

На правах рукописи



Филин Алексей Николаевич

**Роль цитокининов и ауксинов в регуляции перехода клеток
меристемы корня к растяжению**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории физиологии корня Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Иванов Виктор Борисович

Официальные оппоненты:

Медведев Сергей Семёнович,

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург

Живухина Елена Александровна,

кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский педагогический государственный университет», Институт биологии и химии, доцент кафедры ботаники, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва.

Защита состоится «30» июня 2016 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» апреля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Фитогормоны (ФГ) играют ключевую роль в регуляции роста и морфогенеза растений. Наибольшее внимание физиологов растений сосредоточено на цитокининах (ЦК) и ауксинах, поскольку их считают одними из основных регуляторов этих процессов. Однако, несмотря на то, что изучению их действия на рост и морфогенез корней посвящено огромное количество работ, до сих пор относительно мало изучено, как они действуют на отдельные процессы, из которых складывается пролиферация и рост клеток, а именно на длительность клеточного цикла, время жизни клеток в меристеме, скорость образования клеток и скорость их перехода к растяжению. В настоящее время существует целый ряд различных мутантов, у которых одно или несколько звеньев цепи восприятие-передача-ответ нарушено или изменена скорость синтеза и распада ФГ. Они являются эффективными инструментами для изучения проблемы действия ФГ. Введение новых генов, а также выключение работы существующих генов у трансгенных растений или вследствие мутации часто приводит к изменению скорости роста, в частности, к изменению скорости роста корней. В настоящее время в литературе нет единого мнения на счет того, какое влияние оказывают ЦК и ауксины на рост корня. С одной стороны, ряд исследователей показали, что ЦК негативно действуют на пролиферацию (Guttman, 1956; Butcher, Street, 1960; Van't Hof, 1968; Beemster, Baskin, 2000). С другой стороны, существует гипотеза о том, что ЦК не влияют на пролиферацию, а увеличивают скорость перехода клеток к растяжению (Werner et al., 2003; Ioio et al., 2007). О том, как на пролиферацию и переход клеток к растяжению влияют ауксины, также нет единого мнения. Для того, чтобы разобраться на какие именно процессы влияют ЦК и ауксины и было проведено настоящее исследование. ФГ, а также мутанты, которые используются в этой работе, в настоящее время являются широко используемыми в работах, посвященных данной проблеме. Результаты, полученные в ходе этого исследования, позволят лучше понять механизмы регуляции роста и развития корня ЦК и ауксинами.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в определении роли цитокининов и ауксинов в регуляции пролиферации и перехода клеток меристемы корня *Arabidopsis thaliana* к растяжению. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить воздействие экзогенного *транс*-зеатина на скорость роста корня, длительность клеточного цикла, число и время жизни клеток в меристеме, длину закончивших рост клеток, скорость образования клеток и скорость перехода клеток к растяжению.
2. Изучить скорость роста корня, длительность клеточного цикла, число и время жизни клеток в меристеме, длину закончивших рост клеток, скорость образования клеток и скорость перехода клеток к растяжению у мутанта *ipt3ipt5ipt7* с нарушенным биосинтезом цитокининов и мутантов с ослабленной рецепцией цитокининов *cre1-2ahk3-7* и *cre1-12ahk3-3*
3. Изучить воздействие 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на скорость роста корня, длительность клеточного цикла, число и время жизни клеток в меристеме, длину закончивших рост, скорость образования клеток и скорость перехода клеток к растяжению.
4. Изучить скорость роста корня, длительность клеточного цикла, число и время жизни клеток в меристеме, длину закончивших рост клеток, скорость образования клеток и скорость перехода клеток к растяжению у мутантов *shy2-31* с нарушенным механизмом ответа на ауксиновый сигнал и мутантов с нарушенным полярным транспортом ауксинов *pin2* и *pin4*

Научная новизна работы. Настоящая работа, посвящённая изучению влияния цитокининов и ауксинов на пролиферацию и переход клеток меристемы корня *A. thaliana*, является оригинальным научным исследованием.

Впервые проведено изучение влияния эндогенной обработки tZ и 2,4-D в широких пределах концентрации. Проведен полный клеточный анализ роста корней мутантов со снижением концентрации ЦК или ослаблением сигналинга ЦК, в

результате которого выявлено, что у этих мутантов наблюдается стимуляция пролиферации и перехода клеток к растяжению.

Впервые с помощью клеточного анализа показано, что цитокинины не ускоряют переход клеток к растяжению, а наоборот, замедляют его из-за ингибирования пролиферации.

В процессе данной работы впервые было показано, что нарушение ответа на ауксиновый сигнал у *shy2-31* или полярного транспорта ауксина у *pin2* и *pin4* вызывает задержку клеток в меристеме, стимуляцию процесса растяжения, а также ингибирование пролиферации.

С помощью метода клеточного анализа было впервые показано, что у мутантов с уменьшением уровня экспрессии генов полярных переносчиков ауксина *pin2* и *pin4* по-разному изменены показатели роста корня.

В ходе данного исследования была применена новая методика мацерации исследуемого материала, где в качестве мацерирующего агента впервые применялась трихлоруксусная кислота

Практическая значимость. Результаты, полученные в работе, имеют прежде всего фундаментальный характер, так как позволяют получить более полную картину действия цитокининов и ауксинов на рост и развитие корня. Вместе с тем, эти результаты представляют интерес и в прикладной области, так как раскрывают особенности реакции корней растений на экзогенную обработку фитогормонами, которые активно используются в сельском хозяйстве. Материалы, изложенные в диссертации, могут быть использованы в учебной работе при подготовке лекционного материала для чтения курсов лекций по физиологии и биохимии растений в высших учебных заведениях.

Апробация результатов. Полученные в работе данные доложены на IX Международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых (к 100-летию со дня рождения И.Г. Серебрякова) (2014), V всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение,

биобезопасность» (2014), XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (2015), Всероссийской научной конференции с международным участием, и школе для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений», посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из которых 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 251 странице машинописного текста, включает 17 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает 248 наименований, из которых – 231 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись корни растений *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (экотип Columbia 0), используемые в качестве контроля во всех схемах экспериментов, а также при изучении влияния экзогенно-вносимых ЦК и ауксинов и инсерционные мутанты *A. thaliana* (экотип Columbia 0) с пониженной скоростью синтеза ЦК (Miyawaki et al., 2006) *ipt3ipt5ipt7*, с ослабленной рецепцией ЦК *cre1-2ahk3-7*, *cre1-12ahk3-3* (Ioio et al., 2007), с нарушением механизма ответа на ауксиновый сигнал *shy2-31* (Moubayidin et al., 2008), с нарушенным распределением ауксинов *pin2* и *pin4* (Blilou et al., 2005).

Условия выращивания. Растения выращивали в стерильных условиях. Перед посадкой семена стерилизовали 5% раствором гипохлорита натрия, после чего промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды по 5 мин в каждой. Стерилизованные семена высаживали в чашки Петри на среду, содержащую 1/4 нормы МС, 1% сахарозу, 0.8% агар-агар, 0.5 г/л 2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,8. В вариантах с добавлением tZ его вносили в концентрациях

0,02; 0,1 и 1µM непосредственно перед разливанием среды по чашкам Петри, после охлаждения среды до $t = 45^{\circ}\text{C}$, чтобы избежать его разрушения. В вариантах с добавлением 2,4-D, ее вносили в концентрациях 1,5; 15; 30 и 60 нМ в среду непосредственно перед автоклавированием, поскольку это соединение не разрушается во время этого процесса.

