

УДК 57.084.

**Применение гидратцеллюлозной пленки для исследования роста и развития корневой системы модельного растения *Arabidopsis thaliana* L.**© 2020 А. С. КРИВОБОК<sup>1,\*</sup>, И. О. КОНОВАЛОВА<sup>1</sup>, Т. Н. КУДЕЛИНА<sup>2</sup>, С. О. СМОЛЯНИНА<sup>1</sup>, А. И. ЛИЛИЕНБЕРГ<sup>3</sup>, Т. Н. БИБИКОВА<sup>3,\*\*</sup><sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007<sup>2</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Беларусь<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234

\*e-mail: nuxin@yandex.ru,

\*\*e-mail: bibikova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 09.09.2019 г.

После доработки 24.10.2019 г.

Принята к публикации 25.01.2020 г.

В работе предложена новая методика культивирования растений *Arabidopsis thaliana*, сочетающая применение питательной среды на основе фитогеля и гидрофильной мембраны из гидратцеллюлозной пленки, отделяющей корневую систему растения от толщи среды. Корневая система *A. thaliana*, растущая вдоль поверхности гидратцеллюлозной пленки, по темпам развития главного и боковых корней опережала корневую систему, развивающуюся в объеме фитогеля. Расположение корневой системы на плоскости прозрачной гидратцеллюлозной пленки позволяет упростить ее наблюдение и анализ, а также проводить пересадку растений на другие среды с сохранением конфигурации корневой системы. Предложенная методика впервые позволила оценить влияние экзогенного ауксина на рост боковых корней 5–6-й стадий развития.

**Ключевые слова:** *A. thaliana*, ауксин, боковые корни, гидратцеллюлозная пленка, дифференциальная скорость роста корня, методы исследования корневой системы растений

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-36-43

Биотехнология позволяет создавать организмы с заданным набором параметров и использовать их в качестве биореакторов для получения гетерологичных белков, имеющих медицинское значение. В области синтеза белков уже получили применение системы экспрессии на основе клеток насекомых, млекопитающих, дрожжей и бактерий. В настоящее время все больше работ посвящено использованию для этих целей растений, которые могут синтезировать гетерологичные белки как в культуре клеток, так и в отдельных органах растения, например, в корнях [1]. Модельное растение *Arabidopsis thaliana* детально исследовано и остается одним из популярных объектов в этой области [2]. Тропические реакции корневой системы, а также ее реакция на дей-

ствии различных факторов среды обитания исследованы на примере главного корня (ГК), но не менее важным является и развитие боковых корней (БК), которые по последним данным имеют значительные отличия от ГК на уровне гормональной регуляции [3–5]. БК *A. thaliana* длиной более 10 мм считаются физиологически эквивалентными ГК [6]. При этом, например, данные о влиянии ведущего гормона – ауксина на развитие боковых корней *A. thaliana* длиной более 10 мм в литературе отсутствуют. Одной из причин недостатка данных в этой области является отсутствие методики, которая позволила бы оценить влияние ауксина на рост БК в нормально сформированной корневой системе, без гиперинициации БК, которая наблюдается при длительном воздействии

**Список сокращений:** БК – боковой корень, ГК – главный корень, ГЦП – гидратцеллюлозная пленка, ДМСО – диметилсульфоксид, НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота, GSA (gravitropic set point angle) – угол наклона апекса бокового корня по отношению к вектору гравитации; DR5–GFP – ауксин-чувствительный промоутер.

избытка ауксина на ГК [7]. Пример с ауксином является далеко не единственным, но наиболее показательным в этой области исследований.

Оценка динамики развития корневой системы *A. thaliana* осуществляется, как правило, посредством обработки последовательных фото- и видеоизображений растений, развивающихся на прозрачной плотной питательной среде. Такой метод позволяет определять локальные изменения в скорости роста и пространственной ориентации корней в ответ на действие тех или иных факторов [8]. Распространенной мерой пространственной ориентации боковых корней является угол наклона апекса бокового корня по отношению к вектору гравитации (GSA) [9]. Охарактеризовать величину GSA и дифференциальную скорость роста корней, развивающихся в толще гелевой или агаризованной среды достаточно трудно, так как простая фронтальная съемка чашки Петри с растением дает лишь проекцию корневой системы на плоскость, перпендикулярную оптической оси объектива, в то время как сама корневая система имеет объемное строение в толще среды. Такой подход влечет за собой ошибку в получении данных об ориентации, длине и скорости роста корней [7], а также затрудняет манипуляции с объектом исследования. К существенным недостаткам описанной методики можно отнести и гипоксию корневой системы на поздних этапах ее развития [10]. Одним из возможных вариантов решения этих проблем может служить уменьшение толщи слоя среды до 0,5–1 мм, однако, это делает невозможным культивирование растений в течение >7 дней в связи с обезвоживанием агарового слоя или фитогеля.

