МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

Специализированный учебно-научный центр им. Колмогорова

Кафедра биологии

Чергинцев Денис Александрович

Изучение развития меристемы побега у фасциированных мутантов гороха посевного (*Pisum sativum*) и резуховидки Таля (*Arabidópsis thaliána*)

Курсовая работа ученика 10 класса Н

Руководитель:
профессор СУНЦ МГУ, д.б.н.
Чуб Владимир Викторович

Москва, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ.

Введение…….….. 3
Обзор литературы…….. 4
Цели и задачи……...……. 8
Материалы и методы……...…… 9
Результаты и обсуждение…….....…..…. 10
Выводы……...……. 11
Список литературы……. 12
Приложения……..... 13

Введение

Изучение стволовых клеток животных и человека является очень перспективной область исследования, так как открывает новые возможности лечения различных болезней. За этими изучениями скрываются возможность лечения онкологических и наследственных генетических заболеваний, выращивание искусственных органов для облегчения трансплантации и лучшей совместимости. В тоже время, как-то необоснованно мало исследований проводится на растительных аналогах животных стволовых клеток – меристемах.

Меристема – структура, отвечающая за число и форму органов растения. Изучение меристемы и выявление возможностей влиять и контролировать ее рост и форму может позволить выводить совершенно непохожие растения в пределах одного вида и сорта.

Фасциированная меристема – меристема, увеличенная по размерам и измененная по форме, образует растения с измененным числом и формой его органов.

В перспективе, можно предположить, что изучение влияния различных антропогенных и средовых факторов на меристему позволит в промышленных масштабах получать модифицированные растения. Это можно будет применять в сельском хозяйстве, получая высокопродуктивные растения, или в садоводстве, разводя растения с многократно увеличенным количеством цветков.

Меристема, несмотря на свои незначительные размеры, довольно сложно устроена, на нее влияют многочисленные группы различных белков, кодируемые большим количеством генов. До сих пор многое остается неизвестным. Например, непонятно, как изменить меристему так, чтобы растение обрело именно нужный габитус, как производить эти изменения – с помощью генной инженерии, выращивая растения на определенной среде, чем – то обрабатывая уже взрослые растения, или же можно будет это делать с помощью патогенных организмов – бактерий и паразитических грибов.

Ценность данной работы с научной точки зрения заключается в исследовании закономерностей изменения габитуса растения в зависимости от генетически заложенных изменений и внешних факторов среды. Эти данные позволят дополнить имеющуюся информацию об объекте и в дальнейшем проводить более глубокие исследования, концентрируясь на морфологических и механических свойствах меристемы. Совокупность данных о последних вместе с другими сведеньями позволят в перспективе создать создать модель, которая будет не только 3D – реконструкцией меристемы, но и отображать все ее свойства и функции, например, в ней будет присутствовать управляемый рост.

Обзор литературы

Меристемы – своеобразная по своему строению и функциям группа растительных тканей, состоящая из постоянно делящихся клеток, производящая стебель, корень, инициирующая листья, закладывающая цветок. Именно в меристемах сосредоточенны основные процессы диффузного роста. Клетки меристемы имеют тонкие стенки и сохраняют способность к делению в течение долгого времени. Меристемами в растениях являются: собственно верхушечные (апикальные) и боковые (латеральные) меристемы; меристемы проводящих тканей (васкулярные) – прокамбий и камбий; пробковый камбий (феллоген) – ткань, образующая пробку; вставочные (интеркалярные) меристемы – отвечают за удлинение стебля, например, у злаковых и в нижней части эмбрионального побега, располагается в междоузлиях. На вершине побега (апексе) находится побеговая апикальная меристема (дальше-ПАМ), (являющаяся объектом исследования), она обеспечивает апикальный (верхушечный) рост. Ее структура поддерживается постоянной и практически неизменной на протяжении жизни[1]. Клетки, находящиеся под меристемой приступают к растяжению и дифференциации, формируя в дальнейшем основные ткани растений.[2]

В апикальной меристеме двудольных растений инициальные клетки в меристеме присутствуют как минимум в двух слоях. Инициали верхних слоев делятся антиклинально, параллельно поверхности ПАМ (побеговой апикальной меристемы), инициали более глубоких слоев могут также делиться периклинально.

В 1924 году Шмидт (Schmidt) предложил теорию туники и корпуса в качестве концепции строения ПАМ.

Туника, состоит из отдельных слоев клеток. Обычно число слоев равно трем. Отдельные поверхностные слои клеток обозначают L1, L2, L3 и т.д. Под туникой лежит корпус, здесь ориентация веретена делений клеток непостоянна. Часть меристемы, содержащую инициали корпуса, называют rib-зоной, или медуллярной зоной. В ПАМ есть и другие зоны, отличающиеся по свойствам и функциям.

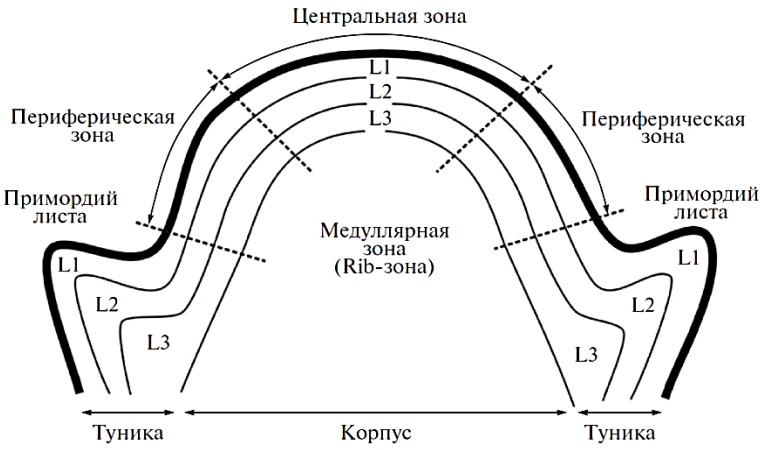


Рис.1 Зонирование меристемы (из В.В. Чуб, А.А. Синюшин. 2012.)

