

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *Arabidopsis thaliana* В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2023 г. В. А. Фридман^а, *, В. С. Фадеев^а, А. А. Тюрин^а,
И. С. Демьянчук^а, И. В. Голденкова-Павлова^а

^а Федеральное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: VikaFridman@gmail.com

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 10.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh является одним из важнейших модельных организмов в различных областях науки: физиологии и биохимии растений, биологии развития, генетической инженерии, геномном редактировании и в других. Преимущества этих модельных растений: короткий жизненный цикл, простота культивирования, секвенированный и достаточно хорошо аннотированный геном, множество доступных данных о транскриптоме, протеоме, метаболических путях, мутациях. Культивирование *A. thaliana* в лабораторных условиях — важный аспект многих исследований в случае использования этого растения как модели. Выбор способа выращивания зависит от цели исследования, количества и типа необходимого биоматериала. Целью данной работы является обзор методов культивирования растений *A. thaliana* и их применимость для различных исследований.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, гидропоника, культивирование, почва, стерильная культура

DOI: 10.31857/S0015330323600109, **EDN:** QAXRZE

ВВЕДЕНИЕ

Впервые резуховидка (резушка) Таля описана в 1577 г. Иоганном Талем. В 1842 г. Густав Хейнхольд систематизировал растение, которое получило современное название *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *A. thaliana* широко используется в качестве модельного растения во многих лабораториях по ряду причин; (1) возможность выращивания в различных условиях (стерильно в культуре *in vitro*; в оранжерее; в почве или в гидропонной установке); (2) возможность самоопыления; (3) короткий жизненный цикл; (4) небольшой и хорошо аннотированный геном; (5) восприимчивость к культуре тканей; (6) большой выбор экотипов и мутантных линий (как природного происхождения, так и целенаправленно полученных); (7) простые методы генетической трансформации и геномного редактирования [1–4].

Согласно современным литературным данным самыми распространенными субстратами для культивирования растений *A. thaliana* являются агаризованные питательные среды (чаще всего МС [5] и ее модификации [6–27]), почва и почвенные смеси (коммерчески доступные готовые смеси; компостные смеси; смеси почвы с песком, вермикулитом, керамзитом, суглинком в различных соотношениях) [13, 28–37] и гидропоника с различными модификациями и дополне-

ниями [35, 38–62]. Выбор метода выращивания из имеющегося арсенала для решения ряда научных задач крайне актуален и обуславливает успешное проведение исследования. Отметим, что *A. thaliana* — миниатюрное розеточное растение, не требует большой площади для выращивания. В то же время именно малый размер и уязвимость при росте и пересадке из одних условий выращивания в другие представляет значимую проблему для ряда исследований.

В данном обзоре мы рассмотрим и сравним основные способы культивирования модельного растения *A. thaliana*: в стерильной культуре *in vitro*, в почве и смесях и в гидропонных условиях. Для каждого метода выращивания будут описаны особенности его использования и данные, которые получают с его помощью; возможность модификации условий, которые можно применить в процессе культивирования растений; а также преимущества и ограничения метода для различных направлений исследования.

1. СТЕРИЛЬНАЯ КУЛЬТУРА РАСТЕНИЙ *A. THALIANA IN VITRO*

1.1. Этапы подготовки и выращивания растений

Для этого метода культивирования семена подвергают стратификации, стерилизации, и за-

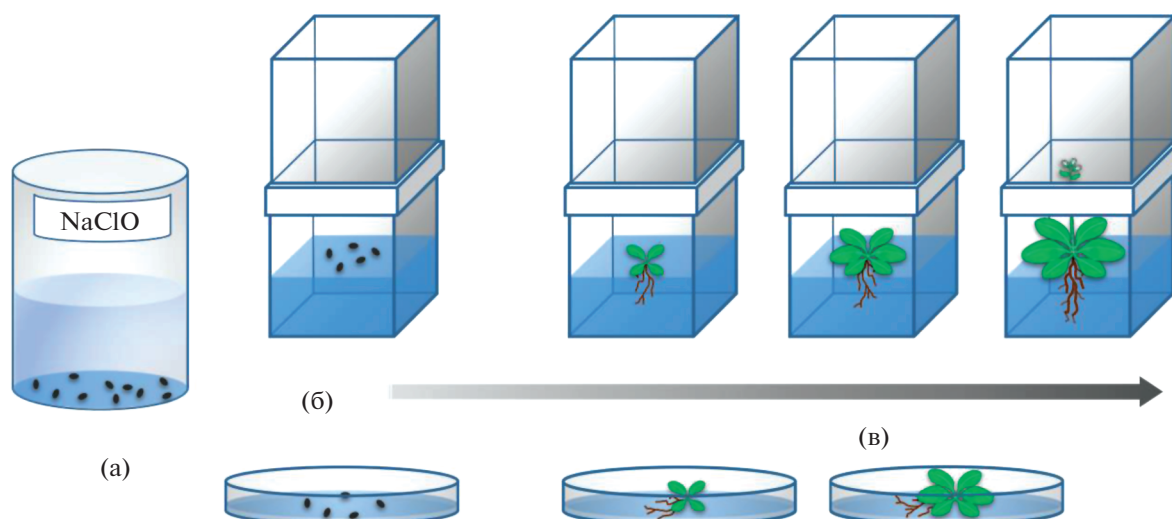


Рис. 1. Культивирование в стерильных условиях *in vitro*: в стерильных условиях *A. thaliana* культивируют в чашках Петри или контейнерах. (а) – стерилизация семян; (б) – посадка на агаризованную питательную среду с последующей стратификацией; (в) – развитие растений. На рисунке изображено одно растение в одной емкости; есть возможность выращивания большего количества растений в каждой емкости, в зависимости от необходимого возраста биоматериала.

тем высаживают на поверхность агаризованной среды в чашках Петри или других емкостях (рис. 1).

1.1.1. Стратификация семян

Прорастание семян и оптимальное развитие растения требуют точной координации множества внутренних процессов. С помощью стратификации моделируют воздействие холода, происходящее в природе в зимний период. Стратификация позволяет ускорить прорастание семян и повысить их всхожесть за счет воздействия на экспрессию генов путей биосинтеза, катаболизма и передачи сигналов фитогормонов, в частности, гибберелловой кислоты [63] и абсцизовой кислоты [64]. Для одновременного прорастания и эффективного развития растений *A. thaliana* требуется 72 ч холода ($\sim 2-4^{\circ}\text{C}$) и темноты в сочетании с высокой влажностью [65]. При исключении этапа стратификации в зависимости от возраста семян после сбора и условий хранения прорастание может происходить неравномерно, что приведет к неоднородности растительного материала и, в конечном итоге, может повлечь за собой негативные последствия для эксперимента и интерпретации полученных результатов. Методика проведения стратификации проста и эффективна, рекомендуется ее обязательное использование для снижения влияния качества семян на получаемый растительный материал.

1.1.2. Стерилизация семян

Выращивание на агаризованных питательных средах требует применения стерилизации семян,

поскольку состав сред подбирается таким, чтобы он был благоприятным для растений; что, как правило, делает его подходящим также для различных микроорганизмов с поверхности семян, из воздуха, с инструментов и рук исследователя.

Влияние стерилизации на семена *A. thaliana* в литературе описывают очень кратко. В каждой лаборатории приняты свои методы, которые в публикациях только упоминают. Важным при стерилизации семян является подбор такого режима, который позволит уничтожить контаминирующие микроорганизмы, при этом существенно не повредив семена и не оказав влияния на рост растений.

При анализе литературных источников было выделено три наиболее распространенных метода стерилизации семян *A. thaliana*: 1) с использованием растворов хлорсодержащих отбеливателей; 2) с использованием этанола; 3) с применением газообразного хлора.

Для многих видов растений, культивируемых *in vitro*, наиболее часто используется стерилизация с помощью хлорсодержащих отбеливателей [6]. Семена замачивают в стерилизующем растворе определенной концентрации в течение некоторого времени экспозиции, после чего тщательно отмывают стерильной водой. Оптимальная концентрация и время воздействия стерилизующего агента различаются в зависимости от морфологии семян: их размера и формы, поверхности, наличия каких-либо образований. В эксперименте показано, что для *A. thaliana* экотипа Col-0 стерилизация отбеливателем в течение 5–10 мин в концентрации 40–100% не оказывает

значимого влияния на всхожесть семян. Высокие показатели прорастания семян отмечены и при концентрации бытового отбеливателя 40% и 50% для всех временных интервалов стерилизации. Обработка 80–100% отбеливателем в течение более 10 мин приводит к снижению всхожести; отмечается обесцвечивание и сморщивание поверхности семян. Кроме того, у проростков выживших после такой обработки семян с большой частотой выявлены дефекты семядолей, деформации гипокотыля. На основе имеющихся данных определен оптимальный режим стерилизации: концентрация отбеливателя 50% с экспозицией 10 мин [6].

