

На правах рукописи

Жаң —

КАВАЙ-ООЛ УРАНА НИКОЛАЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И
ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ В КОНТРОЛЕ РАЗВИТИЯ
РАСТЕНИЙ**

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

МОСКВА – 2012

Работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и в Институте общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН.

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Ежова Татьяна Анатольевна,
МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Тарасов Валентин Алексеевич,
Учреждение Российской академии наук
Институт аридных зон Южного
научного центра РАН, Ростов-на-Дону

доктор биологических наук, профессор

Соловьев Александр Александрович,
РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева,
Москва

доктор биологических наук, профессор

Чуб Владимир Викторович,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский
государственный университет

Защита диссертации состоится 29 марта 2012 года в 15.30 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д.3.

Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru, aspirantura@vigg.ru; Адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Губкина, д.3.

Автореферат разослан 29 февраля 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Синельщикова Татьяна Аркадьевна

Посвящается светлой памяти моих родителей

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Генетика развития растений является одним из фундаментальных направлений современной биологии, успехи которого во многом связаны с исследованиями на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. В последние годы становится все более понятным, что процессы морфогенеза – результат функционирования многих генов, которые могут взаимодействовать разным образом или действовать независимо. Работа многих генов контролируется внешними и внутренними сигналами, среди которых важнейшими являются фитогормональные. Действие фитогормонов, их способность регулировать экспрессию генов опосредована функционированием сигнальных путей (Тарчевский, 2002). Гены, кодирующие компоненты сигнальных путей, также находятся под сложным генетическим контролем организма в соответствии с внешними и внутренними условиями. Синтез самих фитогормонов, которые «запускают» сигнальные пути, также регулируется многими генами (Лутова и др., 2010). Действие ауксина, одного из важнейших гормонов, управляющих развитием растений на всех стадиях онтогенеза, зависит не столько от места его синтеза в растении, сколько от его полярного транспорта, который, в свою очередь, контролируется специальными генетическими системами (Galweiler et al. 1998; Friml, 2003; Benkova et al., 2003; Медведев, 1996; Чуб, 2010).

В настоящее время становится все более ясным, что плеiotропный эффект, который демонстрирует подавляющее большинство, а может быть и все гены контролирующие развитие, является результатом сложных взаимодействий между генами, контролирующими морфогенез. Под влиянием разных сигналов, включая гормональные, один ген может «включаться» на разных стадиях развития, контролируя морфогенез разных органов. Не удивительно, что у впервые описанных в конце 80-х – начале 90-х годов генов, контролирующих развитие, и после 20 - 30 лет интенсивных исследований обнаруживаются все новые функции.

Развитие растений, образование органов на протяжении всего жизненного цикла возможно благодаря функционированию апикальных меристем побега и корня, которые содержат стволовые клетки и являются источником клеток для создания органов (Батыгина, 2007; Иванов, 2011). Изучение взаимодействия генетических и фитогормональных факторов в контроле пролиферации клеток - важнейшая задача, решению которой сегодня уделяется особое внимание. Выявление генов, контролирующих пролиферацию клеток имеет важное практическое значение, поскольку открывает новые возможности для создания растений с новыми способами репродукции. В настоящее время благодаря исследованиям отечественных эмбриологов разработаны теоретические основы репродукции растений,

позволяющие прогнозировать генотип потомства, что открывает новые перспективы в управлении отдельными этапами онтогенеза (Батыгина и др., 2010). Основой для такого управления служит информация о генных и фитогормональных взаимодействиях, контролирующих разные типы репродукции.

Изучение взаимодействия генов и фитогормональных факторов в контроле развития растений является актуальным направлением исследований, поскольку позволяет объединить данные генетических и физиологических исследований, полнее исследовать функцию генов и их места в генных сетях морфогенеза, что является необходимой предпосылкой для создания моделей виртуального растения.

Анализ мутантов – эффективный инструмент генетики развития (Лутова и др., 2010). Коллекция *A.thaliana* кафедры генетики МГУ содержит уникальные мутанты с изменениями морфогенеза, которые были получены С.И. Янушкевичем, О.П. Солдатовой и Т.А. Ежовой. Исследования этих мутантов были начаты мной еще в 1992 году во время выполнения кандидатской диссертации на кафедре генетики МГУ, часть работы проведена в Тувинском университете и Институте общей генетики РАН, а основная часть исследований, выполнены на кафедре генетики за последние 8 лет, благодаря предоставленной возможности пребывания в докторантуре в ИОГен и стажировке на кафедре генетики МГУ и Международном учебно-научном биотехнологическом центре МГУ.

Цель исследования: изучение генетического контроля морфогенеза модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и выяснение роли взаимодействия генов и фитогормональных факторов в регуляции процессов развития.

Основное внимание уделено изучению функции гена *ABR/PID1*, контролирующего полярный транспорт ауксина, в регуляции морфогенеза побега, его взаимодействию с ключевыми генами морфогенеза, а также изучению функции ранее не исследованных генов, выявленных на основе анализа мутантов из коллекции кафедры генетики МГУ.

В связи с этим, решались следующие задачи:

1. Генетический анализ (особенности наследования, тесты на аллелизм, картирование) новых мутаций *ap1-20*, *lfy-107*, *lfy-109*, *fip1*, *fip2*, *fas4*, *er2*, *min2* из генетической коллекции *A. thaliana* кафедры генетики МГУ и изучение их влияния на морфогенез побега и цветка.

2. Анализ распределения активного ауксина в тканях растений *A.thaliana* дикого типа и мутантов с использованием репортерного гена β-глюкуронидазы (*GUS* - ген *uidA E.coli*), слитого с ауксинчувствительным промотором *DR5*.

3. Изучение генных взаимодействий на основе анализа фенотипа двойных мутантов и сравнительного изучения экспрессии в растениях дикого типа и мутантов репортерного гена β-глюкуронидазы, слитого с промоторными и регуляторными участками генов *LFY*, *API* и *KN1*.

4. Изучение влияния мутантных аллелей исследуемых генов на пролиферативную активность клеток с помощью репортерного гена β-

глюкуронидазы, слитого с промоторной и регуляторной участками гена циклина *CYCB1;1*.

5. Создание коллекции мутантных линий *A. thaliana*, содержащих в геноме конструкции *LFY::GUS*, *API::GUS*, *KN1::GUS*, *CYCB1;1::GUS*, *DR5::GUS*.

6. Создание модели генетической и гормональной регуляции морфогенеза побега и цветка *A. thaliana* с участием гена *ABR/PID1*, контролирующего полярный транспорт ауксина, и других генов, исследованных в диссертационной работе (*TAE*, *NA*, *FAS4*, *FIP1*, *FIP2*, *ER2* и *MIN2*).

Научная новизна. Выделены и охарактеризованы новые мутации, затрагивающие различные этапы развития модельного растительного объекта *A.thaliana*. Идентифицированы новые ключевые гены, контролирующие важнейшие этапы развития побега и цветка. Впервые показано, что ген *ABR/PID1*, контролирующий полярный транспорт ауксина, взаимодействует с генами *A.thaliana*, контролирующими как ранние (*LFY* и *API*), так и поздние (*AP2*, *AP3*, *PI*, *AG*) этапы формирования флоральной меристемы. Кроме совместного действия с гомеозисными генами *API* и *AP2* в I-II мутовках флоральной меристемы, ген *ABR/PID1* вместе с генами *AP3*, *PI* и *AG* участвует в формировании органов II - IV мутовок цветка. Ген *ABR/PID1* участвует и в контроле пролиферации клеток апикальной меристемы побега и флоральной меристемы, комплементарно взаимодействуя с генами *CLV*, *TAE* и *AG*.

Впервые исследованы мутации *fip1* и *fip2*, нарушающие дифференцировку листа и цветка *A. thaliana* и, по-видимому, затрагивающие процесс деления клеток в растениях. Установлено, что гены *FIP1* и *FIP2* совместно с генами *AS1* и *AS2* участвуют в контроле пролиферации клеток органов околоцветника.

Выявлен новый ген *FAS4*, контролирующий пролиферацию клеток апикальной меристемы побега и, совместно с генами *API* и *AP2*, участвующий в регуляции развития органов околоцветника. Впервые показано, что ген *NA* участвует в контроле деления клеток в апикальной меристеме и листьях. Установлено, что ген *LFY* и гомеозисные гены *API*, *AP2*, *AP3* и *AG*, а также ген *NA* влияют на распределение ауксина в органах растений *A. thaliana*.

Научно-практическая значимость работы. Показано, что мутация *abr* может служить удобной моделью для анализа влияния зависимых от температуры градиентов ауксина на процессы морфогенеза *A. thaliana*.

Путем скрещиваний и отборов создана новая коллекция мутантных линий, содержащих в геноме химерные гены *LFY::GUS*, *API::GUS*, *DR5::GUS*, *KN1::GUS* и *CYCB1;1::GUS*. Эти мутантные линии с химерными генами являются удобными моделями для изучения генетической регуляции морфогенеза растений, в том числе – и фитогормональными сигналами.

Результаты диссертационной работы интегрированы в лекции по генетике развития растений, которые читаются на кафедре генетики МГУ, и лекции по генетике растений для ТувГУ, а также используются на занятиях Большого практикума на кафедре генетики МГУ по изучению экспрессии ключевых генов

морфогенеза у *A. thaliana*. Ряд мутантов с соответствующими конструкциями из новой коллекции также переданы в Тувинский государственный университет.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на III съезде Всероссийского общества физиологов растений (Санкт-Петербург, 1993), II Международной конференции «Биология культивируемых клеток растений и биотехнология» (Алматы, 1993), на I, II, III и IV Съезде ВОГиС (Саратов, 1994; Санкт-Петербург, 2000; Москва, 2004; Москва, 2009), Международной конференции молодых ученых по фундаментальным наукам «Ленинские горы» (Москва, 1995), Российско-Германском совещании «Plant Molecular Biology and Biotechnology» (Санкт-Петербург, 1996), III Российской конференции «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2001), Международной конференции «Генетические коллекции, изогенные и аллоплазматические линии», (Новосибирск, 2001), XIV научной школе по биологии развития (Звенигород, 2005), симпозиуме «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 2007), конференции посвященной 300-летию со дня рождения К.Линнея (Луганск, 2007), Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века - фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2008), 35th FEBS Congress «Molecules of Life» (Gothenburg, Sweden, 2010), Всероссийской научной конференции «Апомиксис и репродуктивная биология» (Саратов, 2010), Всероссийской конференции с международным участием «Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии» (Иркутск, 2010), Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Украина, 2010), Международной научной конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии» (Москва, 2011), III Международной научно-практической конференции «Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона» (Кызыл, Тува, 2011).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 32 работы, в том числе 16 статей в журналах из Перечня, утверждённого ВАК РФ.

Декларация личного участия автора. Автором обновлена коллекция *A. thaliana* кафедры генетики МГУ, выполнены морфологический, генетический, физиологический анализ диких и мутантных форм *A. thaliana*. Путем скрещиваний создана 32 новая линия мутантных форм содержащих в геноме химерные гены для использования в научных и учебных целях. В создании этих линий также принимали участие студенты и аспиранты Е. Полковниченко и Ву Чанг, которых автор диссертации обучал методам работы по созданию этих линий и их использованию для анализа экспрессии генов.

Картированы 4 новых гена (*FIP1*, *ER2*, *FAS4*, *MIN2*), сформулированы гипотезы о функции каждого из них. Автором получены данные по генетическому картированию с использованием морфологических маркёров. Эти данные и гибридные популяции растений явились основой для молекулярно-генетического картирования с использованием ДНК-маркёров для проведения более тонкого картирования в пределах группы сцепления другими сотрудниками, аспирантами и

студентами группы генетики развития растений МГУ. Благодаря исследованиям н.с. Е.В. Куприяновой, аспиранта Е.В. Альберта, студентов Т.Ю. Прошляковой и А.Д. Солтабаевой сегодня подтверждена и уточнена локализация генов *FIP1*, *ER2*, *FAS4*.

