

РОЗДІЛ І. ГЕНЕТИКА, ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА ПРИКЛАДНА БОТАНІКА

УДК 575:581.144.2:581.133.8:582.683.2

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ СИГНАЛИЗАЦИИ АУКСИНОВ *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* И *AXR2* НА ВЕТВЛЕНИЕ КОРНЕЙ В КОРНЕВОЙ СИСТЕМЕ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH

Хаблак С.Г., к.б.н., доцент, Абдуллаева Я.А., аспирант

Луганский национальный аграрный университет

Изучены особенности строения корневых систем у растений мутантных линий *tir1-1*, *gpa1-3*, *agb1-2* и *axr2-1 Arabidopsis thaliana*, нарушающих формирование боковых корней. По характеру влияния на степень разветвления корней мутации, которые изменяют сигнализацию к ауксином, разделены на две группы: мутации, уменьшающие степень ветвления корней и мутации, повышающие порядок ветвления корней. В первую группу входят мутации *tir1-1* и *gpa1-3*. Ко второй группе относятся мутации *agb1-2* и *axr2-1*.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., корневая система, фитогормоны, ауксин, ген, мутация, рецептор.

Хаблак С.Г., Абдуллаева Я.А. ВПЛИВ МУТАЦІЙ ГЕНІВ СИГНАЛІЗАЦІЇ АУКСИНІВ *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* І *AXR2* НА РОЗГАЛУЖЕННЯ КОРІННЯ В КОРЕНЕВІЙ СИСТЕМІ В *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH / Луганський національний аграрний університет, Україна.

Вивчено особливості будови корневих систем у рослин мутантних ліній *tir1-1*, *gpa1-3*, *agb1-2* та *axr2-1 Arabidopsis thaliana*, що порушують формування бічного коріння. За характером впливу на ступінь розгалуження коріння мутації, які змінюють сигналізацію до ауксинів, розділено на дві групи: мутації, що зменшують ступінь розгалуження коріння і мутації, що підвищують порядок розгалуження коріння. У першу групу входять мутації *tir1-1* і *gpa1-3*. До другої групи належать мутації *agb1-2* і *axr2-1*.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., коренева система, фитогормони, ауксин, ген, мутация, рецептор.

Hablak S.G., Abdullaeva J.A. THE EFFECT OF MUTATIONS IN THE GENES SIGNALING OF AUKISNS *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* AND *AXR2* THE BRANCHING ROOTS IN THE ROOT SYSTEM OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH / Lugansk national agrarian university, Ukraine.

The features of the root system structure in plants mutant lines *tir1-1*, *gpa1-3*, *agb1-2* and *axr2-1 Arabidopsis thaliana*, violation of forming lateral roots were explored. There are two groups of branching of the roots that alter the signaling of auxins: mutations reducing the branching degree of the roots and mutations increasing the order of the roots branching. The first group includes mutations *tir1-1* and *gpa1-3*. The second group includes mutations *agb1-2* and *axr2-1*.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., root system, plant hormones, aukisn, gene mutation, receptor.

ВВЕДЕНИЕ

Корень (лат. radix) – основной вегетативный орган растения, обладающий радиальной симметрией и неопределенно долго нарастающий в длину благодаря деятельности апикальной меристемы. От стебля он морфологически отличается тем, что на нем никогда не образуются листья, а апикальная меристема всегда прикрыта чехликом [1].

Подобно побегу, корень способен к ветвлению. В результате образуется корневая система, под которой понимают совокупность корней одного растения. Характер корневой системы определяется соотношением роста главного, боковых и придаточных корней [2].

В жизнедеятельности растений корневой системе принадлежит важная роль. Она закрепляет растение в почве, поглощает из нее воду и растворенные в ней вещества, синтезирует важнейшие органические соединения [3].

