

**ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОГО АУКСИНА
В РАСТЕНИЯХ МУТАНТОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*
С ИЗМЕНЕНИЯМИ СТРУКТУРЫ ЦВЕТОНОСА И ЦВЕТКА**

У.Н. Ондар¹, Т.А. Ежова²

¹ - Тувинский государственный университет, Кызыл, Россия,

¹ - Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН), Москва, Россия

² - Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
iogen@vigg.ru, *arabidopsis2004@mail.ru*

Ауксин (индолил-3-уксусная кислота) – важнейший регулятор роста и развития растений. Этот фитогормон способен влиять на экспрессию генов через сложно организованную систему передачи ауксинового сигнала. Кроме того, ауксин влияет на уровень транскрипции генов, контролирующих биосинтез других гормонов. Эти данные свидетельствуют о важности детальных исследований содержания активного ауксина и его распределения в тканях растения. Такие исследования можно провести с использованием трансгенной линии *Arabidopsis thaliana*, которая содержит в геноме химерный ген *DR5::GUS*, то есть репортёрный ген *uidA*, кодирующий β -глюкуронидазу (*GUS*), под контролем синтетического промотора, содержащего несколько повторов искусственно синтезированного элемента, который чувствителен к ауксину и назван *DR5* [1]. По уровню экспрессии репортерного гена можно обнаружить участки с высоким содержанием активного ауксина в тканях растения. Кроме того, оценивая уровень экспрессии гена *GUS* с использованием простого гистохимического метода (по уровню интенсивности голубой окраски), можно качественно сравнивать содержание активного ауксина в разных тканях и у разных мутантных форм.

Целью данной работы было изучение распределения ауксина в растениях мутантных линий *A.thaliana* с использованием слитого гена *DR5::GUS*. Для анализа экспрессии гена *DR5::GUS* скрещивали линии, гомозиготные по этому гену с мутантами из коллекции кафедры МГУ: *abruptus* (линия К-150), *leafy - 107* (линия К-107), *leafy-109* (К-109), *apetala1-20* (К-200), *variifloris* (аллель гена *AP2-2*, линия К-217) и мутантами *apetala1-1*, *apetala2-1*, *agamous* и *apetala3-1* из мировых коллекций (семена получены из банка семян *A. thaliana* ABRC, <http://arabidopsis.org/>). В поколении F2 и F3 проводили отбор растений, гомозиготных по мутации и трансгену *DR5::GUS*. Все исследованные мутанты *A.thaliana* характеризуются морфологическими изменениями структуры цветка. Данные о взаимодействии гена *ABRUPTUS/PINOID* с геном *LEAFY* и генами А-класса (гены *APETALA1* и *APETALA2*), В-класса (гены *APETALA3* и *PISTILLATA*) и С-класса (ген *AGAMOUS*) освещались ранее [2-4].

Анализ растений дикого типа и исследованных мутантов, имеющих в составе геномов слитый ген *DR5::GUS*, показал, что в молодых проростках (1-2-х недельных) дикого типа и исследованных мутантах (с аномалиями) ген экспрессируется на верхушках и вдоль сосудистых элементов семядольных листьев и корней. Существенных аномалий в распределении ауксина у мутантов на этой стадии развития отмечено не было. Некоторое снижение содержания ауксина наблюдали только в проростках мутанта *abr*, которые имели выраженные аномалии развития на этой стадии (около 50 % проростков характеризуются нарушением филлотаксиса и имеют не 2, а 1 или 3 семядоли).