Для голосемянных Фостер (Foster, 1941) разработал цитологическое зонирование, которое вполне применимо и для покрытосемянных. По этому зонированию ПАМ состоит из 5 основных зон, наложенных на слои туники и корпус.[3]

В тунике различают центральную и периферическую зоны. Клетки центральной зоны с заметной вакуолизацией и менее плотной цитоплазмой, а клетки периферической – менее вакуолизированные с более плотной цитоплазмой, это наиболее митотически активная зона ПАМ. [4]

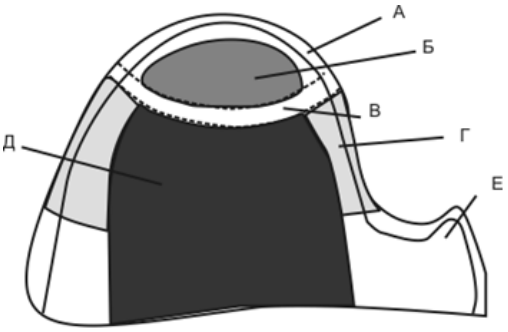


Рис.2 Схема зонирования меристемы, предложенная Фостером (Foster, 1941): А – слои туники; Б – организационный центр; В – переходная зона; Г – периферическая (фланговая) зона; Д – медуллярная (rib) зона; Е - примордий листа.

(из Быкова Е.А., Лабунская Е.А., Косенко Я.В., Чуб В.В. 2013)

Плазмодесменные контакты соединяют клетки меристемы, формируя некий симпластический домен, и разделяют различные зоны меристемы (плотность плазмодесменных контактов в периклинальных и антиклинальных стенках поверхности туники разных слоев почти одинакова [5], и обособление зон ПАМ происходит при открытии и закрытии плазмодесм). Для согласованного роста тела растений требуется сигнализации от клетки к клетке, это достигается путем прохождения через плазмодесменные контакты регуляторных белков и /или мяРНК. ПАМ начинается закладка листовых примордиев. Формирование примордия начинается с переориентации веретена деления в слоях L2 и L3. При этом происходят периклинальные деления. В корпусе происходит дифференцировка образовавшихся клеток, которые в дальнейшем дают начало проводящему пучку, инициирующему закладку листа [4].

Фасциация (слово происходит от латинского fascis; связка) это – изменение меристемы, в связи с которым наблюдается изменение всего габитуса растения. Фасциация началась подробно изучаться в начале XX века, это явление широко распространено географически и происходит, по крайней мере в 107 семействах растений. По аналогии с раком у животных, фасциация - это термин, используемый для описания ненормального или бесконтрольного распространения клеток и тканей в росте растений. Фасциация может произойти в побегах, корнях, листьях, цветах, плодах, семядолях; особенно заметна у органов, имеющих неопределенный рост.[6] Это может быть увеличение какого-либо органа растения (радиальная фасциация); уплощение стебля или цветка за счет разрастания (линейная фасциация); расщепление меристемы на несколько независимых меристем, ведет за собой увеличение числа органов растения (дефасциация).[4] Морфологически фасциация может быть плоской, линейной, ∞ - образной вызывающей ленточное расширение ствола и / или соцветии. Плоские фасциации могут быть результатом бокового расширения апикальной меристемы. Линейные фасциации являются наиболее распространенным типом, в котором стебель, становится ланцетным, часто раздваивается или скручивается. Фасциация в растениях может иметь генетическую основу,

или может быть вызвана факторами окружающей среды или бактериальной инфекции, например, *Rhodococcus fascians* является патогенной бактерией, которая вызывает фасциацию в нескольких семействах и родах однодольных и двудольных. [6]

Постоянные размеры ПАМ, необходимые для осуществления нормального органогенеза, поддерживаются за счет целого ряда регуляторных механизмов. Нарушения этой системы (например, фасциация) возникают у форм, несущих мутации по различным генам. Поддерживание свойственной для данного таксона на данном этапе онтогенеза анатомо-фенотипической формы нефасциированной меристемы выполняется генами, контролирующими ее размеры. Наиболее хорошо изучена отрицательная обратная связь между геном *WUSCHEL (WUS)* из подсемейства *WOX* и многочисленными негативными регуляторами его экспрессии, среди которых первоочередная роль принадлежит группе генов *CLAVATA (CLV)*. [4]

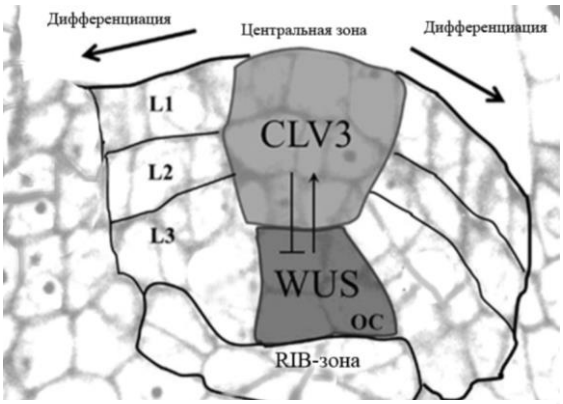


Рис.3. Отрицательная обратная связь в регуляции *CLAVATA - WUSCHEL*

Гены семейства *WOX*, кодирующие гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы, [illegible] ПАМ, прокамбия и камбия и некоторых типов вторичных меристем. Функции генов *WOX* в меристемах связаны с поддержанием недифференцированного статуса стволовых клеток: в ПАМ эту функцию выполняет ген *WUSHEL*, экспрессирующийся в организационном центре. [7]

Система генов *CLAVATA (CLV1, CLV2, CLV3)* негативно регулирует экспрессию гена WUS, ограничивая область его экспрессии. Продукты генов *CLV1* и *CLV2* являются рецепторными киназами, работающими в виде гетеродимера CLV1/CLV2, а продукт гена *CLV3* — лиганд, который связывается с рецепторным комплексом CLV1/CLV2, что приводит к запуску сигнального каскада, негативно регулирующего экспрессию гена *WUS*. [8]

