

УДК 575:581.144.2:581.133.8:582.683.2

С. Г. ХАБЛАК, к.б.н., доцент,

Я. А. АБДУЛЛАЕВА, магистр

Луганский национальный аграрный университет, кафедра почвоведения
и агрохимии,

Луганск, 91008, Украина, тел.: +38 (066) 44-266-08,

e-mail: serhab_211981@rambler.ru

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И РАЗВИТИЯ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ У РАСТЕНИЙ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ *ahk2-5* И *ahk3-7* *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

Изучено строение корневых систем у растений мутантных линии *ahk2-5* и *ahk3-7* *Arabidopsis thaliana*. Установлено, что мутации *ahk2-5* и *ahk3-7* генов *АНК2* и *АНК3* вызывают в корневой системе увеличение числа и длины боковых корней разных порядков ветвления.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, корневая система, мутантная линия, ветвление корней.

Цитокинины представляют собой важный класс растительных гормонов, которые были открыты в лаборатории Ф. Скуга (США) более полвека назад, благодаря своей способности индуцировать клеточное деление в культуре растительных клеток *in vitro* [14]. Этим гормонам принадлежит важная роль в регуляции жизни растения на всех этапах онтогенеза от оплодотворения яйцеклетки до старения и смерти. Они участвуют в стимуляции деления клеток, дифференцировке хлоропластов, индуцируют стеблевой морфогенез, задерживают старение листьев, контролируют транспорт метаболитов в растении, регулируют функциональную активность наземных органов, а также принимают участие в образовании боковых корней в корневой системе (КС) [6].

На протяжении многих десятилетий после открытия цитокининов оставалось неясным, влияют ли они напрямую на активность генов и если да, то каков механизм передачи цитокининового сигнала. Однако только сейчас, в XXI веке, начали открывать основные закономерности молекулярного действия цитокининов в регуляции разнообразных процессов развития растений [10, 15, 16].

© С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаева

За последние несколько лет в области изучения механизма действия цитокининов в контроле генетических и физиологических процессов растительной клетки достигнут значительный прогресс. У *Arabidopsis thaliana* (арабидопсиса) найдены гены, контролирующие ключевой фермент биосинтеза цитокининов – изопентенилтрансферазу (*AtIPT1-AtIPT9*), открыты мембранные рецепторы (АНК2, АНК3, АНК4/CRE1), идентифицированы гены первичного ответа на гормон (*ARR*-гены группы А) и выделены белковые факторы транскрипции, участвующие в регуляции экспрессии генов вторичного ответа (*ARR*-генов группы В) [12]. Однако многие аспекты молекулярного механизма действия цитокининов на физиологические процессы растений еще мало изучены и продолжают активно исследоваться. В частности, это относится к гормональной регуляции цитокининами ветвления корней.

К настоящему времени у *A. thaliana* получены мутанты с подавленным действием цитокининов, которые имеют разнообразные нарушения в процессах развития растений, в том числе дефекты в образовании боковых корней [13, 16]. Это позволило идентифицировать гены инактивации и сигнализации фитогормонов данного класса: *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2* (*АНК2*) [15] и *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3* (*АНК3*) [17].

Гены *АНК2* и *АНК3* кодируют сенсорные гистидинкиназы АНК2 и АНК3, которые являются мембранными рецепторами цитокининов [16]. Мутации в генах *АНК2* и *АНК3* обуславливают у растений инактивирование функций мембранных рецепторов гистидинкиназ АНК2 и АНК3. В результате чего у мутантных растений арабидопсиса снижается чувствительность клеток к цитокининам и гены первичного ответа перестают отзываться на эти гормоны [13].

Вместе с тем, роль генов *АНК2* и *АНК3* в регуляции ветвления корней у *A. thaliana* остается до сих пор не исследованной. Поэтому целью настоящей работы было изучение строения КС у мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7*, несущих мутации в генах *АНК2* и *АНК3*.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа (расы) Columbia (Col-0) и мутантных линий этой расы *arabidopsis histidine kinase2-5* (*ahk2-5*) и *arabidopsis histidine kinase3-7* (*ahk3-7*). Мутации *ahk2-5* и *ahk3-7* получены в 2001 году группой ученых под руководством Т. Мицуно с использованием метода

инсерционного мутагенеза [16]. Путем размножения при самоопылении растений *A. thaliana*, несущих мутации *ahk2-5* и *ahk3-7* по генам *AHK2* и *AHK3*, были созданы мутантные линии, которые поддерживаются в настоящее время в международных генетических центрах коллекций арабидопсиса: NASC, ABRC, SASSC.

