

УДК 575:581.144.2:581.133.8:582.683.2

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН. ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ГЕНОВ *SHR1*, *GPA1* И *COB1*

© 2012 г. С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаева

Луганский национальный аграрный университет

(Луганск, Украина)

Представлены результаты изучения влияния взаимодействия генов *SHR1*, *GPA1* и *COB1* на признаки корневой системы у *Arabidopsis thaliana*. Установлено, что в F₂ скрещиваний растений мутантных линий *shr-1* × *cob-1* и *gpa1-3* × *cob-1* расщепление по фенотипу соответствует формуле расщепления (3:1)², или 9:3:3:1. При скрещивании растений мутантных линий *shr-1* × *gpa1-3* в поколении F₂ происходит видоизменение дигенного расщепления по фенотипу в отношении 9:3:3. Причиной этого является элиминация при расщеплении класса гомозигот по обоим рецессивным генам.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh., корневая система, ген, мутация, взаимодействие генов

Как известно, у растений различают несколько типов корневых систем: стержневую, мочковатую и смешанную. У модельного растительного объекта *Arabidopsis thaliana* образуется корневая система смешанного типа, объединяющая в себе систему главного корня и систему придаточных корней (Хаблак, Абдуллаева, 2010). В настоящее время генетический контроль развития корневой системы у растений *A. thaliana* остается практически неисследованным. Очень мало известно о генетических механизмах, регулирующих ее морфогенез.

В последнее время молекулярно-генетические и физиологические исследования мутантов у *A. thaliana* позволили изолировать и секвенировать ряд генов, участвующих в образовании корневой системы. К ним относятся гены *SHORT-ROOT (SHR1)* (Benfey et al., 1993), *G PROTEIN ALPHA SUBUNIT1 (GPA1)* (Ma et al., 1990), *COBRA1 (COB1)* (Roudier et al., 2001).

Гены, которые детерминируют процессы роста и дифференцировки, часто называют генами-регуляторами (переключателями) развития. Они кодируют транскрипционные факторы, контролирующие программы формирова-

ния органов и тканей растения (Медведев, Шарова, 2010). Ген *SHR1* кодирует фактор транскрипции *SHR1*, контролирующий активность апикальной меристемы корня (Helariutta et al., 2000). Мутация *shr-1* по гену *SHR1* вызывает у растений развитие мочковатой корневой системы, которая не имеет ясно выраженного главного корня и состоит преимущественно из большого количества придаточных корней (Хаблак, Абдуллаева, 2011).

У растений обнаружены сигнальные системы, включающие в себя рецепторы серпантинного типа и сопряженные с ними гетеротримерные G-белки, которые широко распространены у животных и грибов (Weiss et al., 1993). Эти системы участвуют в передаче сигналов фитогормонов (Шпаков, 2009). В геноме *A. thaliana* обнаружены гены, которые кодируют субъединицы, формирующие молекулу гетеротримерного G-белка: одну Gα- (*GPA1*), одну Gβ- (*AGB1*) и две Gγ-субъединицы (*AGG1* и *AGG2*) (Wise et al., 1994). Ген *GPA1* кодирует α-субъединицу гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (G-белки), ответственных за передачу гормонального сигнала от рецепторов серпантинного типа к транскрипционным факторам (Okamoto et al., 2001). Мутация *gpa1-3* в этом гене обуславливает у растений формирование стержневой корневой системы, имеющей ясно выраженный главный корень, кото-

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ

рый длиннее и толще боковых корней (Хаблак, Абдуллаева, 2011).

У растений обнаружен широкий ряд белков клеточной стенки: гидроксипролин-обогащенные гликопротеины, глицин-обогащенные белки, пролин-обогащенные белки, лектины и арабиногалактановые белки. Все эти белки считаются эволюционно и функционально близкими по гидроксипролин-обогащенным остаткам и подобные по нуклеотидной последовательности их генов (Showaltd, 1993). Ген *COB1* кодирует белок GPI, участвующий в организации углеводного каркаса клеточной оболочки (Roudier et al., 2001). Мутация *cob-1* в гене *COB1* приводит у растений к образованию нетипичных корней в виде корневых шишек, которые развиваются вследствие метаморфоза боковых и придаточных корней.

Информация о наследовании признаков корневой системы у *A. thaliana* при взаимодействии генов *SHR1*, *GPA1* и *COB1* отсутствует. Между тем, такого рода исследования важны для выяснения принципов, лежащих в основе образования разных типов корневых систем у растений, что является одной из наиболее трудных и еще мало изученных проблем генетики развития. В этой связи целью настоящей работы было изучение влияния взаимодействия генов *SHR1*, *GPA1* и *COB1* на строение корневой системы.