На стадии 3-4-х недельных розеток точечные сайты накопления ауксина во всех исследованных линиях наблюдали в кончиках зубчатых выростов листа, где располагаются гидатоды (приспособления для выделения воды из листа) [5]. У дикого типа изредка места накопления ауксина иногда были заметны по контуру листовых пластинок, в основании трихом и центральных жилках (уровень экспрессии *DR5::GUS* был низким). В то же время у всех мутантов наблюдались некоторые отличия в пространственных особенностях

распределения ауксина и его содержания. В листьях всех мутантов на этой стадии развития содержание ауксина было значительно выше, чем у дикого типа (уровень экспрессии *DR5::GUS* был высоким). Особенно значительное усиление экспрессии *DR5::GUS* наблюдали у мутантов *lfy-109*, *ap1-20* и *ag*. У мутантов *ap2-1* и *ap1-1* ауксин распределен по контурам вегетативных листьев, но область его высокой концентрации была значительно шире, чем у растений дикого типа. У всех остальных мутантов ауксин был распределен равномерно по всей площади листа. Отмечено интенсивное накопление ауксина в прилистниках *lfy-107* и *lfy-109*.

На репродуктивной стадии развития в растениях дикого типа экспрессию *DR5::GUS* наблюдали в апикальной части цветоноса - в немолодых и раскрывающихся бутонах (в пыльниках). По мере распускания и созревания цветков реакция ослабевала (в цветоложе и стручках). Особо выраженные различия в распределении ауксина по цветоносу наблюдали у мутанта *abr*, который имеет точковую температурочувствительную мутацию в гене *ABR/PID*, контролирующем выход ауксина из клеток надземной части растения [4]. При выращивании при температуре 22-25°C у мутанта наблюдается нарушение в развитии цветков: вместо 25-30 цветков цветонос формирует 2-8 цветков и терминируется булаваковидной структурой. На ранней стадии у таких растений мутанта *abr* ауксин локализовался в локальных участках заложения флоральных меристем (по спирали) на стебле, а также в зачатках цветоножек. В булаваковидных участках цветка экспрессия *DR5::GUS* не отмечалась. Существенно более высокий (по сравнению с диким типом) уровень экспрессии слитого гена наблюдали в пыльниках раскрывающихся бутонов, в цветоложе созревших цветков и стручках.

В отличие от дикого типа у мутанта *ap3* наблюдали накопление ауксина в нектарниках. В цветках *abr*, *lfy-107* и *ag* накопление ауксина заметно в чашелистиках (в виде диффузно распределенных локальных участков). В цветках *lfy-109* экспрессию *DR5::GUS* наблюдали в листовых долистиках и брактях, а у мутанта *vaf* – в химерных органах наружной мутовки цветка (в тычинкоплодолистиках).

Полученные результаты подтверждают роль гена *ABR/PID* в контроле транспорта ауксина и свидетельствуют о важности его функции не только для развития цветоноса и цветка, но и для развития листа. Ранее нарушение транспорта ауксина в цветоносе мутантов *abr*, *pin1*, *ap1-1* и *lfy* было показано с использованием прямого измерения выхода ауксина из отрезков стебля [2, 6]. В нашей работе показано, что нарушение распределения ауксина наблюдается также в листьях и цветках. Причины такого феномена пока не ясны. На основании ранее проведенных исследований по изучению взаимодействия гена *ABR/PID* с геном *LFY* и гомеозисными генами ABC-классов (*API*, *AP2*, *AP3*, *PI* и *AG*) было установлено, что гены комплементарно взаимодействуют в процессе развития цветоноса и цветка. Можно предполагать, что изменение распределения ауксина в мутантах по гену *LFY* и генам ABC-классов связано с их влиянием на ауксиновый транспорт, которое опосредовано взаимодействием с геном *ABR/PID*. Для изучения этого предположения в настоящее время созданы двойные мутанты (имеют мутацию *abr* и мутации в других генах, контролирующих развитие) и, одновременно, содержат слитый ген *DR5::GUS*. Их дальнейшее изучение позволит выяснить роль генных взаимодействий в регуляции транспорта ауксина и контроле морфогенеза растений *A. thaliana*.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 07-04-01515-а, ФЦП НШ 4202.2008.4, программой РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека».

1. T. Ulmasov, J. Murfett, G. Hagen, T.J. Guilfoyle. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // Plant Cell. 1997. V. 9. 1963-1971.
2. Т.А. Ежова, О.П. Солдатова, А.Ю. Калинина, С.С. Медведев. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *LEAFY* в процессе флорального морфогенеза у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Генетика. 2000. Т. 36. № 12. С. 1682-1687.