Еще одним распространенным методом стерилизации семян является замачивание в этиловом спирте. Поскольку семена *A. thaliana* имеют небольшой размер, их выдерживают в 70–100% спирте от 1 до 20 мин с последующим промыванием стерильной водой [7]. Иногда к этанолу добавляют Triton X-100 в качестве детергента [8–10] или другие вещества: например, хлорид бария [11], перекись водорода [12].

Применяется и совмещение двух названных выше методов: семена сперва замачивают в спирте, а затем в отбеливателе, или наоборот [13–18].

Для стерилизации семян *A. thaliana* используют также газообразный хлор. В основе метода лежит реакция между хлорсодержащим отбеливателем и концентрированной соляной кислотой с выделением газообразного Cl_2 , а также хлорида натрия и воды в качестве побочных продуктов. Заранее рассчитывают количество реагентов для достижения определенной концентрации газообразного хлора в заданном объеме контейнера, смешивают их в отдельной емкости и помещают семена в тот же контейнер, что и сосуд, из которого выделяется Cl_2 . При использовании данного метода показано, что значительное влияние на всхожесть семян оказывает не концентрация газообразного хлора, а время экспозиции. Экспериментально установлено, что обработка в течение трех часов газообразным Cl_2 в концентрации выше 16.5% значительно снижает всхожесть семян. Эффективное подавление развития микроорганизмов при сохранении хорошей всхожести (более 82%) наблюдается при обработке Cl_2 в концентрации от 6.1% до 16.5% в течение 1 ч, а также более низкими концентрациями (от 2.1%) в течение 3 ч [6].

Стерилизация отбеливателем рекомендуется для линий с более низким потенциалом прорастания (20–70%): показано, что стерилизация газообразным хлором оказывает несколько большее негативное влияние на всхожесть [6]. Если необходимо провести стерилизацию одновременно большого количества семян, целесообразно применить газовую стерилизацию. Не рекомендуется применять эти два метода для семян с

эффективностью прорастания менее 20%, поскольку в этом случае всхожесть может снизиться очень существенно.

1.1.3. Посадка семян на агаризованную среду

После подготовки семена высаживают на застывшую агаризованную питательную среду. Поскольку семена *A. thaliana* имеют небольшой размер, можно ресуспендировать их в небольшом количестве стерильной воды и распределить по поверхности среды. На этом этапе необходимо соблюдать стерильность: все операции от стерилизации семян включительно проводят в ламинар-боксе, поскольку есть риск контаминации питательной среды микроорганизмами.

1.2. Биологический материал и его использование

Растения, выращенные на агаризованных питательных средах, используют в различных направлениях исследований, поскольку имеется возможность получать компоненты растительных клеток из различных частей проростков и исследовать качественный и количественный состав целевых веществ (например, таких, как нитраты, углерод, сахара, хлорофилл, иные вторичные метаболиты, транскрипты, аминокислоты и др.). Растения, выращенные в этих условиях, могут быть использованы для оценки ростовых показателей: биомассы побегов, корней и их соотношения [19], скорости прорастания семян и времени появления первых листьев [20]. Агаризованные среды также используют для проращивания семян перед пересадкой в почву.

Ниже мы приводим ряд примеров исследований, в которых использованы растения *A. thaliana*, выращенные на агаризованных средах *in vitro*.

1.2.1. Исследование корневой системы

Для оценки развития корневой системы чашки располагают вертикально, и корень за счет положительного геотропизма растет параллельно поверхности среды [11, 13, 19–21]. При таком выращивании легко можно подсчитать количество первичных корней проростков, измерить их длину, а с использованием определенного программного обеспечения предсказать биомассу растений [20]. Кроме того, Lotier с соавт. [11] провели исследование, в котором при таком культивировании предварительно оценивали уровень экспрессии гена глутаминсинтетазы *GLN1;2*, связанного с геном глюкуронидазы *uidA*, путем GUS-окрашивания проростков и микророскопий: сравнивали экспрессию целевого гена у растений, выращенных на средах с разными источниками азота. *A. thaliana*, выращенный на среде с аммонием, окрашивается интенсивнее, чем на среде с нитра-

тами, что говорит о более высоком уровне экспрессии целевого гена в первом варианте.

1.2.2. Отбор трансформантов

На агаризованной среде можно отбирать трансформированные растения. Aiyarathne и Wone трансформировали *A. thaliana*, экспрессирующий ген с оптимизированным кодоновым составом, который кодирует фактор транскрипции bHLH из *Selaginella lepidophylla* – засухоустойчивого колючего мха, способного переносить потерю до 96% клеточной воды. Экспрессионный вектор содержит ген устойчивости к канамицину, что позволяет отобрать трансгенные растения [20]. В исследовании Nan с соавт. такую селекцию проводили с использованием гигромицина: трансгенные растения *A. thaliana* получали с использованием вектора, несущего ген устойчивости к этому антибиотику, а целевым выступал ген фактора транскрипции *PdNF-YB7* из тополя, экспрессия которого привела к повышению эффективности использования воды растениями [13].

1.2.3. Исследование всхожести семян

На чашках с агаризованной средой удобно оценивать всхожесть семян [20, 22]. Поскольку для определения этого параметра нет необходимости получения взрослых растений, агаризованная среда является оптимальным вариантом: не требуется значительных материальных и временных затрат. На одной чашке можно высадить большое количество семян, что позволит получить выборку, достаточную для статистического анализа. Такой метод позволяет провести сравнительный анализ семян, предположительно различающихся по всхожести, а также исследовать влияние различных факторов и веществ на всхожесть.

1.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

При выращивании растений с использованием агаризованных питательных сред имеется возможность точно контролировать их состав. Например, варьировать источник и количество азота [11, 19], моделировать воздействие солевого стресса различной интенсивности на прорастание семян или на молодые растения [20], подвергать растения обезвоживанию добавлением осмолитиков [20].

Кроме состава самой среды, можно модифицировать и внешние условия. Так, Tholen с соавт. [23] исследовали чувствительность растений *A. thaliana* к повышенному содержанию этилена в воздухе. Для этого открытые чашки Петри с семенами на агаризованной МС-среде помещали в эксикаторы и выращивали в условиях насыщающей кон-

центрации этилена в течение трех суток, после чего измеряли длину первичного корня и гипокотыля. В рамках того же исследования рассматривали выделение этилена растениями в герметично закрытых чашках Петри. После 14 дней выращивания из чашек отбирали пробы газа и пересчитывали объем выделенного газа на единицу площади листьев проростков.

Воздухообмен является одним из важных факторов для жизни растения. Matuszkiewicz с соавт. [24] провели сравнительное исследование роста *A. thaliana* в чашках Петри, запечатанных герметично с помощью парафилма (“Parafilm”, США) и с помощью воздухопроницаемой медицинской ленты (3M “Micropore”, США). Растения выращивали на одинаковой питательной среде Кнопа и сравнивали скорость роста и структуру корневой системы, утечку ионов, эффективность фотосинтеза, выработку этилена и накопление углекислого газа, а также маркеры окислительно-восстановительного статуса и сигналинга салицилата, жасмоната и этилена с помощью количественной ПЦР. Проведенное исследование позволило убедительно продемонстрировать, что отсутствие аэрации вызывает у растений стрессовые реакции, которые могут в ходе какого-либо исследования повлиять на фенотип и другие признаки, и, тем самым, исказить интерпретацию результатов.

В 2017 г. Basu с соавт. [25] провели исследование, направленное на выявление влияния аппаратуры Biological Research in Canisters – Petri Dish Fixation Units (BRIC-PDFU, США) на проростки *A. thaliana*; в частности, на транскриптом и протеом. Это оборудование применяется для изучения растений, микроорганизмов и их взаимодействий в чашках Петри в космосе. BRIC-PDFU представляет собой прямоугольный блок, вмещающий 6 устройств с зафиксированными чашками Петри, с возможностью контроля температуры и газообмена, а также подачи жидкости (например, воды, фиксатора, питательного раствора) в чашки. Проведено сравнение трехдневных растений, культивируемых на Земле в одинаковых условиях, с использованием оборудования и без него в герметичном контейнере. После трех дней роста в чашках с агаризованной ½ МС-средой проростки обрабатывали стабилизатором РНК и замораживали при -80°C для имитации экспериментальных условий на МКС. Далее материал размораживали, выделяли РНК и белки и анализировали. Выявлено более 1600 генов, дифференциально экспрессируемых в зависимости от использования BRIC-PDFU; показаны различия в почти 1200 растворимых и мембранных белках; причем по результатам ГО-анализа эти гены и белки оказались связаны с реакциями на абиотический стресс. Также масс-спектрометрия выявила различия в фосфорилировании 8 белков. В целом

данные показывают, что используемое оборудование влияет на результаты экспериментов.

