

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Савельева Арина Петровна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Роль PIN-белков в формировании максимума
клеточного ответа на ауксин при инициации
боковых корней у кабачка (*Cucurbita pepo* L.)

Научный руководитель:

д.б.н. Родионов А. В.

Научный консультант:

к.б.н., зав. лаб. Демченко К. Н.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

Лаборатория клеточных и молекулярных
механизмов развития растений

Содержание

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	6
1.1 Ветвление корня, основные этапы образования бокового корня	6
1.2 Роль ауксина в инициации и развитии примордия бокового корня	9
1.3 Механизмы транспорта ауксина. Классификация транспортеров ауксина	10
1.4 Общая характеристика семейства белков PIN	14
1.5 Формирование боковых корней в меристеме родительского корня	22
Глава 2. Материалы и методы	24
2.1 Материалы	24
Растительный материал и условия выращивания растений	24
Штаммы микроорганизмов	24
Условия культивирования микроорганизмов	24
2.2 Молекулярно-генетические методы исследования	25
Филогения и биоинформатика	25
Выделение плазмидной ДНК из <i>Escherichia coli</i>	26
Выделение плазмидной ДНК из <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	26
Выделение общей ДНК из растительных тканей	27
Выделение общей РНК из растительных тканей	27
Полимеразная цепная реакция	27
ПЦР-скрининг бактериальных колоний	30
ПЦР с перекрывающимися праймерами	30
ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)	30
Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле	31
Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	31
Трансформация компетентных клеток <i>Escherichia coli</i>	32
Трансформация компетентных клеток <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	32
2.3 Создание генетических конструкций	32

2.4 Трансформация растений штаммами <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	33
Получение асептического материала	33
Агробактериальная трансформация растений.....	34
Отбор трансгенных корней для локализации PIN1 в кончике корня кабачка	35
2.5 Методы микроскопии.....	35
Пробоподготовка материала для локализации кодирующей последовательности PIN1, слитой с флуоресцентным белком mNeonGreen	35
Пробоподготовка материала для иммунолокализации белка PIN1	36
Глава 3. Результаты и обсуждение	39
3.1 Поиск и идентификация нуклеиновой последовательности ортолога гена PIN1 <i>Arabidopsis thaliana</i> у <i>Cucurbita pepo</i>	39
3.2 Создание генетических конструкций для анализа локализации белка PIN1...41	
Подбор праймеров для клонирования промоторной и кодирующей последовательности <i>PIN1</i> кабачка	41
ПЦР с праймерами к промоторной последовательности <i>PIN1</i> кабачка	41
Проверка ориентации вставки последовательности промотора <i>CpPIN1</i> в вектор 369_pENTRattL4attR1_BSAI.....	42
ПЦР с кДНК и праймерами к кодирующей последовательности PIN1 кабачка	42
ПЦР с перекрывающимися праймерами, плазмидной ДНК и праймерами к кодирующей последовательности и флуоресцентному белку Neon Green.	43
Проверка наличия вставки кодирующей последовательности.....	44
Сборка конечного вектора.....	45
3.3 Локализация белка PIN1 в кончике корня кабачка в связи с анализом его роли в регуляции инициации и развития примордиев.....	46
Заключение.....	50
Выводы	51
Список литературы.....	52

Введение

Изучение корней и корневых систем необходимо для понимания правильного развития растений. Актуальность проблемы определяется, во-первых, тем, что корневая система составляет значительную часть растительного организма и позволяет растению закрепляться в почве. Во-вторых, корневая система играет главную роль в водном и минеральном питании растения, и, наконец, активно участвует в симбиозе с множеством почвенных микроорганизмов.

Способность корней к ветвлению является одной из наиболее важных функций системы, так как растения, в отличие от животных организмов, не могут активно перемещаться. Необходимость компенсации неравномерного распределения питательных веществ в среде приводит к регулярному образованию боковых корней, что позволяет растению постоянно получать новые элементы для питания.

Интерес научного сообщества к данной теме возрастает с каждым годом, о чём свидетельствует все большее количество работ, посвященных изучению регуляции формирования боковых корней. На данный момент достоверно показано, что фитогормон ауксин играет ключевую роль в процессе инициации примордия бокового корня (Dubrovsky *et al.* 2008; Overvoorde *et al.* 2010; Du, Scheres. 2017; Pina *et al.* 2018). Формирование направленного тока ауксина обеспечивается семейством белков PIN-FORMED – его главными транспортерами (Kramer, Bennett. 2006; Grunewald, Friml. 2010). Из-за различной локализации этих белков на мембране отток ауксина из клеток растения возможен в разных направлениях.

Результаты данной работы обладают также практической значимостью, поскольку позволят внести вклад в теоретическую базу, которая является основой стабильного инновационного сельского хозяйства в Российской Федерации. Выявлены структурные и молекулярно-генетические механизмы инициации бокового корня, которые являются

теоретическими основами для создания высокоэффективных и устойчивых сортов культурных растений.

Целью работы является анализ локализации и роли PIN1 белка в формировании максимума клеточного ответа на ауксин при инициации бокового корня в меристеме родительского корня кабачка (*Cucurbita pepo* L., сем. Cucurbitaceae).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие основные задачи:

1. Поиск и идентификация белков семейства PIN у кабачка;
2. Создание репортерной конструкции и анализ локализации SpPIN1 белка в трансгенных корнях кабачка;
3. Иммунолокализация PIN1 белка в кончике корня кабачка;
4. Анализ роли PIN1 на ранних этапах инициации бокового корня у кабачка.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Ветвление корня, основные этапы образования бокового корня

Корневая система играет важную роль в развитии растения. Ее основными функциями являются закрепление растения в почве и поглощение воды и минеральных веществ. Выделяют два основных типа корневых систем, отличающихся соотношением роста главного, боковых и придаточных корней. Стержневой тип корневой системы, характерный для большинства видов из класса Двудольные и некоторых Голосеменных, формируется преобладающим в росте главным корнем, проникающим глубоко в почву. Виды класса Однодольные, обычно, образуют мочковатый тип корневой системы, который формируется при слабом росте и быстром отмирании главного корня, а также развитию большого числа боковых и придаточных корней. Мочковатая корневая система активно ветвится в поверхностном слое почвы.

Одной из наиболее важных характеристик корневой системы является её пластичность благодаря регулярному возникновению боковых корней. Боковой корень является удобной моделью для изучения механизмов органогенеза, так как он появляется в результате образования новой меристемы в постэмбриональный период. Для корня высших растений характерно следующее тканевое строение (снаружи внутрь) – ризодерма, кора, эндодерма, перицикл и ткани центрального цилиндра, включающие проводящие ткани – ксилему и флоэму. Гистологические исследования показали, что развитие примордиев боковых корней происходит в результате делений в перицикле напротив ксилемных или флоэмных групп, в зависимости от систематической принадлежности растения (Esau, 1977). Растения можно разделить на две стратегии в зависимости от удаления зоны инициации боковых корней от кончика родительского корня. У большинства видов цветковых растений инициация примордиев бокового корня происходит выше зоны растяжения (*Poaceae*, *Fabaceae* и др.). Однако у видов семейства

Тыквенные (*Cucurbitaceae*) и в некоторых других семействах цветковых растений (*Fagopyraceae*, *Convolvulaceae*, некоторые водные растения и др.) инициация и развитие боковых корней наблюдается непосредственно в апикальной меристеме родительского корня (Demchenko, Demchenko. 2001; Pina *et al.* 2018). У представителей первой стратегии под влиянием эндогенного стимула, в качестве которого чаще всего рассматривается ауксин, клетки перикабла, вышедшие в конце меристемы из митотического цикла в фазе G1, возобновляют пролиферацию и участвуют в инициации примордия бокового корня (Demchenko, Demchenko. 2001; Himanen *et al.* 2002). Механизмы инициации бокового корня выше зоны растяжения достаточно подробно описаны в литературе на примере модельных растений (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (рис), *Triticum aestivum* (мягкая пшеница)), в то время как у видов с инициацией боковых корней в апикальной меристеме этот механизм остается малоизученным.

Боковые корни располагаются вдоль продольной оси материнского корня. По направлению от кончика корня к стеблю выделяют несколько основных ростовых зон: **меристема**, клетки которой удваивают свой объем за время митотического цикла (большая часть клеток в этой зоне активно пролиферирует), в большинстве случаев ее протяженность составляет не более 1 мм; **зона растяжения**, которая характеризуется быстрым и значительным (до 5-10 раз) удлинением клеток за время митотического цикла; **зона дифференциации** клеток, в которой клетки перестают расти, и многие из них начинают дифференцироваться с появлением характерных признаков терминальной дифференцировки (Рисунок 1).

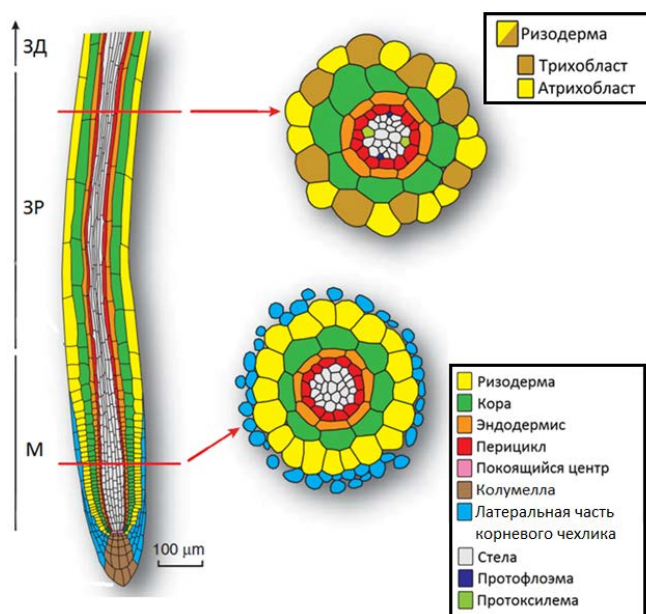


Рисунок 1 – Схема продольного среза корня *Arabidopsis*

М – меристема, ЗР – зона растяжения, ЗД – зона дифференцировки, по Overvoorde *et al.* (2010).

Некоторые авторы также выделяют базальную часть меристемы и, так называемую, **переходную (transition) зону** (Baluska *et al.* 1996; Baluška, Mancuso. 2013). Корневой чехлик, покрывающий ткани меристемы, в свою очередь, образует защитные и сенсорные слои для защиты меристематических клеток, в частности у *Arabidopsis*, во время продвижения в почве и для восприятия сигналов окружающей среды (Dolan *et al.* 1993; Verbelen *et al.* 2006).

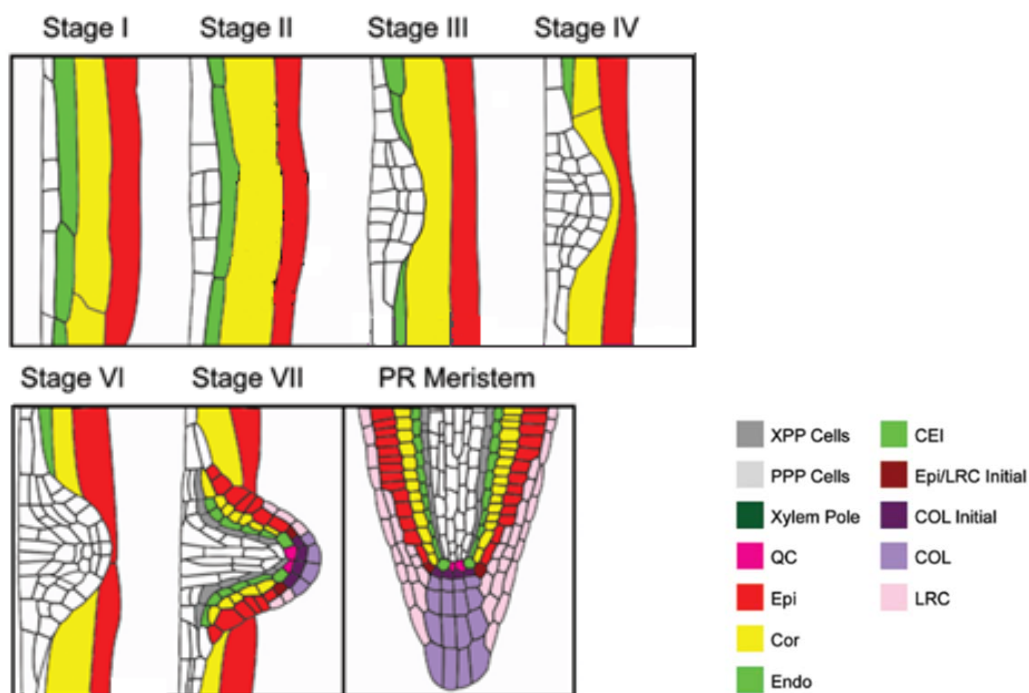


Рисунок 2 – Схема последовательных стадий развития бокового корня *Arabidopsis*

XPP Cells – клетки ксилемного полюса перицикла, PPP Cells – клетки флоэмного полюса перицикла, Xylem Pole – ксилемный полюс, QC – покоящийся центр, CEI – инициалы коры и эндодермы, Epi – ризодерма, Cor – кора, Endo – эндодерма, LRC – корневой чехлик бокового корня, COL – колумелла, модифицировано по Du, Scheres (2017).

Образование бокового корня у *Arabidopsis* можно условно разделить на семь стадий (Malamy, Benfey. 1997; Benková *et al.* 2003), на основании числа сформированных клеточных слоев в примордии бокового корня (Рисунок 2). **Стадия 0** - появление клеток-основательниц (founder cells) примордия; **стадия I** – серия антиклинальных (ассиметричных) делений клеток-основательниц; **стадия II** – формирование двух слоев клеток (внутреннего и внешнего) за счет периклинальных делений; **стадия III** – периклинальные деления продолжают во внешнем слое, формируя внешний слой 1 и внешний слой 2; **стадия IV** – периклинальные деления продолжают во внутреннем слое, формируя два внутренних слоя и два внешних слоя; **стадия V** – центральная клетка в двух внешних слоях делится антиклинально, с образованием нескольких клеток, которые

в свою очередь, тоже будут делиться, образуя внешний слой из 10-12 клеток. Также клетки второго внутреннего слоя растут радиально и делятся. **Стадия VI** – клетки второго внешнего слоя делятся периклинально образуя новый внутренний слой, внешний слой 2a и внешний слой 2b. Одновременно с этим, 4 центральные клетки в первом внешнем слое делятся периклинально, создавая еще один слой на кончике примордия. К стадии VI корень успевает пройти через кору родительского корня и проникнуть в ризодерму. **Стадия VII** – все клетки примордия продолжают делиться. Клетки первого внешнего слоя делятся антиклинально, что приводит к образованию двух групп по 8-10 клеток по обе стороны от 8-10 центральных клеток. Выход примордия на поверхность материнского корня происходит в основном за счет растяжения клеток, а не их деления.

С каждым годом появляется все большее количество работ, посвященных исследованию самых ранних этапов инициации бокового корня. На данный момент обнаружено, что позиционирование будущего примордия начинается с одной клетки периклика в пределах ряда, при делении которой и образуются клетки-основательницы бокового корня – стадия 0 (Dubrovsky. 2018; Pina *et al.* 2018).

1.2 Роль ауксина в инициации и развитии примордия бокового корня

Ауксин является одним из главных гормонов растений, который присутствует практически во всех тканях и участвует во множестве сигнальных каскадов, регулирующих нормальное функционирование организма. В наибольших количествах он обнаруживается в молодых органах, таких как: почки, листья, побеги, цветки и примордии боковых корней. Функции ауксина разнообразны. Ауксин участвует в регуляции пролиферации и растяжении клеток, участвует в образовании сосудов, боковых корней, играет главную роль в тропизме и др.

Основным местом образования ауксина является апикальная меристема побега и молодые листья, однако существует и дополнительный источник фитогормона – корневой чехлик. В чехлике происходит превращение в индол-3-масляной кислоты (ИМК) в индол-3-уксусную кислоту (ИУК), активную форму ауксина, которая положительно влияет на экспрессию генов, запускающих спецификацию клеток-основательниц бокового корня. Важным явлением для этого процесса является осцилляция концентрации ауксина, которая происходит в базальной части меристемы или в начале зоны растяжения. Эта область в литературе называется зоной осцилляции (De Smet *et al.* 2007). Анализ экспрессии генов в зоне осцилляции привел к заключению, что для, примерно, тысячи генов характерно колебание уровней экспрессии. Механизм поддержания осцилляции

ауксина до сих пор неизвестен, однако, существуют предположения, что колебания создают PIN-FORMED белки – главные транспортеры ауксина (Farcot, Yuan. 2013).

Ауксин необходим на различных стадиях развития бокового корня (Рисунок 3). Так у *Arabidopsis* было описано несколько мутаций *alf* (*aberrant lateral root formation*), связанных с ауксином, из-за которых у растений наблюдались изменения как на стадии инициации деления клеток в перицикле, так и при дальнейшем поддержании их пролиферации и жизнеспособности в развивающемся боковом корне (Celenza *et al.* 1995). Ауксин принимает участие также и в продвижении растущего примордия бокового корня через ткани родительского корня. В данном случае критическим фактором становится обеспечение развивающегося примордия бокового корня ауксином, синтезирующимся в побеге. Например, удаление семядолей и листьев у проростков *Arabidopsis* приводило к остановке продвижения примордиев боковых корней (Reed *et al.* 1998).

