

УДК 575.164

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНА *PINOID/ABRUPTUS* С ГЕНОМ *AGAMOUS* – НЕГАТИВНЫМ РЕГУЛЯТОРОМ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МЕРИСТЕМЕ ЦВЕТКА *Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup>

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол<sup>1</sup>, О. Ю. Карпенко<sup>2</sup>, Т. А. Ежова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тувинский государственный университет,  
Кафедра общей биологии, 667000 Кызыл  
e-mail: dr.urana@mail.ru

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Учреждение Российской Академии наук, 119991 Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Кафедра генетики, 119992 Москва  
e-mail: ezhova2001@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.10 г.  
Окончательный вариант получен 28.06.10 г.

Выявлено комплементарное взаимодействие гена *AGAMOUS* с геном *PINOID/ABRUPTUS*. У двойного мутанта *abr ag-1* наблюдается существенное усиление пролиферации клеток флоральной меристемы и образование ветвящихся побегоподобных цветков. Эти данные указывают на участие гена *PID/ABR* в ограничении пролиферации ствольных клеток флоральной меристемы. Выявленное в цветках мутанта *abr* повышение уровня транскрипции гена *WUS*, а также нарушение распределения ауксина, позволяют предполагать, что ген *PID/ABR*, контролируя транспорт ауксина, участвует в определении доменов экспрессии гена *WUS*.

**Ключевые слова:** развитие цветка, взаимодействие генов, ствольные клетки, транспорт ауксина, мутанты, *Arabidopsis thaliana*.

### ВВЕДЕНИЕ

Полярный транспорт ауксина является важнейшим фактором морфогенеза растений. Локальные изменения концентрации ауксина (повышенные или, наоборот, минимальные) определяют судьбу клеток на всем протяжении онтогенеза, начиная с самых ранних этапов эмбриогенеза. В исследованиях на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuh. установлено, что в изменении концентрации ауксина в клетках важнейшую роль играют белки-транспортёры PIN, выносящие ауксин из клетки, и протеинкиназа PID (продукт гена *PID/ABR*), которая фосфорилирует белки PIN и обеспечивает возможность их полярной (ассиметричной) локализации на мембране клетки (Zhang et al., 2010). Градиент ауксина определяет апикально-базальную ось зародыша; высокие локальные концентрации ауксина маркируют положение развивающихся семядолей и гипофизиса, а на постэмбриональной стадии они определяют места положения латеральных органов и маркируют инициалы будущих

органов и сосудистых тканей (обзор Petrášek and Friml, 2009). Минимальные концентрации ауксина по краю плодolistиков маркируют участки разделительного слоя, по которым происходит вскрытие стручков *A. thaliana* (Sorefan et al., 2009). Недавно установлено, что в процессе соматического эмбриогенеза градиенты ауксина определяют место экспрессии гена *WUS* (Su et al., 2009), активность которого необходима для инициации и поддержания пула ствольных клеток (СК) в апикальной меристеме побега и флоральной меристеме *A. thaliana* (Laux et al., 1996).

В отличие от функционирующего на протяжении всего жизненного цикла пула СК в апикальной меристеме побега, пул СК во флоральной меристеме существует в растениях дикого типа лишь до появления зачатков репродуктивных органов цветка. Это связано с активностью гена *AG*, который не только обеспечивает развитие тычинок и плодolistиков, но и терминирует флоральную меристему, путем подавления в ней транскрипции гена *WUS* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Мутации в гене *AG* приводят к эктопической пролиферации СК во флоральной меристеме: у мутантов *ag* цветок образует многочисленные органы, причем вместо тычинок и пести-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00859-а) и федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект № НШ-3293.2010.4)

ков развиваются лепестки и чашелистики (Соеп, Меуегowitz, 1991). Задачей данной работы было изучение влияния мутации *abr*, нарушающей функцию гена *PID/ABR* (Ежова и др., 2000), на проявление мутации *ag-1*. Для решения этой задачи провели анализ фенотипа двойного мутанта *abr ag-1*, исследовали уровень транскрипции гена *WUS* в цветках мутанта *abr*, а также распределение ауксина в растениях *abr* с использованием химерной конструкции *DR5::GUS*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения, гомозиготные по температурочувствительной мутации *abr* (линия К-150 из коллекции кафедры генетики МГУ, полученная на основе расы Dijon-M), а также линию, содержащую мутацию *ag-1*, которая получена от трехкратного скрещивания мутации *ag-1* из линии CS25 (коллекция ABRC) с растениями расы Dijon-M. Для получения двойного мутанта *abr ag-1* скрещивали растения мутанта *abr*, выращенные при 23–25°C, с растениями, гетерозиготными по мутации *ag-1*.