Для облегчения последующих манипуляций с растениями, а также для того, чтобы препятствовать заглублению корней в глубь среды, поверх среды накладывали сетчатые круги из полиэстера. Семена высаживали поверх них.

Стратификацию проводили при 4°C в темноте в течение 2 суток в чашках Петри. После стратификации чашки Петри с семенами переносили в климатическую камеру, где их устанавливали в вертикальное положение. Проращивание проводили при длине светового дня 16 ч, освещенности до 10 кЛк и температурном режиме 22/18°C (день/ночь).

Схемы экспериментов

Экспериментальная часть предусматривала несколько серий циклов экспериментов, проведенных по различным схемам.

Схема№1 (3-5-7). Эта серия экспериментов предусматривала изучение роста корня мутанта *ipt3ipt5ipt*, а также изучение влияния на рост экзогенного *транс*-зеатина (tZ), в концентрациях 0,02; 0,1 и 1µM. В качестве контроля для сравнения использовали корни растений дикого типа, которые выращивали на среде без добавления tZ. Растения фиксировали на 3-е, 5-е и 7-е сутки после прорастания.

Схема№2 (2,4-D). Эта серия экспериментов предусматривала изучение влияния на рост 2,4-D, в концентрациях 1,5; 15; 30 и 60нМ. В качестве контроля для сравнения использовали корни растений дикого типа, которые выращивали на среде без добавления 2,4-D. Растения фиксировали на 3-е, 5-е и 7-е сутки после прорастания.

Схема№3 (Мутанты). Эта серия экспериментов предусматривала изучение роста корней мутантов *shy2-31 cre1-2ahk3-7*, *cre1-12ahk3-3*, *pin2* и *pin4*. В качестве контроля для сравнения использовали корни растений дикого типа. Растения фиксировали на 3-е, 4-е и 5-е сутки после прорастания.

Фиксация материала и подготовка к микроскопированию. Перед фиксацией корней чашки Петри с проростками сканировали на световом сканере Epson Perfection V300 Photo (Epson, Индонезия) с разрешением 600 dpi для последующего измерения длины корней. Для дальнейших измерений растения фиксировали целиком в 4% формалине на фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 4 ч при комнатной температуре. Далее проростки переносили в 30% глицерин, приготовленный на 2% диметилсульфоксиде (DMSO), и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем проростки перекладывали в так называемый «просветляющий раствор» для подготовки к просмотру препаратов под микроскопом Imager D1 с использованием оптики Номарского (Carl Zeiss, Германия).

Просветляющий раствор состоял из 61 г KI и 198 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в 100 мл 2% DMSO. 35 мл этого раствора смешивали с 65 мл 100% глицерина. Проростки выдерживали в просветляющем растворе не меньше 1,5 ч, после этого готовили временные препараты в 50% глицерине. Также для подготовки материала к микроскопированию, хорошо себя показала разработанная нами методика. Она очень проста и подразумевает использование вместо сложного в приготовлении просветляющего раствора, описанного выше, раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (Филин, 2015). Для просветления объекта, его, в живом или фиксированном виде, укладывали на предметное стекло, добавляли несколько капель раствора ТХУ (2 мг/мл) и накрывали покровным стеклом. Препарат был готов к микроскопированию спустя 1 минуту. Для каждой мацерации необходимо готовить свежий раствор.

Обработка данных и вычисление параметров роста клеток корня

Анализ длины корней и размера меристемы. Анализ препаратов проводили под микроскопом Imager D1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оптики Номарского. Для измерения длины главных корней использовали программу IMAGE J. Длину главного корня измеряли, начиная от покоящегося центра (ПЦ) до конца корневой шейки. Для подсчетов числа клеток в меристеме (Nm) и числа клеток в зоне растяжения (Ne) главного корня использовали программное обеспечение Carl Zeiss AxioVision. Длину закончивших рост клеток (l) измеряли на снимках в программе

AxioVision (Carl Zeiss) с помощью инструмента Length. Все измерения, для каждого корня, проводили вдоль одного продольного ряда клеток коры.

Вычисление показателей роста клеток корня. Длительность клеточного цикла (T , ч) вычисляли по формуле, разработанной В.Б. Ивановым (1974, 2011):

$$T = (\ln 2 \times N_m \times l) / V, \quad (1)$$

где N_m – число меристематических клеток в одном ряду, l – длина клеток, закончивших рост (мкм), V – скорость роста корня (мкм/ч).

Время жизни клеток в меристеме ($T_{ж}$, ч) (Иванов, 1974; Ivanov, Dubrovsky, 1997) вычисляли следующим образом:

$$T_{ж} = pT, \quad (2)$$

где T – длительность клеточного цикла (ч), p – число циклов деления клетки с момента отделения от первой клетки на границе покоящегося центра до выхода из меристемы. Величину p можно вычислить по формуле (Иванов, 1974; Ivanov, Dubrovsky, 1997):

$$p = \ln(Nm - 1) / \ln 2, \quad (3)$$

где Nm – число клеток в меристеме.

Число клеток, закончивших рост (N), рассчитывали по формуле (Иванов, 1974, Ivanov; Dubrovsky, 1997):

$$N = \Delta L / l, \quad (4)$$

где ΔL – прирост корня (мкм), l – длина закончивших рост клеток (мкм).

Скорость образования клеток (V_m), вычисляли по формуле:

$$V_{m(1-2)} = N_{(1-2)} + (Nm_2 - Nm_1) + (Ne_2 - Ne_1), \quad (5)$$

где $N_{(1-2)}$ – число клеток в одном ряду, закончивших рост между первыми и вторыми сутками; N_{m1} , N_{m2} – число клеток меристемы в ряду в первые и вторые сутки; N_{e1} , N_{e2} – число клеток ряда в зоне растяжения в первые и вторые сутки.

Скорость перехода клеток к растяжению V_{me} вычисляли по формуле:

$$V_{me(1-2)} = V_{m(1-2)} - (Nm_2 - Nm_1), \quad (7)$$

где $V_{me(1-2)}$ – скорость образования клеток между измерениями (кл./ч); N_{m1} , N_{m2} – число клеток меристемы в ряду в первые и вторые сутки.

Количественные данные показателей роста корня, полученные в ходе измерений и вычислений, обрабатывали с помощью программного обеспечения MS Excel 2007 и представляли, как средние значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Влияние цитокининов на рост корня

1. Экзогенные цитокинины ингибируют пролиферацию, что приводит к замедлению перехода клеток к растяжению.

При выращивании растений на среде с *tZ* мы наблюдали уменьшение размера меристемы (рис. 1), замедление скорости роста корней (V) (табл. 1), и уменьшение Nm (рис. 2), что подтверждает данные G. Beemster, T. Baskin. (2000), R.D. Iolo et al. (2007), S. Perilli, S. Sabatini. (2010). Поскольку, в конечном итоге, именно проблема того, чем обусловлено уменьшение Nm , стала одной из основных в данной работе, мы изучили по какой причине это происходит.