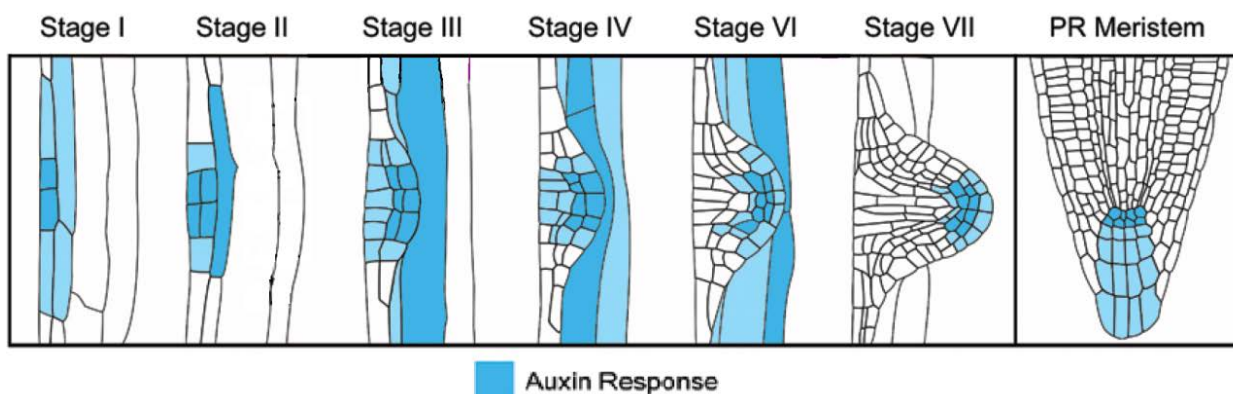


Рисунок 3 – Схема перераспределения максимума клеточного ответа на ауксин в процессе развития примордия бокового корня у *Arabidopsis*

Локализация активности синтетического промотора DR5, по Du, Scheres (2017).

Нарушения в метаболизме ауксина и его транспорте приводят к нарушениям развития главного и боковых корней, а также к изменению количественных признаков, связанных с корневой системой.

1.3 Механизмы транспорта ауксина. Классификация транспортеров ауксина

Ауксин влияет на различные процессы роста и развития растений. Ауксин регулирует разнообразные физиологические процессы главным образом за счет своего неравномерного распределения в тканях, что происходит в результате активных транспортных механизмов. Только для ауксина показан ярко выраженный полярный транспорт (Jones. 1998).

В корне *Arabidopsis* описано два направления транспорта ауксина в корне – акропетальное и базипетальное. Оба вида транспорта важны для инициации и развития бокового корня (Casimiro *et al.* 2001).

Акропетальный транспорт идет от побега к кончику корня, а базипетальный от кончика корня вверх к зоне инициации боковых корней (Рисунок 4).

В работе Reed *et al.* (1998) было показано, что при блокировке акропетального транспорта с помощью нафтилфталамовой кислоты (НФК) происходило уменьшение количества боковых корней в зависимости от концентрации НФК вплоть до их полного отсутствия. Исследователи подчеркивают, что акропетальный транспорт очень важен для развития и контроля плотности боковых корней, но остается неизвестным, влияет ли этот тип транспорта на инициацию примордиев или только на развитие уже сформировавшихся боковых корней.

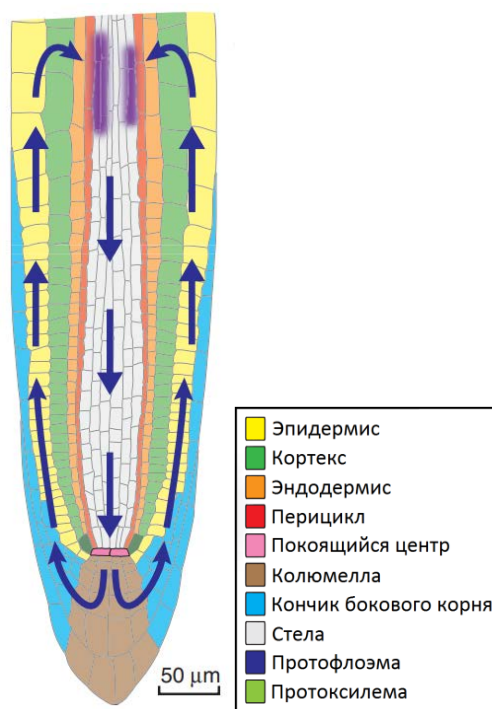


Рисунок 4 – Схема организации потоков ауксина в корне: акропетального и базипетального

По Overvoorde *et al.* (2010)

Позже Casimiro *et al.* (2001) изучали влияние базипетального транспорта. Был проведен схожий эксперимент с НФК, но на этот раз, при повышении концентрации блокатора наблюдалась остановка периклинальных делений. Таким образом, было убедительно доказано, что именно базипетальный транспорт наиболее важен для закладки и развития примордия бокового корня. При поступлении ауксина из центрального

цилиндра в область покоящегося центра и далее в чехлик происходит перераспределение его тока, и затем ауксин поднимается вверх по коре и ризодерме вследствие активного транспорта (Blilou *et al.* 2005).

Ауксин может транспортироваться несколькими способами: пассивно – диффузия через плазматическую мембрану, или активно – с помощью специальных транспортеров.

В 1973 году П. Рабери и П. Шелдрэйком предложили хемиосмотическую гипотезу для объяснения транспорта ИУК через мембрану. ИУК является слабой кислотой (рК 4,75), и, находясь в апопласте (низкий уровень рН), высокая доля ауксина остается недиссоциированной, в таком виде гормон может пассивно диффундировать через плазматическую мембрану (Rubery, Sheldrake. 1974). Однако в своей диссоциированной форме кислота может попасть в клетку только посредством активного транспорта, то есть специальных переносчиков (AUX). Попав в клетку молекулы ИУК практически полностью диссоциируют из-за относительно высокого рН цитоплазмы и выводятся из клетки PIN транспортерами.

Существуют несколько классов белков-транспортеров ауксина, благодаря которым осуществляется его активный транспорт (Рисунок 5, Таблица 1).

Таблица 1 – Семейства транспортеров ауксина и их функции

Семейство	Функции транспортеров
AUXIN RESISTANT (AUX) и LIKE AUXIN RESISTANT (LAX)	Обеспечивают поступление ауксина в клетку
P-GLYCOPROTEIN (PGP), MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) и ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB)	Осуществляют АТФ-зависимый транспорт ауксина в клетку
PIN-FORMED (PIN)	Осуществляют полярный транспорт ауксина за счёт его оттока из клетки
PIN-LIKES (PILS)	Осуществляют внутриклеточный транспорт ауксина
MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION (MATE)	Предположительно участвуют в развитии боковых органов
ALTERED DEVELOPMENT PROGRAM (ADP1)	Предположительно является транспортером MATE

Активными импортерами ауксина в клетку являются представители семейства трансмембранных белков AUXIN RESISTANT (AUX) и LIKE AUXIN RESISTANT (LAX),

обеспечивающие поступление ауксина в клетку. У *Arabidopsis* описано 4 гена, которые кодируют белки данного семейства - *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* и *LAX3*. Соответствующие белки ассиметрично локализованы на плазматической мембране в большом количестве (Jiang *et al.* 2017).

Одними из экспортеров ауксина являются мембранные переносчики P-GLYCOPROTEIN (PGP), MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) и ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB), осуществляющие АТФ-зависимый неполярный транспорт ауксина из цитоплазмы в апопласт и располагающиеся ассиметрично на плазматической мембране. У растений к переносчикам этого класса относятся более 100 различных белков (Grunewald, Friml. 2010; Zažímalová *et al.* 2010).

Доминирующим активным переносчиком ауксина из клетки является семейство PIN-FORMED (PIN), состоящее у *Arabidopsis* из 8 белков. Часть PIN белков осуществляют полярный транспорт ауксина за счёт его оттока из клетки, другая часть – внутриклеточный транспорт ауксина. Благодаря локализации длинных PIN на мембране клетки, возможно перераспределение транспорта ауксина и, как следствие, закладка новых органов (Kramer, Bennett. 2006; Grunewald, Friml. 2010).

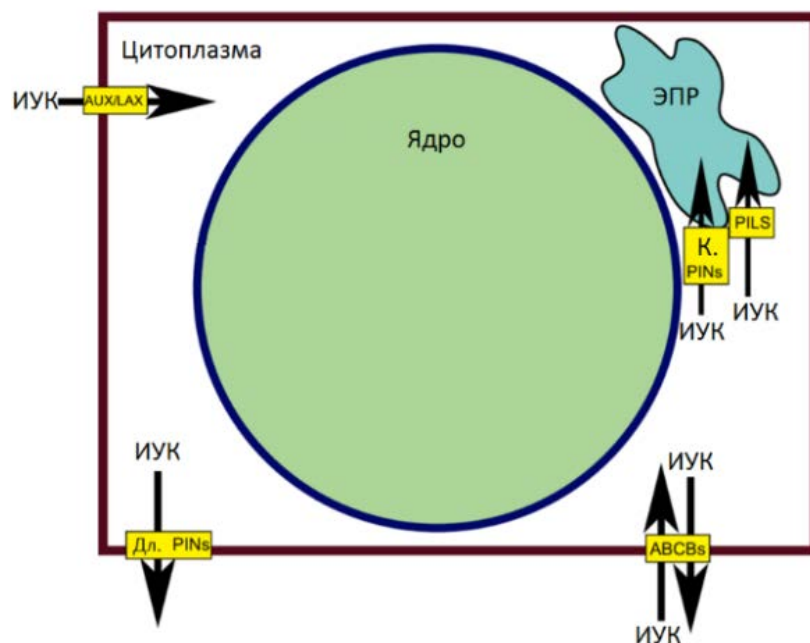


Рисунок 5 – Схема активного транспорта ауксина в клетке

ИУК – индол-3-уксусная кислота, К. PIN – короткие PIN, Дл. PIN – длинные PIN, модифицировано по Jiang *et al.* (2017).

Также, существует несколько белков различных семейств, функции или последовательности которых напоминают членов вышеуказанных транспортеров, например: PIN-LIKES (PILS) белки – осуществляют внутриклеточный транспорт ауксина,

аналогичны коротким PIN (Barbez *et al.* 2012); MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION (MATE) – предположительно участвуют в развитии боковых органов (Takanashi *et al.* 2014); ALTERED DEVELOPMENT PROGRAM (ADP1) – предположительно является транспортером MATE, его повышенная экспрессия приводила к ускоренному росту растения и увеличению количества цветков, боковых корней и боковых ответвлений побега (Li *et al.* 2014).

1.4 Общая характеристика семейства белков PIN

PIN белки получили свое название из-за характерного фенотипа у мутантов *Arabidopsis*, по форме побега напоминающих дамскую шпильку для волос (pin – шпилька). Активное изучение PIN белков и их участие в транспорте ауксина началось после описания этих мутантов. Представители семейства PIN были найдены только в геномах высших растений, начиная со мхов и плаунов (Mravec *et al.* 2009).

В отношении аннотации PIN белков у неблизкородственных к Brassicaceae растений у исследователей не существует единого мнения. Так, у огурца, в дополнение к белку PIN1 (Kamada *et al.* 2003), было идентифицировано ещё 5 PIN белков. Они были названы с CsPIN2 по CsPIN6 (Watanabe *et al.* 2012), однако порядковые номера этим белкам были присвоены, по-видимому, без опоры на данные филогенетического анализа и данные о локализации паттерна экспрессии генов, кодирующих эти белки. Сравнительный филогенетический анализ, проведённый самими же авторами показывает, что белок CsPIN5 демонстрирует высокий процент сходства с AtPIN2. Белки CsPIN1, 3 и 4 располагаются в сестринской кладе по отношению к AtPIN2, а белки CsPIN2 и 4 кластеризуются в сестринскую по отношению к AtPIN3 кладу (Watanabe *et al.* 2012). Кроме того, некоторые исследователи, исходя из данных филогенетического анализа, вводят дополнительную буквенную аннотацию для двух и более белков близкородственных по отношению к одному и тому же PIN белку *Arabidopsis* (например, PIN1a, b, c и d) (O'Connor *et al.* 2014; Kirschner *et al.* 2018). Известно, что у большинства покрытосеменных может быть более одного ортолога белка AtPIN1, поэтому с 2014 года в литературу прочно вошло понятие «Sister of PIN1 clade» (SoPIN1) (Bennett *et al.* 2014; O'Connor *et al.* 2014).

У *Arabidopsis* семейство PIN состоит из 8 белков, которые по молекулярному весу, структуре и локализации можно разделить на 2 подсемейства: «длинные» и «короткие». Гены, кодирующие длинные PIN (PIN1–4, 6, 7) состоят из 6 экзонов и 5 интронов. Белки структурно разделены на 2 консервативных гидрофобных домена, каждый из которых имеет 5 трансмембранных спиралей, отличия между этими доменами практически не

выражены во всем семействе. Между двумя гидрофобными доменами лежит довольно длинная гидрофильная переменная петля, которая у коротких PIN (PIN5, 8) практически отсутствует (Рисунок 6).

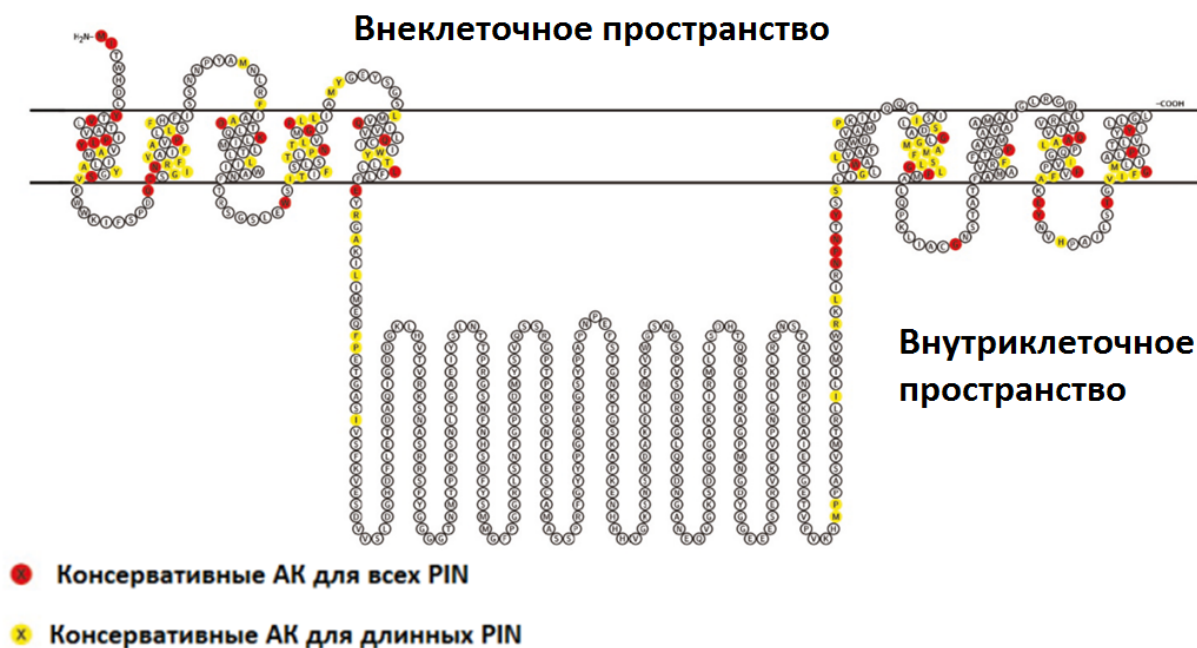


Рисунок 6 – Структура молекулы белка PIN

по Křeček *et al.* (2009).

Длинные PIN белки – являются трансмембранными переносчиками ауксина, в то время как короткие PIN – находятся на мембранах ЭПР и регулируют внутриклеточный гомеостаз ауксина, например, PIN5 участвует в компартиментализации ауксина, закачивая гормон в просвет ЭПР, где он в дальнейшем будет подвергаться модификациям. Ауксин положительно регулирует экспрессию генов, кодирующих длинные PIN, и отрицательно влияет на экспрессию генов, кодирующих короткие PIN-белки. Подобный эффект характерен и для других фитогормонов, регулирующих активность PIN промоторов.

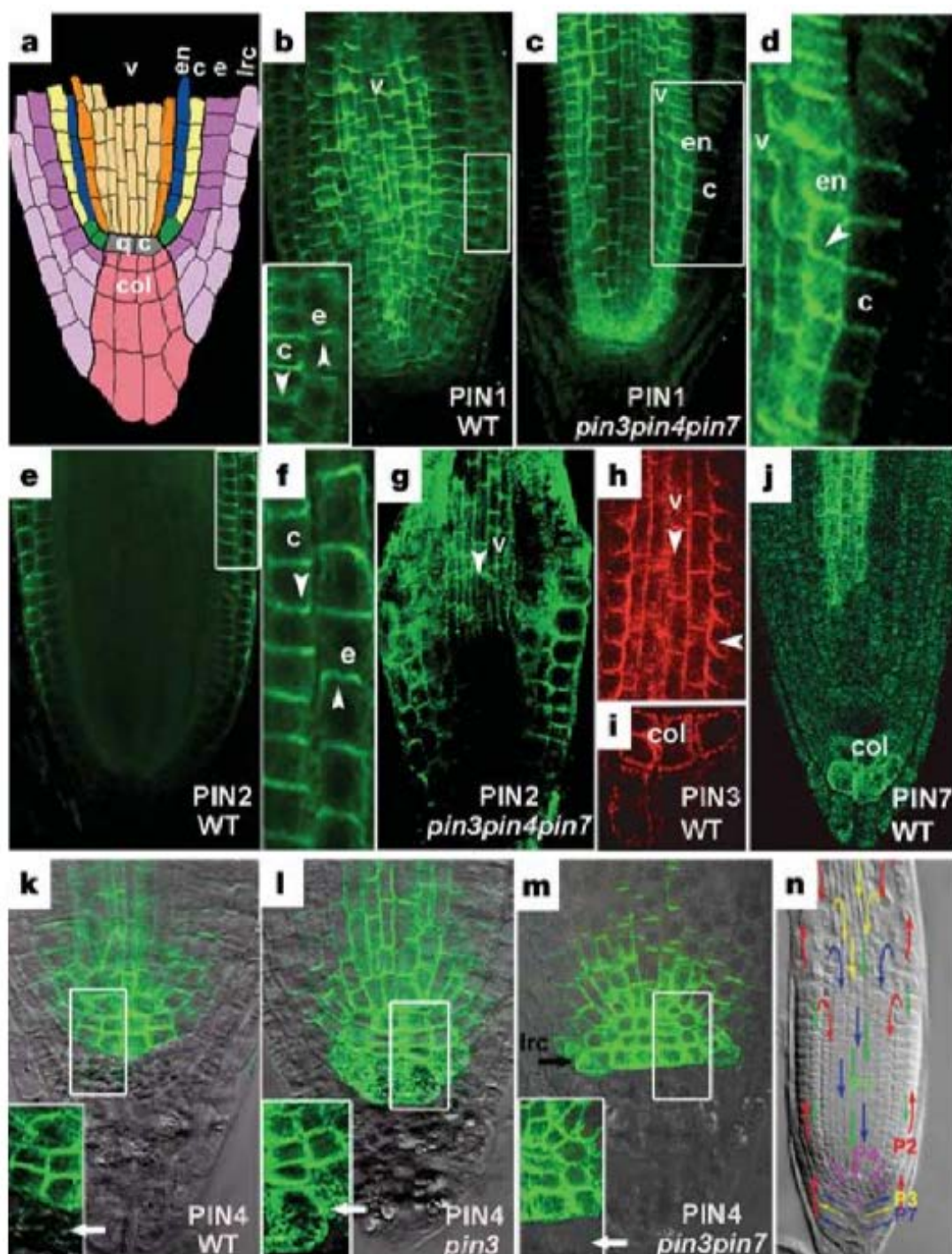


Рисунок 7 – Иммунолокализация белков PIN Arabidopsis дикого типа и при различных мутациях

PIN белки – зеленый и красный канал, по Blilou *et al.* (2005).

