

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

---

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

**Островерхова Мария Геннадьевна**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

**Транскрипционный фактор LBD16  
в инициации примордия бокового корня  
у кабачка (*Cucurbita pepo*)**

Научный руководитель:

д.б.н. Родионов А.В.

Научный консультант:

к.б.н., Демченко К.Н.

зав. лаб. клеточных и молекулярных механизмов развития растений

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Санкт-Петербург

2019

## Оглавление

Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Механизмы ветвления корневой системы .....	6
1.2. Этапы инициации и развития бокового корня у <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
1.3. Белки семейства LBD. Классификация и функции .....	12
1.4. Роль LBD16 в развитии бокового корня у <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
1.5. Особенности инициации бокового корня у Тыквенных.....	19
Глава 2. Материалы и методы.....	24
2.1. Материал .....	24
Растительный материал и условия выращивания растений.....	24
Штаммы и условия культивирования микроорганизмов .....	24
2.2. Молекулярно-генетические методы исследования .....	25
Выделение плазмидной ДНК из <i>Escherichia coli</i> .....	25
Выделение плазмидной ДНК из <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	25
Выделение общей ДНК из растительных тканей .....	26
Полимеразная цепная реакция .....	26
ПЦР-скрининг бактериальных колоний .....	28
Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле .....	28
Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции .....	29
Трансформация компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> .....	29
Трансформация компетентных клеток <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	30
2.3. Создание генетических конструкций.....	30
2.4. Агробактериальная трансформация растений штаммами <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	30
Получение асептического материала.....	30
Трансформация растений с использованием <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	31
Отбор ко-трансформированных корней.....	31
2.5. Методы микроскопии .....	32

Фиксация материала .....	32
Приготовление препаратов.....	32
Документация и анализ препаратов .....	33
2.6. Филогения и биоинформатика .....	34
Глава 3. Результаты и обсуждение .....	35
3.1 Определение нуклеотидной последовательности ортолога гена <i>LBD16</i> <i>Arabidopsis</i> у <i>Cucurbita pepo</i> .....	35
3.2 Клонирование последовательности промотора <i>CpLBD16</i> кабачка .....	38
3.2.1 Подбор праймеров.....	38
3.2.2 Аналитическая ПЦР с геномной ДНК кабачка и праймерами к промоторной последовательности <i>CpLBD16</i> .....	38
3.2.3 Анализ результатов секвенирования промоторной последовательности <i>CpLBD16</i> 39	
3.2.4 Клонирование промоторной последовательности <i>CpLBD16</i> в вектор ввода Gateway-системы.....	39
3.3 Создание генетической конструкции для исследования активности промотора <i>CpLBD16</i> .....	41
3.4 Визуализация тканевой активности промотора <i>CpLBD16</i> в кончике корня кабачка     42	
Заключение .....	46
Выводы .....	48
Список литературы.....	49

## Введение

Архитектура корневой системы и способность адаптировать её к изменяющимся условиям окружающей среды являются определяющими факторами общей приспособленности высших растений. Строение корневой системы определяет доступность растения к воде и питательным веществам, а также его закрепление в почве и взаимодействие с разнообразными бактериями и грибами. В области селекции сельскохозяйственных растений для повышения их устойчивости и урожайности также необходимо понимание механизмов и ключевых факторов, лежащих в основе морфогенеза корневой системы, роста корня, его ветвления в целом. Зная особенности роста и ветвления корневой системы, можно осуществлять отбор растений для фиторемедиации загрязнённых почв.

Формирование бокового корня, наравне с развитием зародыша в семени, является удобной моделью в области биологии развития для изучения морфогенеза растений. Корни имеют сравнительно простую анатомию и быстрое время генерации. В настоящий момент из-за ограниченного числа традиционных модельных объектов существуют пробелы в знаниях о закономерностях ветвления корня, поэтому важно уделять внимание растительным объектам, образование корневой системы у которых отличается от исследованного на модельных организмах. Ввиду этого, особый интерес представляют растения, у которых закладка бокового корня происходит в пределах апикальной меристемы родительского корня, а не далее от кончика корня, за зоной растяжения, как у *Arabidopsis thaliana*. Одним из семейств растений, у которых инициация и развитие боковых корней происходит в непосредственной близости от инициальных клеток кончика корня, являются Тыквенные, исследование которых также позволяет проследить эволюционные тенденции в процессах ветвления корня.

В настоящее время известен целый ряд внутри- и внеклеточных агентов, участвующих в процессах образования бокового корня на различных стадиях. Одни из них – белки семейства LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) –

транскрипционные факторы, вовлеченные в различные процессы развития растений. Они участвуют в развитии корней, листьев и соцветий, кроме того, белок LBD16 и некоторые другие члены семейства LBD играют важную роль в установлении асимметрии клеток-основательниц бокового корня.

**Цель работы:** выяснение роли транскрипционного фактора LBD16 в инициации бокового корня в меристеме родительского корня у кабачка (*Cucurbita pepo*).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие основные задачи исследования:

1. Поиск и идентификация нуклеотидной последовательности ортолога гена *LBD16 Arabidopsis thaliana* у кабачка (*Cucurbita pepo*)..
2. Клонирование нуклеотидной последовательности промотора гена *CpLBD16* кабачка и создание генетических конструкций для анализа тканевой активности промотора *CpLBD16* с использованием репортерных флуоресцентных белков.
3. Определение паттерна экспрессии гена *CpLBD16* в тканях кончика корня кабачка.
4. Анализ роли LBD16 в регуляции инициации и развития примордиев бокового корня в меристеме родительского корня.

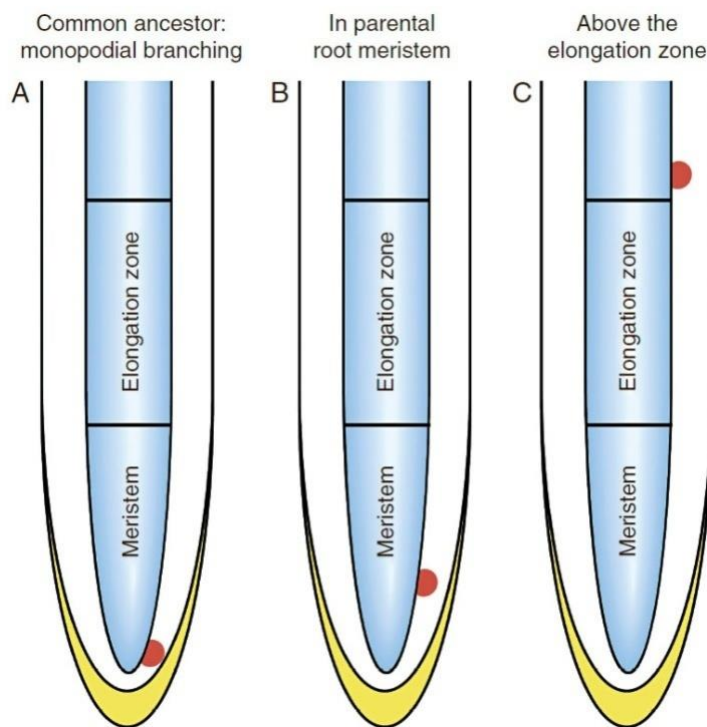
# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. Механизмы ветвления корневой системы

Растительные организмы, в отличие от большинства животных, неподвижны, поэтому они более уязвимы к внешним воздействиям. Корень растений является важнейшим органом, участвующим в адаптации к условиям окружающей среды (Ditengou *et al.* 2008; Lucas *et al.* 2008). Сосудистые растения успешно заселили наземно-воздушную среду благодаря эволюции многоклеточных органов, которые проникают в почву, закрепляют растения и поглощают питательные вещества, необходимые для роста и развития организма (Raven, Edwards. 2001). Помимо закрепления в субстрате, корневая система обеспечивает синтез биологически активных соединений, вегетативное размножение и запасание питательных веществ, а также вступает в симбиотические отношения с другими растениями, микроорганизмами и грибами (Philippot *et al.* 2013). Для осуществления большинства вышеперечисленных функций и интенсификации поглощения воды происходит ветвление корня, что позволяет увеличивать площадь его поверхности (Herder *et al.* 2010). У сосудистых растений в результате ветвления, связанного с деятельностью боковых меристем, образуются корневые системы различной степени разветвленности (Vilches-Barro, Maizel. 2015). Способность корней к ветвлению в значительной степени обуславливает их высокие адаптационные возможности, которые почти 400 миллионов лет назад привели к успешной колонизации суши растениями, в конечном итоге, даже в засушливых регионах. Во время этой колонизации развивались различные формы ветвления корней, постепенно усиливающие фенотипическую пластичность корневой системы и вносящие существенный вклад в стратегии выживания растений (Motte, Beeckman. 2018).

Существует множество классификаций корневых систем. Наиболее распространенные в литературе классификации определяют тип корневой системы по соотношению длин главного, боковых и придаточных корней, а также характеру их роста. Стержневая корневая система характеризуется хорошо развитым главным корнем,

который может проникать на значительную глубину, обеспечивая возможность растению произрастать на почвах с глубоким уровнем залегания грунтовых вод. Подобную корневую систему имеют многие представители класса Двудольные (Bellini *et al.* 2014). Для подавляющего же большинства класса Однодольные характерна мочковатая корневая система, которая состоит из хорошо развитых придаточных и боковых корней, при этом главный корень морфологически не выражен и часто отмирает (Osmont *et al.* 2007). Такая корневая система позволяет поглощать преимущественно поверхностную влагу.



**Рисунок 1 – Гипотетическая схема эволюции ветвления корня у сосудистых растений (Tracheophyta)**

А – общий предок с моноподиальным ветвлением; В – инициация бокового корня в апикальной меристеме родительского корня; С – инициация бокового корня выше зоны растяжения. По (Pina *et al.* 2018)

Как говорилось ранее, разнообразие корневых систем обеспечивает приспособленность растений к различным почвам и местообитаниям. В зависимости от того, где располагается зона инициации примordia бокового корня относительно продольной оси главного корня, можно выделить два основных типа мест инициации примordia бокового корня (Pina *et al.* 2018). Для первого типа характерна инициация примордиев выше зоны растяжения. Он встречается у большинства видов цветковых растений, как однодольных, так и двудольных (Рисунок 1, С). Для возобновления пролиферации клеток перицикла, вышедших из митотического цикла и находящихся в

G1-фазе (Demchenko, Demchenko. 2001a), необходим эндогенный сигнал – осцилляция уровня ауксина (Himanen *et al.* 2002; Péret *et al.* 2009), либо в некоторых особых случаях – механическое воздействие (Malamy, Benfey. 1997; Ditengou *et al.* 2008), сила притяжения, вода и питательные вещества (Xuan *et al.* 2016). Литературные данные свидетельствуют о наличии у растений возможностей преобразования внешних воздействий во внутренние сигналы, необходимые для развития (Benková, Hejác̃ko. 2008; Fukaki, Tasaka. 2008). У растений со вторым типом инициации формирование бокового корня происходит непосредственно в апикальной меристеме главного корня (Рисунок 1, В). Второй тип встречается у различных семейств сосудистых растений, не связанных филогенетически. К ним относятся представители Гречишных (*Polygonaceae*), Вьюнковых (*Convolvulaceae*), Понтедериевых (*Pontederiaceae*), Ароидных (*Araceae*), Сусаковых (*Butomaceae*), Частуховых (*Alismataceae*), Тыквенных (*Cucurbitaceae*), а также некоторых папоротников (Pina *et al.* 2018). Наиболее исследован механизм инициации примордиев бокового корня первого типа, в то время как о втором крайне мало литературных данных, и он остается малоизученным. Понимание механизмов инициации бокового корня второго типа позволит, в том числе, пролить свет на эволюцию цветковых растений и пути их происхождения от общего предка.

## 1.2 Этапы инициации и развития бокового корня у *Arabidopsis thaliana*

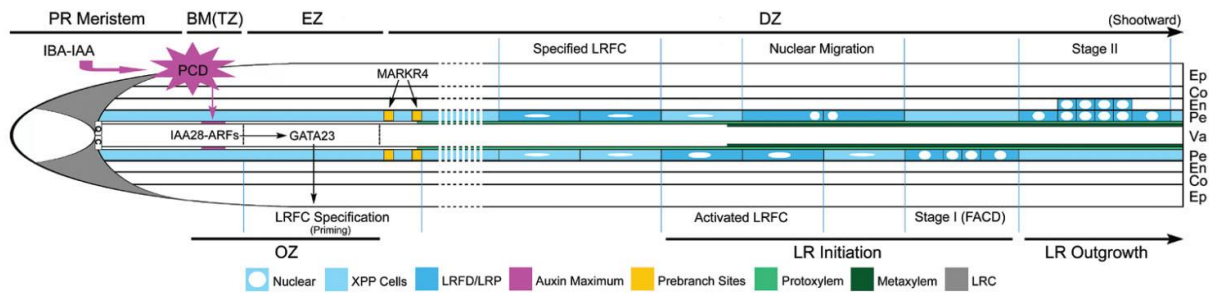
Образование боковых корней и их расположение – основной фактор, определяющий морфологию и тип корневой системы растения. Степень ветвления корня влияет на эффективность поглощения воды, усвоения питательных веществ и закрепления в почве. Молекулярные и клеточные основы формирования боковых корней наиболее полно изучены на классической растительной модели *Arabidopsis*.

В работе (Du, Scheres. 2017) показано, что боковые корни *Arabidopsis* развиваются из клеток-предшественниц (founder cells), расположенных в перицикле напротив полюсов ксилемы. Именно с их активации, начинается позиционирование будущего бокового корня и формирование паттерна примордиев боковых корней вдоль оси родительского корня (Рисунок 2).

В развитии бокового корня выделяют несколько стадий в зависимости от количества сформированных клеточных слоев в примордии (Рисунок 4) (Malamy, Benfey. 1997). После инициации примордия бокового корня (стадия 0) принято выделять стадию I, которая рассматривается как точка отсчета начала развития бокового корня. Активация клеток-основательниц – стадия 0 формирования бокового корня, начинается в конце меристемы и продолжается в зоне растяжения, представляя собой колебания активности



экспрессии множества генов в ответ на осцилляцию концентрации ауксина в клетках стелярной паренхимы, протоксилемы и перицикла (Du, Scheres. 2017). Для преобразования компетентных клеток после осцилляции ауксина в сайты инициации боковых корней необходимы другие регуляторные механизмы. Во время таких колебаний в группе клеток перицикла некоторые из этих клеток могут утрачивать осцилляцию экспрессии генов, и в итоге, в каждом ряду перицикла напротив ксилемного полюса остается лишь пара клеток, в дальнейшем участвующих в образовании примордия. Это подразумевает существование механизмов ограничения количества клеток-предшественниц бокового корня во время и после колебания концентрации ауксина (Van Norman *et al.* 2013). На стадии I, непосредственно инициации бокового корня, запускается миграция ядер в клетках-основательницах, что приводит к первому антиклинальному асимметричному клеточному делению в сестринских клетках-основательницах с образованием двух коротких дочерних клеток, фланкированных двумя более длинными клетками (Casimiro *et al.* 2001; Dubrovsky *et al.* 2001) (Рисунок 3). На II и последующих стадиях производные клеток-основательниц пролиферируют, что приводит к формированию примордия бокового корня и закладке будущей корневой меристемы.

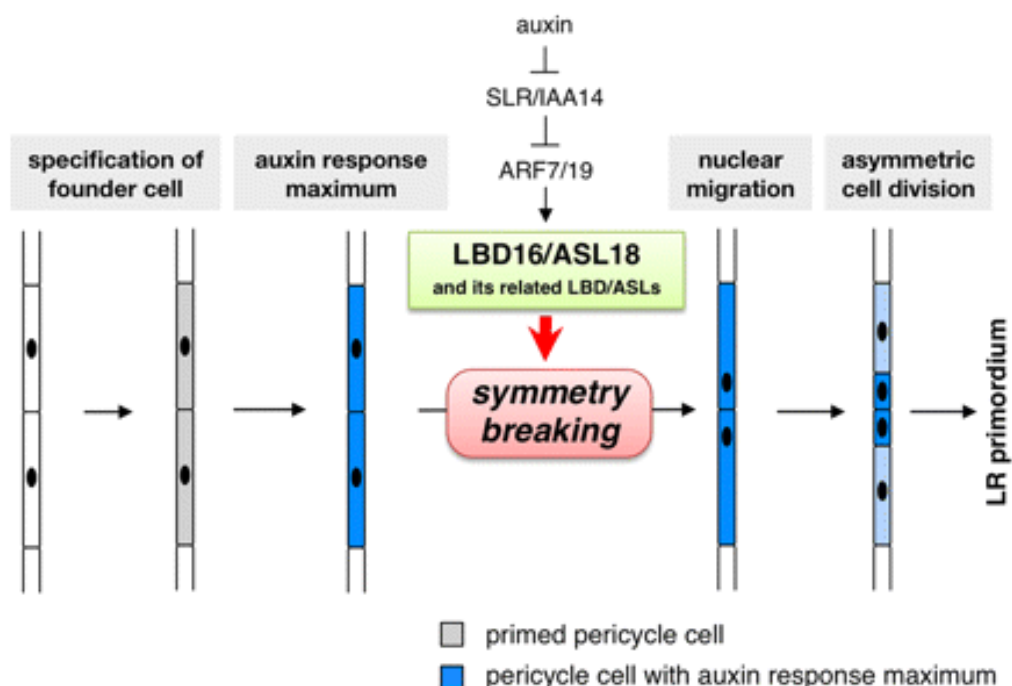


**Рисунок 2 – Схема позиционирования боковых корней у *Arabidopsis***

Позиционирование бокового корня (LR) начинается в базальной меристеме и продолжается до тех пор, пока клетки перицикла на ксилемном полюсе (XPP) не достигнут зоны дифференцировки. PR Meristem – первичная корневая меристема; TZ – переходная зона; BM – базальная меристема; EZ – зона удлинения; OZ – зона колебаний; DZ – зона дифференциации; FACD – первое асимметричное деление клеток перицикла; QC – покоящийся центр; LRC – боковой корневой чехлик; Ep – эпидермис; Co – кора; En – эндодерма; Pe – перицикл; XPP – перицикл на ксилемном полюсе; Va – сосуды; LRFC – клетки основательницы бокового корня; LRP – примордий бокового корня; LR – боковой корень; PCD – запрограммированная гибель клеток. Du, Scheres (2017).