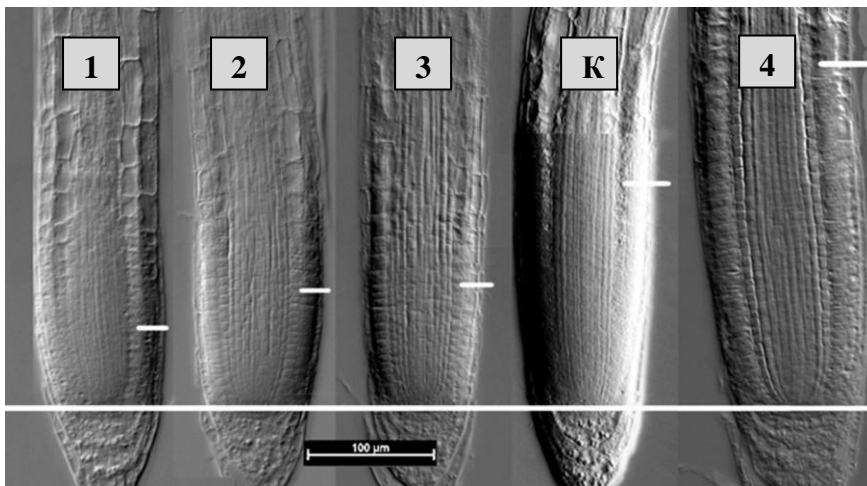


Рис. 1. Влияние *tZ* на размер меристемы.

7-е сутки эксперимента.

1 – 1 μM *tZ*;

2 – 0,1 μM *tZ*;

3 – 0,02 μM *tZ*;

4 – *ipt3ipt5ipt7*;

К – контроль.

Белыми линиями показаны границы меристемы

Согласно концепции В.Б. Иванова, V корня зависит от Vm и от Vme . Эти два процесса взаимосвязаны. При увеличении Vm , происходит увеличение Vme и наоборот (Иванов, 1974). Это означает, что уменьшение Nm может быть вызвано как замедлением пролиферации, так и ускорением перехода клеток к растяжению. Поэтому было крайне важным узнать, какая именно группа процессов затронута в данном случае.

Для того, чтобы это понять мы напрямую вычисляли показатели, связанные с пролиферацией, такие как длительность клеточного цикла (T) и Vm . Для того, чтобы понять, как действует экзогенный *tZ* на переход к растяжению, мы непосредственно вычисляли Vme . Вычислив все перечисленные показатели (табл. 1), мы показали, что экзогенные ЦК увеличивают T . Наши данные также согласуются с данными G.

Beemster, T. Baskin (2000), а также F. Federici et al. (2012). Последние, показали, что tZ при концентрации 0,1µM замедляет рост меристематических клеток корней *Arabidopsis*, что также позволяет говорить об удлинении клеточного цикла при обработке ЦК.

Второй важный момент, который мы изучили, это как экзогенные ЦК действуют на время жизни клеток в меристеме ($Tж$), поскольку этот показатель также крайне важен для правильной оценки действия ЦК на рост корня, так как уменьшение Nm может быть обусловлено уменьшением $Tж$. И от $Tж$ зависит, сколько раз клетка успеет поделиться до того, как выйдет из меристемы.

Мы показали, что tZ в используемых нами концентрациях не оказывает влияние на $Tж$ (табл. 1), что также подтверждает результаты, приведенные в работе G. Beemster, T. Baskin (2000) для концентрации 1 µM. Значит, в наших экспериментах уменьшение Nm не может быть обусловлено уменьшением $Tж$. Соответственно, если происходит увеличение T , а $Tж$ при этом не изменяется, то происходит уменьшение Vm , что означает, что за один момент времени в корнях, обработанных tZ, образуется меньшее число клеток. (Мы подробно разобрали взаимосвязь основных показателей роста корня в разделе 1.2 диссертации). Мы также показали, что при этом наблюдается замедление Vme (табл. 1). Очень важно отметить, что в наших экспериментах tZ практически не влиял на растяжение. Мы можем об этом говорить, поскольку у растений, которые росли на среде с добавлением tZ, какого-либо заметного действия на l не наблюдалось (рис. 3). Поскольку в работе G. Beemster, T. Baskin (2000), показано, что ЦК уменьшают l , не более чем на 12%, и мы наблюдали сходный эффект (максимальная разница l в наших экспериментах составляла 8-10%), то можно исключить влияние tZ на этот показатель.

Таким образом, благодаря проведению полного клеточного анализа мы можем обоснованно говорить о том, что tZ начиная с концентрации в 0,1 µM ингибирует пролиферацию, что приводит к замедлению перехода клеток к растяжению.

Таблица 1. Влияние tZ на показатели пролиферации и переход к растяжению клеток коры в главном корне.

Вариант	V, мкм/ч		V _m , кл./ч		V _{ме} , кл./ч		T, ч		T _ж , ч	
	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.
Control	85 ± 6	116 ± 19	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	16,9 ± 1,1	14,8 ± 1,8	58,3 ± 5,3	53,3 ± 6,4
Ipt3ipt5ipt7	315 ± 40	426 ± 26	3,6 ± 0,4	4,6 ± 0,6	3,6 ± 0,3	4,4 ± 0,6	10,2 ± 0,6	7,4 ± 1,1	33,6 ± 3,8	33,2 ± 5,9
0,02 μM Zt	71 ± 12	74 ± 9	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	17,3 ± 2	17,8 ± 2,2	54,1 ± 6,8	58,3 ± 7,6
0,1 μM Zt	41 ± 3	41 ± 3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	19,9 ± 1,7	20,5 ± 1,8	50,6 ± 5,5	53,1 ± 5,7
1 μM Zt	29 ± 4	28 ± 4	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	22,8 ± 0,5	22,9 ± 0,6	51,5 ± 1,5	52,5 ± 1,76

Примечание. T, T_ж, V_m и V_{ме} вычислены, как описано в ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для каждого варианта эксперимента приведены средние значения и стандартные отклонения (±). Для всех вариантов представлены данные, полученные при измерении 50 корней.

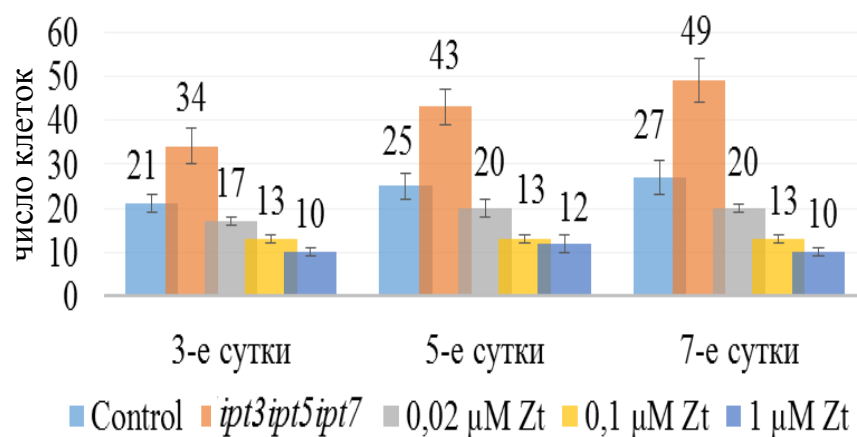


Рис. 2. Влияние tZ на число клеток в меристеме (Nm).

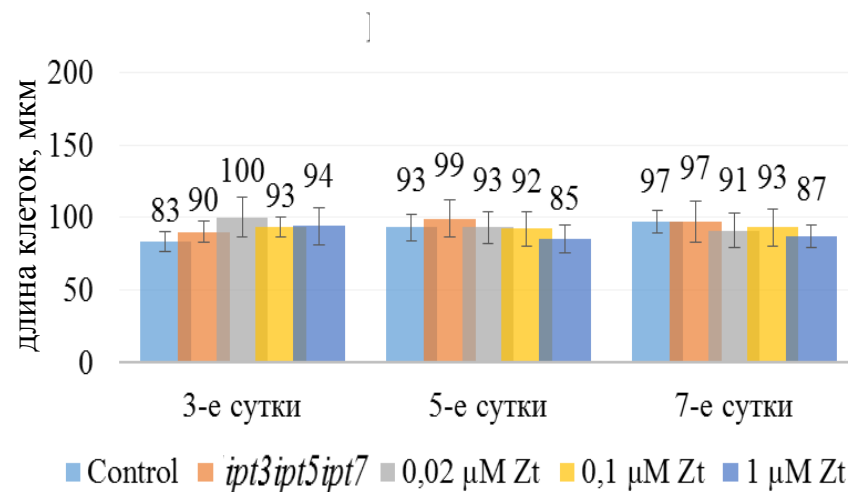


Рис.3. Влияние tZ на длину закончивших рост клеток (l).