Длинные PIN белки имеют различный паттерн локализации в корне, причём каждый белок специфичен для определённых типов тканей. У Arabidopsis **PIN1** локализуется в центральном цилиндре, на апикальной части клеток коры и на базальной части клеток ризодермы (Рисунок 7B). PIN2 обнаруживается в тех же тканях, за исключением центрального цилиндра (Рисунок 7E, F). PIN3 экспрессируется в клетках

колумеллы, причём для этого белка не характерна ярко выраженная полярность, а также, его следовые количества обнаружены в клетках центрального цилиндра (Рисунок 7Н, I). PIN4 находится в клетках покоящегося центра и вокруг него, доходя до клеток центрального цилиндра (Рисунок 7К) (Blilou *et al.* 2005). PIN6, который относится к длинным PIN белкам, несмотря на наличие гидрофильной петли, обнаруживается только на мембране ЭПР, также как короткие PIN5 и PIN8, и не выявляется на плазматической мембране (Sawchuk *et al.* 2013). Паттерн распределения PIN7 совпадает с паттерном PIN3, однако в центральном цилиндре его количество намного больше. Он выявляется на протяжении всей зоны меристемы и в зоне растяжения (Рисунок 7J) (Blilou *et al.* 2005).

Таким образом, многие PIN белки показывают сходный паттерн локализации. Показано, что мутация по одному гену приводит к повышению экспрессии других, что частично заменяет функции повреждённого белка. Так, у мутанта *pin3pin4pin7* наблюдались повышенная концентрация PIN1 на плазматической мембране и изменения в его локализации на базальной и латеральной части клеток эндодермы (Рисунок 7С, D). PIN2 также начинал экспрессироваться на базальной части клеток центрального цилиндра, где в норме выявлялись PIN3 и PIN7 (Рисунок 7G). При двойной мутации по *pin2pin3* генам, паттерн PIN4 полностью совпадал с паттерном PIN3 (Blilou *et al.* 2005).

В корне PIN белки отвечают за полярный транспорт ауксина, соответственно, и их локализация напрямую связана с механизмами транспорта этого гормона. Так, PIN1, PIN4 и PIN7 осуществляют акропетальный транспорт, PIN3 и PIN7 ответственны за изменение направления потока в чехлике, а PIN2 за базипетальный тип транспорта (Рисунок 7Н, Рисунок 8).

PIN располагаются полярно на плазматической мембране, что является результатом их активного перемещения в составе везикул по актиновым микрофиламентам. Поэтому токсин грибов брефельдин А, ингибирующий везикулярную секрецию, а также цитохалазин D и латрункулин Б, вызывающие деполимеризацию или фрагментацию F-актина, подавляют процесс полярного транспорта ауксина.

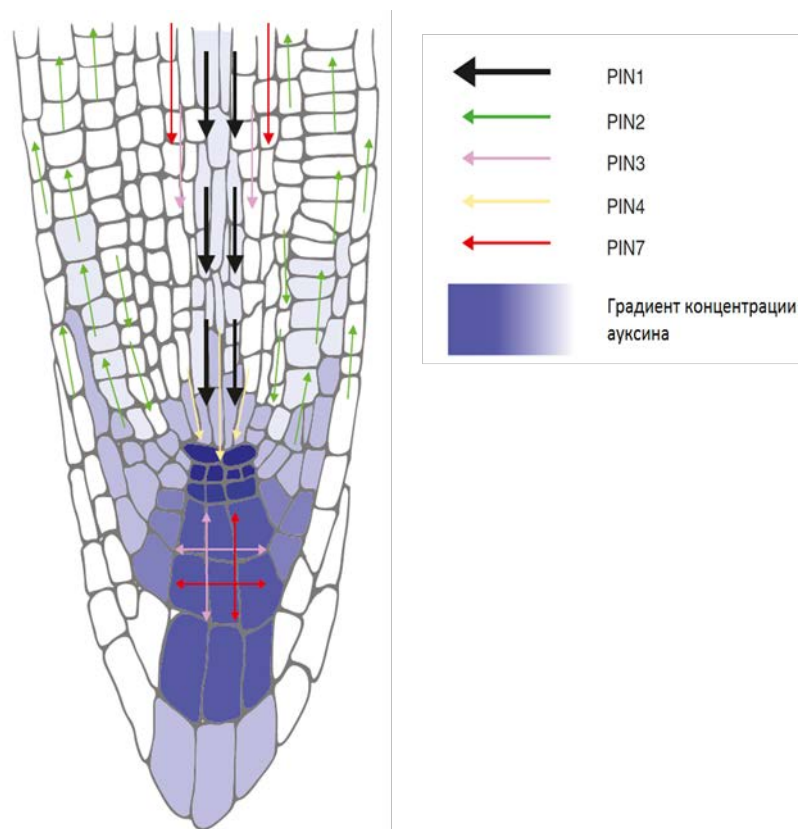


Рисунок 8 – PIN-опосредованный транспорт ауксина в кончике корня у *Arabidopsis*

По Blilou *et al.* (2005).

Наиболее изученным белком семейства является PIN1, так как именно из-за мутаций в его гене происходит шпилькообразное изменение побега у *Arabidopsis*, давшее название этим транспортерам. В работе Omelyanchuk *et al.* (2016) с помощью иммулокализации было показано, что в процессе развития бокового корня экспрессия PIN1 в перикле наблюдалась со стадии I, после первого антиклинального деления клеток-основательниц (Рисунок 9А). После первого периклинального деления образовывался двухслойный примордий (стадия II), и при каждом дальнейшем антиклинальном делении PIN1 занимал смежные соседние зоны у поделившихся клеток (Рисунок 9В). На следующих стадиях (III и IV) продолжались периклинальные деления и после образования наружного и внутреннего слоев клеток, экспрессия PIN1 смещается к кончику примордия (Рисунок 9С, D). Начиная со стадии IV, количество PIN1 уменьшается на внешней части примордия (Рисунок 9D). В это же время транскрипционный фактор WOХ5 начинает синтезироваться в клетках будущего покоящегося центра (Tian *et al.* 2014). В этих клетках PIN1 будет экспрессироваться без выраженной полярности. На стадии VII развития примордия распределение PIN1 аналогично его локализации в материнском корне (Рисунок 9G).

Так же было показано, что при обработке низким количеством экзогенного ауксина происходит повышение уровня экспрессии PIN1 в корне (Omelyanchuk *et al.* 2016).

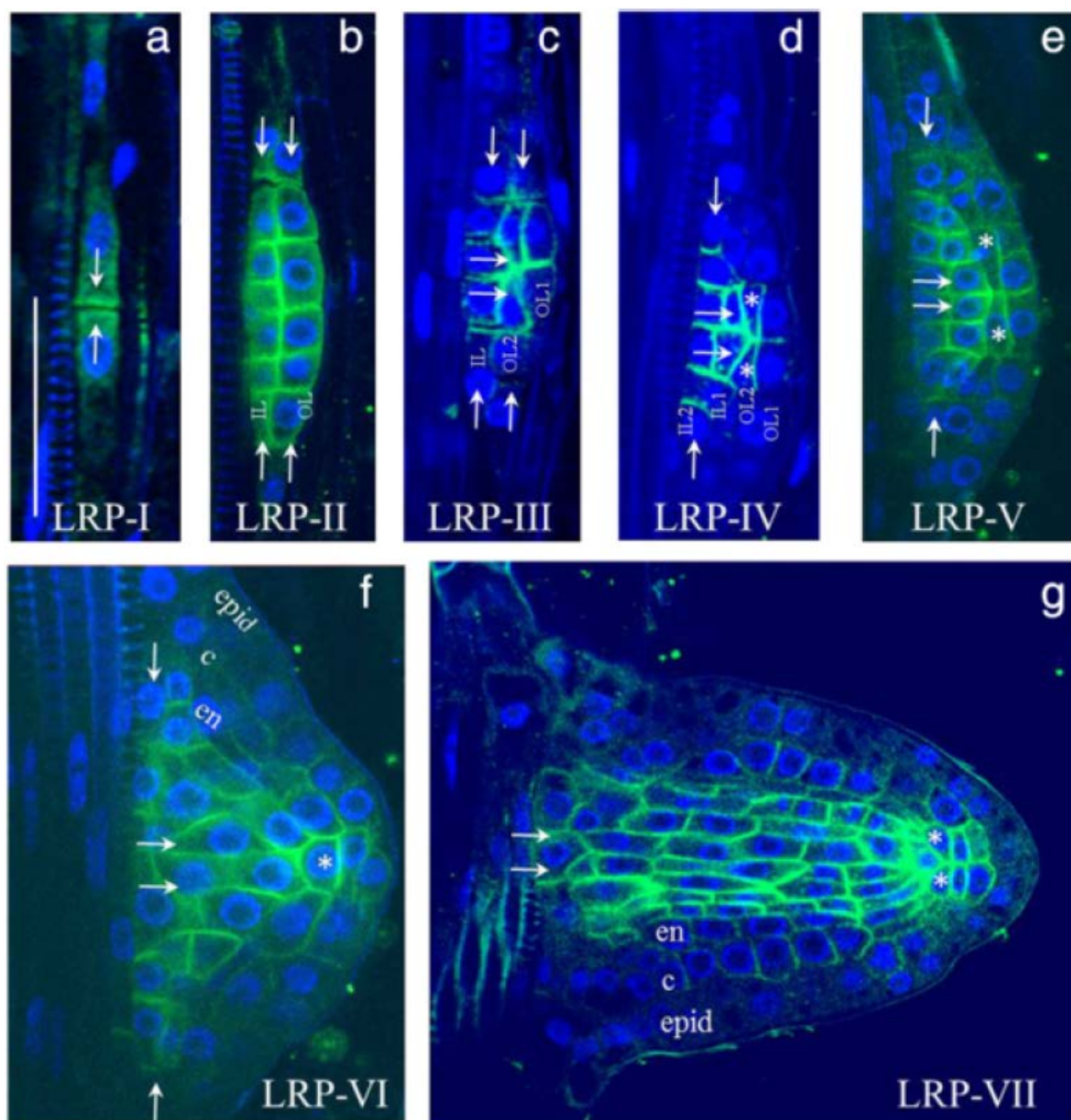


Рисунок 9 – Стадии развития бокового корня у *Arabidopsis* и изменения в распределении белка PIN1 на плазматической мембране клеток примordia

IL (IL1, IL2) – внутренний слой, OL (OL1, OL2) – внешний слой, en – эндодерма, c – кора, epid – ризодерма; * - клетка(и) покоящегося центра, стрелками показано направления транспорта ауксина, по Omelyanchuk *et al.* (2016).

В 2012 году Watanabe с соавторами локализовали в кончике корня огурца (*Cucumis sativus*) шесть из восьми PIN белков (Watanabe *et al.* 2012). При помощи метода *in situ* гибридизации было проанализировано накопление мРНК различных PIN белков. мРНК PIN1 и PIN4 были найдены в центральном цилиндре; мРНК PIN1, PIN2 и PIN3

обнаруживалась вокруг покоящегося центра; в колумелле выявили мРНК PIN6, а мРНК PIN5 локализовалась в ризодерме и в латеральной части корневого чехлика (Рисунок 10).

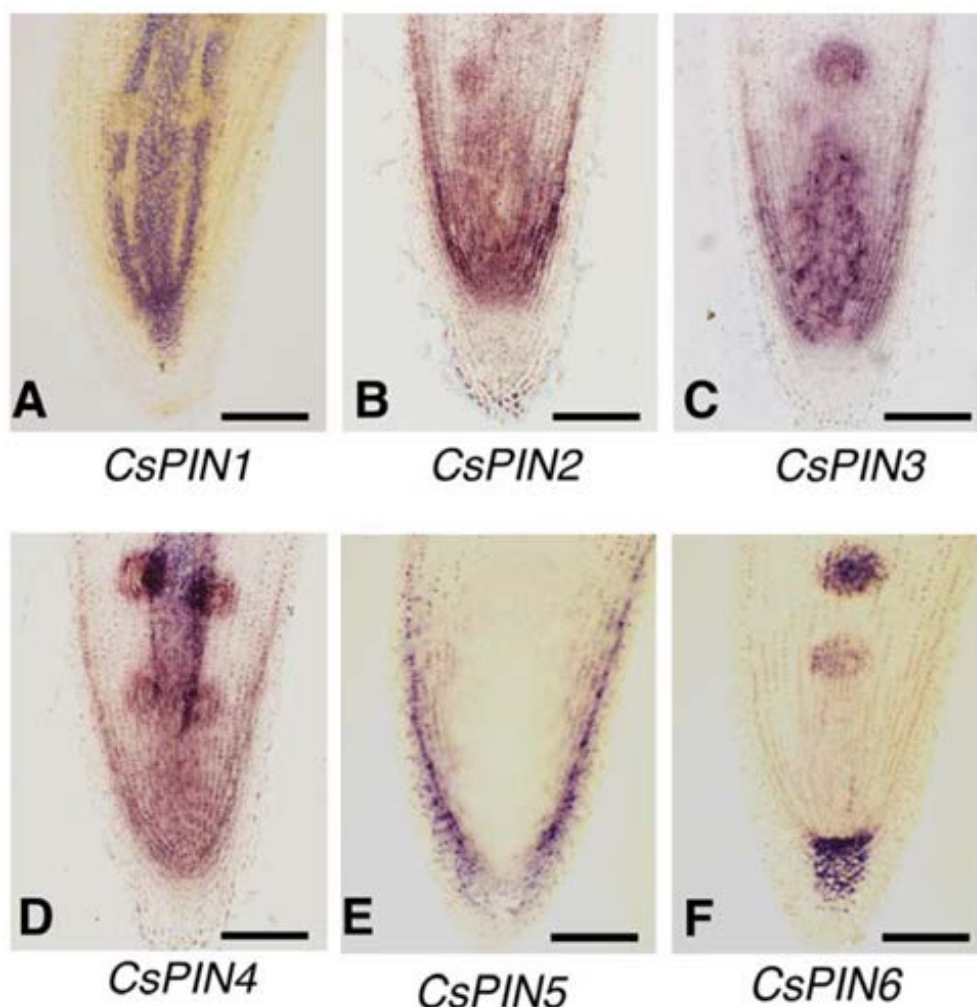


Рисунок 10 – Локализация мРНК CsPIN белков в кончике корня огурца

Визуализация аккумуляции мРНК CsPIN белков на продольных срезах кончика корня: CsPIN1 (A), CsPIN2 (B), CsPIN3 (C), CsPIN4 (D), CsPIN5 (E) или CsPIN6 (F). Масштабная линейка = 300 мкм, по Watanabe *et al.* (2012).

В работе Lavenus *et al.* (2016) было продемонстрировано, что белки семейства PIN принимают участие в гравитропизме – восприятию вектора силы тяжести в кончике корня клетками колумеллы. В этих клетках активно экспрессируются транскрипционные факторы FLP, а PIN3 и PIN7 перераспределяют ауксин в соседние клетки (Wang *et al.* 2015). При гравистимуляции PIN3 и PIN7 перераспределяются на нижнюю часть мембраны клеток, тем самым увеличивая потоки ауксина в нижней части корня и вызывая рост в зоне растяжения и переориентацию корня в направлении вектора силы тяжести. Важно отметить, что в боковых корнях этот механизм PIN-опосредованного перераспределения ауксина будет отличаться, поскольку PIN3 не экспрессируется в зрелых клетках колумеллы бокового корня (Lavenus *et al.* 2016).

Белки PIN опосредуют асимметричное распределение ауксина в тканях, а различные эндогенные и экзогенные сигналы модулируют распределение ауксина, действуя на белки, и, таким образом, на само развитие растения (Кřeček *et al.* 2009). Активность PIN может регулироваться на многих уровнях, включая регуляцию транскрипции, деградации белка и субклеточного транспорта (Tanaka *et al.* 2006; Vieten *et al.* 2007; Petrášek, Friml. 2009). Постоянная внутриклеточная циркуляция PIN является его важным регуляторным механизмом (Kleine-Vehn, Friml. 2008).