В исследовании Ryu с соавт. [26] изучали роль летучих веществ ризобактерий, стимулирующих рост растений (PGPR) (*Pseudomonas fluorescens* 89B-61, *Bacillus pumilus* T4, *B. pasteurii* C-9, *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937a, *Serratia marcescens* 90-166, *Enterobacter cloacae* JM22). Для этого растения проращивали на чашках Петри с ½ МС-средой и через 2 дня пересаживали на чашки с перегородкой в середине (1 plates, “Fisher Scientific”, США). На одной стороне культивировали растения *A. thaliana*, а на другой – один из семи исследуемых штаммов ризобактерий. Бактерии с растениями культивировали в течение двух недель, при этом благодаря использованию специфических чашек Петри они физически не контактировали между собой, а только посредством летучих веществ. Для этой же цели можно культивировать растения в чашках с бумажными дисками, смоченными экстрактами летучих веществ, выделяемых рассматриваемыми бактериями. Рост растений анализировали с помощью системы анализа видео “AgVision” (США).

В другом исследовании [27] оценивали влияние летучих веществ, выделяемых бактериями (*Bacillus subtilis*), на рост растений *A. thaliana*, но в более взрослом возрасте. Использовали контейнеры “Magenta” (США) с ½ МС-средой. *A. thaliana* выращивали до различного возраста, максимально – 12 недель, до получения семян. В отдельный стеклянный сосуд внутри контейнеров помещали суспензионную культуру бактерий (или воду в контрольном варианте), которую меняли каждые 4 недели. Таким образом обеспечивали контакт растений с летучими веществами, выделяемыми бактериями, но не с самими бактериями. Воздухообмен осуществляли через отверстия в верхней части контейнера, одновременно отбирали через адсорбент летучие вещества со скоростью 0.5 л/мин. Влияние выделений бактерий определяли, измеряя в листьях растений содержание хлорофилла (спектрофотометрически в ацетоновых экстрактах листьев) и количество железа (в растертых в жидком азоте тканях листа); также анализировали время цветения и количество розеточных листьев, их сырую и сухую массу; количество, массу и скорость прорастания семян. Таким образом, было продемонстрировано долгосрочное стимулирование роста растений *A. thaliana* при длительном воздействии летучих выбросов *Bacillus subtilis* (GB03), что проявляется в увеличенной массе корней и количестве розеток, и, как следствие, сырой и сухой массе. Наблюдается также задержка цветения, при этом количество семян как репродуктивный показатель растений значительно увеличилось по сравнению с контролем.

1.4. Преимущества

Преимуществом метода можно назвать его простоту: посадка растений не вызывает сложностей, и растения после нее не нуждаются в дополнительной обработке.

Контролируемые условия культивирования – также важная положительная сторона метода. Помимо простоты манипулирования составом среды, чашки Петри имеют небольшой размер, и растения в этих условиях роста достаточно легко можно подвергать воздействию различных внешних факторов: например, различной освещенности и температуре.

Следует отметить, что для некоторых экспериментов бывает необходимо получать стерильный материал, что затруднительно или вовсе невозможно при других способах выращивания. Поэтому стерильные условия можно также назвать преимуществом метода культивирования на агаризованных питательных средах, несмотря на то, что поддержание таких условий несколько усложняет метод и требует дополнительных материальных затрат.

1.5. Ограничения

Важное ограничение культивирования *A. thaliana* в чашках Петри заключается в том, что невозможно вырастить взрослые растения. Через 12–14 дней проростки упираются в крышку чашки, а корни – в ее дно. Это не является препятствием, если для целей исследования требуются растения до достижения этого возраста.

Частично эта проблема решается выбором емкости большего объема – например, контейнеров. В этом случае рост растения также ограничен, однако, его может быть достаточно для целей эксперимента. Возникает необходимость оптимизации состава среды, чтобы питательные вещества не истощились за время культивирования.

Необходимость стерилизации семян, среды, емкостей, а также проведение манипуляций в стерильных условиях может являться ограничивающим фактором: требуется специальное оборудование и сотрудники, обученные с ним работать. Манипуляции, связанные с обеспечением стерильности и ее поддержанием, усложняют и удорожают методику выращивания.

2. ПОЧВА

2.1. Описание метода

Почва – один из наиболее простых способов культивирования растений. Семена либо сразу высаживают в почву, либо проращивают на агаризованной питательной среде, и затем пересаживают в почву. Существует множество модификаций субстратов, как коммерчески доступных, так иготавливаемых исследователями самосто-

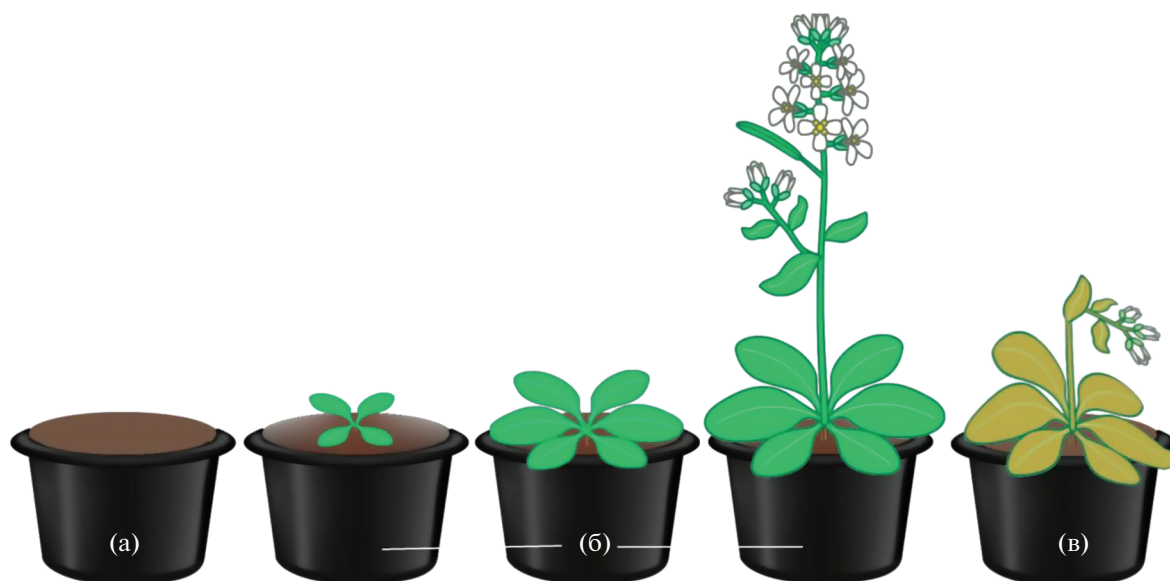


Рис. 2. Выращивание растений *A. thaliana* на почве и почвенных смесях: (а) – посадка семян в почву с последующей стратификацией (опционально в зависимости от требований к получаемому биоматериалу); (б) – развитие растений; (в) – увядание растений, получение зрелых семян.

ательно: смеси почвы с песком, вермикулитом, суглинком, компостом в различных соотношениях, а также беспочвенные субстраты и смеси. Растения на таких субстратах, как правило, выращивают нестерильно, осуществляя полив водой или питательными растворами (рис. 2).

2.2. Биологический материал и его использование

В почве можно выращивать *A. thaliana* до различных стадий развития, вплоть до получения семян и увядания, поскольку растения не ограничены в пространстве.

2.2.1. Биохимические и физиологические исследования

Выращенные в почве растения или полученные из них ткани можно использовать для оценки фенотипа надземной части (биомассы и размеров растений и отдельных частей [28], калориметрического выхода после сушки или сжигания тканей [29], числа и массы семян [30–33]), динамики роста и развития растений [30, 32, 33], для биохимических и молекулярных исследований (суммарный белок, хлорофилл, сахара, крахмал, нитраты, аминокислоты, активность некоторых ферментов [30]). Могут быть получены в достаточном для исследований количестве выделения растений: например, выделяют ксилемный сок для измерения концентрации в нем АБК [34], экссудаты флоэмы для определения аминокислот,

транспортируемых по этой ткани [11]. При выращивании растений до взрослого состояния можно получать наибольший выход биомассы для различных экспериментов. Можно легко разделять растения на компартменты (листья различных уровней, цветков, стручки, семена и т.д. [35]) и исследовать их по отдельности (например, дифференциальную экспрессию интересующих генов, различия в накоплении вторичных метаболитов и других веществ).