2. Уменьшение эндогенной концентрации ЦК или ослабление рецепции ЦК приводит к ускорению перехода клеток к растяжению.

Мы изучили, как влияет на показатели роста корня замедление синтеза ЦК. Для этого мы использовали тройной мутант *ipt3ipt5ipt7*, концентрация эндогенного tZ у которого составляет примерно 0,05 нМ, (у дикого типа 0,4нМ), а также снижена концентрация iP и их рибозидов (Miyawaki et al., 2006). Также мы использовали мутантов с ослаблением рецепции ЦК *cre1-12ahk3-3* и *cre1-2ahk3-7*, что позволило рассмотреть, как изменяются показатели роста, в случае нарушения одного из звеньев сигналинга ЦК, не затрагивая при этом скорость их синтеза или распада.

Уменьшение концентрации эндогенных ЦК в корне у тройного мутанта *ipt3ipt5ipt7* приводит к увеличению V корня (табл. 1), увеличению размера меристемы (рис.1), которое происходит из-за увеличения Nm (рис. 2), что сопоставимо с результатами, в работах (Iolo et al., 2007; Takahashi et al., 2013; Kinoshita et al., 2015). Нами было показано, что и у мутантов с нарушением рецепции ЦК *cre1-12ahk3-3* и *cre1-2ahk3-7* наблюдается увеличение V (табл. 3) и размера меристемы (рис. 4).

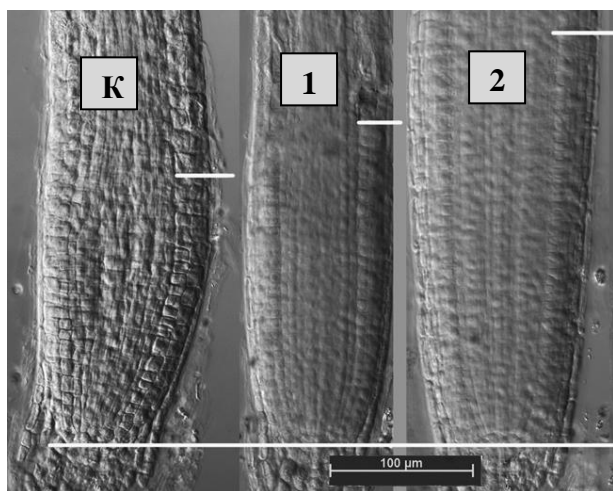


Рис. 4. Влияние нарушения рецепции ЦК на размер меристемы. 5-е сутки эксперимента.

К – контроль; 1 – *cre1-2ahk3-7*;

2 – *cre1-12ahk3-3*.

Белыми линиями показаны границы меристемы

Увеличение размера меристемы также связано с увеличением Nm (рис. 5). В работах, касающихся мутантов с уменьшенной концентрацией ЦК, ослаблением рецепции или сигналинга ЦК, а также с ускоренным их разрушением, никто не рассчитывал показатели пролиферации, а значит до наших экспериментов не было никакой информации о T , p и Vm . Мы показали, что у мутанта с уменьшенной скоростью синтеза ЦК *ipt3ipt5ipt7* и у мутантов с ослабленной рецепцией ЦК *cre1-2ahk3-7*, *cre1-12ahk3-3* происходит уменьшение T по сравнению с корнями растений дикого типа (табл. 1, 2). Это приводит к тому, что у этих мутантов Vm выше, чем в контроле (табл. 1, 2), что в

свою очередь затрагивает и V_{me} . Так как мы знаем, что у корней цитокининовых мутантов *ipt3ipt5ipt7*, *cre1-2ahk3-7* и *cre1-12ahk3-3* V_m выше по сравнению с корнями растений дикого типа, то увеличение V корня у них может происходить только в том случае, если за единицу времени к растяжению переходит большее число клеток. Это подтверждает наши данные как по расчетам V_m и V_{me} , так и после измерения l у этих мутантов. Тот факт, что при ускорении роста корня не меняется l (рис. 5, 6), свидетельствует об увеличении V_m у мутантов по отношению к контролю (табл. 1, 2). Следовательно, то, что l не изменяется так же, как и в случае с tZ, позволяет нам исключить какое-либо существенное влияние процесса растяжения на V корня, что позволяет нам утверждать, что у изученных нами мутантов увеличение V происходит исключительно за счет увеличения V_m и V_{me} .

Tж у мутантов *ipt3ipt5ipt7* и *cre1-12ahk3-3* было меньшим по сравнению с другими вариантами опытов и контролем (табл. 1, 2), что также является одним из фактов в пользу того, что у этих мутантов наблюдается ускорение перехода клеток к растяжению. Уменьшение *Tж*, которое мы наблюдали у *ipt3ipt5ipt7* и *cre1-12ahk3-3*, по всей видимости, связано с тем, что у них увеличена V_m , поскольку клетки быстрее делятся, а значит и быстрее проходят меристему (Иванов, 1974).

Таким образом, все перечисленные факты позволяют утверждать, что уменьшение концентрации или рецепции ЦК в корнях вызывает увеличение скорости пролиферации, что приводит к ускорению перехода клеток к растяжению. В литературе имеется множество данных (Werner et al., 2003; Miyawaki et al., 2006; Perilli, Sabatini, 2010; Ioio et al., 2007; Takahashi et al., 2013; Kinoshita et al., 2015; и др.), к которым теперь присоединяются и наши данные о том, что ослабление сигналинга или уменьшение эндогенной концентрации ЦК до определенного уровня приводит к стимуляции роста корня, а добавление ЦК вызывает наоборот ингибирование его роста. Наши данные подтверждают заключение, сделанное исследователями группы J. Kieber (Ferreira, Kieber, 2005) о том, что концентрация ЦК в меристеме супраоптимальна. И мы можем добавить к этому, что она супраоптимальна по отношению к процессу пролиферации.

Таблица 2. Влияние нарушения сигналинга ЦК, перераспределения ауксинов и нарушения ответа на ауксиновый сигнал на показатели пролиферации и переход к растяжению клеток коры в главном корне.