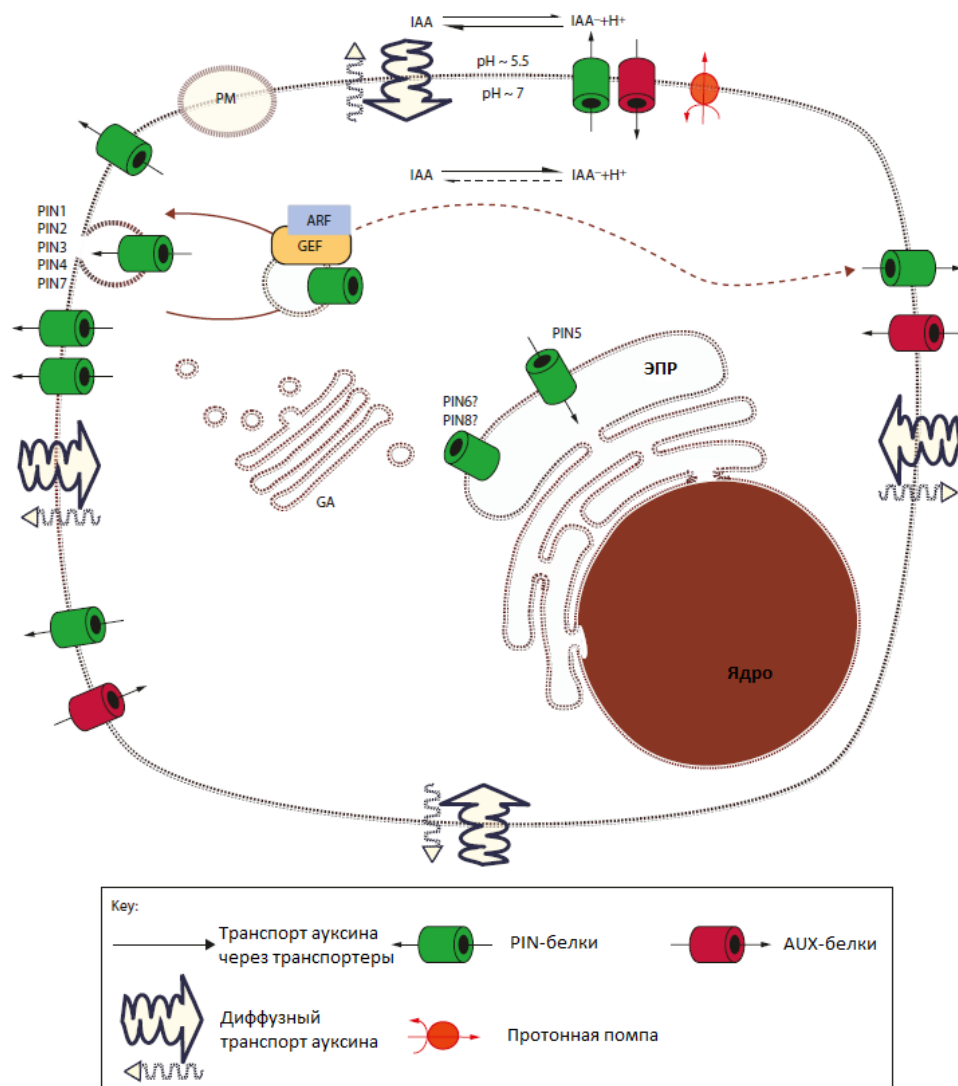


Рисунок 11 – Схема транспорта ауксина и распределения PIN-белков в клетке

по: Кřeček *et al.* (2009).

С помощью экзоцитоза синтезированные *de novo* PIN выводятся и равномерно распределяются на плазматической мембране (Кřeček *et al.* 2009) (Рисунок 11). Уход PIN с мембраны осуществляется за счет клатрин-зависимого эндоцитоза (Dhonukshe *et al.* 2007), а их возвращение на мембрану будет опосредована ARF-GEF-зависимым экзоцитозом.

Благодаря этому механизму PIN белки полярно локализованы на плазматической мембране, так как ARF/GEF (ADP-ribosylation factor/ guanine-exchange factor) задают вектор экзоцитоза (Рисунок 11). Эти факторы кодируются геном GNOM, мутации по которому приводят к гибели зародышей на самых ранних стадиях развития, по причине отсутствия оси полярности (Geldner *et al.* 2001). Также, локализация и активность PIN белков определяется фосфорилированием определенных участков их гидрофильной петли серин-треониновыми протеинкиназами PINOID и D6PK (D6 PROTEIN KINASE). PINOID регулирует локализацию белка (Friml *et al.* 2004), а D6PK его активность на мембране (Zourelidou *et al.* 2009).

1.5 Формирование боковых корней в меристеме родительского корня

Большинство работ, в которых изучались процессы, связанные с инициацией бокового корня, были выполнены на видах цветковых растений, для которых характерно образование примордиев бокового корня выше зоны растяжения. При этом генетические и физиологические механизмы, опосредующие инициацию боковых корней в апикальной меристеме корня у ряда семейств, в том числе и тыквенных, остаются малоизученными (Demchenko, Demchenko. 2001).

Стадии образования бокового корня у тыквенных аналогичны стадиям, описанным для *Arabidopsis*. В работе Пина *et al.* (2018) подробно описано образование бокового корня у кабачка и участие в этом процессе фитогормона ауксина. В корне кабачка перицикл представлен двумя слоями, расположенными напротив полюсов ксилемы, а именно внутренний перицикл (перицикл I) и внешний перицикл (перицикл II). Самыми ранними событиями в инициации бокового корня, детектируемыми на гистологическом уровне, являлись симметричные антиклинальные деления в двух соседних клетках в двух соседних рядах перицикла напротив ксилемного полюса. Первые примордии боковых корней (стадии I) были обнаружены на расстоянии 250–350 мкм от инициальных клеток рядов перицикла. На этом же удалении было отмечено возобновление максимумов ответа на ауксин в клетках перицикла, после их исчезновения на удалении 200 мкм от инициалей. На стадиях развития 0 и I максимумы ответа на ауксин обнаруживаются в протоксилеме и периферической метаксилеме, а также в некоторых клетках стелярной паренхимы, прилегающих к месту инициации примордия бокового корня. На удалении 500 мкм от инициальных клеток рядов происходит завершение антиклинальных делений в клетках перицикла с максимумом ответа на ауксин. Одновременно происходит вовлечение соседних клеток эндодермы в формирование будущего бокового корня. Важным отличием кабачка от модельного объекта ботаники *Arabidopsis* является участие в образовании

примордия не только клеток перицикла, но еще и клеток эндодермы и коры. После завершения первых периклинальных делений в перицикле (стадия II) внутренние ряды клеток коры вовлекаются в процесс развития бокового корня, и с этой стадии в них также детектируется максимум ответа на ауксин. Позже эти клетки будут делиться и сформируют внешние слои примордия. В целом три-четыре внутренних слоя клеток коры будут вовлечены в образование примордия, в то время как три наружных слоя не будут участвовать в развитии бокового корня. Процессы вовлечения клеток эндодермы и коры в образование примордия бокового корня также сопровождаются появлением в них максимумов ответа на ауксин. В ходе развития бокового корня максимум клеточного ответа на ауксин смещается в апикальную часть примордия.

На данный момент, разнообразие, локализация и функционирование PIN белков в различных группах сосудистых растений изучены достаточно хорошо, однако до сих пор остается открытым вопрос о роли перераспределения PIN белков на плазматической мембране в создании максимума клеточного ответа на ауксин в клетках апикальной меристемы материнского корня при формировании примордия бокового корня. Хорошим инструментом для изучения этого вопроса являются корни представителей семейства Тыквенные.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Растительный материал и условия выращивания растений

В качестве растительного материала для проведения экспериментов были использованы семена кабачка (*Cucurbita pepo* L.) сорта Белоплодный (СортСемОвощ, Санкт-Петербург, Россия). Растения выращивали при световом режим 16/8 ч (день/ночь) и освещённость 600 мкМ/(м²·с).

Штаммы микроорганизмов

В работе применяли лабораторные штаммы *Escherichia coli* XL1.Blue. Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* R1000 (ГНУ ВНИИСХМ), без устойчивости к антибиотикам.

Условия культивирования микроорганизмов

Культивирование клеток *E. coli* проводили при 37°C на агаризованной среде LB в течение 18-20 ч. Для приготовления жидкой культуры инокулировали небольшой объём LB с соответствующими антибиотиками бактериальной колонией. Бактерии инкубировали в течение 16-18 ч при 250 об./мин. и температуре 37°C.

Среда LB (Luria – Bertani) (1 л):

Пептон (Select Pepton 140)	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г
Агар (для получения твёрдой среды)	15 г

pH=7,2.

Агробактерии выращивали на агаризованной среде YEB в течение 24-36 ч при 28°C. Для получения жидкой культуры бактерий в жидкую среду YEB добавляли часть колонии агробактерий, объём сосуда для культивирования в десять раз превосходил объём

инокулируемой среды. Культуру выращивали 18-24 ч при 220 об./мин. и температуре 28°C.

Среда YEB (1 л):

Мясной экстракт	5 г
Дрожжевой экстракт	1 г
Пептон	1 г
Сахароза	5г
5 мМ MgSO ₄	
Агар (для получения твёрдой среды)	15 г
pH=7,4	

2.2 Молекулярно-генетические методы исследования

Филогения и биоинформатика

Поиск гомологов PIN белков *Arabidopsis* у представителей семейства Тыквенные огурца (*Cucumis sativus*, Chinese Long v2) (Li *et al.* 2011) и кабачка (*Cucurbita pepo*, zucchini) (Montero-Pau *et al.* 2018) был проведён с помощью базы данных Cucurbit Genomics Database (cucurbitgenomics.org). Также были использованы аминокислотные последовательности PIN белков огурца (Watanabe *et al.* 2012), размещённые в базе NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). В качестве внешней группы использована последовательность PIN белка ели (*Picea abies*), размещённая в базе ConGenIE (congenie.org). Для идентификации группы SoPIN1 у Тыквенных с сайта Phytozome v. 12.1 (phytozome.jgi.doe.gov) были взяты белки томата (*Solanum lycopersicum*) Solyc10g078370.1.1(SoPIN1a) и Solyc10g080880.1.1(SoPIN1b). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проведено с помощью алгоритма Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) (Sievers *et al.* 2011). Сравнительный филогенетический анализ PIN белков *Arabidopsis* и Тыквенных был проведён с использованием программного обеспечения MEGA7.0 (Kumar *et al.* 2016) при помощи метода максимального правдоподобия (the Maximum Likelihood method) на основе модели Jones-Taylor-Thornton (JTT) (Jones *et al.* 1992) с параметрами, оценивающими как различие частот аминокислотных замен в разных позициях (2 categories (+G, parameter = 1.5183) (Yang. 1994), так и долю консервативных аминокислотных позиций ([+I], 5.27% sites) (Shoemaker, Fitch. 1989). JTT+G+I была выбрана из вариантов моделей, имеющих наименьшие значения байесовского информационного критерия (Bayesian Information Criterion (BIC) scores) (Schwarz. 1978). Модели аминокислотных замен, обладающие наименьшими значениями байесовского информационного критерия, наилучшим образом отражают эволюционный процесс аминокислотных замен. Начальное древо для эвристического поиска было получено автоматически, путем применения алгоритмов

Neighbor-Join (NJ) (Saitou, Nei. 1987) и BioNJ (Gascuel. 1997). При построении дерева использовали 1000 циклов бутстреппинга (bootstrap value).

Выделение плазмидной ДНК из *Escherichia coli*

Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора реактивов для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Количество и качество выделенной плазмидной ДНК оценивали при помощи флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) а также методом электрофореза образцов в 1% агарозном геле в однократном буфере ТАЕ.

Буфер ТАЕ (50-кратный, рН 8.0):

2 М Трис-ацетат,

50 мМ ЭДТА,

рН подводили ледяной уксусной кислотой.

Выделение плазмидной ДНК из *Agrobacterium rhizogenes*

Для выделения плазмидной ДНК из клеток агробактерий 2 мл жидкой культуры отбирали в пробирку Эппендорф; клетки осаждали центрифугированием при 13000 об./мин. К осадку добавляли 100 мкл ресуспендирующего буфера, 25 мкл РНКазы А (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл, лизоцим (Sigma) в концентрации 20 мкг/мл, перемешивали и инкубировали в течение 30 мин. при 37°C. После в пробирку вносили 200 мкл лизирующего буфера и оставляли на 5 минут при комнатной температуре. Далее, добавляли 175 мкл нейтрализующего буфера, перемешивали и инкубировали на льду в течение 5 мин, затем центрифугировали при 13000 об./мин., супернатант переносили в новые пробирки (Phase Lock Gel Heavy Tubes, Eppendorf). Супернатант последовательно очищали от белков смесью хлороформа и изоамилового спирта (24:1), после чего обрабатывали только 100% хлороформом. Очищенную водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли изопропанол в соотношении 0,6 от объёма содержимого и инкубировали на льду 10 мин. Содержимое пробирки перемешивали и центрифугировали при 13000 об./мин. в течение 15 мин. Осадок дважды промывали 70% этиловым спиртом, подсушивали, избавляясь от остатков спирта и растворяли в 50 мкл 2,5 мМ Трис-НСl (рН 8,0). Количество выделенной плазмидной ДНК оценивали при помощи флуориметра Qubit.

Ресуспендирующий буфер:

50 мМ Глюкозы

25 мМ Трис (рН 8,0)

10 мМ ЭДТА

Лизирующий буфер:

1% SDS

0,2 N NaOH

Нейтрализующий буфер:

M ацетата калия (pH 5,0)

Выделение общей ДНК из растительных тканей

Выделение общей ДНК из растительных тканей производили набором реактивов для выделения геномной ДНК AxyPrep™ (Axygen, США) в соответствии с рекомендациями производителя из навески листьев кабачка (100 мг). В работе использовали замороженный (-80°) растительный материал. Количество выделенной ДНК определяли при помощи флуориметра Qubit. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью ПЦР с праймерами к гену убиквитина (Таблица 4), с последующим электрофоретическим разделением образцов в 1,5% агарозном геле.

Выделение общей РНК из растительных тканей

Общая РНК из корней кабачка была выделена с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Ее качество и количество оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле и с помощью флуориметра Qubit.

Полимеразная цепная реакция

Фрагменты ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК полимеразу DreamTaq™ Green (Thermo Fisher Scientific) использовали из расчёта 1,25 единиц активности (Е) на 50 мкл реакционной смеси. Конечная концентрация компонентов реакционной смеси была следующей: 1x DreamTaq-буфер для проведения ПЦР, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP): 0,2 mM (каждого нуклеотида), 5'-праймер – 0,2 мкМ, 3'-праймер – 0,2 мкМ. В соответствии с рекомендациями Thermo Fisher Scientific, в реакционную смесь вносили 0,01–1 нг плазмидной ДНК или 0,1–1 мкг геномной ДНК. В большинстве случаев объем реакции составлял 20 мкл. Для проведения ПЦР использовали воду 1 степени очистки по ГОСТ Р 52501–2005 (MQH₂O). Реакционную смесь переносили в тонкостенные 0,2 мл пробирки (SSI, США); ПЦР проводили в термоциклере BioRad C1000 (Bio-Rad Laboratories, США). Стандартная программа ПЦР для DreamTaq на стадии 2–4, в зависимости от целей, состояла из 25–35 циклов (Таблица 2). Длительность стадии элонгации зависела от длины амплифицируемого фрагмента.

Таблица 2 – Стандартная программа ПЦР для DreamTaq полимеразы

Стадия	Температура	Длительность
1. Первичная денатурация матричной ДНК	95°C	90 с - 3 мин.
2. Денатурация ДНК	95°C	30 с
3. Посадка праймеров на матричную ДНК	Температура отжига праймеров (Таблица 4)	30 с
4. Элонгация	72°C	1 мин./1000 п.н.
5. Завершение синтеза ДНК	72°C	5 мин.

Для амплификации фрагмента DNA с более высокой точностью использовали высокоточную ДНК полимеразу PhusionTM (Thermo Fisher Scientific) из расчёта 1 единица активности на 50 мкл реакционной смеси. Конечная концентрация компонентов реакционной смеси была следующей: 1x Phusion HF-буфер для проведения ПЦР, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) – 0,2 мМ (каждого нуклеотида), 5'-праймер – 0,5 мкМ, 3'- праймер – 0,5 мкМ. В соответствии с рекомендациями Thermo Fisher Scientific, в реакционную смесь вносили 0.1–1 нг плазмидной ДНК и 50–100 нг геномной ДНК. Используемая вода, пробирки и оборудование соответствуют ПЦР с полимеразой DreamTaq.

Стандартная программа ПЦР для Phusion полимеразы на стадии 2–4, в зависимости от целей программа состояла из 25–35 циклов (Таблица 3). Длительность стадии элонгации зависела от длины амплифицируемого фрагмента.

Таблица 3 – Стандартная программа ПЦР для Phusion полимеразы

Стадия	Температура	Длительность
1. Первичная денатурация матричной ДНК	98°C	30с
2. Денатурация ДНК	98°C	10 с
3. Посадка праймеров на матричную ДНК	Температура отжига праймеров (Таблица 4)	15 с
4. Элонгация	72°C	15 с/1000 п.н. для плазмидной ДНК 30 с/1000 п.н. для геномной ДНК
5. Завершение синтеза ДНК	72°C	5 мин.