МЕТОДИКА

Материалом для исследований служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа (расы) Columbia (Col-O) и мутантных линий *short-root-1* (*shr-1*), *g protein alpha subunit1-3* (*gpa1-3*), *cobra-1* (*cob-1*). Семена мутантных линий были получены из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), UK).

Растения выращивали в лаборатории в асептической пробирочной культуре на агаризованной питательной среде Кнопа, обогащенной микроэлементами (Чернавина и др., 1978).

Семена к посеву готовили путем яровизации в течение 5 суток при температуре 4-6°C и последующего односуточного проращивания при комнатной температуре. Пробирки для предохранения от нагревания и попадания света на корни растений обертывали двумя слоями бумаги. Растения культивировали при температуре 18-20°C, освещенность круглосуточная в пределах 4000-7000 лк.

Кастрацию и принудительную гибридизацию проводили с помощью бинокулярного микроскопа. Генетический анализ наследования признаков корневой у растений проводили в F₁ и F₂. Объем выборки в каждом опыте составлял 196 растений. При проведении наблюдений за растениями руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно-морфологических исследований (Доспехов, 1985). Математическую обработку результатов проводили по методам, описанным в руководствах Б.А. Доспехова (1985) и Г.Ф. Лакина (1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У арабидопсиса нормального или дикого типа, распространенного в природе, образуется корневая система смешанного типа. Растения мутантной линии *shr-1* обладают мочковатой корневой системой, а растения мутантной линии *gpa1-3* имеют стержневую корневую систему. Для растений мутантной линии *cob-1* характерны нетипичные корни в виде корневых шишек.

Нормальный аллель *SHR1*, обуславливающий корневую систему смешанного типа, доминирует над аллелем *shr-1*, определяющим корневую систему мочковатого типа. Другая аллельная пара, находящаяся в иной паре гомологичных хромосом, определяет типичное строение корней. Это строение корней контролируется доминантным аллелем *COB1*. Рecessивный аллель *cob-1* определяет не характерное для *A. thaliana* строение корней в виде корневых шишек.

При скрещивании растения мутантной линии *shr-1* с мочковатой корневой системой и типичными корнями *shr-1 shr-1 COB1 COB1* с растением мутантной линии *cob-1*, обладающим смешанной корневой системой и видоизмененными корнями *SHR1 SHR1 cob-1 cob-1*, у гибридных растений первого поколения *SHR1 shr-1 COB1 cob-1* проявляется смешанная корневая система и типичные корни (рис. 1). В F₁ по генам *SHR1* и *COB1* по каждой паре аллелей наблюдается полное доминирование типичного типа корневой системы и нормального строения корней (*shr-1 < SHR1, cob-1 < COB1*). Во втором поколении от самоопыления таких растений происходит расщепление на четыре фенотипических класса в соотношении 107 с корневой системой смешанного типа и типичными корнями, 34 с корневой системой смешанного типа и видоизмененными корнями, 35 с корневой системой мочковатого типа и типичными



Рис. 1. Наследование типа корневой системы и характера строения корней у *A. thaliana* при взаимодействии двух пар генов *SHR1* и *COB1*.

SHR1 – смешанная корневая система, *shr-1* – мочковатая корневая система, *COB1* – типичные корни, *cob-1* – видоизмененные корни.

Таблица 1. Расщепление в поколении F₂ по генам *SHR1* и *COB1*

Обозначение	<i>SHR1</i> __ <i>COB1</i> __	<i>SHR1</i> __ <i>cob-1 cob-1</i>	<i>shr-1 shr-1</i> <i>COB1</i> __	<i>shr-1 shr-1 cob-1</i> <i>cob-1</i>	Всего
<i>f</i>	107	34	35	12	188
<i>f'</i>	106	35	35	12	188
<i>d</i>	1	-1	0	0	
<i>d'</i>	1	1	0	0	
$\chi^2 = \frac{d^2}{f'}$	0,009	0,03	0	0	0,039

корнями, 12 с корневой системой мочковатого типа и видоизмененными корнями.

Статистическую оценку различий между экспериментально полученными и теоретически ожидаемыми результатами расщепления в F₂ проводили с помощью критерия соответствия χ^2 (хи-квадрат). Результаты представлены в табл. 1.

