

Новая методика количественного описания процесса обновления клеток в корневом чехлике у *Arabidopsis thaliana* L.

Черенко В.^{1, 2*}, Землянская Е.^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* cherenkova@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: корневой чехлик; *Arabidopsis thaliana*; микроскопия; фенотипирование; ауксин

Мотивация и цель: Понимание того, с помощью каких механизмов определяется размер органов у живых организмов, является одной из важнейших задач биологии развития. Одна из стратегий такой регуляции – координация пространственно разобщенных процессов деления и удаления клеток. У растений эта стратегия реализуется в корневом чехлике (КЧ), который располагается на кончике корня, защищая от повреждений нишу стволовых клеток. КЧ непрерывно пополняется новыми клетками в результате деления инициалей, при этом его размер и форма остаются постоянными [1]. Поддержание размера и структуры этого органа крайне важно для правильного функционирования корня и происходит благодаря синхронизации делений стволовых клеток колумеллы (центральной части корневого чехлика) и удаления внешнего слоя клеток корневого чехлика [2]. Однако механизмы, координирующие процессы деления и слущивания клеток в корневом чехлике, мало изучены. Для эффективного исследования механизмов, координирующих эти процессы, необходима простая скрининговая методика, позволяющая количественно оценивать параметры клеточной динамики в КЧ. Разработка такой методики применительно к модельному растению *Arabidopsis thaliana* является целью данной работы.

Методы и алгоритмы: Методика предназначена для относительной оценки изменения скоростей деления и удаления клеток в корневом чехлике при изменении условий. Для этого использовали легко детектируемые структурные параметры КЧ: количество отделившихся клеточных слоев (у *A. thaliana* клетки КЧ слущиваются единым слоем, а не по отдельности, что позволяет легко оценить этот параметр), количество клеточных слоев без признаков их отделения от КЧ и общее количество клеточных слоев. В основе методики – два этапа микроскопии для каждого исследуемого корня: микроскопия в проходящем свете без переноса с твердой питательной среды с целью оценки количества отделившихся клеточных слоев КЧ; конфокальная микроскопия с целью оценки количества клеточных слоев без признаков их отделения от КЧ.

Результаты: Считается, что ключевым координатором деления стволовых клеток и слущивания клеток дистального слоя корневого чехлика является градиент фитогормона ауксина с максимумом в стволовых клетках и минимумом в клетках отделяющегося слоя [3]. Мы провели апробацию разработанной методики для оценки влияния ауксина (индол-3-уксусная кислота) на клеточную динамику в КЧ *A. thaliana*.

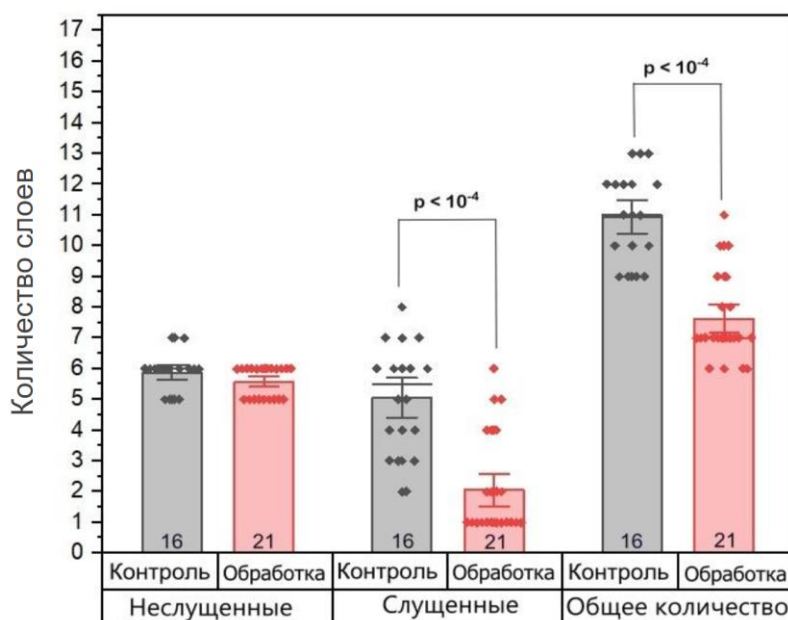


Рис. 1. Количество слоев в корневом чехлике после обработки ауксином в концентрации 0.1 мкМ

На гистограмме отображено среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Медиана отображена горизонтальной линией. Размер выборки указан внутри столбцов

Нам удалось зафиксировать изменения структурных параметров КЧ (рис. 1), а именно снижение количества слущенных слоев КЧ и общего количества слоев; количество слоев без признаков отделения от КЧ осталось неизменным. Таким образом, показано, что избыток ауксина сбалансированно снижает скорость деления инициалей КЧ и скорость слущивания наружного клеточного слоя.

Выводы: Предлагаемая нами методика может быть успешно использована для количественной оценки параметров клеточной динамики в КЧ на фоне мутаций в потенциальных регуляторах.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 20-14-00140.

New technique for the quantitative description of root cap renewal in *Arabidopsis thaliana* L.