Таблица 4 – Последовательности праймеров, использованные в работе

Название	Последовательность праймера (5'→3')	Ta ¹ , °C	Ta ² , °C
pPIN1 _forward	<u>ACCCGGG</u> ACGACAAGACAAGGGGCGACC	59.8	72
pPIN1 _reverse	<u>ACCCGGG</u> GTGGTTTGTGTTTAAGATGCTCTGT TTC	58.7	72
pPIN1 in promotor _forward	GTAGGATCAACCACATGAAGCGGT	58	-
pPIN1 in promotor _reverse	GGGAGATAATTCCAAGTAAACAAAGTGACT	58	-
CDS PIN1 _forward	TCTGTCCGCCATTACAATACCTCC	58.1	67
CDS PIN1 _reverse	ATTAGTGGGGTGAAGAGTGGTTGAGA	58.2	67
CDS PIN1 OE _forward1	aaa <u>GGTACC</u> ATGATCTCTGTTTCCGACCTCTAC CAT	58.2	68
CDS PIN1 OE _reverse1	CCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT <u>GGTGGCGACCG</u> <u>GTGGATC</u> GGCAGTTGGCTTGGACTCCG	59.1	68
NeonGreen OE _forward	GATCCACCGGTCGCCACC	58.1	68
NeonGreen OE _reverse	CTTGTACAGCTCGTCCATGCC	58.3	68
CDS PIN1 OE _forward2	<u>GCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTGGAGGCTC</u> <u>CGGAGGC</u> ATGCCGCCGGCAAGTGTG	60	65
CDS PIN1 OE _reverse2	aa <u>GCGGCCGC</u> TCAAAGTCCCAATAAGATGTAAT AAACCAAC	58.5	65
UBQ_forward	ATGCGATYTTTGTGAAGAC	56	-
UBQ_reverse	ACCACCACGRAGACGGAG	56	-
pJET1.2._forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	60	65
pJET1.2._reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	60	65
M13_forward	GTA AACGACGGCCAGT	52	-
M13_reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	52	-

OE – ПЦР с перекрывающимися праймерами

Выделенные буквы – адптер к флуоресцентному белку mNeonGreen

Ta¹ - Температура отжига праймеров для DreamTaq полимеразы

Ta² - Температура отжига праймеров для Phusion полимеразы

Подчеркнутые буквы – сайты рестрикции

- не использовалась

В работе были использованы последовательности праймеров, подобранные к промоторной и кодирующей последовательности гена PIN1 кабачка (Таблица 4). Также в работе были использованы стандартные праймеры M13 и праймеры pJET1.2. (CloneJET PCR Cloning kit , Thermo Fisher Scientific). Температуру плавления праймера (Tm) для DreamTaq полимеразы рассчитывали в программе Vector NTI™ Advance 11 (Thermo Fisher Scientific). Температуру посадки праймера на матричную ДНК (температуру отжига, Ta) рассчитывали как Tm-3⁰C. Температуру отжига праймеров для Phusion полимеразы

рассчитывали с помощью калькулятора температур Tm Calculator (Thermo Fisher Scientific). Если температуры отжига праймеров различались, то всегда при разработке программы ПЦР выбирали более низкую температуру отжига праймера.

ПЦР-скрининг бактериальных колоний

ПЦР-скрининг бактериальных колоний является модификацией стандартной методики ПЦР, при которой вместо выделенной и очищенной ДНК в реакционную смесь вносят клетки анализируемой колонии. Реакционная смесь была приготовлена согласно инструкции к набору реагентов CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Fisher Scientific). Для ПЦР были использованы внутренние праймеры к промотору гена PIN1 (pPIN1 in promotor_forward; pPIN1 in promotor_reverse) и праймеры к гену mNeonGreen (NeonGreen OE_forward; NeonGreen OE_reverse). Конечная концентрация компонентов реакционной смеси была следующей: 1x DreamTaq-буфер для проведения ПЦР, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) – 0,2 мМ, 5'- праймер – 0,2 мкМ, 3'- праймер – 0,2 мкМ, 0,5 единицы DreamTaq™ полимеразы (Thermo Fisher Scientific). Конечный объём реакционной смеси составлял 20 мкл. Программа ПЦР приведена в протоколе к набору CloneJET PCR.

ПЦР с перекрывающимися праймерами

ПЦР с перекрывающимися праймерами (overlap extension PCR) так же является модификацией стандартной методики ПЦР. Эта методика использовалась для слияния кодирующей последовательности PIN1 и флуоресцентного репортерного белка mNeonGreen. Применяли высокоточную ДНК полимеразу Phusion™ (Thermo Fisher Scientific) из расчёта 1 Е на 50 мкл реакционной смеси по принципу, описанному в статье (Horton *et al.* 1993). Конечная концентрация компонентов реакционной смеси была такой же, как описано в разделе 2.2.4 (Полимеразная цепная реакция). Вносили эквимольное количество очищенных продуктов ПЦР с перекрывающимися концами последовательностей. Для проведения ПЦР перекрывающимися праймерами в качестве матрицы использовали два амплифицированных фрагмента кодирующей последовательности (CDS) PIN1 и амплифицированный фрагмент mNeonGreen.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции на матрице РНК, выделенной из корней кабачка (0) при помощи набора реактивов для синтеза кДНК Maxima™ First Strand (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Для проведения реакции использовали 1 мкг общей РНК. Программа указана в Таблица 5.

Таблица 5 – Условия для проведения обратной транскрипции

Этапы	Температура	Длительность
1. Обработка ДНКазой I	37°C	10 мин
2. Инкубация I	25°C	10 мин
3. Инкубация II	50°C	15 мин
4. Заключительный этап реакции	85°C	15 мин

Для проверки качества ДНКазной обработки проводили ПЦР с праймерами к гену убиквитина (Таблица 4) на матрице РНК, подвергнутой обработке ДНКазой I. Для проверки качества синтезированной ДНК проводили ПЦР с праймерами к гену убиквитина (Таблица 4).

Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК осуществляли методом электрофореза ДНК в 1% или 1,5% агарозном геле на основе однократного буфера ТАЕ. Для приготовления геля использовали агарозу LE 2 Agarose (Helicon, Россия). Электрофорез проводили в однократном буфере ТАЕ при напряжении не более 80 В. Для проведения электрофореза использовали электрофоретические ячейки и источник тока производства Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). Для визуализации результатов электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия (2 мкг/мл однократного ТАЕ). Распределение фрагментов ДНК анализировали по флуоресценции бромистого этидия в УФ-свете 312 нм на трансиллюминаторе ECX-F15.M (Vilber Lourmat, Германия). Для определения молекулярного веса использовали коммерческие маркеры молекулярного веса (Thermo Fisher Scientific).

Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Для проведения рестрикции ДНК использовали ферменты для ускоренного гидролиза ДНК (Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя изготовителя. Если в ходе реакции образовывался единственный продукт, то его очищали с помощью набора реагентов RCD для очистки ДНК из реакционных смесей (БиоСилика, Россия). Разделение нескольких фрагментов ДНК проводили методом электрофореза, целевые фрагменты вырезали из гелей, окрашенных красителем SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific), с использованием конверсионного экрана УФ-света XcitaBlue™ (Bio-Rad Laboratories) и помещали в 1,5 мл стерильные пробирки. Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора реагентов GED для выделения фрагментов из

геля (БиоСилика) согласно протоколу производителя. Концентрацию фрагмента ДНК оценивали на флуориметре Qubit.

Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli*

Компетентные клетки штамма XL1.Blue *E. coli*, трансформировали продуктами лигирования. Компетентные клетки (100 мкл) оттаивали на льду затем добавляли 5 мкл из реакции лигирования или 10 мкл продуктов клоназной реакции и инкубировали на льду в течение 20 мин. Далее клетки в течение 1 мин. выдерживали при 37°C для создания условий теплового шока и снова охлаждали на льду. В стерильных условиях добавляли 900 мкл среды SOC и инкубировали при 37°C в течение 1,5 ч при покачивании (250 об./мин.). Далее клетки бактерий высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB и антибиотиком, соответствующим гену устойчивости плазмиды.

Среда SOC:

2% пептон

0,5% дрожжевой экстракт

10 мМ NaCl

2,5 мМ KCL

Трансформация компетентных клеток *Agrobacterium rhizogenes*

К 40 мкл компетентных клеток добавляли 75-750 нг плазмидной ДНК и переносили в кювету для электропорации. Электропорацию клеток производили на приборе MicroPulser (Bio-Rad Laboratories) согласно рекомендациям производителя. После электропорации клетки агробактерий культивировали в питательной среде YEB без добавления антибиотиков в течение 2-4 ч при покачивании (220 об./мин.) и температуре 28°C. Клетки высевали на селективную агаризованную среду YEB, содержащую соответствующий антибиотик, для отбора трансформированных клеток.

2.3 Создание генетических конструкций

Для создания молекулярно-генетической конструкции использовали систему клонирования Gateway (Gateway™ Thermo Fisher Scientific) (Рисунок 12). В ходе предыдущих работ в лаборатории был получен конечный вектор ввода системы клонирования Gateway, содержащий терминатор актина Arabidopsis (373 pENTRattR2attL3-TermAct) (Pina *et al.* 2018).

Нами был получен начальный вектор ввода Gateway-системы, несущий промотор гена *PIN1* кабачка – 369_pENTRattL4attR1-pCpPIN1. Репортерная часть состояла из кодирующей последовательности гена CpPIN1, слитого с геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen (Allele Biotechnology, США) (Shaner *et al.* 2013;

Hostettler *et al.* 2017). Получение последовательности слитого гена CpPIN1-mNeonGreen приведено в п. 0. Последовательность CpPIN1-mNeonGreen клонировали в вектор pUC18-entry8 (Hornung *et al.* 2005) по сайтам рестрикции KpnI/NotI.

Результирующая кассета pCpPIN1::CpPIN1-mNeonGreen-TermAct была собрана в векторе 242 pKGW-RR-MGW (E. Limpens, Wageningen University, Wageningen, Голландия) путём LR plus-клонажной реакции (Gateway™, Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Наличие вставки в результирующем векторе проверяли методом ПЦП с праймерами к кодирующей последовательности *mNeonGreen* и терминатору актина *TermAct*, соответственно, а также подтверждали секвенированием.

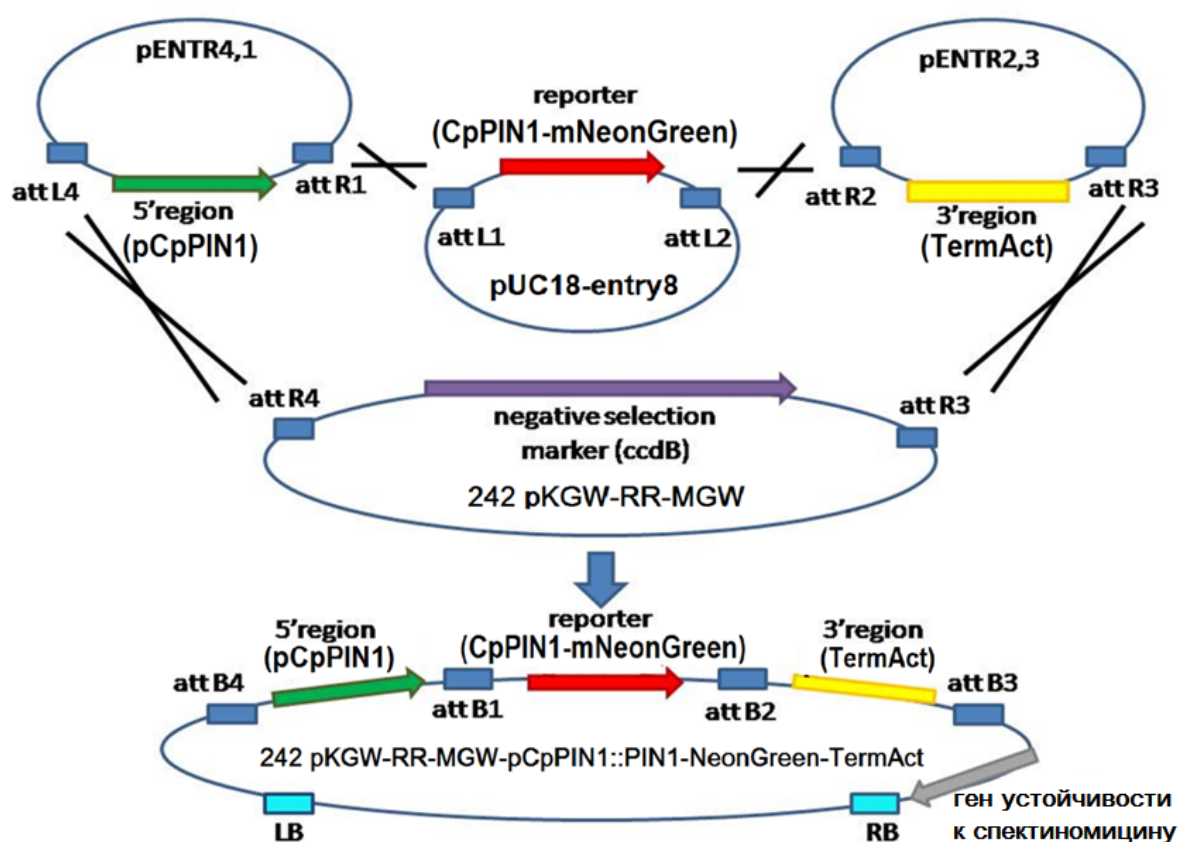


Рисунок 12 – Схема системы клонирования Gateway™ Thermo Fisher Scientific

attL, attR – сайты рекомбинации; LB – левая граница тДНК; RB – правая граница тДНК;

2.4 Трансформация растений штаммами *Agrobacterium rhizogenes*

Получение асептического материала

Для получения асептического растительного материала семена кабачка стерилизовали в стерилизационной смеси в течение 8 мин. Затем промывали 3 раза большим количеством dH₂O, подсушивали на фильтровальной бумаге и высевали в

стаканы со стерильным вермикулитом. Семена проращивали в темноте при 25°C в течение 5 дней до появления этиолированного гипокотилия длиной 1,5-2,5 см. Полученные проростки использовали для трансформации штаммами *Agrobacterium rhizogenes*.

Стерилизационная смесь:

96% этанол – 2 части,
33% перекись водорода – 1 часть,
стерильная dH₂O – 1 часть.

Агробактериальная трансформация растений

Трансформацию проростков кабачка проводили по ранее разработанному протоколу (Pina *et al.* 2012). Использовали пятидневные проростки, выращенные в темноте, с этиолированным гипокотилем длиной примерно 1,5–2,5 см. У каждого проростка удаляли корни на уровне гипокотилия, а на срез наносили биомассу агробактерий штамма R1000, несущих ранее созданный вектор. Инокулированные проростки высаживали в квадратные чашки Петри на скосы агаризованной среды Мурасиге-Скуга, разведённой в 2 раза ($\frac{1}{2}$ MS) (Murashige, Skoog. 1962) и накрывали стерильной фильтровальной бумагой для предотвращения выпадения проростков. Чашки по периметру заклеивали микроповым скотчем. После 5 дней ко-культивации с агробактериями при 21°C и световом режиме 16/8 ч (день/ночь) происходила отмывка от бактериальной массы 50 мкМ водным раствором нитрата серебра, с последующим высаживанием растений для укоренения на среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащую антибиотик цефотаксим (1 мг/л). Проростки накрывали антибактериальной фильтровальной бумагой. Через несколько дней после отмывки из каллуса на месте инокуляции с агробактериями развивались первые корни. После этого, трансформированные проростки высаживали в стерильный вермикулит, пропитанный однократной средой Хоагганда (Hoagland, Arnon. 1950). Дальнейшую культивацию трансформантов кабачка проводили в нестерильных условиях.

Среда $\frac{1}{2}$ MS (1л, pH 5,6):

Смесь солей для MS (Duchefa, Нидерланды) – 0,22 г,
1% сахара,
0,8% агар-агар.

Среда Хоагганда (на 1л):

1 М КН₂РO₄ – 4 мл
1 М КNО₃ – 20 мл
1 М Са(NО₃)₂ – 20 мл
1 М MgSO₄ – 8 мл
Microelements (H₃BO₄ (2.86 g/l), 9 mM MnCl₂ (1.81 g/l), ZnSO₄ x 7H₂O (0.22 g/l), CuSO₄ x 5H₂O (0.08 g/l), Na₂MoO₄ x 2H₂O (0.025 g/l), 100 mkM CoCl₂ x 6H₂O (0.025 g/l)– 4 мл
0,1 М Fe-EDTA – 4 мл

Отбор трансгенных корней для локализации PIN1 в кончике корня кабачка

Трансгенные корни, несущие T-ДНК вектора 242 pKGW-RR-MGW с кассетой *pCpPIN1::CpPIN1-NeonGreen* отбирали по флуоресценции белка DsRED с использованием узкополосного набора фильтров 43 HE (возбуждение 550/25 нм, эмиссия 605/70 нм) под стереоскопическим флуоресцентным микроскопом SteREO Lumar.V12. Скрининговая кассета pUBQ10::DsRED находится в пределах T-ДНК вектора 242 pKGW-RR-MGW. Отбирали только такие корни, в которых наблюдали свечение скринингового белка DsRED одновременно и в коре, и в тканях центрального цилиндра

Отбор корней для дальнейшего проведения иммулокализации PIN1 так же проводился по флуоресценции белка DsRED. Трансгенные растения кабачка, содержащие генетический конструктор 242 pKGW-RR-MGW-DR5::NLS-GFP-GUS-T35S, были предоставлены сотрудниками лаборатории клеточных и молекулярных механизмов развития растений.

2.5 Методы микроскопии

Пробоподготовка материала для локализации кодирующей последовательности PIN1, слитой с флуоресцентным белком mNeonGreen

Фиксация материала

Кончики корня длиной 8 мм отрезали и фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксатор был приготовлен согласно протоколу (McLean, Nakane. 1974), модифицированному Brian Lin (Tufts University, Boston, MA, США). Для удаления воздуха из тканей растительный материал в емкостях с фиксатором помещали в эксикатор под вакуум (-1 атм) на 5 мин, затем вакуум снимали, процедуру повторяли 7–8 раз. После фиксации материал промывали 3 раза в 0,02 М фосфатным буфером, содержащим L-лизин.

Состав фиксатора:

1% параформальдегид
5% диметилсульфоксид (DMSO)
0,1 М L-лизин
0,01 М м-периодат натрия
0,1 М фосфатный буфер pH=8

Приготовление препаратов

После фиксации растительный материал помещали в резиновые формы в расплавленную 2% агарозу при температуре около 60°C. Для приготовления продольных срезов кончики корня ориентировали параллельно дну формы. Готовые агарозные блоки

наклеивали на плоские металлические держатели секундным цианакрилатным клеем Супер момент (Хенкель, Россия). Продольные срезы получали в водной среде с использованием автоматического прецизионного микротомы с вибрирующим лезвием Microm HM-650V (Thermo Fisher Scientific, Microm International, Германия). Толщина среза – 65 мкм. После порезки срезы перекладывали в дистиллированную воду (pH=8) с добавлением коммерческого флуоресцентного красителя SCRI Renaissance 2200 (Renaissance Chemicals, Великобритания) в соотношении 1:1000. Этот краситель специфично связывается с полисахаридами клеточной стенки. Срезы монтировали на предметные стекла SuperFrost (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel, Германия) в последовательном порядке и заключали в просветляющую смесь ClearSee (Nagaki *et al.* 2017). Покровные стёкла фиксировали по периметру лаком для ногтей.

