



**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1*
ПО ГЕНАМ МЕТАБОЛИЗМА И СИГНАЛИЗАЦИИ ЭТИЛЕНА
CTR1, *ETR1*, *EIN2* И *ETO1*
НА СТРОЕНИЕ КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ
У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН.**

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн., корневой волосок, фитогормоны, этилен, ген, мутация, рецептор.

Введение

Этилен (C₂H₄) является фитогормоном-ингибитором, который влияет на многие аспекты жизни растений [1]. Он тормозит полярный транспорт ауксина, ингибирует деление клеток, ускоряет созревание и опадение плодов, вызывает старение листьев и цветков, участвует в ответе растений на различные стрессовые факторы, а также подавляет рост корней в корневой системе, но способствует образованию придаточных корней на стебле [2]. В то же время роль этилена в процессе формирования на корнях корневых волосков у растений до конца еще не определена. Вполне очевидно, что необходимо проведение специальных исследований для выяснения действия этилена на образование волосков эпидемии у растений.

К настоящему времени молекулярно-генетические и физиологические исследования мутантных растений у *A. thaliana* позволили изолировать и секвенировать ряд генов, участвующих в метаболизме и сигнализации этилена. К ним относятся гены *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1)* [3], *ETHYLENE OVERPRODUCER1 (ETO1)* [4], *ETHYLENE-RESISTANT1 (ETR1)* [5] и *ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2)* [6].

У высших растений этилен синтезируется из S-аденозилметионина через промежуточное соединение – 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК). Ключевым ферментом, на уровне которого регулируется биосинтез этилена, является АЦК-синтаза (англ. ACC synthases). Ген *ETO1* кодирует белок ETO1, который негативно регулирует фермент биосинтеза этилена (АЦК-синтазу). Мутация *eto1-1* гена *ETO1* вызывает у растений потерю функций белка ETO1, ингибирующего активность фермента синтеза этилена. Это приводит к усилению скорости биосинтеза этилена в клетках и увеличению его концентрации в тканях растения [4].

Для восприятия генерируемых фитогормонами сигналов и их преобразования в конечный ответ клетки растения используют

различные по своей структурно-функциональной организации хемосигнальные системы. Этилен, цитокинины и брассиностероиды реализуют свои эффекты через двухкомпонентные сигнальные системы, включающие в себя в качестве сенсора рецепторные гистидинкиназы или серинтреониновые потеинкиназы и регуляторы ответа [7].

Функцию рецепторов для этилена выполняют сенсорные гистидинкиназы. У *A. thaliana* имеется пять рецепторных форм гистидинкиназ – *ETHYLENE-RESISTANT1 (ETR1)*, *ETR2*, *ETHYLENE-INSENSITIVE4 (EIN4)*, *ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1)* и *ERS2*. Ген *ETR1* кодирует рецепторную гистидинкиназу ETR1, ответственную за восприятие и передачу в растительную клетку сигнала, генерируемого этиленом. Мутация *etr1-1* по гену *ETR1* вызывает повреждение мембранного рецептора ETR1, через который проявляется реакция растений на этилен [5].

Обычно рецепторы при взаимодействии с гормоном меняют свою конформацию и переходят в активное состояние. Активированные мембранные рецепторы передают сигнал внутрь клетки с помощью тех или иных каскадных механизмов с участием вторичных посредников. На мембране ядра клетки расположен ядерный мембранный белок EIN2. Он кодируется геном *EIN2*. Мутация *ein2-1* в гене *EIN2* обуславливает у растений дефекты в ядерном мембранном белке EIN2, который воспринимает этиленовый сигнал от вторичных посредников и передает его внутрь ядра клетки к эффекторным белкам, ответственным за транскрипцию определенных генов. Это приводит у мутантных растений, в конечном счете, к подавлению или запуску генетических программ, обеспечивающих специфический ответ на этилен растений [6].

