

УДК 575:581.144.2:581.133.8:582.683.2

## СТРОЕНИЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* У МУТАНТНОЙ ЛИНИИ *G PROTEIN ALPHA SUBUNIT1-3 (GPA1-3)*

Хаблак С. Г., Абдуллаева Я. А.

Луганский национальный аграрный университет, Луганск, serhab\_211981@rambler.ru

Изучены особенности строения корневой системы у растений мутантной линии *gpa1-3 Arabidopsis thaliana*. Установлено, что у растений линии *gpa1-3* формируется стержневая корневая система, у которой сильно развит главный корень, выделяющийся среди разветвленных боковых корней.

*Ключевые слова:* *Arabidopsis thaliana*, дикий тип, мутантная линия, корневая система.

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство систематиков отдел Покрытосеменные разделяют на два класса: Двудольные и Однодольные. Эволюция этих классов происходила разными путями и развела их столь далеко, что однодольные растения не скрещиваются с двудольными [1].

Одним из характерных различий данных классов является разный тип корневой системы. Для двудольных растений характерны обычно стержневые и смешанные корневые системы, а для однодольных – мочковатые корневые системы.

Выяснение принципов, лежащих в основе образования разных типов корневых систем у этих классов растений, является наиболее трудной и еще мало изученной проблемой генетики развития растений. В морфогенезе корневой системы, то есть в ее формообразовании, происходят процессы заложения, роста и развития клеток, тканей и органов, которые генетически запрограммированы и скоординированы между собой.

В 1990 году в университете Северной Каролины Чапел Хилл и Алан М. Джонс с использованием метода вакуумной инфльтрации растений экотипа Columbia в присутствии *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей вектор pROK2, получили у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (1842) мутацию *g protein alpha subunit 1-3 (gpa1-3)* по гену *G PROTEIN ALPHA SUBUNIT 1 (GPA1)* с нарушениями в развитии корневой системы, поддерживающую в NASC под номером N6533 [2]. Ген *GPA1* участвует в функционировании передачи фитогормональных сигналов в двухкомпонентных хемосигнальных системах растений и кодирует альфа-субъединицу гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (G-белки), состоящих их трех лабильных ассоциированных субъединиц: одной G $\alpha$ -, одной G $\beta$ - и двух G $\gamma$ -субъединиц [3].

Известно, что восприятие гормонов чувствительными клетками происходит благодаря специфическим рецепторам, расположенных либо на плазмалемме, либо в цитоплазме, либо на внутриклеточных мембранах. Поэтому различают два типа рецепторов: внутриклеточные растворимые белки-рецепторы, связывающие

фитогормоны и мигрирующие между цитоплазмой и ядром; мембранные белки-рецепторы, связывающие фитогормоны из внеклеточного пространства [4]. Гетеротримерные ГТФ-связывающие белки соединены с мембранными рецепторами GPCR (англ. G protein-coupled receptors), которые в своем строении имеют 7 трансмембранных доменов, в результате этого они получили название 7 ТМ-рецепторы (от Seven Transmembrane Receptor), семиспиральные рецепторы, или серпентины. Семиспиральные рецепторы, сопряженные с G белком, составляют большое семейство трансмембранных рецепторов. GPCR рецепторы выполняют функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигнала, приводящими в итоге к клеточному ответу [5].

Мутация *gpa1-3* вызывает у растений на клеточном уровне потерю функций альфа-субъединицы гетеротримерных ГТФ-связывающих белков, которые осуществляют передачу сигнала с активированного гормоном рецептора к эффекторным белкам, генераторам вторичных посредников, или к ионным каналам. В результате не проходит фитогормональный сигнал внутрь клеток к генам-мишеням, что приводит к снижению чувствительности клеток к ауксину, блокированию экспрессии генов, активируемых через зависимые от его сигнальные каскады, и нарушению запуска и регуляции физиологических, морфогенетических программ развития, контролируемых гормоном [6]. Все это является причиной появления у мутантных растений *gpa1-3* целого ряда нарушений, таких как ослабление деления клеток, ингибирование устичного открытия, снижение апикального доминирования, развитие круглых листьев, образование тупых стручков, формирование короткого гипокотилия, а также уменьшение количества боковых корней, что приводит собственно к снижению массы корневой системы [7].