Для выявления участков локализации свободного ауксина использовали линию трансгенных растений *A. thaliana DR5::GUS*, в геном которых включен репортерный ген  $\beta$ -глюкуронидазы *GUS* под контролем чувствительному к ауксину синтетического промотора *DR5* (Ulmasov et al., 1997). Путем скрещивания с растениями расы Dijon-M (линия К-1) и мутанта *abr* получены гомозиготы по нормальной и мутантной аллелям гена *ABR/PID* и трансгену *DR5::GUS*. Растения выращивали в асептических условиях при 16 ч фотопериоде и температуре 23–25°C. После достижения стадии цветения (4 недели от посадки), часть растений переносили в условия 27–29°C, где они росли еще одну неделю. Анализ активности репортерного гена проводили на растениях в возрасте 5 недель как описано ранее (Ву и др., 2008).

Уровень транскрипции *WUS* оценивали с помощью метода ПЦР продуктов обратной транскрипции РНК в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной обработкой ДНКазой. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15T праймером (Silex, Russia). ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Syntol, Russia). Для амплификации кДНК использовали следующие праймеры: для *WUS* CAGTCTTGTCCATAGATCCATAG и CTCATCTTTCCGAAGTGTCTCA; для референсного гена *EFL* TTGCTGTTGTAACAAGTGGATGC и AAGATTGGTGGTATTGGAACGG. Анализ проводили в 3-х повторностях.

Таблица. Особенности строения цветка у двойного мутанта *abr ag-1* и родительских линий *A. thaliana*

Генотип	Число ярусов на главной оси цветка	Число латеральных цветков
<i>abr</i>	1 ± 0	0
<i>ag-1</i>	4.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1
<i>abr ag-1</i>	8.5 ± 1.8	4.1 ± 0.6

Примечание: анализировали базальные цветки растений 8-ми недельного возраста; для всех генотипов просмотрено по 25 цветков.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и у мутанта *ag-1*, цветки двойного мутанта не имели тычинок и пестиков и состояли только из органов околоцветника, число которых существенно превышало обычное число органов цветка из-за более продолжительной пролиферации флоральной меристемы (рис. 1а–д). На генетическом фоне расы Dijon-M мутация *ag-1* вызывает образование многоярусных цветков, что связано с тем, что после образования нескольких мутовок ось цветка удлиняется перед образованием новой мутовки чашелистиков и вновь начинает формировать органы цветка (рис. 1б). Число таких ярусов повышается с возрастом растения и достигает в базальных цветках мутанта *ag-1* в конце вегетации в среднем 3.6 (таблица). Цветки двойного мутанта *abr ag-1* пролиферируют еще дольше (рис. 1г, д), чего не наблюдается у мутанта *abr* (рис. 1е). Среднее число ярусов в цветке *abr ag-1* составляет 7.5 у растений 8-ми недельного возраста (таблица).

У мутанта *ag-1* и двойного мутанта часто встречались химерные органы, состоящие из тканей чашелистиков и лепестков (рис. 1ж). Лепестки у двойного мутанта были крупными и часто двухлопастными (рис. 1з), как и у мутанта *abr*.

В отличие от мутанта *ag-1*, цветки двойного мутанта ветвятся (рис. 1д). Среднее число латеральных цветков на один многоярусный цветок составляет 4.1 (таблица), в то время как у мутанта *ag-1* латеральные ветвления встречаются очень редко (0.7). Такой фенотип, свидетельствующий о комплементарном взаимодействии генов *ABR* и *AG*, можно объяснить выявленным в распустившихся цветках мутанта *abr* повышенным уровнем транскрипции гена *WUS* (рис. 2).

По-видимому, ген *ABR* в растениях дикого типа вместе с геном *AG* участвует в ограничении уровня экспрессии гена *WUS* и терминации флоральной меристемы. Отметим, что у одиночного мутанта *abr* также наблюдаются некоторые при-



**Рис. 1.** Морфология цветка мутантов *ag-1* (а, б), *abr* (е) и двойного мутанта *abr ag-1* (в–д, ж–и) *A. thaliana*:

а и б — цветки *ag-1*, состоящие из чашелистиков и лепестков (на рис. б видно появление нового яруса за счет растяжения оси цветка);

в–д — последовательные стадии развития цветка двойного мутанта; на рис. г стрелками отмечено положение частично или полностью опавших органов цветка нижних ярусов; на рис. д главная ось цветка имеет 6 ярусов, латеральные двухъярусные цветки отмечены звездочками;

е — верхушка соцветия мутанта *abr*, стрелкой отмечен фасциированный участок цветоноса;

ж–и — сканирующая электронная микроскопия;

ж — эпидермальные клетки органов цветка двойного мутанта; справа и слева — лепестки, в центре — химерный орган, нижняя часть которого состоит из типичных для лепестка клеток, а верхняя (стрелка) из крупных клеток, характерных для чашелистиков;