На стадии II за счет периклиналильных делений образуются два слоя клеток – внешний и внутренний. На стадии III внешний слой вновь претерпевает периклиналильные деления, образуя два слоя. Стадия заканчивается формированием автономной меристемы бокового корня (Рисунок 4). На стадии IV деления происходят во внутреннем слое, что

приводит к образованию четырехслойного примордия. Рост клеток и последующие раунды антиклинальных и периклинальных делений клеток приводят к формированию куполообразного примордия (Lucas *et al.* 2013; von Wangenheim *et al.* 2016). На этой стадии в примордии формируется полностью функциональная меристема аналогичная меристеме родительского корня с покоящимся центром (Bennett, Scheres. 2010). В экспериментах с изолированными частями корней показано, что боковые корни могут образовываться из сегментов, содержащих примордии боковых корней на IV стадии, без дополнительной обработки ауксином, что указывает на образование автономной функциональной меристемы в примордиях с 3–5 клеточными слоями (Laskowski *et al.* 1995).

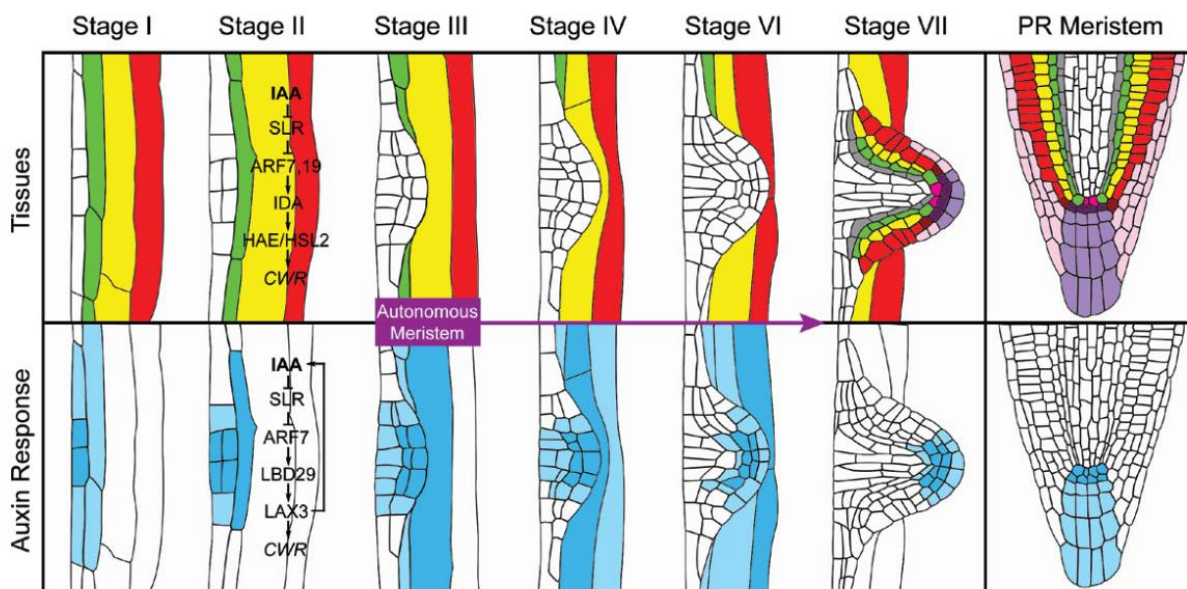


**Рисунок 3 – Схема миграции ядер клеток-основательниц бокового корня и роли LBD16 в этом процессе.**

LBD16/ASL18 активируется ауксином в клетках-основательницах бокового корня (LR) через сигнальный каскад SLR/IAA14-ARF7-ARF19. LBD16 способствует нарушению симметрии и поляризации клеток-основательниц бокового корня, вероятно, посредством регуляции транскрипции родственных *LBD/ASL*, тем самым, вызывая миграцию ядер в двух соседних клетках перицикла и ассиметричные клеточные деления для инициации и последующего развития примордия бокового корня. По Goh *et al.* (2012).

На стадии V центральные клетки двух внешних слоев претерпевают антиклинальные деления и образуют внешний слой из десяти клеток. Стадия VI начинается с деления клеток внешних слоев и прохождение бокового корня через кору в ризодерму родительского корня. На стадии VII количество внешних клеток продолжает увеличиваться. Дальнейший выход бокового корня на поверхность осуществляется за счет растяжения клеток, а не их пролиферации.

На последней стадии примордий продвигается через вышележащие ткани (кора, ризодерма), и боковой корень оказывается на поверхности родительского корня. Все описанные выше процессы контролируются ауксином – за счёт колебаний его концентрации, создающихся при взаимодействии множества клеточных факторов (Laskowski *et al.* 2008).



**Рисунок 4 – Основные сигнальные события и ответ на ауксин во время инициации и роста бокового корня**

Синий цвет – максимум клеточного ответа на ауксин (DR5), зеленый – эндодерма, желтый – кора, красный – ризодерма, фиолетовый – колумелла, розовый – боковой корневой чехлик. Ауксин через сигнальный каскад SLR, ARF7, ARF19, IDA, HAE/HSL2 активирует CWR - гены ремоделирования клеточной стенки. Du, Scheres (2017).

Выход бокового корня на поверхность родительского корня требует особого взаимодействия между развивающимся примордием и вышележащими тканями, включая эндодерму, кору и ризодерму. Первой на пути будущего бокового корня оказывается эндодерма с гидрофобными поясками Каспари. Эндодермальные клетки при прорастании примордия существенно изменяют свою форму, уплощаясь до тех пор, пока цитоплазматическая мембрана с обеих сторон клеток окончательно сливается, что вызывает гибель клеток. Между тем, линия поясков Каспари сохраняется, и в ней образуется локальное отверстие, позволяющее боковому корню на стадиях III-IV пройти через эндодерму (Kumpf *et al.* 2013; Vermeer *et al.* 2014). Клетки коры и ризодермы расходятся в стороны при увеличении размера примордия из-за утраты межклеточных контактов, практически не изменяя при этом своей формы (Stanley *et al.* 2006). Разделение клеток происходит из-за разрыхления клеточной стенки. Этому способствует индукция различных ферментов деградации клеточной стенки, особенно полигалактуроназ, которые

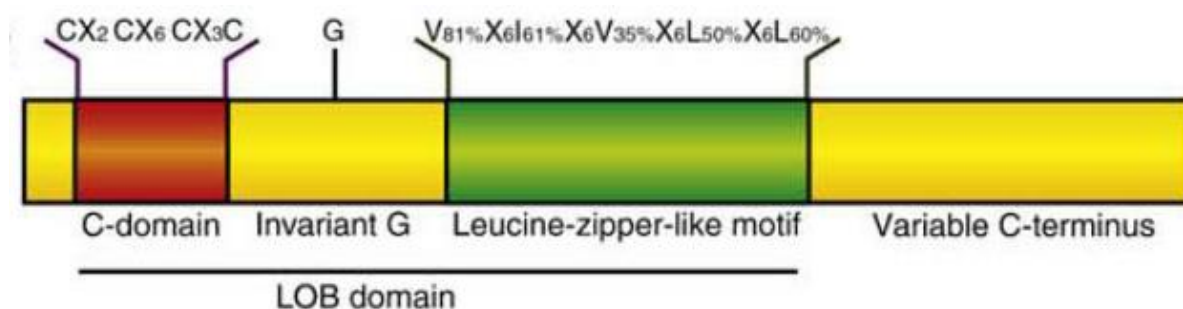
осуществляют гидролиз ее основного структурного компонента – пектина (Kumpf *et al.* 2013).

Таким образом, комплексность биомеханических и биохимических взаимодействий между растущим примордием и окружающими тканями позволяет использовать процесс образования бокового корня как удобную модель для изучения межклеточных взаимодействий во время морфогенеза целого растения (Vilches-Barro, Maizel. 2015).

### 1.3. Белки семейства LBD. Классификация и функции

Существующее разнообразие морфологических особенностей растительных организмов определяется точно согласованными взаимодействиями между различными генами, которые формируют широкий спектр генных каскадов и сетей. Одним из наиболее сложноорганизованных процессов морфогенеза у высших растений является определение границ между органами или между органами и меристемами (Aida, Tasaka. 2006). Как правило, клетки, которые определяют такие границы, обладают крайне низкой пролиферативной активностью (Breuil-Broyer *et al.* 2004). В этих клетках наблюдается экспрессия определенных генов, кодирующих белки, которые принимают участие в формировании границ боковых органов. К таким белкам относятся, прежде всего, белки семейства LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) – транскрипционные факторы, вовлеченные в различные процессы развития растений, включая формирование корней, листьев и соцветий (Borghi *et al.* 2007).

Общим для всех белков семейства LBD является наличие LOB-домена на N-конце аминокислотной последовательности (Рисунок 5), который присутствует в 42 белках *Arabidopsis* и в белках множества других видов высших растений. LOB-домен содержит C-домен, предположительно необходимый для ДНК-связывания. В его состав входят четыре полностью консервативных остатка цистеина (C) в мотиве CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>C, где X являются неконсервативными остатками. Кроме того, LOB-домен содержит консервативный остаток глицина и C-концевую лейцин-молниеподобную последовательность, которая включает пять гидрофобных аминокислот (валин, изолейцин, лейцин), разделенных шестью вариабельными аминокислотными остатками.



## Рисунок 5 – Общая структура домена LOB (LBD)

C – цистеин, V – валин, L – лейцин, X – любая аминокислота. C-домен способен связывать ДНК и домены лейциновые молнии и участвует в белок-белковых взаимодействиях. По Majer, Hochholdingер (2011).

Вероятно, за счёт этой последовательности происходит димеризация белков (Shuai *et al.* 2002; Matsumura *et al.* 2009). Варибельная C-концевая область белков LBD обеспечивает контроль транскрипции нижестоящих генов (Kim, Kim. 2012; Majer *et al.* 2012).

Белки, имеющие схожие с LOB-доменом участки, были найдены только в базах данных растительных геномов и протеомов, что указывает на то, они могут играть важную роль в процессах, специфичных только для растений. Белки LBD были отнесены к семейству ASYMMETRIC LEAVES (ASL) в побегах, поэтому почти все они имеют двойное название. LBD делятся на две группы, характеризующиеся наличием (класс I) или отсутствием (класс II) на конце LOB-домена последовательности – спиральной катушки (coiled coil), содержащей 30 аминокислот, четыре из которых – остатки лейцина (Matsumura *et al.* 2009; Majer, Hochholdingер. 2011). Члены I класса включают 36 генов *Arabidopsis*, которые содержат аминокислотную последовательность на 25%–82% идентичную LOB-домену первого идентифицированного представителя семейства At5g63090 (MDC12.5) (Shuai *et al.* 2002). Класс II состоит из шести генов *Arabidopsis*, которые кодируют белки, в меньшей степени похожие на LOB-домен MDC12.5: 28%–33% идентичности. В экспериментах с иммунопреципитацией ДНК было показано, что белки с LOB-доменом являются ДНК-связывающими транскрипционным факторами, узнающими консенсусный мотив ДНК из 6-ти нуклеотидов GCGGCG. Также белки с LOB-доменом пострансляционно регулируются семейством bHLH (bHLH048), что было обнаружено в опытах с использованием дрожжевой двугибридной системы (Husbands *et al.* 2007).

Белки LBD I и II класса отличаются структурно и функционально. В структуре белков LBD класса I есть как цинковые пальцы, так и лейцин-молниеподобные мотивы, тогда как в генах LBD класса II присутствует только мотив цинкового пальца (Shuai *et al.* 2002). LBD, участвующие в процессах развития, относятся к классу I, тогда как белки класса II участвуют в метаболизме азота (Majer, Hochholdingер. 2011).

Гены, кодирующие LBD, возникли и эволюционно разошлись во время ранней эволюции харовых водорослей (Coudert *et al.* 2013). Первоначальное разделение привело к появлению пяти родов генов у предка *Streptophyta*. Последующее расширение одного из этих родов привело к возникновению в общей сложности шести линий генов LBD в наземных растениях. Также обнаружено, что гены класса I, которые связаны с развитием

корня присутствуют, по крайней мере, в некоторых Плауновидных (*Selaginella*). Они не были полностью утрачены во время эволюции плаунов, и сохранились в них в виде линии генов класса IB, которые связаны с развитием корней. Белки LBD класса I могут являться консервативными участниками процессов развития корней у растений (Chanderbali *et al.* 2015). Это древнее семейство генов сохраняется во всех проанализированных геномах наземных растений, а ее прямым потомком в *Arabidopsis* является *AtLBD20*, который участвует в защите от патогенов. Однако, хорошо известно, что молекулярные механизмы регуляции ауксином экспрессии генов, вовлеченных в инициацию корней Плауновидных и Эуфиллофитов (*Euphyllophyte*), различны и эволюционировали независимо (Pires, Dolan. 2012; Coudert *et al.* 2013)

Современные исследования все более расширяют наши представления о функциональной активности белков семейства LBD у растений. Помимо определения боковых границ органов, эти белки отвечают за: развитие пыльцы (Oh *et al.* 2010; Kim *et al.* 2015), регенерацию растений (Fan *et al.* 2012), фотоморфогенез (Mangeon *et al.* 2010) и устойчивость к патогенам (Thatcher *et al.* 2012).

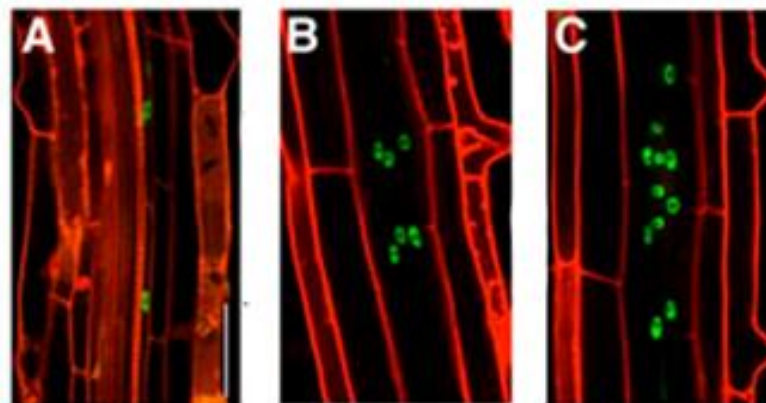
Образование каллуса является начальной стадией регенерации растений *in vitro*. Интересно, что этот процесс также индуцируется ауксином и имеет сходный с развитием бокового корня генетический каскад (Sugimoto *et al.* 2010). Белки LBD *AtLBD16*, *AtLBD17*, *AtLBD18* и *AtLBD29*, которые контролируют образование боковых корней, были идентифицированы также как ключевые регуляторы индукции каллуса в различных органах. Процесс образования каллуса коррелирует с быстрой индукцией и динамической экспрессией этих генов. Эктопическая экспрессия каждого из них приводит к образованию каллуса без применения экзогенного ауксина, тогда как функциональная репрессия этих *LBD* генов блокирует индукцию каллуса. Показано, что гены *LBD* являются прямыми мишенями транскрипционных факторов AUXIN RESPONSIVE FACTOR (ARF). Вероятно, *LBD* регулируют образование каллуса посредством регуляции экспрессии генов, ответственных за организацию меристемы корня (Fan *et al.* 2012). Кроме того, *AtLBD16* и *AtLBD29* необходимы для спонтанного укоренения эксплантов растений при органогенезе корня *de novo*, также регулируемого ауксином. Гомеобоксные белки, связанные с WUSCHEL HOMEОBOX 11 и 12 (*WOX11* и *WOX12*), способствуют избыточной экспрессии обоих генов *LBD* в течение первого этапа определения клеточной судьбы во время укоренения эксплантов (Liu *et al.* 2014). Таким образом, белки LBD играют ключевую роль в объединении ауксиновых сигнальных путей с различными программами регенерации растений.

#### 1.4. Роль LBD16 в развитии бокового корня у *Arabidopsis thaliana*

У *Arabidopsis*, функция пяти ауксин-активируемых LBD (*LBD16*, *LBD17*, *LBD18*, *LBD29* и *LBD33*), относящихся к подтипу С в группе I класса, важна для инициации и формирования примордия бокового корня (Okushima *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009; Matsumura *et al.* 2009). Только для этих представителей семейства LBD была показана ауксин-индуцируемая экспрессия в клетках перицикла на ксилемном полюсе (De Smet *et al.* 2008). Транскрипционные факторы ARF7 и ARF19 регулируют экспрессию генов *LBD16* и *LBD29* (Okushima *et al.* 2007). ARF7 индуцирует экспрессию *ARFhb9* и *LBD16* в ответ на ауксин, а затем ARF19 вызывает экспрессию *LBD18*. Также показано совместное участие двух генов *LBD16* и *LBD18* в развитии бокового корня, так мутанты *lbd18* и *lbd16* имели меньшее количество боковых корней по сравнению с диким типом, но при двойной мутации *lbd18 lbd16* число боковых корней сокращалось еще сильнее (Okushima *et al.* 2007).