Модифицированный способ культивирования растений, при котором вся корневая система растений в процессе вегетации располагается вдоль поверхности гидрофильной мембраны и доступна для анализа, помог бы решить вышеизложенные проблемы в организации исследований. Оригинальным материалом для мембраны, разделяющей питательную среду и корневую систему растений, может служить гидратцеллюлоза. В отличие от целлюлозы, в структуре полимера гидратцеллюлозы ослаблены водородные и межмолекулярные связи, в результате чего возрастает внутренняя поверхность волокон, доступных для водных растворов [11].

Цель работы – рассмотреть возможность применения гидратцеллюлозной пленки (ГЦП) в качестве гидрофильной мембраны для выращивания растений в стерильной культуре на фитогеле, а также проанализировать перспективы примене-

ния данной методики для анализа интактной корневой системы ювенильных растений *A. thaliana*.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Подготовка питательной среды и растительного материала

Объектом исследований явились растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (экотип Columbia 0) и трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок под контролем ауксин-чувствительного промотора (DR5–GFP). Растения выращивали на стерильной питательной среде на основе фитогеля в квадратных чашках Петри (120×120 мм). Состав питательной среды, г/100 мл дистиллированной воды: базовая среда Мурасиге–Скуга (MS, Phytotechlab M519, США) 0,2286; сахароза (х.ч.) 1,0; 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота (MES, Panreac, Испания) 0,05; фитогель (Phytigel, Sigma 8169–500G, США) 0,5 г, pH 5,7. При подготовке гидрофильной мембраны ГЦП толщиной 20–30 мкм разрезали на листы 80×80 мм. Для удаления заводских остатков глицерина ГЦП выдерживали в дистиллированной воде в течение 20 мин, трижды меняя воду, после чего расправляли на ровной гладкой поверхности, перекадывая влажной фильтровальной бумагой. При относительной массовой влажности > 55% ГЦП имеет однородную структуру и может выполнять функции гидрофильной мембраны на поверхности питательной среды, высыхание пленки ведет к искривлению ее поверхности и потере проводящих свойств [11].

Раствор фитогеля в питательной среде и листы ГЦП автоклавировали 30 мин в режиме –121 °С, 1 атм. Остывший до 60 °С фитогель распределяли слоем 4 мм в стерильные чашки Петри. В контрольных вариантах чашки Петри заполняли только питательной средой на основе фитогеля. В эксперименте на лист ГЦП, размещенный поверх затвердевшей питательной среды, наносили отдельные капли фитогеля для формирования посадочных гнезд для семян (рис. 1а). Перед посадкой семена стерилизовали в течение 1–2 мин в растворе 75%-ного этанола с добавлением 0,1%-ного препарата Тритон X-100 и троекратно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена размещали на поверхности фитогеля (контроль) либо в посадочные гнезда из фитогеля на пленке (опыт) из расчета два растения на одну чашку Петри. В предварительных экспериментах было установлено, что при отсутствии посадочных гнезд в опыте, т.е. посадке семян непосредственно на поверхность ГЦП, у 35% исследованных растений в возрасте более 12 сут

имело место падение массивной розетки листьев и сопутствующее отставание от пленки верхней части корневой системы. Альтернативным методом крепления растений может стать нанесение капли жидкой среды на основе низкоплавкого агара в область корневой шейки растения, но в данной работе эта техника не применялась. Объем экспериментальной выборки ( $n$ ) для исследований в каждом варианте эксперимента составлял не менее 12 растений. После посадки семян чашки герметично закрывали лентой Parafilm, оставляли на 4 сут для стратификации при 4 °С, затем переносили в климатическую камеру (23–24 °С, 24-часовой фотопериод при освещении люминисцентными лампами с ППФ 100 мкмоль/м<sup>2</sup>·с). Длительность вегетации составляла от 5 до 25 сут в зависимости от задач эксперимента.