з — трехъярусный цветок двойного мутанта; видно удлинение оси цветка перед каждой новой мутовкой чашелистиков; стрелкой обозначен крупный лепесток;

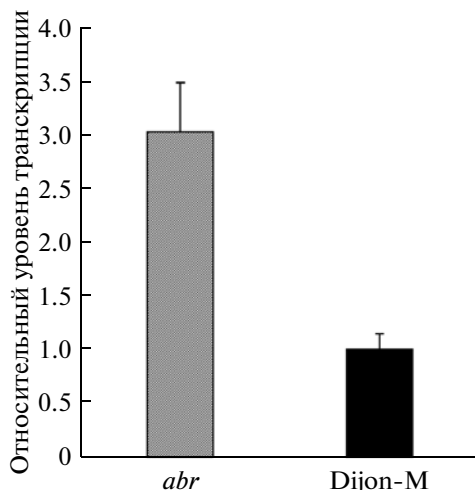
и — цветок двойного мутанта с пятью латеральными цветками (стрелки); верхняя часть главной оси удалена (отмечено звездочкой).

знаки, указывающие на эктопическую пролиферацию клеток как апикальной, так и флоральной меристем: фасциация цветоноса (у 12–40% растений мутанта *abr*, см. рис. 1е), длительный рост оси цветка и формирование гинофора (разрастание цветоложа между тычинками и пестиком), а также аномальное разрастание рыльцевых тканей. Влияние гена *PID/ABR* на экспрессию *WUS* может быть связано с установленной недавно (Su et al., 2009) важной ролью градиентов ауксина в определении пространственных особенностей экспрессии гена *WUS*.

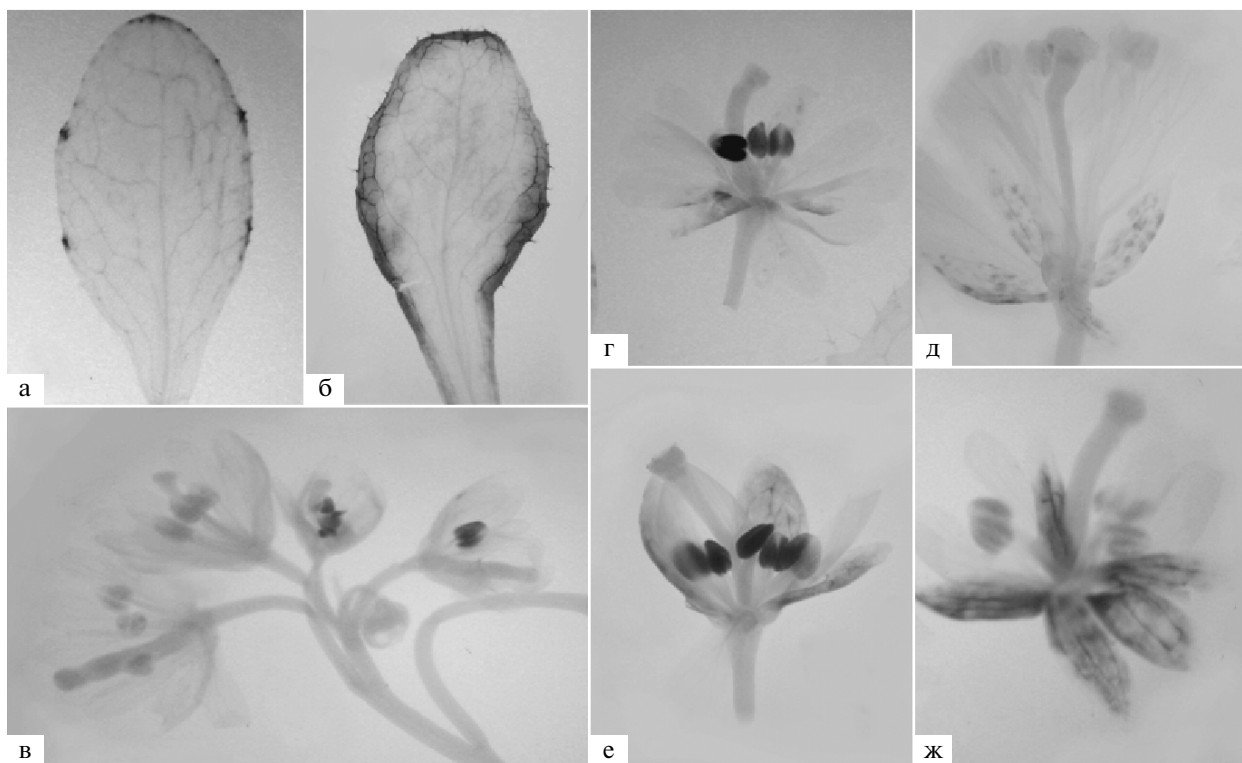
С использованием химерного гена *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997) нами выявлены существенные аномалии в распределении ауксина по тканям растений мутанта *abr*. В отличие от растений дикого типа у мутанта ауксин накапливается по

всему краю листа (рис. 3а, б). В цветках ауксин накапливается не только в молодых пыльниках (как у исходной линии *DR5::GUS*, рис. 3в, г), но и в чашелистиках (рис. 3д).