Ассиметричные клеточные деления часто опосредуют дифференцировку клеток в многоклеточных организмах и играют важную роль в развитии новых органов. У большинства цветковых растений боковые корни образуются из клеток перицикла, расположенных на ксилемном полюсе. Эти клетки ассиметрично делятся на мелкие центральные и фланкирующие клетки большего размера с различными судьбами (Malamy, Benfey. 1997). У *Arabidopsis* LBD16 и другие члены семейства LBD играют важную роль в установлении асимметрии клеток-основательниц бокового корня. *LBD16* специфично экспрессируется в паре клеток перицикла на ксилемном полюсе до первого антиклинального деления в ходе инициации бокового корня. Клетки перицикла на ксилемном полюсе, в которых происходит экспрессия *LBD16*, предположительно являются клетками-основательницами бокового корня (Goh *et al.* 2012), спецификация которых происходит в базальной части меристемы корня и зависит от осциллирующей экспрессии генов, включая транскрипционный фактор *GATA23* (De Rybel *et al.* 2010). Локализация экспрессии конструкции слияния *LBD16-GFP* в клетках перицикла на ксилемном полюсе в корне *Arabidopsis* представлена на Рисунок 6. Локальная активация экспрессии *LBD16* в инициальных клетках бокового корня регулируется SLR/IAA14-ARF7-ARF19-зависимым модулем сигнализации ауксина (Goh *et al.* 2012). Эти модули играют роль в распределении боковых корней, что показано на мутантах *bdl/iaa12* и *mp/arf5*, у которых в определенных условиях образуются кластерные боковые корни (De Smet *et al.* 2010). Боковые корни Тыквенных также часто показывают кластерный характер инициации (Ilna *et al.* 2018). Вероятнее всего, у *Arabidopsis* существует также петля обратной связи, в которой LBD16 и связанные с ней LBD положительно регулируют

ядерную миграцию и ассиметричные деления клеток-основательниц бокового корня, одновременно с тем, что эти же LBD или события инициации бокового корня отрицательно воздействуют на инициацию боковых корней в соседних участках (Goh *et al.* 2012).



**Рисунок 6 – Тканевой паттерн экспрессии *LBD16* в клетках перицикла при инициации бокового корня *Arabidopsis* (*pLBD16::GFP*)**

А – экспрессия *LBD16* в двух клетках ряда перицикла на ксилемном полюсе до миграции ядер. Б – экспрессия *LBD16* после первого ассиметричного деления в трех рядах перицикла. С – экспрессия *LBD16* в примордии бокового корня, по (Goh *et al.* 2012).

Известно, что для мутанта *slr-1* *Arabidopsis* характерен более высокий уровень ауксина в корне, что, по-видимому, связано с нарушением поддержания гомеостаза ауксина. У растений дикого типа экспрессия *LBD16* происходит в клетках перицикла, а у этого мутанта слабая экспрессия *LBD16* наблюдалась только в эндодерме, хотя мутация *slr-1* не влияет на определение судьбы клеток основательниц бокового корня (Vanneste *et al.* 2005a). Повышенное содержание ауксина в корне мутантных растений может приводить к изменению распределения экспрессии *LBD16* в корнях независимо от сигнального модуля SLR/IAA14-ARF7-ARF19. В совокупности эти данные указывают на важную роль SLR/IAA14-ARF7-ARF19-зависимого сигналинга ауксина для экспрессии *LBD16* в клетках-основательницах бокового корня.

Контроль протекания клеточного цикла является ключевым механизмом ассиметричных делений клеток перицикла, которые в будущем дадут начало примордию бокового корня (Beekman *et al.* 2001; Himanen *et al.* 2002; DiDonato *et al.* 2004; Vanneste *et al.* 2005a; De Smet *et al.* 2010; Sanz *et al.* 2011). Для осуществления возможности инициации бокового корня, клетки перицикла у *Arabidopsis* и многих других цветковых, у которых формирование примордиев происходит выше зоны растяжения, выходят из клеточного цикла в G1 фазе в конце меристемы (Demchenko, Demchenko. 2001b; Himanen



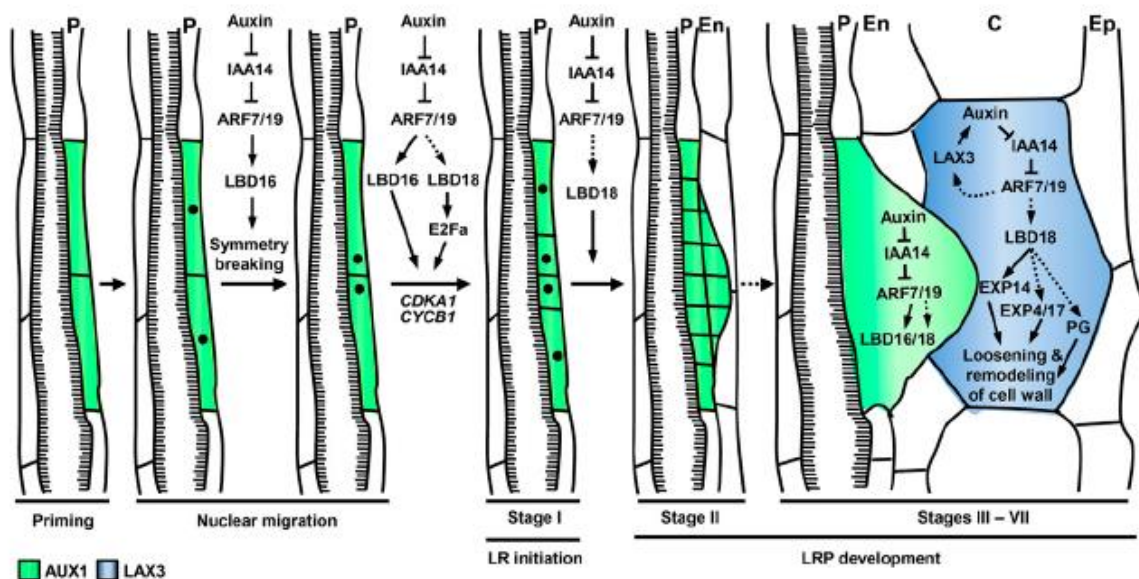
*et al.* 2002; Vanneste *et al.* 2005b). Однако, перед асимметричным делением им необходимо возобновить пролиферацию, осуществив запуск S фазы митотического цикла (Demchenko, Demchenko. 2001b; Alarcón *et al.* 2016).

Ауксин стимулирует переход из стадии G1 в стадию S отдельных клеток перицикла на ксилемном полюсе выше зоны растяжения и последующее их деление. Они возобновляют продвижение по клеточному циклу, когда достигают зоны инициации боковых корней (Demchenko, Demchenko. 2001b; Casimiro *et al.* 2003). Вероятнее всего, гены, активирующие движение по клеточному цикл, не способны запустить процесс инициации бокового корня без дополнительной стимуляции ауксином (Vanneste *et al.* 2005a).

Транскрипционный фактор E2F вызывает асимметричные клеточные деления в процессе инициации бокового корня (De Smet *et al.* 2010; Verckmans *et al.* 2011). Экспрессия *E2Fa* регулируется димеризованными транскрипционными факторами LBD18–LBD33, которые, в свою очередь, контролируются ауксином (Verckmans *et al.* 2011). Димер LBD18–LBD33 является связующим звеном в процессе образования бокового корня и активирует транскрипцию *E2Fa*. Таким образом, запуск транскрипции *E2Fa* с помощью факторов LBD является общим механизмом ауксин-зависимой активации клеточного цикла (Verckmans *et al.* 2011).

Возникновение в базальной части меристемы родительского корня *Arabidopsis* клеток перицикла, способных к инициации бокового корня, происходит за счет образования локального максимума ауксина в прилежащих клетках протоксилемы (De Smet *et al.* 2007). Это приводит к блокированию перехода клеток перицикла в S-фазу. У пшеницы эти клетки покидают меристему в G1-фазе и возобновляют движение по циклу в конце зоны растяжения, что приводит к двум синхронным делениям инициирующим боковой корень (Demchenko, Demchenko. 2001b). Определение способности клеток перицикла к возобновлению пролиферации осуществляется циклином D-типа *CYCD4;1* (Nieuwland *et al.* 2009). Снижение экспрессии *CYCD4;1* в базальной части меристемы под воздействием ауксина приводит к остановке деления некоторых клеток перицикла в G1 (De Veylder *et al.* 2007). В случае формирования примордиев бокового корня выше зоны растяжения, возобновление продвижения клеток перицикла по циклу, возможно, сопровождается образованием нового локального максимума ауксина за счет транспорта ауксина из эндодермы (Marhavý *et al.* 2013). Это позволяет клеткам продолжить пролиферацию и сформировать примордий. Таким образом, синхронное определение (спецификация) двух лежащих в одном ряду клеток перицикла, дает начало определению точки инициации бокового корня.

С использованием дрожжевой одногибридной системы продемонстрировано связывание транскрипционного фактора LBD29 с промотором *LAX3*, являющимся мишенью регуляции ARF7. Наличие дефектов в ауксин-индуцируемой экспрессии *LBD29* или экспрессия репрессора транскрипции *LBD29-SRDX* вызывали развитие фенотипа, аналогичного фенотипу мутанта *lax3*, что приводило к задержке появления бокового корня. Следовательно, для контроля клеточных делений и морфогенеза требуется последовательная индукция ауксином экспрессии *LBD29* и *LAX3* (Porco *et al.* 2016).



**Рисунок 7 – Модель молекулярной сигнальной сети регуляции *LBD16* и *LBD18* через транспортеры *AUX1* и *LAX3* при инициации и развитии бокового корня *Arabidopsis***

Заштрихованный ряд клеток – ксилема; толстые стрелки – прямая активация генов; пунктирные стрелки – непрякая активация генов. P – перикцикл En – эндодерма; C – кора; Ep – эпидермис. Lee *et al.* (2015).

Димеризация факторов транскрипции имеет решающее значение для модуляции аффинности и специфичности ДНК-связывания, что способствует регуляции транскрипции. Димеризация белков наблюдалась среди нескольких белков LBD класса I, включая гомодимеризацию LBD16 и LBD18, гетеродимеризацию димеров LBD10-LBD27, LBD18-LBD33 и LBD30-LBD6 и комбинаторные взаимодействия LBD10, LBD22, LBD25, LBD27 и LBD36 (Berckmans *et al.* 2011; Lee *et al.* 2015). Мотив «суперспираль» имеет решающее значение для гомодимеризации LBD16 и LBD18, необходимых для регуляции транскрипции в развитии бокового корнеобразования.

На основе данных предыдущих исследований (Marchant *et al.* 2002; Okushima *et al.* 2007; Swarup *et al.* 2008; Lee *et al.* 2009; Berckmans *et al.* 2011; Goh *et al.* 2012; Lee *et al.* 2015) была сформулирована генетическая модель регуляции процессов образования бокового корня. Так, LBD16 стимулирует направленную миграцию ядер в двух клетках

перицикла-основательницах бокового корня (Рисунок 3) (Goh *et al.* 2012). Позднее LBD18 контролирует ассиметричное антиклинальное деление при инициации бокового корня путем активации экспрессии *E2Fa* и перехода из G1-стадии в S (Berckmans *et al.* 2011), а затем и периклиналильных делений клеток перицикла ксилемного полюса через регуляцию клеточного цикла, воздействуя на CDKA1;1 и CYCB1;1. LBD16 и LBD18 участвуют в регуляции развития примордия бокового корня совместно с фактором AUX1. Переносчик ауксина LAX3 опосредованно активирует SLR/IAA14-ARF7-ARF19 сигнальный модуль (Swarup *et al.* 2008), индуцируя экспрессию *LBD18*. Во время выхода примордия на поверхность корня LBD18, в свою очередь, активирует экспанзины EXP14 и EXP17в эндодерме и коре (Рисунок 7) для разрыхления клеточной стенки (Lee, Kim. 2013), а также позднее вызывает экспрессию полигалактуроназы, которая облегчает локальное разделение клеток. Полигалактуроназа изменяет структуру клеточной стенки, делая ее растяжимой (Cosgrove. 2000; Peret *et al.* 2009). Эти молекулярные события способствуют росту примордия бокового корня через внешние слои родительского корня.

На сегодняшний день только некоторые из белков LBD функционально охарактеризованы, тогда как роль многих LBD остаётся неизвестной. Поэтому основная задача исследований в области изучения развития корней – всеобъемлющее понимание функции суперсемейства LBD и выяснение точной роли этих белков в определении границ органов и реакции растений на эндо- и экзогенные сигналы. В данный момент мало известно о мишенях LBD, которые связывают ауксиновый сигнал с процессами морфогенеза, такими как развитие бокового корня. Необходимо выяснить, какие молекулярные компоненты, лежащие в регуляторной сети ниже LBD, являются ключевыми в определении программ развития органов растений. Идентификация и анализ нижестоящих мишеней LBD16 и LBD18 будет способствовать нашему пониманию механизмов, регулирующих поляризацию клеток-основательниц бокового корня, последующие ассиметричные деления и развитие примордия бокового корня, которые являются ключевыми в морфогенезе корневой системы растений.

## **1.5. Особенности инициации бокового корня у Тыквенных**

Инициация и развитие бокового корня может происходить либо в апикальной меристеме родительского корня, либо гораздо чаще – за зоной растяжения на значительном расстоянии от кончика корня. Второй тип инициации бокового корня характерен для большинства цветковых растений, в том числе для модельного растения *Arabidopsis* (Pina *et al.* 2018). Инициация примордиев боковых корней у представителей ряда семейств, в том числе Тыквенных, происходит в апикальной меристеме

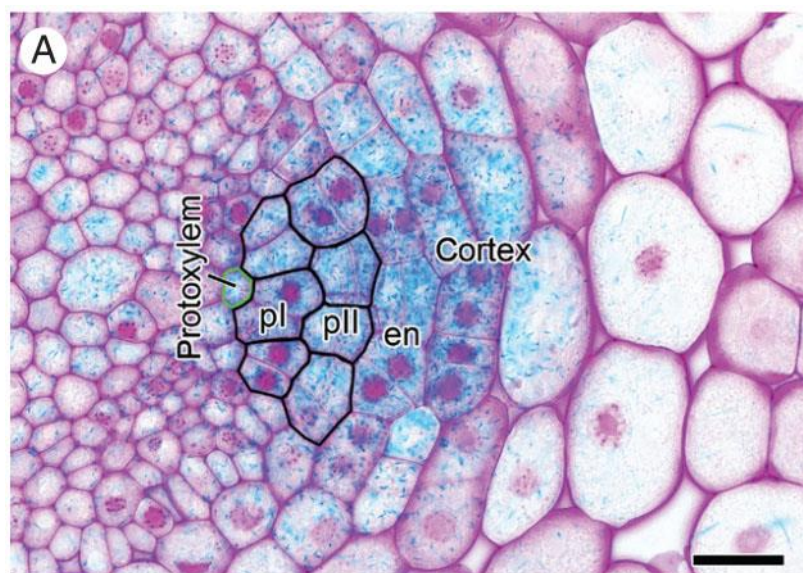
родительского корня (Mallory *et al.* 1970; Seago. 1973; Clowes. 1982; Demchenko, Demchenko. 2001a) У некоторых видов семейства Тыквенные первые признаки формирования боковых корней удается заметить на расстоянии менее 1 мм от кончика родительского корня (Mallory *et al.* 1970). Примордии боковых корней были также обнаружены в зародышевом корне зрелых семян (Clowes. 1982). У *Cucurbita pepo* (кабачок) определение способности клеток участвовать в инициации боковых корней происходит в апикальной части меристемы родительского корня. Боковые корни у видов из семейства Тыквенные могут быстро развиваться, что приводит к их появлению непосредственно над зоной растяжения в родительском корне. Это позволяет развивать обширную корневую систему в короткие сроки.

Для корня кабачка, в зависимости от его толщины, возраста и порядка, характерно наличие трех–пяти полюсов проводящих тканей (Pina *et al.* 2012). Клетки протофлоэмы выходят из клеточного цикла и дифференцируются ближе к кончику корня, чем клетки других тканей. Примордии боковых корней закладываются в меристеме родительского корня. Их инициация начинается в результате антиклинальных делений клеток перицикла, который у кабачка является двухслойным. Группа из 3–6 пар клеток перицикла появляется на расстоянии 200–250 мкм от инициальных клеток коры. Клетки эндодермы участвуют в инициации почти одновременно с клетками перицикла. Затем клетки других слоев коры последовательно и очень быстро включаются в развитие примордия. Самые ранние стадии развития примордиев (I и II) выявляются в корне кабачка после того, как клетки протофлоэмы родительского корня завершили свои деления и дифференцировку. Примордий, увеличиваясь в объеме, сминает три слоя коры и ризодермы, которые не участвуют в его образовании. После появления примордия бокового корня на поверхности родительского корня кабачка производные клеток коры образуют временный корневой чехлик, тогда как ткани бокового корня происходят из перицикла родительского корня (Demchenko, Demchenko. 2001a).

Первые клеточные события, связанные с инициацией бокового корня у кабачка, происходят в апикальной меристеме родительского корня. Ранние события инициации примордия были локализованы при помощи трансгенных корней кабачка в работе (Pina *et al.* 2018). Распределение ответа на ауксин в меристеме родительского корня было показано на основе локализации экспрессии *GUS*, примордии инициировались напротив полюсов ксилемы (Рисунок 8).