Сигнал от рецепторных гистидинкиназ к ядру клетки может блокироваться белком CTR1, контролируемым геном *CTR1*. Этот белок является репрессором передачи этиленового сигнала, образующий комплекс сенсорными гистидинкиназами. Мутация *ctr1-2* по гену *CTR1* приводит к морфологическим изменениям у арабидопсиса, кото-

рые могли бы возникнуть при постоянном включении этиленовой программы [3].

Цель работы – изучение влияния мутантных аллелей *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* генов *CTR1*, *ETO1*, *ETR1* и *EIN2* на строение корневых волосков.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа (расы) Columbia (Col-O) и мутантных линий *constitutive triple response1-1* (*ctr1-2*), *ethylene overproducer1-1* (*eto1-1*), *ethylene-resistant1-1* (*etr1-1*) и *ethylene insensitive2-1* (*ein2-1*). Семена мутантных линий 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 [8]. Питательную смесь разливали в химические пробирки размером 14x120 мм и закрывали их плотными ватными пробками.

Семена к посеву готовили путем яровизации в течение 5 сут. при температуре 4-6°C и последующего односуточного проращивания при комнатной температуре. Пробирки для предохранения от нагревания и попадания света на корни растений обертывали двумя слоями бумаги. Растения культивировали при температуре 18-20°C, освещенность круглосуточная в пределах 4000-7000 лк.

При проведении наблюдений за растениями руководствовались общепринятыми методиками вегетационных и сравнительно-морфологических исследований [9]. Учет количества корневых волосков и их длину в корневых системах у растений экотипа Col-O и исследуемых мутантных линий проводили в фазе второй пары настоящих листьев под микроскопом типа МБС-9. Объем выборки у расы Col-O и мутантных линий *ers1-2*, *ein2-1*, *ctr1-1* и *eto1-1* составлял по 30 растений. Математическую обработку результатов проводили по методам, описанным Б.А. Доспеховым [9] и Г.Ф. Лакиным [10].

Результаты и обсуждение

Снаружи корни у растений *A. thaliana* дикого или нормального типа в зоне всасывания покрыты покровной тканью – эпibleмой, образованной одним слоем однородных клеток. Поверх кожицы корня из клеток эпibleмы вырастают корневые волоски трубчатой формы. Это особенность тесно связана с функцией клеток поверхностной ткани корня поглощать из почвы воду с растворенными в ней минеральными веществами.

Корневые волоски появляются в поглощающей зоне в виде небольших выростов клеток кожицы корня. В процессе формирования волоска эпibleмы внешняя стенка клетки трихобласты выпячивается, образуя его кончик. По мере его роста растяжением происходит удлинение корневого волоска. Длина полностью закончившего роста выроста поверхностной клетки корня достигает 998 микрометров (мкм).

У растений мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* корневые системы резко отличаются от экотипа Col-O по длине и количеству корневых волосков (табл.). Величина волосков эпibleмы на корнях у растений данных мутантных линий колеблется в широких пределах – от 102,0 до 1479,2 мкм. Короткие корневые волоски имеют линии *etr1-1* (116,3 мкм) и *ein2-1* (102,0 мкм). Крупные волоски эпibleмы характерны для растений мутантных линий *ctr1-2* (1479,2 мкм) и *eto1-1* (1458,8 мкм).

Сравнивая соотношения длины корневых волосков на корнях у исходной расы Col-O и растений мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* в фазу второй пары настоящих листьев, можно заметить, что в составе их корневых систем наибольшая длина среди волосков эпibleмы отмечается у линии *ctr1-2*, а наименьшая – линии *ein2-1*.

Обращает на себя внимание также то, что у мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* по сравнению с экотипом Col-O выросты клеток кожицы корня не отличаются по диаметру в основании и в средней их части.

Количество корневых волосков у растений исследуемых линий варьирует в меньшей степени, чем их длина. У исходной расы Col-O не все клетки эпibleмы поглощающей зоны корня формируют корневые волоски. Обычно клетки зоны всасывания кожицы корня, образующие волоски эпibleмы, граничат с клетками, которые их не развивают. В то же время при необходимости все клетки поверхностной ткани этой зоны способны к образованию выростов клеток кожицы корня.