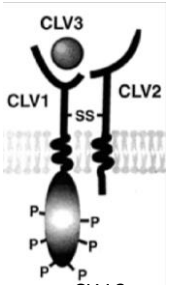


Рис.4. Рецепция CLV 3

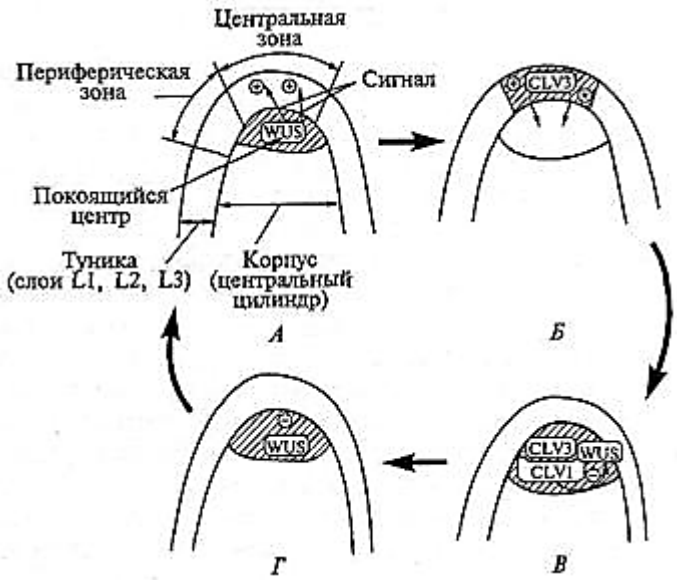


Рис.5.Контроль размера меристемы коротким пептидом CLV3 у

А — в покоящемся центре активен ген WUSHEL, Что приводит к появлению сигнала, стимулирующего деления клеток; Б — Делящиеся клетки центральной зоны синтезируют и выделяют в апопласт короткий пептид - продукт гена CLAVATA 3; В — в покоящемся центре короткий пептид CLAVATA 3 взаимодействует с мембранным рецептором CLAVATA 1, что приводит к инактивации экспрессии гена WUSHEL; Г — В центральную зону не поступает сигнал о делении клеток, пептида CLAVATA 3 становится меньше. Создаются условия для повышения экспрессии гена WUSHEL

и проводящих клеток (прокамбиальные тяжи), образующиеся под меристемой, возникают в местах самоорганизации потоков ауксина. У каждого проводящего пучка есть свой “бассейн сбора” ауксинов (высокоактивных физиологических стимуляторов роста растений), из-за того, что есть этот «бассейн», проводящие пучки закладываются с определенным интервалом, на определенном расстоянии друг от друга. При изодиаметрическом увеличении объема ПАМ, число клеток растет пропорционально r^2 (где r – условный радиус стебля) за счет того, что стебель имеет цилиндрическую форму, а скорость роста в длину прокамбия и зависящих от него клеток можно считать одинаковой. Расстояние между пучками проводящей системы при этом отстает, увеличиваясь пропорционально r, в связи с этим нарушается нормальное расположение проводящих пучков. Для восстановления оптимальной плотности тяжей в единице объема теоритически должны происходить разные изменения:

- *Увеличение числа проводящих пучков без изменения общей геометрии побега* – возможно при незначительном увеличении объема меристемы
- *Увеличение отношения линейного размера к площади сечения* – ПАМ становится гребневидной, происходит значительное увеличение ширины побега в одной плоскости, приводящее к формированию линейно уплощенного ребристого стебля (линейная фасциация)
- *Разделение массива стволовых клеток на части (дефасциация)* – разделение меристемы на несколько автономных частей, появление увеличенного числа побегов, соцветий и т.п. [4]

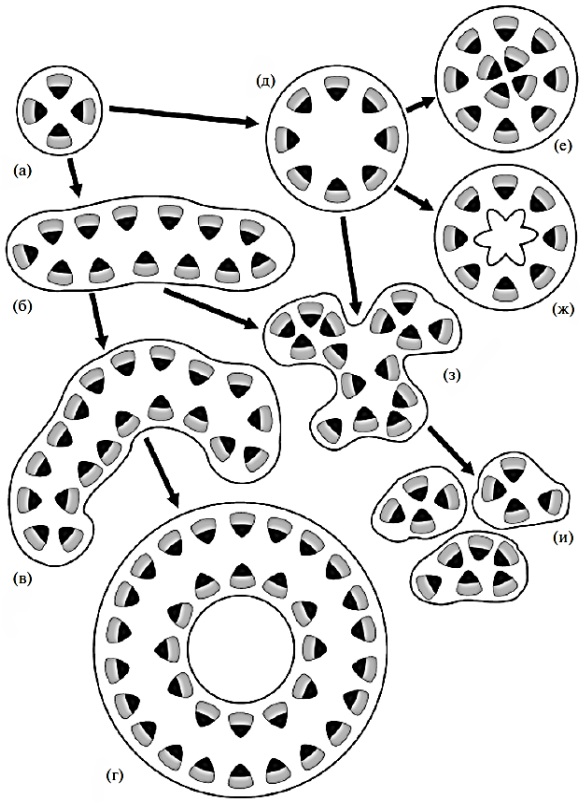


Рис.6 Преобразования нормальной анатомической структуры побега (а); при различных типах фасциации. При гребневидном разрастании ПАМ наблюдается плоская фасциация (б); ПАМ может искривляться (в); в некоторых случаях замыкаясь в кольцо (кольцевая фасциация, г). Увеличение ПАМ с сохранением ее геометрии приводит к радиальной фасциации (д). Радиально фасциированный побег может стабилизироваться за счет закладки дополнительных проводящих пучков (е), или разрушения плохо иннервируемой центральной зоны (ж). В некоторых случаях увеличенная ПАМ приобретает неправильную форму (з) и склонна к дефасциации (и).

(из В. В. Чуб, А. А. Синюшин. 2012.)

Развитие фасциированной меристемы тоже может происходить по-разному:

- Меристема приобретает избыточный объем на момент закладки листьев, в этом случае, может поддерживаться относительно постоянный объем ПАМ, происходят наруше-

ния в расположении филломов в основании листьев. Для флоральной меристемы при приобретении избыточного объема до разметки: у цветка наблюдается кратное изменение числа органов во всех кругах.

- Объем меристемы увеличивается вследствие каких–либо повреждений после разметки – происходит прогрессирующее увеличение объема меристемы, приводящее к развитию сильно уплощенного побега, выраженным аномалиям листорасположения; при данном развитии фасциации у флоральной меристемы, у цветка происходит увеличение числа органов в круге относительно цветков дикого типа. [4]

В настоящее время продолжается изучение анатомии, морфологии, регуляции меристемы и действие на нее различных факторов.

Наше исследование проходило на двух объектах – горох посевной (*Pisum sativum*) и арабидопсис Таля (*Arabidópsis thaliána*).

Горох посевной—вид рода горох из семейства бобовых (Fabaceae). Широко культивируется как пищевое и кормовое растение. Это - вьющееся однолетнее травянистое растение с полегающим стеблем. Листья очередные, (третий лист располагается под первым, располагаются в два ряда), сложные парноперистые, заканчиваются ветвящимися усиками. Прилистники крупные, охватывающие стебель.