### Определение скорости роста и пространственной ориентации корней

Чашки с растениями сканировали 1 раз в сутки при помощи сканера HP ScanJet 2400C с разрешением изображения 900 dpi. В серии последовательных изображений на базе графического редактора GIMP измеряли длину корней, GSA БК (угол между прямолинейным участком кончика БК и ГК) [4]. На основании измеренных величин рассчитывали дифференциальную скорость роста БК и ГК. В координатной плоскости строили карту роста БК относительно точки выхода БК из ГК, отображая апексы БК в виде векторов, ориентированных к оси Y согласно величине GSA БК. Эксперименты по определению темпов развития корневой системы на поверхности ГЦП и в толще фитогеля, а также исследование пространственной

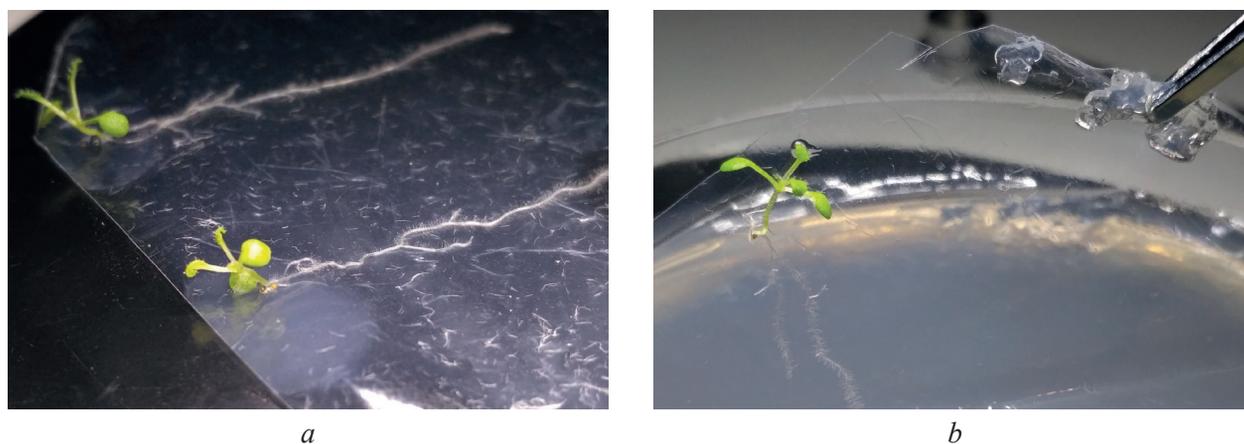
ориентации корневой системы на поверхности ГЦП проводились в четырех независимых сериях экспериментов.

### Измерение активности генов ауксинового ответа

Для сравнения транскрипционной активности ауксина в корнях *A. thaliana* на 5-е и 10-е сут их развития использовали трансгенные растения, содержащие репортерную ауксин-чувствительную конструкцию DR5-GFP [12]. Для проведения анализа на покровное стекло размером 20×50 мм переносили лист ГЦП с растущим на нем растением. Объекты смачивали дистиллированной водой и накрывали вторым покровным стеклом. Исследование проводили при помощи инвертированного конфокального микроскопа LSM510 (Carl Zeiss, Германия) с сухим 40X-объективом с апертурой 0,75. Флуоресценцию зеленого флуоресцентного белка возбуждали лазером (488 нм) и собирали с помощью дихроичного фильтра 488/543 нм и фильтра 510 LP. Исследование проводили в двух независимых сериях экспериментов при объеме выборки в каждом эксперименте  $n = 12$ .

### Пересадка растений на питательную среду с добавлением ауксина

На 10-е сут с момента прорастания семени, растения вместе с листом ГЦП стерильно переносили в аналогичные по форме, размеру чашки Петри со свежей питательной средой того же состава, сохраняя конфигурацию корневой системы на поверхности пленки (рис. 1b). В опыте в питательную среду (см. описание выше) дополнительно вносили раствор  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты



**Рис. 1.** Растения *A. thaliana* на поверхности ГЦП: (a) – растения, развивающиеся из посадочного гнезда (капля фитогеля); (b) – растение после переноса листа ГЦП на свежую питательную среду с сохранением конфигурации корневой системы

**Fig. 1.** Plants of *A. thaliana* on the surface of HCF: (a) – plants developing from a planting nest (a drop of phyto-gel) on the surface of HCF; (b) – plants on the surface of the leaf of HCF with preserving the root system configuration

в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации НУК в среде 300 нМ; в контроль добавляли только растворитель — ДМСО, в объемной концентрации аналогичной опыту. После стерильного переноса растений в на свежую среду, чашки с растениями на пленке герметизировали парафиновой лентой и возвращали в климатическую камеру. Исследование проводили в двух независимых сериях экспериментов при объеме выборки в каждом эксперименте  $n = 20$ .