Развитие корневой системы у растений находится под генетическим контролем. В настоящее время вопросы генетики морфогенеза корневой системы у растений практически не изучены. Проблема генетического контроля морфогенеза корневой системы у растений тесно связана с работой эндогенной интегральной регуляторной фитогормональной системы. В то же время изучению эндогенных механизмов контроля роста и развития корневой системы у растений практически не уделяется внимание.

Существенную роль в гормональной регуляции развития корневой системы у растений в основном наряду с цитокининами и этиленом отводят ауксином. Ауксины – соединения преимущественно индольной природы: индолилуксусная кислота и ее производные (индолил-3-ацетальдегид, индолил-3-ацетонитрил, триптамин и другие) [4]. Они стимулируют рост клеток, определяют апикальное доминирование, индуцируют корнеобразование и утолщение корней, контролируют цветение, рост и созревание плодов, регулируют опадение листьев, завязей и плодов [5].

В настоящее время одной из главных проблем современной физиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики растений остается изучение механизма действия фитогормонов, который изучен крайне недостаточно [6]. Изучение механизма действия гормонов заключается в исследовании их рецепторов и процессов, приводящих к проявлению специфического гормонального эффекта.

К настоящему времени молекулярно-генетические и физиологические исследования мутантных растений у *A. thaliana* позволили изолировать и секвенировать ряд генов, участвующих в сигнализации ауксинов. К ним относятся гены *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* и *AXR2*.

Ген *TIR1* кодирует рецептор ауксина, который выступает посредником в регуляции ауксином экспрессии генов в растении [7]. Ген *GPA1* контролирует альфа-субъединицу гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (G-белки), содержащих альфа (*AtGPA1*), бета (*AGB1*) и гамма (*AGG*) субъединицы. Продукт гена *GPA1* участвует в передаче фитогормонального сигнала с активированного гормоном рецептора к факторам транскрипции, которые регулируют экспрессию генов в растении [8]. Ген *AGP1* кодирует бета-субъединицу гетеротримерных ГТФ-связывающих белков [9]. Ген *AXR2* контролирует короткоживущие транскрипционные белки, локализованные в ядре клеток, которые подавляют экспрессию генов в растении [10].

В то же время роль генов *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* и *AXR2* в регуляции ветвления корней у растений у *A. thaliana* до сих пор остается не изученной, что и послужило целью наших исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследований служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа (расы) Columbia (Col-0) и мутантных линий *tir1-1*, *gpa1-3*, *agb1-2* и *axr2-1*. Семена мутантных линий были получены из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), UK).

Растения выращивали в асептической пробирочной культуре на агаризованной питательной среде Кнопа, обогащенной микроэлементами [11]. Питательную смесь разливали в химические пробирки размером 14x120 мм и закрывали плотными ватными пробками.

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 обвертывали двумя слоями бумаги. После посадки пробирки накрывали полиэтиленовой пленкой. Снимали полиэтиленовую пленку при достижении семядольными листьями ее поверхности.

Растения культивировали при температуре 18–20°C, освещенность круглосуточная в пределах 4000–7000 лк.

При проведении наблюдений за растениями руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно–морфологических исследований [12]. При сравнении корневых систем по числу корней и по их длине объем выборки у экотипа Col-O и мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* составляли по 20 растений. Математическую обработку результатов исследований проводили по Б.А. Доспехову [12] и Г.Ф. Лакину [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по сравнению корневых систем по числу корней и их длине у исходной расы Col-O и мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* в фазу бутонизации обобщены в табл. 1.

Таблица 1. – Характеристика средних значений признаков у экотипа Col-O и мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* в фазу бутонизации