Резухови́дка Та́ля (лат. Arabidópsis thaliána) — вид рода Резуховидка (Arabidopsis), семейства Капустные (Brassicaceae). Это небольшое цветковое растение. В связи с относительно коротким циклом развития является удобным модельным объектом. Резуховидка Таля может пройти полный цикл развития за шесть недель, и не требует особых условий выращивания – в лабораториях растет в чашках Петри. Листорасположение у арабидопсиса спиральное, листья собраны в мутовку.

Из-за различия в листорасположении, методом наблюдения за дикими растениями и фасциированными мутантами, можно выявить общую закономерность расположения листьев и плоскости фасциации. (см. приложение 8)

<u>Целью работы</u> является рассмотрение следующих вопросов:

1. Есть ли корреляция между расположением плоскости фасциации и листорасположением.
2. На какие процессы морфогенеза влияет ингибитор транспорта ауксинов - нафтилфталамовая кислота (НФК).

<u>Задачи:</u>

- Подобрать наиболее контрастные генотипы для создания наиболее полной и яркой картины фенотипических изменений
- Подобрать рабочую концентрацию НФК (которая вызывает морфогенетические изменения)
- Выявить время развития, необходимое для проявления морфогенетических эффектов.

Материалы и методы

Объекты исследования. Горох посевной (*Pisum sativum*), мутантная фасциированная линия «Штамбовый» и сорт «Немчиновский» (дикий тип, изогенный сорт) из коллекции кафедры генетики МГУ любезно предоставлены к.б.н. А.А. Синюшиным.

Арабидопсис Таля (*Arabidópsis thaliána*), мутантная фасциированная линия *clavata1, clavata 2* и *clavata3*, а также изогенная раса дикого типа *Blanes* из коллекции кафедры генетики МГУ любезно предоставлены д.б.н. Т.А. Ежовой.

Выращивание растений. Семена *Arabidopsis thaliana* поверхностно стерилизовали 5% H_2O_2 и высаживали в чашки Петри на среду по Мурасиге и Скугу (½ нормы минеральных солей, 0,5% сахарозы 0,8% агарозы). В опытные образцы к среде добавляли раствор N-1-нафтилфталамовой кислоты (НФК) в диметилсульфоксиде (табл.1). Далее растения выращивали растения под люминесцентными белыми лампами в режиме 16 часов освещения – 8 часов темноты.

Таблица 1. Добавление рабочих растворов на 100 мл среды

	0мкМ	3 мкМ	10 мкМ	20 мкМ
объем запасного раствора (6мг/мл НФК), мкл	0	15	50	100
DMSO, мкл	100	85	50	0

Семена *Pisum sativum* высевали сначала в чашки Петри, проращивали под люминесцентными белыми лампами, затем переносили на водную культуру, добавляя в питательную среду НФК в концентрациях 20-80мкМ.

Подготовка материала для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). С 7 по 28 день выращивания отбирали растения для дальнейшего анализа. Под бинокуляром выделяли по 1 – 3 меристемы от растений из каждого варианта опыта. Меристемы фиксировали и хранили в 70% растворе этанола, далее обезвоживали в растворах этанола с нарастающей концентрацией (от 70% до 96%), инкубируя в каждом растворе по 45 минут, переносили материал в безводный этанол, замещали этанол ацетоном. Материал подвергали сушке, замещая ацетон на двуокись углерода в тройной точке, которая потом испарилась. Высушенные меристемы монтировали на столиках, проводили напыление слоя палладия для снятия заряда с поверхности растения и экранирования электронного пучка от поверхности. Объекты рассматривали с помощью растрового электронного микроскопа CAMSCAN.

Обработка данных. Фотографии материала, полученные с помощью СЭМ, обрабатывали в графическом редакторе Photoshop, выделяя меристему и первые листовые примордии для последующего сопоставления и выявления закономерностей зависимости листорасположения от формы меристемы (см. приложение 1). С помощью программы ImageJ измеряли длину и ширину меристем относительно заданной на фотографии шкалы.

Результаты и обсуждение

Как показали предварительные наблюдения на ранних стадиях развития, низкие концентрации НФК Вызывают следующий эффект:

- ✓ нарушение геотропизма (растения росли параллельно агару, горизонтально) (см. приложение 2)

Ауксин – гормон, отвечающий за координацию направленного роста и развития растения, его ориентация в пространстве. Например, он обладает аттрагирующим эффектом (привлекает питательные вещества к точке роста); является фактором апикального доминирования; отвечает за листорасположение (чтобы сформировался лист, закладывающие его клетки должны получить определенное количество гормона); так же ауксин инициирует растяжение клеток стебля, и ингибирует растяжение клеток корня – из-за этого и происходит рост побега вверх, а корня вниз и другие таксисы.

Соответственно, при ингибировании транспорта ауксина при помощи обработки НФК, его действие на растение будет ослабевать, приводя к различным аномалиям:

- ✓ усиленное образование корневых волосков и короткий корень, на более поздних этапах развития корень мутантов, выращенных на среде с НФК в несколько раз короче, чем у контроля дикого типа. (см. приложение 3)

Из-за ингибитора транспорта ауксина, гормон скапливается в локальном максимуме в корне, где ингибирует его рост, и усиливает образование корневых волосков.

На более поздних стадиях развития были замечены следующие изменения:

- ✓ Нарушение филлотаксиса
- ✓ Более короткий побег, листья сидят плотно друг к другу (см. приложение 4)

Под действием ингибитора транспорта ауксина НФК, гормон не транспортируется в достаточном количестве по растению – междоузлия не удлиняются.

- ✓ На поздних стадиях при высокой концентрации наблюдается деформация листовой пластинки у *Arabidopsis* – уменьшение длины черешка относительно листовой пластинки, у мутантов *Pisum sativum* наблюдается деформация листовых пластинок в сложном листе, нарушение геотропизма (см. приложение 9).

Другие интересные изменения наблюдались на уровне закладки листовых примордиев

- ✓ слияние примордиев листьев - размеры примордиев и морфология апекса листа позволяют это определённо утверждать (см. приложение 6)

Данное изменение наблюдается у *Pisum sativum*

Дело а том, что у гороха, в отличие от *Arabidopsis*, сложные листья закладываются из некоторого массива клеток - бластозоны. В бластозоне в норме (дикий тип без НФК) происходит разметка на области двух прилистников и центральной части листа, преобразующейся в рахис с листовыми пластинками и усиками. При фасциации (без НФК) размер бластозоны для каждого листа увеличивается - это видно по увеличению числа частных примордиев для прилистников и примордиев рахисов. Теперь бластозона охватывает бóльшую дугу на меристеме, чем у дикого типа, и туда "помещается" больше органов.