ClearSee:

10% Ксилитол

15% Натрий дезоксихолат

25% Мочевина

0,02М PBS, pH=8

Документация и анализ препаратов

Анализ препаратов и получение иллюстраций проводили с применением конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) с использованием объективов Plan-Apochromat 20x/0,8 и 40x/1,3. Для получения изображения выбрана стратегия последовательного сканирования треков. Для детекции репортерного флуоресцентного белка mNeonGreen использовали лазер с длиной волны 488 нм, флуоресцентный сигнал собирали в диапазоне 490–525 нм на 32-канальном GaAsP детекторе. Тот же лазер и канал использовали для выявления неокрашенных структур на срезах с применением дифференциального интерференционного контраста. Клеточные стенки, окрашенные SCRI Renaissance 2200 (Renaissance Chemicals, Великобритания), визуализировали в отдельном треке с диапазоном 415–492 нм при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм.

Пробоподготовка материала для иммунолокализации белка PIN1

Фиксация материала

Кончики корней длиной 8 мм отрезали и фиксировали (условия фиксации описаны в главе 0). После фиксации материал промывали 3 раза в 1/10 MTSB буфере.

Состав фиксатора:

3% параформальдегид (Sigma)

0,1% глутаровый альдегид (Sigma)
0,2% Tween-20 (Sigma)
0,2% Triton X-100 (Sigma)
10% диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma)
1/10 буфер, стабилизирующий микротрубочки (MTSB) pH=6,9

MTSB буфер:
50mM PIPES
5mM MgSO₄·7H₂O
5mM EGTA, pH=6,9

Далее проводили обезвоживание растительного материала в сменах этилового спирта повышающейся концентрации, начиная с 20% до 70% с шагом в 10%, в каждой смене корни держали по одному часу. Растительный материал хранили в 70% спирте при +4°C.

Приготовление препаратов

Кончики корней после дегидратации проводили по обратному градиенту концентрации спиртов (условия те же, что и в 2.5.2.1) до воды, затем монтировали в резиновые формы в расплавленную 2% агарозу при температуре около 60°C. Далее срезы готовили как в 0. Полученные срезы инкубировали в растворе ферментов, разрушающих клеточную стенку, в течение 30 мин при +37°C. Срезы отмывали охлажденным буфером TBS, pH7.3 (+4°C) 2 раза по 5 мин, а затем обрабатывали пермеабилзирующим буфером и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин. Срезы отмывали дистиллированной водой комнатной температуры 3 раза по 10 мин. Затем срезы обрабатывали блокирующим буфером, в течение 1 часа при комнатной температуре. На срезы наносили раствор первичных антител против флуоресцентного белка GFP, полученных от крысы, (Chromotek, США) или первичных антител против белка AtPIN1, полученных от кролика, которые были любезно предоставлены профессором Klaus Palme (Institute of Biology II (Botany), University of Freiburg, Германия). Антитела к GFP разводили в соотношении 1:500, антитела к AtPIN1 – 1:750 в 1/3 MTSB с 2% ацетилированным БСА и 0,1% БСА.

Раствор ферментов, разрушающих клеточную стенку:

1% Целлюлоза
0,5% Пектиназа
в 0,02 М TBS, pH=7,3

Пермеабилзирующий буфер:

2% Nonidet P40
10% DMSO
в 0,02 М TBS, pH=7,3

Блокирующий буфер:

5% Бычий сывороточный альбумин
0, 2% Желатин из холодноводных рыб
в 0,02 М ТBS, рН=7,3

Срезы инкубировали в растворе двое суток при +4°C, после чего переносили на 1 час на +37°C. Далее срезы промывали 0,02 М ТBS 2 раза по 4 часа при +4°C и обрабатывали вторичными антителами против первичных антител крысы, конъюгированных с флуоресцентным белком Alexa Fluor 546, и против антител кролика, конъюгированных с флуоресцентным белком Alexa Fluor 488, в соотношении 1:500. Все остальные условия были аналогичны условиям обработки срезов первичными антителами. Срезы инкубировали с вторичными антителами в течение 5 суток, далее срезы промывали 0,02 М ТBS 4 раза по 1 ч при комнатной температуре.

Срезы монтировали на предметные стекла SuperFrost (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel) и заключали под покровные стекла в просветляющую смесь ClearSee (65 мкл). Покровные стёкла фиксировали по периметру лаком для ногтей.

Документация и анализ препаратов

Получение изображений проводили на том же оборудовании, которое было описано в главе 0. Для детекции Alexa Fluor 546 использовали лазер с длиной волны 561 нм, флуоресцентный сигнал собирали в диапазоне 550-600 нм на 32-канальном GaAsP детекторе. Ядра, окрашенные DAPI, визуализировали в отдельном треке с диапазоном 400-490 нм при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург). Секвенирование образцов выполнено в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Пушкин).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Поиск и идентификация нуклеиновой последовательности ортолога гена PIN1 *Arabidopsis thaliana* у *Cucurbita pepo*

С использованием алгоритма выравнивания для белковых последовательностей BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for proteins) в протеоме огурца (*Cucumis sativus*) было найдено 8 PIN белков, а у кабачка (*Cucurbita pepo*) - 14. У *Arabidopsis* известно 8 PIN белков (Kramer, Bennett. 2006; Grunewald, Friml. 2010). Число PIN белков кабачка почти в два раза превышает число этих же белков у огурца, что объясняется полногеномной дупликацией, произошедшей около 30 миллионов лет назад у общего предка рода *Cucurbita* (Montero-Pau *et al.* 2018).

Сравнительный филогенетический анализ PIN белков *Arabidopsis*, огурца и кабачка показал, что у видов семейства Тыквенные можно идентифицировать 6 клад PIN белков (Рисунок 12). Клады PIN2 и PIN5 включают в себя по одному белку огурца и кабачка. В кладе, содержащей белки AtPIN3, AtPIN4 и AtPIN7, сложно однозначно определить какие из белков семейства Тыквенные относятся к конкретным белкам *Arabidopsis*, у огурца в данной кладе содержится два белка, а у кабачка четыре. Возможно, у тыквенных отсутствует ортолог одного из трёх, указанных выше, PIN белков *Arabidopsis*. Клада PIN8 состоит из трёх белков относящихся к тыквенным: одного у огурца и двух у кабачка. Клада, содержащая ортологи белка AtPIN1 может быть разделена на две подгруппы PIN1-like и SoPIN1.



Рисунок 13 – Филогенетическое дерево PIN белков *Arabidopsis*, огурца (*Cucumis sativus*) и кабачка (*Cucurbita pepo*)

Сравнительный филогенетический анализ PIN белков *Arabidopsis*, огурца (*C. sativus*) и кабачка (*C. pepo*) был проведён с использованием программного обеспечения MEGA7.0 при помощи метода максимального правдоподобия (the Maximum Likelihood method) на основе модели Jones-Taylor-Thornton (JTT) с параметрами, оценивающими как различие частот аминокислотных замен в разных позициях (+G) так и долю консервативных аминокислотных позиций (+I). В качестве внешней группы использована последовательность PIN белка ели (*Picea abies*) - MA_100472g0010. Для идентификации группы SoPIN1 у Тыквенных были взяты белки томата (*Solanum lycopersicum*) - Solyc10g078370.1.1 (SoPIN1a) и Solyc10g080880.1.1 (SoPIN1b). Значение бутстреп поддержки - 1000. Масштабная линейка - число аминокислотных замен на сайт. ID генов: AT, *A. thaliana* с сайта TAIR; Csa, *C. sativus* Chinese Long v.2 и Cp, *C. pepo* с сайта Cucurbit Genomics Database; Solyc, *S. lycopersicum* с сайта Phytozome v. 12.1

Для идентификации группы SoPIN1 у Тыквенных были использованы аминокислотные последовательности белков томата (*Solanum lycopersicum*) Solyc10g078370.1.1 (SoPIN1a) и Solyc10g080880.1.1 (SoPIN1b), входящие в эту подгруппу (Martinez *et al.* 2016). В подгруппе SoPIN1 содержится один белок огурца и два белка кабачка, а в подгруппе PIN1-like – два белка огурца и три белка кабачка.

Для данной работы особый интерес представляли белки PIN3, PIN4 и PIN6, так как в работе Watanabe *et al.* (2012) показано, что мРНК генов этих белков локализуется в примордиях боковых корней у огурца. Для поиска и идентификации ортолога у кабачка был выбран белок PIN4 огурца (ID AB539051).

В результате поиска в базах данных по аминокислотной последовательности белка PIN4 огурца было выявлено два его гомолога у кабачка: ID Cp4.1LG00g01890 с 86,2%

идентичности и 89% консенсусных позиций; ID Cr4.1LG19g02490 с 92,9% идентичности и 94,9% консенсусных позиций. Для дальнейшего анализа нами был выбран ген ID Cr4.1LG19g02490, так как обладал наибольшим процентом гомологии с белком PIN4 огурца. На основе проведенного филогенетического анализа можно заключить, что данный белок входит в кладу белков SoPIN1 (Рисунок 13).

3.2 Создание генетических конструкций для анализа локализации белка PIN1

Подбор праймеров для клонирования промоторной и кодирующей последовательности *PIN1* кабачка

Для клонирования промоторной и кодирующей последовательности *PIN1* кабачка были подобраны праймеры (Таблица 4). Подбор праймеров осуществляли, следуя правилам (Primer guidelines, Howard Judelson). С помощью программы Vector NTI™ Advance 11 праймеры были проверены

ПЦР с праймерами к промоторной последовательности *PIN1* кабачка

В ходе клонирования промотора гена *CrPIN1* продукты ПЦР выделяли из геля, лигировали кодирующую последовательность с вектором pJET1.2, промоторную последовательность с вектором ввода Gateway-системы 369_pENTRattL4attR1_BSAI. Продукты лигирования промоторной и кодирующей последовательностей с векторами трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Наличие целевой вставки определяли методом ПЦР с колонией. Из отобранных колоний получали жидкую культуру и выделяли плазмидную ДНК.

ПЦР для определения ориентации вставки проводили на матрице с выделенной плазмидной ДНК из отобранных колоний *E.coli*. Положение вставки, когда 5`-конец примыкает к attL4 сайту, а 3`-конец – к сайту attR1 будет обозначена как правильная ориентация, обратное положение как противоположная ориентация вставки. В одном варианте ПЦР в реакционную смесь добавлялись праймеры M13_forward и pPIN1_reverse, что соответствовало правильной ориентации вставки, в другом варианте использовали праймеры M13_forward и pPIN1_forward для противоположной ориентации вставки.

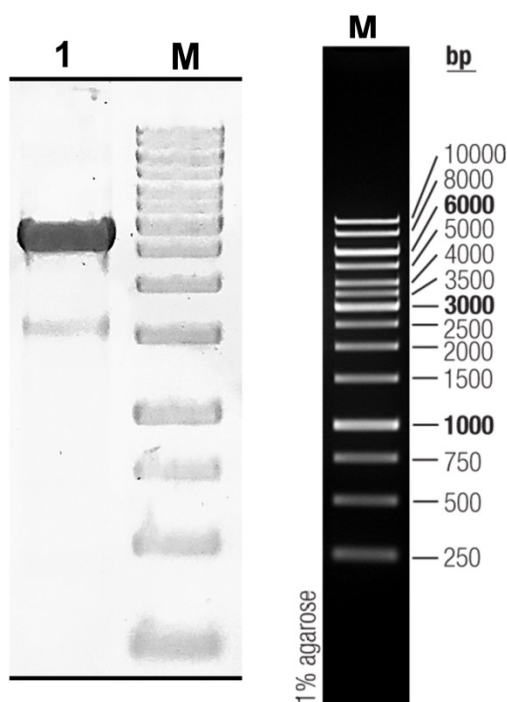


Рисунок 14 – Проверка специфичности работы праймеров для промоторной последовательности гена *CpPIN1* кабачка

1 – результат ПЦР с праймерами к промоторной последовательности гена *CpPIN1*, 2881 п.о. М – молекулярный маркер веса (Thermo Fisher Scientific, 1000 п.о.).

Проверка ориентации вставки последовательности промотора *CpPIN1* в вектор 369_pENTRattL4attR1_BSAI

В целях подтверждения наличия вставки промотора *CpPIN1* в плазмидную ДНК вектора pENTR4-1 проводили ПЦР с праймерами pCpPIN1_forward и pCpPIN1_reverse. Результаты ПЦР подтвердили наличие вставки последовательности промотора *CpPIN1* в вектор pENTR4-1. Результаты секвенирования также подтвердили соответствие вставки и последовательности из базы данных.

ПЦР с кДНК и праймерами к кодирующей последовательности PIN1 кабачка

Для клонирования кодирующей последовательности гена *CpPIN1*, который содержит 5 интронов, необходимо получение мРНК этого гена. После выделения общей РНК, ее качество и количество оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле и с помощью флуориметра Qubit. Далее, 1 мкг общей РНК использовали для обратной транскрипции и получения кДНК, с которой проводили ПЦР с праймерами к кодирующей последовательности (Таблица 4), продукты ПЦР выделяли из геля, лигировали с вектором pJET1.2 и трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Результаты секвенирования кодирующей последовательности *CpPIN1* подтвердили соответствие вставки нуклеотидной последовательности из базы данных.

ПЦР с перекрывающимися праймерами, плазмидной ДНК и праймерами к кодирующей последовательности и флуоресцентному белку Neon Green.

Для проведения ПЦР с перекрывающимися праймерами в качестве матрицы использовали ранее амплифицированные фрагменты кодирующей последовательности *CpPIN1* и *mNeonGreen*. *CpPIN1* был разделен на две части (1281 п.о. и 507 п.о.), которые позже амплифицировали. Для получения репортерного слияния мембранного белка PIN с флуоресцентным белком, местом вставки репортера, обычно, является гидрофильная цитоплазматическая петля PIN (Рисунок 15) (Benková *et al.* 2003; Vieten *et al.* 2005; Xu, Scheres. 2005; Křeček *et al.* 2009; Mravec *et al.* 2009; Žádníková *et al.* 2010; Bosco *et al.* 2012; Watanabe *et al.* 2012; Bender *et al.* 2013; Sawchuk *et al.* 2013; O'Connor *et al.* 2014; Martinez *et al.* 2016; Yamazaki *et al.* 2016; Pařízková *et al.* 2017; Barbosa *et al.* 2018; Kirschner *et al.* 2018).

Далее продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами выделяли из геля, лигировали кодирующую последовательность *CpPIN1-mNeonGreen* с вектором pUC18-entry8. Продукты лигирования с векторами трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Наличие целевой вставки определяли методом ПЦР с колонией. Из отобранных колоний получали жидкую культуру и выделяли плазмидную ДНК.

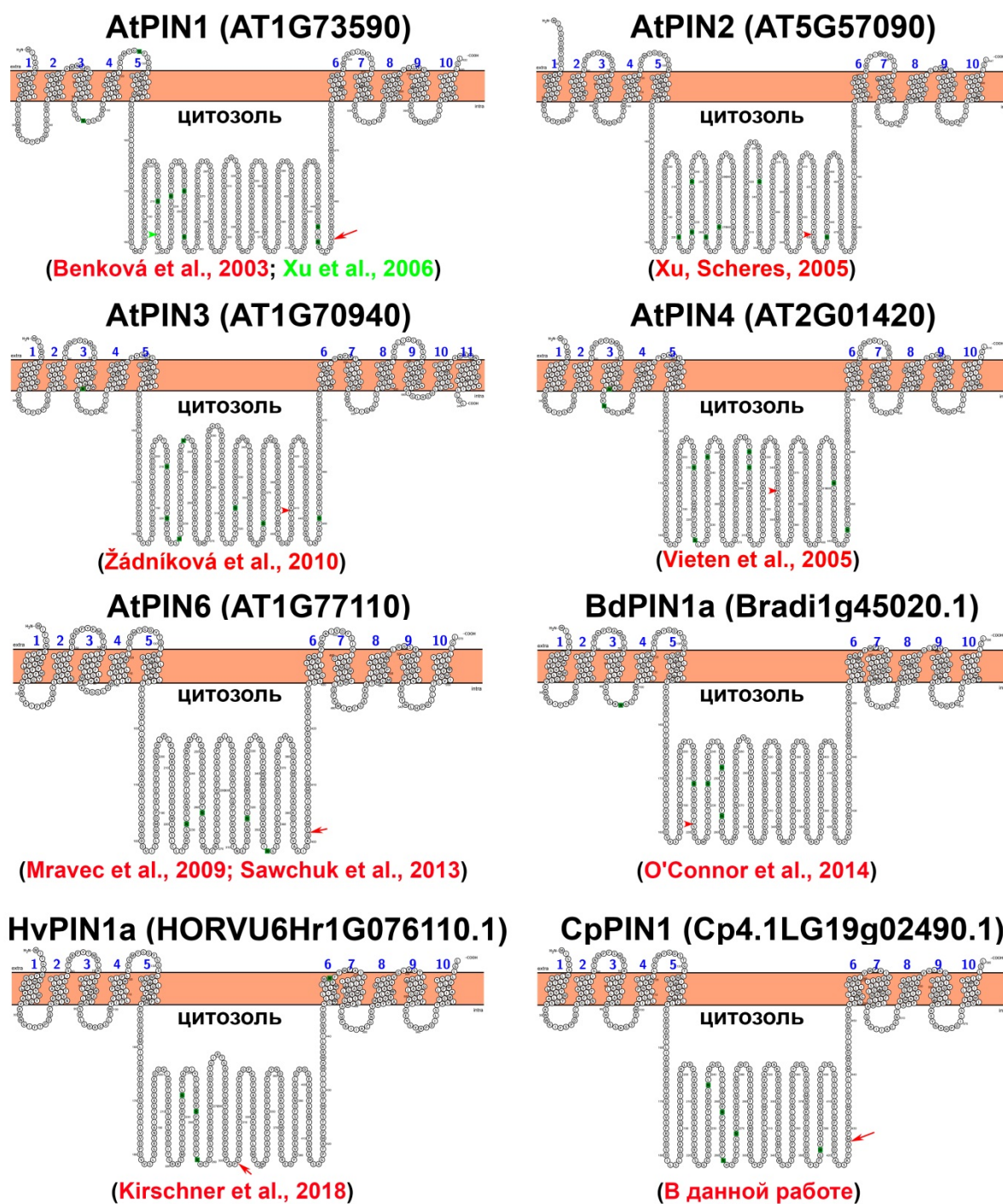


Рисунок 15 – Варианты слияния флуоресцентного белка с PIN белком у *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare* и *Cucurbita pepo*

Стрелками отмечены сайты вставки флуоресцентного белка при репортерном слиянии с белком интереса. ID генов: AT – *A. thaliana* с сайта TAIR; Bradi – *B. distachyon* и HORVU – *H. vulgare* с сайта Phytozome v. 12.1; Cp – *C. pepo* с сайта Cucurbit Genomics Database.