Исследования показали, что на 1 мм² поглощающей зоны у дикого типа Col-O приходится 51,0 корневых волоска. Растения мутантных линий *ctr1-2* и *eto1-1* по сравнению с исходной расой Col-O имеют большее количество выростов клеток кожицы корня. Однако растения мутантных линий *etr1-1* и *ein2-1* образуют меньшее количество волосков эпibleмы, чем у контроля (Col-O).

Следует подчеркнуть, что наибольшее количество корневых волосков на 1 мм² зоны всасывания выявлено у мутантной линии *ctr1-2* (90 шт/1 мм²), тогда как наименьшее – мутантной линии *etr1-1* (41,1 шт/1 мм²).

Средние значения биометрических параметров (длины, толщины и количества) корневых волосков у экотипа Col-0 и мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* в фазу второй пары настоящих листьев (на 10-й день после прорастания семян)

Название линии	Корневые волоски			
	длина, мкм	диаметр в основании, мкм	диаметр в средней части, мкм	количество, шт./1 мм ²
WT (Col-0)	997,8±0,2	21,3±0,3	9,8±0,1	50,7±0,3
<i>etr1-1</i>	116,3±0,4	21,8±0,2	10,1±0,3	41,1±0,4
<i>ein2-1</i>	102,0±0,2	21,3±0,1	9,8±0,2	42,0±0,2
<i>ctr1-2</i>	1479,2±0,3	21,1±0,2	9,1±0,1	90,2±0,4
<i>eto1-1</i>	1458,8±0,2	21,4±0,4	9,4±0,2	83,8±0,2
HCP _{0,05} , микрометры, мкм	4,84	0,99	0,94	1,91

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании различий у мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* по числу и длине корневых волосков. Это позволило разделить данные мутации по характеру влияния на строение волосков эпидемии на две группы: мутации, подавляющие образование выростов клеток кожицы корня, и мутации, вызывающие формирование корневых волосков.

К первой группе относятся мутации, подавляющие развитие волосков эпидемии. В этих случаях мутантные растения имеют уменьшенное по отношению к экотипу Col-0 количество и длину выростов клеток кожицы корня. Такими мутациями являются *etr1-1* и *ein2-1*.

Мутации *etr1-1* и *ein2-1* в генах *ETR1* и *EIN2* обуславливают у растений нарушения в мембранных рецепторах *ETR1* и *EIN2*, воспринимающих и передающих этиленовый сигнал к транскрипционным факторам, ответственных за экспрессию чувствительных генов, контролирующих образование из клеток поверхностной ткани корня корневых волосков. Это обуславливает в корневой системе понижение формирования волосков эпидемии.

Во вторую группу входят мутации, которые вызывают образование выростов клеток кожицы корня. К ним относятся мутации *ctr1-2* и *eto1-1*. В таких случаях у растений под влиянием мутации развиваются большее по сравнению с исходной расой Col-0 число и длина корневых волосков.

Мутации *ctr1-2* и *eto1-1* по генам *CTR1* и *ETO1* приводят у растений к дефектам в белках *CTR1* (блокаторе этиленового сигнала) и *ETO1* (ингибиторе ферментативной активности фермента биосинтеза этилена АЦК-синтазы), что влечет за собой транскрипцию компетентных генов, участвующих в процессе формирования корневых волосков. В результате в корневой системе повышается образование волосков эпидемии.

До настоящего времени считалось, что ауксин является фитогормоном, стимули-

рующим как рост клеток, так и образование волосков эпидемии. Так, рост клеток растяжением многих незрелых тканей (в интактном растении и в культуре) усиливается при добавлении ИУК в 6 и даже в 8 раз. Вместе с тем проведенные нами исследования свидетельствуют в пользу того, что наряду с ауксином этилен у растений играет важную роль в процессе развития корневых волосков.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что у мутантных линий *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* корневые системы значительно отличаются от исходной расы Col-0 по количеству корневых волосков и их длине. Следовательно, мутации *ctr1-2*, *etr1-1*, *ein2-1* и *eto1-1* генов *CTR1*, *ETO1*, *ETR1* и *EIN2* по-разному действуют на количество и длину волосков эпидемии. Мутации *ctr1-1* и *eto1-1* обуславливают в корневой системе повышение образования выростов клеток кожицы корня, а мутации *etr1-1* и *ein2-1* вызывают понижение формирования корневых волосков.