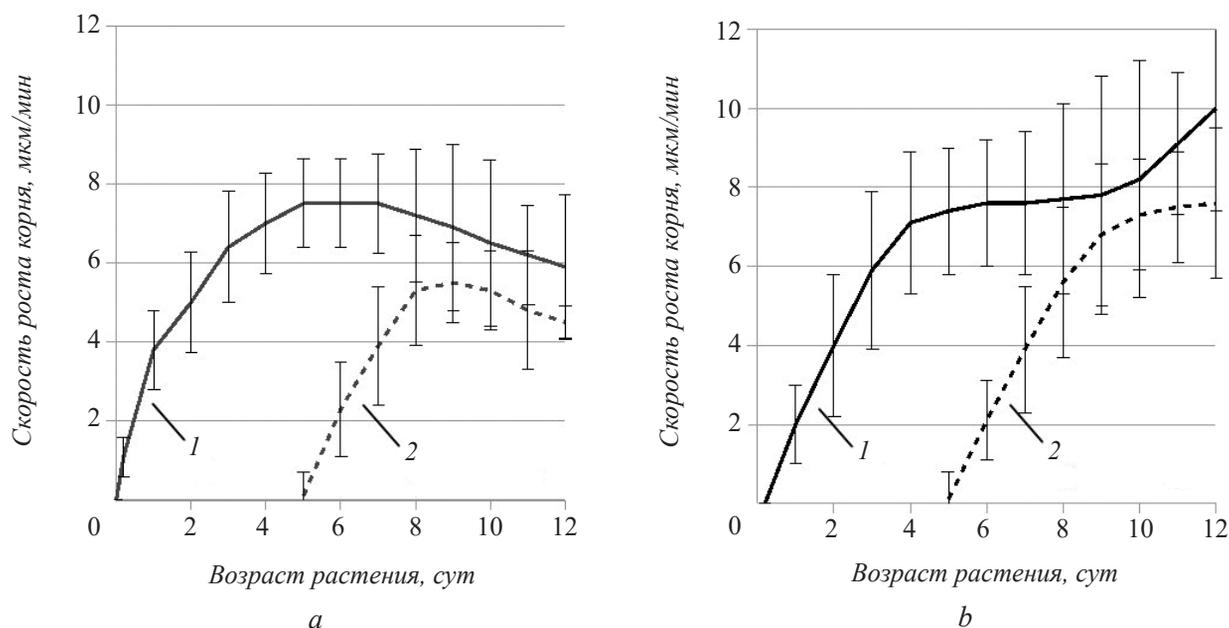
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ прорастания семян на поверхности фитогеля, покрытого ГЦП и без нее выявил относительное отставание в прорастании семян на поверхности пленки, однако, общая всхожесть за первые двое суток в обоих вариантах не различалась и развитие ГК в течение первых 9 сут (рис. 2) согласовывалось с описанным ранее в литературе: наблюдалась фаза экспоненциального роста, которую сменяла фаза стационарного роста ГК (5–9-е сут). В этот период развитие главного корня на фитогеле (контроль) и на поверхности ГЦП происходило однотипно, однако, на поверхности ГЦП (опыт) наблюдался больший (в среднем в 1,5 раза) разброс экспериментальных значений и небольшая задержка в развитии ГК в течение первых суток. Причиной таких различий,

по всей видимости, было колебание влажности воздуха, а следовательно и влажности ГЦП, в отдельных экспериментальных чашках. К концу стационарной фазы кривые роста ГК на фитогеле и на ГЦП начинали расходиться по значениям скорости роста, а к 11–12-м сут эксперимента отличались статистически по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ). Скорость роста ГК в фитогеле снижалась до 6 мкм/мин, в то время как ГК на пленке увеличивал темпы роста вплоть до 10 мкм/мин, что было почти в 1,3 раза выше средних значений скорости, встречающихся в литературных источниках [13].