Cherenko V.^{1, 2*}, Zemlyanskaya E.^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* cherenkova@bionet.nsc.ru

Key words: root cap; *Arabidopsis thaliana*; microscopy; phenotyping; auxin

Motivation and Aim: Understanding the mechanisms, which determine organ size in living organisms is one of the most important tasks of developmental biology. One of the strategies of this regulation is to coordinate spatially separated cell division and cell removal. In plants, this strategy is implemented in the root cap (RC), which is located at

the root tip, protecting the stem cell niche from damage. The RC is continuously replenished with new cells due to the division of the initials, and its size and shape remain constant [1]. The maintenance of the size and structure of this organ is essential for the proper functioning of the root and occurs due to the synchronization of the division of the stem cells in the columella (central part of the root cap) and the removal of the outer layer of the root cap cells [2]. However, the mechanisms that coordinate cell division and removal in the root cap are poorly understood. In order to effectively study the mechanisms coordinating these processes, a simple screening technique is needed, which allows quantification of the parameters of cell dynamics in the RC. The development of such a technique for the model plant *Arabidopsis thaliana* is the goal of this work.

Methods and Algorithms: The technique is designed for the relative assessment of changes in cell division and removal rates in the root cap under changing conditions. To achieve this, easily detectable structural parameters of the root cap were utilized: detached cell layers (in *A. thaliana*, RC cells slough off as a single layer rather than individual cells, which allows for easy estimation of this parameter), the number of cell layers without signs of detachment from the RC, and the total number of cell layers. The methodology is based on two microscopy stages for each examined root: bright-field microscopy without transfer from solid nutrient medium to assess the number of detached cell layers in the RC; confocal microscopy to assess the number of cell layers without signs of detachment from the RC.

Results: The gradient of the phytohormone auxin with a maximum in the stem cells and a minimum in the cells of the separating layer is thought to be a key coordinator of stem cell division and the detachment of cells from the root cap surface [3]. We used the new technique to assess the influence of auxin (indole-3-acetic acid) on cell dynamics in the root cap of *A. thaliana*.

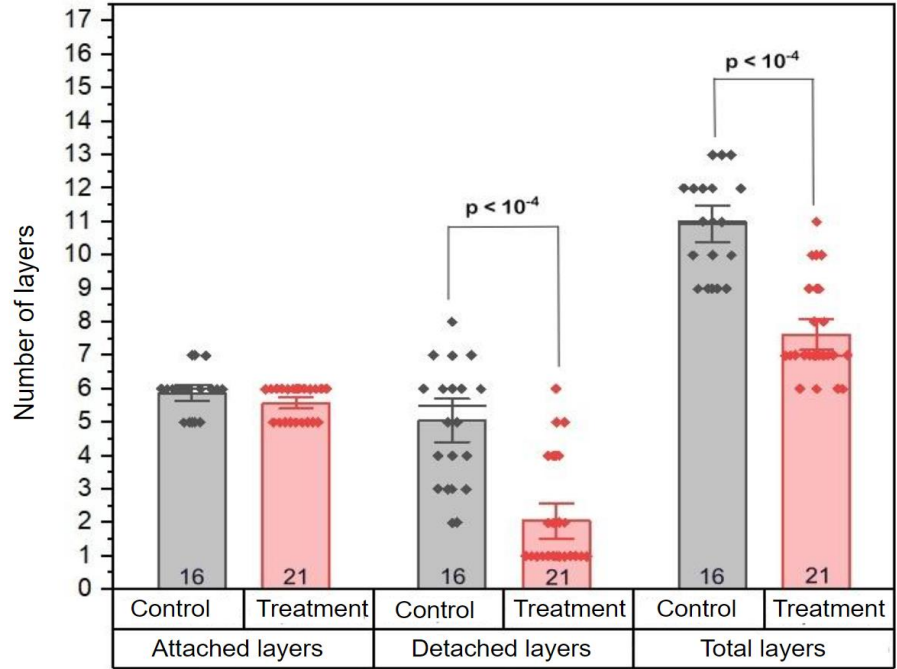


Fig. 1. Number of layers in the root cap after auxin treatment at a concentration of 0.1 μM . The chart shows the average value $\pm$ the standard error. Median is designated as a horizontal line. Number of samples is shown in the bars

We observed changes in the structural parameters of the root cap (Fig. 1), namely: a decrease in the number of detached layers of the root cap and the total number of layers, while the number of layers without signs of detachment from the RC remained unchanged. Thus, it was demonstrated that an excess of auxin evenly reduced the division rate of root cap initials and the rate of sloughing of the outer cell layer.

Conclusion: The proposed methodology can be successfully used to estimate changes in the parameters of cell dynamics in RC in mutant background with the deficiency in the potential regulators.

Funding: The study was supported by the RSF grant No. 20-14-00140.

Список литературы/References

1. Kumpf R.P., Nowack M.K. The root cap: a short story of life and death. *J Exp Bot.* 2015;66(19):5651-5662. doi 10.1093/JXB/ERV295
2. Fendrych M., Hautegeim T.V. et al. Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2014;24(9):931. doi 10.1016/J.CUB.2014.03.025
3. Dubreuil C., Jin X., Grönlund A., Fischer U. A local auxin gradient regulates root cap self-renewal and size homeostasis. *Curr Biol.* 2018;28(16):2581-2587. doi 10.1016/J.CUB.2018.05.090