Получен фонд электронных микрофотографий диких рас и мутантов *A.thaliana*. Предложена модель генетической и гормональной регуляции роста и развития цветка и побега растений с участием исследованных в диссертационной работе генов *A. thaliana*. Проведена статистическая обработка результатов. Суммарное личное участие автора составило 90%.

Связь с государственными научными программами, участие в выполнении грантов. Работы выполнены при поддержке грантов РФФИ №07-04-01515-а и 10-04-00859-а.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 334 страницах, включает 26 таблиц и 144 рисунков, введение, 3 главы, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, а также общее заключение, выводы и список литературы (333 источника).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Мутация *abr* является удобной моделью для анализа влияния зависимых от температуры градиентов ауксина на процессы морфогенеза. Путем изменения температуры выращивания растений мутанта можно изменять распределение и содержание активного ауксина по тканям растения *A. thaliana* (в цветке и листе).

2. С использованием трансгенов *35S::API*, *API::GUS* и *DR5::GUS* и мутаций *apl-1*, *apl-20* и *abr* впервые показано, что градиенты ауксина определяют пространственные особенности экспрессии гена *API*.

3. Ген *LFY* и гомеозисные гены *API*, *AP2*, *AP3*, *AG* оказывают влияние на распределение полярного транспорта ауксина в растениях *A. thaliana*.

4. С использованием трансгенов *API::GUS* и *LFY::GUS* выявлено влияние гена *TAE* на экспрессию генов *LFY* и *API*, контролирующей образование флоральной меристемы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В I-ой части обзора литературы рассматриваются особенности развития цветка *A. thaliana* и использование коллекции мутантов этого модельного объекта для изучения генетического контроля морфогенеза цветка. В этой части представлены стадии формирования флоральной меристемы и рассмотрена роль генов *LFY*, *API* и *CAL* в развитии флоральной меристемы, а также участие гомеозисных генов в регуляции типа органов цветка *A.thaliana* и молекулярные механизмы их действия. Во II-ой части уделяется внимание генетическому контролю поддержания апикальной меристемы побега (на эмбриональной и постэмбриональной стадиях развития), функции генов *WUS/CLV* и фитогормонов в этом процессе. III часть посвящена генетической регуляции полярного транспорта ауксина и его роли в контроле

морфогенеза побега. В том числе, важное внимание уделено гену *ABR/PID1*, изучение которого входило в задачи данной работы.

Глава 2. Материалы и методы

Растительный материал. В работе продолжены исследования мутантов *abr*, *na* и *tae* из коллекции *A. thaliana* кафедры генетики МГУ (линии К-150, К-164 и К-122, соответственно; Янушкевич, 1985). Кроме того, исследованы 8 новых мутантов: *ap1-20* (К-200), *lfy* (К-107 и К-109), *fas4* (М-21-2), *fip1* (М-40-1), *fip2* (М-40-2), *er2* (М-21-1) и *min2* (Т-38-26). Морфометрию проводили, сравнивая мутанты с дикими расами, на основе которых выделены мутанты: Dijon-M (Di-M, линия К-1), Enkheim-M (En-M, К-2), Blanes-M (Bl-M, К-6), Columbia-M (Col-M, К-8) и *Ler*. Для теста на аллелизм и/или изучения взаимодействия генов использовали мутанты: *as1* (К-102), *sa* (К-118), *vaf/ap2-14* (К-217), *clv1* (К-205), а также *lfy5* (CS6235), *lfy10* (CS6279), *ag-1* (CS25), *ap3-1* (CS3085), *pi-1* (CS77), *clv2* (CS46), *clv3* (CS8066) и *fas1-1* (CS265, из *Arabidopsis* Biological Resource Center). Для локализации мутаций использовали множественно маркированные линии: К-310 (МГУ), mm1L, mm1R, mm2, mm4 и mm5 (из Института генетики растений; г. Гатерслебен, Германия). Для изучения влияния мутаций на экспрессию генов *API*, *LFY*, *KN1* исследуемые мутанты скрещивали с трансгенными линиями, содержащими регуляторные участки этих генов, слитые с репортерным геном β-глюкуронидазы: *API::GUS* (CS8848), *LFY::GUS* (CS6297; оба из ABRC) и *KN1::GUS* (любезно предоставленную профессором В.Б. Ивановым, ИФР им. К.А. Тимирязева РАН). Для изучения распределения активного ауксина в растении для скрещиваний использовали линию *DR5::GUS*, а для детекции активных делений клеток – трансгенную линию *CYCB1;1::GUS* (ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, предоставлена профессором В.Б. Ивановым).

Условия выращивания. Растения выращивали в смеси почвы и песка (2:1) в теплице и на агаризованной среде (Квитко, 1960) в лабораторных установках при температуре 26°C и фотопериоде 16 час.

Морфометрический анализ. Все морфометрические измерения проводились не менее чем на 10 растениях. Среднее число органов цветка и число дополнительных цветков рассчитывали для 10-ти цветков, расположенных базально на главном цветоносе (с 1-го по 10-й цветки). В отдельных случаях (для мутаций *abr* и *ap1*) учитывали раздельно цветки 1-5 и 6-10. Измерение размера эпидермальных клеток проводили на изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии. В исследованиях использовали аналитический сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LA (фирмы “Jeol”, Япония) и СЭМ S-405A (“Hitachi”, Япония) с ускоряющим напряжением 15кВ. Достоверность различий между средними значениями морфометрических показателей определяли с использованием критерия Стьюдента (Лакин, 1990). В табл.6-7 указаны квадратичные отклонения от средних, а в табл. 5 - ошибки.

Метод определения активности репортерного гена *GUS*. Для анализа активности *GUS* использовали гистохимический метод (Jefferson et al., 1987). В

качестве субстрата для определения использовали X-gluc (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) фирмы Dushefa. Перед окрашиванием отдельные части растения помещали в раствор X-gluc (конечные концентрации 1мМ и 2мМ для оценки, соответственно, высокого или слабого уровней экспрессии трансгенов) и инкубировали в темноте в термостате при 37⁰С от 24 до 42 часов. Образцы помещали в 70% этанол для удаления хлорофилла, после чего ткани анализировали с помощью микроскопа. Этот метод позволяет определять место экспрессии генов и по интенсивности окрашивания качественно оценивать уровень экспрессии.

Анализ генных взаимодействий. Во всех вариантах скрещиваний в F₂ анализировали расщепления. Экспериментальные данные соответствовали либо теоретическому расщеплению 9:3:3:1 (для случаев отсутствия взаимодействия и при комплементарном взаимодействии), либо расщеплению 9:3:4 (при рецессивном эпистазе). Фенотип двойных мутантов анализировали в F₂-F₄ поколениях по сравнению с родительскими формами.

Генетическое картирование с использованием морфологических маркеров.

Для обнаружения сцепления генов использовали метод разложения χ^2 на компоненты (Серебровский, 1970). Частоту рекомбинации определяли методом произведений (Серебровский, 1970). Для преобразования % рекомбинации в сМ использовали функцию Косамби (Захаров, 1979). Результаты локализации 4 новых генов *FIP1*, *ER2*, *MIN2* и *FAS4* показаны в табл. 1.

Табл. 1. Локализация 4 новых генов (*FIP1*, *ER2*, *MIN2* и *FAS4*) *A. thaliana*

Исследуемый ген	Группа сцепления и маркерные гены (положение на карте, сМ)	Фенотипы F ₂				χ^2			D (сМ)
		AB	Ab	aB	ab/ Σ	A	B	L	
<i>FIP1</i>	I. <i>AN</i> (0)	208	92	64	5/369	7.8*	0.4	13.9**	29.0 ± 0.002
<i>ER2</i>	I. <i>AS2</i> (85)	108	50	67	9/234	8.9*	0.17	12.5**	39.64 ± 2.53
	I. <i>AP1</i> (99)	49	27	21	0/97	0.58	0.42	10.3**	21.18 ± 0.01
	I. <i>GL2</i> (118)	71	38	37	2/148	0.14	0.32	14.0**	22.42 ± 4.32
<i>MIN2</i>	I. <i>AP1</i> (99)	107	43	46	0/196	0.14	0.7	13.0**	16.58 ± 4.41
<i>FAS4</i>	II. <i>ER1</i> (48)	170	70	76	9/325	0.45	3.7	12.0**	35.5 ± 0.001

Примечание: A, a - аллели исследуемого гена; B, b - аллели маркерной мутации, L - связь генов A и B (Серебровский, 1970). Компоненты χ^2_A и χ^2_B рассчитаны для выявления отклонения расщеплений от моногенного по каждому из анализируемых генов A, B и χ^2_L - для выявления независимости расщеплений по A и B (Серебровский, 1970); D - расстояние (сМ) с поправкой Косамби, Σ - всего растений; *, ** - различия достоверны при P > 0.95 и P > 0.99, соответственно.

Физиологические методы. Для определения чувствительности к гиббереллину растения, начиная со стадии 4-х листной розетки, опрыскивали 50µМ водным раствором ГА₃ или водой 3 раза в неделю в течение месяца. После 2-х недельного выращивания растения описывали. Содержание активного ауксина в тканях растений *A. thaliana* определяли с помощью конструкции *DR5::GUS*.

Работа с мутантами проводилась по следующей схеме (рис. 1):



Рис. 1. Схема экспериментов по исследованию мутантов.

Глава 3. Результаты и обсуждение

РАЗДЕЛ 1. Роль гена *ABR/PID1* в регуляции морфогенеза *A. thaliana*

1.1. Особенности морфологии мутанта *abr* и изучение влияния мутации *abr* на распределение активного ауксина

Показан плейотропный эффект рецессивной мутации *abruptus* (*abr*, К-150, МГУ) на развитие всех элементов побега (лист, цветонос, цветок) и температурозависимое проявление фенотипа мутанта (Ондар, Высоцкий, 1994; Ежова, Ондар и др., 1997). При пониженной температуре (21-26°C) растения мутанта формируют многолепестковые цветки, но после формирования 1-5 (при 24-26°C) или 8-12 цветков (при 21-23°C) цветонос превращается в булавковидную структуру и его развитие прекращается. При 27-29°C наблюдается высокая экспрессивность мутантного признака и булавковидный цветонос полностью лишен цветков.

Влияние мутации *abr* на распределение активного ауксина в растениях изучали с использованием трансгенной линии *A. thaliana*, в геноме которой имеется трансгенная конструкция *DR5::GUS*, полученная путём слияния синтетического ауксин-чувствительного промотора *DR5* с репортерным геном β-глюкуронидазы (Ulmasov et al., 1997). Наблюдения вели на всех стадиях развития растений. В растениях дикого типа, выращенных при температуре 24-26°C, активность слитого гена *DR5::GUS* наблюдали в локальных участках листьев розетки (в кончиках зубчатых выростов

листа) ювенильных 2-х-недельных и цветущих 5-ти-недельных растений (рис. 2а), а также в стеблевых листьях, развивающихся на цветоносах (Кавай-оол, Ежова, 2010). Наибольший уровень экспрессии *DR5::GUS* наблюдали в тычинках распускающихся бутонов и самых молодых цветках (рис. 2б). В условиях повышенной температуры (27-29°C) экспрессия *DR5::GUS* в растениях дикого типа становилась ниже, чем в растениях, которые постоянно росли при 24-26°C. Эти данные можно объяснить влиянием температуры на биосинтез ауксина (Zhao et al., 2002).