✓ Также было обнаружено, что под действием НФК у *Arabidopsis* на месте одного прилистника часто наблюдается целая группа прилистников (или разветвленные прилистники) - это до сих пор не было известно (см. приложение 7)

Основываясь на наблюдении за растениями *Pisum sativum*, выращиваемыми на НФК, было установлено, время развития, когда начинают наблюдаться изменения. При обработке НФК не оказывает влияния на первые 4-5 листьев – они уже заложены в зародыше семени. Поэтому морфологические изменения возможны на более поздних стадиях (начиная с 6–7 листа) и при более высоких концентрациях НФК. Здесь при ингибировании транспорта ауксина бластозоны по-прежнему возникают, но внутри бластозон частные примордии для прилистников и рахиса (центральной части) сливаются друг с другом. Нарушается разметка бластозоны (явление более высокого порядка, чем у арадибопсис).

С помощью диаграмм расположения меристемы и последних примордиев относительно нее (см. приложение 1), подобрали наиболее контрастные генотипы. Как и ожидалось, наибольшую разницу по сравнению с диким типом можно увидеть у мутантов *clv3* выращенных на среде с высокой концентрацией НФК.

Отсюда можно сделать еще один вывод – достаточная концентрация НФК для *Arabidopsis* 10 – 20 мкмоль/л, для гороха изменения видны начиная с концентрации 20 мкмоль/л, но наиболее выраженный эффект наблюдался при концентрации 80 мкМ.

Так же можно сделать вывод, что уплощение меристемы при фасциации не зависит от листорасположения - на диаграммах видно, что листья могут быть по-разному расположены относительно плоскости фасциации. (см. приложение 10)

Выводы

В общем, действие НФК на исследуемые растения, как и предполагалось, оказалось многоуровневым. В зависимости от объекта и концентрации проявление тех или иных изменений, и их степень изменяется, но есть общий спектр влияния вещества на растения:

- усиленное образование корневых волосков и короткий корень
- нарушение филлотаксиса
- деформация листовой пластинки
- укорочение междоузлий

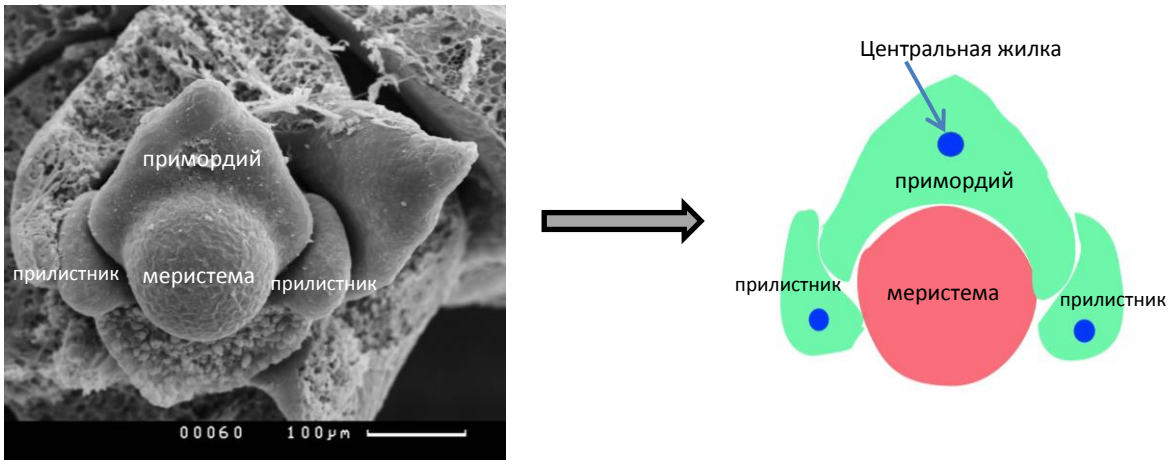
Так же корреляции между расположением плоскости фасциации и листорасположением не выявленно.

Список литературы

1. Kwiatkowska. D. 2004. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments. Am. J. Bot. V. 91 № 9 P.1277-1293. doi: 10.3732/ajb.91.9.1277
2. Лотова Л.И. 2010. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 512с. ISBN 978-5-397-01047-4
3. Быкова Е.А., Лабунская Е.А., Косенко Я.В., Чуб В.В. 2013. Коэволюция структуры побеговой апикальной меристемы и генетических механизмов контроля клеточной пролиферации. Изд.: Вестник Тверского государственного университета. Серия Биология и экология. Вып. 32, № 31. С. 27-52.
4. Чуб В.В., Синюшин А.А. 2012. Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы. Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва. Физиология растений, Т. 59, № 4, С. 574–590
5. Imaichi R., Hiratsuka R. 2007. Evolution of shoot apical meristem structures in vascular plants with respect to plasmodesmatal network. Am. J. Bot. V.. 94 № 12 P.1911-1921. doi: 10.3732/ajb.94.12.1911
6. Ansari S., Daehler C.C. 2011 Fasciation in Invading Common Mullein, *Verbascum thapsus* (Scrophulariaceae): Testing the Roles of Genetic and Environmental Factors. Pacific Science, V. 65, №. 4, P.451 – 463. doi: 10.2984/65.4.451
7. . Додуева И.Е,. Юрлова Е.В,. Осипова М.А,. Лутова Л.А. 2012. CLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем. Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербург. Журнал "Физиология растений" Т.59,№ 1,С.17-31
8. Осипова М. А.,. Долгих Е. А, Лутова Л. А. 2006. Роль Транскрипционных факторов WOX и KNOX в развитии и опухолеобразовании у растений. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. Экологическая генетика Т. IV №4 ISSN 1811–0932

Приложения

Приложение 1.



Обработка фотографий для дальнейшего сопоставления.