Обозначение линии	Тип корней								Всего корней
	Главный корень		Боковые корни главного корня		Придаточные корни		Боковые корни придаточных корней		
	ЧК, шт	ДК, мм	ЧК, шт	ДК, мм	ЧК, шт	ДК, мм	ЧК, шт	ДК, мм	
WT (Col-0)	1	39,1	29,6	12,5	1,1	7,5	10,3	6,6	42
Мутации, вызывающие уменьшение порядков ветвления корней									
<i>gal-3</i>	1	31,9	16,3	7,4	0	0	0	0	17,3
<i>tir1-1</i>	1	31,0	19,0	5,9	1,0	4,0	4,9	3,3	25,9
Мутации, приводящие к повышению степени ветвления корней									
<i>axr2-1/iaa7</i>	1	57,3	44,3	22,5	6,4	13,0	15,7	9,7	67,4
<i>agb1-2</i>	1	64,7	45,6	25,4	6,3	14,3	15,7	12,5	68,6
НСР ₀₅ , шт/мм	–	3,54	2,0	1,19	0,58	1,14	1,25	0,86	2,79

Примечание: ЧК – число корней, ДК – длина корней.

У данных мутантных линий корневые системы резко отличаются от экотипа Col-O по количеству и длине корней. Величина боковых корней разных порядков ветвления, как главного, так и придаточных у растений мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* колеблется в широких пределах от 0 до 25,4 мм. Короткие боковые корни имеют растения линии *tir1-1* и *gal-3*. Крупные боковые корни характерны для растений мутантных линий *agb1-2* и *axr2-1*.

Мутация *gal-3* в гене *GPA1* приводит к отсутствию в корневой системе придаточных корней. Это является причиной изменения типа корневой системы. В таких случаях у растений мутантной линии *gal-3* образуется стержневая корневая система, у которой сильно развит главный корень, выделяющийся среди разветвленных боковых корней.

Сравнивая соотношения длины боковых корней на главном и придаточных корнях у растений исходной расы Col-O и мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* в фазу бутонизации, можно заметить, что в составе их корневых систем наибольшая длина среди корней отмечается у растений линии *agb1-2*, а наименьшая – растений линии *gal-3*.

Количество боковых корней разных порядков ветвления, как главного, так и придаточных у растений исследуемых линий также сильно варьирует. Исследования показали, что растения мутантных линий *agb1-2* и *axr2-1* по сравнению с исходной расой Col-O имеют большее число боковых корней. Однако растения мутантных линий *tir1-1* и *gpa1-3* образуют меньшее количество боковых корней, чем в контроле (Col-O).

Следует подчеркнуть, что наибольшее количество боковых корней выявлено также у растений мутантной линии *agb1-2*, тогда как наименьшее – растений мутантной линии *gpa1-3*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании различий у мутантных линий *tir1-1*, *gpa1-3*, *agb1-2* и *axr2-1* по числу и длине корней в корневых системах. Это позволило разделить данные мутации по характеру влияния на степень разветвления корней на две группы: мутации, уменьшающие степень ветвления корней, и мутации, повышающие порядок ветвления корней.

В первую группу входят мутации, которые уменьшают степень ветвления корней. К ним относятся мутации *tir1-1* и *gpa1-3*. В таких случаях у растений под влиянием мутации образуется меньшее по сравнению с исходной расой Col-O число и длина боковых корней первого и последующих порядков ветвления, как главного, так и придаточных корней.

Мутации генов *TIR1* и *GPA1* приводят у растений к дефектам в рецепторе ауксина TIR1 и альфа-субъединице гетеротримерных ГТФ-связывающих белков GPA1, что влечет за собой подавление транскрипции компетентных генов, участвующих в процессе формирования из клеток перицикла боковых корней. В результате в корневой системе понижается образование боковых корней.

Ко второй группе относятся мутации, повышающие порядок ветвления корней. В этих случаях мутантные растения имеют увеличенное по отношению к экотипу Col-O количество и длину боковых корней разных порядков ветвления, как главного, так и придаточных корней. Такими мутациями являются *agb1-2* и *axr2-1*.

Мутации в генах *AGP1* и *AXR2* вызывают у растений нарушения в бета-субъединице гетеротримерных ГТФ-связывающих белков AGP1 и транскрипционном факторе AXR2, ответственном за подавление экспрессии чувствительных генов, контролирующих деление и образование из клеток перицикла зачатков боковых корней и их рост в длину. Это обуславливает в корневой системе повышение формирования боковых корней.