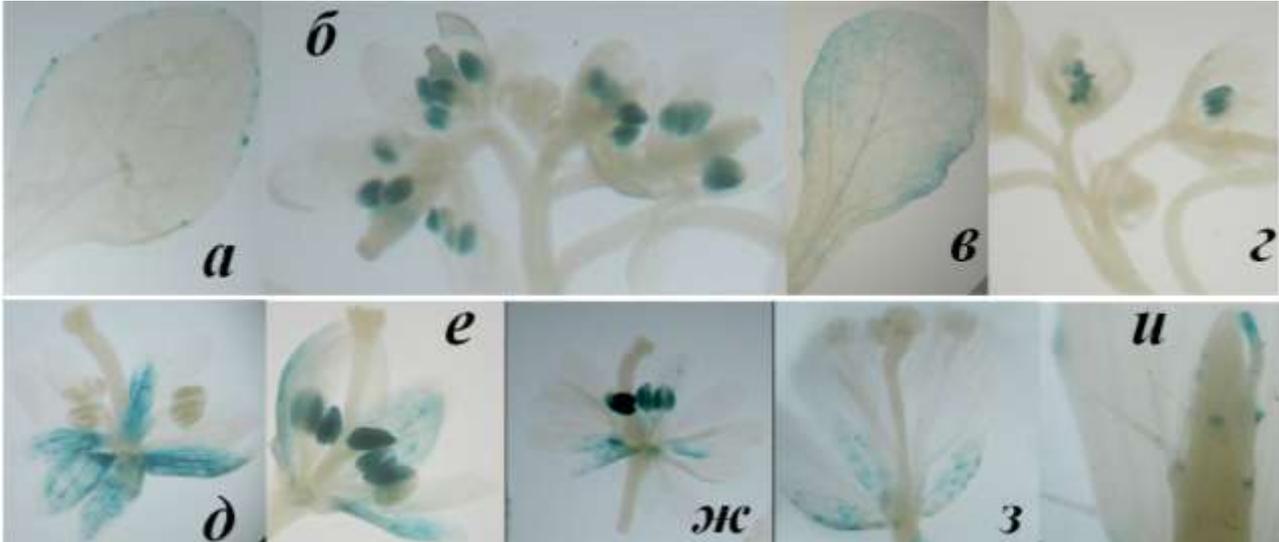


Рис. 2. Экспрессия трансгена *DR5::GUS* в растениях дикого типа (гомозиготы по нормальному аллелю гена *ABR/PID1* - а, б) и мутанта *abr* (в-и). в, г, д – выращивание при низкой, е, ж, з - высокой температурах; и - при переносе мутанта с высокой в низкую температуры (показана верхушка булавковидного цветоноса *abr*, где видны локальные сайты накопления ауксина в местах закладки неразвившихся примордиев цветков).

В растениях мутанта *abr* экспрессия *DR5::GUS* при 24-26°C во всех органах была выше, чем в растениях дикого типа. В листьях накопление ауксина наблюдали не только в гидатодах, но и по краю всей пластинки листа, а также по всей площади листа (рис. 2в). Основным местом экспрессии *DR5::GUS* в цветках мутанта, как и в цветках дикого типа, были тычинки (рис. 2г, е, ж). Существенный уровень экспрессии *DR5::GUS* отмечался и в чашелистиках молодых цветков (рис. 2д), 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 (27-29°C) уровень активности репортерного гена в растениях мутанта (рис. 2е, ж) увеличивался по сравнению с 24-26°C (рис. 2г, д), а пространственные особенности экспрессии оставались практически неизменными. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с усилением экспрессивности фенотипического проявления мутации *abr* при выращивании растений в условиях повышенной температуры. 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 (Калинина и др., 2000; Ежова и др., 2000). Кроме того, выявленное с помощью анализа экспрессии *DR5::GUS* накопление ауксина в листьях розетки (рис. 2в) и стебля мутанта *abr* хорошо соответствуют обнаруженным ранее данным об увеличении в 1.5 – 3 раза содержания ауксина в листьях розетки и базальной части цветоноса (где формируются стеблевые листья) у мутанта по сравнению с растениями дикого типа (Ежова и др., 2000).

Таким образом, благодаря использованию химерного гена *DR5::GUS* нам удалось детально исследовать влияние мутации *abr*, нарушающей транспорт ауксина в побегах, на распределение ауксина в растениях. Показано, что путем изменения температуры выращивания растений можно изменять распределение и содержание активного ауксина по тканям растения *A. thaliana*, что позволяет рассматривать мутант *abr* как модель для анализа влияния зависимых от температуры градиентов ауксина на процессы морфогенеза.

1.2. Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *LFY* и изучение влияния мутации *abr* на экспрессию трансгена *LFY::GUS*

Ранее на основании изучения фенотипа двойного мутанта *abr lfy-10*, был сделан вывод об эпистазе мутантного гена *abr* над геном *lfy-10* на самой ранней стадии формирования меристемы цветка - разметке его положения (Ежова и др., 2000). Нами установлено, что если растения выращиваются при повышенной температуре эпистаз наблюдался и в скрещиваниях *abr* с другими аллелями гена *LFY* (*lfy-5*, *lfy-107*, *lfy-109* - фенотипическое расщепление в F₂ соответствовало расщеплению 9 частей дикого типа : 3 частей *lfy* : 4 части *abr*).

В пользу эпистатического взаимодействия генов на ранних этапах разметки флоральной меристемы свидетельствуют и данные по изучению экспрессии гена *LFY* в растениях мутанта *abr*. Нами показано, что мутация *abr* приводит к снижению уровня транскрипции гена *LFY* в верхушках цветоносов (данные ПЦР-РВ, Лебедева, Ондар и др., 2005). Отсутствие экспрессии гена *LFY* в булавковидном цветоносе подтверждено и анализом экспрессии трансгена *LFY::GUS* у мутанта *abr* (рис. 3). Мы не обнаружили экспрессии *LFY::GUS* в верхушке цветоноса мутанта (рис. 3б, в), где он наиболее активно экспрессируется у дикого типа (рис. 3а); уровень экспрессии *LFY::GUS* в листе – существенно выше (рис. 3г, д). Эти данные свидетельствуют о важной роли гена *ABR/PID1* в определении места и уровня экспрессии гена *LFY*.

Продукт гена *ABR/PID1* – протеинкиназа (не транскрипционный фактор), поэтому участие гена *ABR/PID1* в регуляции транскрипции *LFY*, по-видимому, опосредовано влиянием гена *ABR/PID1* на создание локальных градиентов ауксина в растении. При отсутствии продукта *ABR/PID1* у мутанта *abr*, выращенного при повышенной температуре, нарушается образование локальных градиентов ауксина, размечающих положение будущих цветковых примордиев, поэтому цветонос лишен

цветков и похож на булавку. Только при перенесении мутанта в условия пониженной температуры можно увидеть скопления ауксина в локальных участках цветоноса, которые обуславливают возможность развития отдельных цветков (рис. 2*u*).

По результатам анализа экспрессии *DR5::GUS*, основным местом накопления ауксина в растениях мутанта *abr* является лист (рис. 2*в*) и, именно в листе мы наблюдали также максимальный уровень экспрессии *LFY::GUS* (рис. 3*е*), что свидетельствует о важной роли ауксина в регуляции транскрипции гена *LFY*. Недавно в промоторе гена *LFY* был обнаружен ауксин-регулируемый элемент *AuxRE*, который узнается белками ARF (Auxin Response Factors; Bai, deMason, 2008), что подтвердило наши выводы. Таким образом, в основе эпистатического взаимодействия генов *ABR/PID1* и *LFY*, которое детектируется при повышенной температуре, приводящей к полному нарушению остаточной функции мутантной аллели *abr*, лежит способность гена *ABR/PID1* через создание ауксиновых градиентов влиять на уровень транскрипции гена *LFY*.

При выращивании больших выборок растений при пониженной температуре (21-23°C) в F₃ от скрещивания мутанта *abr* с *lfy-10* наблюдали единичные растения двойного мутанта, имеющие одиночные цветки сильно измененной морфологии, что указывало на комплементарное взаимодействие генов на более поздних стадиях развития цветка. Для детального изучения этого вопроса при пониженной температуре выращивали F₂ – F₄ от скрещивания *abr* с аллелью *lfy-107* из коллекции кафедры генетики МГУ, имеющей более низкую экспрессивность. В F₂ наблюдали расщепление 9:3:3:1, поскольку растения двойного мутанта *abr lfy-107* формировали одиночные цветки, состоящие из единичных пестикоподобных органов (1-3 цветка на главном цветоносе). Такой же фенотип имели двойные мутанты *abr lfy-10*. Эти данные подтверждают предположение о комплементарном взаимодействии генов *ABR/PID1* и *LFY* в контроле морфогенеза цветка.



Рис. 3. Экспрессия *LFY::GUS* в растениях дикого типа (*a*, *с*) и мутанта *abr* (*б*, *в*, *д*). Верхушки цветоносов растений дикого типа (*a*) и мутанта *abr* (*б*, *в*) с низкой (*б*) и высокой (*в*) экспрессивностями мутантных признаков (*б*, *в* - булавковидные окончания отмечены стрелками).

По-видимому, пониженная температура, приводит к сохранению остаточной функции аллели *abr* и позволяет растениям перейти с критической стадии разметки флоральных примордиев на стадию развития цветка, где *ABR/PID1* комплементарно взаимодействует с геном *LFY*.

Таким образом, на разных стадиях морфогенеза наблюдается разный тип взаимодействия генов *ABR/PID1* и *LFY*. Если на ранней стадии разметки положения примордия цветка ген *ABR/PID1* эпистатичен по отношению к *LFY*, и через создание ауксиновых градиентов влияет на уровень экспрессии *LFY*, то на стадии формирования органов цветка гены действуют комплементарно. Такой тип взаимодействия можно объяснить тем, что не только ген *ABR/PID1*, но и сам ген *LFY* важен для создания градиентов ауксина. Этот вывод был сделан ранее с помощью анализа транспорта ИУК в стеблях мутанта *A.thaliana lfy* (Ока et al., 1998). С помощью изучения экспрессии *DR5::GUS* в растениях мутантов *lfy-107* и *lfy-109* (коллекция МГУ) мы подтвердили эти данные. Как и у мутанта *abr* мы обнаружили накопление ауксина в семядолях и листьях розетки мутантов *lfy*. В цветке обнаружено снижение экспрессии трансгена *DR5::GUS*. Поскольку пыльники являются главным сайтом накопления ауксина в цветке их недоразвитие у мутантов *lfy* должно влиять на транспорт гормона (Кавай-оол, 2011).

1.3. Взаимодействие гена *ABR/PID1* с генами А-, В- и С-классов, контролирующими развитие органов цветка

Как известно, ген *LFY* является активатором транскрипции гомеозисных генов, контролирующих развитие органов цветка в соответствие с генетической схемой, названной ABC-модель. Ранее мы выявили взаимодействие гена *ABR/PID1* с генами А-класса *AP1* и *AP2* (Ежова, Ондар и др., 1997). В данной работе продолжено изучение взаимодействия гена *ABR/PID1* с гомеозисными генами (*AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI* и *AG*). Отметим, что при выращивании популяции F₂ при повышенной температуре (более 27°C), мутация *abr* полностью эпистатична по отношению к мутациям *ap1*, *vaf*, *ap2-1*, *ap3-1*, *pi-1* и *ag-1*. Отличить двойные мутанты от мутантов *abr* невозможно. При температуре 21-23°C в F₂ наблюдали независимое дигенное расщепление 9:3:3:1, причём, у двойных мутантов *abr ap1*, *abr vaf*, *abr ap2-1*, *abr ap3-1*, *abr pi-1* и *abr ag-1* наблюдали новые морфологические признаки, отсутствующие у единичных мутантов, что свидетельствует о взаимодействии генов.