Наиболее ранним клеточным событием в образовании бокового корня у кабачка является симметричное антиклинальное деление в двух клетках наружного и внутреннего рядов перицикла. Было продемонстрировано, что на расстоянии 200 мкм от инициальных

клеток в перицикле почти полностью исчезают максимумы ответа на ауксин, которые возобновляются на удалении 250 мкм от инициалей рядов. На расстоянии 250–350 мкм от инициальных клеток образуются клеточные пакеты, состоящие из двух пар сестринских клеток в каждом продольном ряде клеток перицикла.



**Рисунок 8 – Визуализация максимумов ответа на ауксин у корней *Cucurbita pepo*, несущих *DR5::GUS* при развитии примордиев боковых корней**

Примордий формируется напротив ксилемного полюса. pI – первый слой перицикла, pII – второй слой перицикла, en – эндодерма. Масштабная линейка – 20 мкм. По (Piina *et al.* 2018).

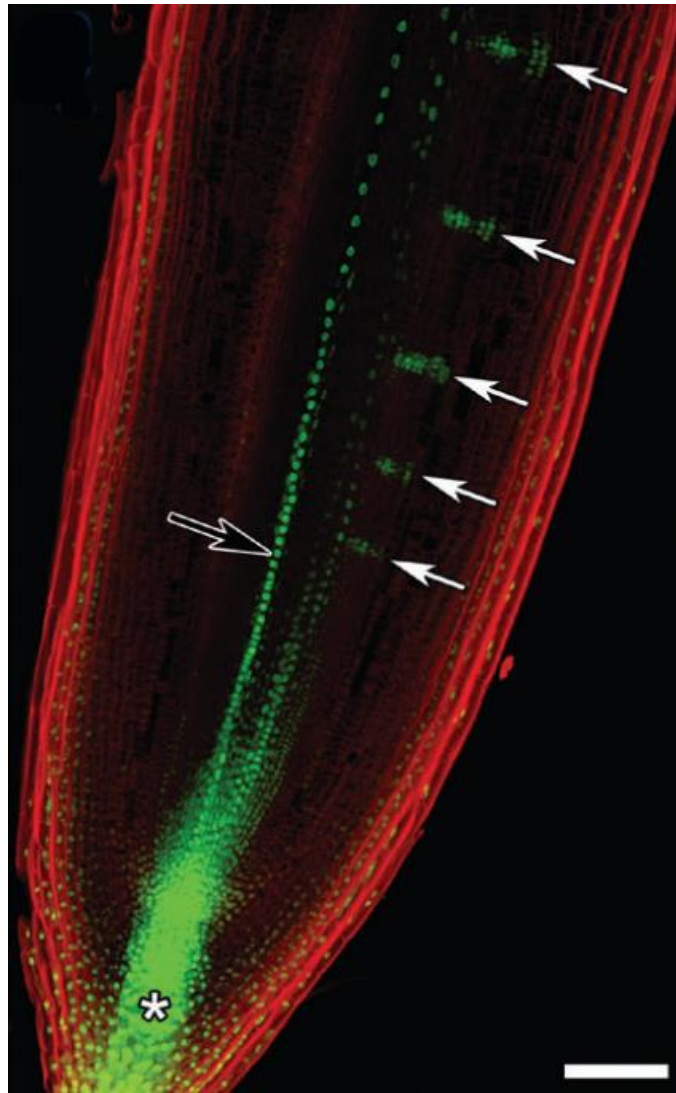
Таким образом, зона инициации бокового корня у кабачка определяется как область меристемы родительского корня проксимальнее инициальных клеток рядов, на удалении 250–350 мкм от них. На удалении 500 мкм от инициальных клеток формируются клеточные пакеты сестринских клеток, в которых наблюдаются максимумы ответа на ауксин. Они периклинально делятся, что приводит к формированию примордия. Соседние эндодермальные слои участвуют в формировании примордия бокового корня после завершения антиклинальных делений клеток-основательниц в перицикле на расстоянии около 500 мкм от инициалей. Периклинальные деления во внешнем ряду перицикла могут сопровождаться радиальными антиклинальными делениями во внутреннем ряду перицикла, что приводит к увеличению числа внутренних клеток перицикла. Последующее вовлечение внутренних клеток коры происходит после завершения первых периклинальных делений в перицикле. В целом, три-четыре слоя внутренней коры вовлекаются в формирование примордия, и три внешних слоя клеток коры не участвуют в этом процессе. Таким образом, для Тыквенных характерно образование примордия бокового корня с участием нескольких слоев коры (Dubrovsky. 1986; Piina *et al.* 2012;

Torres-Martínez *et al.* 2019). Процессы включения в образования примордия бокового корня клеток эндодермы и коры сопровождается формированием в них максимумов клеточного ответа на ауксин. В течение дальнейшего развития бокового корня область ответа на ауксин уменьшалась в размерах и смещалась в апикальную часть примордия.

Для более точного изучения распределения ответа на ауксин при инициации бокового корня на ранних стадиях у кабачка были использованы следующие репортерные слияния под контролем синтетического промотора *DR5*, отвечающего на ауксин, – *DR5::GUS-eGFP* с цитоплазматической локализацией, а также *GUS-eGFP-NLS* (Рисунок 9) и *tdTomato-H2B* с ядерной локализацией. Наиболее точные данные о локализации ауксинового ответа были получены с использованием репортерных кассет с ядерной локализацией флуоресцентных белков. В частности, при анализе корней, содержащих *tdTomato-H2B*, удалось наиболее точно определить распределение клеточного ответа на ауксин в процессе митоза. Это позволило впервые идентифицировать клетки меристемы родительского корня, участвующие в процессе, называемом «прайминг» (De Smet *et al.* 2007). Было показано, что при инициации примордия в меристеме родительского корня у кабачка, не происходит возобновление митотического цикла из G1 фазы, наблюдаемое при образовании бокового корня выше зоны растяжения (Demchenko, Demchenko. 2001b). Таким образом, эндогенный ауксин является ключевым фактором на этапе инициации и развития бокового корня у Тыквенных.

Однако, известно, что инициация примордия бокового корня у кабачка нечувствительна к обработке экзогенным ауксином (Pina *et al.* 2018). С увеличением концентрации экзогенного ауксина общее количество примордиев и боковых корней уменьшалось на фоне общего подавления роста первичного корня. Это может быть объяснено высоким содержанием эндогенного ауксина в зоне инициации примордия в корне кабачка или неспособностью к активному транспорту экзогенного ауксина в апикальную часть коревой меристемы. Следовательно, повышение уровня ауксина в клетках меристемы корня, вызванное обработкой экзогенным ауксином, не приводит к образованию новых локальных максимумов ауксина, необходимых для инициации большего количества боковых корней.

Таким образом, в ходе эволюции высших растений был сформирован иной тип инициации бокового корня – в меристеме родительского корня. Несмотря на то, что клетки-основательницы бокового корня и окружающие их клетки не прекращают пролиферацию, для инициации бокового корня также необходим ауксин (Pina *et al.* 2018).



**Рисунок 9 – Визуализация максимумов клеточного ответа на ауксин в кончике корня *Cucurbita pepo*, несущих *DR5:: GFP-NLS***

Зеленый канал – максимум клеточного ответа на ауксин (флуоресценция GFP); пурпурный канал – ДНК, окрашенная DAPI; и красный канал – клеточные стенки, окрашенные Pontamine Fast Scarlet. Белые стрелки – примордии боковых корней. Звездочка – клетки колумеллы чехлика. Черная стрелка – ряд клеток метаксилемы. Масштабная линейка – 100 мкм. По (Pina *et al.* 2018).

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Материал

#### Растительный материал и условия выращивания растений

Для проведения экспериментов использовали семена кабачка (*Cucurbita pepo L.*) сорта Белоплодный (СортСемОвощ, Санкт-Петербург, Россия). При выращивании проростков кабачка поддерживался световой режим 16/8 ч (день/ночь) и освещённость 600 мкМ/(м<sup>2</sup>·с).

#### Штаммы и условия культивирования микроорганизмов

В работе применялись лабораторные штаммы *Escherichia coli* XL1-Blue. Для трансформации растений использовался штамм *Agrobacterium rhizogenes* R1000 (ГНУ ВНИИСХМ), не имеющий устойчивости к антибиотикам.

Культивирование штаммов *E. coli* проводили при 37°C на агаризованной среде LB в течение 18-20 ч. При приготовлении жидкой культуры 3 мл среды LB с соответствующими антибиотиками инокулировали частью бактериальной колонии. Для этого брали часть колонии в стерильных условиях при помощи стерильной деревянной зубочистки. Бактерии инкубировали в течение 14-16 ч при 250 об./мин. и температуре 37°C.

Агробактерии выращивали на агаризованной среде YEB в течение 24-36 ч при температуре 28°C. Для получения жидкой культуры инокулировали жидкую среду YEB частью колонии агробактерий. Культуру выращивали при 220 об./мин. и температуре 28°C.

#### Среда Luria – Bertani (LB) (1 л):

Пептон (Select Pepton 140) 10 г

Дрожжевой экстракт 5 г

NaCl 10 г

Агар (для получения твёрдой среды) 15 г

dH<sub>2</sub>O до 1 л

pH доводили до 7,2 с помощью NaOH перед автоклавированием.



Среда YEB (1 л):

Мясной экстракт	5 г
Дрожжевой экстракт	1 г
Пептон	1 г
Сахароза	5г
5 мМ MgSO <sub>4</sub>	
Агар (для получения твёрдой среды)	15 г
dH <sub>2</sub> O до 1 л	

pH довели до 7,4 с помощью NaOH перед автоклавированием

## 2.2 Молекулярно-генетические методы исследования

### Выделение плазмидной ДНК из *Escherichia coli*

Плазмидную ДНК выделяли согласно рекомендациям производителя с использованием набора реактивов фирмы Евроген (Россия) для выделения плазмидной ДНК.

Количество выделенной плазмидной ДНК измеряли при помощи флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США). При необходимости качество выделенной плазмидной ДНК оценивали методом электрофореза проб в 1% агарозном геле.

### Выделение плазмидной ДНК из *Agrobacterium rhizogenes*

Для выделения плазмидной ДНК из клеток агробактерий 2 мл жидкой культуры клеток переносили в пробирку Эппендорф и осаждали клетки центрифугированием при 13000 об./мин. Затем к осадку добавляли 100 мкл ресуспендирующего буфера, 25 мкл РНКазы А (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл, лизоцим (Sigma, США) в концентрации 20 мкг/мл и тщательное ресуспендирование с помощью шейкера (Heidolph, Германия). Смесь инкубировали в течение 30 мин. при 37°C. В пробирку вносили 200 мкл лизирующего буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего добавляли 175 мкл нейтрализующего буфера, перемешивали и инкубировали на льду в течение 5 мин, центрифугировали при 13000 об./мин., супернатант переносили в новые пробирки (Phase Lock Gel Heavy Tubes,). Супернатант очищали от белков смесью хлороформа и изоамилового спирта (24:1) и затем 100% хлороформом. Очищенную водную фазу переносили в чистую пробирку, добавляли изопропанол в соотношении 0,6 от объёма содержимого и инкубировали на льду в течение 10 мин. Содержимое пробирки центрифугировали при 13000 об./мин. в течение 15 мин. Осадок промывали дважды 70% этанолом, подсушивали и растворяли в 50 мкл 2,5 мМ Трис-НСl (pH 8,0). Количество выделенной плазмидной ДНК оценивали при помощи флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США).

Ресуспендирующий буфер:

50мМ Глюкозы  
25 мМ Трис (pH 8,0)  
10 мМ ЭДТА

Лизирующий буфер:

1% SDS  
0,2 NNaOH

Нейтрализующий буфер

3М ацетат калия (pH 5,0)

### **Выделение общей ДНК из растительных тканей**

Выделение суммарной ДНК из растительных тканей производили набором реактивов DNeasy Plant Minikit (Qiagen, Германия). в соответствии с рекомендациями производителя. ДНК выделяли из навесок корней кабачка (30-50 мг). В работе использовали замороженный растительный материал, хранящийся при температуре -80 °С. Количество выделенной ДНК определяли при помощи флуориметра Qubit. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью ПЦР с праймерами к гену убиквитина (Таблица 3), с последующим электрофоретическим разделением образцов в 1,5% агарозном геле.

### **Полимеразная цепная реакция**

Фрагменты ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали ДНК полимеразу DreamTaq™ Green (Thermo Fisher Scientific, США) и ДНК полимеразу высотой точности Phusion™ (Thermo Fisher Scientific).

Для реакций с ДНК полимеразой DreamTaq™ Green использовали фермент из расчёта 1,25 единиц активности (enzyme unit, EU) на 50 мкл реакционной смеси. Конечная концентрация компонентов реакционной смеси была следующей: 1x DreamTaq-буфер для проведения ПЦР, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) – 0,2 мМ (каждого нуклеотида), 5'-праймер – 0,2 мкМ, 3'- праймер – 0,2 мкМ. В соответствии с рекомендациями фирмы 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. ПЦР проводили в термоциклере Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories, США). Стандартная программа ПЦР для DreamTaq полимеразы, в зависимости от целей, на стадии 2–4 состояла из 25–35 циклов (Таблица 1).

### **Таблица 1 – 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 3)	30 с
4. Элонгация	72°C	1 мин./1000 п.н.
5. Завершение синтеза ДНК	72°C	5 мин.

Для амплификации фрагмента ДНК с более высокой точностью использовали ДНК полимеразу высокой точности Phusion™ 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. Стандартная программа ПЦР для Phusion полимеразы, в зависимости от целей, на стадии 2–4 состояла из 25–35 циклов (Таблица 2).

**Таблица 2 – 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 3)	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.

В работе были использованы следующие последовательности праймеров, подобранные к промоторной последовательности гена интереса (Таблица 3). Также в работе были использованы стандартные праймеры M13 и праймеры pJET1.2. (CloneJET PCR Cloning kit, Thermo Fisher Scientific, США). Температуру плавления праймера (T<sub>m</sub>) для DreamTaq полимеразы рассчитывали при помощи программы Vector NTI™ Advance 11 (Thermo Fisher Scientific, США). Температуру посадки праймера на матричную ДНК

(температуру отжига,  $T_a$ ) рассчитывали как  $T_m - 3^{\circ}\text{C}$ . Температуру отжига праймеров для Phusion полимеразы рассчитывали с помощью калькулятора температур  $T_m$  Calculator (Thermo Fisher Scientific).

### ПЦР-скрининг бактериальных колоний

ПЦР-скрининг бактериальных колоний – модифицированная методика ПЦР, при которой вместо выделенной и очищенной ДНК в реакционную смесь вносят клетки анализируемой бактериальной колонии.

Реакционную смесь готовили согласно инструкции к набору реагентов CloneJET PCR Cloning kit. Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл без учета бактериальных клеток, которые вносились в эппендорф при помощи деревянной зубочистки. В качестве праймеров были использованы внутренние праймеры к *pCpLBD16*, стандартные праймеры к вектору pJET1.2., входящие в состав набора реактивов, и праймеры M13 для вектора 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI. Программа ПЦР приведена в протоколе к набору CloneJET PCR Cloning kit.

**Таблица 3 – Последовательности праймеров, использованные в работе**

Название	Последовательность праймера (5'→3')	$T_a^1$ , °C	$T_a^2$ , °C
pCpLBD16_forward	AAAAAGCTTCACTCTTGTTATTTGTA GCCCTTATGTAAT	55.5	64.2
pCpLBD16_revers	AAAAAGCTTGTGGGTTATTAGGGA ACATCTCTTAA	55.8	64.2
pCpLBD16_inFor	TAATACATTGTTTTAGCCATGAGAT TGTA	55.3	63.1
pCpLBD16_inRev	GCTTAGTTCAAGTATGTGCTGATAAT TCTG	56.6	63.1
UBQ_forward	ATGCGATYTTTGTGAAGAC	56	-
UBQ_reverse	ACCACCACGRAGACGGAG	56	-
pJET1.2._forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	60	-
pJET1.2._reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	60	-
M13_forward	GTAAAACGACGGCCAGT	52	-
M13_reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	52	-

$T_a^1$  - Температура отжига праймеров для DreamTaq полимеразы

$T_a^2$  - Температура отжига праймеров для Phusion полимеразы

**Полужирный шрифт** - сайты рестрикции для HindIII в последовательности праймеров

- не использовалась

### Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК осуществляли методом электрофореза ДНК в 1% или 1,5% агарозном геле на основе 1-кратного буфера TAE. Для приготовления геля использовали агарозу LE 2 Agarose (Helicon, Россия). Электрофорез проводили в 1-

кратном буфере ТАЕ при напряжении 70-80 В. Для проведения электрофореза использовали электрофоретические ячейки и источник тока Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, США). Для визуализации результатов электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия (2 мкг/мл 1-кратного ТАЕ) в течение 15 минут. Распределение фрагментов ДНК анализировали по флуоресценции бромистого этидия в УФ-свете (312 нм, трансиллюминатор VilberLourmat). В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК фага лямбда, обработанную рестриктазой *Pst*I, или коммерческие маркеры молекулярного веса (Thermo Fisher Scientific, США). Целевые полосы ДНК, предназначенные для клонирования, вырезали из гелей, окрашенных красителем SybrSafe (Thermo Fisher Scientific, США), с использованием преобразователя УФ-света XcitaBlue™ Conversion Screen (Bio-Rad). Результаты электрофореза фотографировали при помощи системы для документации гелей GelDocXR (Bio-Rad Laboratories, США) и обрабатывали при помощи программного обеспечения QuantityOne.