Представленные в работе результаты исследований с морфологии корневых системы у гормональных мутантов открывают возможность для практического использования хозяйственно ценного признака «ветвление корней» в селекции растений для создания сортов и гибридов с заданными свойствами минерального питания.

Наши данные свидетельствуют о том, что способность растений увеличивать степень ветвления корней зависит от отдельных генов. В связи с этим поиск растений-доноров с увеличенной степенью ветвления корней необходимо проводить среди гормональных мутантов с повышенным уровнем и чувствительностью к ауксинам.

В дальнейшем планируется изучение молекулярных механизмов действия цитокининов в образовании боковых корней, регуляции их ветвления, начиная с восприятия гормональных сигналов их рецепторами до изменений экспрессии гормон-контролируемых генов и возникновения ответов клеток растений на внешние или внутренние сигналы.

ВЫВОДЫ

1. У мутантных линий *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* корневые системы значительно отличаются от исходной расы Col-0 по количеству корней и их длине.
2. Мутации генов *TIR1*, *GPA1*, *AGP1* и *AXR2* по-разному действуют на количество и длину корней в корневой системе. Мутации *tir1-1* и *gal-3* обуславливают в корневой системе уменьшение степени ветвления корней, а мутации *agb1-2* и *axr2-1* вызывают повышение порядков ветвления корней.
3. По характеру влияния на степень разветвления корней в корневой системе мутации *tir1-1*, *gal-3*, *agb1-2* и *axr2-1* можно разделить на две группы: мутации, уменьшающие степень ветвления корней, и мутации, повышающие порядок ветвления корней. К первой группе относятся мутации *tir1-1* и *gal-3*. Во вторую группу входят мутации *agb1-2* и *axr2-1*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботаника. Анатомия и морфология растений : [учеб. пособ. для студ. биол. спец. пед. ин-тов] / А. Е. Васильев, Н. С. Воронин, А. Г. Еленовский, Т. И. Серебрякова. – М.: Просвещение, 1978. – 478 с.
2. Биология : биологический энциклопедический словарь / [гл. ред. М. С. Гиляров]. – М.: Большая российская энциклопедия, 1989. – 864 с.
3. Хржановский В. Г. Курс общей ботаники (цитология, гистология, органография, размножение) : [учеб. для сельхозвузов] / В. Г. Хржановский В. Г. – М.: Высш. шк., 1982. – 384 с.
4. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений : учеб. пособ. для студ. высш. учеб. завед. / [Н. Н. Третьяков, Е. И. Кошкин, Н. М. Макрушин и др.] ; под ред. Н. Н. Третьякова. – М. Колос, 1998. – 640 с.
5. Woodward A. W. Auxin: regulation, action, and interaction / A. W. Woodward, B. Bartel // *Ann. Botany*. – 2005. – V. 95, №2. – P. 707 – 735.
6. Шпаков А. О. Хемосигнальные системы растений / А. О. Шпаков // *Цитология*. – 2009. – Т.51, №9. – С. 721 – 733.
7. Gray W. M. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana* / W. M. Gray, J. C. del Pozo, L. Walker // *Genes Dev*. – 1999. – V. 13, №3. – P.1678 – 1691.
8. Ullah H. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination / H. Ullah, J. G. Chen, S. Wang // *Plant Physiol*. – 2002. – V. 129, №2. – P. 897–907.
9. Borner G. H. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A genomic analysis / G. H. Borner, D. J. Sherrier // *Plant Physiol*. – 2002. – V. 129, №2. – P. 486–499.
10. Leyser O. Auxin signalling: the beginning, the middle and the end / O. Leyser // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2001. – V. 4, №2. – P. 382–386.
11. Большой практикум по физиологии растений: учебн. пособ. для студентов биол. спец. вузов / [Б. А. Рубина, И. А. Чернавина, Н. Г. Потапов и др.]. – М.: Высш. школа, 1978. – 408 с.
12. Доспехов Б. А. Методика (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.