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *AP1* и изучение влияния мутации *abr* на экспрессию трансгена *AP1::GUS*. Мы провели анализ взаимодействия генов *ABR/PID1* и *AP1* с использованием аллелей *AP1* с разной экспрессивностью. В исследовании использовали аллель *ap1-20* (К-200, МГУ) с самой низкой экспрессивностью, несущую делецию 21 нуклеотида в области, кодирующей К-домен (Ондар, Ву, Ежова, 2008), «мягкую» аллель *ap1-3*, «промежуточную» аллель *ap1-6* и самую «сильную» аллель *ap1-1* (из коллекции ABRC). Среди всех использованных аллелей только обнаруженная нами аллель *ap1-20* сохраняет

околоцветник (рис. 4а). Общими признаками для всех аллелей *ap1* являются дополнительные цветки в пазухах органов I мутовки (листья и брактей), а для аллелей *ap1-3*, *ap1-6* (табл. 2) и *ap1-1* отсутствие (частичное или полное) лепестков. У *ap1-20* наблюдается и существенная редукция тычинок (III мутовка; табл. 2).

Табл. 2. Число цветков на цветоножку и доля редуцированных органов (%) в I – IV мутовках нижних/верхних цветков дикого типа и мутантов *ap1-6*, *ap1-3* и *ap1-20*

Линия	Число цветков на цветоножку	Редуцированные органы в мутовке, %			
		I	II	III	IV
Di-M (50/50)	1.0 / 1.0	0 / 0	0 / 0	0.5 / 0.3	0 / 0
<i>ap1-6</i> (50/50)	2.52 / 2.6	82 / 80.5	85 / 83	6.7 / 7.0	1.0 / 0.5
<i>ap1-3</i> (50/50)	2.94 / 1.2	76 / 85	73.5 / 85	13.3 / 10	0* / 0
<i>ap1-20</i> (50/44)	4.2 / 2.6	59 / 73.9	79 / 80.7	37 / 48.5	0* / 0

Примечание: в скобках - число проанализированных нижних/верхних цветков, *- в нижних цветках изредка наблюдали развитие дополнительных плодolistиков (менее 1% у *ap1-20* и около 2% - у *ap1-3*).

Общим признаком для всех двойных мутантов *abr ap1* (рис. 4б-г) является отсутствие органов околоцветника (I и II мутовки). Обнаружено также влияние мутантных аллелей *ap1* на формирование органов генеративной сферы мутанта *abr* (рис. 4б-г; Кавай-оол, Куприянова, Ежова, 2011). Фенотип двойных мутантов указывает на комплементарное взаимодействие генов *ABR/PID1* и *AP1*. Для выяснения природы взаимодействия генов проведен анализ экспрессии гена *AP1* в растениях мутанта *abr*.

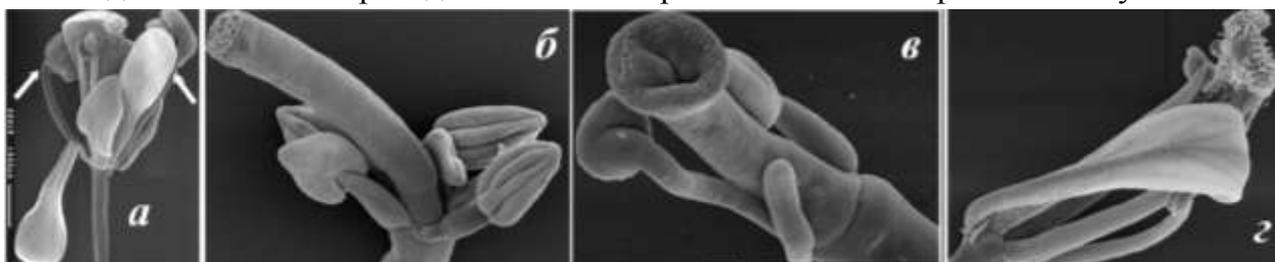


Рис. 4. Цветки одиночного мутанта *ap1-20* (а) и двойных мутантов *abr ap1-20* (б), *abr ap1-6* (в) и *abr ap1-1* (г).

Анализ экспрессии *AP1::GUS*. Экспрессия гена *AP1::GUS* в мутанте *abr* была существенно выше (рис. 5б, г), чем в растениях трансгенной линии (рис. 5а, в). В цветках мутанта экспрессию *AP1::GUS* наблюдали не только в органах околоцветника, но и в репродуктивных структурах (рис. 5б). Более того, можно увидеть его повышенную экспрессию и в листьях (рис. 5г), чего не наблюдается в растениях дикого типа (рис. 5в).

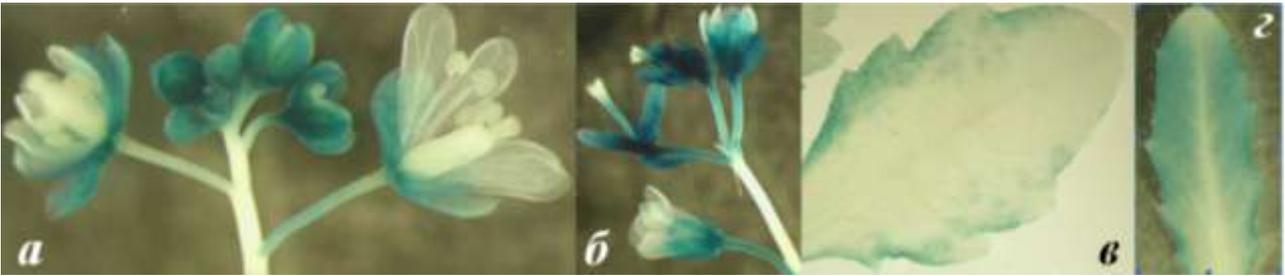


Рис. 5. Экспрессия *AP1::GUS* в растениях дикого типа (*а, в*) и мутанта *abr* (*б, г*).

Расширение доменов экспрессии гена *AP1* в растениях мутанта *abr* приводит и к увеличению общего уровня транскрипции *AP1* в молодых цветках более чем в 3 раза (данные метода ПЦР-РВ, Кавай-оол и др., 2010). Следовательно, ген *ABR/PID1* участвует в ограничении домена экспрессии *AP1* в репродуктивных органах и подавляет его экспрессию в листьях (Кавай-оол и др., 2010). Таким образом, основой комплементарного взаимодействия генов *ABR/PID1* и *AP1* при развитии цветка является их совместное участие в контроле развития органов: ген *AP1* участвует в определении типа органов околоцветника, а ген *ABR/PID1* не только размечает положение органов, но и ограничивает домены экспрессии *AP1* в цветке и вегетативных органах. Определенный вклад в это взаимодействие ген *AP1*, как и ген *LFY*, вносит посредством влияния на распределение ауксина в растениях. Это показано путем анализа распределения ауксина в растениях *ap1-20 DR5::GUS*, *ap1-1 DR5::GUS* и *abr ap1-1DR5::GUS*. Выявлено существенное накопление ауксина в листьях розетки *ap1-20* (рис. 6б) и *ap1-1* (рис. 6г). В цветках одиночных мутантов *ap1* ауксин накапливается в пыльниках (рис. 6а, в), как и в цветках дикого типа. У двойных мутантов *abr ap1-20* и *abr ap1-1* отмечается лишь следовой уровень экспрессии *DR5::GUS* в тычинках (рис. 6д, е), в то время как в листьях розетки (рис. 6ж) уровень экспрессии трансгена был очень высоким (выше, чем у остальных мутантов, за исключением мутанта *ap1-20*).

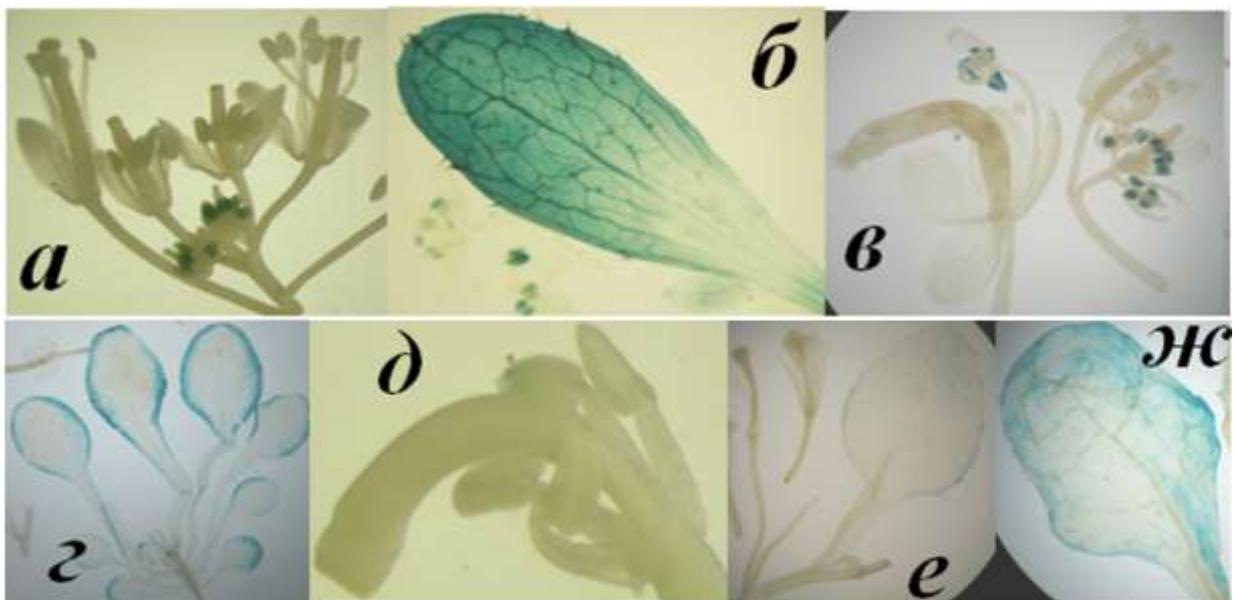


Рис. 6. Экспрессия *DR5::GUS* в растениях *ap1-20* (*а, б*), *ap1-1* (*в, г*) и *abr ap1-20* (*д*), *abr ap1-1* (*е, ж*).

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *AP2*. Цветки двойных мутантов *abr vaf* (*vaf* или *ap2-14* - аллель гена *AP2* с сильной экспрессивностью) и *abr ap2-1* (*ap2-1* – «мягкая» аллель) лишены околоцветника и имели частичную редукцию органов III мутовки (табл. 3), что свидетельствует о комплементарном взаимодействии доминантных аллелей дикого типа генов *AP2* и *ABR/PID1* в контроле развития органов околоцветника.

Табл. 3. Среднее число органов I - IV мутовок цветков мутантных растений *A.thaliana* и доля органов определенного типа (%) в мутовке в цветках дикого типа, одиночных мутантов *abr*, *vaf*, *ap2-1* и двойных мутантов *abr vaf*, *abr ap2-1*

Мутовка, органы	Di-M (50)	<i>abr</i> (90)	<i>vaf</i> (48)	<i>abr vaf</i> (50)	<i>ap2-1</i> (47)	<i>abr ap2-1</i> (50)
I. Всего органов	4.0	1.8	3.1	0	3.8	2.0
Чашелистики	100	100	0	0	0	0
Листья	0	0	25	0	100	25
Плодолистики	0	0	70	0	0	59
Филаменты	0	0	5	0	0	16
II. Всего органов	4.0	5.4	0	0	3.6	0
Лепестки	100	100	0	0	1.1	0
Лепестко-тычинки	0	0	0	0	98.9	0
Филаменты	0	0	0	0	0	0
III. Всего органов	5.6	3.0	1.3	0.2	5.1	3.7
Тычинки	100	84	95	60	100	100
Пестико-подобные структуры	0	0	0	40	0	0
Филаменты	0	16	5	0	0	0
IV. Всего органов	2.0	0.5	2.0	0.3	2.0	0.4
Плодолистики	100	100	100	100	100	100

Примечание: здесь и в табл.4 слева под каждым генотипом показаны среднее число органов, справа - % органов разных типов. В скобках - число проанализированных цветков. I-IV – мутовки.