Проверка наличия вставки кодирующей последовательности

В целях подтверждения наличия вставки CpPIN1_CDS::mNeonGreen в плазмидную ДНК вектора pUC18-entry8 проводили ПЦР с праймерами CDS_PIN1_OE_forward1 и CDS_PIN1_OE_reverse2, и рестрикцию по сайтам BamHI, XhoI и XbaI (Рисунок 16). Результаты

секвенирования CpPIN1_CDS::mNeonGreen также подтвердили соответствие вставки нуклеотидным последовательностям из базы данных.

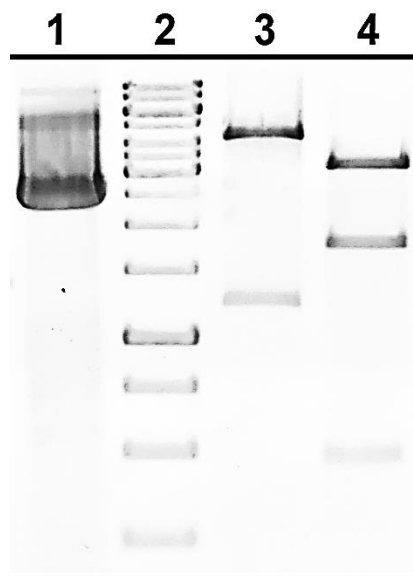


Рисунок 16 – Проверка наличия вставки кодирующей последовательности

1 – результат ПЦП с праймерами к последовательности CpPIN1_CDS::mNeonGreen, 2544 п.о.; 2 – молекулярный маркер веса (Thermo Fisher Scientific, 1000 п.н.); 3 – результат рестрикции по сайтам BamHI, 1430 п.о.; 4 – результат рестрикции по сайтам XhoI и XbaI, 1789 и 389 п.о.

Сборка конечного вектора

С использованием системы клонирования Gateway была получена молекулярно-генетическая конструкция 242 pKGW-RR-MGW-pCpPIN1::PIN1-NeonGreen-TermAct.

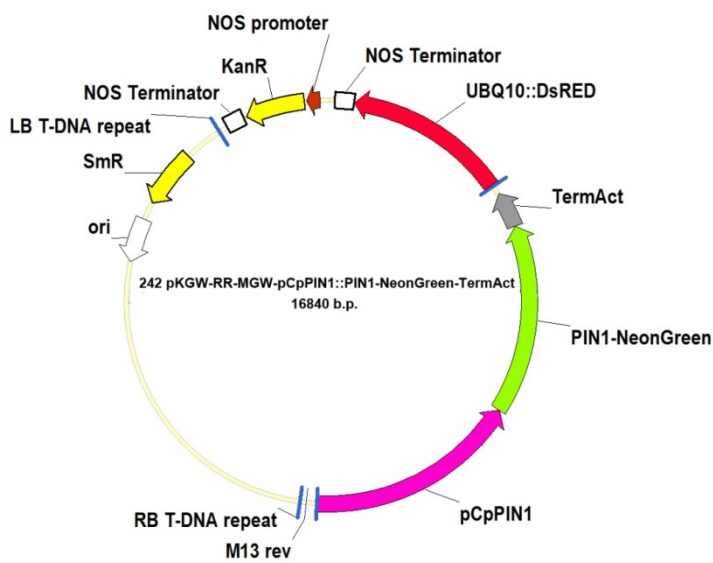


Рисунок 17 – Схема бинарного вектора

pKGW-RR-MGW-pCpPIN1::PIN1-NeonGreen-TermAct в пределах Т-ДНК, содержит скрининговый ген DsRED1 под контролем промотора гена убиквитина Ubq10 (UBQ10::DsRED) и репортерную конструкцию CpPIN1-NeonGreen под контролем промотора pCpPIN1.

Кодирующая часть гена PIN1, слитая с флуоресцентным белком mNeonGreen, была вставлена в вектор ввода pUC18-entry8 (Hornung *et al.* 2005). Промотор гена PIN1 находился в векторе 369 pENTR4-1attL4attR1, а терминатор актина – в векторе 373pENTRattR2attR3. Сборку конечного вектора производили путём LR plus клонозной реакции.

3.3 Локализация белка PIN1 в кончике корня кабачка в связи с анализом его роли в регуляции инициации и развития примордиев

Изучение локализации белка PIN1 в кончике корня кабачка проводилось с помощью двух подходов: визуализации репортерного слияния в трансгенных корнях несущих *pCpPIN1::CpPIN1-mNeonGreen* и иммулокализации с помощью антител против AtPIN1. Иммулокализацию PIN1 проводили в трансгенных корнях кабачка, несущих репортерную конструкцию для визуализации также максимумов клеточного ответа на ауксин (*DR5::GFP-NLS*).

Визуализацию репортерного слияния в трансгенных корнях несущих *pCpPIN1::CpPIN1-mNeonGreen* проводили на продольных вибротомных срезах кончика корня, сделанных в разных планах относительно полюсов проводящих тканей (срез через флоэмный или ксилемный полюс). В корнях, имевших три полюса проводящих тканей (триархных) срез мог пройти одновременно через два полюса, ксилемный и флоэмный.

Анализ таких срезов показал, что CpPIN1 локализуется на мембране клеток центрального цилиндра и коры, но отсутствует в корневом чехлике и ризодерме (Рисунок 18). Плотность белка CpPIN1, и вероятнее всего, уровень его экспрессии, были наиболее высокими на мембранах клеток центрального цилиндра. Кроме того, CpPIN1 локализуется в примордиях бокового корня, изменяя свой паттерн распределения на мембране по мере их развития (Рисунок 19 Г–Ж). У основания примордия наблюдается активная перестройка CpPIN1, а ближе к центру – увеличение его концентрации на мембранах соседних клеток. Скорее всего, это является необходимым для направленного транспорта ауксина в соседние клетки с целью вовлечения их в формирование примордия.

Так как соотнести локализацию CpPIN1 в растениях, несущих генетическую конструкцию *pCpPIN1::CpPIN1-NeonGreen*, с самыми ранними этапами инициации бокового корня оказалось затруднительно, было решено провести иммулокализацию этого белка в корнях растений несущих репортерную конструкцию для визуализации максимумов клеточного ответа на ауксин (*DR5::GFP-NLS*). Для этого использовали антитела полученные против белка PIN1 Arabidopsis.

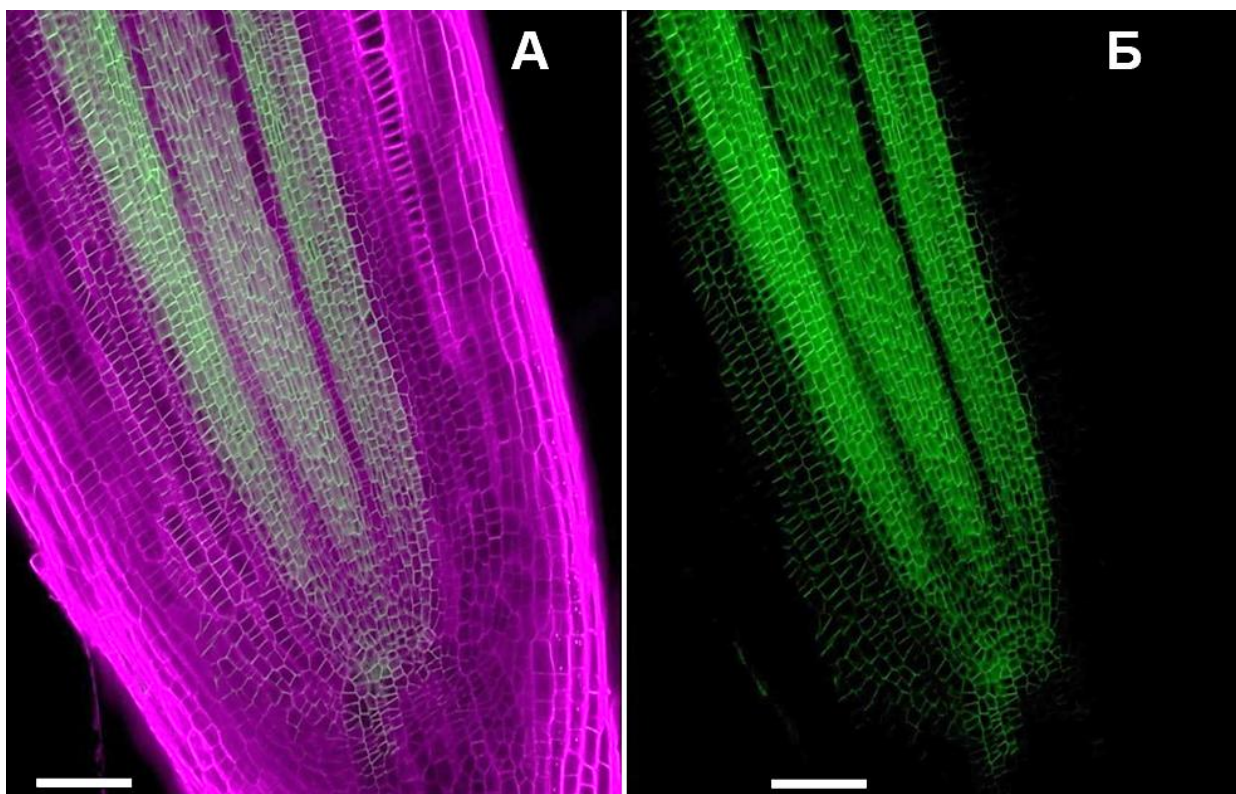


Рисунок 18 – Локализация распределения SrPIN1 в кончике корня кабачка

Общий вид корня трансгенного корня кабачка толщиной 65мкм. Продольный срез через флоэмный полюс. А – комбинация зеленого (SrPIN1) и пурпурного каналов (клеточные стенки), Б – визуализация SrPIN1. Наибольший уровень флуоресценции репортера в клетках центрального цилиндра, в рядах клеток коры уровень флуоресценции значительно ниже. Масштабная линейка 100 мкм.

Иммулокализация AtPIN1 в корнях кабачка показала, что в клетке протоксилемы, прилегающей к примордиям на стадии I (завершены первые антиклинальные деления), белок SrPIN1 перераспределяется на ее латеральную часть, направляя ток ауксина в соседние клетки перицикла I, создавая в них максимум клеточного ответа на ауксин (Рисунок 20 А, Б). Именно эта клетка протоксилемы задает центральную ось примордия. В клетках перицикла I и II так же наблюдается изменение паттерна распределения SrPIN1: белок перераспределяется на смежные плазматические мембраны соседних в продольном ряду клеток (Рисунок 20 А, Б).

В примордии на стадии II, после первого периклиналичного деления, SrPIN1 в клетках протоксилемы возвращается к своему типичному расположению – на мембране апикальной части клетки. В клетках перицикла I этот белок перераспределяется на мембраны обращенные к центру примордия, вероятно так же для направления тока

ауксина в клетки перцикла II, в которых теперь тоже наблюдается максимум клеточного ответа на ауксин (Рисунок 20 В, Г).

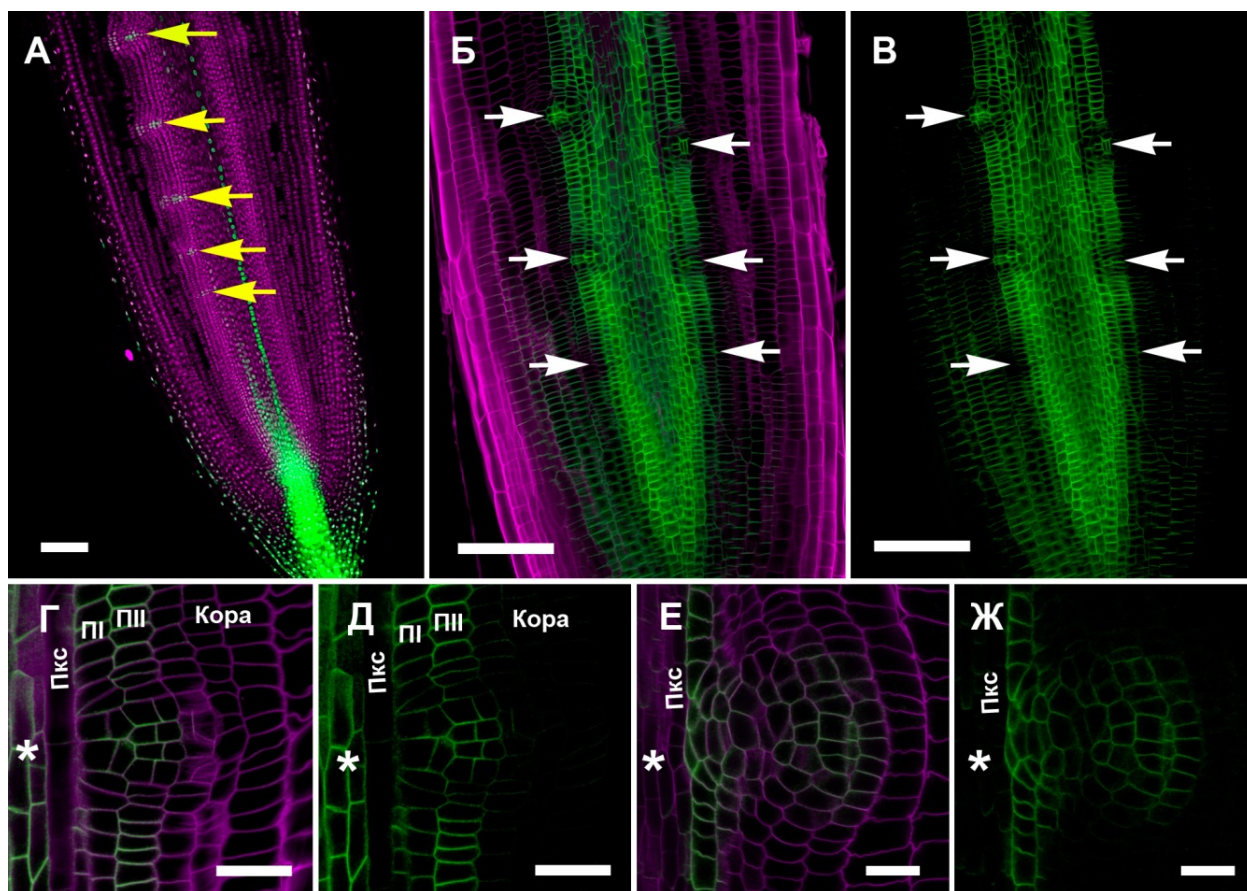


Рисунок 19 – Визуализация распределения максимумов клеточного ответа на ауксин (А) и локализации CrPIN1 в кончике корня кабачка (Б–Ж)

Продольный срез через ксилемный полюс трансгенных корней кабачка, несущих (А) *DR5::GFP-NLS* и (Б–Ж) *pCrPIN1::CrPIN1-mNeonGreen*. Стрелками показаны примордии. А–В – Общий вид кончика корня с развивающимися примордиями. А – ядра клеток с максимумом ответа на ауксин – зеленый канал, ДНК ядер – пурпурный канал. Б–Ж – CrPIN1 – зеленый канал, клеточные стенки – пурпурный канал; Б, В – показан общий вид паттерна CrPIN1 в кончике корня; Г, Д – примордий на стадии II, удаление 400 мкм от инициальных клеток рядов, завершены первые периклиальные деления, CrPIN1 направляют ток ауксина к клеткам в центре примордия; Е, Ж – примордий на стадии V, удаление 600 мкм от инициальных клеток рядов, отсутствие CrPIN1 в стеллярной паренхиме (звездочка). Пкс – протоксилема, ПII, ПIII – слои перцикла, звездочка – стеллярная паренхима центрального цилиндра. Масштабная линейка: А–В – 100 мкм; Г–Ж – 25 мкм.

Проведенный анализ распределения белка CrPIN1 в кончике корня кабачка показал, что выявленный паттерн распределения белка CrPIN1 схож с паттерном распределения белка PIN1 *Arabidopsis*. Исходя из этих данных, можно предположить, что белок CrPIN1, является ортологом белка PIN1 *Arabidopsis*, а не PIN4, как изначально предполагалось, основываясь на номенклатуре PIN белков огурца (Watanabe *et al.* 2012).

