ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotex-journal.ru>

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА НА РОСТ КОРНЕЙ В ДЛИНУ НЕ ОБЯЗАТЕЛЬНО ОПОСРЕДОВАНО ПОВЫШЕНИЕМ В НИХ УРОВНЯ АУКСИНА

**Коробова А.В.*, Ахтямова З.А.,
Васинская А.Н., Иванов И.И.**

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН

*E-mail: muksin@mail.ru

Работа посвящена изучению проблемы взаимодействия этилена и ауксина в регуляции роста корней. Было проведено исследование влияния предшественника этилена 1-аминоциклопропановой кислоты (АЦК) на удлинение корней и концентрацию в них ауксинов у нечувствительных к ауксину мутантных растений *tir1* по сравнению с растениями исходного экотипа Columbia (Col-0). Мутанты *tir1* отличались от Col-0 более длинными корнями и меньшим ветвлением. При этом масса и площадь корней были на уровне исходных растений. Введение в среду АЦК (до конечной концентрации 10 мкмоль/л) не приводило к изменению удлинения корней *tir1*, что соответствует данным литературы о вовлечении сигналинга ауксина в ростовой ответ корней на этилен. У Col-0 экзогенная АЦК вызывала снижение как роста корней в длину, так и концентрации в них ИУК. Поскольку ИУК в высоких концентрациях оказывает ингибирующее влияние на удлинение корней, снижение уровня этого гормона не могло быть причиной торможения роста корней в длину у Col-0 под влиянием экзогенной АЦК. Сделан вывод о том, что в некоторых случаях ростовой эффект этилена на удлинение корней может быть связан либо с прямым действием этого гормона, либо с какими-то иными регуляторами роста, например, с цитокининами.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *tir1*, АЦК, ИУК, удлинение корней

THE INHIBITORY EFFECT OF ETHYLENE ON ROOT ELONGATION IS NOT NECESSARILY MEDIATED BY AN INCREASE IN THE LEVEL OF AUXIN

**Korobova A.V.*, Akhtyamova Z.A.,
Vasinskaya A.N., Ivanov I.I.**

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa

*E-mail: muksin@mail.ru

The work is devoted to studying the problem of the interaction of ethylene and auxin in the regulation of root growth. We studied the effect of the ethylene precursor 1-aminocyclopropanoic acid (ACC) on the root elongation and the concentration of auxins in them in auxin-insensitive mutant plants *tir1* compared to wild-type Columbia ecotype (Col-0). The *tir1* mutants differed from Col-0 with longer roots and less branching. In this case, the mass and root area were at the level of the wild-type plants. The introduction of ACC into the medium (to a final concentration of 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$) did not lead to a change in the root elongation of *tir1*, which is consistent with the literature on the involvement of auxin signaling in the growth response of roots to ethylene. In Col-0, exogenous ACC caused a decrease in both root length and root IAA concentration. Since IAA in high concentrations inhibits root elongation, a decrease in the level of this hormone could not be a cause of inhibition of root growth in length at Col-0 after ACC treatment. It was concluded that in some conditions, the growth effect of ethylene on root elongation can be associated either with the direct action of this hormone, or with some other growth regulators, for example, cytokinins.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *tir1*, ACC, IAA, root elongation

Поступила в редакцию: 12.03.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-59-65

ВВЕДЕНИЕ

Проблеме взаимовлияния этилена и ауксинов в регуляции роста корней посвящено большое количество исследований. Большой популярностью пользуется гипотеза, согласно

которой ингибирующее действие этилена на удлинение корней опосредовано ауксинами. Она основывается, например, на том, что мутации генов, отвечающих за биосинтез (WEI2), транспорт (AUX1 и PIN), рецепцию (TIR1), сигналинг (AXR1) ауксинов приводили к потере чувствительности роста корней к действию предшественника этилена 1-аминоциклопропановой кислоты – АЦК [Stepanova et al., 2007; Qin et al., 2019]. В соответствии с этой точкой зрения ингибирующее действие этилена на рост корней объясняется накоплением ауксинов в корнях под влиянием этилена. Однако наряду с этим есть данные об ингибировании биосинтеза ауксинов под влиянием этилена [Ernest, Valdovinos, 1971; Pacheco-Villalobos et al., 2013] и о снижении уровня ауксинов на фоне повышенного уровня сигналинга этилена [Chilley et al., 2006].