Семена мутантных линий присланы нам из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), UK). Растения выращивали в асептической пробирочной культуре на агаризованной питательной среде Кнопа, обогащенной микроэлементами [1]. Питательную смесь разливали в химические пробирки размером 14x120 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 за растениями расы Col-0 и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно-морфологических исследований [3, 8]. Фазы развития и роста растений различали по внешним признакам. Во время фенологических наблюдений отмечали начало фазы (когда в нее вступит 10–15% растений) и полную фазу (70–75% растений) [8].

Продолжительность культивирования растений экотипа Col-0 и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в вегетационном опыте в среднем составляла около 101 дня. Сроки наступления фенофаз со дня посева семян у расы Col-0 и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* следующие: вторая пара настоящих листьев – 17, бутонизация — 37, цветение — 43, плодоношение — 52, созревание семян — 64 дня.

Учет количества корней и их длины в КС у растений экотипа Col-0 и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* проводили в фазах второй пары настоящих листьев, бутонизации и цветения. Длину корней измеряли с помощью электронного штангенциркуля типа ШЦЦ-1 («ЭТАЛОН», Россия). Разграничение придаточных и боковых корней проводили по характеру эпидермиса (с устьицами на гипокотиле и без устьиц на главном корне), для чего и использовали микроскоп типа МБС-9 («Модуль Плюс», Украина). При сравнении КС по числу корней и по их длине объем выборки у экотипа Col-0, мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-*

7 составлял — 20 растений, повторность трехкратная. Математическую обработку результатов исследований проводили по Б. А. Доспехову [3] и Г. Ф. Лакину [7]. Изображения растений получали с помощью цифрового фотоаппарата Benq DC C1220 (фирма производитель «Benq G», Корея).

Результаты исследований и их обсуждение

Arabidopsis thaliana (L.) Heunh. — растение из семейства крестоцветных, которое является модельным объектом для изучения генетики развития растений [4]. Е. А. Кондратьевой-Мельвиль и Л. Е. Водолазским утверждалось, что для *A. thaliana* характерна стержневая корневая система [5]. Однако, недавно было установлено, что у растений *A. thaliana* нормального или дикого типа образуется КС смешанного типа, объединяющая в себе систему главного корня и систему придаточных корней [11].

На рисунке 1а показана КС растений расы Col-O, фрагмент которой в увеличенном виде изображен на рис. 1б.

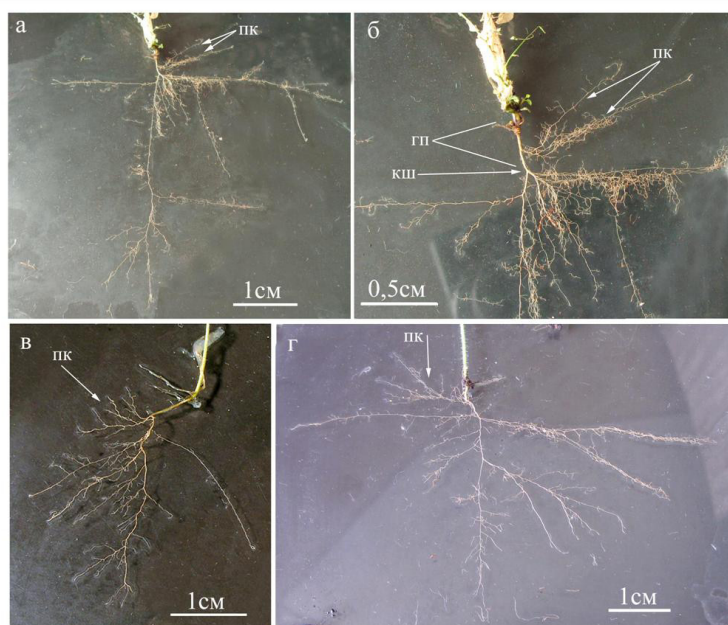


Рис. 1. Корневая система у растений экотипа Columbia и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в фазу цветения (на 43 день после посева семян): а — исходная раса Col-O; б — фрагмент КС рис. а; в — мутантная линия *ahk2-5*; г — мутантная линия *ahk3-7*; гп — гипокотиль; кш — корневая шейка; пак — придаточные корни

У нее выделяется главный корень, на котором по мере роста развиваются боковые корни разных порядков ветвления. Главный корень с боковыми корнями образует систему главного корня. На гипокотиле развиваются придаточные корни. Придаточные корни тоже разветвляются и образуют боковые корни. В ходе ветвления из корней, берущих начало от стебля, формируется система придаточных корней.