По-видимому, ген *AP2* определяет типы органов I и II мутовок, а ген *ABR/PID1* – положение и размер органов. Согласно предсказаниям математической модели, описывающей развитие цветка *A.thaliana* (Скрябин и др., 2006), определение типа органов цветка предшествует разметке их будущих позиций. Можно предполагать, что отсутствие нормальных продуктов генов *AP2* и *ABR/PID1*, приводящее к нарушению обоих процессов, вызывает редукцию околоцветника у двойного мутанта. Методом ПЦР-РВ показано 2-кратное увеличение уровня транскрипции гена *AP2* в цветках мутанта *abr*. Возможно, что это усиление могло вызывать образование большого числа лепестков у мутанта. В цветках двойных мутантов *abr ap2* восстановления образования лепестков не происходило, т.к. усиление транскрипции мутантных аллелей, вероятно, не может вызвать нормализацию определения типа органов (Кавай-оол и др., 2010).

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с генами *AP3* и *PI*. У двойных мутантов *abr pi-1* и *abr ap3-1* обнаружены не количественные изменения органов, а изменения их типов в III мутовке (табл. 4). Вместо тычинок, которые развивались у *abr* (рис. 7б), а также тычинок и тычинко-плодолистиков, которые формировались у температурочувствительных мутантов *pi-1* и *ap3-1* (рис. 7в, г), у двойных мутантов образовывались филаменты (рис. 7е) или филаменты с рыльцевой тканью (рис. 7д).

Табл. 4. Среднее число органов I - IV мутовок цветков мутантных растений *A. thaliana* и доля органов определенного типа (%) в мутовке в цветках дикого типа, одиночных мутантов *abr*, *ap3-1*, *pi-1* и двойных мутантов *abr ap3-1* и *abr pi-1*

Мутовка, органы	Di-M (50)	<i>abr</i> (90)	<i>ap3-1</i> (50)	<i>abr ap3-1</i> (50)	<i>pi-1</i> (50)	<i>abr pi-1</i> (50)
I. Всего органов	4.0	1.8	4.0	4.4	4.0	3.8
Чашелистики	100	100	100	100	100	100
II. Всего органов	4.0	5.7	4.0	7.2	4.0	8.5
Лепестки	100	100	0	0	0	0
Чашелистики*	0	0	100	100	100	100
III. Всего органов	5.3	3.0	4.3	2.8	4.4	2.9
Тычинки	100	84	64	0	14	0
Тычинко-плодолистки**	-	-	-	-	-	-
	0	0	33	0	32	0
Палочковидные пестики	0	0	0	18	0	73
Филаменты	0	16	3	82	54	27
IV. Всего органов	2.0	0.5	2.0	0.01	2.0	0.06
Плодолистки	100	100	100	100	100	100

Примечание: * - чашелистики II мутовки более крупные по размеру, но более тонкие, чем органы I мутовки; ** - тычинки с воронковидными плодолистиковыми тканями (рыльцевая ткань, семязпочки) в составе считали тычинко-плодолистками.

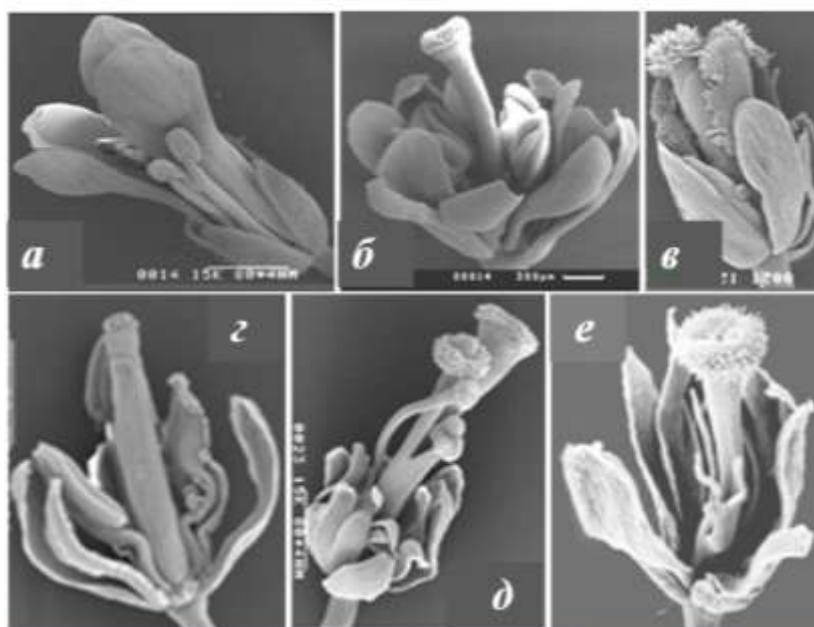


Рис. 7. Цветки дикого типа (а), одиночных мутантов *abr* (б), *pi-1* (в), *ap3-1* (г) и двойных мутантов *abr pi-1* (д), *abr ap3-1* (е).

Влияние мутации *abr* на экспрессивность мутаций *ap3-1* и *pi-1* свидетельствует о том, что ген *ABR* участвует в контроле развития тычинок вместе с генами *AP3* и *PI*. Ранее было показано, что ауксин играет важную роль в развитии тычинок. У мутантов с нарушением синтеза ауксина снижено число тычинок, и их развитие нарушено (Cheng, et al., 2006). Снижение числа тычинок характерно и для мутанта *abr* (Кавай-оол и др., 2010). По-видимому, нормальное распределение ауксина по клеткам флоральной меристемы, которое осуществляется под контролем гена *ABR/PID1*, является важным условием реализации программы развития тычинок, которая запускается под действием генов В-класса *AP3* и *PI*. Среди них имеются и регулируемые ауксином, например, ген *DRNL*, имеющий три регулируемых ауксином элемента *AREs* (Nag, et al., 2007). Снижение их активности может приводить к нарушению развития тычинок, которое наблюдается у мутантов *ap3-1* и *pi-1* при выращивании растений в условиях пониженной температуры (Кавай-оол и др., 2011).

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *AG*. Выявлено комплементарное взаимодействие гена *AG* с геном *ABR/PID1*. У двойного мутанта *abr ag-1* наблюдается существенное усиление пролиферации клеток ФМ и образование ветвящихся побегоподобных цветков (табл. 5; рис. 8 в-д).

Табл. 5. Особенности строения цветков у двойного мутанта *abr ag-1* и родительских линий

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

Эти данные указывают на участие гена *ABR/PID1* в ограничении пролиферации стволовых клеток ФМ. Выявленное в цветках мутанта *abr* повышение уровня транскрипции гена *WUS* (3-кратное), а также нарушение распределения ауксина, позволяют предполагать, что ген *ABR/PID1*, контролируя транспорт ауксина, участвует в определении доменов экспрессии гена *WUS* (Кавай-оол и др., 2011).

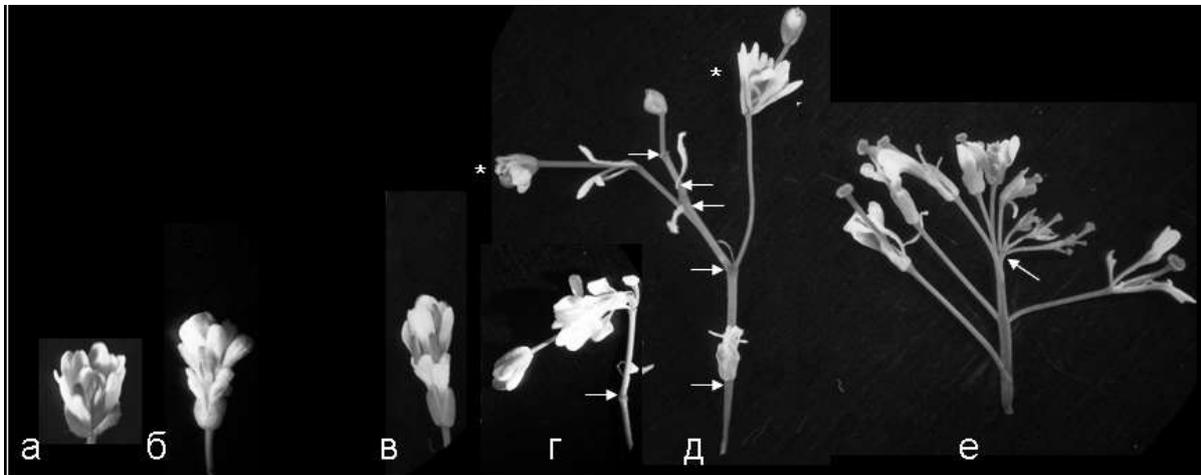


Рис. 8. Цветки одиночных мутантов *ag-1* (а, б), *abr* (е) и двойного мутанта *abr ag-1* (в-д).

Таким образом, результаты изучения взаимодействия гена *ABR/PID1* с генами А, В и С-классов (*AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI* и *AG*) цветка свидетельствуют о глобальной роли градиентов ауксина в определении особенностей экспрессии генов, контролирующих морфогенез цветка *A.thaliana*. Локальные участки скопления ауксина, которые создаются благодаря активности гена *ABR/PID1*, через систему ауксинового сигналинга могут влиять на уровень транскрипции ауксин-зависимых генов, что, по-видимому, имеет место в случае регуляции транскрипции гена *LFY*, содержащего цис-элемент *ARFaux* в регуляторной области. Молекулярные механизмы взаимодействия гена *ABR/PID1* с генами А-, В- и С-классов пока не ясны, хотя есть данные о регуляции экспрессии генов В- и С-класса (*AP3*, *PI*, *AG*) гиббереллином (Yu et al., 2004). Поскольку ауксин влияет на синтез ГА и чувствительность к нему (Weiss, Ori, 2007), часть эффектов ауксина может быть опосредована его влиянием на гиббереллиновый гомеостаз. Кроме того, МКС-белки, содержащие MADS-, I-, K- и C-домены, взаимодействуют с другими белками, в том числе, и не относящимися к МКС-семейству, среди которых есть участвующие в ауксиновом ответе и ауксин-регулируемые (напр-ер, *SEU*). Нарушение белковых взаимодействий в результате изменения распределения ауксина в тканях растения, по-видимому, может нарушать сборку и эффективность работы таких комплексов. И, наконец, по нашим данным гены *LFY*, *AP1* (рис. 6), а также гены *AP2*, *AP3* и *AG* контролирующие морфогенез цветка, сами влияют на распределение ауксина, что также не может не оказывать влияние на генетические взаимодействия, отражающие взаимодействие генных продуктов. У всех мутантов наблюдается снижение содержания ауксина в цветках, но увеличение – в листьях (Кавай-оол, 2011). Эти данные свидетельствуют о том, что не только нарушение ПТА влияет на морфогенез через изменение профиля экспрессии ключевых генов развития, но и нарушение работы этих генов может вызывать изменение программы развития путем влияния на распределение ауксина в растении.

1.4. Взаимодействие гена *ABR/PID1* с генами *CLV1* и *TAE*, контролирующими меристематическую активность клеток, и изучение влияния мутации *abr* на экспрессию трансгенов *CYCB1;1::GUS* и *KN1::GUS*

Влияние мутации *abr* на экспрессию трансгенов *CYCB1;1::GUS* и *KN1::GUS*. Несмотря на преждевременную терминацию цветоноса булавоковидной структурой, мутант *abr* показывает некоторые признаки эктопической пролиферации клеток. Это выражается в существенном увеличении продолжительности жизненного цикла, во время которого мутант способен к образованию дополнительных розеток на стебле (на коротком дне), многочисленных дополнительных розеточных побегов, а также разрастании тканей самого булавоковидного цветоноса. Кроме того, органы мутанта (листья, цветки, семена) имеют более крупные размеры, чем у дикого типа. В связи с этим, нами проведен анализ экспрессии в растениях мутанта *abr* химерных генов *CYCB1;1::GUS* и *KN1::GUS*, которые позволяют судить об активности клеточных

делений и уровне транскрипции гомеобоксного гена *KN1/BP*, поддерживающего недетерминированность и пролиферацию меристематических клеток, соответственно.