Замедление темпов роста корней в толще фитогеля, по всей видимости, связано с недостаточным газообменом в прикорневой зоне. Это предположение подтверждается ростом придаточных корней начиная с 6-х сут у растений, растущих в толще питательной среды [14]. Ускорение роста ГК, растущего на ГЦП, может быть связано либо с увеличением предельной длины растягивающихся за границами меристемы клеток, либо непосредственно с ростом меристемы корня [15]. Второе предположение более вероятно, если учитывать возраст растений и длину ГК на момент начала ускорения (9–10-е сут).

Несмотря на различия в скорости роста главного корня, количество БК статистически не различалось в опыте и контроле ( $p = 0,01$ ) к концу



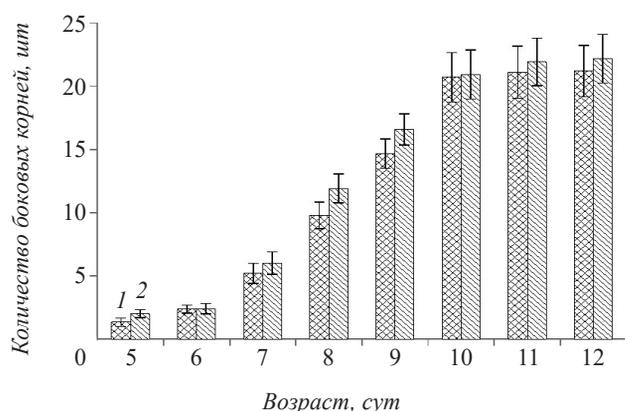
**Рис. 2.** Динамика развития главных и боковых корней *A. thaliana* в толще фитогеля (а) и на поверхности ГЦП (b). 1 – развитие главного корня, 2 – кинетика развития боковых корней. Бары отражают величину стандартного отклонения скорости роста корней

**Fig. 2.** Dynamics of the *A. thaliana* main and lateral roots development in the thickness of the phyto-gel (a) and on the surface of the HCF (b). 1 – the main roots development kinetics, the 2 the lateral roots development kinetics. Bars reflect the standard deviation of the root growth rate

эксперимента (рис. 3). Боковые корни длиной до 10 мм по темпам роста в обоих вариантах оказались близки к темпам развития ГК. Однако при длине более 10 мм БК в толще фитогеля начинают замедляться так же, как и ГК. Более 30% корней замедляются вплоть до полной остановки в развитии при длине порядка 15–20 мм. При этом на поверхности ГЦП доля замерших корней не превышает 10%, а интегральное развитие БК повторяет кривую развития ГК.

Указанные наблюдения позволяют заключить, что при посадке растений в чашки Петри на гелевую питательную среду, покрытую гидрофильной мембраной из ГЦП, растения не только не испытывают явного стрессового воздействия по сравнению с растущими в толще фитогеля, но и имеют преимущества, предположительно обусловленные достаточным газообменом в прикорневой зоне. Более того, признаков стресса (хлороз листьев, ингибирование роста корней) не наблюдалось даже при очень длительном культивировании *A. thaliana* в чашках Петри 120×120 мм (рис. 4).

На поверхности гидрофильной мембраны вся корневая система располагается на плоскости и доступна для анализа. Адекватность данных о пространственной ориентации корней, полученных на плоскости, в сравнении с объемной корнеобитаемой средой, была подтверждена в недавней работе [16]. Обработка фотоизображений корневой системы на поверхности ГЦП позволила сформировать наглядную модель пространственной ориентации боковых корней *A. thaliana* в виде динамики вертикального ( $dy$ ) и горизонтального ( $dx$ ) смещения апекса бокового корня на плоскости относительно точки выхода БК из ГК. Наклон вектора в каждой точке соответствует величине GSA апекса БК (рис. 5).



**Рис. 3.** Число боковых корней растения *A. thaliana* на 5–12-е сут вегетации на фитогеле и поверхности ГЦП. Бары соответствуют величине стандартного отклонения в выборке. 1 – фитогель, 2 – фитогель + ГЦП

**Fig. 3.** The number of *A. thaliana* lateral roots on the 5–12th day of vegetation on phytogel and the surface of HCF. Bars correspond to the standard deviation in the sample. 1 – phytogel, 2 – phytogel + hydrate cellulose membrane