В норме у растений *A. thaliana* дикого типа (WT – wild type) боковые корни формируются на некотором расстоянии от апикальной меристемы глубоко в тканях корня. Они закладываются в перицикле центрального цилиндра. Во время заложения бокового корня группа клеток перицикла делится радиально и тангенально. В итоге этих делений возникает бугорочек, который является зачатком будущего бокового корня. По мере роста, этот зачаток постепенно пробивается сквозь ткани корня и образует на поверхности боковой корень [8]. Однако мутация гена *GPA1* вызывает нарушения в индукции образования боковых корней в результате снижения чувствительности клеток к ауксину, который стимулирует образование боковых корней вследствие активизации деления клеток перицикла. Это ингибирует деление клеток перицикла, что приводит к подавлению заложения части корневых зачатков боковых корней в перицикле центрального цилиндра [9].

На данный момент описано 4 аллели гена *GPA1*, фенотипически похожих между собой (*gpa1-1*, *gpa1-2*, *gpa1-3*, *gpa1-4*). Тем не менее, роль гена *GPA1* в формировании строения корневой системы у *A. thaliana* остается до сих пор не исследованной, а это имеет важное значение для полного понимания функций этого гена. Поэтому целью настоящей работы было изучение морфологии корневой системы у растений мутантной линии *gpa1-3*, несущей в своем генотипе рецессивный аллель *gpa1-3*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (1842) экотипа (раса) Columbia (Col-O) и мутантной линии *g protein alpha subunit1-3* (*gpa1-3*), семена которых 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 [10]. Питательную смесь разливали в химические пробирки размером 14×120 мм и закрывали их плотными ватными пробками.

Семена к посеву готовили путем яровизации в течение 5 суток при температуре 4-6° С и последующего односуточного проращивания при комнатной температуре. Пробирки для предохранения от нагревания и попадания света на корни растений обертывали двумя слоями бумаги. После посадки пробирки накрывали полиэтиленовой пленкой. Снимали полиэтиленовую пленку при достижении семядольными листьями ее поверхности. Растения культивировали при температуре 18–20° С, освещенность круглосуточная в пределах 4000–7000 лк.

При проведении наблюдений, учетов руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно–морфологических исследований [11, 12]. При сравнении корневых систем по числу корней и по их длине объем выборки у дикого типа Col-O и мутантой линии *gpa1-3* составлял по 20 растений. Математическую обработку результатов исследований проводили по Б. А. Доспехову [11], Г. Ф. Лакину [13]. Изображения растений получали с помощью цифрового фотоаппарата Benq DC C1220.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Резушка Таля (*A. thaliana*) – небольшое растение из семейства Brassicaceae, которое в последнее время стало приоритетным объектом для генетических, молекулярно-биологических и других исследований [14]. Считалось, что для *A. thaliana* характерна стержневая корневая система [15]. Однако недавно было установлено, что у растений *A. thaliana* нормального или дикого типа образуется корневая система смешанного типа, объединяющая в себе систему главного корня и систему придаточных корней [16].

На рисунке 1.1 изображена корневая система растений расы Columbia Col-O, которая в увеличенном виде показана на рисунке 1.2. Стрелкой в корневой системе отмечены придаточные корни. Граница между гипокотилем и главным корнем (корневая шейка) часто бывает трудно отличимая, и лишь характер эпидермиса (с устьицами на гипокотиле и без устьиц на главном корне) служит целям маркировки придаточных корней и дает возможность четко отграничить придаточные корни от боковых корней главного корня. По всей видимости, эти затруднения в разграничении придаточных корней от остальных корней корневой системы и послужили причиной ошибочного представления о том, что у растений арабидопсиса формируется стержневая корневая система.