На растениях, выращенных в почве, исследуют различные физиологические процессы: эффективность фотосинтеза [31], параметры газообмена, скорость ассимиляции углерода [29], эффективность использования воды [20, 29], водный потенциал растений [34]; проводят изотопный анализ тканей [29].

2.2.2. Трансформация растений

Некоторые методы трансформации растений, в том числе и для геномного редактирования, требуют использования взрослых растений. Например, для метода погружения цветков необходимо получение цветущих растений, генетически трансформированные семена которых будут получены за счет погружения цветков в суспензию агробактерий [13, 36]. После созревания семена собирают, при необходимости стерилизуют, если это требуется для дальнейших экспериментов.

2.2.3. Исследование мутантных линий

Существует проект unPAK (Undergraduate Phenotyping of *Arabidopsis* Knockouts) [32], который позволил получить данные о фенотипе для тысяч линий инсерционных мутантов *A. thaliana*. Цель проекта — поиск отражения генотипа в конкретных фенотипических признаках. Семена мутантов *A. thaliana* Colambia с нокаутом одного гена из коллекции института Солка (Salk Institute, США) были разосланы в лаборатории по всему миру для получения данных о фенотипических изменениях, происходящих в результате конкретных мутаций. Поскольку не все мутантные фенотипы могут проявляться в стандартных условиях выращивания, рассматривали также и некоторые стрессовые условия: температура, соленость почвы, конкуренция (посадка в один горшок определенного объема одного, трех или пяти растений), концентрация питательных веществ и длина светового дня. Для исключения влияния различных факторов, зависящих от конкретной лаборатории, в качестве контроля были выбраны 11 линий *A. thaliana* (в том числе немутантная линия Col-0), которые использовали для сравнительного анализа в каждом эксперименте наряду с интересующими мутантными растениями. Исследование охватывает примерно треть генома *A. thaliana* (около 9000 генов). Растения выращивали на коммерчески доступной горшечной среде ProMix VX (Канада) по единому протоколу, анализировали фенотип на 5 и 8 неделе после прорастания с последующим включением полученных данных в общую базу. Благодаря проекту unPAK получена информация о фенотипе множества линий в большом числе повторностей, что позволяет говорить о статистической достоверности полученных результатов и делать выводы о влиянии конкретных мутаций на фенотип.

2.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

При использовании почвы в качестве субстрата модификации состава среды исследовать не просто, учитывая сложные взаимодействия химических элементов с ее частицами. Проведены исследования по поиску оптимального твердого субстрата, например, в контексте сокращения объемов использования торфа для лабораторного выращивания. Так, Drake с соавт. [31] сравнили характеристики растений *A. thaliana*, выращенных на различных бесторфяных средах (кокосовое волокно, домашний и древесный компост) с таковыми, выращенными на среде с торфом. Семени Col-0 и *Ler* культивировали 14 дней на агаризованной 1/2 MS-среде, затем перенесли в лотки с исследуемым субстратом с одинаковым количеством воды. Далее оценивали приживаемость рассады, площадь листьев на стадии розетки,

сухую биомассу воздушной части при стрелковании, время цветения, эффективность фотосинтеза, выход семян и их жизнеспособность.

Авторы пришли к выводу, что *A. thaliana* на бесторфяных средах растет хуже: кокосовое волокно само по себе не подходит из-за его механической структуры и дефицита нитратов; домашний компост из пищевых и садовых отходов дает менее стабильные результаты, чем торф, но может быть использован в качестве частичной его замены в компостных смесях; компост на основе древесного волокна во многом так же пригоден, как торф, но в рамках эксперимента отмечена непостоянная семенная продуктивность и уязвимость для грибков, особенно после автоклавирования. В целом авторы делают вывод о возможности частичной замены торфа в смесях для выращивания в комбинации с оптимизацией условий культивирования.

При выращивании растений в почве имеется возможность моделировать условия засухи: для этого необходимо проводить взвешивание горшков, и соблюдать точные соотношения воды и почвы [13]. Помимо этого, необходимо учитывать прирост биомассы растений, испарение воды с поверхности почвы (а не только потребление ее растениями). Эти процедуры проводят вручную, что достаточно трудоемко и требует большого количества времени и/или рабочих рук, а также ограничивает количество растений, которые можно использовать для эксперимента. Для упрощения исследований в этом направлении разработана автоматизированная система Phenopsis (“Apilogic”, Франция) для фенотипирования растений *A. thaliana* в условиях водного дефицита [34]. Применение этой системы позволяет взвешивать, поливать и фотографировать каждое отдельное растение. Основные этапы таких исследований включают высев семян в горшки со смесью суглинка и органического компоста, проращивание и прореживание до одного растения на горшок, после чего горшки помещают в ячейки автоматизированной системы. Phenopsis регулярно фотографирует каждое растение, взвешивает, доводит почву до состояния заданной влажности с поправкой на вес растения. Для внесения этой поправки еженедельно по три растения с каждой опытной и контрольной группы отбирают и взвешивают. Phenopsis применяют для изучения реакции растений на засуху и обнаружения локусов количественных признаков, связанных с этой реакцией [28].

В работе Guo с соавт. [37] изучали влияние плотности посева растений *A. thaliana* на их морфологию и продуктивность. Использовали одинаковые горшки с одинаковым количеством почвы и поливом, но высаживали в них разное количество растений: расстояние между ними варьировали от 2 до 10 см. В возрасте трех недель исследовали

листья растений: измеряли угол наклона и их размер, выделяли РНК для секвенирования тотального транскриптома и количественной ПЦР. Из всех экспериментов исключали растения, расположенные на краю горшков. Было показано, что загущение посадки влияет как на фенотип, так и экспрессию ряда генов, однако не вызывает у растений стрессовой реакции.

2.4. Преимущества

В почве можно выращивать растения *A. thaliana* до любого возраста, вплоть до увядания. Это дает возможность получения семян, изучения стареющих растений.

Важным достоинством культивирования в почве и почвенных субстратах является простота и небольшие материальные затраты.

Следует подчеркнуть, что отсутствие стерильности при выращивании растений в почве можно трактовать и как преимущество, и как недостаток. Так, эксперименты по стерилизации субстратов для выращивания путем автоклавирования [31] показали, что почва и компостные смеси после этой процедуры становятся более подвержены заражению плесенью, поскольку уничтожается собственная микрофлора субстрата и, соответственно, исчезает конкуренция для грибов, обитающих в нестерильных помещениях, в которых обычно выращивают растения.

2.5. Ограничения

Важным недостатком выращивания растений в почве является сложность анализа корневой системы. При культивировании на любом сыпучем материале для получения корня его необходимо извлечь из субстрата и очистить от его остатков, что часто вызывает определенные сложности. Кроме того, есть риск повреждения корней. Если требуется корень как биоматериал, например, для анализа содержания каких-либо веществ, то существует вероятность контаминации биоматериала частицами субстрата или микроорганизмами почвы.

При использовании метода выращивания растений в почве следует учитывать, что в ней всегда содержится биоценоз микроорганизмов, уничтожение которого может приводить к заражению выращиваемых в ней растений патогенами, не встречающимися в стерилизованной почве конкуренции [31]. Это накладывает на исследователя дополнительную ответственность в отношении соблюдения чистоты и разграничения пространства для выращивания растений в почве и других экспериментов, для которых контаминация микроорганизмами почвы нежелательна.

3. ГИДРОПОНИКА

3.1. Этапы подготовки и выращивания растений

Термин “гидропоника”, который происходит от слияния древнегреческих слов “вода” и “работа”, впервые сформулировал физиолог Уильям Ф. Геррике в 1929 г. Изначально под этим термином подразумевалась методика выращивания растений с использованием жидких питательных сред без применения почвы [38]. Определение гидропоники с годами расширилось и стало синонимично беспочвенной культуре, которая включает выращивание растений в любом инертном субстрате, жидком или твердом (песок, гравий, вермикулит, перлит, минеральная вата) [35, 39, 40].

Проращивают семена на твердом субстрате, служащем механической опорой для растения (агаризованная среда [41, 42], минеральная вата [43, 44], песок [35, 40], вермикулит [39]). Для синхронизации прорастания, как правило, также применяют стратификацию.