Библиографический список

- Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский образовательный журнал. – 1995. – № 1. – С. 2-27.
- Johnson P.R., Ecker J.R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective // Annual Review of Genetics. – 1998. – V. 32. – № 2. – P. 227-254.
- Gao Z., Chen Y.F., Randlett M.D. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – № 3. – P. 34725-34732.
- Yoshida H., Nagata M., Saito K. *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases // BMC

Plant Biol. – 2005. – V. 10. – № 5. – P. 14-18.

5. Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators // Science. – 1993. – V. 262. – № 2. – P. 539-544.

6. Kim J.H., Woo H.R., Kim J. Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis* // Science. – 2009. – V. 323. – № 2. – P. 1053-1057.

7. Шпаков А.О. Хемосигнальные системы растений // Цитология. – 2009. – Т. 51. – № 9. – С. 721-733.

8. Рубина Б.А., Чернавина И.А., Потапов Н.Г. и др. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высш. школа, 1978. – 408 с.

9. Доспехов Б.А. Методика (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.



УДК 582.284(571.51)

Н.А. Зауолкова

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БАЗИДИОМИЦЕТЫ В МИКОБИОТЕ ЛЕСОСТЕПНЫХ СООБЩЕСТВ МИНУСИНСКИХ КОТЛОВИН

Ключевые слова: агариикоидные базидиомицеты, гастеромицеты, лекарственные грибы, лесостепные сообщества, Минусинские котловины, Республика Хакасия.

Введение

В настоящее время большой интерес проявляется к фунготерапии, в связи с тем грибы представляют собой уникальный источник природных биологически активных соединений, они способны к быстрому накоплению биомассы и продуцированию разнообразных биологических активных веществ, таких как антибиотики, полисахариды, ферменты и др. [1].

Спектр фармакологического действия базидиомицетов достаточно разнообразен, включает в себя противоопухолевые, иммуностимулирующие, гепатопротекторные, иммуномодулирующие и др. Грибы имеют большой потенциал для производства полезных биоактивных метаболитов и являются богатым лекарственным ресурсом, но при этом остаются практически неиспользуемым источником фармацевтических продуктов. В современных биотехнологиях используется только около 5% всех известных грибов [1]. Основная масса российских лекарственных препаратов, полученных из грибов, остается пока малодоступной из-за уровня их производства, который в достаточной мере не отвечает международным стандартам качества [2]. Одной из первостепенных и важных задач фунготерапии является выявление на региональном уровне видов лекарственных грибов, которые могут

быть использованы в дальнейшем для производства лекарств. В Республике Хакасия до настоящего времени подобные исследования не проводились.

Цель работы – представить информацию о лекарственных видах агариикоидных и гастероидных базидиомицетов, произрастающих в лесостепных сообществах Минусинских котловин, которые имеют широкое распространение на территории Республики Хакасия.

Объект и методы

Объектом исследования являются агариикоидные и гастероидные базидиомицеты, обладающие лекарственными свойствами, произрастающие в лесостепных сообществах Республики Хакасия. Изучение макромицетов проходило с 2010 по 2012 гг. на территории Минусинских котловин (Северо-Минусинской и Южно-Минусинской), включающей несколько районов Республики Хакасия – Богградский, Усть-Абаканский, Бейский и Аскизский. Для сбора образцов базидиальных макромицетов использовались маршрутный и стационарный методы. Сбор и гербаризацию материала проходили по стандартной методике с учетом требований современных определителей [3]. Определение гербарных образцов осуществлялось в лаборатории систематики низших растений ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) и на кафедре ботаники и общей биологии ХГУ (г. Абакан) с использованием микроскопов MBL, Zeiss и «Биомед». При рассмотрении микроскопических признаков применялся стандартный набор реактивов и красителей [4].