Максимальный уровень экспрессии *CYCB1;1::GUS* наблюдали в пыльниках, однако уровень экспрессии трансгена в растениях мутанта *abr* был значительно ниже, чем у дикого типа. Следовательно, увеличение размера органов у мутанта не связано с эктопическими делениями клеток. Наиболее характерными сайтами экспрессии *KN1::GUS* в растениях дикого типа были верхушки побегов, цветоножки и цветоложе. В молодых цветках активность гена наблюдали также в столбиках пестиков и верхушках тычиночных нитей; в зрелых цветках – в тычиночной нити и пыльниках (в пыльцевых зернах). У мутанта *abr* изменялись как пространственные и временные особенности экспрессии трансгена, так и его интенсивность. Мы не наблюдали экспрессии *KN1::GUS* в верхушках побегов, стебле и цветоножках. Единственным местом повышенной экспрессии трансгена были пыльники, причем экспрессия в этих органах была более ранней, чем у дикого типа. Выявленные нами нарушения пространственных и временных особенностей экспрессии трансгена *KN1::GUS* у мутанта *abr* свидетельствуют о важной роли гена *ABR/PID1* в поддержании нормальной работы гена *KN1*.

Полученные нами данные находятся в хорошем соответствии с результатами изучения влияния ауксина на пространственные характеристики экспрессии *KN1::GUS* в листе (Nay et al., 2006). Таким образом, данные по экспрессии *KN1::GUS* и *CYCB1;1::GUS* не могут объяснить наблюдаемой у мутанта *abr* пролиферации булавоковидной структуры и более продолжительного жизненного цикла. В то же время, эти признаки могут быть результатом изменения гормонального гомеостаза у мутанта. Известно, что ген *KN1* подавляет работу гена биосинтеза гиббереллина *GA-20-оксидазы* и активирует транскрипцию гена *GA-2-гидроксилазы*, который контролирует катаболизм этого гормона. Поэтому обнаруженное снижение его транскрипции у мутанта *abr* может приводить к повышению уровня ГА в растениях, и, как следствие, к увеличению размера органов у мутанта. Накопление активного ауксина в листьях и цветках мутанта может вызывать те же эффекты, поскольку оба гормона контролируют растяжение клеток.

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *CLV1*. В связи с выявленным увеличением в цветках мутанта *abr* уровня транскрипции ключевого гена «стволовости» - гомеобоксного гена *WUS*, и взаимодействием гена *ABP/PID1* с геном *AG* – негативным регулятором экспрессии гена *WUS*, нами исследовано также взаимодействие гена *ABR/PID1* с геном *CLV1* - еще одним негативным регулятором гена *WUS*, действующим как в цветке, так и в АМ побега.

На самых верхушках цветоносов двойных мутантов *abr clv1* отмечали разрастания тканей (рис. 9б). Фасцированные формы *abr clv1* на верхушке побега содержали множественные скопления из пестикоподобных органов, которые или сливались или развивались в самостоятельные аномальные цветки двойных мутантов (рис. 9в). Отметим, что фасциация стебля - черта обеих родителей, как *abr* (рис. 8е), так и *clv1* (Clark et al., 1995). В I-III мутовках цветка *abr clv1* изменений по сравнению

с *abr* не наблюдали. На ранних этапах развития гинецея существенных отличий от его развития у мутанта *abr* также не было обнаружено. В то же время на поздних стадиях развития внутри гинецея (стручка) наблюдается пролиферация недифференцированных клеток, а также клеток рыльцеподобных тканей (рис. 9з). Усиление признаков пролиферации клеткок у двойного мутанта *abr clv1* по сравнению с мутантами *clv1* и *abr* свидетельствует о комплементарном характере взаимодействия генов дикого типа *ABR/PID1* и *CLV1*.

Анализ взаимодействия гена *ABR/PID1* с геном *TAE*. Рецессивная мутация *taeniata* (*tae*, К-122, МГУ) приводит к эктопической меристематической активности листовой меристемы - образованию дополнительных листовых лопастей (рис. 9а) и, даже побегов, развивающихся на пластинке розеточных листьев, что связано с эктопической экспрессией в листе гомеобоксных генов *STM*, *KN1*, *KN2* и *KN6* (Лебедева, 2005; Ву, 2009). У мутанта *tae* в основании и центре листовой пластинки активно транскрибируется ген *KN1* (Ву, 2009), а на ее периферии наблюдается накопление ауксина, что показано с использованием трансгена *DR5::GUS* (Ву Хуен Чанг, Ондар, Ежова, 2007). Более активная экспрессия *CYCB1;1::GUS* наблюдается и на ранних стадиях онтогенеза – в молодых проростках, где экспрессия *CYCB1;1::GUS* охватывает более протяженные участки в семядолях, чем у дикого типа.

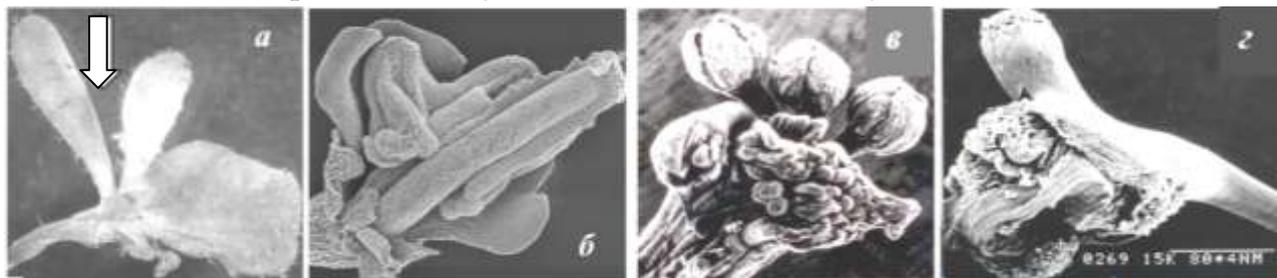


Рис. 9. Мутант *tae* (а) и двойные мутанты *abr tae* (б) и *abr clv1* (в, з). а - молодой лист розетки мутанта *tae* с двумя лопастями на листовой пластинке (стрелка); б - аномальный цветок *abr tae*; в – пролиферация АМ *abr clv1* и ФМ на разных стадиях развития; з - стручок *abr clv1* с пролиферацией тканей на месте разрыва.

Поскольку и мутация *tae*, и мутация *abr* вызывают накопление ауксина на периферии листа и оказывают влияние на особенности экспрессии трансгена *KN1::GUS*, исследовали взаимодействие генов *TAE* и *ABR/PID1* с помощью анализа фенотипа двойного мутанта. Булавковидная верхушка двойного мутанта *abr tae* имеет существенно меньший размер, чем у мутанта *abr*, поскольку клетки АМ цветоноса у двойного мутанта пролиферируют дольше, чем у *abr*. В результате *abr tae* имеет значительное количество цветков на цветоносе. Эти особенности могут быть связаны с вызванным мутацией *tae* усилением экспрессии гомеобоксных генов, поддерживающих недетерминированность клеток апикальной меристемы.

Цветки двойного мутанта *abr tae* имеют существенные изменения (рис. 9б), которые не встречаются у их родителей. Помимо слияния органов околоцветника, характерных для мутанта *abr*, в цветках двойного мутанта сливаются ткани пыльников или тычиночных нитей (рис. 9б). Реже встречаются отдельные тычинки

аномальной морфологии, нередко с признаками присутствия тканей гинецея, т.е. химерного строения (рис. 9б). Гинецей может отсутствовать или сливаться с органами из других мутовок (рис. 9б), вследствие чего *abr tae* не способен производить семена. Фенотип двойного мутанта свидетельствует о комплементарном взаимодействии генов *ABR/PID1* и *TAE* в контроле развития цветка.

Таким образом, ген *ABR/PID1* взаимодействует не только с генами, контролирующими морфогенез цветка, но и с генами, поддерживающими пролиферацию клеток апикальной и флоральной меристем.

Анализ взаимодействия гена *TAE* с генами *LFY* и *API* с помощью изучения влияния мутации *tae* на экспрессию трансгена *LFY::GUS* и *API::GUS*. У мутанта *tae* также как и у мутанта *abr* наблюдается существенное снижение экспрессии *LFY::GUS* в верхушках побега и бутонах (рис. 10б) по сравнению с исходной линией *LFY::GUS* (рис. 10а), что свидетельствует о важной роли гена *TAE* в регуляции уровня экспрессии *LFY* и объясняет ранее отмеченные особенности развития цветоноса (Лебедева и др., 2005).



Рис. 10. Экспрессия *LFY::GUS* (а, б) и *API::GUS* (в, г) в растениях дикого типа (а, в) и мутанта *tae* (б, г).

Анализ экспрессии *API::GUS* в растениях мутанта *tae* выявил роль гена *TAE* в поддержании уровня экспрессии гена *API*. В верхушках молодых цветоносов (0.5 – 1 см длиной) и прилегающих стеблевым листьям уровень экспрессии трансгена у *tae* выше, чем в диком типе на такой же стадии развития (рис. 10в). Постепенно по мере роста цветоноса экспрессия трансгена *API::GUS* у дикого типа повышается, в то время как у мутанта отмечается её заметное снижение, т.е. у мутанта *tae* наблюдается более ранняя активация *API* и быстрое снижение его экспрессии. Следовательно, ген *TAE* наряду с ранее описанной функцией регуляции уровня экспрессии генов *KNOX I* в меристеме листа, обладает дополнительной функцией контроля экспрессии генов, контролирующих развитие цветка (Кавай-оол, Ву, Сарыглар, 2010).

РАЗДЕЛ 2. Изучение новых мутантов из генетической коллекции *A.thaliana*

2.1. Изучение роли гена *FAS4* в контроле развития апикальной меристемы побега и флоральных меристем

Особенности морфологии мутанта *fas4*. Рecessивная мутация *fasciata4* (*fas4*, М-21-2, МГУ) вызывает эктопическую меристематическую активность, приводящую к существенному увеличению размеров АМ цветоноса и ФМ. Отличительной особенностью мутанта *fas4* является способность обеих типов меристем к бифуркациям: удваиваются не только сами стебли, но и цветки (пестики-стручки). АМ побега мутанта производит не только стеблевые листья, паракладыи и цветки (как у дикого типа), но и новые меристемы соцветия (см. рис. 11а). Эти новые оси цветоноса могут находиться вместе с главной и не отщепляться (у 20% растений), приводя к фасциации, как и ранее описанные мутации *fas1*, *fas2* и *clv*. У 80% растений такое расширение стебля в ширину постепенно угасает к верхушке в связи с отщеплением от стебля каждый раз новых осей пока весь пул клеток АМ не будет исчерпан. Кроме того, мутант *fas4* имеет карпеллоидоподобные стеблевые листья, особенно на боковых побегах (рис. 11а; стрелки). По краям таких листьев видны выросты, напоминающие недоразвившиеся семязпочки (рис. 11а). Иногда на стебле и в основании цветоножек наблюдаются группы папилл (рыльцевая ткань).

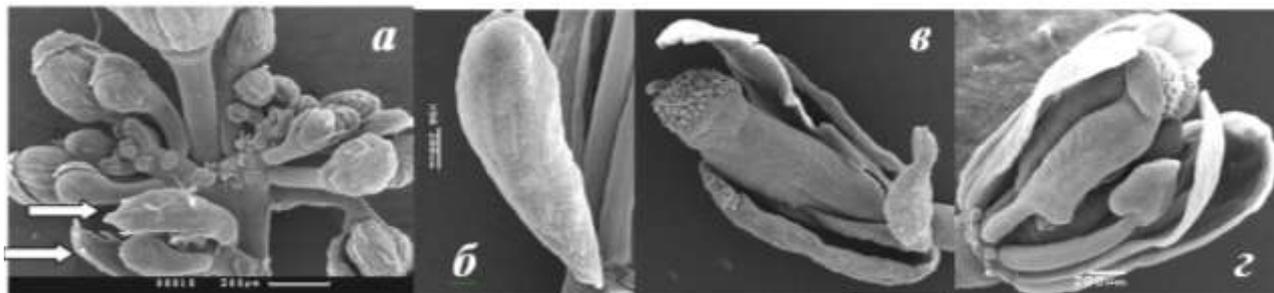


Рис. 11. Особенности морфологии мутанта *fas4*. *a* - развитие новых меристем соцветия на главной оси цветоноса *fas4*; *б, в* - плодолистикоподобные чашелистики; *в, г* - узкие и тычинкоподобные лепестки, на рис. *в* виден 3-х плодолистиковый пестик, на рис. *г* - плодолистикоподобные тычинки.