Далее в зависимости от выбранного способа культивирования молодые растения либо продолжают выращивать на том же субстрате, осуществляя полив питательным раствором (МС, Хогланда, Кнопа и др.) [39, 41, 43, 44, 66]; либо переносят в гидропонную установку, которая обеспечивает постоянное или периодическое смачивание корней питательным раствором (рис. 3).

Например, Robison с соавт. [42] проращивали семена на чашках Петри с агаризованной питательной средой, а затем пересаживали по одному проростку на один из торцов столбиков минеральной ваты; второй торец погружали в жидкий питательный раствор. Таким образом, как отмечают авторы, достигается практически 100% выживаемость семян. Малая площадь поверхности торца столбика и затемнение в зоне корней решает вопрос контаминации водорослями. Но при таком выращивании невозможно наблюдать и отделить корневую систему растений для дальнейших манипуляций.

Для решения этой проблемы другая группа [41] предложила подход к гидропонному выращиванию *A. thaliana* с использованием распространенного доступного оборудования: контейнеров, пробирок типа “Falcon” и “Eppendorf”. Семена высаживали на агаризованную среду, залитую куполом в крышечки от микроцентрифужных пробирок объемом 1.5 мл с просверленными в центре отверстиями. Крышечки с семенами помещали в контейнер так, чтобы купол агаризованной среды касался жидкой среды. Семена стратифицировали, затем выращивали в климатической камере до возраста 21 день после прорастания. Для активации работы устьиц на 14 день крышки контейнеров приоткрывали, на 17 день снимали. Далее растения пересаживали в контейнеры с аэрацией.

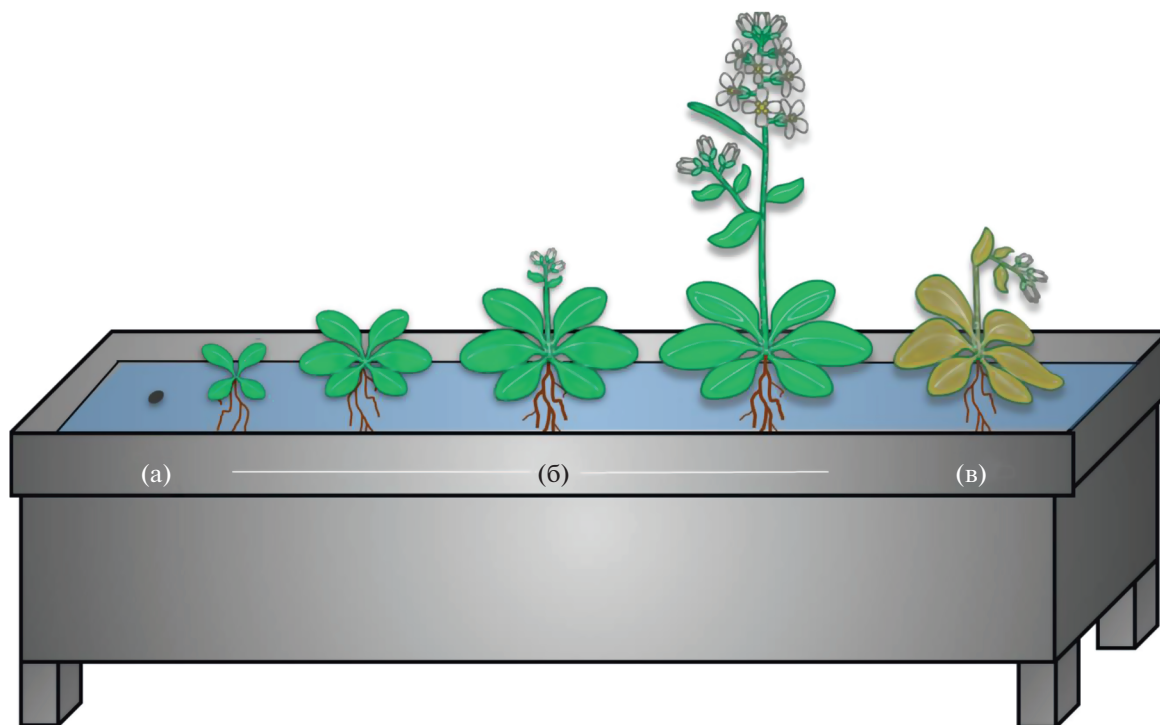


Рис. 3. Гидропонное выращивание растений *A. thaliana*: (а) – посадка семян на субстрат с последующей стратификацией; (б) – развитие растений; (в) – увядание растений, получение зрелых семян.

Для этого у пробирок типа “Falcon” объемом 50 мл обрезали скошенные концы, в крышках проделывали отверстия, соответствующие диаметру крышечек от микроцентрифужных пробирок. Крышечки вместе с растениями помещали в крышки фалькенов, которые погружали в среду. При переносе в емкость большего размера, таким образом, существенно снижается вероятность повреждения корней, поскольку их не извлекают из твердого субстрата. В таком состоянии растения выращивали до максимального возраста 7 недель, при этом корни не спутывались между собой и легко могли быть отделены для измерений и дальнейших манипуляций.

Другие исследователи [45] проращивали семена на агаризованной МС-среде, затем в 10-дневном возрасте пересаживали их на смесь песка и перлита и поливали раствором для гидроponики. После выращивания растений таким образом еще 10–12 дней, их пересаживали на гидроponику, предварительно промыв корни от частиц песка и перлита гидроponным раствором. В гидроponном резервуаре растения выращивали до возраста 35 дней, после чего собирали биоматериал, промывали водой и высушивали для дальнейших исследований.

В исследовании Hermans и Verbruggen [46] растения *A. thaliana* проращивали в компосте на основе торфа две недели, после чего промывали корни

водой и перемещали в гидроponные контейнеры, в которых моделировали условия дефицита магния.

Как уже упоминалось выше, гидроponикой считается выращивание растений на инертных субстратах, например, на песке. Для этих целей можно использовать кварцевый песок, речной песок (его просеивают через сито для получения частиц желаемого размера [47]). На песке возможно стерильное выращивание: достаточно провести автоклавирование. Отмывка корневой системы от песка не так трудоемка, как от почвы или агара. В то же время, в песке, ввиду отсутствия его структурированности, растения могут развиваться медленно.

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод о многообразии способов культивирования в условиях гидроponики. В каждой лаборатории это делают исходя из имеющихся материалов, оборудования и умений.

3.2. Биологический материал и его использование

Выращивая растения *A. thaliana* в условиях гидроponики, можно получать все материалы и данные, что и при использовании двух предыдущих рассмотренных методов; вдобавок есть возможность изучать корневую систему растений.

Ниже приведены несколько примеров, в которых показаны преимущества гидроponного выращивания по сравнению с другими методами.

3.2.1. Исследования с использованием протопластов

Из растений, выращенных гидропонным способом, изолируют протопласты. При доступности корневой системы можно выделять протопласты корневых волосков [48]. Уоо с соавт. [49] представили методику транзientной экспрессии генов в изолированных протопластах клеток мезофилла *A. thaliana*. Оценивали экспрессию цитозольного sGFP в протопластах, выделенных из растений, выращенных в почве и на гидропонике. Трансфекцию проводили двумя векторами (размером 4 и 12 т.п.н.), после чего определяли количество GFP-позитивных клеток. Эффективность трансфекции протопластов, полученных из листьев растений, выращенных на гидропонике, была выше, чем у таковых из растений, выращенных в почве: в 2 раза для вектора 12 т.п.н. и на 8–26% для вектора 4 т.п.н.

Скорость роста растений, выращенных на гидропонике, в данном эксперименте была на 14–20% выше, чем в почве. При этом не выявлено достоверной разницы ни в размере протопластов, ни во внутриклеточной локализации белка sGFP между растениями, выращенными разными способами. Общий выход протопластов из мезофилла листьев растений, выращенных в условиях гидропонике, на 15% превысил таковой для выращенных в почве; предположительно это обусловлено равномерным ростом, позволяющим собирать здоровые листья на всех этапах развития растений. Таким образом, сочетание высокой скорости роста на гидропонике и эффективности трансформации предоставляет оптимальный биоматериал для изучения физиологических процессов в протопластах растений [49].

3.2.2. Отбор трансгенных растений

При создании трансгенных растений как классическим методом, так и методом геномного редактирования, часто применяют селективный отбор на агаризованных средах или на почве с добавлением антибиотика (фосфинотрицин, канамицин, гиромидин), ген устойчивости к которому переносят в геном в составе вектора, используемого для трансформации. После отбора, как правило, проростки пересаживают в почву, где выращивают до достижения необходимого для эксперимента возраста.