3. А.Ю. Калинина, Т.А. Ежова, Н.В. Голубева. Полярный транспорт ауксина у мутанта *abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Вестник СбГУ. 2000. Сер. 3. Вып. 1. № 3. С. 44-51.
4. О.В. Лебедева, У.Н. Ондар, А.А. Пенин, Т.А. Ежова. Влияние гена *ABRUPTUS/PINOID Arabidopsis thaliana* на экспрессию гена *LEAFY*// Генетика. 2005. Т. 41. № 4. С. 1-7.
5. R. Aloni. The induction of vascular tissue by auxin. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action / Ed. Davies P.J. Dordrecht et al.: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 471-492.
6. M. Oka, J. Ueda, K. Miyamoto, K. Okada. Activities of auxin polar transport in inflorescence axes of flower mutants of *Arabidopsis thaliana*: relevance to flower formation and growth // J. of Plant Research. 1998. V. 111. № 3. P. 407-410.

РАСШИРЕНИЕ И ОБОГАЩЕНИЕ ГЕНОФОНДА ЗЛАКОВ МЕТОДОМ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

L.Koren@igc.bas-net.by

Стратегия селекции растений на современном уровне развития направлена на повышение устойчивости (толерантности) сортов к абиотическим и биотическим стрессам при поддержании высокого уровня урожайности и качества продукции. Для решения этой задачи большое значение имеет создание разнообразного генофонда, адаптированного к условиям выращивания, что требует поиска новых методов и подходов. С этой целью в скрещивания с культурными сортами все чаще привлекаются дикорастущие сородичи, которые несут гены, детерминирующие такие хозяйственно ценные признаки, как устойчивость к грибным болезням, вредителям, засолению почвы, высокое качество зерна [1, 2]. В частности, для улучшения злаков используются разные виды рода *Aegilops*, введение генетического материала которых способствует повышению устойчивости к биотическим и абиотическим факторам, содержания белка, устойчивости к прорастанию на корню и др. [3]. В наших исследованиях с использованием метода отдаленной гибридизации создан ряд форм озимого тритикале с интрогрессией генетического материала диплоидных видов *Aegilops* (*Ae. umbellulata*, *Ae. sharonensis*, *Ae. mutica*). Проведенные испытания показали высокую устойчивость данных форм к повышенной кислотности почвы и высокое содержание белка в зерне (до 17,7 %) [4].

Метод отдаленной гибридизации также использован нами для улучшения мягкой пшеницы: были получены гибриды между сортами мягкой пшеницы *T. aestivum* (Фестивальная, Белорусская 80, Саратовская 29, Ростань, Чайниз Спринг, Рассвет, Тома, Дарья) и дикорастущими видами пшеницы *T. persicum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccoides K5199*, *T. spelta K1731*, *T. monococum*, *T. polonicum*, *T. Turgidum*, *T. Kiharae*. Хотя у части гибридных зерновок эндосперм практически отсутствовал, использование биотехнологических методов *in vitro* позволило сохранить полученный гибридный материал почти во всех комбинациях скрещивания. Цитологический анализ гибридов F₁ от скрещивания дикорастущих видов рода *Triticum* с сортами мягкой пшеницы выявил значительные нарушения в прохождении стадий мейоза, что позволяет предположить наличие чужеродного генетического материала в геноме мягкой пшеницы. Данные морфологического анализа подтверждают это предположение. Для растений комбинаций скрещивания *Triticum dicoccum K45926* × Фестивальная и *Triticum dicoccoides* × Фестивальная отмечена коричневая окраска колосковой чешуи, которая свидетельствует о передаче данного признака от тетраплоидных пшениц *Triticum dicoccum K45926* и *Triticum dicoccoides*, имеющих коричневую окраску колоса. Поскольку гены, контролирующие окраску колосковых чешуй, принадлежат к числу наиболее известных маркеров хромосом первой гомеологической группы пшеницы, можно говорить о присутствии чужеродного