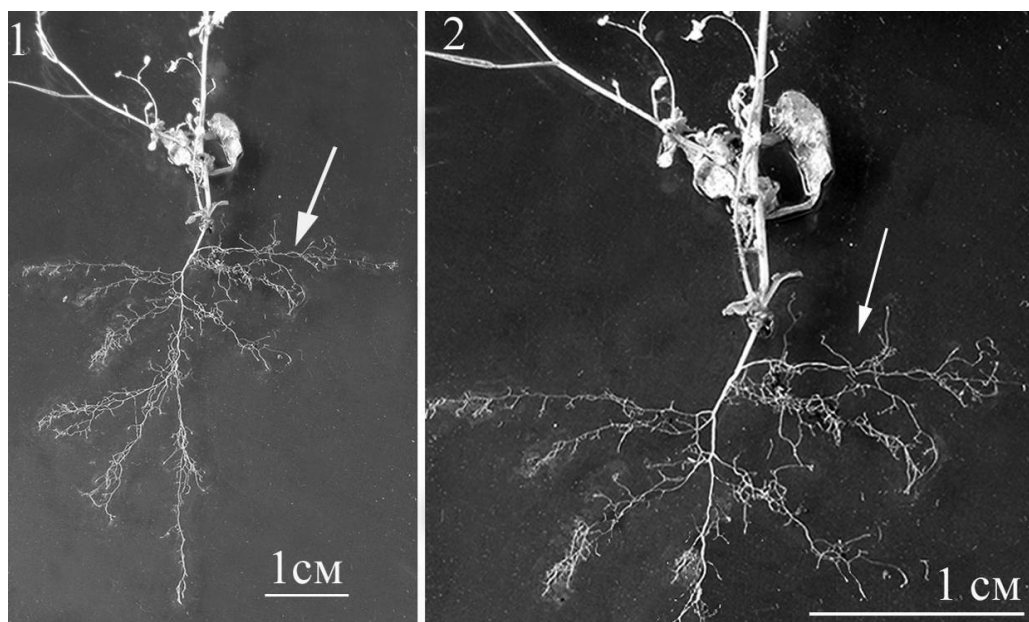


Рис. 1. Строение корневой системы у растений расы Columbia в фазу созревания семян

1 – общий вид корневой системы экотипа Col-O (стрелкой на рисунке отмечены придаточные корни); 2 – фрагмент корневой системы рис. 1.1 при увеличении.

Строение корневой системы у линии *gal-3* во многом совершенно иное, чем у экотипа Columbia, поскольку в отличие от дикого типа Col-O у растений мутантной линии *gal-3* на гипокотиле не развиваются придаточные корни (табл. 1). Это связано с особенностью мутации *gal-3*, а именно: вызывать дефекты в индукции заложения зачатков придаточных корней.

Как известно, у растений дикого типа *A. thaliana* придаточные корни имеют эндогенное (внутриродное) происхождение, то есть закладываются во внутренних тканях гипокотиле проростка из клеток перицикла непосредственно около проводящей ткани. Они возникают в зачатках, находящихся в состоянии покоя до стимулирования их роста [17]. Однако в результате мутации *gal-3* по гену *GPA1* во внутренних тканях стебля проростка не происходит заложение корневых зачатков придаточных корней, что в свою очередь ведет к отсутствию на подсемядольном колене придаточных корней. Это является причиной изменения у растений мутантной линии *gal-3* типа корневой системы.

При детальном рассмотрении морфологии корневой системы у растений линии *gal-3* в зависимости от происхождения мы различили главный и боковые корни. Придаточные корни, которые должны возникать на участке стебля, расположенного между семядольным узлом стебля и собственно главным корнем, выше корневой шейки, среди корней не были выявлены.

Таблица 1

Сравнение средних значений признаков корней корневых систем у экотипа Col-0 и мутантной линии *gpa1-3* в фазу бутонизация (на 30 день после прорастания семян)

Обозначение линии и название статистики	Наименование 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
<i>gpa1-3</i>	1	31,9	16,3	7,4	0	0	0	0	17,3
t-критерий Стьюдента	1,7	10,9***	9,6***	4,7**	5,8**	8,8***	6,1***	6,5**	14,9***

Примечание к таблице: ЧК – число корней, ДК – дина корней; достоверно при парном сравнении признаков с контролем (\*\* – отличия высоко значимы,  $0,001 < p < 0,01$ , \*\*\* – отличия максимально значимы,  $p < 0,001$ ).