Проблемой этого метода является потенциальное повреждение корневой системы при пересадке, что влияет на выживаемость молодых растений. Гидропонную систему можно использовать как альтернативу почве для выращивания трансформантов, отобранных на чашке с агаризованной питательной средой. Применение данного метода обеспечивает выживаемость более 95%

трансформантов, собранные с таких растений семена показывают высокую всхожесть [50].

3.2.3. Измерение газообмена растений

Эксперименты, связанные с измерением газообмена у *A. thaliana*, могут встречать такое препятствие, как небольшой размер растения. Листья *A. thaliana*, выращенные на гидропонике, по сравнению с листьями растений, выращенных в почве, достаточно чистые, поэтому не нуждаются в дополнительной очистке перед измерением газообмена, что позволяет избежать механического повреждения листьев, которое может повлиять на поток воздуха и протяженность пограничного слоя и без того маленькой листовой пластины, и, в свою очередь, может изменить результаты измерений газообмена [41].

3.2.4. Изотопное мечение

Выращивая растения *A. thaliana* на песке, применяют такой метод, как изотопное мечение. Семена высаживают на песок и поливают питательным раствором. Далее в определенном возрасте (40 и 42 дня, во время экспоненциального роста розеток [35, 40]) ^{14}N в составе раствора для полива частично заменяют на изотоп ^{15}N , затем песок с корнями тщательно промывают деионизированной водой. Далее растения собирают в конце жизненного цикла (около 140 дней), измеряют соотношение сухого вещества и количества общего азота и изотопа ^{15}N надземной части растений и семян. Таким образом, показано, что около 65% ^{15}N , поглощенного розетками в вегетативную фазу, ремобилизовалось в семена.

3.3. Модификации условий и их вклад в результаты исследований

Обычно питательный раствор в гидропонном контейнере постоянно аэрируют [39, 43, 44, 51], однако, некоторые исследования ставят под вопрос необходимость этой процедуры. Например, Artesa и Artesa [52] показали, что аэрация корневой системы не оказывает значимого влияния на массу корней и побегов, а также на развитие растений до цветения. Авторы делают вывод, что достаточная концентрация кислорода в растворе может быть обеспечена просто еженедельной заменой питательной среды, поскольку корневая система *A. thaliana* достаточно мала по сравнению с объемом используемого питательного раствора. В исследовании Gibeaut с соавт. [53] применяли аэрацию корней в течение 5 минут каждые полчаса, так как, по мнению авторов, колебания раствора при аэрации тормозили рост корней.

A. thaliana — факультативно длиннодневное растение. В большинстве литературных источни-

ков используется 16-часовой фотопериод для роста растений *A. thaliana*, цветение в этом случае начинается в течение трех недель. Время развития до цветения может быть увеличено путем изменения длины светового дня [54]. Для изучения влияния освещенности растения выращивали в прозрачных контейнерах, накрывая несколькими слоями марли до достижения освещенности 125, 100, 50 и 25 $\mu\text{моль}/\text{м}^2 \text{ с}$. Между первыми двумя вариантами наблюдались незначительные различия, тогда как при 50 $\mu\text{моль}/\text{м}^2 \text{ с}$ рост растений подавлялся; освещенность 25 $\mu\text{моль}/\text{м}^2 \text{ с}$ оказывала еще большее влияние на рост, а также вызывала задержку цветения и снижение соотношения корней и побегов [52].

Температура окружающей среды является важным фактором для роста и развития растений. В литературе чаще всего можно встретить температуру культивирования *A. thaliana* в диапазоне от 16 до 25°C. В исследовании Artesa и Artesa [52] рассматривались температуры от 15 до 30°C, и авторы не наблюдали существенной разницы в росте растений при температурах 18–24°C. Более низкие и более высокие температуры вызывали подавление роста *A. thaliana* экотипа Columbia.

Для выращивания растений *A. thaliana* методом гидропоники используют питательные растворы различного состава [39, 43, 44, 53]. В часто применяемом модифицированном растворе Хогланда в разведении $\frac{1}{4}$ содержание макроэлементов снижено до четверти, чтобы избежать возможных осмотических эффектов, ионной токсичности и неблагоприятных взаимодействий некоторых питательных веществ, в то время как микроэлементы сохраняют в полном объеме, чтобы предотвратить их истощение. Применение сред без разведения (Гамборга [67], Хогланда или МС) приводит к задержке роста и появлению стрессовых фенотипов. В различных работах проведены обширные исследования по подбору раствора для выращивания растений различных экотипов *A. thaliana* и мутантных линий [55, 56].

Следует отметить, что возможно выращивать *A. thaliana* в гидропонной культуре в стерильных условиях. Schlesier с соавт. [57] разработали методику, все материалы и оборудование для которой могут быть подвергнуты стерилизации. Авторы использовали стеклянные сосуды, в которые помещали стальную сетку. На поверхность сетки по каплям наносили стерилизованные семена, ресуспендированные в автоклавированном агарозно-сахарозном растворе. Капли застывали, после чего сосуды наполняли до уровня сетки автоклавированной жидкой $\frac{1}{4}$ МС-средой с добавлением сахарозы и витаминов. Сверху сосуды закрывали крышками или автоклавированным целлофаном. Нижнюю часть контейнеров помещали в темные емкости для предотвращения проникновения света

к корням, выращивали растения в климатической камере при контролируемых температурных условиях и освещенности. Таким образом, группа получила из одного сосуда с сеткой площадью 28 см^2 200 мг материала корней и более 2 г листьев (сырой вес) растений в трехнедельном возрасте. По мнению авторов, биоматериала из нескольких таких сосудов будет достаточно для большинства исследовательских целей: например, биохимического анализа тканей или отдельных органов. Однако некоторые исследования показывают, что нет необходимости в стерильности при выращивании *A. thaliana* на гидропонике [52, 58], это только удорожает и усложняет методику. Многие исследователи отмечают, что основной контаминирующий организм — водоросли, развитие которых можно предотвратить, если не допускать проникновения света к субстрату, на котором они могут поселиться: пробке из агаризованной среды или минеральной ваты, песку, пропитанному питательным раствором, или самому питательному раствору.

3.4. Преимущества

Основным преимуществом гидропонных систем культивирования растений является возможность исследовать корневую систему; причем не только визуально при помощи фотографирования, окрашивания [52] с применением соответствующего программного обеспечения для обработки данных, но и анализировать содержание каких-либо интересующих соединений: нет необходимости очищать корни от субстрата, достаточно лишь аккуратно промыть их водой, и корни готовы для дальнейших манипуляций [59]. Кроме того, состав гидропонного раствора можно легко модифицировать — как и при культивировании на агаризованных питательных средах. Например, в эксперименте Ahn с соавт. [48] *A. thaliana* подвергали временному лишению ионов K^+ или избытку ионов Na^+ или K^+ на одни и шесть суток. Для этого корни растений, выращенных в гидропонном резервуаре, промывали водой и переносили в раствор, который приготовили без нужных ионов, затем промывали корни снова и помещали растения обратно в полный питательный раствор. Такая смена состава раствора без опасности повреждения корня невозможна при использовании твердых субстратов (агаризованной среды, почвы и других сыпучих материалов, минеральной ваты и др.).

3.5. Ограничения

В каждой лаборатории к выращиванию растений в условиях гидропоники подходят по-своему, и, как следствие, системы очень различаются с точки зрения воспроизводимости результатов экспери-

Таблица 1. Методы выращивания растений *Arabidopsis thaliana* в лабораторных условиях

	Стерильное культивирование <i>in vitro</i>	Почва и почвенные смеси	Гидропоника
Возможности метода	<ul style="list-style-type: none"> • проростки и их части (до 12–14 дней) • динамика развития проростков • параметры корневой системы (вертикальное выращивание) • отбор трансформантов 	<ul style="list-style-type: none"> • фенотип надземной части • динамика роста и развития растений вплоть до старения • материал для биохимических и молекулярных исследований • физиологические процессы • погружение цветков • модификации внешних условий и воздействия стрессов 	<ul style="list-style-type: none"> • те же данные и материалы, какие получают при выращивании в почве • фенотип надземной части и корня • материал чистый (в сравнении с почвой)
Ограничения	<ul style="list-style-type: none"> • размер растений ограничивается размером емкости • необходимость стерилизации семян, среды, емкостей, а также проведение манипуляций в стерильных условиях 	<ul style="list-style-type: none"> • сложность анализа корневой системы • возможность контаминации биоматериала микроорганизмами почвы и ее частицами 	<ul style="list-style-type: none"> • относительно сложная установка • возможность загрязнения питательной среды водорослями
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • простота метода: посадка не вызывает сложностей, и растения после нее не нуждаются в дополнительном уходе • контролируемые условия культивирования • стерильные условия 	<ul style="list-style-type: none"> • возможность выращивать растения до любого возраста, вплоть до получения семян и увядания • простота метода: после посадки необходимо только одно прореживание и полив, стерилизация не применяется 	<ul style="list-style-type: none"> • возможность манипулирования как побегом, так и корневой системой • возможность выращивать растения до любого возраста, вплоть до получения семян и увядания • легкость варьирования составом питательного раствора

ментов. Протокол выращивания подбирают в зависимости от необходимого биоматериала, доступного оборудования и условий эксперимента.