Вариант	V , мкм/ч		V_m , кЛ./ч		V_{me} , кЛ./ч		T , ч		$T_{ж}$, ч	
	3-4 сут.	4-5 сут.	3-4 сут.	4-5 сут.	3-4 сут.	4-5 сут.	3-4 сут.	4-5 сут.	3-4 сут.	4-5 сут.
Контроль	102 ± 10	102 ± 9	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	16,7 ± 1,3	17,3 ± 1,1	58,1 ± 4,5	59,2 ± 4,3
<i>cre1-2ahk3-7</i>	147 ± 12	182 ± 25	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1	16,2 ± 1,3	15,6 ± 2,2	59,9 ± 6	59,6 ± 8,4
<i>cre1-12ahk3-3</i>	246 ± 36	222 ± 22	3,8 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,9 ± 0,5	3,2 ± 0,3	11,1 ± 1,9	14 ± 1	42,9 ± 8,1	55 ± 5
<i>shy2-31</i>	174 ± 15	180 ± 20	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,3	17 ± 1,2	16,9 ± 1,4	65,5 ± 5,8	66,1 ± 6
<i>pin2</i>	120 ± 11	122 ± 14	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	31,6 ± 0,2	17,1 ± 1,1	18,1 ± 1	56,7 ± 3,9	60,3 ± 3,6
<i>pin4</i>	161 ± 12	163 ± 13	2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	21,5 ± 1,3	20,9 ± 1,1	85,1 ± 5,6	84,8 ± 5,5

Примечание. T , $T_{ж}$, V_m и V_{me} вычислены, как описано в ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для каждого варианта эксперимента приведены средние значения и стандартные отклонения (\pm). Для всех вариантов представлены данные, полученные при измерении 30 корней

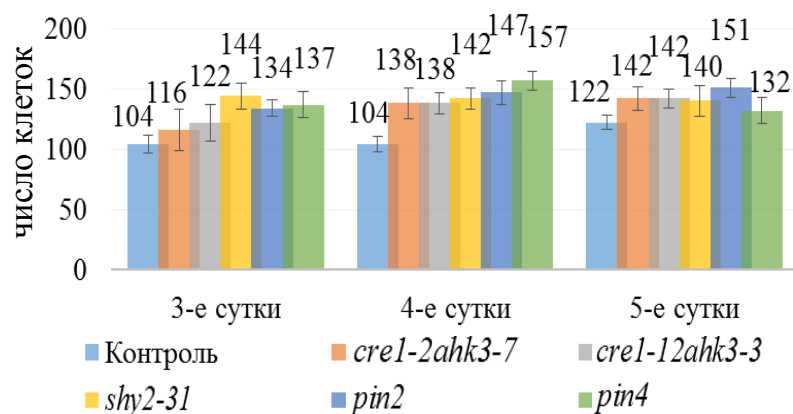


Рис. 5. Изменение N_m у мутантов.

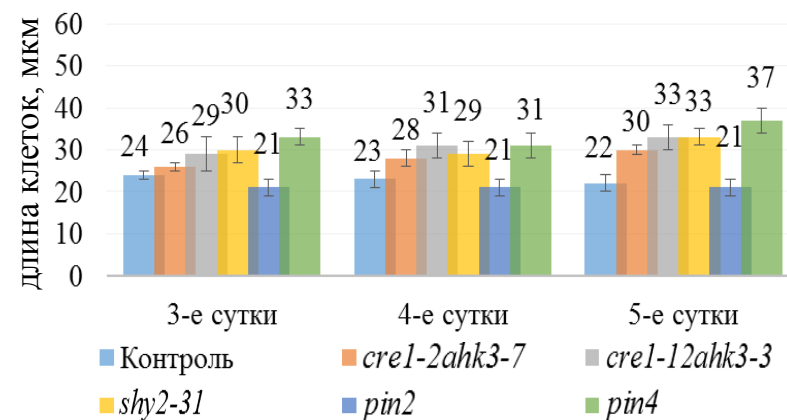


Рис. 6. Изменение l у мутантов.

Однако, приведенные нами выводы о действии ЦК на пролиферацию и переход к растяжению категорически противоречат выводам, которые в настоящее время являются признанными в иностранной литературе.

В работе T. Werner et al. (2003), где изучали особенности роста трансгенного растения *A.thaliana* с оверэкспрессией генов оксидазы ЦК, о влиянии уменьшения концентрации ЦК на пролиферацию судили по плотности делящихся клеток (The density of dividing cells). По всей видимости, под этим показателем имелась ввиду доля клеток, находящихся в G2 и M фазах клеточного цикла, (о том, как они определяли клетки в G2 и M, подробно разобрано в разделе 1.4.3 диссертации). Поскольку «плотность делящихся клеток» у этого мутанта не менялась по сравнению с контрольными растениями, был сделан вывод, что ЦК не влияют на Vm , а поскольку у этого мутанта, как и в случае с исследованными нами, было увеличено Nm , был сделан еще один вывод, о том, что ЦК вовлечены в регуляцию выхода клеток из меристемы. Однако по данным в Таб. II из статьи G. Beemster, T. Baskin, (2000) следует, что ЦК действуют именно на T и Vm , что, напомним, согласуется с нашими данными (табл. 1) и противоречит выводу, сделанному в работе T. Werner et al. (2003), а также последующим работам с подобными заключениями.

Позже подобная гипотеза действия ЦК на рост корня появляется в работах других авторов. Так, в работе R. Ioio et al. (2007) был использован аналогичный способ для оценки пролиферации на других объектах. В этой статье использовался мутант *ipt3ipt5ipt7*, у которого также была увеличена Vm и Nm . Показатель пролиферации, который авторы называют «скорость деления клеток» (Cell-Division Rate), на самом деле является тем же, что и «плотность делящихся клеток» в работе T. Werner et al. (2003). Согласно их данным, «скорость деления клеток» у мутанта и контрольных растений не отличается, из чего делается вывод аналогичный тому, что был приведен в работе T. Werner et al. (2003). (В диссертации в разделе 1.1.3 и 1.4.3 мы подробно описали, почему с помощью этого метода нельзя оценить Vm и T). При изучении всех работ, где делается подобный вывод, а именно что ЦК не влияет на пролиферацию, а регулирует переход клеток к дифференциации (растяжению) в

переходной зоне, становится не понятным, на основании чего он сделан. Для полной оценки действия ЦК на пролиферацию и переход клеток к растяжению, необходимо определить, как ЦК действует на показатели пролиферации (T , Vm) и непосредственно на саму Vme , а также узнать, как влияет ЦК на растяжение, путем измерения l . Всего этого не было сделано ни в одной работе, в которой приводится данный вывод. Мы считаем, что говорить о том, что ЦК влияют на скорость перехода клеток к растяжению, не проводя подробный клеточный анализ роста и не приводя даже данных по изменению Vme , нелогично и некорректно.

Поэтому в нашей работе мы обосновываем сделанный нами вывод данными по влиянию ЦК на показатели пролиферации, растяжение и на скорость перехода к растяжению. Мы наглядно показываем, что добавление ЦК вызывает ингибирование пролиферации и замедление скорости перехода клеток к растяжению, а уменьшение эндогенных ЦК или ослабление их рецепции, наоборот, к усилению пролиферации и увеличению скорости перехода к растяжению и потому, считаем нашу точку зрения на действие ЦК на корень достаточно обоснованной.

II. Влияние ауксинов на рост корня

1. Экзогенная обработка 2,4-D приводит к изменению основных показателей роста корня: пролиферации, перехода к растяжению и сам процесс растяжения.

Экзогенная обработка 2,4-D во всех опробованных нами концентрациях приводила к уменьшению V корня (табл. 3), и сокращению размера меристемы (рис. 7), что подтверждает ранее проведенные эксперименты как с использованием 2,4-D (Stenlid, 1982; Veemster, Baskin 2000), так и для IAA, которых на настоящий момент было проведено достаточно много (Manos, 1961; Van't Hof, 1968; Burström 1950, 1951a, 1951b; Hejnowicz 1968; Vaneeste, Friml et al., 2003; Rahman et al., 2007; Swarup et al., 2007; Stepanowa et al., 2007 и др.). В ранних работах, посвященных действию ауксинов на рост корня, их часто сравнивали с ЦК из-за похожего ингибирующего действия (Manos, 1961; Van't Hof, 1968), поскольку было показано, что ЦК и ауксины в корне ингибируют деление клеток.