Чашелистики мутанта в базальных цветках иногда напоминают плодолистики (закругленный верхний край и утолщения по бокам с рыльцевой тканью на верхушке, рис. 11б, в), что особенно ярко проявляется в апикально расположенных цветках. Такие особенности наблюдаются у мутантов с нарушением функции генов *LUG* и *SEU*, продукты которых образуют белковый комплекс, подавляющий транскрипцию гена *AG* в органах околоцветника (Бао et al., 2010). Кроме того, у *fas4* развиваются узкие лепестки, крупные пыльники и пестик (рис. 11в). Часто лепестки по форме напоминают тычинки, а последние могут развиваться в химерные органы (тычинко-плодолистики). Пестик состоит из 3-х плодолистиков (рис. 11в), которые могут и не

срастаться. У мутанта нарушен филлотаксис; ромбовидной формы листья розетки, что отличает *fas4* от мутантов *clv* и *fas* (коллекции МГУ и ABRC).

Отметим, что у *A.thaliana* известны 2 группы генов, мутации в которых приводят к развитию ярко выраженной фасциации и увеличению числа плодolistиков - *FAS* и *CLV*. Однако по результатам проведенных нами тестов на аллелизм с мутациями *clv1*, *clv2*, *clv3* и *fas1-1* установлено, что мутация *fas4* нарушает работу другого гена. Обнаружено, что для мутанта *fas4* характерны признаки, ранее не описанные для мутантов *clv1*, *clv2*, *clv3* и *fas1*, *fas2*, как, например, нарушение детерминации типа органов. По всему комплексу фенотипических изменений мутация скорее проявляет сходство с ранее описанными мутациями гена *LUG*, имеющими плеiotропное проявление: у мутантов *lug* изменяется форма листа (в том числе, на стеблевых листьях появляются недоразвитые семечки), наблюдается нарушение филлотаксиса и структуры цветка (формируются узкие лепестки и карпеллоподобные чашелистики, особенно в апикально расположенных цветках, лепестко-тычинки и т.д.). Локализованный в хромосоме IV ген *LUG* является репрессором гена *AG* и усиливает экспрессивность мутаций *ap1* и *ap2* (Liu, Meyerowitz, 1995; Liu et al., 2000).

Анализ взаимодействия гена *FAS4* с генами *AP1* и *AP2*. Для создания двойных мутантов скрещивали *fas4* с делеционным мутантом *ap1-20*, который имеет узкие и филаментоподобные лепестки, а также мутантами *ap1-1* и *ap2-1*, у которых лепестки либо отсутствуют, либо превращаются в лепестко-тычинки. Как отмечали ранее, в цветках мутантов *ap1* проявляется активность меристем в пазухах органов I мутовки (листья и брактеи) и иногда развиваются пестики из 3-х плодolistиков (Ондар, Ву, Ежова, 2008).

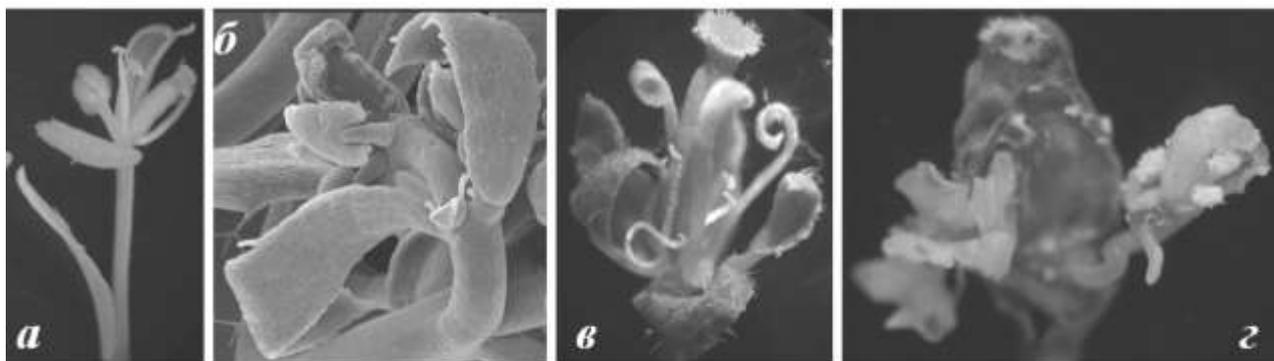


Рис. 12. Цветки двойных мутантов *fas4 ap1-1* (а, г), *fas4 ap1-20* (б) и *fas4 ap2-1* (в).

У двойных мутантов *fas4 ap1-1* (рис. 12а) и *fas4 ap2-1* цветки характеризуются спиральным органотаксисом. У *fas4 ap1-20* появляются междоузлия между околоцветником и внутренними мутовками (рис. 12б). То есть, мутация *fas4* усиливает свойства побеговости, наблюдаемые у *ap1* и *ap2*. В отличие от листовидных органов, которые формируются у мутанта *ap1-20*, у *fas4 ap1-20* в I мутовке развиваются органы с рыльцевой тканью на верхушке и семечками по бокам, т.е. по этому признаку *fas4 ap1-20* больше напоминает мутанты *ap2*, чем *ap1*. И, наоборот, в пазухах органов I мутовки у *fas4 ap2-1* развиваются дополнительные

цветки (как у мутантов *ap1*), а во II - листья или лепестко-листья (рис. 12в). Таким образом, анализ развития цветков двойных мутантов *fas4 ap* свидетельствует о важной роли гена *FAS4* в образовании и функционировании ФМ и его влиянии на детерминацию типа органов околоцветника, которую он выполняет, комплементарно взаимодействуя с генами А-класса (*AP1* и *AP2*). Проявление частичной гомеозисной трансформации органов околоцветника в плодolistикоподобные органы, признаков карпеллоидности на стеблевых листьях и рыльцевой ткани на стебле и в основании цветоножек одиночного мутанта, а также усиление проявления мутаций *ap1* и *ap2* у двойных мутантов *fas4 ap1* и *fas4 ap2* косвенно свидетельствуют об участии гена *FAS4* в негативной регуляции экспрессии гена *AG*, которую он может осуществлять, взаимодействуя с генами *AP1* и *AP2*.

Анализ развития репродуктивных органов в цветках *fas4 ap* выявляет ещё одну функцию гена *FAS4*. В отличие от одиночных мутантов пестики *fas4 ap1-1* и *fas4 ap2-1* показывают эктопическую пролиферацию (рис. 12з), характер которой отличается от той, что описан для *clv3*. В пестиках образовывались новые цветки, по структуре напоминающие родителей *ap1-1* (рис. 12з) и *ap2-1*. Сочетание у мутанта *fas4* признаков эктопической пролиферации АМ, а также выявленной пролиферации в пестиках двойных мутантов *fas4 ap1-1* и *fas4 ap2-1* наряду с явлениями частичной гомеозисной трансформации свидетельствуют о комплексной роли гена *FAS4* в контроле развития растений. Предположение об участии гена *FAS4* в негативной регуляции гена *AG* не объясняет эффектов эктопической пролиферации АМ и ФМ у мутанта *fas4* и двойных мутантов *fas4 ap1-1* и *fas4 ap2-1*. Ведь, ген *AG* подавляет пролиферацию клеток ФМ (участвуя в непрямом подавлении транскрипции гена *WUS*), поэтому усиление его экспрессии должно приводить к снижению пролиферативной активности клеток ФМ, чего мы не наблюдаем. По полученным в лаборатории предварительным данным у мутанта *fas4* в цветоносах наблюдается усиление уровня транскрипции как гена *WUS*, так и гена *KN1*, поддерживающих недетерминированное состояние клеток и их пролиферативную активность. Следовательно, выявленная нами частичная гомеозисная трансформация у мутанта *fas4* может быть результатом усиления экспрессии не самого гена *AG*, а его мишеней. Для окончательного выяснения функции гена *FAS4* требуются дальнейшие исследования. Ген *FAS4* по нашим данным сцеплен с геном *ER1* (48сМ) и локализован во II-ой хромосоме (табл. 1).

2.2. Изучение роли генов *FIP1* и *FIP2* в контроле морфогенеза побега

Особенности морфологии мутантов *fip1* и *fip2*. Наиболее существенные влияния мутации *fimbriata petioles1* (*fip1*; М-40-1, МГУ) и *fimbriata petioles2* (*fip2*, М-40-2, МГУ) оказывают на стадию генеративного развития растений. У мутанта *fip1* в дистальной области чашелистиков и лепестков наблюдается появление групп очень крупных клеток (рис. 13а, б, в, г, е), создающих бахромчатость краев этих органов (Кавай-оол, Ежова, 2011). Чашелистики и лепестки (рис. 13а, стрелка) мутанта

существенно короче, чем в цветках дикого типа; их размер и форма сильно варьируют; в основном, укорочены. Развитие пестика нарушено - имеет место недоразвитие столбика, плодолистиков, аномалии рыльца (рис. 13а, стрелка). Семязпочки по краям плодолистиков не развиваются, что приводит к женской стерильности. Из-за женской стерильности мутант *fip1* поддерживается путем размножения гетерозиготных фенотипически нормальных растений. АМ цветоноса у мутанта *fip1* формирует больше ФМ, чем у дикого типа.

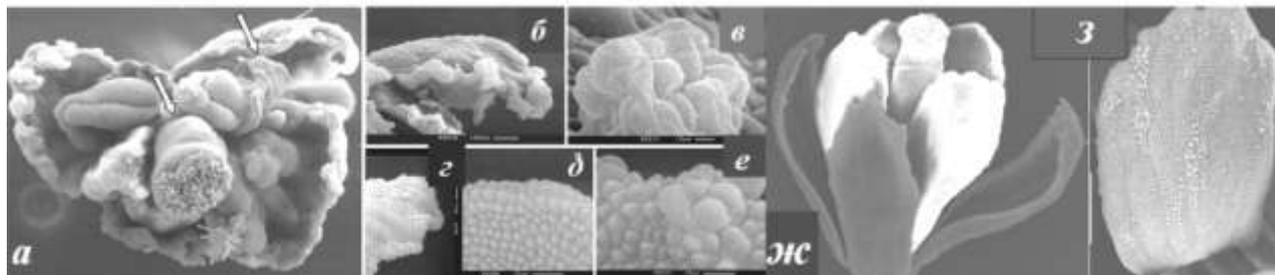


Рис. 13. Цветки (а, ж) и органы цветков (а, б, в, г, е, з) мутантов *fip1* (а-е) и *fip2* (ж-з).

Некоторым изменениям подвергаются и листья *fip1*. Они имеют неровную бугристую поверхность. Таким образом, у мутанта *fip1* в органах околоцветника и листьях наблюдаются сходные нарушения деления и роста клеток. Известно, что размер клеток коррелирует с их пloidностью. Это позволило нам сделать предположение, что возникновение крупных клеток является результатом преждевременного прекращения клеточных делений и перехода клеток к эндоредупликации ДНК, которая приводит к образованию крупных полиплоидных клеток. После завершения экспериментальной работы это предположение было доказано методом стационарной цитофотометрии. Ген *FIP1* локализован в левом плече I-ой хромосомы на расстоянии 29 сМ от маркерного гена *AN* (табл. 1).