Таблица 1. Размера меристем нескольких растений *Pisum sativum*

объект	ширина(мкм)	длина(мкм)	Отношение длина/ширина
Штамбовый контроль	255	389	1.5
Штамбовый 20мкМ	257	694	2.7
Штамбовый 20мкМ	335	459	1.4
Штамбовый 80мкМ	289	477	1.7
Немчиновский контроль	207	246	1.2
Немчиновский контроль	209	289	1.4
Немчиновский 40мкМ	197	226	1.1
Немчиновский 80мкМ	152	183	1.2

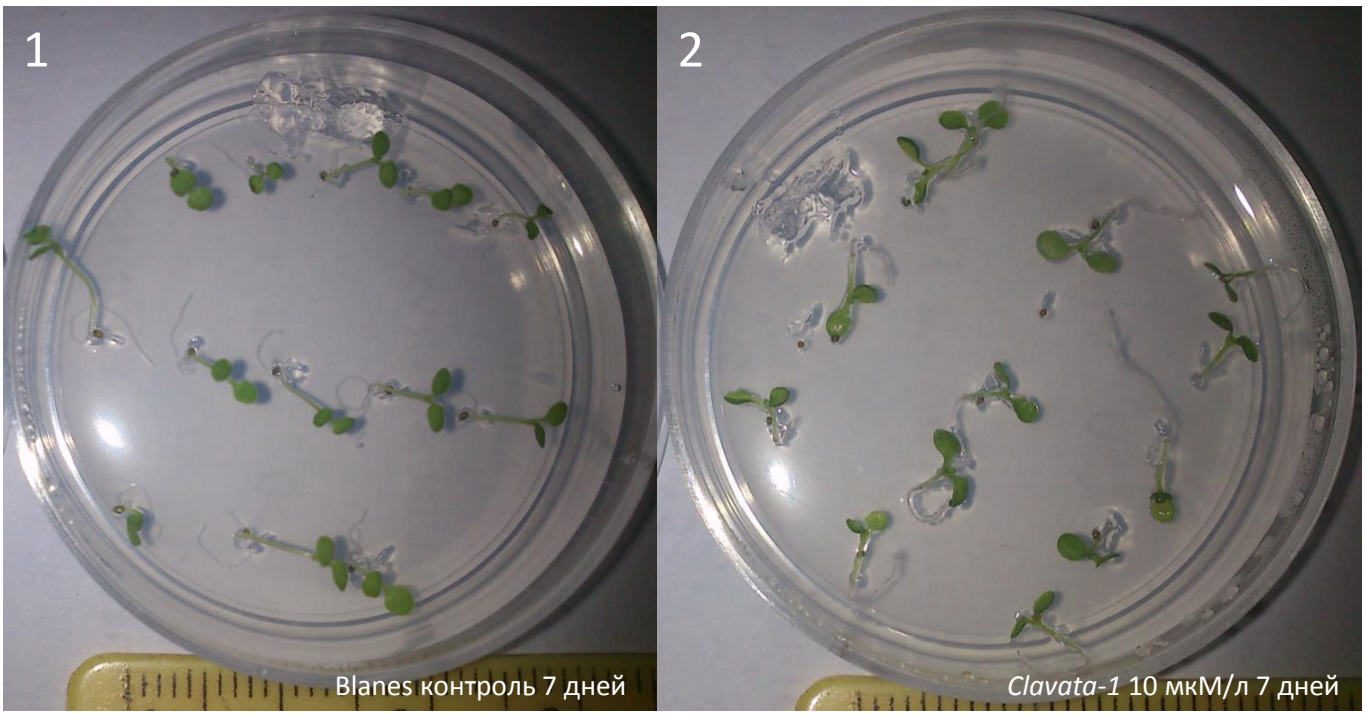
Видно, что меристемы растений дикого типа (сорт Немчиновский) более или менее округлой формы, с возрастанием концентрации НФК наблюдаются изменения. То же, но вболее выраженной степени наблюдается и у мутантов (сорт Штамбовый).

Таблица 2. Размера меристем нескольких растений *Arabidopsis thaliana*

объект	ширина(мкм)	длина(мкм)	Отношение длина/ширина
bl 10мкМ	68	112	1.6
clv1 10мкМ	119	247	2.0
clv1 20мкМ	75	76	1.0
clv2 10мкМ	81	122	1.5
clv2 20мкМ	124	130	1.0
clv3 контроль	79	87	1.1
clv3 10мкМ	137	169	1.2
clv3 10мкМ	97	105	1.1
clv3 20мкМ	119	176	1.5
clv3 20мкМ	160	226	1.4

Меристема небольшая и круглая у дикого типа и у мутантов на среде без НФК, у мутантов чем больше концентрация НФК, тем больше меристема и не правильнее ее форма.

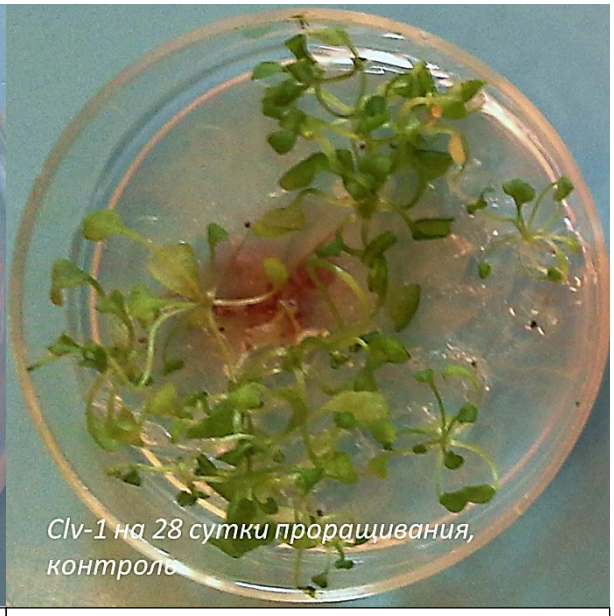
Приложение 2.



У растений дикого типа выращенного без НФК (картинка 1) более или менее вертикальное положение стебля, по крайней мере верхушки всех растений стремятся вверх к свету, в то время как корень, как и должно быть, углубляется в агар. У мутантов, например, *Clavata-1*, выращенного на НФК концентрацией 10 мкМ/л (картинка 2) видна сильная дезориентация: корень стелется параллельно поверхности, семядоли не повернуты к солнцу, а верхушки некоторых растений даже обращены вниз.

Приложение 3.

Приложение 4.