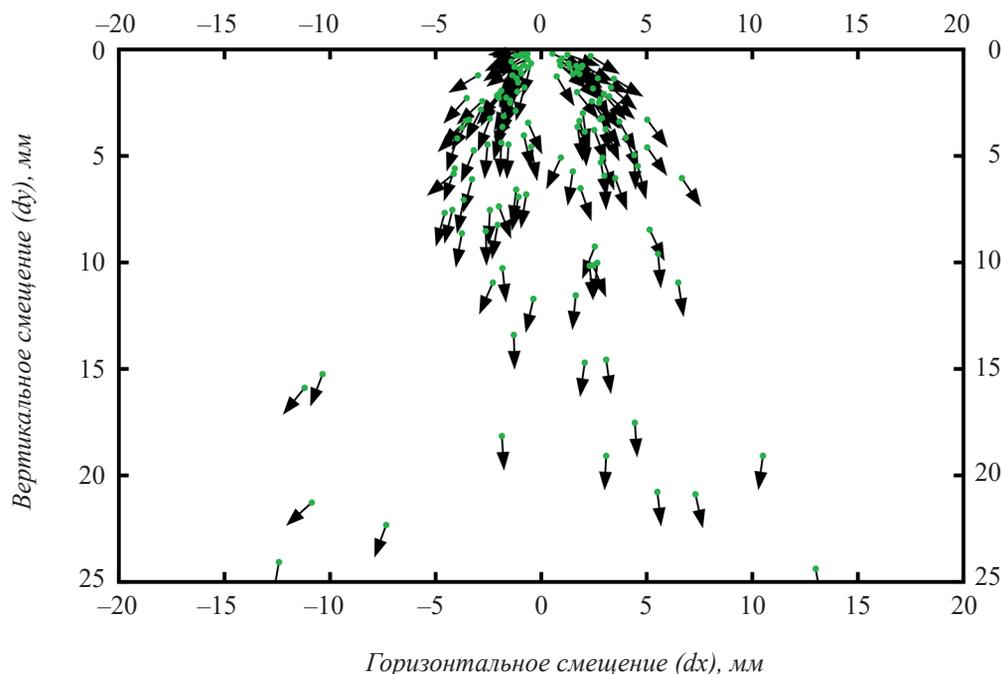


**Рис. 4.** Растения *A. thaliana* на 25-е сут вегетации на поверхности ГЦП, покрывающей питательный фитогель

**Fig. 4.** *A. thaliana* plants on the 25th day of vegetation on the surface of the HCF covering the nutrient phytogel

ной ориентации боковых корней *A. thaliana* в виде динамики вертикального ( $dy$ ) и горизонтального ( $dx$ ) смещения апекса бокового корня на плоскости относительно точки выхода БК из ГК. Наклон вектора в каждой точке соответствует величине GSA апекса БК (рис. 5).

В зависимости от расположения и направления роста БК – слева или справа от ГК – значения  $dx$  имеют отрицательное или положительное значение соответственно. Величина  $dy$  имеет постоянный знак, так как вдоль вертикальной оси в рассматриваемом эксперименте все корни растут в направлении сверху–вниз. Для растений, развивающихся на ГЦП, распределение величины GSA БК длиной < 15 мм соответствует имеющимся в литературе данным [4–5]. Представленный метод характеристики роста и ориентации БК на поверхности ГЦП с успехом может быть использован в исследованиях роста и развития корневой системы *A. thaliana*. Стоит отметить, что предложенный метод применим не только для арабидопсиса, но и для других растений с диархным типом корней. Учитывая тот факт, что инициация боковых корней происходит в основном в сторону градиента влаги [17], использование мембраны из ГЦП для разделения питательной среды и корневой системы растений возможно также и в



**Рис. 5.** Смещение апексов боковых корней *A. thaliana* на плоскости относительно точки выхода бокового корня из главного корня (0) в условиях постоянного действия силы тяжести и равномерного светового поля. Направление векторов соответствует значению GSA апекса бокового корня в данной точке

**Fig. 5.** Displacements of the *A. thaliana* lateral roots apices relative to the point of exit of the lateral root from the main root (0) under conditions of constant action of gravity and a uniform light field. The direction of the vectors corresponds to the GSA value of the lateral root apex at this point

исследованиях растений с полиархными корнями, однако, требуется дополнительная экспериментальная проверка.

В литературе накоплено большое количество экспериментальных данных, в которых показана ключевая роль ауксина как в формировании и сохранении меристемы, так и в регуляции растяжения клеток корня. При помощи растений экспрессирующих конструкцию DR5-GFP была проведена оценка транскрипционной активности ауксина в ГК *A. thaliana* на 5-е сут вегетации на поверхности ГЦП и на фитогеле [12, 18].

Для растений, выращенных в толще фитогеля, исследовались только препараты с отрезанным ГК, где среднее значение сравнительной активности DR5-GFP составило  $50,8 \pm 4,8$ . ГЦП прозрачная для световых лучей, в том числе для лазерного излучения, поэтому выращивание растений на поверхности пленки дополнительно позволило анализировать интактные корни, не отрезая их от растения. Активность флуоресценции в корнях не зависела от метода подготовки препарата: при исследовании отрезанного ГК на покровном стекле среднее значение сравнительной активности DR5-GFP составило  $50,1 \pm 6,4$  отн. ед., а при оценке интактных корней, перенесенных и исследованных на покровном стекле вместе с ГЦП –

$51,4 \pm 8,0$  отн. ед (рис. 6). Близкое значение этих величин имеет принципиальное значение и открывает новые возможности исследования клеточных механизмов развития корней *A. thaliana in vivo*.



**Рис. 6.** Сравнительная активность DR5-GFP в главном корне *A. thaliana* на 5-е сут с момента прорастания на поверхности ГЦП, покрывающей питательный фитогель

**Fig. 6.** Comparative activity of DR5-GFP in the main root of *A. thaliana* on the 5th day after germination on the surface of the HCF covering the nutrient phyto-gel

## Оценка влияния НУК на скорость роста корневой системы

Перенос ювенильного растения с развитой корневой системой с поверхности агара или фитогеля на новую среду сопряжен с механическим стрессом и изменением ориентации БК. Расположение корневой системы на плоскости гидрофильной мембраны из ГЦП позволило не только упростить наблюдения и анализ корневой системы, но и проводить пересадку растений разного возраста с сохранением конфигурации корневой системы. При пересадке растений на пленке на аналогичную среду не наблюдалось статистически значимого замедления роста как для главного, так и для боковых корней 4–6-й стадий развития ( $p < 0,05$ ). В перспективе методика пересадки растений на пленке может упростить проведение экспериментов по воздействию отдельных компонентов среды на формирование корневой системы. Для проверки этой гипотезы, в этой работе была проведена оценка влияния НУК на скорость роста ГК и БК 5–6-й стадий развития.

По полученным данным, НУК в концентрации 300 нМ в питательной среде существенно ингибировала рост главного корня (~ в 5 раз), замедляла рост БК на 5-й стадии развития в 1,8 раза, а на 6-й – в 2,1 раза. Различия в реакции корней 5-й и 6-й стадий подтверждаются статистически по критерию Стьюдента при  $p < 0,01$ . Результаты согласуются с имеющимися в литературе представлениями о влиянии экзогенного ауксина на ГК [19, 20] и указывают на переходный характер БК 5-й стадии развития, что является принципиально новым результатом.

В задачи данной работы не входил более детальный анализ реакции БК. Однако, по ее результатам, применение ГЦП в качестве гидрофильной мембраны является простым и удобным методом организации корнеобитаемой зоны модельного растения *A. thaliana* и открывает новые возможности в исследованиях роста и развития корневой системы.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ Бел\_мол\_а 19-54-04015, а также базовой темы РАН в ГНЦ РФ–ИМБП РАН «Закономерности влияния экстремальных факторов среды обитания на процессы культивирования высших растений и развитие тканей японского перепела на разных этапах его онтогенеза в условиях регенерационных систем жизнеобеспечения».

## ЛИТЕРАТУРА

- Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L., et al. Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production. *Mol. Biotechnol.*, 2015, 57(3), 219–232. doi: 10.1007/s12033-014-9837-y
- Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Носов А.В. и др. Вариабельность по экспрессии GFP-гена в моноклональных клеточных линиях *Arabidopsis thaliana*. *Биотехнология*, 2019, 35(1), 58–67. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-58-67
- Lavenus J., Guyomarc'h S., Laplaze L. PIN transcriptional regulation shapes root system architecture. *Trends. Plant. Sci.*, 2016, 21(3), 175–177. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.011.
- Roychoudhry S., Kieffer M., Del Bianco M., et al. The developmental and environmental regulation of gravitropic setpoint angle in *Arabidopsis* and bean. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 42664. doi: 10.1038/srep42664.
- Rosquete M.R., Kleine-Vehn J. PIN7 auxin carrier is a terminator of radial root expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(4), 1238. doi: 10.3390/ijms19041238
- Kiss, J.Z., Miller, K.M., Ogden, L.A., Roth, K.K. Phototropism and gravitropism in lateral roots of *Arabidopsis*. *Plant. Cell. Physiol.*, 2002, 43, 35–43. doi: 10.1093/pcp/pcf017
- Dubrovsky J.G., Forde B.G. Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell*. 2012, 24(1), 4–14. doi: 10.1105/tpc.11.0.89698
- Walter A., Silk W.K., Schurr U. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Ann. Rev. Plant. Biol.*, 2009, 60, 279–304. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092819
- Digby J., Firm, R.D. The gravitropic set-point angle (GSA): the identification of an important developmentally controlled variable governing plant architecture. *Plant Cell Environ.*, 1995, 18(12), 1434–1440.
- Vandenbrink J.P., Kiss J.Z. Space, the final frontier: A critical review of recent experiments performed in microgravity. *Plant. Sci.*, 2016, 243, 115–119. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.11.004
- Ровкина Н.М., Ляпков А.А. Полимеры на основе целлюлозы и ее производных: учебное пособие. РФ, Томск: Изд-во ТПУ, 2006, 1–128
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.*, 1997, 9(11), 1963–1971. doi: 10.1105/tpc.9.11.1963
- Beemster G.T., De Vusser K., De Tavernier E., et al. Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiol.*, 2002, 129(2), 854–864. doi: 10.1104/pp.002923
- Bellini C., Pacurar D.I., Perrone I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2014, 65, 639–666. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035645

15. Ivanov V.B., Dubrovsky J.G. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.*, 2013, 18(5), 237–243. doi: 10.1016/j.tplants.2012.10.002
16. Waidmann S., Rosquete M.R., Schöller M., et al. Cytokinin functions as an asymmetric and anti-gravitropic signal in lateral roots. *Nat. Commun.*, 2019, 10(1), 3540. doi: 10.1038/s41467-019-11483-4
17. Orosa-Puente B., Leftley N., Wangenheim D., et al. Root branching toward water involves posttranslational modification of transcription factor ARF7. *Science*, 2018, 362(6421), 1407–1410. doi: 10.1126/science.aau3956
18. Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., et al. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell.*, 1999, 99(5), 463–472. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81535-4
19. Beemster G.T.S., Baskin T.I. Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2000, 124, 1718–1727. doi: 10.1104/pp.124.4.1718
20. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemssen V., et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 2005, 433, 39–44. doi: 10.1038/nature0318

## Utilization of a hydrate cellulose film for investigation of *Arabidopsis thaliana* L. root system growth and development

© 2020 A. S. KRIVOBOK<sup>1,\*</sup>, I. O. KONOVALOVA<sup>1</sup>, T. N. KUDELINA<sup>2</sup>, S. O. SMOLYANINA<sup>1</sup>, A. I. LILIENBERG<sup>3</sup>, T. N. BIBIKOVA<sup>3,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Russian Federation State Research Center Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Science (IBMP), Moscow, 123007 Russia

<sup>2</sup>Kuprevich Institute of Experimental Botany NAS of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia,

\*e-mail: nuxin@yandex.ru

\*\*e-mail: bibikova@mail.bio.msu.ru

Received September 09, 2019

Revised October 24, 2019

Accepted January 25, 2020

**Abstract**—A new technique for *Arabidopsis thaliana* cultivation has been proposed that combines the use of a phytogel-based nutrient medium and a hydrophilic membrane of hydrate cellulose film, separating the root system of the plant from the medium thickness. Growth rates of both main and lateral roots were faster in the plants cultivated on the surface of hydrate cellulose film than in the plants grown in the phytogel volume. The location of the root system on the surface of the transparent hydrate film simplifies its observation and analysis and facilitates plant transplantation with preservation of the root system configuration. The proposed technique allowed us to first assess the effect of exogenous auxin on the growth of lateral roots at the 5–6 developmental stage.

**Key words:** methods to study plant root systems, hydrate cellulose film, *A. thaliana*, lateral roots, differential root growth rate, auxin

**Funding**—The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project Bel\_mol\_a 19-54-04015) and the basic topic of the Russian Academy of Sciences – IBMP RAS «Regularities of the Influence of Extreme Environmental Factors on the Processes of Cultivation of Higher Plants and the Development of Japanese Quail Tissues at Different Stages of its Ontogenesis under the Conditions of Regenerative Life Support Systems».

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-36-43