Буфер ТАЕ (концентрированный, 50-кратный, pH 8.0):

2М Трис-ацетат,

50 мМ ЭДТА,

ледяная уксусная кислота для подведения pH.

### **Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции**

Для проведения рестрикции ДНК использовали ферменты для ускоренного гидролиза ДНК FastDigest (Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя изготовителя. Если в ходе реакции образовывался единственный продукт, то его очищали с помощью набора реагентов для очистки ДНК из реакционных смесей (БиоСилика, Россия). Если образовывались несколько фрагментов, то их разделение осуществляли методом электрофореза. Выделение ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора реагентов для выделения фрагментов из геля (БиоСилика, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию фрагмента ДНК в обоих случаях оценивали при помощи флуориметра Qubit.

### **Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli***

Для трансформации использовали компетентные клетки штамма XL1-Blue *E. coli*. Компетентные клетки (100 мкл) хранили при температуре -80°C и оттаивали на льду, после чего добавляли 5 мкл продуктов лигирования или 10 мкл продуктов клональной реакции и инкубировали на льду в течение 20 мин. Затем клетки в течение 1 минуты выдерживали при 37°C для создания условий теплового шока и охлаждали на льду. В стерильных условиях добавляли 900 мкл среды SOC и инкубировали при 37°C в течение

1,5 ч при 250 об./мин. Клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB и антибиотиком, соответствующим приобретённой устойчивости.

### **Трансформация компетентных клеток *Agrobacterium rhizogenes***

К 40 мкл компетентных клеток добавляли 100-200 нг нг плазмидной ДНК и переносили в кювету для электропорации. Электропорацию клеток производили на приборе MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, США) согласно рекомендациям производителя. После электропорации клетки агробактерий культивировали в питательной среде YEB без добавления антибиотиков в течение 2-4 ч при 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). В ходе предыдущих работ в лаборатории был получен второй и третий вектора ввода системы клонирования Gateway, содержащие терминатор актина *Arabidopsis* и репортерную часть: ген *NeonGreen-H2B*, кодирующий зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen (Allele Biotechnology, США) (Shaner *et al.* 2013; Hostettler *et al.* 2017), слитый с геном человеческого гистона H2B (TermAct) (Pina *et al.* 2018).

Нами был получен первый вектор ввода 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI-pCpLBD16, который содержит промотор ортолога гена *LBD16* кабачка. Подробно клонирование вектора приведено в главе Результаты и Обсуждение.

Результирующая кассета pCpLBD16::NeonGreen-H2B-TermAct была собрана в векторе 242 pKGW-RR-MGW (E.Limpens, Wageningen University, Wageningen, Голландия) путём LR plus-клоназной реакции (Gateway™ Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Наличие вставки в результирующем векторе проверяли методом секвенирования и ПЦР с праймерами к гену NeonGreen и терминатору актина TermAct.

## **2.4. Агробактериальная 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

избытком стерильной дистиллированной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге и высевали в стаканы со стерильным, предварительно автоклавированным, вермикулитом. Семена инкубировали в темноте при 25°C в течение 5 дней до появления этиолированного гипокотыля длиной 1,5-2,5 см. Полученные проростки использовали для агробактериальной трансформации штаммами *Agrobacterium rhizogenes*.

Стерилизационная смесь:

33% перекись водорода – 1 часть,  
96% этанол – 2 части,  
стерильная dH<sub>2</sub>O – 1 часть.

### **Трансформация растений с использованием *Agrobacterium rhizogenes***

Трансформацию проростков кабачка проводили по протоколу, разработанному в лаборатории ранее (Irina *et al.* 2012). В работе использовали пятидневные проростки с этиолированным гипокотилем длиной примерно 1,5-2,5 см. У каждого проростка удаляли главный корень, а на срез наносили биомассу агробактерий штамма R1000, несущий один из созданных векторов. Инокулированные проростки высаживали на скосы агаризованной среды Мурашиге и Скуга, разведённой в 2 раза (½ MS) (Murashige, Skoog. 1962), и покрывали стерильной фильтровальной бумагой для предотвращения выпадения проростков. После 5 дней трансформации происходила отмывка от бактериальной массы 50 мкМ водным раствором нитрата серебра, с последующим высаживанием растений для укоренения на среду ½ MS, содержащую антибиотик цефотаксим (1 мг/л). Через несколько дней после отмывки в месте инокуляции становился заметным каллус, из которого впоследствии развивались корни. После появления первых корней, трансформированные проростки освобождали от агаризованной среды и высаживали в стерильный вермикулит, пропитанный ¼ средой Хоагланда. Дальнейшую культивацию трансформантов кабачка проводили в нестерильных условиях.

Среда ½ MS (1л, pH 5,6):

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

### **Отбор ко-трансформированных корней**

Ко-трансформированные корни, несущие T-ДНК вектора 242 pKGW-RR-MGW- с кассетой pCpLBD16::NeonGreen-H2B-TermAct, отбирали по флуоресценции белка DsRED1 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::DsRED1 находится в пределах T-ДНК вектора 242 pKGW-RR-MGW.

Отбирали только такие корни, в которых наблюдали свечение скринингового белка DsRED1 одновременно и в коре, и в тканях центрального цилиндра.

Для локализации активности промотора *CpLBD16* в тканях анализировали продольные и поперечные срезы кончиков корней кабачка. В течение семи последовательных сборов корней трансформированных кабачков отобрано 30 трансгенных корней для дальнейшего анализа. Эффективность агробактериальной трансформации кабачка составила 65%.

## 2.5. Методы микроскопии

### Фиксация материала

Кончики главного корня длиной приблизительно 8 мм отрезали и фиксировали. 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 3-4 раза. Корни выдерживали в фиксаторе в течение 1 ч при комнатной температуре. После фиксации материал промывали 20 мин 0,02 М фосфатным буфером содержащим 0,1 М L-лизина.

#### Состав фиксатора:

0,02 М фосфатный буфер pH 7.2

1% параформальдегид

5% диметилсульфоксид (DMSO)

0,1 М L-лизин

0,01 М м-периодат натрия

### Приготовление препаратов

Фиксированный и промытый в 0,02 М фосфатном буфере с L-лизином растительный материал помещали в резиновые формы в расплавленную 2% агарозу при температуре около 40°C. Для приготовления продольных срезов кончики корня ориентировали параллельно дну формы, для поперечных срезов кончики корня размещали в формах вертикально. Готовые агарозные блоки наклеивали на плоские металлические держатели клеем Супер момент (Хенкель, Россия). Продольные и поперечные срезы получали в водной среде с использованием автоматического прецизионного микротомы с



вибрирующим лезвием Microm HM-650V (Thermo Fisher Scientific Microm International, Германия). Толщина продольных и поперечных срезов составляла 65 мкм. Ядра подкрашивали 0,01% йодидом пропидия в течение 1 ч с предварительной обработкой РНК-азой (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл, клеточные стенки окрашивали в течение 1 ч 0.01% красителем SCRI Renaissance Stain 2200 (Reneissance Chemicals, Великобритания) (Musielak *et al.* 2015). Срезы монтировали на предметные стекла SuperFrost (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel, Германия) и заключали в 65 мкл среды ClearSee (Nagaki *et al.* 2017) под покровные стекла 24x50 мм (Carl Roth, Германия). Излишки воды удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Покровные стёкла фиксировали по периметру лаком для ногтей.

100% ClearSee (50 ml):

Ксилитол (X3375-100G, Sigma) – 5 г

Na-дезоксихолат (Am-O613-0.05, Helicon) – 7,5 г

Мочевина (U5378-100G, Sigma) – 12 г

Лизин – 0,685 г

0.02 M PB (pH=8)

### **Документация и анализ препаратов**

Анализ препаратов и получение иллюстраций проводили с применением конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (CarlZeiss, Германия) с использованием объективов Plan-Apochromat 20x/0,8 и 40x/1,3. Для получения изображения была выбрана стратегия последовательного сканирования треков. Для детекции репортерного флуоресцентного белка NeonGreen использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм, флуоресцентный сигнал собирали в диапазоне 490 – 525 нм на 34-канальном GaAsP детекторе. Тот же лазер и канал использовали для выявления неокрашенных структур на срезах с применением дифференциального интерференционного контраста. Для визуализации ядер, окрашенных пропидий йодидом, использовали возбуждающий лазер 561 нм, флуоресценцию (эмиссию) детектировали в диапазоне 615-680 нм. Глубина получения z-стеков продольных срезов составляла до 25 мкм, а поперечных до 45 мкм. Для получения z-стеков использовали алгоритм с 50% перекрытием толщины оптического среза, которая соответствовала диаметру диафрагмы пинхола (pinhole) в 1,5 AU (airy units, AU). Для представления z-стека в виде двумерного изображения был использован алгоритм проекции максимальной интенсивности в программном обеспечении ZENpro2.3 (Carl Zeiss).

## 2.6. Филогения и биоинформатика

Поиск ортолога белка LBD16 *Arabidopsis* у представителей семейства Тыквенные огурца (*Cucumis sativus*, Chinese Long v2 (Li *et al.* 2011) и Gy14 v1 (Yang *et al.* 2012)) и кабачка (*Cucurbita pepo*, zucchini) (Montero-Pau *et al.* 2018) был проведён с помощью базы данных Cucurbit Genomics Database (cucurbitgenomics.org). В качестве внешней группы использована последовательность белка LBD папоротника (*Azolla filiculoides*), размещённая в базе FernBase (feribase.org). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проведено с помощью алгоритма Clustal Omega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)) (Sievers *et al.* 2011). Сравнительный филогенетический анализ был проведён с использованием программного обеспечения MEGA7.0 (Kumar *et al.* 2016) при помощи метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) на основе модели Jones-Taylor-Thornton+F (JTT+F) (Jones D.T. 1992) с параметром, оценивающим различие частот аминокислотных замен в разных позициях (2 категории, параметр +G = 2.32) (Yang. 1994). JTT+F+G была выбрана из вариантов моделей, имеющих наименьшие значения байесовского информационного критерия (Bayesian Information Criterion (BIC)) (Schwarz. 1978). Модели аминокислотных замен, обладающие наименьшими значениями BIC, наилучшим образом отражают замены аминокислот в процессе эволюции. Начальное древо для эвристического поиска было получено автоматически, путем применения алгоритмов Neighbor-Join (NJ) (Saitou, Nei. 1987) и BioNJ (Gascuel. 1997). Число циклов бутстреппинга (bootstrap value), использовавшееся при построении дерева – 1000.

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

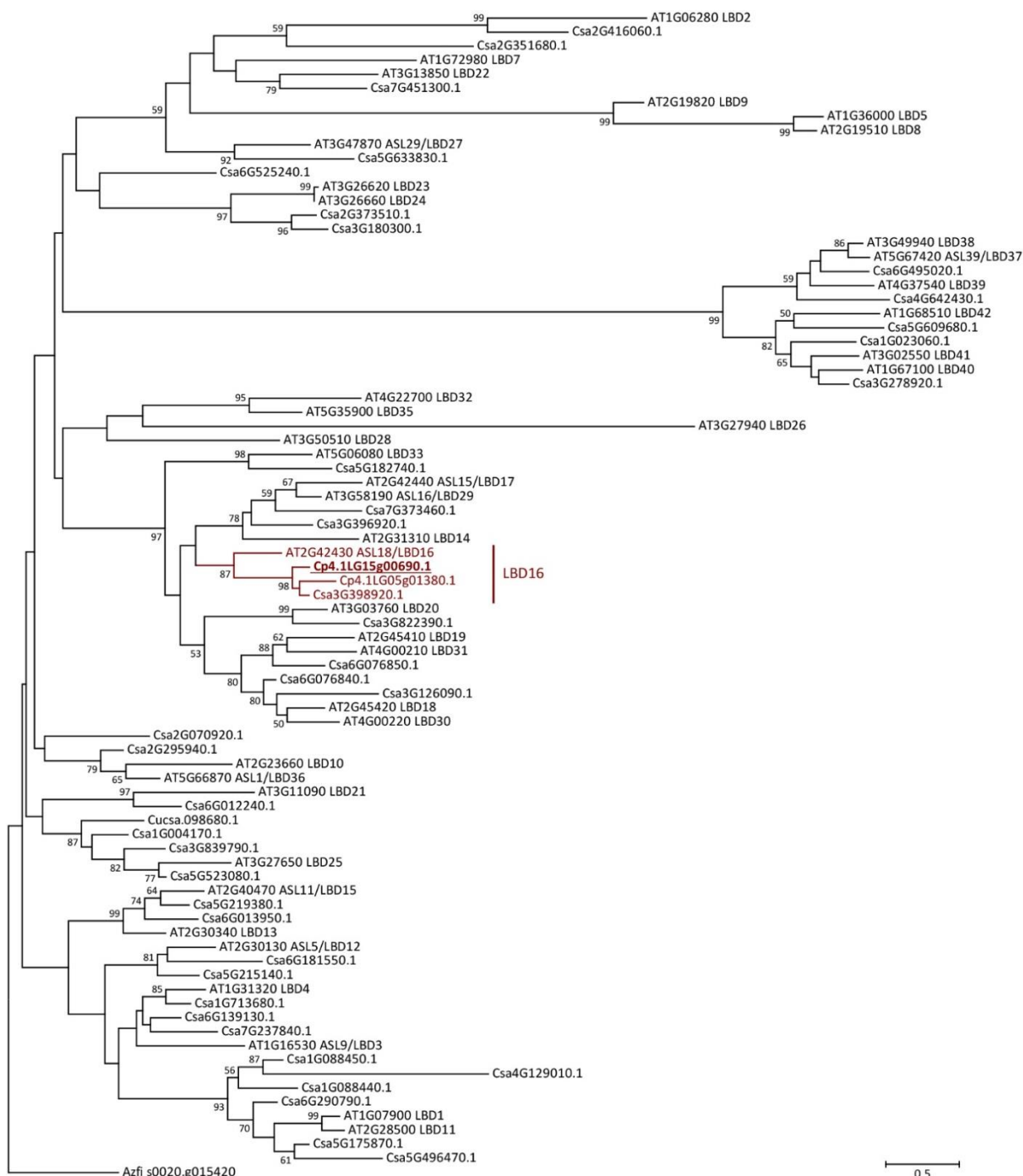
### 3.1 Определение нуклеотидной последовательности ортолога гена *LBD16 Arabidopsis* у *Cucurbita pepo*

На первом этапе работы в базе данных TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) была определена аминокислотная последовательность белка *LBD16 Arabidopsis thaliana*: MASSGNGTTAGTGSPCGACKFLRRKASDCIFAPYFSSEQGAARFAAIHKVFGASNVSKLLLNVP IHDRCEAVVTIAYEAQARLHDPVYGCVSHIFALQQQVAFLOSQVMQMQKAQIAGHQ TSAAGDLRHSSESTNQFMTWQQTSVSPIGSAYSTPYNHHQPYYGHVNPNNPVSPQSSLEESFSNTSSDVTTT ANVRETHHQ TGGGVYGHGIGFHEGYPNKKRSVSYCSSDLGELQALALRMMKN.

С использованием алгоритма BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for proteins) в протеомах огурца (*Cucumis sativus*) из проектов Chinese Long v2 (Li *et al.* 2011) и Gy14 v1 (Yang *et al.* 2012) было найдено 40 белков LBD: 39 в Chinese Long v2 и один, отсутствующий в первом проекте, в Gy14 v1 (Рисунок 10). Был идентифицирован ортолог *LBD16 Arabidopsis* у *C. sativus* (ID - Csa3G398920.1). По проценту сходства с *LBD16* огурца у кабачка (*Cucurbita pepo*) было обнаружено два паралогичных белка *LBD16* (ID - Cp4.1LG05g01380.1 и Cp4.1LG15g00690.1). Cp4.1LG05g01380.1, в сравнении с *LBD16* огурца, обладает 60,7% идентичности и 99,6% консенсусных позиций, а Cp4.1LG15g00690.1 – 67,2% и 98,8%, соответственно (Рисунок 10 и 11). Наличие двух паралогов *LBD16* у *C. pepo* объясняется полногеномной дупликацией, произошедшей около 30 миллионов лет назад у общего предка рода *Cucurbita* (Montero-Pau *et al.* 2018).

На основе данных транскриптомного анализа зоны инициации примордиев боковых корней (до и после обработки экзогенным ауксином) было показано, что уровень экспрессии двух паралогичных генов *LBD16* кабачка в ответ на экзогенный ауксин был разным. Для гена *Cp4.1LG05g01380.1* не было выявлено достоверного изменения уровня экспрессии, а уровень экспрессии гена *Cp4.1LG15g00690.1* достоверно повышался в 58 раз (Кирюшкин А.С., 2019, личное сообщение).