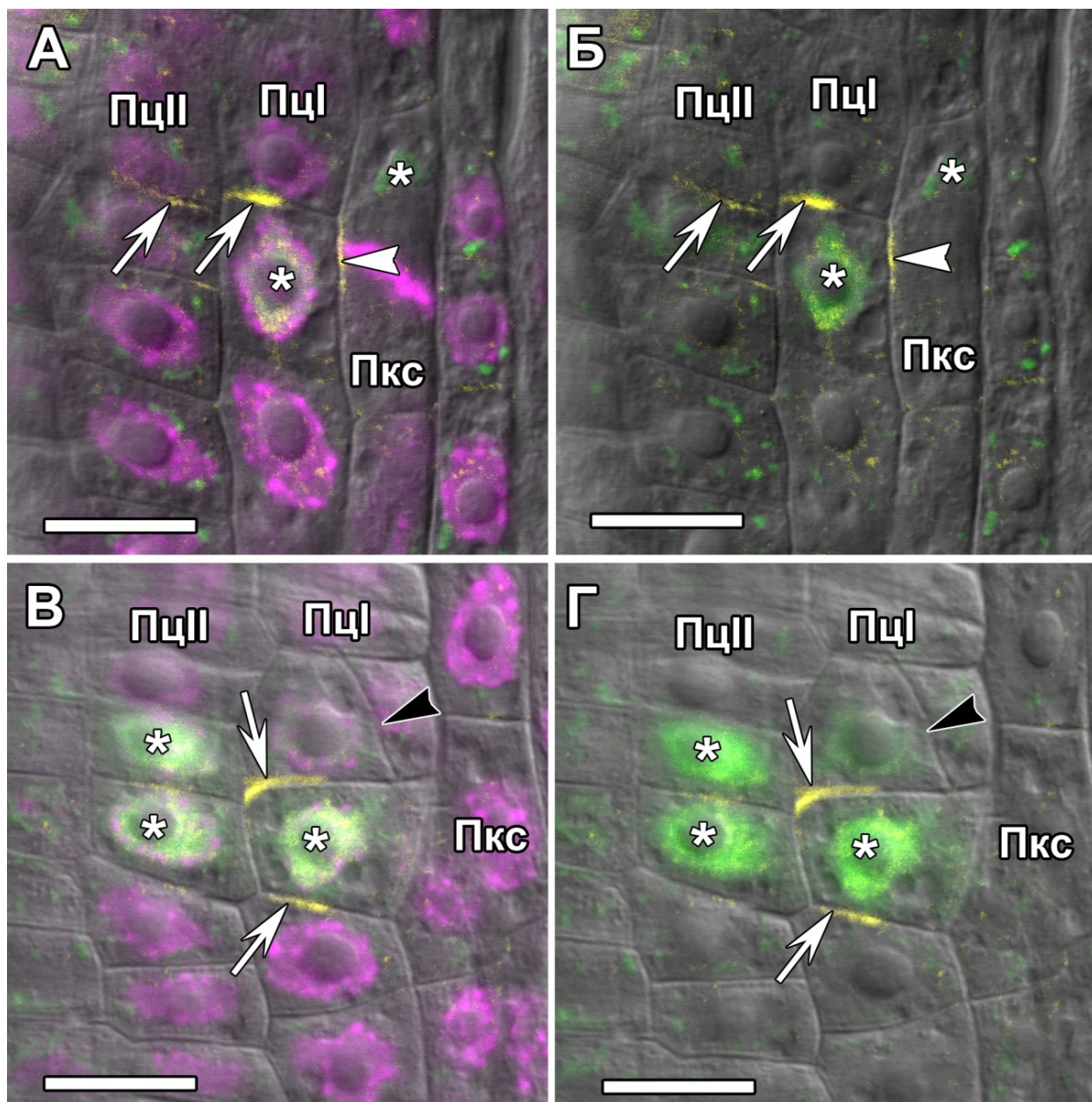


Рисунок 20 – Иммулокализация PIN1 и максимумов клеточного ответа на ауксин в кончике трансгенного корня кабачка, несущего *DR5::GFP-NLS*

Продольные вибраторные срезы толщиной 65 мкм. Примордий бокового корня на стадии I (А–Б), на стадии II (В–Г). PIN1 – желтый канал, ядра клеток с максимумом клеточного ответа на ауксина – зеленый канал, ДНК ядер – пурпурный канал. Аккумуляция PIN1 в центральной части латеральной стенки протоксилемы – головка стрелки, перераспределение PIN1 на смежные мембраны соседних клеток в рядах перикликла – белые стрелки. Периклиналильное деление во внутреннем слое перикликла – черная стрелка. Клетки с максимумом ответа на ауксин (DR5) – звездочки. Масштабная линейка 10мкм

Заключение

В работе был проведен поиск ортолога белка PIN4 огурца у кабачка (*Cucurbita pepo*) с использованием баз данных Phytozome, Cucurbit Genomics Database и алгоритма BLAST (cucurbitgenomics.org). Сравнение белковых и нуклеотидных последовательностей показало высокий процент гомологии белков PIN4 у огурца и у кабачка.

Были подобраны праймеры для клонирования промоторной и кодирующей последовательностей гена *CpPIN1*. Для локализации *CpPIN1* в кончике корня кабачка была создана генетическая конструкция рKGW-RR-MGW-pCpPIN1::PIN1-NeonGreen-TermAct и проведена иммулокализация белка, с помощью антител против AtPIN1, на трансгенных корнях кабачка, несущих репортерную конструкцию для визуализации максимумов клеточного ответа на ауксин (*DR5::GFP-NLS*). Анализ продольных срезов кончиков корней кабачка, содержащих вставку рCpPIN1::PIN1-NeonGreen-TermAct, показал, что паттерн распределения белка CpPIN1 на мембране клеток аналогичен паттерну распределения белка PIN1 у *Arabidopsis*. Иммулокализация AtPIN1 в корнях кабачка показала, что PIN1, перераспределяясь на мембране, направляет ток ауксина в соседние клетки, создавая в них максимум клеточного ответа на ауксин.

В процессе работы были освоены методы выделения плазмидной и геномной ДНК, выделения общей РНК, методы ПЦР, ПЦР с колоний, ПЦР с перекрывающимися праймерами и ПЦР с обратной транскрипции, технология клонирования Gateway, трансформация клеток *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes*, агробактериальная трансформация проростков кабачка, иммулокализация растений, освоена техника приготовления продольных и поперечных с помощью микротомы с вибрирующим лезвием, освоена техника лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Выводы

- 1) Геном кабачка (*Cucurbita pepo*) содержит два гомолога белка PIN4 огурца, один из которых обладает наибольшим сходством аминокислотной последовательности с таковой у PIN4 огурца.
- 2) В корне кабачка белок CrPIN1 (гомолог белка PIN4 огурца) локализуется в клетках центрального цилиндра и коры, и имеет сходное распределение с PIN1 *Arabidopsis*.
- 3) Белок PIN1 способствует созданию максимума концентрации ауксина при инициации и на ранних стадиях образования примордия бокового корня кабачка.

Список литературы

1. Baluška F., Mancuso S. Root apex transition zone as oscillatory zone // *Frontiers in Plant Science*. – 2013. – Vol. 4, N 354. –
2. Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W. Specialized zones of development in roots: View from the cellular level // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 112, N 1. – P. 3-4.
3. Barbez E., Kubeš M., Rolčik J., Béziat C., Pěňčík A., Wang B., *et al.* A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants // *Nature*. – 2012. – Vol. 485, N – P. 119.
4. Barbosa I.C.R., Hammes U.Z., Schwechheimer C. Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation // *Trends in Plant Science*. – 2018. – Vol. doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.009N –
5. Bender R.L., Fekete M.L., Klinkenberg P.M., Hampton M., Bauer B., Malecha M., *et al.* PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development // *The Plant Journal*. – 2013. – Vol. 74, N 6. – P. 893-904.
6. Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., *et al.* Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation // *Cell*. – 2003. – Vol. 115, N 5. – P. 591-602.
7. Bennett T., Brockington S.F., Rothfels C., Graham S.W., Stevenson D., Kutchan T., *et al.* Paralogous Radiations of PIN Proteins with Multiple Origins of Noncanonical PIN Structure // *Molecular Biology and Evolution*. – 2014. – Vol. 31, N 8. – P. 2042-2060.
8. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., *et al.* The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots // *Nature*. – 2005. – Vol. 433, N 7021. – P. 39-44.
9. Bosco C.D., Dovzhenko A., Liu X., Woerner N., Rensch T., Eismann M., *et al.* The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis // *The Plant Journal*. – 2012. – Vol. 71, N 5. – P. 860-870.
10. Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., *et al.* Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation // *The Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13, N 4. – P. 843-852.
11. Celenza J.L., Grisafi P.L., Fink G.R. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* // *Genes & Development*. – 1995. – Vol. 9, N 17. – P. 2131-2142.
12. De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frey N.F.D., Laplaze L., Casimiro I., *et al.* Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis* // *Development*. – 2007. – Vol. 134, N 4. – P. 681-690.
13. Demchenko K.N., Demchenko N.P. Changes of root structure in connection with the development of lateral root primordia in wheat and pumpkins // *Recent Advances of Plant Root Structure and Function: Proceedings of the 5th International Symposium on Structure and Function of Roots*. Stará Lensná, Slovakia, 30 August – 4 September, 1998

- / Gašparíková O., Čiamporová M., Mistrík I., Baluška F. Dordrecht: Springer Netherlands, – 2001. – P. 39-47.
14. Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.-D., *et al.* Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis* // *Current Biology*. – 2007. – Vol. 17, N 6. – P. 520-527.
 15. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., *et al.* Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root // *Development*. – 1993. – Vol. 119, N 1. – P. 71-84.
 16. Du Y., Scheres B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 69, N 2. – P. 155-167.
 17. Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., *et al.* Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, N 25. – P. 8790-8794.
 18. Dubrovsky J.G.G. Clonal analysis reveals gradual recruitment of lateral root founder cells and a link between root initiation and cambium formation in *Arabidopsis thaliana* // *bioRxiv*. – 2018. – Vol. doi: 10.1101/283366N – P. 283366.
 19. Esau K. *Anatomy of seed plants* / New York, Santa Barbara, London, Sydney, Toronto: J. Wiley and Sons, – 1977. – p.
 20. Farcot E., Yuan Y. Homogeneous auxin steady states and spontaneous oscillations in flux-based auxin transport models // *SIAM Journal on Applied Dynamical Systems*. – 2013. – Vol. 12, N 3. – P. 1330-1353.
 21. Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., *et al.* A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux // *Science*. – 2004. – Vol. 306, N 5697. – P. 862-865.
 22. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – Vol. 14, N 7. – P. 685-695.
 23. Geldner N., Friml J., Stierhof Y.-D., Jürgens G., Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking // *Nature*. – 2001. – Vol. 413, N 6854. – P. 425-428.
 24. Grunewald W., Friml J. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells // *The EMBO Journal*. – 2010. – Vol. 29, N 16. – P. 2700-2714.
 25. Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., De Almeida Engler J., Inzé D., Beeckman T. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14, N 10. – P. 2339-2351.
 26. Hoagland D.R., Arnon D.I. *The water-culture method for growing plants without soil* // *Circular*. California Agricultural Experiment Station. – 1950. – Vol. 347, N 2nd edit. – P. 32 pp.
 27. Hornung E., Krueger C., Pernstich C., Gipmans M., Porzel A., Feussner I. Production of (10*E*,12*Z*)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2005. – Vol. 1738, N 1-3. – P. 105-114.
 28. Horton R.M., Ho S.N., Pullen J.K., Hunt H.D., Cai Z., Pease L.R. Gene splicing by overlap extension // *Methods in Enzymology* / Academic Press, – 1993. – P. 270-279.
 29. Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Semenova V.A., Demchenko N.P., Pawlowski K., Demchenko K.N. Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of *Cucurbita pepo*: is auxin a key player? // *Ann Bot*. – 2018. – Vol. 122, N 5. – P. 873-888.
 30. Jiang Z., Li J., Qu L.-J. *Auxins* // *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* / Li J., Li C., Smith S.M.: Academic Press, – 2017. – P. 39-76.
 31. Jones A.M. Auxin transport: down and out and up again // *Science*. – 1998. – Vol. 282, N 5397. – P. 2201-2202.

32. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences // *Computer Applications in the Biosciences*. – 1992. – Vol. 8, N 3. – P. 275-282.
33. Kamada M., Yamasaki S., Fujii N., Higashitani A., Takahashi H. Gravity-induced modification of auxin transport and distribution for peg formation in cucumber seedlings: possible roles for CS-AUX1 and CS-PIN1 // *Planta*. – 2003. – Vol. 218, N 1. – P. 15-26.
34. Kirschner G.K., Stahl Y., Imani J., Von Korff M., Simon R. Fluorescent reporter lines for auxin and cytokinin signalling in barley (*Hordeum vulgare*) // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. e0196086.
35. Kleine-Vehn J., Friml J. Polar Targeting and Endocytic Recycling in Auxin-Dependent Plant Development // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2008. – Vol. 24, N 1. – P. 447-473.
36. Kramer E.M., Bennett M.J. Auxin transport: a field in flux // *Trends in Plant Science*. – 2006. – Vol. 11, N 8. – P. 382-386.
37. Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., *et al.* The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters // *Genome Biology*. – 2009. – Vol. 10, N 12. – P. 249.
38. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Molecular Biology and Evolution*. – 2016. – Vol. 33, N 7. – P. 1870-1874.
39. Lavenus J., Guyomarc'h S., Laplace L. PIN transcriptional regulation shapes root system architecture // *Trends in Plant Science*. – 2016. – Vol. 21, N 3. – P. 175-177.
40. Li R., Li J., Li S., Qin G., Novák O., Pěňčík A., *et al.* ADP1 affects plant architecture by regulating local auxin biosynthesis // *PLOS Genetics*. – 2014. – Vol. 10, N 1. – P. e1003954.
41. Li Z., Zhang Z., Yan P., Huang S., Fei Z., Lin K. RNA-Seq improves annotation of protein-coding genes in the cucumber genome // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol. 12, N 1. – P. 540.
42. Malamy J.E., Benfey P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* // *Development*. – 1997. – Vol. 124, N 1. – P. 33-44.
43. Martinez C.C., Koenig D., Chitwood D.H., Sinha N.R. A sister of PIN1 gene in tomato (*Solanum lycopersicum*) defines leaf and flower organ initiation patterns by maintaining epidermal auxin flux // *Developmental Biology*. – 2016. – Vol. 419, N 1. – P. 85-98.
44. Montero-Pau J., Blanca J., Bombarely A., Ziarolo P., Esteras C., Martí-Gómez C., *et al.* *De novo* assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus // *Plant Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 16, N 6. – P. 1161-1171.
45. Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter // *Nature*. – 2009. – Vol. 459, N – P. 1136.
46. Nagaki K., Yamaji N., Murata M. ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, N – P. 42203.
47. O'connor D.L., Runions A., Sluis A., Bragg J., Vogel J.P., Prusinkiewicz P., *et al.* A division in PIN-mediated auxin patterning during organ initiation in grasses // *PLOS Computational Biology*. – 2014. – Vol. 10, N 1. – P. e1003447.
48. Omelyanchuk N.A., Kovrizhnykh V.V., Oshchepkova E.A., Pasternak T., Palme K., Mironova V.V. A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root // *BMC Plant Biology*. – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 5.
49. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. Auxin control of root development // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol. 2, N 6. –

50. Pařízková B., Pernisová M., Novák O. What has been seen cannot be unseen - detecting auxin in vivo // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, N 12. – P. 2736.
51. Petrášek J., Friml J. Auxin transport routes in plant development // *Development*. – 2009. – Vol. 136, N 16. – P. 2675-2688.
52. Reed R.C., Brady S.R., Muday G.K. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in arabidopsis // *Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 118, N 4. – P. 1369-1378.
53. Rubery P.H., Sheldrake A.R. Carrier-mediated auxin transport // *Planta*. – 1974. – Vol. 118, N 2. – P. 101-121.
54. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – Vol. 4, N 4. – P. 406-425.
55. Sawchuk M.G., Edgar A., Scarpella E. Patterning of leaf vein networks by convergent auxin transport pathways // *PLOS Genetics*. – 2013. – Vol. 9, N 2. – P. e1003294.
56. Schwarz G. Estimating the dimension of a model // *The Annals of Statistics*. – 1978. – Vol. 6, N 2. – P. 461-464.
57. Shoemaker J.S., Fitch W.M. Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated // *Molecular Biology and Evolution*. – 1989. – Vol. 6, N 3. – P. 270-289.
58. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Mol Syst Biol*. – 2011. – Vol. 7, N 1. – P. 539.
59. Takanashi K., Shitan N., Yazaki K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants // – 2014. – Vol. 31, N – P. 417-430.
60. Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2006. – Vol. 63, N 23. – P. 2738-2754.
61. Tian H., Wabnik K., Niu T., Li H., Yu Q., Pollmann S., *et al.* WOX5–IAA17 Feedback Circuit-Mediated Cellular Auxin Response Is Crucial for the Patterning of Root Stem Cell Niches in Arabidopsis // *Molecular Plant*. – 2014. – Vol. 7, N 2. – P. 277-289.
62. Verbelen J.-P., Cnodder T.D., Le J., Vissenberg K., Baluška F. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities // *Plant Signaling & Behavior*. – 2006. – Vol. 1, N 6. – P. 296-304.
63. Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development // *Trends in Plant Science*. – 2007. – Vol. 12, N 4. – P. 160-168.
64. Vieten A., Vanneste S., Wiśniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., *et al.* Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression // *Development*. – 2005. – Vol. 132, N 20. – P. 4521.
65. Wang H.-Z., Yang K.-Z., Zou J.-J., Zhu L.-L., Xie Z.D., Morita M.T., *et al.* Transcriptional regulation of PIN genes by FOUR LIPS and MYB88 during Arabidopsis root gravitropism // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6, N – P. 8822.
66. Watanabe C., Fujii N., Yanai K., Hotta T., Kim D.-H., Kamada M., *et al.* Gravistimulation changes the accumulation pattern of the CsPIN1 auxin efflux facilitator in the endodermis of the transition zone in cucumber seedlings // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 158, N 1. – P. 239-251.
67. Xu J., Scheres B. Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, N 2. – P. 525.
68. Yamazaki C., Fujii N., Miyazawa Y., Kamada M., Kasahara H., Osada I., *et al.* The gravity-induced re-localization of auxin efflux carrier CsPIN1 in cucumber seedlings: spaceflight experiments for immunohistochemical microscopy // *Npj Microgravity*. – 2016. – Vol. 2, N – P. 16030.

69. Yang Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods // *Journal of Molecular Evolution*. – 1994. – Vol. 39, N 3. – P. 306-314.
70. Žádníková P., Petrášek J., Marhavý P., Raz V., Vandenbussche F., Ding Z., *et al.* Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana* // *Development*. – 2010. – Vol. 137, N 4. – P. 607.
71. Zažímalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. Auxin Transporters—Why So Many? // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol. 2, N 3. –
72. Zourelidou M., Müller I., Willige B.C., Nill C., Jikumaru Y., Li H., *et al.* The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana* // *Development*. – 2009. – Vol. 136, N 4. – P. 627-636.