Мы также наблюдали отчетливое ингибирование пролиферации, которое проявлялось в замедлении T , что в результате приводило к снижению Vm (табл. 3). В результате Nm у корней, растущих на среде с добавлением 2,4-D, было меньшим, чем в контроле (рис.8). Это подтверждает результаты, полученные в работе G. Beemster, T. Baskin (2000), для концентрации 2,4-D равной 60 нМ и A. Rahman et al. (2007) для 30нМ, в которых показано аналогичное действие 2,4-D на Vm , а также согласуется с результатами по действию IAA в работе Van't Hof (1968), в которой показано, что IAA в микромолярной концентрации замедляет разные фазы клеточного цикла.

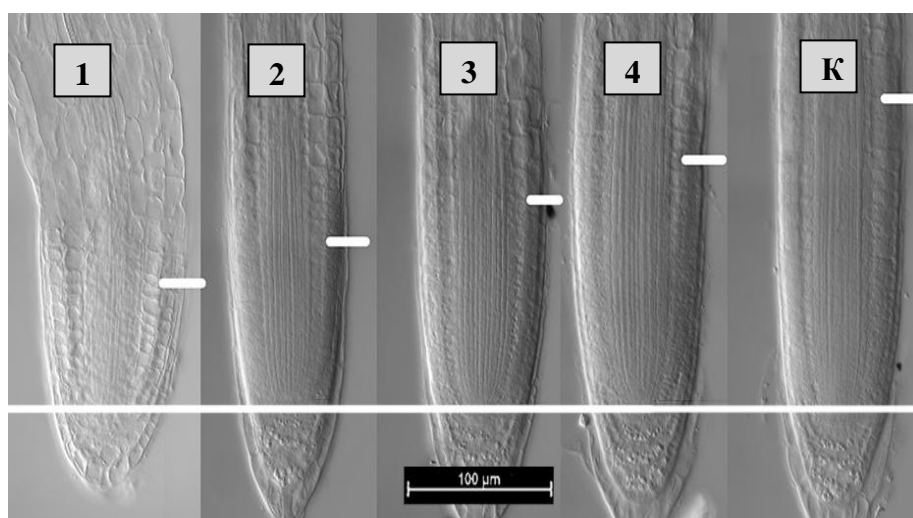


Рис. 7. Влияние 2,4-D на размер меристемы. 7-е сутки эксперимента. К – контроль; 1 – 60нМ 2,4-D; 2 – 30нМ 2,4-D; 3 – 15нМ 2,4-D; 4 – 1,5нМ 2,4-D. Белыми линиями показаны границы меристемы.

Однако, в работе A. Rahman et al. (2007) говорится об отсутствии влияния IAA и 1-NAA на пролиферацию, что может быть вызвано меньшей концентрацией действующего вещества, поскольку в этой работе использовались наномолярные концентрации. Стоит отметить, что 2,4-D это, прежде всего, искусственный аналог ауксинов. И хотя его используют для индукции каллусогенеза, не стоит забывать, что он является весьма распространенным гербицидом. Поэтому вопрос о том, действуют ли природные ауксины аналогично 2,4-D, остается открытым.

Помимо того, что 2,4-D ингибирует пролиферацию, она также, начиная с концентрации 15 нМ, вызвала увеличение $Tж$ по сравнению с корнями, которые росли в среде без ФГ (табл. 3), что также отмечалось для концентрации 60 нМ 2,4-D в работе (Beemster, Baskin, 2000). Это является весьма важно, поскольку этот показатель весьма устойчив, и 2,4-D оказывает на него существенное влияние. К

сожалению, работ, в которых приводились бы данные по $T_{ж}$ при обработке корней другими ауксинами нет, поэтому, как и в случае с влиянием на пролиферацию, утверждать наверняка, что все ауксины вызывают подобный эффект, нельзя.

Уменьшение $T_{ж}$, наблюдаемое нами при воздействии 2,4-D, а также увеличение T , с одной стороны, может быть связано с ингибирующим действием такой концентрации ауксинов на растяжение клетки (Beemster, Baskin, 2000; Burström, 1969). Поскольку клетки не делятся ровно пополам, то для последующего деления им нужно снова вырасти до определенного размера (Иванов, 1974). Следовательно, ингибирующее действие на рост клеток, которое вызывается избытком ауксинов, может вызывать увеличение времени прохождения цикла, что в итоге приводит и к их задержке в меристеме. Однако это только предположение, и необходимо проводить дополнительные эксперименты, для того чтобы понять механизм действия ауксинов на этот процесс. Также, при увеличении T , задержка клеток в меристеме предохраняет ее от полного исчерпания. Увеличение $T_{ж}$, наряду с подавлением V_m , в свою очередь, влечет за собой и замедление V_{me} (табл. 3), что согласуется с результатами, опубликованными в работе (Rahman et al., 2007), и как следствие, за одно и то же время в корне растения, обработанного 2,4-D, меньшее число клеток переходит к растяжению. Это может являться защитным механизмом, препятствующим исчерпанию меристемы.

Наши результаты показывают, что 2,4-D вызывает сокращение l , (рис. 9), что согласуется с работами Н. Burström. (1957, 1969); G. Beemster, T. Baskin. (2000); A. Rahman et al. (2012). Возможно, это связано с тем, что избыток ауксинов вызывает усиление синтеза этилена. Так, например, показано, что IAA и этилен являются синергистами в процессе подавления растяжения клеток в корне (Swarup et al., 2007; Stepanona, 2007; Muday et al., 2012; Van de Poel et al., 2015). Не известно вызывает ли 2,4-D подобный эффект, однако судя по результатам А. Rahman et al. (2012), возможно, что нет, и это является интересной проблемой для последующих исследований.

Таблица 3. Влияние 2,4-D на показатели пролиферации и переход клеток к растяжению клеток коры в главном корне.

Вариант	V , мкм/ч		V_m , кл./ч		V_{me} , кл./ч		T , ч		$T_{ж}$, ч	
	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.	3-5 сут.	5-7 сут.
Контроль	106 ± 22	140 ± 45	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	16,7 ± 3,5	17,2 ± 1,1	57,2 ± 2,0	61,5 ± 3,4
1,5 нМ	92 ± 27	119 ± 31	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	17,7 ± 5,3	18,2 ± 1,5	59,2 ± 4,0	64,8 ± 5,2
15 нМ	42 ± 8	35 ± 9	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	21,0 ± 5,1	23,3 ± 6,0	67,4 ± 1,6	80,3 ± 2,2
30 нМ	20 ± 4	21 ± 5	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	22,8 ± 6,0	23,4 ± 8,1	73,3 ± 3,2	78,8 ± 4,0
60 нМ	13 ± 2	16 ± 4	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	22,0 ± 3,8	22,0 ± 7,0	68,0 ± 2,1	74,0 ± 4,1

Примечание. T , $T_{ж}$, V_m и V_{me} вычислены, как описано в ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Для варианта 1,5 нМ приведены данные, полученные при измерении 30 корней, для всех остальных – 60 корней

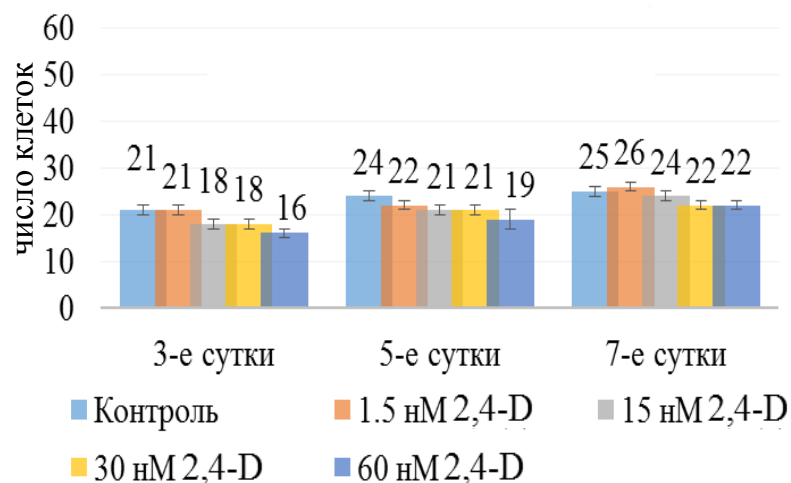


Рис. 8. Влияние 2,4-D на N_m .

