., Sasidharan R., Voeselek L.A.C.J. Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2007. V. 26. P. 188–200. DOI: [10.1007/s00344-006-0124-4](https://doi.org/10.1007/s00344-006-0124-4)
11. Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Friml J., Benkova E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution // *The Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 2197–2212. DOI: [10.1105/tpc.107.052126](https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126)
12. Shtratnikova V.Yu., Kudryakova N.V., Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Danilova M.N., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N. Effects of nitrate and ammonium on growth of Arabidopsis thaliana plants transformed with the ARR5::GUS construct and a role for cytokinins in suppression of disturbances induced by the presence of ammonium // *Физиология растений*. 2015. Т. 62. № 6. С. 792–803. DOI: [10.7868/S0015330315060159](https://doi.org/10.7868/S0015330315060159)
13. Sisler E.C., Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments // *Physiologia Plantarum*. 1997. V. 100. P. 577–582. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x)
14. Stepanova A.N., Hoyt J.M., Hamilton A.A., Alonso J.M. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2005. V. 17. P. 2230–2242. DOI: [10.1105/tpc.105.033365](https://doi.org/10.1105/tpc.105.033365)
15. Tholen D.J.H., Voeselek L.A.C.J., Poorter H. Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia 3 hybrida* // *Plant Physiology*. 2004. V. 134. P. 1803–1812. DOI: [10.1104/pp.103.034389](https://doi.org/10.1104/pp.103.034389)
16. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1963–1971.
17. Voeselek L.A.C.J., Colmer T.D., Pierik R., Millenaar F.F., Peeters A.J.M. How plants cope with complete submergence // *New Phytologist*. 2006. V. 170. P. 213–226. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2006.01692.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01692.x)
18. Vysotskaya L., Wilkinson S., Davies W.J., Arkhipova T., Kudoyarova G. The effect of competition from neighbours on stomatal conductance in lettuce and tomato plants // *Plant Cell Environ*. 2011. V. 34. I. 5. P. 729–737. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2011.02277.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02277.x)
19. Woeste K.E., Vogel J.P., Kieber J.J. Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings // *Physiologia Plantarum*. 1999. V. 105. P. 478–484. DOI: [10.1034/j.1399-3054.1999.105312.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105312.x)