Восприятие сигнала ауксинов, доминирующей формой которого в растениях является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), осуществляется рецептором TIR1/AFB. Недавние исследования выявили необходимость TIR1/AFB для очень быстрых ростовых ответов корней, в частности, в гравитропических реакциях [Fendrych et al., 2018]. Рост корней мутантов по рецептору ауксина *tir1* не чувствителен не только к экзогенному ауксину, но и к этилену [Stepanova et al., 2007]. Ранее нами было показано, что мутация по рецептору ауксина TIR1/AFB снижает чувствительность корней к инактивации этиленовых рецепторов [Korobova et al., 2018]. Представляло интерес продолжить исследования в этом направлении и проверить, как на эти мутантные растения и растения их исходного генотипа действует предшественник этилена АЦК. В свете противоречивости данных о влиянии этилена на уровень ауксинов в растениях, представляло также интерес оценить влияние АЦК на содержание эндогенных ауксинов в растениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) исходного экотипа Columbia (Col-0) и нечувствительные к ауксину мутанты *tir1* (Ruegger et al., 1997). Для выравнивания прорастания семена инкубировали в чашке Петри на влажной фильтровальной бумаге в холодильной камере в течение 3 суток. Затем их раскладывали по 4 шт на сосуд на поверхность песка, насыщенного раствором Хогланда-Арнона, и помещали в климатическую камеру (MLR-350H, “Sanyo”, Япония). Растения выращивали при температуре 23°/19°С (день/ночь), 80% относительной влажности воздуха, освещенности 120 мкмоль/(м² с) ФАР и 16-часовом фотопериоде, как описано в работе [Shtratnikova et al., 2015].

В возрасте 16 и 18 сут проводили обработку растений раствором предшественника этилена - 1-аминоциклопропановой кислоты (АЦК). Для этого АЦК растворяли в питательном растворе и добавляли в песок, где выращивались растения, до конечной концентрации 10 мкмоль/л [Zhang et al., 2010]. Через 2 суток после второй обработки АЦК производили фиксацию корней для определения концентрации ИУК. Еще через 2 сут измеряли длину корней.

Ауксины экстрагировали из тканей корней 80%-ным этанолом в течение 16 ч, для очистки и концентрирования проводили эфирную экстракцию, метилировали диазометаном для стабилизации структуры [Lebedev et al., 2018]. Концентрацию ауксинов определяли с помощью иммуоферментного анализа [Высоцкая и др., 2007].

Оценка площади корней была произведена с помощью программы ImageJ. Для этого корни фиксировали в реактиве Кларка (смесь 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1), а затем сканировали на черном фоне.

Статистическую обработку данных проводили с помощью MS Excel. В таблице и на рисунках представлены средние значения из *n* биологических повторностей, указаны их стандартные ошибки. Достоверные различия ($p < 0,5$, *t*-тест) обозначены звездочкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Корни нечувствительных к ауксину мутантов *tir1* были длиннее, чем у растений исходного экотипа Columbia (табл. 1). Это неудивительно, поскольку ауксины хорошо известны своей способностью тормозить удлинение главного корня [Qin et al., 2019]. Логично, что потеря чувствительности к ауксинам привела к усилению роста корней в длину.

Таблица 1. Ростовые показатели трехнедельных нечувствительных к ауксину мутантных растений арабидопсиса (*tir1*) по сравнению с растениями исходного экотипа Columbia (Col-0). * - различия между генотипами достоверны при $p < 0,5$; *t*-тест ($n = 30$).

Показатель роста	Col-0	<i>tir1</i>
Длина корня, мм	33,8 ± 2,0	41,7* ± 2,1
Количество боковых корней (сумма первичных и вторичных)	10,3 ± 0,8	7,1* ± 0,5
Сырая масса, мг	5,7 ± 0,3	6,4 ± 0,5
Площадь корней, мм ²	42,5 ± 2,7	43,2 ± 2,9

Ауксины играют ключевую роль в формировании боковых корней [Du et al., 2018]. В соответствии с этим мы зарегистрировали снижение количества боковых корней у нечувствительных к ауксину растений (табл. 1).

По накоплению сырой массы корней растения *tir1* не отличались от Columbia. В итоге формирование более длинных корней со сниженным ветвлением на фоне неизмененного накопления массы корней привело к сходным значениям площади этих органов у нечувствительных к ауксину мутантов по сравнению с Columbia.

Этилен играет важную роль в регуляции роста и развития корней [Vaseva et al., 2018]. При этом он так же, как и ауксины тормозит их удлинение. Поэтому было важно сравнить реакцию растений *tir1* и Columbia на введение в среду предшественника этилена АЦК. Мы зарегистрировали снижение роста корней в длину у растений исходного экотипа (рис. 1).

Рис. 1. Длина корней нечувствительных к ауксину мутантов (*tir1*) и растений арабидопсиса исходного экотипа *Columbia* (Col-0) после двукратной обработки предшественником этилена 1-аминоциклопропановой кислотой (АЦК+). Первая обработка проводилась в возрасте 16 сут. * - различия между вариантами достоверны при $p < 0,5$; t-тест ($n = 30$).