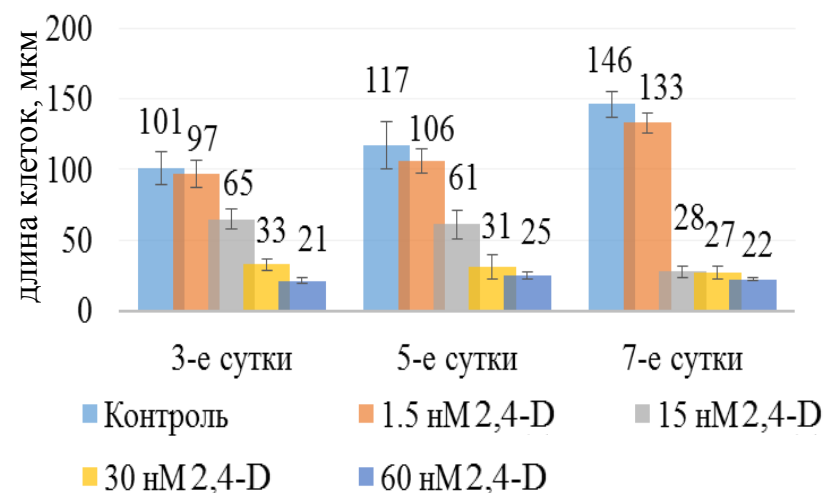


Рис. 9. Влияние 2,4-D на l .

Таким образом, мы показали, что 2,4-D влияет сразу на все показатели, из которых складывается рост корня, и именно этим обусловлено столь сильное ингибирование *V* корня. Нам не удалось установить избирательное действие 2,4-D на какой-либо один ростовой процесс.

Возможно, причина в достаточно высоких концентрациях 2,4-D, которые были использованы, или в специфике данного соединения. Безусловно, стоит продолжить изучение влияния ауксинов на показатели роста корня, используя другие ауксины как природные, так и их искусственные аналоги, чтобы понять, отличается ли влияние природных и искусственных ауксинов на пролиферацию, переход к растяжению и сам процесс растяжения.

1. Нарушение нормального распределения ауксинов в корне приводит к изменениям процессов роста корня.

На сегодняшний момент существует относительно большое количество работ, в которых изучается влияние мутаций, нарушающих перераспределение ауксинов, на рост и морфогенез корней. Однако большая их часть посвящена определению локализации транскрипции *PIN* генов в корне (Blilou et al., 2005; Friml et al., 2000, 2002, 2002a). Лишь в некоторых работах изучается изменение фенотипа корней этих мутантов (Vieten et al., 2005). Наша работа является первой попыткой разобраться в том, как изменение перераспределения ауксинов влияет на пролиферацию, переход к растяжению и на сам процесс растяжения. Наши результаты показывают, что у мутанта *pin2* наблюдается увеличение *V* корня (табл. 2), что согласуется с данными работы A. Vieten et al. (2005). К сожалению, каких-либо еще данных по данному мутанту, также, как и данных по другим *pin* мутантам нам не удалось обнаружить. У изученного нами мутанта *pin4* *V* корней была выше по сравнению с диким типом (табл. 2). Однако в отличие от *pin2*, у этого мутанта увеличен размер меристемы (рис. 10). В литературе отмечается, что именно *PIN4* ответственны за создания максимума ауксинов в районе ПЦ (Blilou et al., 2005). Еще одним интересным мутантом, которому посвящено несколько работ, является мутант *shy2-31* по генам *SHY2*, которым сейчас отдают роль «переключателя» между пролиферацией и переходом

клеток к растяжению (Moubayidin et al., 2010), и поэтому было крайне важно понять, какие процессы роста затронуты у этого мутанта. Наши результаты показали, что у мутанта *shy2-31* V корня выше, чем у растений дикого типа (табл. 2), и у него также увеличена меристема (рис. 10). Подсчет Nm показал, что у *shy2-31* и *pin4* это связано с увеличением Nm (табл. 2). L. Moubayidin et al. (2010) также наблюдали увеличение Nm у *shy2-31*.

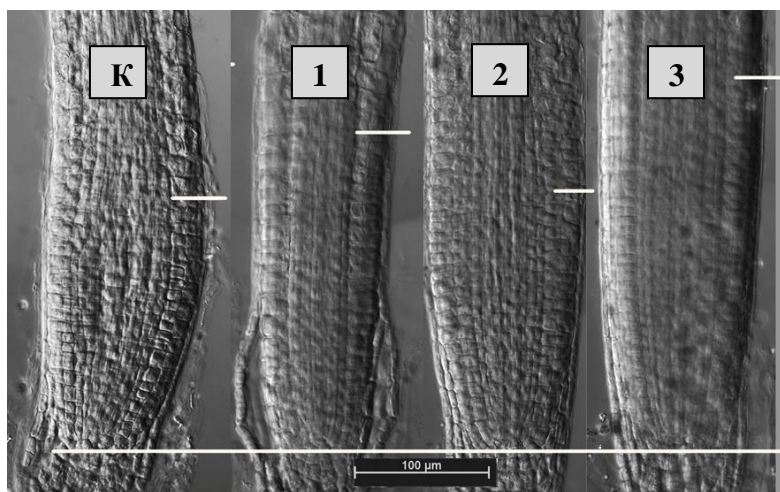


Рис. 10. Влияние нарушения перераспределения ауксинов на размер меристемы.

5-е сутки эксперимента.

К – контроль;

1 – *shy2-31*; 2 – *pin2*; 3 – *pin4*.

Белыми линиями показаны границы меристемы.

Из наших данных (табл. 2)

видно, что у мутанта *shy2-31* увеличение Nm связано с тем, что клетки проводят в меристеме больше времени, а поскольку изменения T по отношению к контролю не существенны, то это приводит к тому, что клетки успевают поделиться большее число раз до того, как покинут меристему. В результате чего за единицу времени в меристеме образуется большее число клеток. И вследствие этого за единицу времени больше клеток переходит к растяжению, что наряду с тем, что клетки растягиваются до больших величин, приводит к видимому ускорению роста корня. У мутанта *pin4* мы также наблюдали увеличение $Tж$, однако вместе с этим у него значительно увеличивалась T . По этой причине, хоть клетки и находились дольше в меристеме, но в связи с увеличенной T , они успевали поделиться меньшее число раз. Поэтому у этого мутанта Vm и Vme слабо отличались в большую сторону по сравнению с контролем (табл. 2). Но все же этой разницы было достаточно, чтобы V корня была выше, чем контроле. Увеличению V корня также способствовало то, что клетки достигали большей длины в процессе роста растяжением (рис. 6). По всей видимости, изменение перераспределения ауксинов в районе ПЦ приводит к задержке клеток в

меристематическом состоянии, что и приводит к увеличению Lm . Интересным представляется то, почему у всех трех мутантов, с измененным перераспределением ауксинов, в том числе и *shy2-31*, у которого, в конечном счете, также изменяется перераспределение ауксинов, наблюдалось увеличение l . В литературе было показано, что ауксины в корнях находятся либо в субоптимальных концентрациях, либо сверхоптимальных (McBride, Evans, 1977; Meuwly, Pilet, 1987). В любом случае, увеличение концентрации ауксинов в районе зоны растяжения, по-видимому, должно наоборот ингибировать растяжение, но этого не наблюдается у данных мутантов, и представляется интересным выяснить, почему это происходит.