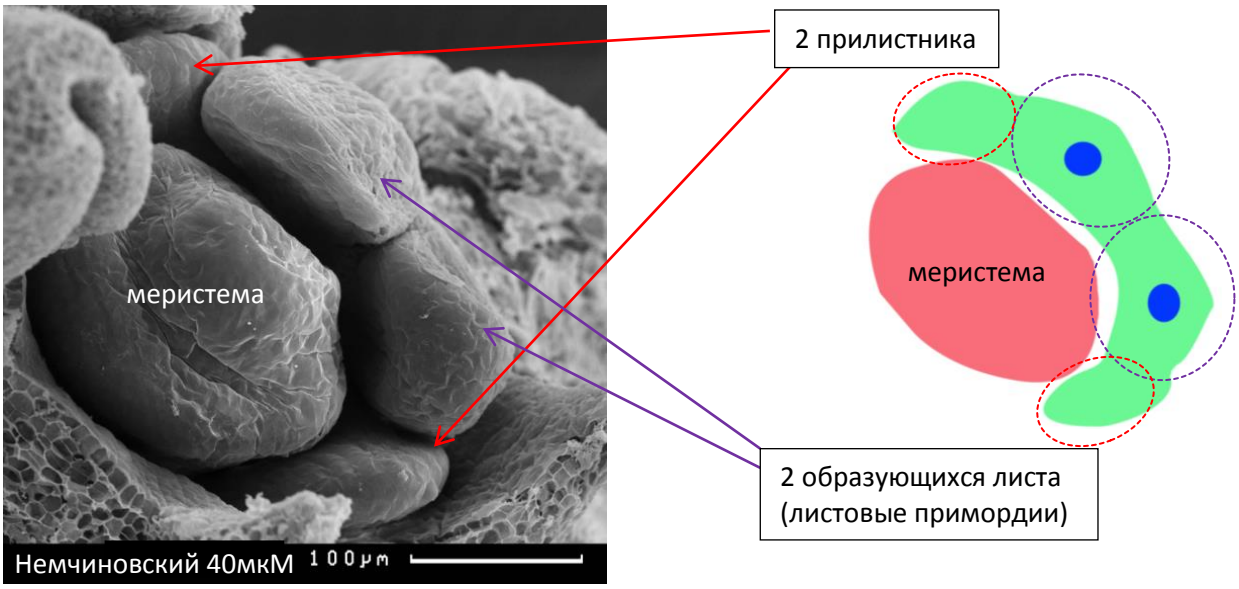


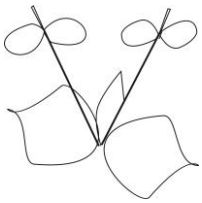
Увеличенная листовая пластинка, укороченный черешок, листья сидят плотно - междоузлия короткие.	Растение (та же мутация) росло без НФК, имеет внешний вид, характерный для дикого типа.

Приложение 5.

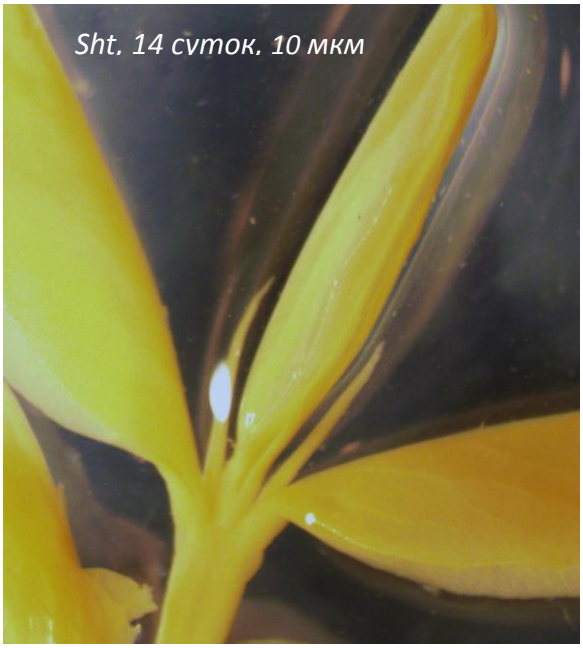
Нормальный сложный лист с двумя прилистниками, четырьмя листовыми пластинками пятая видоизменена в усик	Более мясистые прилистники, взявшие на себя все фотосинтетические функции, все листовые пластинки превратились в усики

Приложение 6.



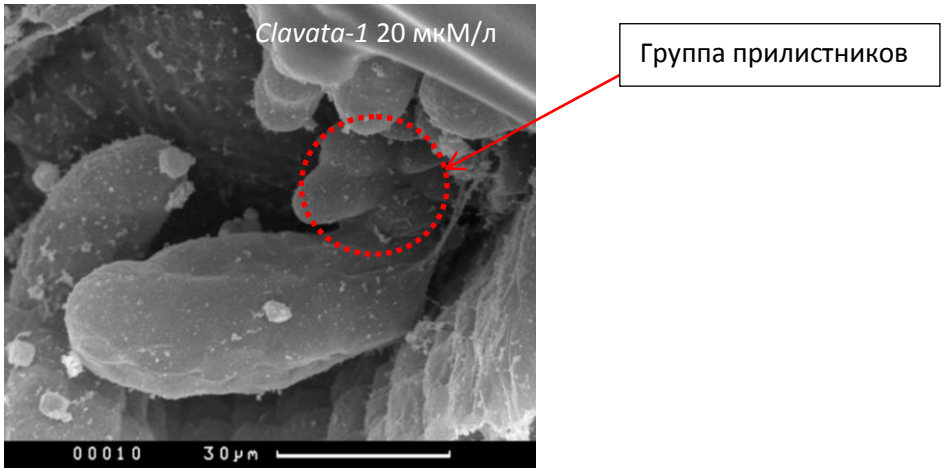


Зачаточный аномальный лист, состоящий из 2 прилистников и 2 примордиев. В диком типе один примордий имеет два прилистника по бокам (см. приложение 1), здесь же два примордия срощены, двух прилистников, которые должны лежать между ними нет. Данная структура даст два нормальных сложных листа, заключенных между двумя прилистниками, возможно, с редуцированным прилистником посередине.