При переносе растений на стадии начала цветения, выращенных при 23–25°C, в условия повышенной температуры (7 дней при 27–29°C), содержание ауксина в растениях исходной линии снижалось (данные не приводятся), а в растениях температурочувствительного мутанта *abr* существенно увеличивалось (рис. 3е, ж). Полученные данные подтверждают важную роль гена *PID/ABR* в регуляции полярного транспорта ауксина и позволяют предположить, что аномалии в распределении ауксина в растениях мутанта могут приводить к появлению новых участков экспрессии



**Рис. 2.** Сравнение уровня транскрипции гена *WUS* в цветках мутанта *abr* и растений дикого типа (раса Dijon-M). Уровень транскрипции гена *WUS* в растениях расы Dijon-M принят за единицу.



**Рис. 3.** Экспрессия трансгена *DR5::GUS* в листьях и цветках дикого типа (гомозиготы по нормальному аллелю гена *PID/ABR* – а, в) и мутанта *abr* (б, г–ж) *A. thaliana*:

а, б – листья розетки растений, выращенных при 23–25°C;

в – верхушка цветоноса растения дикого типа, выращенного при 23–25°C (видна экспрессия репортерного гена в пыльниках молодых цветков);

г, д – соответственно, молодой и зрелый цветки растений мутанта *abr*, выращенных при 23–25°C (в молодом цветке видна экспрессия репортерного гена в пыльниках; в зрелом цветке *DR5::GUS* экспрессируется в чашелистиках);

е, ж – соответственно, молодой и зрелый цветки растений мутанта *abr*, перенесенных в условия 27–29°C (в молодом цветке видна экспрессия трансгена в пыльниках и чашелистиках; в зрелом цветке экспрессия в чашелистиках усиливается, а в пыльниках сохраняется остаточная экспрессия).

*WUS* и эктопической пролиферации рядом расположенных клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ву Х.Ч., Ондар У.Н., Солдатова О.П. Особенности проявления новых аллелей генов *AS1* и *AS2*, контролирующих морфогенез листа *Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 1. С. 8–14.
- 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. 1682–1687.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // Nature. 1991. V. 353. № 6339. P. 31–37.
- Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jrgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* // Development. 1996. V. 122. P. 87–96.
- Lenhard M., Bohnert A., Jurgens G., Laux T. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS* // Cell. 2001. V. 105. P. 805–814.
- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M. et al. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis* // Cell. 2001. V. 105. Issue 6. P. 793–803.
- Petrášek J. and Friml J. Auxin transport routes in plant development // Development. 2009. V. 136. P. 2675–2688.
- Sorefan K., Girin T., Liljegren S.J. et al. A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis* // Nature. 2009. V. 459. P. 583–586.
- Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Yu B. et al. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* // Plant Journal. 2009. V. 59. P. 448–460.
- 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. V. 9. P. 1963–1971.
- Zhang J., Nodzyn'ski T., Pěnc'ík A. et al. PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport // PNAS. 2010. V. 107. № 2. P. 918–922.

### Interaction between the *PINOID/ABRUPTUS* Gene with the *AGAMOUS* Gene: the Negative Regulator of Stem Cells in the Meristem of *Arabidopsis thaliana* Flower

U. N. Kawai-ool<sup>a</sup>, O. Yu. Karpenko<sup>b</sup>, and T. A. Ezhova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tyva State University, Department of General Biology, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia  
e-mail: dr.urana@mail.ru

<sup>a</sup> Vavilov Institute of General Genetics, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, 119992 Russia  
e-mail: ezhova2001@mail.ru

**Abstract**—Complementary interaction between the *AGAMOUS* and *PINOID/ABRUPTUS* genes was revealed. In double mutant *abr ag-1*, there is a significant increasing proliferation of cells of the floral meristem and formation of branching bine-like flowers. This data indicate the participation of the *PID/ABR* gene in limitation of proliferating stem cells of the floral meristem. The revealed increase of transcription level of *WUS* gene in flowers of the *abr* mutant, as well as distortion of auxin distribution, allows us to suggest that the *PID/ABR* gene controls auxin transport and participates in detection of expression domains for the *WUS* gene.

**Keywords:** flower development, gene interaction, stem cells, auxin transport, mutants, *Arabidopsis thaliana*