Экзогенная АЦК, являясь предшественником этилена, повышает уровень его продукции в растениях [Lavee, Martin, 1981], поэтому торможение удлинения корней у растений *Columbia* могло быть связано с ингибирующим действием этилена на этот процесс. Однако у нечувствительных к ауксину растений обработка АЦК не вызывала изменения в росте корней в длину, что соответствует данным литературы о вовлечении сигналинга ауксина в регуляцию ростового ответа корней на этилен [Stepanova et al., 2007]. Предполагается, что действие этилена осуществляется через стимуляцию синтеза ауксинов, которые и тормозит рост корней. Поэтому важно было оценить уровень ауксина ИУК в корнях растений обоих генотипов при введении в среду АЦК.

Мы зарегистрировали снижение концентрации ИУК в корнях растений *Columbia* в ответ на введение в среду АЦК, тогда как уровень ауксина в корнях мутантов *tir1* не снижался (рис. 2). Эти результаты противоречат сведениям о том, что этилен стимулирует синтез ИУК активируя WEI2/ASA1/TIR7 и WEI7/ASB1, катализирующих синтез триптофана (предшественника ИУК) [Stepanova et al., 2007]. Однако данные о влиянии этилена на синтез ИУК неоднозначны, и наши результаты соответствуют сведениям о том, что АЦК подавляла экспрессию YUCCA гена, контролирующего один из заключительных этапов синтеза ИУК (Pacheco-Villalobos et al., 2013)

Рис. 2. Концентрация ИУК в корнях нечувствительных к ауксину мутантов (*tir1*) и растений арабидопсиса исходного экотипа *Columbia* (Col-0) после двукратной обработки предшественником этилена 1-аминоциклопропановой кислотой (АЦК+). Первая обработка проводилась в возрасте 16 сут. * - различия между вариантами достоверны при $p < 0,5$; t-тест ($n = 9$).

ИУК, как и этилен, обладает ингибирующим действием на удлинение корней [Qin et al., 2019], поэтому мы не можем связать торможение роста корней растений *Columbia* в длину в ответ на ведение АЦК со снижением концентрации в них ауксина. Можно предполагать, что в условиях наших экспериментов был реализован иной, не связанный с изменением концентрации ауксина, механизм торможения удлинения корней. Помимо возможного прямого влияния этилена на удлинение корней, не исключено участие других регуляторов роста, поскольку хорошо известно, что этилен способен вызывать изменения в концентрации других гормонов [Vandenbussche, van der Straeten, 2007]. Вполне вероятно, что под влиянием этилена после поступления в растения *Columbia* АЦК произошло изменение концентрации цитокининов, и это могло вызвать торможение удлинения корней. Это предположение основано на сведениях о влиянии этилена на уровень цитокининов [Коробова и др., 2016].

У нечувствительного к ауксину мутанта *tir1* АЦК не вызывала падения уровня ИУК в корнях (рис. 2).

Во многих работах цитируются результаты исследований, где было показано, что этилен вызывает повышение уровня ауксинов в корнях, например, путем активации их синтеза [Stepanova et al., 2007]. Поскольку ауксин оказывает ингибирующее влияние на удлинение корней, подавление их удлинения под влиянием этилена объясняют его способностью повышать уровень ауксинов в корнях. Наши данные говорят о том, что

действие этилена не связано с накоплением ауксинов в корнях. Сходные результаты были получены британскими коллегами, зарегистрировавшими сниженный уровень ИУК как в побегах, так и корнях мутантных растений арабидопсиса по гену PLS на фоне повышенного уровня сигналинга этилена [Chilley et al., 2006]. Как уже упоминалось выше, эти результаты соответствуют сведениям от ингибирования синтеза ауксинов под влиянием этилена в результате подавления его синтеза с участием фермента, катализируемого YUCCA геном [Pacheco-Villalobos et al., 2013]. Противоположное действие этилена на уровень ауксинов в разных работах можно объяснить различными постановками экспериментов. В большинстве предшествующих работ для выращивания растений была использована среда Мурасиге-Скуга, содержащая сахарозу, которая способна влиять на содержание ауксинов в растениях и их чувствительность к этим гормонам [Mishra et al., 2009]. Мы выращивали растения в песчаной культуре с использованием среды Хогланда-Арнона, которая содержит только неорганические компоненты.

Таким образом, в растении, по-видимому, сосуществуют противоположно направленные регуляторные механизмы. Этилен способен как стимулировать накопление ауксинов, так и снижать их уровень. В первом случае торможение роста корней в длину под влиянием этилена опосредовано ауксинами. Во втором случае, этот ростовой эффект, по-видимому, связан либо с прямым действием этилена на удлинение корней, либо с какими-то иными регуляторами роста, например, цитокининами. Проявление того или иного пути зависит от условий, в которых находится растение.