Граница между гипокотилем и главным корнем (корневая шейка) часто бывает трудно отличимая, и лишь микроскопическое исследование характера эпидермиса (с устьицами на гипокотиле и без устьиц на главном корне) дает возможность четко отграничить придаточные корни от боковых корней главного корня. По всей видимости, затруднения в разграничении придаточных корней от остальных корней КС и послужили причиной ошибочного представления о том, что у растений *A. thaliana* формируется стержневая КС.

Интересно отметить, что тип КС у растений мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* такой же, как и у дикого типа Col-O. В рамках внешнего строения корни у растений этих линий в совокупности представляют собой смешанную корневую систему.

У мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* КС резко отличаются от исходной расы Col-O по числу боковых корней разных порядков ветвления, как главного, так и придаточных корней (табл. 1).

Об этом можно судить по общему числу боковых корней 1-го–3-го порядков ветвления в фазу бутонизации, поскольку в период образования розеточных листьев рецессивные аллели *ahk2-5* и *ahk3-7* не влияют на количество и длину боковых корней в КС [16]. Это послужило причиной ошибочного представления М. Riefler et al. [16] о том, что мутации генов *АНК2* и *АНК3* не оказывают влияния на формирование боковых корней и их рост в длину в КС у *A. thaliana*. Кроме того, у растений линий *ahk2-5* и *ahk3-7* одновременно с увеличением числа боковых корней первого и последующих порядков ветвления главного и придаточных корней, происходит также увеличение их длины.

Таблица 1

Средние значения биометрических параметров (длины и количества) корней у экотипа Col-O и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в фазу бутонизации (на 37 день после посева семян)

Тип корня	Обозначение экотипа и мутантной линии						НСР _{0,95} *, шт/ мм
	Col-O		<i>ahk2-5</i>		<i>ahk3-7</i>		
	число корней, шт	длина корней, мм	число корней, шт	длина корней, мм	число корней, шт	длина корней, мм	
Главный	1,0	39,1	1,0	47,0	1,0	50,9	$\frac{-}{2,44}$
Боковые главного (всего)	29,6	12,5	45,0	22,4	51,5	28,4	$\frac{3,70}{2,30}$
1-го порядка ветвления	10,1	8,6	15,2	12,6	16,4	16,7	$\frac{1,18}{1,84}$
2-го порядка ветвления	19,5	3,9	25,1	7,0	29,7	8,2	$\frac{3,04}{0,86}$
3-го порядка ветвления	0	0	4,7	2,8	5,4	3,5	$\frac{0,62}{0,50}$
Придаточные	1,1	7,5	2,4	10,1	3,0	11,7	$\frac{0,48}{1,36}$
Боковые прида- точных (всего)	10,3	6,6	19,6	13,9	25,9	18,6	$\frac{2,34}{2,40}$
1-го порядка ветвления	6,5	4,2	10,5	6,8	12,0	8,0	$\frac{0,98}{0,94}$
2-го порядка ветвления	3,8	2,4	6,4	4,7	10,4	5,9	$\frac{1,54}{0,96}$
3-го порядка ветвления	0	0	2,7	2,4	3,5	4,7	$\frac{0,45}{0,57}$
Всего по корневой системе	42,0	65,7	68,0	93,4	81,4	109,6	$\frac{4,77}{4,28}$

Примечание: * — в числителе для числа корней, в знаменателе для длины корней.

Сравнивая соотношения количества корней КС и их длину у экотипа Col-O и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в фазу бутонизации можно заметить, что в составе их КС наибольшая длина среди корней наблюдается у главного корня, а максимальное количество корней отмечается у боковых корней 2-го порядка ветвления главного корня. Вместе с тем, в составе боковых разветвлений КС наибольшую длину среди корней формируют боковые корни 1-го порядка ветвления главного корня, тогда как максимальное количество корней образуют боковые корни 2-го порядка ветвления главного корня.