Полученную величину $\chi^2 = 0,009 + 0,03 = 0,039$ сравнивали с табличной χ^2_{st} . Табличное значение χ^2_{st} в нашем случае при степени свободы (df), равной 3, составляет $\chi^2_{st} = \{7,8-11,34-16,27\}$. Установили, что $\chi^2 < \chi^2_{st}$, т.е. вычисленная величина χ^2 (0,039) меньше табличной χ^2_{st} (7,81) ($\chi^2 < \chi^2_{st}$), P < 0,95. Следовательно, данные, полученные в эксперименте, соответствуют схеме расщепления 9:3:3:1. Таким образом, гипотеза о расщеплении по дигибридной схеме 9:3:3:1 подтверждается.

Следует подчеркнуть, что в рассмотренной схеме также наблюдается комплементарное взаимодействие генов *SHR1* и *COB1* в F₁, когда доминантные аллели обоих указанных генов в гетерозиготном состоянии обуславливают нормальный фенотип. В результате этого растения имеют корневую систему смешанного типа и типичное строение корней.

Подобным образом происходит наследование типа корневой системы и характера строения корней у *A. thaliana* при взаимодействии двух пар генов *GPA1* и *COB1*. На рис. 2 показаны результаты скрещивания растения мутантной линии *gpa1-3* со стержневой корневой системой и типичными корнями *gpa1-3 gpa1-3 COB1 COB1* с растением мутантной линии *cob-1*, обладающим смешанной корневой системой и видоизмененными корнями *GPA1 GPA1 cob-1 cob-1*.

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ



Рис. 2. Наследование типа корневой системы и характера строения корней у *A. thaliana* при взаимодействии двух пар генов *GPA1* и *COB1*.

GPA1 – смешанная корневая система, *gpa1-3* – стержневая корневая система, *COB1* – типичные корни, *cob-1* – видоизмененные корни.

Таблица 2. Расщепление в поколении F₂ по генам *GPA1* и *COB1*

Обозначение	<i>GPA1_</i> <i>COB1_</i>	<i>GPA1_</i> <i>cob-1 cob-1</i>	<i>gpa1-3 gpa1-3</i> <i>COB1_</i>	<i>gpa1-3 gpa1-3 cob-</i> <i>1 cob-1</i>	Всего
<i>f</i>	108	32	32	12	184
<i>f'</i>	104	34	34	12	184
<i>d</i>	4	-2	-2	0	
<i>d</i> ²	16	4	4	0	
$\chi^2 = \frac{d^2}{f'}$	0,15	0,12	0,12	0	0,39

Смешанная корневая система у *A. thaliana* определяется доминантным аллелем *GPA1* с доминированием его над рецессивным аллелем *gpa1-3*, обуславливающим стержневую корневую систему. Другая пара признаков связана с особенностями строения корней в корневой системе. Доминантный аллель гена *COB1* в гомозиготном состоянии определяет типичное строение корней, а рецессивный аллель этого гена (также в гомозиготном состоянии) обуславливает развитие видоизмененных корней.

Первое поколение гибридов все состоит из растений с корневой системой смешанного типа и типичными корнями. Этот тип корневой системы и такое строение корней развивается у растений обычно только в том случае, когда два доминантных гена *GPA1* и *COB1* в гетерозиготном состоянии взаимодействуют. Их генотип характеризуется дигетерозиготностью –

GPA1 gpa1-3 COB1 cob-1. Во втором поколении этого дигибридного скрещивания расщепление по фенотипу наблюдается в таком соотношении: смешанная корневая система, типичные корни *GPA1_COB1_* – 108 растений, смешанная корневая система, видоизмененные корни *GPA1_cob-1 cob-1* – 32 растения, стержневая корневая система, типичные корни *gpa1-3 gpa1-3 COB1_* – 32 растения, стержневая корневая система, видоизмененные корни *gpa1-3 gpa1-3 cob-1 cob-1* – 12 растений.

Достоверность расщепления по критерию χ^2 представлена в табл. 2. Сравнивая χ^2 и χ^2_{st} , установили, что $\chi^2 < \chi^2_{st}$ ($P < 0,95$). Следовательно, гипотеза о расщеплении в отношении 9:3:3:1 подтверждается.

Со значительным видоизменением расщепления в F₂ при дигибридном скрещивании осуществляется наследование типа корневой



Рис. 3. Наследование типа корневой системы у *A. thaliana* при гибели проростков, гомозиготных по рецессивным аллелям двух генов *SHR1* и *GPA1*.

SHR1 – смешанная корневая система, *shr-1* – мочковатая корневая система, *GPA1* – смешанная корневая система, *gpa1-3* – стержневая корневая система.