Главный корень образуется из зародышевого корешка семени. Он является продолжением основного стебля, от которого отделяется корневая шейкой. От главного корня отходят боковые корни первого и последующих порядков. По сравнению с боковыми корнями главный корень более толстый и более глубоко проникает в субстрат.

Очевидно, что у растений мутантной линии *gpa1-3* корневая система стержневая. Обычно, корневую систему у растений относят к стержневой, если главный корень заметно превышает по длине и толщине боковые корни [1]. В нашем случае в корневой системе растений мутантной линии *gpa1-3* выделяется собственно главный корень, на котором формируются боковые корни первого порядка. Он характеризуется хорошим ростом и резко отличается от боковых корней по толщине и длине, которых образуется в 2 раза меньше, чем у дикого типа. На боковых корнях первого порядка развиваются боковые корни второго порядка. В силу этого образуются боковые разветвления, которые обладают неодинаковым характером ветвления, темпом роста корней в глубину и в горизонтальном направлении, а также имеют различное расположение на главном корне, что видно хорошо на рисунках 2.1–2.4.

На рисунке 2.1–2.4 изображены некоторые варианты корневой системы у растений мутантной линии *gpa1-3*, наблюдаемые нами в онтогенезе растений в фазу созревания семян. На рисунке 2.1 представлена корневая система, которая практически не имеет на главном корне боковых корней. На рисунке 2.2 показана сложная корневая система, у которой главный корень разветвлен только в верхней части. На рисунке 2.3 изображена сложная корневая система, которая отличается от корневой системы, представленной выше, тем, что главный корень разветвлен не в