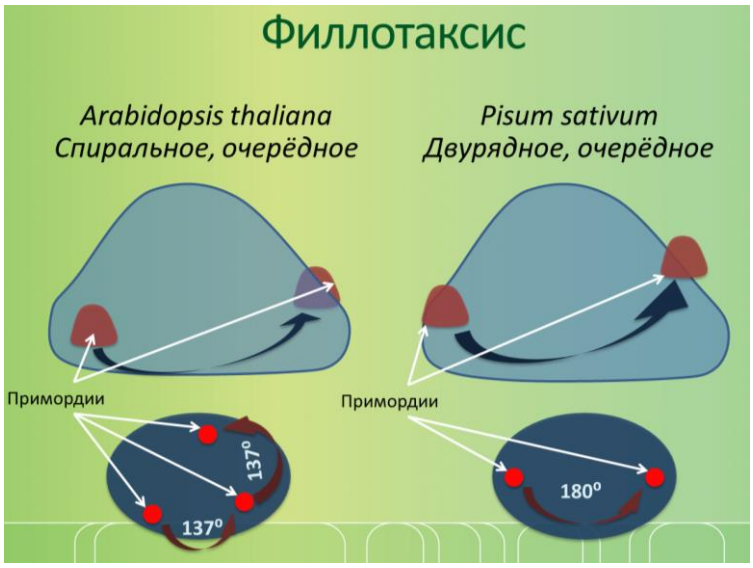


Данный лист начал раздваиваться на уровне отхождения первой пары листьев от рахиса (общего черешка), видны две нормальные листовые пластинки по бокам, потом маленькие иглообразные структуры – растущие дальше рахисы и посередине листовая пластинка, которая не развоилась.

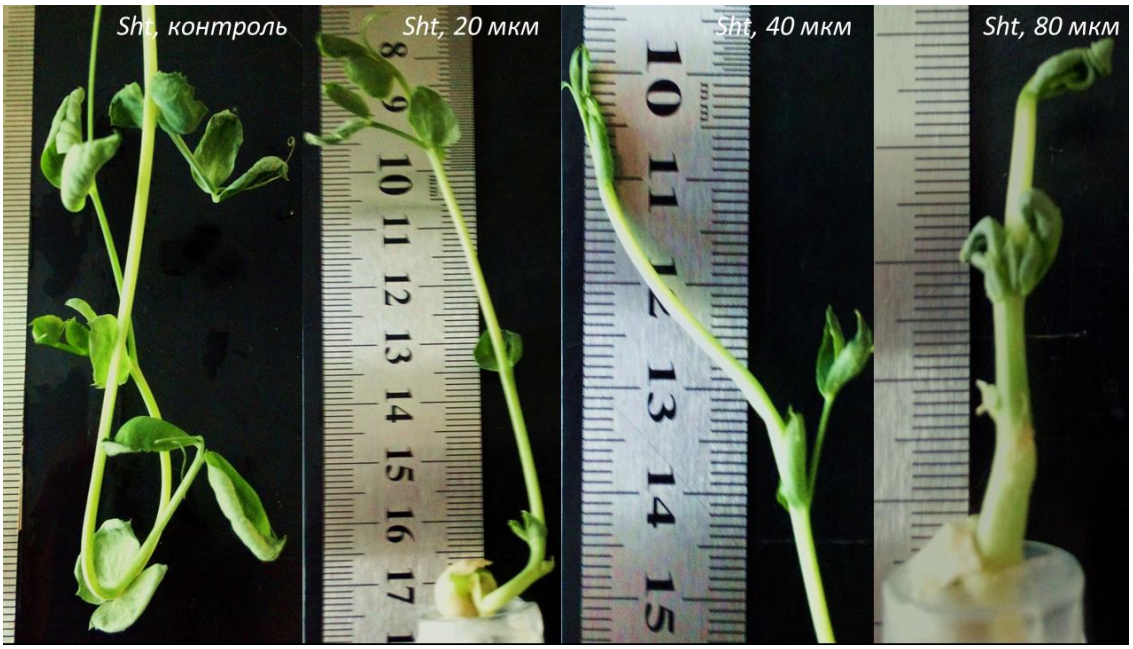
Приложение 7.



Приложение 8.



Приложение 9. Сравнение фенотипов растений, выращенных на разных концентрациях НФК

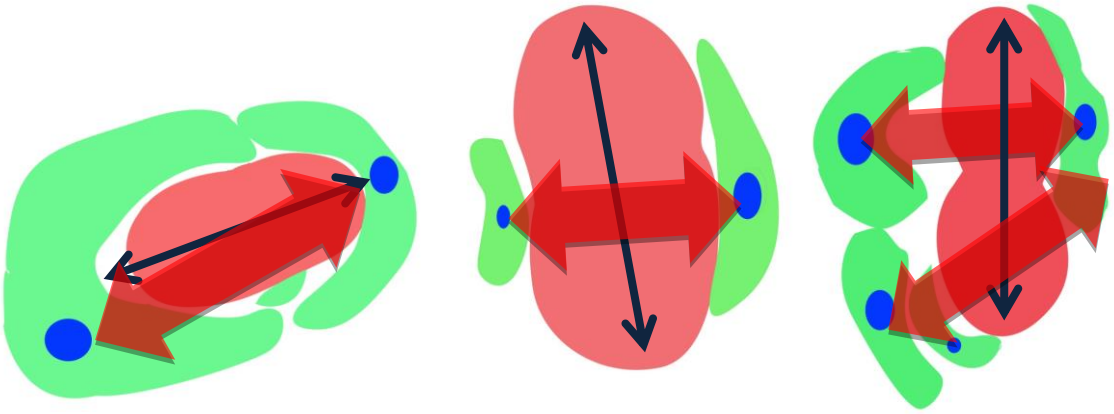
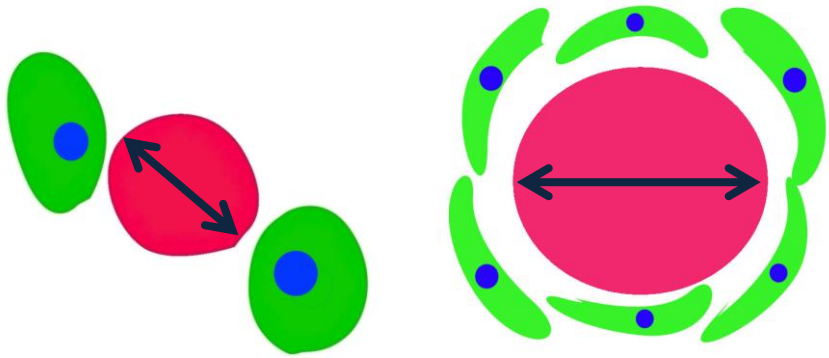


Приложение 10.

Уплощение меристемы при фасциации не зависит от листорасположения.

На картинках синяя стрелка отображает плоскость фасциации, а широкая красная стрелка - расположение двух рядов листьев у *Pisum sativum* Видно, что расположение стрелок не коррелирует.

Диаграммы меристем *Pisum sativum:*



Диаграммы меристем *Arabidopsis thaliana*: