

УДК 575.164

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА В РАСТЕНИЯХ ДИКОГО ТИПА И МУТАНТА *ABRUPTUS ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА *DR5::GUS*

У.Н. Кавай-оол¹, Т.А. Ежова

(кафедра генетики; e-mail: dr.urana@mail.ru)

В растениях *Arabidopsis thaliana* исследовали активность слитого гена *DR5::GUS*, позволяющего выявлять участки локализации активного ауксина и качественно оценивать его уровень в тканях растения. Установлено, что температурочувствительная мутация *abruptus* приводит к температурозависимому накоплению свободного ауксина в листьях, а также увеличению уровня ауксина в тычинках и чашелистиках по сравнению с контрольными растениями, гомозиготными по аллелю гена *ABRUPTUS/PINOID* дикого типа. Полученные данные подтверждают важную роль гена *ABRUPTUS/PINOID* в регуляции полярного транспорта ауксина.

Ключевые слова: развитие растений, ауксин, мутанты, трансгенные растения, *Arabidopsis thaliana*.

Ауксин является важнейшим регулятором морфогенеза растений. Благодаря работе систем полярного транспорта ауксина (ПТА) в тканях растения создаются локальные участки высокой концентрации этого гормона, что приводит к изменению экспрессии в этих участках десятков генов-мишеней. Исследования на модельном растении *Arabidopsis thaliana* позволили идентифицировать гены, контролируемые ПТА. Установлено, что одним из ключевых регуляторов ПТА в тканях побега является ген *ABRUPTUS/PINOID* (*ABR/PID*), кодирующий серин-треониновую протеинкиназу, активность которой важна для правильной локализации белка PIN1, выносящего ауксин из клеток. У мутантов *pid* белок PIN1 утрачивает свойственное для него положение на апикальных частях клеток [1], что обуславливает фенотипическое сходство мутантов *pid* и *pin* [2, 3]. Мутанты *pid* и *pin* характеризуются слиянием семядолей, нарушением филлотаксиса, развитием цветоноса, похожего на булавку. Проявление мутации *abr* (аллель *pid*) зависит от температуры. В условиях повышенной температуры наблюдается высокая экспрессивность мутантного признака и растение не способно развивать цветки на булавковидном цветоносе. При более низкой температуре мутант формирует цветки измененной морфологии [4], что, по-видимому, связано с сохранением остаточной функции мутантного белка. Задачей данной работы являлось изучение влияния мутации *abr* на распределение активного ауксина в органах побега растений *A. thaliana*. Для выявления участков локализации активного (свободного)

ауксина использовали линию трансгенных растений *A. thaliana*, в геном которых включен репортерный ген β-глюкуронидазы *GUS* под контролем чувствительного к ауксину синтетического промотора *DR5* (*DR5::GUS*) [5].

Объект и методы исследования

Растительный материал. В работе использовали трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие химерный ген *DR5::GUS*. Путем скрещивания с растениями расы Dijon-M (линия К-1) и мутанта *abr* (линия К-150, полученная из расы Dijon-M после обработки мутагеном нитрозометилмочевинной) получены гомозиготы по нормальной и мутантной аллелям гена *ABR/PID* и трансгену *DR5::GUS*. Растения выращивали в асептических условиях на агаризованной среде Квитко [6] в люминостате при 16-часовом фотопериоде (интенсивность освещения 4000 лк) и температуре 23–25°. После достижения стадии цветения (4 недели от посадки) часть растений переносили в условия 27–29°, где они росли еще одну неделю. Растения, постоянно растущие при 23–25°, анализировали на стадии ювенильной розетки (2 недели) и стадии цветения (5 недель). Растения, перенесенные в условия 27–29°, анализировали в возрасте 5 недель.

Анализ активности репортерного гена *GUS*. В качестве субстрата для определения активности β-глюкуронидазы использовали 20 мМ раствор X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) в диметилформамиде [7]. Образцы тканей помещали в раствор, содержащий 1 мМ X-gluc; 50 мМ фосфатный

¹ Тувинский государственный университет. 667000, г. Кызыл; Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 119991, г. Москва.

буфер $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0–7,2; 0,01 объемных % Tween-20, и инкубировали в темноте в термостате при 37° от 5 до 48 ч. Затем образцы переносили в 70%-й этанол для удаления хлорофилла, после чего анализировали их стереомикроскопом STEMI-2000 (“K. Zeiss”, Германия).

Результаты и обсуждение

В растениях дикого типа, выращенных при температуре 23–25°, активность слитого гена *DR5::GUS* наблюдали в локальных участках листьев розетки (в кончиках зубчатых выростов листа) ювенильных 2-недельных и цветущих 5-недельных растений, а также в стеблевых листьях, развивающихся на цветоносах (рисунок, а, б). Эти локальные участки соответствуют местам расположения гидатод, что отмечалось и в ранее проведенных исследованиях [8, 9].

Наибольший уровень экспрессии *DR5::GUS* наблюдали в тычинках распускающихся бутонов и самых молодых цветках (рисунок, в). В условиях повышенной температуры (25–27°) экспрессия *DR5::GUS* в растениях дикого типа становилась ниже, чем в растениях, которые постоянно росли при 23–25°. Эти данные можно объяснить влиянием температуры на биосинтез ауксина. Ранее было показано, что уровень свободного ауксина в проростках *A. thaliana*, выращенных при 26°, существенно ниже, чем в выращенных при 21° [10]. По-видимому, и в нашем эксперименте снижение экспрессии трансгена

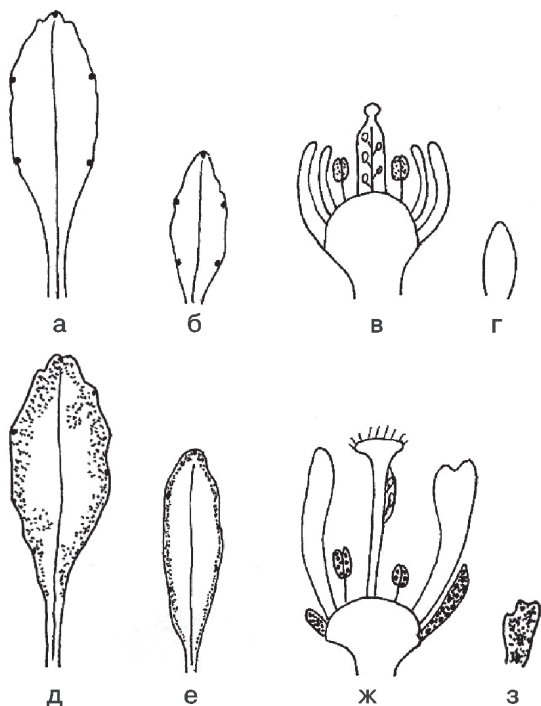
DR5::GUS в растениях дикого типа после переноса растений в условия 27–29° связано со снижением синтеза ауксина.

В растениях мутанта *abr* экспрессия *DR5::GUS* во всех органах была выше, чем в растениях дикого типа (рисунок, д, е, ж, з). В листьях накопление ауксина наблюдали не только в гидатодах, но и по краю всей пластинки листа, а также диффузно, по всей площади листа (рисунок, д, е). Основным местом экспрессии *DR5::GUS* в цветках мутанта, как и в цветках дикого типа, были тычинки (рисунок, ж). Существенный уровень экспрессии *DR5::GUS* отмечался и в чашелистиках молодых цветков (рисунок, ж, з), который ослабевал по мере распускания цветков мутанта *abr*. Более активная экспрессия *DR5::GUS* в листьях и цветках мутанта *abr* свидетельствует о более высоком уровне свободного ауксина в этих органах.

При повышенной температуре (25–27°) уровень активности репортерного гена в растениях мутанта увеличивался по сравнению с 23–25°, а пространственные особенности экспрессии оставались практически неизменными. Эти результаты находятся в соответствии с усилением экспрессивности фенотипического проявления мутация *abr* при выращивании растений в условиях повышенной температуры [4]. По-видимому, повышение температуры приводит к инактивации мутантного белка и полному блоку транспорта ауксина в побеге, что вызывает усиление мутантного фенотипа и более выраженное накопление ауксина в тканях.

Эти результаты подтверждают полученные ранее данные о более высоком содержании свободной формы ауксина, определенном методом ИФА, в растениях мутанта на стадии бутонизации (~ в 2 раза) по сравнению с растениями дикого типа [11, 12]. Кроме того, выявленное с помощью анализа экспрессии *DR5::GUS* накопление ауксина в листьях розетки и стебля мутанта *abr* хорошо соответствует обнаруженным ранее данным об увеличении в 1,5–3 раза содержания ауксина в розетке листьев и базальной части цветоноса (где формируются стеблевые листья) у мутанта по сравнению с растениями дикого типа [12].