Таким образом, мы показали, что у мутантов *pin4* и *shy2-31* увеличение V корня обусловлено не усилением пролиферации, а задержкой клеток в меристеме, в результате чего несколько увеличивается Vm и Vme , а также усилением растяжения клеток в зоне растяжения. Для *pin2* мы показали, что незначительная стимуляция V корня связана с тем, что клетки растягиваются сильнее, что приводит к увеличению длины корня. Безусловно, представляется интересным дальнейшее изучение целого ряда *pin* мутантов, а также комбинаций мутантов, использующихся в различных приведенных здесь работах (например, Ioio et al., 2007; Moubayidin et al., 2008; 2010, 2012 и др.). Однако это требует отдельного внимания и отдельной работы, которую, несомненно, интересно было бы провести.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что ЦК и ауксины играют ключевую роль в регуляции роста и морфогенеза растений. Однако, несмотря на то, что проблеме того, как они регулируют эти процессы, посвящено огромное количество работ, оказывается, что до сих пор относительно мало изучено, как действуют эти ФГ на отдельные процессы, из которых складывается пролиферация и рост клеток.

В нашей работе впервые изучается влияние ряда мутаций, а также ЦК и аналога ауксинов 2,4-D в ряде концентраций на процессы пролиферации и перехода клеток к растяжению. Мы поставили перед собой цель понять, на какие именно показатели

роста корня влияет ЦК и ауксины: на пролиферацию, переход к растяжению или само растяжение.

В результате, после проведения всех задуманных экспериментов, подсчетов и обработок результатов, мы можем говорить о том, что избыток ЦК ингибирует рост корня путем замедления скорости пролиферации клеток меристемы корня. Помимо замедления пролиферации, происходит также замедление перехода клеток к растяжению. В случае, если концентрация эндогенных ЦК уменьшена, либо ослаблена их рецепция, наблюдается стимуляция пролиферации, вследствие чего увеличивается скорость перехода клеток к растяжению. Все это приводит к тому, что корень растет быстрее.

Очень интересными являются данные о том, что у мутанта *ipt3ipt5ipt7* наблюдается уменьшение *Tж*. Поскольку повлиять на этот показатель очень сложно, то представляется крайне важным понять, почему это происходит, однако это тема для отдельного исследования. Крайне важным результатом нашей работы является возможность показать, что ЦК ингибируют пролиферацию и ингибируют переход клеток к растяжению, а не стимулируют их, что позволит в будущем прояснить возникшие противоречия в вопросе действия ЦК на эти процессы.

Мы также показали, что 2,4-D крайне сильно влияет на скорость роста корня, поскольку влияет на все основные процессы роста корня. Впервые было показано, что нарушение перераспределения ауксинов у мутанта *pin4*, а также нарушение ответа на ауксиновый сигнал у *shy2-31* вызывают задержку клеток в меристеме, в результате чего несколько увеличивается *Vm* и *Vme*, а также усиление растяжения клеток в зоне растяжения, в результате чего увеличивается *V* корня. Наши результаты могут стать отправной точкой для последующих исследований влияния изменения перераспределения ауксинов в корне, поскольку, не смотря на то, что в последнее время этому вопросу уделяется большое внимание, не существует работ, в которых поднимался бы вопрос о том, как это влияет на показатели, связанные с пролиферацией и переходом к растяжению.

ВЫВОДЫ

1. Экзогенный *транс*-зеатин вызывает замедление скорости роста корня.
2. Замедление скорости роста корня при воздействии *транс*-зеатина происходит из-за ингибирования пролиферации и перехода клеток к растяжению. Влияния на длину закончивших рост клеток и время жизни клеток в меристеме данное соединение не оказывает.
3. У мутантов с уменьшенной концентрацией цитокининов *ipt3ipt5ipt7* или ослаблением рецепции цитокининов *cre1-2ahk3-7* и *cre1-12ahk3-3* увеличена скорость роста корня.
4. Увеличение скорости роста корня у мутантов *ipt3ipt5ipt7*, *cre1-2ahk3-7* и *cre1-12ahk3-3* происходит вследствие стимуляции пролиферации и перехода клеток к растяжению.
5. У мутанта *ipt3ipt5ipt7* снижение эндогенной концентрации цитокининов вызывает уменьшение времени жизни клеток в меристеме, вследствие чего у него наблюдается ускорение выхода клеток из меристемы.
6. 2,4-D, начиная с концентрации 1,5 нМ, вызывает замедление скорости роста корня.
7. Эффект замедления роста корня, вызванный 2,4-D, связан с его воздействием на основные показатели роста: пролиферацию, переход к растяжению и сам процесс растяжения.
8. У мутантов *pin2*, *pin4* и *shy2-31* увеличена скорость роста корня.
9. Увеличение скорости роста корня у мутантов *pin4* и *shy2-31* связано с задержкой клеток в меристеме, в результате чего несколько увеличивается скорость образования и скорость перехода клеток к растяжению, а также с усилением растяжения клеток. У мутанта *pin2* стимуляция скорости роста корня связана только с усилением процесса растяжения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ

1. **Филин А.Н.** (2015) Анализ роста мутанта *Arabidopsis thaliana* по генам, контролирующим скорость синтеза цитокининов. *Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки»*, №2, 14-17.
2. **Филин А.Н.** (2015) Клеточный анализ роста корней некоторых мутантов *Arabidopsis thaliana*. *Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки»*, №4, 37-45.
3. **Филин А.Н.**, Иванов В.Б. (2016) Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana*. *Физиология растений*, 63, 174-179.

Публикации в сборниках и материалах конференций

1. **Филин А.Н.** (2015) Влияние цитокининов на рост корня на клеточном уровне. Тезисы докладов XXII международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015», Москва, с.357-357
2. **Филин А.Н.**, Иванов В.Б. (2014) Влияние цитокининов на рост корня на клеточном уровне. В сборнике статей: Труды IX Международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых (к 100-летию со дня рождения И.Г. Серебрякова), Москва, 2, с. 444-446.
3. **Филин А.Н.**, Иванов В.Б. (2014). Методика анализа клеточных механизмов изменения скорости роста корней трансгенных растений на примере анализа роста мутанта *Arabidopsis thaliana* по генам, контролирующим скорость синтеза цитокининов. В сборнике статей: Материалы докладов V всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, с.204-207.
4. Иванов В.Б., Жуковская Н.В., Быстрова Е.И., **Филин А.Н.** (2015) Митотический цикл в клетках корней. В сборнике статей: Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений: сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, с. 279-282

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФГ — фитогормоны;

tZ — *транс*-зеатин;

2,4-D — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота;

ЦК — цитокинины;

ПЦ — покоящийся центр;

T — длительность клеточного цикла;

$Tж$ — время жизни клеток в меристеме;

Nm — число клеток в меристеме;

Ne — число клеток в зоне растяжения;

l — длина закончивших рост клеток;

V — скорость роста корня;

Vm — скорость образования клеток;

Vme — скорость перехода клеток меристемы к растяжению.