Следует отметить, что мутантные линии *ahk2-5* и *ahk3-7* по характеристике средних значений признаков корней КС существенно отличаются между собой.

Обращает на себя внимание в сравнении с экотипом Col-O появление у мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в фазу цветения на главном и придаточных корнях боковых корней 3-го порядка ветвления. У экотипа Col-O в данную фазу развития боковые корни 3-го порядка ветвления отсутствуют соответственно на главном и придаточных корнях. В эту фазу развития растения расы Col-O обычно еще не способны к формированию боковых корней 3-го порядка ветвления, как на главном, так и на придаточных корнях.

Для сравнения на рис. 1в, г изображены КС мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* в фазу цветения. В процессе развития растений строение КС у мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* может быть различным, в зависимости от степени разветвленности главной оси и расположения на главном корне ветвящихся осей.

В соответствии с расположением на главном корне ветвящихся осей КС у мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* бывают: разветвленными в отдельности в верхней, средней и нижней частях; разветвленными совместно в верхней и нижней, в верхней и средней частях; разветвленными вдоль всей оси. На рис. 1в представлена КС мутантной линии *ahk2-5*, которая имеет главный корень, ветвящийся по всей оси. При этом разветвленность боковых корней уменьшается по направлению к кончику главного корня, придавая корневой системе пирамидальную форму. На рис. 1г изображена КС мутантной линии *ahk3-7*, из рисунка видно, что рассматриваемая КС отличается от КС, представленной выше, тем, что главный корень разветвлен не вдоль всей оси, а только в верхней и средней части.

Таким образом, мутации *ahk2-5* и *ahk3-7* генов *АНК2* и *АНК3* вызывают в КС увеличение степени ветвления боковых корней. В результате у растений изучаемых мутантных линий под влиянием мутаций *ahk2-5* и *ahk3-7* образуется большее по отношению к дикому типу количество боковых корней разных порядков ветвления, как на главном, так и на придаточных корнях, а также увеличивается их длина.

До настоящего времени считалось, что цитокинины необходимы как для инициации боковых корней, так и для стимуляции их дальнейшего роста. Совместно с ауксином они индуцируют деление клеток перицикла в примордии боковых корней [2]. Тем не менее, роль цитокининов в процессе формирования боковых корней до конца еще не выяснена. В частности, недавно было высказано предположение о том, что цитокинины влияют на развитие уже сформировавшихся примордиев в боковые корни, но не влияют на заложение новых примордиев [9]. Однако проведенные исследования свидетельствуют в пользу того, что цитокинины, как ингибируют образования боковых корней, так и тормозят их дальнейший рост.

Полученные результаты согласуются с данными исследований Г. А. Романова [10], проводившего функциональный анализ генов *A. thaliana* первичного и вторичного ответа на цитокинины, которые показали, что хотя фитогормоны этого класса принято относить к гормонам-стимуляторам, вызываемая ими активация отдельных значимых метаболических путей клетки вовсе не коррелирует напрямую со степенью активации транскрипции генома в целом. Если среди генов раннего ответа на гормон превалируют гены, активируемые цитокининами, то среди генов позднего ответа на гормон большинство составляют гены, наоборот, репресслируемые цитокининами [10]. Возможно предположить, что активация неких доминирующих метаболических процессов в растении, например, индуцирование клеточного деления, стимулирование формирования почек, рост побегов, требует подавления многих других, в том числе угнетение роста корней.

Выводы

В целом, результаты исследований строения КС у растений расы Col-0 и мутантных линий *ahk2-5* и *ahk3-7* показали, что данные мутации в генах *АНК2* и *АНК3* обуславливают увеличение порядков ветвления боковых корней. Причем, влияние мутантных аллелей *ahk2-5* и *ahk3-7* на уровне КС проявляется в двух направлениях: в увеличении числа и длины боковых корней разных порядков ветвления, как главного, так и придаточных корней.