Обнаруженная нами более высокая активность *DR5::GUS* в цветках мутанта по сравнению с диким типом не противоречит также данным об отсутствии различий в содержании ауксина в апикальной части цветоноса мутанта и растений дикого типа на стадии бутонизации и даже данным о 2-кратном сниженном содержании ауксина у мутанта в апикальной части цветоноса на стадии полного цветения [12]. Это кажущееся противоречие легко объясняется тем, что растения мутанта имеют существенно более низкое число цветков по сравнению с растениями дикого типа. Более того, в цветках мутанта уменьшено число тычинок и чашелистиков [4], которые по результатам анализа экспрес-



Схематическое изображение экспрессии трансгена *DR5::GUS* в листьях и цветках растений дикого типа (а–г) и мутанта *abr* (д–з) *A. thaliana*: а, д — листья розетки; б, е — стеблевые листья; в, ж — молодые цветки; г, з — чашелистики (объяснения в тексте)

сии *DR5::GUS* являются основными органами, накапливающими ауксин.

Таким образом, благодаря использованию химерного гена *DR5::GUS* нам удалось более детально исследовать влияние мутации *abr*, нарушающей транспорт ауксина в побеге, на распределение ауксина в растениях. Показано, что мутация приводит к накоплению ауксина не только в листьях, но и в цветках, что подтверждает отсутствие нарушений в процессах синтеза этого фитогормона у мутанта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friml J., Yang X., Michniewicz M. et al. A PINOID dependent binary switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting directs auxin efflux // *Science*. 2004. Vol. 306. P. 862–865.
2. Bennett S.R.M., Alvarez J., Bossinger G., Smyth D.R. Morphogenesis in *pinoid* Mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1995. Vol. 8. P. 505–520.
3. Christensen S.K., Dagenais N., Chory J., Weigel D. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID // *Cell*. 2000. Vol. 100. P. 469–478.
4. Ежова Т.А., Ондар У.Н., Солдатова О.П., Кузнецова Т.В. Изучение роли гена *ABRUPTUS* в дифференцировке цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Докл. РАН. 1997. Т. 354. № 6. С. 839–842.
5. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *Plant Cell*. 1997. Vol. 9. P. 1963–1971.
6. Квитко К.В. Асептическая культура *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и перспективы ее использования в ботанических исследованиях // Вестн. Лен. ун-та. Сер. биология. 1960. Т. 15. № 3. С. 47–56.

Выявленное снижение уровня экспрессии *DR5::GUS* в растениях дикого типа после переноса растений в условия 27–29° указывает на важную роль температуры в регуляции синтеза ауксина.

* * *

Исследования поддержаны грантами Российского фонда фундаментальных исследований и ФЦП НШ 4202.2008.4.

7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
8. Aloni R. The induction of vascular tissue by auxin // *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action* / Ed. Davies P.J. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 471–492.
9. Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C.I. Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development // *Planta*. 2006. Vol. 223. P. 315–328.
10. Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R. et al. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3 // *Genes Dev*. 2002. Vol. 16. P. 3100–3112.
11. Калинина А.Ю., Ежова Т.А., Голубева Н.В. и др. Полярный транспорт ауксина у мутанта *abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Вестн. СПбГУ. 2000. Сер. 3. Вып. 1. № 3. С. 42–49.
12. Ежова Т.А., Солдатова О.П., Калинина А.Ю., Медведев С.С. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *LEAFY* в процессе флорального морфогенеза у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 12. С. 1–6.

Поступила в редакцию
05.11.09

THE ANALYSIS OF AUXIN DISTRIBUTION IN THE WILD TYPE AND *ABRUPTUS* MUTANT PLANTS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BY USING THE CHIMERIC GENE *DR5::GUS*

U.N. Kawai-ool, T.A. Ezhova

We have studied the activity of the chimeric gene *DR5::GUS* that indicates the spatial pattern of free auxin distribution and relative auxin level in the tissues of *A. thaliana* plants. It is established that the temperature sensitive *abr* mutation leads to temperature-dependent increased accumulation of the free auxin in leaves, stamens and sepals in comparison to control plants homozygous for the wild type allele *ABRUPTUS/PINOID*. Our data revealed the important role of the *ABRUPTUS/PINOID* gene in the regulation of the auxin polar transport.

Key words: *plant development, auxin, mutants, transgenic plants, Arabidopsis thaliana.*

Сведения об авторах

Кавай-оол Урана Николаевна — канд. биол. наук, докторант Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Тел.: (495)939-05-67; e-mail: dr.urana@mail.ru

Ежова Татьяна Анатольевна — докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: (495)939-54-90, 8(915)313-93-64; e-mail: ezhova2001@mail.ru