Таблица 3. Расщепление в поколении F₂ по генам *SHR1* и *GPA1*

Обозначение	<i>SHR1</i> __ <i>GPA1</i> __	<i>SHR1</i> __ <i>gpa1-3 gpa1-3</i>	<i>shr-1 shr-1</i> <i>GPA1</i> __	<i>shr-1 shr-1 gpa1-3</i> <i>gpa1-3</i>	Всего
<i>f</i>	108	37	35	0	180
<i>f'</i>	101	34	34	11	180
<i>d</i>	7	3	1	-11	
<i>d'</i>	49	9	1	121	
$\chi^2 = \frac{d^2}{f'}$	0,49	0,26	0,03	11	11,78

системы у *A. thaliana* при взаимодействии двух пар генов *SHR1* и *GPA1*. Результаты скрещивания растения мутантной линии *shr-1* с мочковатой корневой системой *shr-1 shr-1 GPA1 GPA1* с растением мутантной линии *gpa1-3*, имеющим стержневую корневую систему *SHR1 SHR1 gpa1-3 gpa1-3*, представлены на рис. 3.

Смешанная корневая система определяется гомозиготным состоянием аллеля *SHR1*, а мочковатая – аллеля *shr-1*. Другая аллельная пара в гомозиготном состоянии также определяет смешанную корневую систему *GPA1 GPA1*, а рецессивное гомозиготное состояние гена *gpa1-3 gpa1-3* приводит к образованию стержневой корневой системы. Гибридные растения первого поколения *SHR1 shr-1 GPA1 gpa1-3* имеют корневую систему смешанного типа. Нормальный тип корневой системы обусловлен взаимодействием двух доминантных

аллелей *SHR1* и *GPA1* в гетерозиготном состоянии. От самоопыления таких форм во втором поколении появляются растения с тремя типами корневых систем в отношении 9/16 со смешанной корневой системой : 3/16 со стержневой корневой системой : 3/16 с мочковатой корневой системой, то есть расщепление оказывается не типичным для дигибридного скрещивания.

В табл. 3 приведены результаты расщепления в поколении F₂ по указанным признакам. Из данных табл. 3 видно, что статистически не подтверждается совпадение теоретически ожидаемого расщепления по фенотипу с наблюдаемым в опыте: $\chi^2 > \chi^2_{st}$, P < 0,95.

Во втором поколении такого скрещивания имеет место расщепление в необычном отношении 9:3:3. Однако при самоопылении гиб-

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ

ридных растений первого поколения в потомстве должно было бы получаться расщепление, типичное для дигибридного скрещивания $9\ SHR1_GPA1_ : 3\ SHR1_gpa1-3\ gpa1-3 : 3\ shr-1\ shr-1\ GPA1_ : 1\ shr-1\ shr-1\ gpa1-3\ gpa1-3$, а получилось $9\ SHR1_GPA1_ : 3\ SHR1_gpa1-3\ gpa1-3 : 3\ shr-1\ shr-1\ GPA1_$, и растения, гомозиготные по обоим рецессивным генам $shr-1\ shr-1\ gpa1-3\ gpa1-3$, не обнаруживались.

Причиной, изменяющей расщепление в отношении 9:3:3:1, является разная жизнеспособность растений в поколении F_2 . Растения, у которых рецессивные аллели двух генов $SHR1$ и $GPA1$ находятся в гомозиготном состоянии ($shr-1\ shr-1\ gpa1-3\ gpa1-3$), не выживают и гибнут на стадии проростка от прекращения развития корневой системы. У таких растений наблюдается сильная редукция главного и придаточных корней, что приводит к снижению жизнеспособности и скорости их роста. Это связано с тем, что мутация $shr-1$ по гену $SHR1$ вызывает в корневой системе прекращение роста главного корня, а мутация $gpa1-3$ в гене $GPA1$ обуславливает подавление образования придаточных корней.

Следовательно, гомозиготное состояние по обоим рецессивным генам $shr-1\ shr-1\ gpa1-3\ gpa1-3$ вызывает у растений их гибель. В результате целый класс расщепления выпадает, давая отношение 9:3:3 вместо 9:3:3:1.

В целом, результаты гибридологического анализа гибридов F_1 и F_2 всех проведенных комбинаций скрещиваний позволяют сделать вывод о независимом наследовании признаков корневой системы при взаимодействии генов $SHR1$, $GPA1$ и $COB1$. Это свидетельствует о том, что гены $SHR1$, $GPA1$ и $COB1$ участвуют в несвязанных процессах формирования признаков корневой системы.