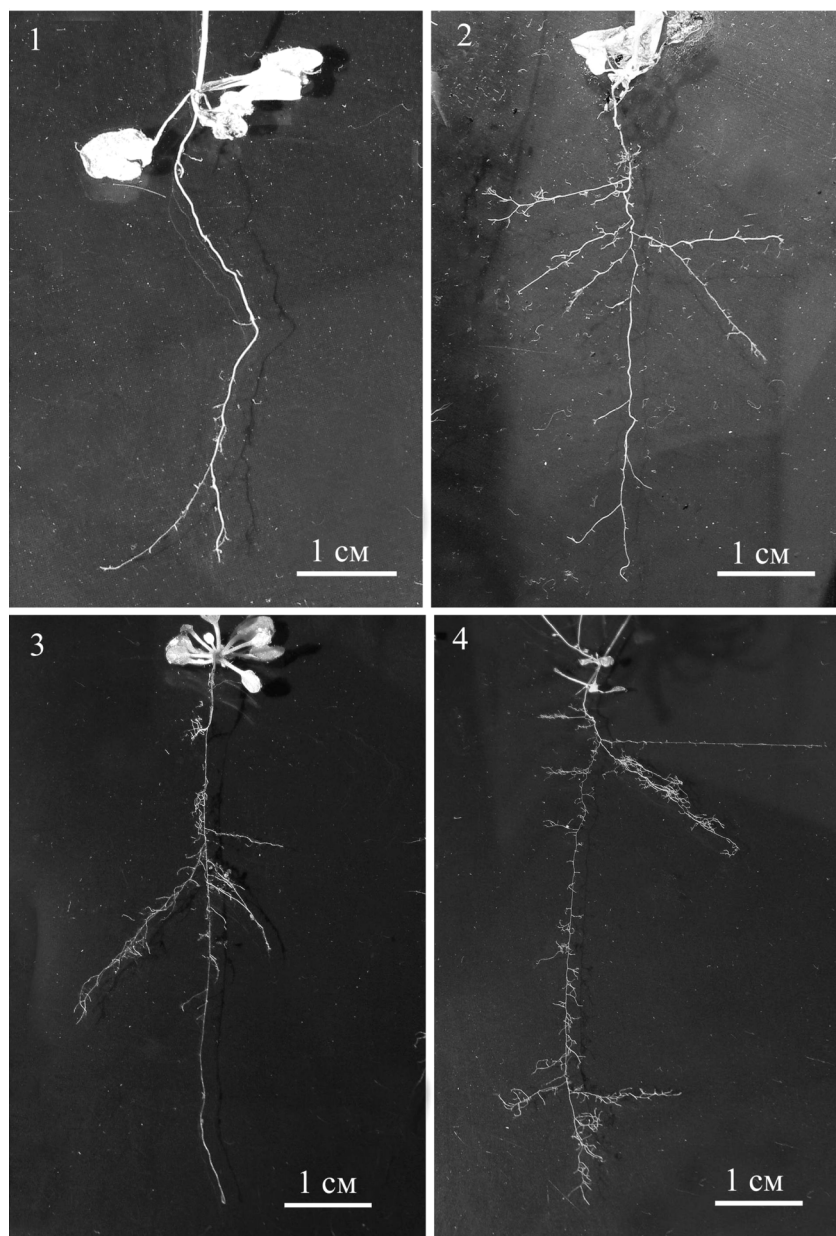


Рис. 2. Морфология корневой системы у растений мутантной линии *gra1-3* в фазу созревания семян

1 – корневая система с главным корнем, у которого практически отсутствуют боковые корни; 2 – сложная корневая система с главным корнем, разветвленным в верхней части; 3 – сложная корневая система с главным корнем, ветвящимся в средней части; 4 – сложная корневая система с главным корнем, разветвленным в верхней и нижней части.

верхней части, а только в средней части. Рисунок 2.4 иллюстрирует корневую систему с главным корнем, у которого боковые ответвления разветвляются не в верхней и средней части, как у вышеописанной корневой системы, а в верхней и нижней части. К изображенному на рисунке 2.4 моменту образуется сложная корневая система с двумя зонами ветвления – верхней и нижней. Эти две разветвленные зоны корней соединяются между собой главным корнем – осью первого порядка.

Таким образом, в рамках внешнего строения у растений мутантной линии *gpa1-3* формируется стержневая корневая система, имеющая ясно выраженный главный корень, который длиннее и толще боковых корней. Эта корневая система характерна для основной массы двудольных растений.

Изучение влияния рецессивного аллеля *gpa1-3* по гену *GPA1* на строение корневой системы позволило нам выявить основные особенности генетического контроля формирования у растений стержневой корневой системы. Наши данные свидетельствуют, что переход корневой системы от одного типа к другому в процессе онтогенеза генетически обусловлен и зависит от генов, регулирующих активность не только апикальной меристемы корня, но и функционирование клеток перицикла. При этом центральная роль в морфогенезе образования разных типов корневых систем у растений наряду с верхушечной меристемой корня принадлежит также перициклу центрального цилиндра, который является одним из главных координирующих центров, влияющих на морфогенетические процессы корневой системы.

## ВЫВОД

По результатам исследования строения корневой системы у растений *A. thaliana* мутантной линии *gpa1-3* установлено, что отсутствие на гипокотиле придаточных корней вследствие образования нарушений в иницировании зачатков их зачатков в перицикле центрального цилиндра является причиной изменения типа корневой системы. В результате чего мутантный ген *gpa1-3* ведет к образованию у растений стержневой корневой системы, которая представлена главным корнем с боковыми корнями первого и последующих порядков ветвления.