Список использованной литературы

1. *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.
2. *Высоцкая Л. Б.* Роль ауксинов и цитокининов в формировании боковых корней у растений пшеницы с частично удаленными первичными корнями / Л. Б. Высоцкая, А. В. Черкозьянова, С. Ю. Веселов, Г. Р. Кудоярова // *Физиология растений*. — 2007. — Т. 54, № 2. — С. 455–460.
3. *Доспехов Б. А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
4. *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.
5. *Кондратьева-Мельвиль Е. А.* Морфологическое и анатомическое строение *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) в онтогенезе / Е. А. Кондратьева-Мельвиль., Л. Е. Водолазский // *Бот. журнал*. — 1982. — Т. 67, № 8. — С. 1060–1069.
6. *Кулаева О. Н.* Цитокинины, их структура и функции / О. Н. Кулаева — М.: Наука, 1973. — 264 с.
7. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
8. *Мойсейченко В. Ф.* Основи наукових досліджень в агрономії / В. Ф. Мойсейченко, В. О. Єщенко. — К. : Вища шк., 1994. — 334 с.
9. *Площинская М. Е.* Анализ возможных механизмов регуляции ветвления корня / М. Е. Площинская, В. Б. Иванов, С. А. Салмин, Е. И. Быстрова // *Журн. общей биологии*. — 2002. — Т. 63., № 4. — С. 68–74.
10. *Романов Г. А.* Как цитокинины действуют на клетку / Г. А. Романов // *Физиология растений*. — 2009. — Т. 56, № 2. — С. 295–319.
11. *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 (21). — С. 92–98.

12. Шепеляковская А. О. Иммунохимический анализ цитокинин-связывающего белка из проростков кукурузы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Анна Олеговна Шепеляковская. — М., 2003. — 98 с.
13. Higuchi M. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family / M. Higuchi, M. S. Pischke, A. P. Mahonen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101, № 2. — P. 8821–8826.
14. Miller C. O. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid / C. O. Miller, F. Skoog, N. M. Von Saltza [et al.] // J. Am. Chem. Soc. — 1955. — Vol. 77, № 2 — P. 1329–1334.
15. Nishimura C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis* / C. Nishimura, Y. Ohashi, S. Sato [et al.] // Plant Cell. — 2004. — Vol. 16, № 6. — P. 1365–1377.
16. Riefler M. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism / M. Riefler, O. Novak, M. Strnad [et al.] // Plant Cell. — 2006. — Vol. 18, № 1. — P. 40–54.
17. Tran L. S. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis* / L. S. Tran, T. Urao, F. Qin [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2007. — Vol. 104, № 51. — P. 20623–20628.

Статья поступила в редакцию 24.01.2012

С. Г. Хаблак, Я. А. Абдуллаєва

Луганський національний аграрний університет,
кафедра ґрунтознавства та агрохімії, Луганськ, 91008, Україна,
тел.: +38 (066) 44-266-08, e-mail: serhab_211981@rambler.ru

**ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ТА РОЗВИТКУ КОРЕНЕВИХ СИСТЕМ
У РОСЛИН МУТАНТНИХ ЛІНІЙ *ahk2-5* І *ahk3-7* *ARABIDOPSIS*
THALIANA (L.) HEYNH.**

Резюме

Вивчено будову кореневих систем у рослин мутантних ліній *ahk2-5* і *ahk3-7 Arabidopsis thaliana*. Встановлено, що мутації *ahk2-5* і *ahk3-7* генів *AHK2* і *AHK3* викликають в кореневій системі збільшення числа та довжини бічного коріння різних порядків розгалуження.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, коренева система, мутантна лінія, розгалуження коріння.

S. G. Hablak, J. A. Abdullaeva

Lugansk National Agrarian University,
Department of Soil Science and Agricultural Chemistry, Lugansk, 91008,
Ukraine, tel.: +38 (066) 44-266-08, e-mail: serhab_211981@rambler.ru

**STRUCTURE FEATURES AND ROOT SYSTEMS DEVELOPMENT
OF IN PLANTS MUTANT LINES *ahk2-5* and *ahk3-7* *ARABIDOPSIS*
THALIANA (L.) HEYNH.**

Summary

The structure of root systems in plants of mutant line *ahk2-5* and *ahk3-7 Arabidopsis thaliana* have been examined. There were found that mutations *ahk2-5* and *ahk3-7* genes *AHK2* and *AHK3* in the root system caused increasing of number and length of lateral roots of different branching orders.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, root system, mutant line, branching roots.