Недостаток как гидропонике, так и чашек с агаризованными питательными средами заключается в том, что они не учитывают различную морфологию корневой системы разных видов растений: например, наличие (как у *A. thaliana*) или отсутствие корневых волосков. Некоторые растения, в условиях почвы образующие корневые волоски, на гидропонике их не имеют [48].

Для всех гидропонных систем характерна существенная проблема, связанная с загрязнением питательной среды водорослями. Контаминация корней и побегов растений происходит при использовании нестерильной богатой фосфором среды (например, минеральной ваты или пробки из агаризованной среды) и при доступе света. Рост водорослей снижает эффективность усвоения питательных веществ, нарушает состав питательного раствора и его pH, что может повлиять на результаты экспериментов [60, 61]. Исключение попадания света в камеры с питательным рас-

твором и на субстрат — залог предотвращения загрязнения водорослями и репрезентативности проводимых исследований.

Также использование минеральной ваты или губки препятствует свободному доступу к корневой системе и может приводить к обводнению апикальных меристем [42, 51, 53, 62]. Поэтому необходимо тщательно подходить к выбору способа посадки растений, особенно если для целей исследования необходимо получение корней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изначально *A. thaliana* являлся сорным растением, он не представляет практического интереса для сельского хозяйства. Однако сейчас этот “сорняк” по количеству исследований с его использованием составляет конкуренцию любому хозяйственно ценному растению. Большая часть этих исследований подразумевает получение растительного материала.

Именно в зависимости от требуемого материала подбирают способ культивирования растительного

объекта. При планировании эксперимента нужно иметь четкое представление о том, какие именно данные с помощью каких методов необходимо получить.

У каждого метода выращивания есть свои преимущества, возможности и ограничения. Агаризованные питательные среды позволяют получать стерильный материал, но имеется ограничение по возрасту. Почва позволяет легко получать растения любого возраста, но без возможности исследования корней. Использование гидропоники дает гибкую экспериментальную платформу для манипулирования как побегом, так и корневой системой растения, но такое выращивание трудно стандартизировать и получить воспроизводимые результаты в разных лабораториях.

Из всего вышеизложенного можно заключить, что выбор способа культивирования растительного объекта является непростой задачей. На ее решение влияет множество факторов, которые индивидуальны для каждого уникального исследования, поэтому не существует единственно верного выбора.

В таблице 1 кратко перечислены основные тезисы статьи.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00057) (раздел 1 и 3) и в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *The Arabidopsis Genome Initiative*. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796. <https://doi.org/10.1038/35048692>
2. *Borrelli V.M.G., Brambilla V., Rogowsky P., Marocco A., Lanubile A.* The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01245>
3. *Zhao Y., Zhang C., Liu W., Gao W., Liu C., Song G., Li W.X., Mao L., Chen B., Xu Y., Li X., Xie C.* An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design // Sci. Rep. 2016. V. 6. <https://doi.org/10.1038/SREP23890>
4. *Pyott D.E., Sheehan E., Molnar A.* Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants // Mol. Plant Pathol. 2016. V. 17. P. 1276. <https://doi.org/10.1111/MPP.12417>
5. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
6. *Lindsey B.E., Rivero L., Calhoun C.S., Grotewold E., Brkljacic J.* Standardized method for high-throughput sterilization of *Arabidopsis* seeds // J. Visualized Exp. 2017. V. 2017. P. e56587. <https://doi.org/10.3791/56587>
7. *Ried M.K., Banhara A., Hwu F.Y., Binder A., Gust A.A., Höfle C., Hüchelhoven R., Nürnberger T., Parniske M.* A set of *Arabidopsis* genes involved in the accommodation of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* // PLoS Pathog. 2019. V. 15. P. 1. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007747>
8. *Niñoles R., Ruiz-Pastor C.M., Arjona-Mudarra P., Casañ J., Renard J., Bueso E., Mateos R., Serrano R., Gadea J.* Transcription factor DOF4.1 regulates seed longevity in *Arabidopsis* via seed permeability and modulation of seed storage protein accumulation // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.915184>
9. *Ugena L., Hýlová A., Podlešáková K., Humplík J.F., Doležal K., Diego N. de, Spíchal L.* Characterization of biostimulant mode of action using novel multi-trait high-throughput screening of *Arabidopsis* germination and rosette growth // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01327>
10. *Adhikari N.D., Bates P.D., Browse J.* WRINKLED1 rescues feedback inhibition of fatty acid synthesis in hydroxylase-expressing seeds // Plant Physiol. 2016. V. 171. P. 179. <https://doi.org/10.1104/PP.15.01906>
11. *Lothier J., Gaufichon L., Sormani R., Lemaître T., Azzopardi M., Morin H., Chardon F., Reisdorf-Cren M., Avice J.C., Masclaux-Daubresse C.* The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 1375. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERQ299>
12. *Cui D., Yin Y., Wang J., Wang Z., Ding H., Ma R., Jiao Z.* Research on the physio-biochemical mechanism of non-thermal plasma-regulated seed germination and early seedling development in *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01322>
13. *Han X., Tang S., An Y., Zheng D.C., Xia X.L., Yin W.L.* Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 4589. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT262>
14. *Vandepol N., Liber J., Yocca A., Matlock J., Edger P., Bonito G.* *Linnemannia elongata* (Mortierellaceae) stimulates *Arabidopsis thaliana* aerial growth and responses to auxin, ethylene, and reactive oxygen species // PLoS One. 2022. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0261908>
15. *Ciou H.S., Tsai Y.L., Chiu C.C.* *Arabidopsis* chloroplast J protein DJC75/CRRJ mediates nitrate-promoted