ЛИТЕРАТУРА

- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // J. Siberian Federal Univer. Biol. – 2010. – V. 2, №3. – P. 109-129.
- Хаблак С.Г., Абдуллаева Я.А. Строение корневой системы у мутантной линии *g protein alpha subunit1-3 (gpa1-3) Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2011. – Вып. 5 (24). – С. 71-78.
- Хаблак С.Г., Абдуллаева Я.А. Корневая система *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа расы Landsberg // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – Вып. 2 (21). – С. 92-98.
- Хаблак С.Г., Абдуллаева Я.А. Строение корневой системы у мутантной линии *wooden leg-1 (wol-1) Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2011. – № 1 (11). – С. 122-127.
- Чернавина И.А., Потанов Н.Г., Косулина Л.Г., Кренделева Т.Е. Большой практикум по физиологии растений / Под ред. Б.А. Рубина. – М.: Высш. шк., 1978. – 408 с.
- Шпаков А.О. Хемосигнальные системы растений // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 9. – С. 721-733.
- Benfey P.N., Linstead P.J., Roberts K., Schiefelbein J.W., Hauser M.T., Aeschbacher R.A. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis // Development. – 1993. – V. 119, № 5. – P. 57-70.
- Helariutta Y., Fukaki H., Woysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.T., Benfey P.N. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling // Cell. – 2000. – V. 101, № 5. – P. 555-567.
- Ma H., Yanofsky M.F., Meyerowitz E.M. Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein alpha subunit gene from *Arabidopsis thaliana* // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 1990 – V. 87, № 10. – P. 3821-3825.
- Okamoto H., Matsui M., Deng X.W. Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2001. – V. 13, № 7. – P. 1639-1652.
- Roudier F., Fernandez A. G., Fujita M., Himmelspach R., Borner G.H., Schindelman G., Song S., Baskin T.I., Dupree P., Wasteneys G.O., Benfey P.N. COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation // Plant Cell. – 2005. – V. 17, № 6. – P. 1749-1763.
- Showaltd A.M. Structure and function of plant cell wall proteins // Plant Cell. – 1993. – V. 5, № 1. – P. 9-23.
- Weiss C.A., Huang H., Ma H. Immunolocalization of the G protein alpha subunit encoded by the *GPA1* gene in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 1993. – V. 5, № 10. – P. 1513-1528.

ХАБЛАК, АБДУЛЛАЕВА

Wise C.A., Thomas P.G., White I.R., Millner P.A. Isolation of a putative receptor from *Zea mays* microsomal membranes that interacts with the G-protein, *GP*

alpha 1 // FEBS Lett. – 1994. – V. 19, № 3. – P. 233-237.

Поступила в редакцію
13.09.2012 г.

**INHERITANCE OF THE ROOT SYSTEM IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.
AT THE INTERACTION OF GENES *SHR1*, *GPA1* AND *COB1***

S. G. Hablak, J. A. Abdullaeva

*Lugansk National Agrarian University
(Lugansk, Ukraine)*

The results of study of interaction of the genes *SHR1*, *GPA1* and *COB1* impact on the traits of the root system in *Arabidopsis thaliana* are presented. There is found that in F₂ of crosses between mutant lines *shr-1* × *cob-1* and *gpa1-3* × *cob-1*, the segregation by phenotype corresponds to the segregation formula (3:1)², or 9:3:3:1. In F₂ of the crosses between mutant lines *shr-1* × *gpa1-3*, the segregation by phenotype is modified to 9:3:3. The reason for this is elimination of the segregation class homozygous for the both recessive genes.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., root system, gene mutation, gene interactions

**УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ
У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ПРИ ВЗАЄМОДІЇ ГЕНІВ
SHR1, *GPA1* І *COB1***

С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаєва

*Луганський національний аграрний університет
(Луганськ, Україна)*

Представлені результати вивчення впливу взаємодії генів *SHR1*, *GPA1* і *COB1* на ознаки кореневої системи у *Arabidopsis thaliana*. Встановлено, що в F₂ схрещувань рослин мутантних ліній *shr-1* × *cob-1* і *gpa1-3* × *cob-1* розщеплення за фенотипом відповідає формулі розщеплення (3:1)², або 9:3:3:1. При схрещуванні рослин мутантних ліній *shr-1* × *gpa1-3* в поколінні F₂ відбувається видозміна розщеплення за фенотипом у відношенні 9:3:3. Причиною цього є елімінація при розщепленні класу гомозигот за обома рецесивними генами.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., коренева система, ген, мутація, взаємодія генів