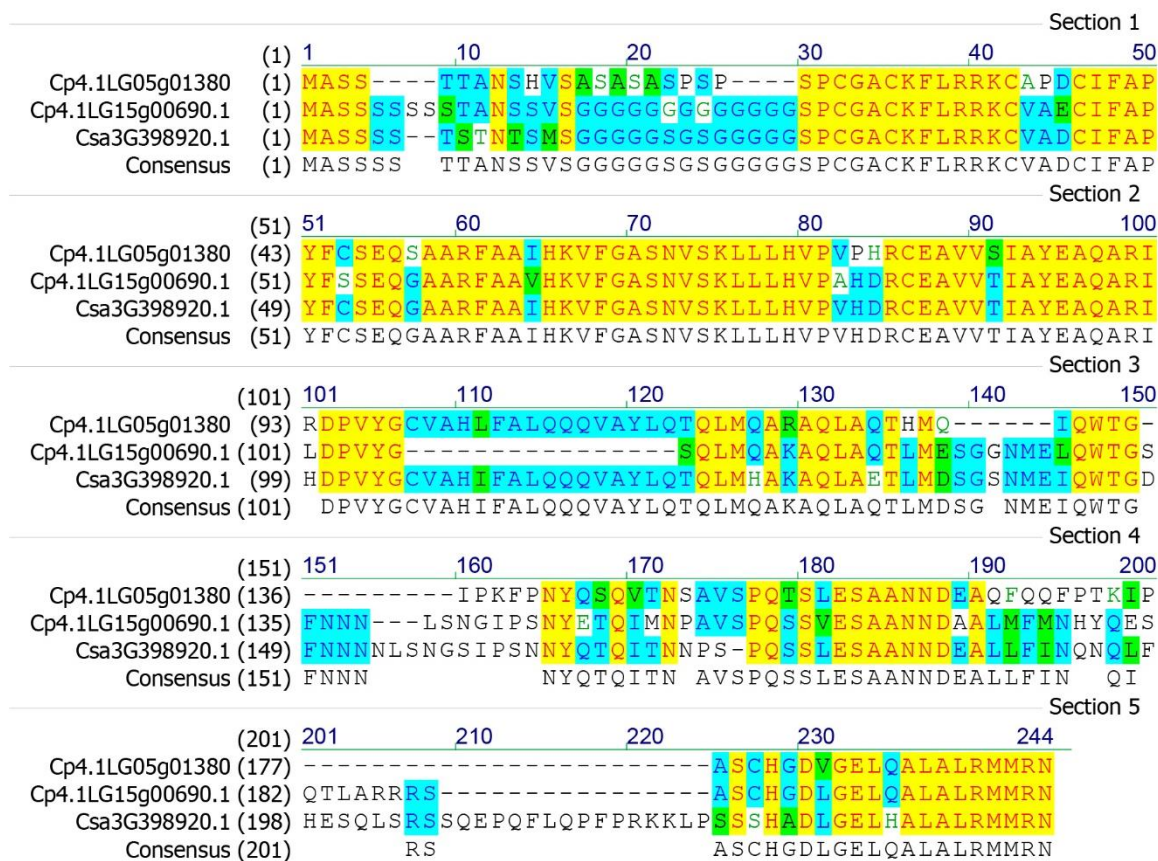
Таким образом, для дальнейшего исследования был выбран ген *Cp4.1LG15g00690.1*, который далее в тексте обозначается как *CpLBD16* (Рисунок 12).



**Рисунок 10 – Филогенетическое дерево белков LBD Arabidopsis, огурца (*Cucumis sativus*) и кабачка (*Cucurbita pepo*)**

Сравнительный филогенетический анализ белков LBD Arabidopsis, огурца (*C. sativus*) и кабачка (*C. pepo*) был проведён с использованием программного обеспечения MEGA7.0 при помощи метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) на основе модели Jones-Taylor-Thornton+F (JTT+F) с параметром, оценивающим различие частот аминокислотных замен в разных позициях (+G). В качестве внешней группы использована последовательность белка LBD

папоротника *Azolla filiculoides* – Azfi s0020.g015420. Подчёркнутым жирным шрифтом отмечен один из предполагаемых ортологов AtLBD16 у *C. pepo*. Значение бутстреп поддержки - 1000. Масштабная линейка - число аминокислотных замен на сайт. ID генов: AT – *A. thaliana* с сайта TAIR; Csa/Cuca – *C. sativus* Chinese Long v2/Gy14 v1 и Cp – *C. pepo* с сайта Cucurbit Genomics Database.



**Рисунок 11 – Оценка процента сходства аминокислотных последовательностей белка LBD16 *Cucumis sativus* и *Cucurbita pepo***

Выравнивание аминокислотных последовательностей белка LBD16 *Cucumis sativus* (ID #Csa...) и *Cucurbita pepo* (ID #Cp4...).

**MASSSSSSSTANSSVSGGGGGGGGGGGGGSPCGACKFLRRKCVAEICIFAPYFSSEQGAARFAAV  
HKVFGASNVS****KLLHVP****PAHDRCEAVVTIAAYEAQARI****LDPVYGSQ****LMQAKA****QLAQTLMESGGNME**  
**LQWTGS****FNNN****LSNG****IPSN****NYETQ****IMNPAV****SPQSS****VESAANND****AALMFMN****HYQES****QTLARR****RS****AS**  
**CHG****D****L****GELQALAL****LRMMRN**

**Рисунок 12 – Аминокислотная последовательность белка CpLBD16**

## 3.2 Клонирование последовательности промотора *CpLBD16* кабачка

### 3.2.1 Подбор праймеров

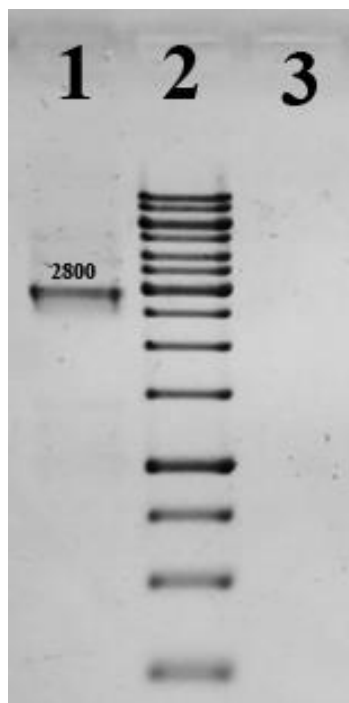
Ген *CpLBD16* располагается на 15-ой хромосоме в геноме кабачка. Для определения последовательности промотора использовали базу данных Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), от старт-кодона гена в сторону 5'-конца был сделан отступ в три тысячи пар оснований.

Для клонирования промотора *CpLBD16* кабачка были подобраны праймеры, представленные ранее в Таблица 3. Подбор всех праймеров осуществляли, согласно правилам (Primer guidelines, Howard Judelson). Возможное образование структур типа шпилек внутри каждого праймера и димеризацию пары праймеров проверяли при помощи программы Vector NTI™ Advance 11.

К 5'-концам праймеров были добавлены сайты рестрикции для эндонуклеазы HindIII для последующего клонирования в вектор 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI.

### 3.2.2 Аналитическая ПЦР с геномной ДНК кабачка и праймерами к промоторной последовательности *CpLBD16*

Для клонирования промотора гена *CpLBD16* в качестве матрицы использовали геномную ДНК кабачка, выделенную из молодых листьев.



**Рисунок 13 – Проверка специфичности работы праймеров к промоторной последовательности гена *CpLBD16* кабачка**

1 – результат ПЦР с праймерами к промотору *CpLBD16*, 2800 п.н.; 2 – молекулярный маркер веса (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); 3 – результаты ПЦР с использованием воды в качестве матрицы (контроль контаминации).

### 3.2.3 Анализ результатов секвенирования промоторной последовательности *CpLBD16*

В процессе клонирования промотора гена *CpLBD16* продукт ПЦР выделяли из геля (Рисунок 13, 1). Промоторную последовательность лигировали с вектором pJET1.2, в котором она была отправлена на секвенирование. Выравнивание нуклеотидной последовательности промотора *CpLBD16* из базы данных Cucurbit Genomic Database и секвенированных последовательностей промотора с различными праймерами показало 98% сходство между ними (Рисунок 14).

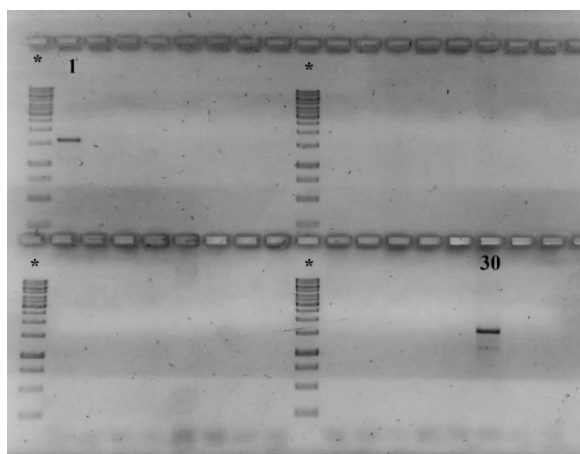
	2665	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770
1 pCPLBD16 M13 Rev	492	AAAGCTCAAAGACAAAAGACGAAAGTTCATAGTTCGGTCTATAACTTATCAGGGTTATCGATACATATTCAAATTAAACTTAAAAATTCATAACCGAGAATAGGTCGGGTC										
Promoter Cp4.1LG15g00690	2663	AAAGCTCAAAGACAAAAGACGAAAGTTCATAGTTCGGTCTATAACTTATCAGGGTTATCGATACATATTCAAATTAAACTTAAAAATTCATAACCGAGAATAGGTCGGGTC										
	647	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	
1 pLBD16 inF1	81	TTTAAAAATTTTAAAAAGACTTACGGTATATCTTAATTAATTTATGCATGAAGTAGCGACTTTATTATAGTAGAAAAAGTAGGGTCGTTATAGGTTAGATT										
Promoter Cp4.1LG15g00690	647	TTTAAAAATTTTAAAAAGACTTACGGTATATCTTAATTAATTTATGCATGAAGTAGCGACTTTATTATAGTAGAAAAAGTAGGGTCGTTATAGGTTAGATT										
	1624	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710		
1 pLBD16 inR1	479	AAAAATTAGGGTTTGATGGGACCAAAACGCTCGTGGGGACACATAATTTAATTACAAAATAAAAAAGCGGAAGCGCAAAAAACGCAGCAAT										
Promoter Cp4.1LG15g00690	1621	AAAAATTAGGGTTTGATGGGACCAAAACGCTCGTGGGGACACATAATTTAATTACAAAATAAAAAAGCGGAAGCGCAAAAAACGCAGCAAT										

**Рисунок 14 – Оценка сходства нуклеотидных последовательностей промотора *CpLBD16* кабачка**

Последовательность промотора *LBD16* из базы данных Cucurbit Genomic Database – Promoter Cp4.LG15g00690. Последовательности pCPLBD16, секвенированные с различных праймеров (M13, inF1 и inR1) и клонированные в вектор pJET1.2.

### 3.2.4 Клонирование промоторной последовательности *CpLBD16* в вектор ввода Gateway-системы

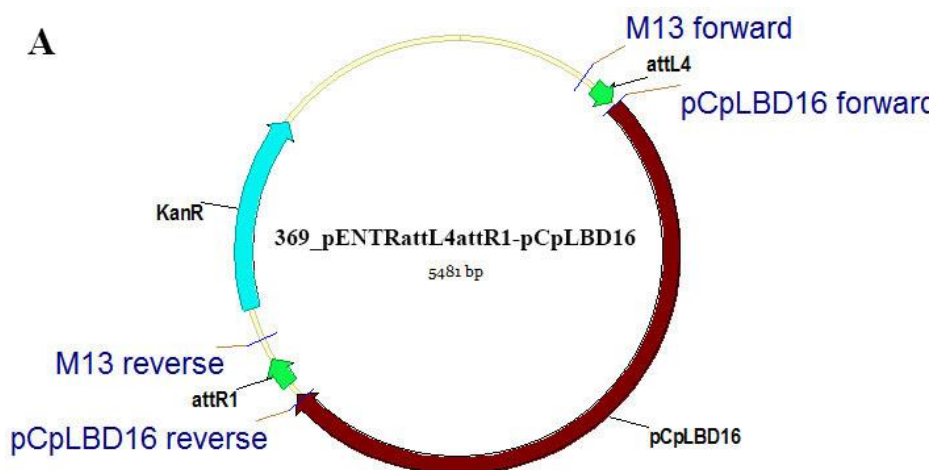
В дальнейшем последовательность промотора *CpLBD16*, клонированную в вектор pJET1.2, амплифицировали и лигировали с вектором ввода Gateway-системы 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI. Продуктом лигирования промотора в вектор трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue методом теплового шока. Присутствие целевой вставки в колониях бактерий определяли методом ПЦР-скрининга бактериальных колоний с использованием «внутренних» праймеров к *pCpLBD16* (Рисунок 15). Из отобранных положительных колоний получали жидкие культуры и выделяли плазмидную ДНК для дальнейшей работы.



**Рисунок 15 – Результаты ПЦР-скрининга бактериальных колоний**

Трансформация *E. coli* штамма XL1 Blue вектором 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI - pCpLBD16. #1 и #30 – колонии с наличием вставки 1600 п.н, \* - молекулярный маркер веса (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) (Thermo Fisher Scientific)

Далее была поставлена ПЦР для определения правильности вставки в выделенных векторах. Правильной ориентацией считали такое положение вставки *pCpLBD16*, когда 5'-конец промотора прилегает к attL4 сайту, а 3'-конец – к сайту attR1. Использовали праймеры M13\_forward pCpLBD16\_reverse, которые определяли правильную ориентацию вставки. Иное положение промотора относительно attL4 и attR1 сайтов считали, как противоположное (Рисунок 16), в этом случае использовали праймеры M13\_forward и pCpLBD16\_forward.





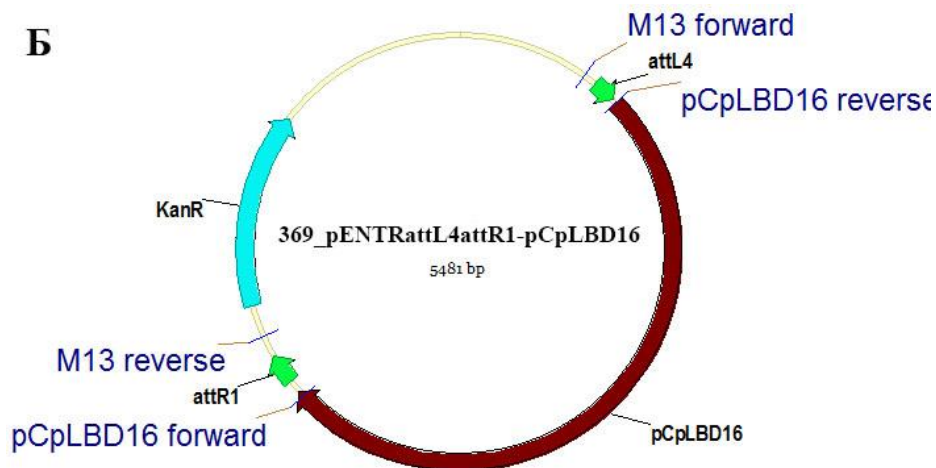


Рисунок 16 – Схемы вектора 369\_pENTRattL4attR1 со вставкой *pCpLBD16*

А – правильное расположение *pCpLBD16* в векторе 369\_pENTRattL4attR1-pCpLBD16. Б – противоположная ориентация *pCpLBD16* в векторе 369\_pENTRattL4attR1-pCpLBD16.

### 3.3 Создание генетической конструкции для исследования активности промотора *CpLBD16*

Созданную молекулярно-генетическую конструкцию 369\_pENTRattL4attR1\_BSAI-pCpLBD16 использовали для сборки конечной кассеты *CpLBD16::NeonGreen-H2B-TermAct* в векторе 242\_pKGW-RR-MGW путем LRII plus-клонажной реакции (Рисунок 17). Второй и третий вектора ввода, содержащие *NeonGreen-H2B* и *TermAct*, соответственно, были получены в ходе предыдущих работ лаборатории.

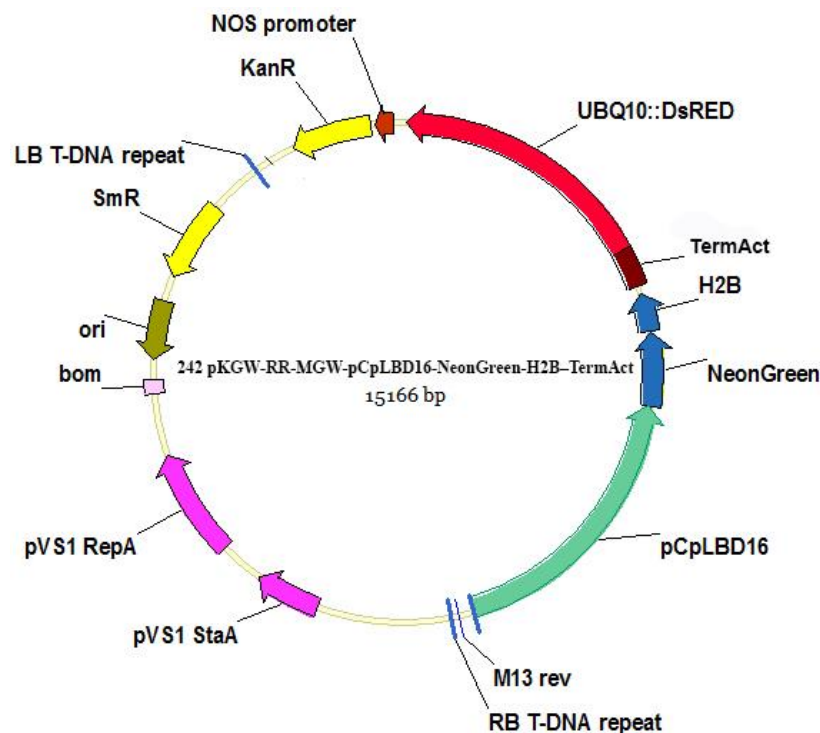


Рисунок 17 – Схема бинарного вектора 242\_pKGW-RR-MGW-pCpLBD16-NeonGreen-H2B-TermAct

В полученном векторе в пределах Т-ДНК находится ген *DsRED1*, работа которого контролируется промотором гена убиквитина *AtUbq10* (*AtUbq10::DsRED1*), и репортерный слитый ген *NeonGreen-H2B* под контролем промотора *CpLBD16* (*pCpLBD16::NeonGreen-H2B*). Данный вектор использовали для трансформации *Agrobacterium rhizogenes* и в дальнейшем – трансформации проростков кабачка.

Свечение белка *DsRED1* позволяло идентифицировать успешно трансформированные корни кабачка на этапе их отбора, а флуоресценция *mNeonGreen* позволила локализовать активность промотора *CpLBD16* на препарате.

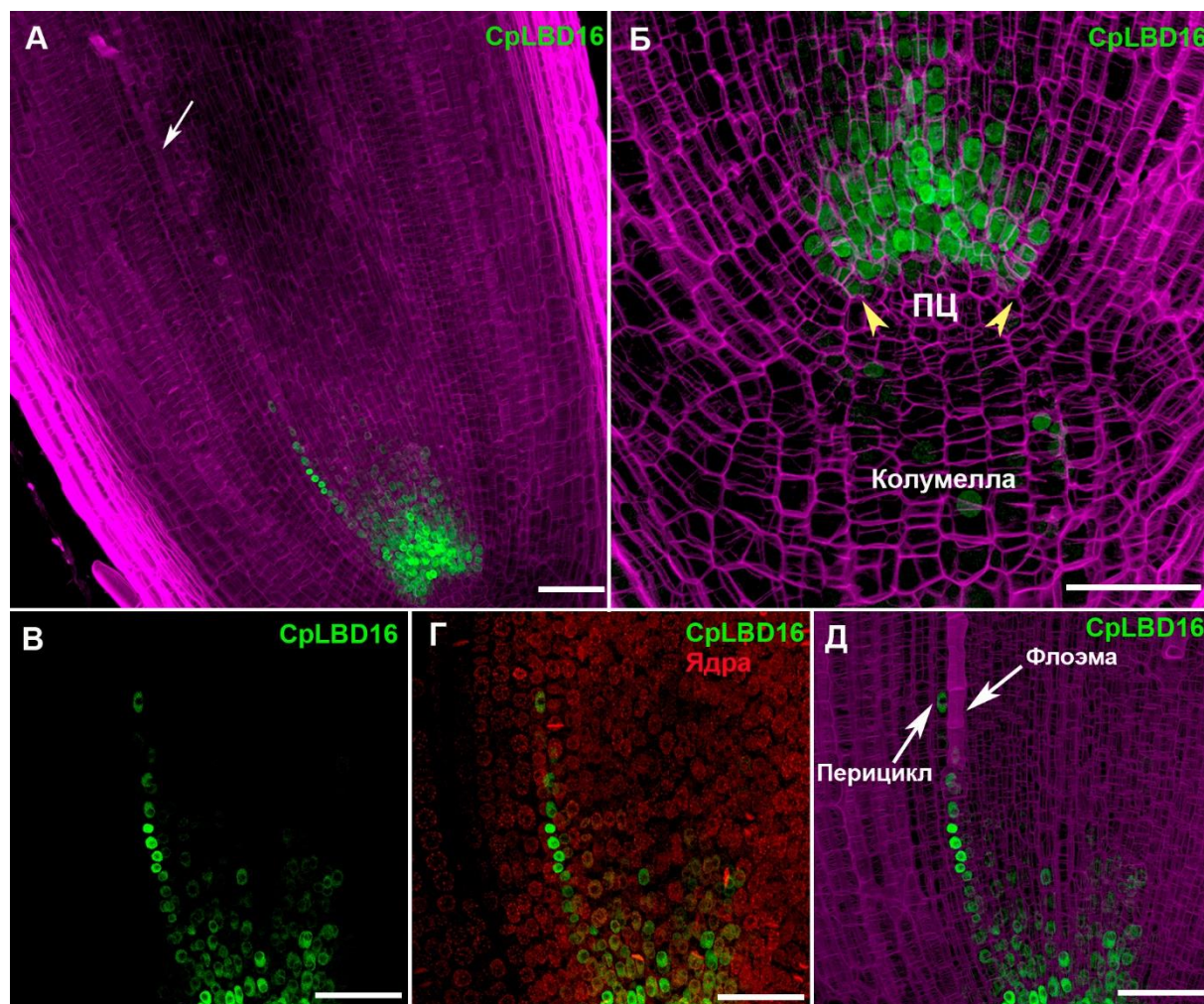
### **3.4 Визуализация тканевой активности промотора *CpLBD16* в кончике корня кабачка**

Экспрессия *CpLBD16* была локализована на продольных и поперечных срезах кончиков корней кабачка (Рисунок 18 и 19). Анализ продольных срезов показал, что промотор этого гена активен в инициальных клетках рядов центрального цилиндра, а также в трех – десяти первых клетках этих рядов на удалении до 50 мкм от покоящегося центра. На продольных срезах возможен анализ паттерна распределения экспрессии *CpLBD16* лишь в отношении двух полюсов проводящих тканей, и оценить максимальное удаление клеток, экспрессирующих *CpLBD16* от кончика корня, сложно.

Для точного определения максимального расстояния, на котором заканчивается экспрессия *CpLBD16*, использовали анализ серии поперечных срезов кончика корня, сделанных на разном удалении от апикальной меристемы (Рисунок 19). Анализ распределения флуоресцентного белка *NeonGreen* в поперечных срезах кончиков трансгенных корней кабачка позволил локализовать экспрессию *CpLBD16* клетках ряда протофлоэмы – на удалении 510 мкм, в клетках перицикла флоэмного полюса – на удалении 150 мкм и в клетках перицикла ксилемного полюса – на удалении 100 мкм от покоящегося центра.

На начальных этапах инициации и развития примордия бокового корня экспрессия *CpLBD16* не была обнаружена (Рисунок 20 А). На стадии развития примордия IV, на удалении около 700 мкм от покоящегося центра, активность промотора гена *CpLBD16* выявлена только в первых клетках формируемой меристемы бокового корня (Рисунок 20 Б–Г). В таких примордиях, на стадии III–IV, различимы четыре клеточных слоя – два внешних и два внутренних, но еще не происходит сжатия слоев наружной коры (Рисунок 20 В–Г). Принято считать, что на этой стадии происходит образование автономной функциональной меристемы. Наши данные позволяют предположить участие *CpLBD16* в формировании такой меристемы примордия.

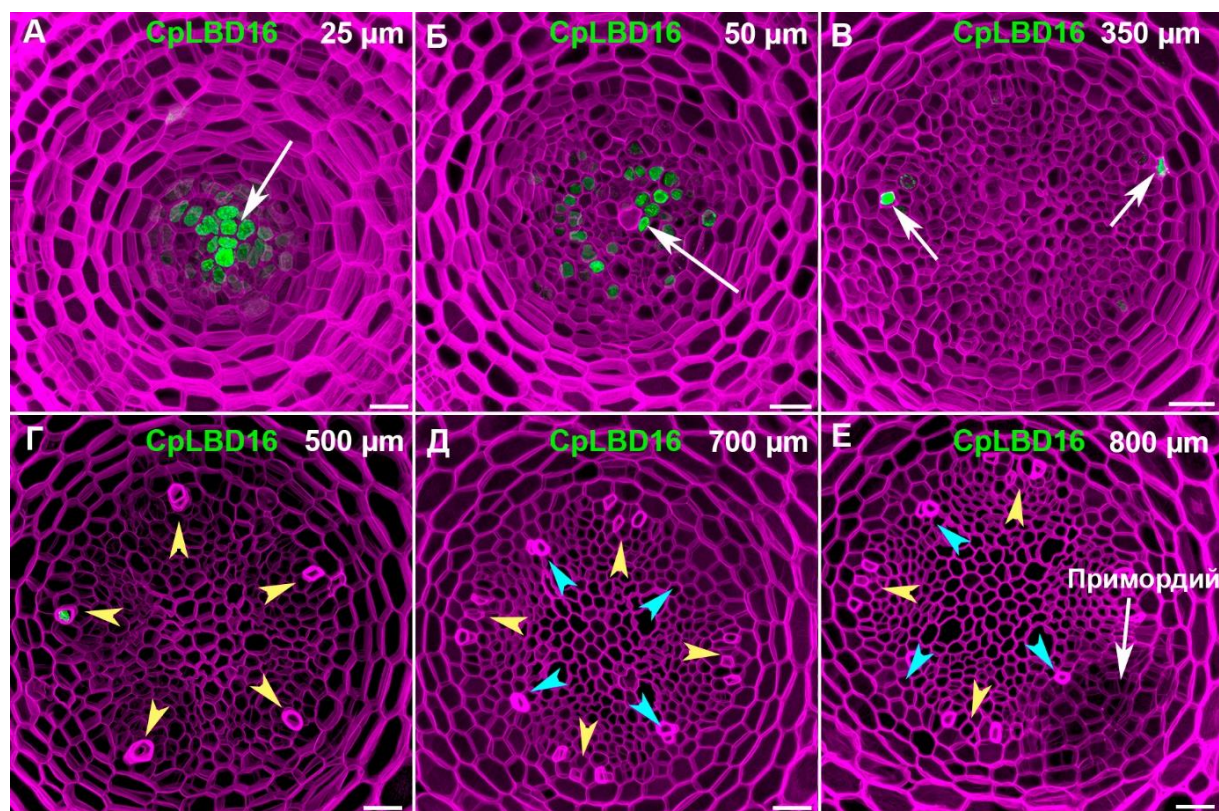
Выявленный нами паттерн экспрессии *CpLBD16* в корне кабачка существенно отличается от такового в *Arabidopsis* (Рисунок 6), что может быть связано с тем, *CpLBD16* в отличие от *AtLBD16* выполняет иные функции и отвечает за развитие родительского корня, функционирование его меристемы и формирование клеток протофлоэмы. Так как в кабачке отсутствует стадия миграции ядер при инициации бокового корня, в которой непосредственно принимает участие *LBD16* у *Arabidopsis*, возможно, *CpLBD16* в корне кабачка имеет другие мишени.



**Рисунок 18 – Локализация экспрессии *CpLBD16* вдоль продольной оси кончиков корней *Cucurbita pepo***

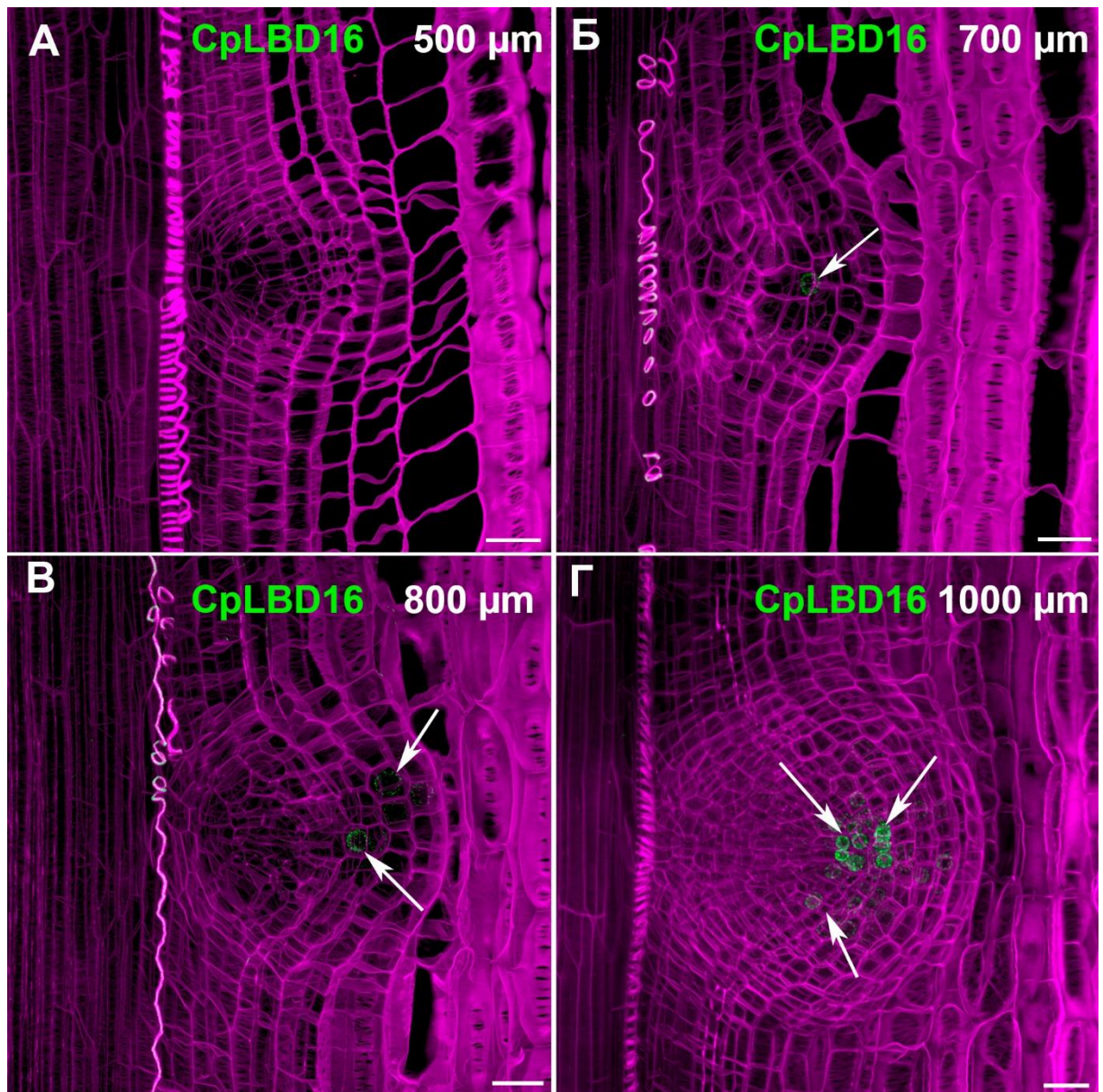
Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Зеленый канал - флуоресценция NeonGreen-N2B, пурпурный канал – клеточные стенки, окрашенные Renaissance 2200, красный канал – клеточные ядра, окрашенные пропидий йодидом. А – локализация экспрессии *CpLBD16* в группе инициальных клеток и в клетках флоэмы, стрелка указывает на наиболее удаленное ядро флоэмы, экспрессирующее *CpLBD16*. Б – наличие флуоресценции в инициальных клетках и в колумелле корневого чехлика. ПЦ – покоящийся центр. Желтые головки стрелок – инициальные клетки

центрального цилиндра. В, Г, Д – локализация экспрессии *CpLBD16* в инициальных клетках меристемы, клетках флоэмы и перицикла. Масштабная линейка – 50 мкм.



**Рисунок 19 – Локализация экспрессии *CpLBD16* на поперечных срезах кончиков корней *Cucurbita pepo***

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Зеленый канал – флуоресценция NeonGreen-N2B, пурпурный канал – клеточные стенки, окрашенные Renaissance 2200. А – срез на уровне инициальных клеток апикальной меристемы (25 мкм от покоящегося центра), стрелка указывает на группу инициальных клеток, экспрессирующих *CpLBD16*. Б – срез на расстоянии 50 мкм от покоящегося центра. В – срез на расстоянии 350 мкм от покоящегося центра, стрелки указывают на клетки центрального цилиндра, экспрессирующие *CpLBD16*. Г – срез на расстоянии 500 мкм от покоящегося центра, желтые головки стрелок указывают на полюса флоэмы. Д – срез на расстоянии 700 мкм от покоящегося, желтые головки стрелок указывают на полюса флоэмы, голубые – на полюса ксилемы. Е – срез на расстоянии 800 мкм от апекса корня, стрелка указывает на примордий, расположенный напротив сосудов ксилемы, желтые головки стрелок указывают на полюса флоэмы, голубые – на полюса ксилемы. Масштабная линейка – 20 мкм.



**Рисунок 20 – Локализация экспрессии *CpLBD16* в примордиях боковых корней на разных стадиях развития *Cucurbita pepo***

А – примордий на стадии III, на удалении 500 мкм от покоящегося центра. Экспрессия *CpLBD16* отсутствует. Б – примордий на стадии IV, на удалении 600 мкм от покоящегося центра. Появляются первые ядра, экспрессирующие *CpLBD16*. В – примордий на стадии V, на удалении 800 мкм от покоящегося центра. Г – примордий на стадии VI формирования примордия, на удалении 1 мм от покоящегося центра. Белые стрелки указывают на ядра клеток, экспрессирующих *CpLBD16*. Масштабная линейка – 20 мкм.

## Заключение

В работе был проведен поиск ортолога гена *LBD16 Arabidopsis thaliana* у кабачка (*Cucurbita pepo*) с использованием базы данных Phytozome, Cucurbit Genomics Database и алгоритма BLAST (cucurbitgenomics.org). Было показано высокое сходство аминокислотных и нуклеотидных последовательностей (более 70%) между геном *LBD16 Arabidopsis* и выбранным гомологом *CpLBD16* кабачка. С использованием методов обратной генетики нами был клонирован промотор гена *CpLBD16*. Для локализации тканевого паттерна экспрессии гена *CpLBD16* была создана генетическая конструкция, несущая промоторную последовательность гена *CpLBD16*, слитую с репортером на основе флуоресцентного белка mNeonGreen-H2B. С использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии проведен анализ распределения репортерного флуоресцентного белка NeonGreen на срезах кончиков трансгенных корней кабачка, содержащих целевую конструкцию. Экспрессия *CpLBD16* обнаружена в инициальных клетках кончика родительского корня, первых десяти клетках ряда центрального цилиндра на удалении до 50 мкм, протофлоэме на удалении около 510 мкм от покоящегося центра, в клетках перицикла флоэмного полюса на удалении 150 мкм от покоящегося центра, в клетках перицикла ксилемного полюса на удалении 100 мкм и в клетках-предшественницах инициалей бокового корня в примордии на IV стадии формирования.