- seed germination in the dark // *Ann. Bot.* 2020. V. 125. P. 1091.
<https://doi.org/10.1093/AOB/MCAA040>
16. *Seok H.Y., Bae H., Kim T., Mehdi S.M.M., Nguyen L.V., Lee S.Y., Moon Y.H.* Non-TZF protein ATC3H59/ZF-WD3 is involved in seed germination, seedling development, and seed development, interacting with PPPDE family protein Desi1 in *Arabidopsis* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/IJMS22094738>
 17. *Lim S.D., Yim W.C., Liu D., Hu R., Yang X., Cushman J.C.* A *Vitis vinifera* basic helix–loop–helix transcription factor enhances plant cell size, vegetative biomass and reproductive yield // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 1595.
<https://doi.org/10.1111/PBI.12898>
 18. *Bayon S., Chen G., Weselake R.J., Browse J.* A small phospholipase A2- α from castor catalyzes the removal of hydroxy fatty acids from phosphatidylcholine in transgenic *Arabidopsis* seeds // *Plant Physiol.* 2015. V. 167. P. 1259.
<https://doi.org/10.1104/PP.114.253641>
 19. *Takatani N., Ito T., Kiba T., Mori M., Miyamoto T., Maeda S.I., Omata T.* Effects of high CO₂ on growth and metabolism of *Arabidopsis* seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. P. 281.
<https://doi.org/10.1093/PCP/PCT186>
 20. *Ariyaratne M.A., Wone B.W.M.* Overexpression of the *Selaginella lepidophylla* bHLH transcription factor enhances water-use efficiency, growth, and development in *Arabidopsis* // *Plant Sci.* 2022. V. 315. P. 111129.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.111129>
 21. *Lucek K., Hohmann N., Willi Y.* Postglacial ecotype formation under outcrossing and self-fertilization in *Arabidopsis lyrata* // *Mol. Ecol.* 2019. V. 28. P. 1043.
<https://doi.org/10.1111/MEC.15035>
 22. *Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M.* Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1119.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ093>
 23. *Tholen D., Voeselek L.A.C.J., Poorter H.* Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia x hybrida* // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1803.
<https://doi.org/10.1104/PP.103.034389>
 24. *Matuszkiewicz M., Koter M.D., Filipecki M.* Limited ventilation causes stress and changes in *Arabidopsis* morphological, physiological and molecular phenotype during in vitro growth // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 135. P. 554.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.11.003>
 25. *Basu P., Kruse C.P.S., Luesse D.R., Wyatt S.E.* Growth in spaceflight hardware results in alterations to the transcriptome and proteome // *Life Sci. Space Res.* 2017. V. 15. P. 88.
<https://doi.org/10.1016/J.LSSR.2017.09.001>
 26. *Ryu C.M., Faragt M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., Klopper J.W.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. V. 100. P. 4927.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0730845100>
 27. *Xie X., Zhang H., Paré P.W.* Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) // *Plant Signal. Behav.* 2009. V. 4. P. 948.
<https://doi.org/10.4161/PSB.4.10.9709>
 28. *Bac-Molenaar J.A., Granier C., Keurentjes J.J.B., Vreugdenhil D.* Genome-wide association mapping of time-dependent growth responses to moderate drought stress in *Arabidopsis* // *Plant, Cell Environ.* 2016. V. 39. P. 88.
<https://doi.org/10.1111/PCE.12595>
 29. *Yang Z., Liu J., Tischer S.V., Christmann A., Windisch W., Schnyder H., Grill E.* Leveraging abscisic acid receptors for efficient water use in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. V. 113. P. 6791.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1601954113>
 30. *Cross J.M., von Korff M., Altmann T., Bartzetko L., Sulpice R., Gibon Y., Palacios N., Stitt M.* Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1574.
<https://doi.org/10.1104/PP.106.086629>
 31. *Drake T., Keating M., Summers R., Yochikawa A., Pitman T., Dodd A.N.* The cultivation of *Arabidopsis* for experimental research using commercially available peat-based and peat-free growing media // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. 1.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153625>
 32. *Rutter M.T., Murren C.J., Callahan H.S., Bisner A.M., Leebens-Mack J., Wolyniak M.J., Strand A.E.* Distributed phenomics with the unPAK project reveals the effects of mutations // *Plant J.* 2019. V. 100. P. 199.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.14427>
 33. *Groot M.P., Kubisch A., Ouborg N.J., Pagel J., Schmid K.J., Vergeer P., Lampei C.* Transgenerational effects of mild heat in *Arabidopsis thaliana* show strong genotype specificity that is explained by climate at origin // *New Phytol.* 2017. V. 215. P. 1221.
<https://doi.org/10.1111/NPH.14642>
 34. *Granier C., Aguirrezabal L., Chenu K., Cookson S.J., Dauzat M., Hamard P., Thioux J.J., Rolland G., Bouchier-Combaud S., Lebaudy A., Muller B., Simonneau T., Tardieu F.* PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit // *New Phytol.* 2006. V. 169. P. 623.
<https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01609.X>
 35. *Diaz C., Lemaître T., Christ A., Azzopardi M., Kato Y., Sato F., Morot-Gaudry J.F., le Dily F., Masclaux-Daubresse C.* Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. P. 1437.
<https://doi.org/10.1104/PP.108.119040>

36. Zhang X., Henriques R., Lin S.S., Niu Q.W., Chua N.H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 641. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
37. Guo D., Song X., Yuan M., Wang Z., Ge W., Wang L., Wang J., Wang X. RNA-Seq profiling shows divergent gene expression patterns in *Arabidopsis* grown under different densities // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.02001>
38. Hershey D.R. Solution culture hydroponics: history and inexpensive equipment // Amer. Biol. Teach. 1994. V. 56. P. 111. <https://doi.org/10.2307/4449764>
39. Rodecap K.D., Tingey D.T., Lee E.H. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // J. Environ. Qual. 1994. V. 23. P. 239. <https://doi.org/10.2134/JEQ1994.0047242500230002004X>
40. Lemaître T., Gaufichon L., Boutet-Mercey S., Christ A., Masclaux-Daubresse C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* *Wassileskija* accession // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 1056. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCN081>
41. Conn S.J., Hocking B., Dayod M., Xu B., Athman A., Henderson S., Aukett L., Conn V., Shearer M.K., Fuentes S., Tyerman S.D., Gilliham M. Protocol: Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants // Plant Meth. 2013. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-4>
42. Robison M.M., Smid M.P.L., Wolyn D.J. High-quality and homogeneous *Arabidopsis thaliana* plants from a simple and inexpensive method of hydroponic cultivation // Can. J. Bot. 2006. V. 84. P. 1009. <https://doi.org/10.1139/b06-054>
43. Delhaize E., Randall P.J. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1995. V. 107. P. 207. <https://doi.org/10.1104/PP.107.1.207>
44. Hirai M.Y., Fujiwara T., Chino M., Naito S. Effects of sulfate concentrations on the expression of a soybean seed storage protein gene and its reversibility in transgenic *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. P. 1331.
45. Berezin I., Elazar M., Gaash R., Avramov-Mor M., Shaul O. The use of hydroponic growth systems to study the root and shoot ionome of *Arabidopsis thaliana* // Hydroponics – a standard methodology for plant biological researches. 2012. <https://doi.org/10.5772/36558>
46. Hermans C., Verbruggen N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2153. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERI215>
47. Johnston-Monje D., Gutiérrez J.P., Lopez-Lavalle L.A.B. Seed-transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737616>
48. Ahn S.J., Shin R., Schachtman D.P. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1135. <https://doi.org/10.1104/PP.103.034660>
49. Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1565. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
50. Harrison S.J., Mott E.K., Parsley K., Aspinall S., Gray J.C., Cottage A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation // Plant Meth. 2006. V. 2. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19/FIGURES/4>
51. Smeets K., Ruytinx J., van Belleghem F., Semane B., Lin D., Vangronsveld J., Cuypers A. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. P. 212. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2007.09.014>
52. Arteca R.N., Arteca J.M. A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically // Physiol. Plant. 2000. V. 108. P. 188. <https://doi.org/10.1034/J.1399-3054.2000.108002188.X>
53. Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 317. <https://doi.org/10.1104/PP.115.2.317>
54. Martinez-Zapater J.M., Coupland G., Dean C., Koornneef M. The transition to flowering in *Arabidopsis* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. P. 403
55. Conn S.J., Conn V., Tyerman S.D., Kaiser B.N., Leigh R.A., Gilliham M. Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles // New Phytol. 2011. V. 190. P. 583. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2010.03619.X>
56. Conn S.J., Gilliham M., Athman A., Schreiber A.W., Baumann U., Moller I., Cheng N.H., Stancombe M.A., Hirschi K.D., Webb A.A.R., Burton R., Kaiser B.N., Tyerman S.D., Leigh R.A. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 240. <https://doi.org/10.1105/TPC.109.072769>
57. Schlesier B., Bréton F., Mock H.P. A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions // Plant Mol. Biol. Rep. 2012. V. 21. P. 449. <https://doi.org/10.1007/BF02772594>
58. Tocquin P., Corbesier L., Havelange A., Pieltain A., Kurtem E., Bernier G., Périlleux C. A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2003. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-2/TABLES/3>

59. *Rhee S.Y.* Bioinformatic resources, challenges, and opportunities using *Arabidopsis* as a model organism in a post-genomic era // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1460. <https://doi.org/10.1104/PP.124.4.1460>
60. *Boller T., Felix G.* A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. V. 60. P. 379. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.57.032905.105346>
61. *Huang C., Verrillo F., Renzone G., Arena S., Rocco M., Scaloni A., Marra M.* Response to biotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*: Analysis of variably phosphorylated proteins // *J. Proteomics.* 2011. V. 74. P. 1934. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2011.05.016>
62. *Huttner D., Bar-zvi D.* An improved, simple, hydroponic method for growing *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 21. P. 59. <https://doi.org/10.1007/BF02773397>
63. *Holdsworth M.J., Bentsink L., Soppe W.J.J.* Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination // *New Phytol.* 2008. V. 179. P. 33. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02437.X>
64. *Umezawa T., Okamoto M., Kushiro T., Nambara E., Oono Y., Seki M., Kobayashi M., Koshiba T., Kamiya Y., Shinozaki K.* CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2006. V. 46. P. 171. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02683.X>
65. *Wang X., Yesbergenova-Cuny Z., Biniek C., Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F.* Revisiting the role of ethylene and N-end rule pathway on chilling-induced dormancy release in *Arabidopsis* seeds // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3577. <https://doi.org/10.3390/IJMS19113577>
66. *Hoagland D.R.* The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif: College of Agriculture, University of California. 1950. P. 41.
67. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* 1968. V. 46. P. 417. <https://doi.org/10.1139/O68-063>