Работа выполнена при частичной поддержке 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. С. 455-460.
2. Коробова А.В., Высоцкая Л.Б., Васинская А.Н., Кулуев Б.Р., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Связь накопления биомассы корней с содержанием и метаболизмом цитокининов у нечувствительных к этилену растений // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 636–643. DOI: [10.7868/S0015330316050079](https://doi.org/10.7868/S0015330316050079)
3. Chilley P.M., Casson S.A., Tarkowski P., Hawkins N., Wang K.L.-C., Hussay P.J., Beale M., Ecker J.R., Sandberg G.K., Lindsey K. The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 3058-3072. DOI: [10.1105/tpc.106.040790](https://doi.org/10.1105/tpc.106.040790)
4. Du Y., Scheres B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. : 155–167. DOI: [10.1093/jxb/erx223](https://doi.org/10.1093/jxb/erx223)
5. Ernest L.C., Valdovinos J.G. Regulation of auxin levels in *Coleus blumei* by ethylene // Plant Physiol. 1971. V. 48. P. 402-406. DOI: [10.1104/pp.48.4.402](https://doi.org/10.1104/pp.48.4.402)
6. Fendrych M., Akhmanova M., Merrin J., Glanc M., Hagihara S., Takahashi K., Uchida N., Torii K.U., Friml J. Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signaling // Nat Plants. 2018. V. 4. I. 7. P. 453-459. DOI: [10.1038/s41477-018-0190-1](https://doi.org/10.1038/s41477-018-0190-1)

7. Korobova A., Vasinskaya, Kirpichnikova A., Shishova M., Kudoyarova G. Cross-regulation of *Arabidopsis* root growth by plant hormones auxins and ethylene // Bio. Comm. 2018. V. 63. I. 4. P. 256–260. DOI: [10.21638/spbu03.2018.404](https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.404)
8. Lavee S., Martin G.C. Ethylene evolution following treatment with 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethephon in an in vitro olive shoot system in relation to leaf abscission // Plant Physiol. 1981. V. 67. P. 1204-1207. DOI: [10.1104/pp.67.6.1204](https://doi.org/10.1104/pp.67.6.1204)
9. Lebedev V.G., Shestibratov K.A., Korobova A.V., Shendel G.V., Kudoyarova G.R. Effect of glutamine synthetase gene overexpression in birch (*Betula pubescens*) plants on auxin content and rooting in vitro // Doklady biochemistry and biophysics. 2018. V. 480. P. 143-145. DOI: [10.1134/S1607672918030043](https://doi.org/10.1134/S1607672918030043)
10. Mishra B.S, Singh M., Aggrawal P., Laxmi A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development // PLoS ONE. 2009. V. 4. I. 2. e4502. DOI: [10.1371/journal.pone.0004502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502)
11. 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. I. 6. e1003564. DOI: [10.1371/journal.pgen.1003564](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003564).
12. Qin H., He L., Huang R. The coordination of ethylene and other hormones in primary root development // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. A. 874. DOI: [10.3389/fpls.2019.00874](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00874)
13. Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J. Estelle M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p // Genes & Development. 1997. V. 12. P. 198–207.
14. 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 // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 741–752. DOI: [10.7868/S0015330315060159](https://doi.org/10.7868/S0015330315060159)
15. Stepanova A.N., Yun J., Likhacheva A.V., Alonso J.M. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2169–2185. DOI: [10.1105/tpc.107.052068](https://doi.org/10.1105/tpc.107.052068)
16. Vandenbussche F., van der Straeten D. One for all and all for one: crosstalk of multiple signals controlling the plant phenotype // J. Plant Growth Regul. 2007. V. 26. P. 178–187. DOI: [10.1007/s00344-007-9001-z](https://doi.org/10.1007/s00344-007-9001-z)
17. Vaseva I.I., Qudeimat E., Potuschak T., Du Y., Genschik P., Vandenbussche F., Van Der Straeten D. The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis // Proc. Natl. Acad. Sci. 2018. V. 115. P. E4130–E4139. DOI: [10.1073/pnas.1717649115](https://doi.org/10.1073/pnas.1717649115)
18. Zhang W., Hu W., Wen C.-K. Ethylene preparation and its application to physiological experiments // Plant Sign. Behav. 2010. V. 5. I. 4. P. 453-457. Addendum to: Zhang W., Wen C.-K. Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC and ethephon // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 45-53. DOI: [10.1016/j.plaphy.2009.10.002](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.002)