## Список литературы

1. Андреева И. И. Ботаника / И. И. Андреева, Л. С. Родман. – М.: Колос, 1999. – 488 с.
2. Ma H. Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein alpha subunit gene from *Arabidopsis thaliana* / H. Ma, M. F. Yanofsky, E. M. Meyerowitz // Proc Natl. Acad. Sci. U S A. – 1990 – Vol. 87, №10. – 10. – P. 3821–3825.
3. Weiss C. A. Immunolocalization of the G protein alpha subunit encoded by the *GPA1* gene in *Arabidopsis* / C. A. Weiss, H. Huang, H. Ma // Plant Cell. – 1993. – Vol. 5, №10. – P. 1513–1528.
4. Полевой В. В. Физиология растений : [учеб. для биол. спец. вузов] / В. В. Полевой. – М. : Высшая школа, 2006. – 464 с.
5. Pandey S. The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit *GPA1* and regulates abscisic acid signaling / S. Pandey, S. M. Assmann // Plant Cell. – 2004. – Vol. 16, №6. – P. 1616–1632.

6. Weiss C. A. The G protein alpha subunit (GP alpha1) is associated with the ER and the plasma membrane in meristematic cells of *Arabidopsis* and cauliflower / C. A. Weiss, E. White, H. Huang, H. Ma // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 407, №3. – P. 361–367.
7. Ullah H. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis* / H. Ullah, J. G. Chen, J. C. Young, K. H. Im, M. R. Sussman, A. M. Jones // Science. – 2001. – Vol. 292, № 1. – P. 2066–2069.
8. Malamy J. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* / J. Malamy, P. Benfey // Genes Dev. – 1997. – Vol. 124, №4. – P. 33–44.
9. Chen J. G. Differential roles of *Arabidopsis heterotrimeric* G-protein subunits in modulating cell division in roots / J. G. Chen, Y. Gao, A. M. Jones // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141, №3. – P. 887–897.
10. Большой практикум по физиологии растений: Учебн. пособие для студентов биол. спец. вузов / [Б. А. Рубина, И. А. Чернавина, Н. Г. Потапов и др.]. – М.: Высш. школа, 1978. – 408 с.
11. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
12. Ягодин Б. А. Агрохимия / Б. А. Ягодин, Ю. П. Жуков, В. И. Кобзаренко; под ред. Б. А. Ягодина. – М.: Колос, 2002. – 584 с.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
14. Иллюстрированный каталог генетической коллекции арабидопсиса Луганского НАУ / [И. Д. Соколов, П. В. Шелихов, Л. И. Сигидиненко и др.]. – Луганск: Изд-во ЛНАУ, 2004. – 36 с.
15. Кондратьева-Мельвил Е. А. Морфологическое и анатомическое строение *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) в онтогенезе / Е. А. Кондратьева-Мельвил, Л. Е. Водолазский // Бот. журнал. – 1982. – Т. 67, № 8. – С. 1060–1069.
16. Хаблак С. Г. Корневая система *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа расы Landsberg / С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаева // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – Вып. 2. – С. 92–98.
17. Beeckman T. The peri-cell-cycle in *Arabidopsis* / T. Beeckman, S. Burssens, D. Inzé // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, №11. – P. 403–411.

Хаблак С. Г., Абдуллаева Я. А. Будова кореневої системи *Arabidopsis thaliana* у мутантної лінії *g protein alpha subunit1-3 (gpa1-3)* // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2011. Вип. 5. С. 71–78.

Вивчено особливості будови кореневої системи у рослин мутантної лінії *gpa1-3 Arabidopsis thaliana*. Встановлено, що у рослин лінії *gpa1-3* формується стержнева коренева система, у якої сильно розвинений головний корінь, що виділяється серед розгалуженого бічного коріння.

*Ключові слова:* *Arabidopsis thaliana*, дикий тип, мутантна лінія, коренева система.

Hablak S. G., Abdullaeva J. A. Structure of root system of *Arabidopsis thaliana* at the mutant strain *g protein alpha subunit1-3 (gpa1-3)* // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2011. Iss. 5. P. 71–78.

The features of the structure of the root system of plants mutant lines *gpa1-3 Arabidopsis thaliana* was studied. It was established that plant lines *gpa1-3* are formed tap root system, which has a strongly developed of taproot which distinguish among the branched lateral roots.

*Key words:* *Arabidopsis thaliana*, wild type, mutant line, root system.

Поступила в редакцію 17.10.2011 г.