Выявленный нами паттерн экспрессии *CpLBD16* в корне кабачка существенно отличается от такового в *Arabidopsis*, что может быть связано с тем, *CpLBD16* в отличие от *AtLBD16* выполняет иные функции и отвечает за развитие родительского корня, функционирование его меристемы и формирование клеток протофлоэмы. Так как в кабачке отсутствует стадия миграции ядер при инициации бокового корня, в которой непосредственно принимает участие *LBD16* у *Arabidopsis*, возможно, *CpLBD16* в корне кабачка имеет другие мишени.

В ходе выполнения исследования были освоены методы выделения плазмидной и геномной ДНК, методы ПЦР, технология клонирования Gateway, трансформация клеток *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes* методом теплового шока и электрофореза, соответственно; агробактериальная трансформация проростков кабачка; освоена техника приготовления срезов с помощью микротомы с вибрирующим лезвием, освоена техника лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Дальнейшие перспективы работы связаны с локализацией тканевого паттерна распределения белка LBD16 в меристеме корня огурца, имеющего в геноме только один гомолог данного гена, и анализом функциональных свойств *LBD16* с использованием манипуляции уровнем его экспрессии в корне.

## Выводы

- 1) Геном кабачка (*Cucurbita pepo*) содержит два гомолога гена *LBD16 Arabidopsis thaliana*, один из которых обладает наибольшим сходством аминокислотной последовательности с таковой у *LBD16 Arabidopsis*.
- 2) Экспрессия гена *CpLBD16* локализована в инициальных клетках рядов центрального цилиндра, трех – десяти первых клетках этого ряда, клетках ряда протофлоэмы, в клетках перицикла флоэмного полюса и в клетках перицикла ксилемного полюса.
- 3) На начальных этапах инициации и развития примордия бокового корня экспрессия *CpLBD16* отсутствовала, но появлялась со стадии IV развития примордия, момента формирования его автономной меристемы.
- 4) Вероятнее всего, локализованный гомолог *CpLBD16* не определяет компетенции клеток-основательниц бокового корня, но участвует в формировании меристемы бокового корня кабачка.



## Список литературы

1. Aida M., Tasaka M. Morphogenesis and Patterning at the Organ Boundaries in the Higher Plant Shoot Apex // *Plant Molecular Biology*. 2006. N 60. C. 915-928.
2. Alarcón M.V., Lloret P.G., Martín-Partido G., Salguero J. The initiation of lateral roots in the primary roots of maize (*Zea mays* L.) implies a reactivation of cell proliferation in a group of founder pericycle cells // *Journal of Plant Physiology*. 2016. N 192. C. 105-110.
3. Beeckman T., Burssens S., Inze D. The peri-cell-cycle in *Arabidopsis* // *Journal of Experimental Botany*. 2001. N 52. C. 403-411.
4. Bellini C., Pacurar D.I., Perrone I. Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences // *Annual Review of Plant Biology*. 2014. N 65. C. 639-666.
5. Benková E., Hejácíko J. Hormone interactions at the root apical meristem // *Plant Molecular Biology*. 2008. N 69. C. 383.
6. Bennett T., Scheres B. Root Development—Two Meristems for the Price of One? // *Current Topics in Developmental Biology* / под ред. Timmermans M.C.P.: Academic Press, 2010. C. 67-102.
7. Berckmans B., Vassileva V., Schmid S.P.C., Maes S., Parizot B., Naramoto S., *et al.* Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis E2Fa* by lateral organ boundary proteins // *The Plant Cell*. 2011. N 23. C. 3671-3683.
8. Borghi L., Bureau M., Simon R. *Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS* Is Expressed in Boundaries and Coordinates *KNOX* and *PIN* Activity // *The Plant Cell*. 2007. N 19. C. 1795-1808.
9. Breuil-Broyer S., Morel P., De Almeida-Engler J., Coustham V., Negrutiu I., Trehin C. High-resolution boundary analysis during *Arabidopsis thaliana* flower development // *The Plant Journal*. 2004. N 38. C. 182-192.
10. Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., *et al.* Dissecting *Arabidopsis* lateral root development // *Trends in Plant Science*. 2003. N 8. C. 165-171.
11. 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. N 13. C. 843-852.
12. Chandrabali A.S., He F., Soltis P.S., Soltis D.E. Out of the Water: Origin and Diversification of the LBD Gene Family // *Molecular Biology and Evolution*. 2015. N 32. C. 1996-2000.
13. Clowes F.A.L. Changes in cell population kinetics in an open meristem during root growth // *New Phytologist*. 1982. N 91. C. 741-748.
14. Cosgrove D.J. Loosening of plant cell walls by expansins // *Nature*. 2000. N 407. C. 321-326.
15. Coudert Y., Dievart A., Droc G., Gantet P. ASL/LBD phylogeny suggests that genetic mechanisms of root initiation downstream of auxin are distinct in Lycophytes and Euphyllophytes // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. N 30. C. 569-572.
16. De Rybel B., Vassileva V., Parizot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., *et al.* A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity // *Current Biology*. 2010. N 20. C. 1697-1706.

17. De Smet I., Lau S., Voß U., Vanneste S., Benjamins R., Rademacher E.H., *et al.* Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. N 107. C. 2705-2710.
18. 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. N 134. C. 681-690.
19. De Smet I., Vassileva V., De Rybel B., Levesque M.P., Grunewald W., Van Damme D., *et al.* Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root // Science. 2008. N 322. C. 594-597.
20. De Veylder L., Beeckman T., Inze D. The ins and outs of the plant cell cycle // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007. N 8. C. 655-665.
21. Demchenko K., Demchenko N. Changes of root structure in connection with the development of lateral root primordia in wheat and pumpkins // / под ред., 2001a. C. 39-47.
22. Demchenko N.P., Demchenko K.N. Resumption of DNA Synthesis and Cell Division in Wheat Roots as Related to Lateral Root Initiation // Russian Journal of Plant Physiology. 2001b. N 48. C. 755-764.
23. Didonato R.J., Arbuckle E., Buker S., Sheets J., Tobar J., Totong R., *et al.* *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation // Plant Journal. 2004. N 37. C. 340-353.
24. Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., Van Der Graaff E., *et al.* Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. N 105. C. 18818.
25. Du Y., Scheres B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin // Journal of Experimental Botany. 2017. N 69. C. 155-167.
26. Dubrovsky J.G. The origin of tissues of the embryo lateral root in the cucumber. Interactions between tissues and positional control in its development // Ontogenez (Russian Journal of Developmental Biology). 1986. N 17. C. 176-189.
27. Dubrovsky J.G., Rost T.L., Colon-Carmona A., Doerner P. Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2001. N 214. C. 30-36.
28. Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration // Cell Research. 2012. N 22. C. 1169.
29. Fukaki H., Tasaka M. Hormone interactions during lateral root formation // Plant Molecular Biology. 2008. N 69. C. 437.
30. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data // Molecular Biology and Evolution. 1997. N 14. C. 685-695.
31. Goh T., Joi S., Mimura T., Fukaki H. The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins // Development. 2012. N 139.
32. Herder G.D., Van Isterdael G., Beeckman T., De Smet I. The roots of a new green revolution // Trends in Plant Science. 2010. N 15. C. 600-607.
33. 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. N 14. C. 2339-2351.
34. Husbands A., Bell E.M., Shuai B., Smith H.M.S., Springer P.S. LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins // Nucleic Acids Research. 2007. N 35. C. 6663-6671.

35. Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Demchenko N.P., Semenova V.A., Demchenko K.N., Pawlowski K. Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of *Cucurbita pepo*: is auxin a key player? // *Annals of Botany*. 2018. N 122. C. 873-888.
36. Ilina E.L., Logachov A.A., Laplaze L., Demchenko N.P., Pawlowski K., Demchenko K.N. Composite *Cucurbita pepo* plants with transgenic roots as a tool to study root development // *Annals of Botany*. 2012. N 110. C. 479-489.
37. Jones D.T. T.W.R., Thornton J.M. . The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences // *Computer Applications in the Biosciences*. 1992. N 8. C. 275-282.
38. Kim M.-J., Kim J. Identification of nuclear localization signal in ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16 (ASL18/LBD16) from *Arabidopsis* // *Journal of Plant Physiology*. 2012. N 169. C. 1221-1226.
39. Kim M.-J., Kim M., Lee M.R., Park S.K., Kim J. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD)10 interacts with SIDECAR POLLEN/LBD27 to control pollen development in *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. 2015. N 81. C. 794-809.
40. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. N 33. C. 1870-1874.
41. Kumpf R.P., Shi C.-L., Larrieu A., Stø I.M., Butenko M.A., Péret B., *et al.* Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. N 110. C. 5235-5240.
42. Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis H., Hove C.a.T., Hogeweg P., Marée A.F.M., *et al.* Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport // *PLOS Biology*. 2008. N 6. C. e307.
43. Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C., Sussex I.M. Formation of lateral root meristems is a two-stage process // *Development*. 1995. N 121. C. 3303-3310.
44. Lee H.W., Cho C., Kim J. *Lateral Organ Boundaries Domain16* and *18* Act Downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2015. N 168. C. 1792-1806.
45. Lee H.W., Kim J. EXPANSINA17 Up-Regulated by LBD18/ASL20 Promotes Lateral Root Formation During the Auxin Response // *Plant and Cell Physiology*. 2013. N 54. C. 1600-1611.
46. Lee H.W., Kim N.Y., Lee D.J., Kim J. LBD18/ASL20 Regulates Lateral Root Formation in Combination with LBD16/ASL18 Downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2009. N 151. C. 1377-1389.
47. 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. N 12. C. 540.
48. Liu J., Sheng L., Xu Y., Li J., Yang Z., Huang H., *et al.* *WOX11* and *12* Are Involved in the First-Step Cell Fate Transition during de Novo Root Organogenesis in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2014. N 26. C. 1081-1093.
49. Lucas M., Guédon Y., Jay-Allemand C., Godin C., Laplaze L. An Auxin Transport-Based Model of Root Branching in *Arabidopsis thaliana* // *PLOS ONE*. 2008. N 3. C. e3673.
50. Lucas M., Kenobi K., Von Wangenheim D., Voß U., Swarup K., De Smet I., *et al.* Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. N 110. C. 5229-5234.
51. Majer C., Hochholdinger F. Defining the boundaries: Structure and function of LOB domain proteins // *Trends Plant Sci*. 2011. N 16.
52. Majer C., Xu C., Berendzen K.W., Hochholdinger F. Molecular interactions of ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS, a LOB domain protein regulating shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.) // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012. N 367. C. 1542-1551.

53. Malamy J.E., Benfey P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* // *Development*. 1997. N 124. C. 33-44.
54. Mallory T.E., Chiang S.-H., Cutter E.G., Gifford Jr. E.M. Sequence and pattern of lateral root formation in five selected species // *American Journal of Botany*. 1970. N 57. C. 800-809.
55. Mangeon A., Jablonska B., Bell E.M., Lin W.-C., Springer P.S. Misregulation of the LOB domain gene *DDA1* suggests possible functions in auxin signalling and photomorphogenesis // *Journal of Experimental Botany*. 2010. N 62. C. 221-233.
56. Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M., *et al.* *AUX1* promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling // *Plant Cell*. 2002. N 14. C. 589-597.
57. Marhavý P., Vanstraelen M., De Rybel B., Zhaojun D., Bennett M.J., Beeckman T., *et al.* Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation // *EMBO Journal*. 2013. N 32. C. 149-158.
58. Matsumura Y., Iwakawa H., Machida Y., Machida C. Characterization of genes in the *ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB)* family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between *AS2* and other family members // *The Plant Journal*. 2009. N 58. C. 525-537.
59. Mclean I.W., Nakane P.K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1974. N 22. C. 1077-1083.
60. 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. N 16. C. 1161-1171.
61. Motte H., Beeckman T. The evolution of root branching: increasing the level of plasticity // *Journal of Experimental Botany*. 2018. N 70. C. 785-793.
62. Musielak T.J., Schenkel L., Kolb M., Henschen A., Bayer M. A simple and versatile cell wall staining protocol to study plant reproduction // *Plant Reproduction*. 2015. N 28. C. 161-169.
63. Nagaki K., Yamaji N., Murata M. ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples // *Scientific reports*. 2017. N 7. C. 42203-42203.
64. Nieuwland J., Maughan S., Dewitte W., Scofield S., Sanz L., Murray J.a.H. The D-type cyclin *CYCD4;1* modulates lateral root density in *Arabidopsis* by affecting the basal meristem region // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. N 106. C. 22528-22533.
65. Oh S.A., Park K.S., Twell D., Park S.K. The *SIDECAR POLLEN* gene encodes a microspore-specific LOB/*AS2* domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division // *The Plant Journal*. 2010. N 64. C. 839-850.
66. Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M. *ARF7* and *ARF19* Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of *LBD/ASL* Genes in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2007. N 19. C. 118-130.
67. Osmont K.S., Sibout R., Hardtke C.S. Hidden Branches: Developments in Root System Architecture // *Annual Review of Plant Biology*. 2007. N 58. C. 93-113.
68. Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., *et al.* *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story // *Trends in Plant Science*. 2009. N 14. C. 399-408.
69. Peret B., Larrieu A., Bennett M.J. Lateral root emergence: a difficult birth // *Journal of Experimental Botany*. 2009. N 60. C. 3637-3643.

70. Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., Van Der Putten W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere // *Nature Reviews Microbiology*. 2013. N 11. C. 789.
71. Pires N.D., Dolan L. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012. N 367. C. 508-518.
72. Porco S., Larrieu A., Du Y., Gaudinier A., Goh T., Swarup K., *et al.* Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier *LAX3* // *Development*. 2016. N 143. C. 3340-3349.
73. Raven J.A., Edwards D. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance // *J Exp Bot*. 2001. N 52. C. 381-401.
74. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol Biol Evol*. 1987. N 4.
75. Sanz L., Dewitte W., Forzani C., Patell F., Nieuwland J., Wen B., *et al.* The *Arabidopsis* D-type cyclin *CYCD2;1* and the inhibitor *ICK2/KRP2* modulate auxin-induced lateral root formation // *Plant Cell*. 2011. N 23. C. 1-20.
76. Schwarz G. Estimating the Dimension of a Model // *Ann. Statist.* 1978. N 6. C. 461-464.
77. Seago J.L. Developmental Anatomy in Roots of *Ipomoea purpurea*. II. Initiation and Development of Secondary Roots // *American Journal of Botany*. 1973. N 60. C. 607-618.
78. Shuai B., Reynaga-Pena C.G., Springer P.S. The lateral organ boundaries gene defines a novel plant-specific gene family // *Plant Physiol*. 2002. N 129.
79. 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 // *Molecular Systems Biology*. 2011. N 7. C. 539.
80. Stanley K., Laskowski M., Kajstura T., Biller S., Prusty R. Expression Profiling of Auxin-treated *Arabidopsis* Roots: Toward a Molecular Analysis of Lateral Root Emergence // *Plant and Cell Physiology*. 2006. N 47. C. 788-792.
81. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. *Arabidopsis* Regeneration from Multiple Tissues Occurs via a Root Development Pathway // *Developmental Cell*. 2010. N 18. C. 463-471.
82. Swarup K., Benkova E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., *et al.* The auxin influx carrier *LAX3* promotes lateral root emergence // *Nature Cell Biology*. 2008. N 10. C. 946-954.
83. Thatcher L.F., Powell J.J., Aitken E.a.B., Kazan K., Manners J.M. The Lateral Organ Boundaries Domain Transcription Factor *LBD20* Functions in *Fusarium* Wilt Susceptibility and Jasmonate Signaling in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2012. N 160. C. 407-418.
84. Torres-Martínez H.H., Rodríguez-Alonso G., Shishkova S., Dubrovsky J.G. Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms // *Frontiers in Plant Science*. 2019. N 10.
85. Van Norman J.M., Xuan W., Beeckman T., Benfey P.N. To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation // *Development*. 2013. N 140. C. 4301-4310.
86. Vanneste S., De Rybel B., Beemster G.T.S., Ljung K., De Smet I., Van Isterdael G., *et al.* Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for *SOLITARY ROOT/IAA14*-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. 2005a. N 17. C. 3035-3050.
87. Vanneste S., Maes L., De Smet I., Himanen K., Naudts M., Inzé D., *et al.* Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation // *Physiologia Plantarum*. 2005b. N 123. C. 139-146.
88. Vermeer J.E.M., Von Wangenheim D., Barberon M., Lee Y., Stelzer E.H.K., Maizel A., *et al.* A Spatial Accommodation by Neighboring Cells Is Required for Organ Initiation in *Arabidopsis* // *Science*. 2014. N 343. C. 178-183.

89. Vilches-Barro A., Maizel A. Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana* // *Current Opinion in Plant Biology*. 2015. N 23. C. 31-38.
90. Von Wangenheim D., Fangerau J., Schmitz A., Smith R.S., Leitte H., Stelzer E.H.K., *et al.* Rules and Self-Organizing Properties of Post-embryonic Plant Organ Cell Division Patterns // *Current Biology*. 2016. N 26. C. 439-449.
91. Xuan W., Band L.R., Kumpf R.P., Van Damme D., Parizot B., De Rop G., *et al.* Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in *Arabidopsis*// *Science*. 2016. N 351. C. 384-387.
92. Yang L., Koo D.-H., Li Y., Zhang X., Luan F., Havey M.J., *et al.* Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly // *The Plant Journal*. 2012. N 71. C. 895-906.
93. Yang. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods // *Journal of Molecular Evolution*. 1994. N N 39. C. 306-314.