Мутация *fip2* имеет более низкую экспрессивность (рис. 13ж, з), по сравнению с *fip1*. В цветках *fip2* лепестки (рис. 13з) и чашелистики имеют гофрированную поверхность и вырезки на краях (рис. 13ж, з). На адаксиальных поверхностях лепестков содержатся неровные ряды крупных клеток (рис. 13 з), что указывает на сходство функций генов *FIP1* и *FIP2*. Образование у мутантов крупных (полиплоидных) клеток позволяет предполагать, что ген *FIP1* и, возможно, *FIP2* могут участвовать в контроле перехода клеток к эндоредупликациям. Нарушение их функции у мутантов приводит к преждевременному прекращению клеточных делений и включению процесса эндоредупликации ДНК, приводящему к появлению аномально крупных клеток в органах околоцветника.

Анализ взаимодействия генов *FIP1* и *FIP2* с генами *AS1* и *AS2*. Мутанты *asymmetric leaves 1* (*as1* линия К-102, МГУ) и *sagittatus* (*sa* - аллель *as2*; К-118) напоминают мутант *fip1*. Они имеют некоторые аномалии развития цветка (укороченные зубчатые чашелистики, а у *as1* - и расширенные дистальные концы лепестков и пестика) и листьев (асимметричную форму и бугристую поверхность), (Ori et al., 2000; Byrne et al., 2002; Ву, Ондар, Солдатова, 2008; Кавай-оол и Ежова, 2011). В органах околоцветника двойных мутантов *fip1 as1* (рис. 14а, б), *fip1 as2* и *fip2*

as1, fip2 as2 еще сильнее заметны бахромчатость и различия размеров клеток (рис. 14а, б, стрелка), а листья характеризуются более выраженной, чем у родителей, асимметрией и неровностью поверхности (рис. 14в).

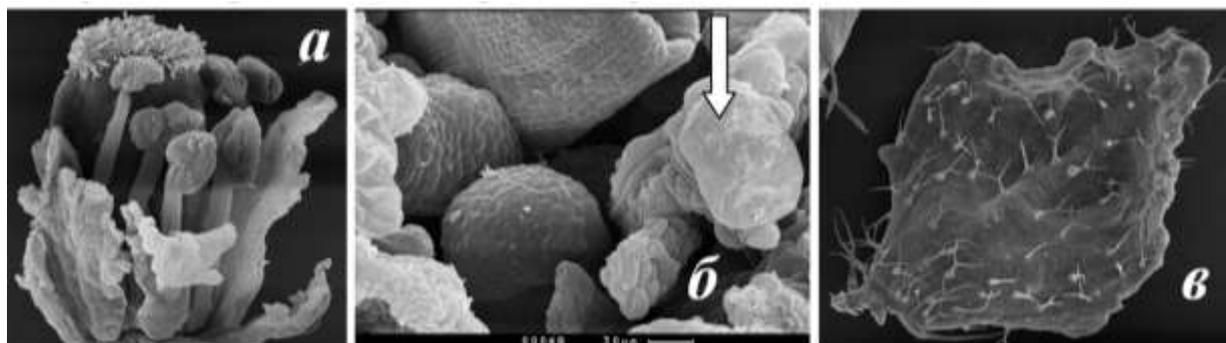


Рис. 14. Цветки (а, б) и лист (в) двойного мутанта *fip1 as1*.

Морфология органов цветка и листьев у двойных мутантов *fip1 as1* (рис. 17а, б, в), *fip1 as2* и *fip2 as1, fip2 as2* свидетельствуют о комплементарном взаимодействии *FIP1* и *FIP2* с генами *AS1* и *AS2*. Мы предполагаем, что гены *FIP1* и *FIP2* вместе с генами *AS1* и *AS2* контролирует пролиферацию клеток, предотвращая преждевременную эндоредупликацию. Хотя мутации *fip* и *as* вызывают нарушения, как в листе (*fip2*, в меньшей степени), так и в цветке (*as* в меньшей степени), тем не менее, наиболее яркое проявление они имеют в разных органах (мутации *as* нарушают главным образом развитие листа, а мутации *fip* – органов цветка). Это указывает на специфичность действия генов *AS* и *FIP*. Гены *AS* имеют несколько разных функций – они ограничивают пролиферацию листовой меристемы, подавляя экспрессию генов *KN* в примордиях листьев (Guo et al., 2008) и, участвуют в поляризации примордия листа *A.thaliana* (Xu et al., 2003). Укорочение органов цветка у мутантов *as* можно объяснить повышением уровня экспрессии *KN*-генов, которые подавляют синтез гиббереллина (Нау et al., 2002). В то же время причины наиболее яркого проявления фенотипа мутантов *as* (бугристый лист) не связаны с эктопической экспрессией *KN*, поскольку у двойных, тройных и даже четверных мутантов с одновременным нарушением активности генов *AS*- и *KN*-генов (*KN1, KN2, KN6*), восстановления этой аномалии не наблюдалось (Ikezaki et al., 2010). По-видимому, гены *AS* могут контролировать пролиферацию клеток по дополнительному пути (не зависимому от генов *KN*), комплементарно взаимодействуя с генами *FIP1* и *FIP2*.

Взаимодействие гена *FIP1* с геном *CLV1*. Ген *CLV1*, как и гены *AS* и *FIP* контролируют пролиферацию клеток. Для анализа взаимодействия *FIP1* с геном *CLV1* получен двойной мутант *fip1 clv1*. Растения *fip1 clv1* сочетали особенности родительских форм, т.е. показывали аддитивный фенотип, свидетельствующий об отсутствии взаимодействия генов. Таким образом, ген *FIP1* не взаимодействует с геном *CLV1*, действующим в АМ и ФМ, но комплементарно взаимодействует с генами *AS*, которые по нашим данным функционируют не только в листовой меристеме, но и во флоральной меристеме. Причем, гены *AS* участвуют как в детерминации клеток листа и органов цветка путем подавления экспрессии в них

гомеобоксных генов *KN* (Бу, Ондар, Ежова, 2008), так и в контроле их дифференцировки, по-видимому, путем предотвращения их преждевременной эндоредупликации, действуя на этом пути, вместе с генами *FIP1* и *FIP2*.

2.3. Изучение роли гена *ER2* в контроле развития побега

Нами продолжены исследования карликовых мутантов из коллекции кафедры генетики МГУ – новых полукарликовых мутантов *er2*, *min2* и карликового мутанта *na*, анализ которого нами был начат ранее (Ежова, Ондар и др., 1997).

Особенности морфологии мутанта *er2*. Рecessивная мутация *erecta2* (*er2*, М-21-1, МГУ) вызывает полукарликовый фенотип и снижение размеров всех органов побега *A. thaliana* (табл. 6). Укорочение корня и гипокотилия у мутанта заметно начиная со стадии 3-10 дневного проростка (рис. 15а, б, в, г). Эта особенность отличает мутант *er2* от мутанта *er1*, который имеет значительное увеличение длины главного корня (10 день, рис. 15д), но делает мутант похожим на ранее описанный *lepida-2* (*le-2*, К-156, МГУ; Ежова, Ондар и др., 1997).

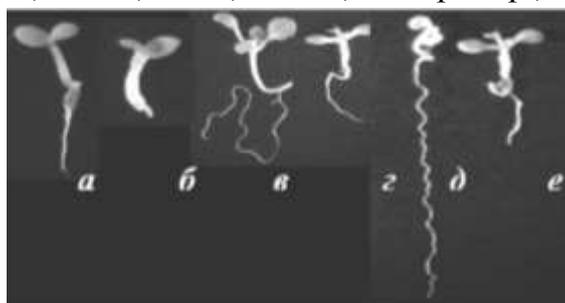


Рис. 15. Общий вид проростков дикого типа (а, е), мутанта *er2* (б, г, е) и *er1* (д).

Цветонос у мутанта эректоидного типа (прямостоячий), что отражено в названии мутанта. В то же время, число генеративных узлов на цветоносе мутанта достоверно выше, чем у дикого типа (табл. 6). Это объясняет причину того, что при двукратном уменьшении длины междоузлий общая высота стебля *er2* уменьшена лишь на 18% по сравнению с диким типом.

Табл. 6. Влияние мутации *er2* на структуру побега

Параметры	Di -М	<i>er2</i>
Высота растения	31.1 ± 4.7	25.6 ± 4.2*
Число розеточных листьев	6.8 ± 1.2	5.6 ± 0.5*
Длина вегетативной, генеративной частей, см	14.8 ± 1.8, 16.3 ± 5.8	7.8 ± 1.2***, 17.8 ± 3.5
Число вегетативных, генеративных узлов	2.7 ± 0.5, 25.4 ± 8.0	2.0 ± 0.7**, 44.8 ± 7.3***
Общее число узлов	28.0 ± 8.0	46.0 ± 7.3***
Длина междоузлий в вегетативной, генеративной частях цветоноса, см	5.6 ± 1.1, 0.6 ± 0.1	2.7 ± 0.5***, 0.4 ± 0.1***

Примечание: *, **, ***- средние значения для мутанта *er2* достоверно отличаются от дикого типа при уровнях значимости $P > 0.95$, $P > 0.99$, $P > 0.999$, соответственно.

Эректоидность стебля мутанта связана не только с укорочением междоузлий (табл. 6), но и с его утолщением (рис. 17а, б, ж). У мутанта *er2* укорочены также длины всех органов цветка - чашелистиков, лепестков, тычинок и пестика (рис. 17е). Из-за укорочения чашелистиков бутоны мутанта всегда открыты, в отличие от закрытых бутонов дикого типа.

Ранее показано, что карликовые мутанты из коллекции МГУ отличаются между собой по чувствительности к гиббереллину. Обнаружены мутанты с повышенной чувствительностью к экзогенной гибберелловой кислоте (GA_3): это 2 аллельных мутанта по гену *ER1* – *er1-1* и *er1-3*, мутант нечувствительный к GA_3 - *na* и не отличающийся по чувствительности к гормону от растений дикого типа мутант - *le-2* (рис. 16а; Ондар, 1995; Ежова, Ондар и др., 1997).

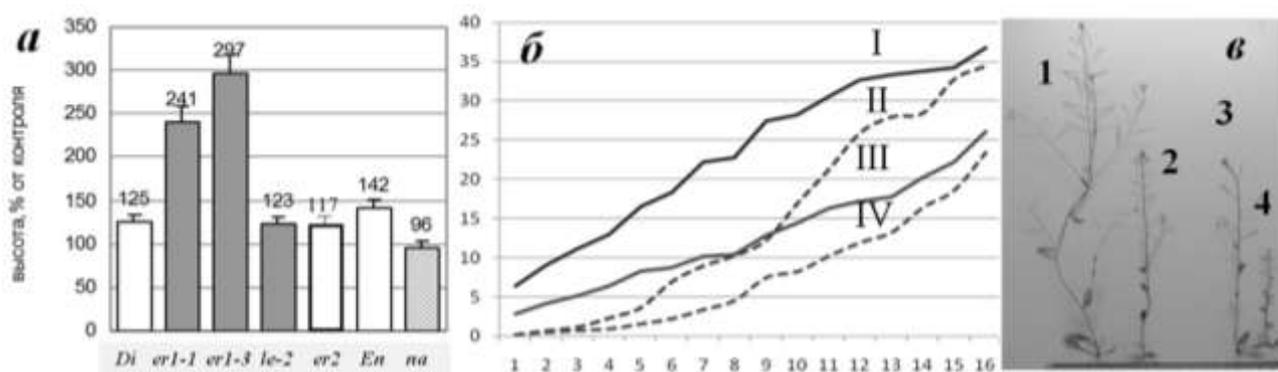


Рис. 16. Влияние экзогенной GA_3 ($50 \mu M$) на рост стебля растений дикого типа и карликовых мутантов *A. thaliana*. а - увеличение высоты стебля *er1*, *er2*, *le-2* и *na* под действием GA_3 (в % от контроля); б - динамика роста стебля растений дикого типа Dj-M (I, II) и мутанта *er2* (III, IV) при обработке GA_3 (I, III) и водой (II, IV - прерывистые линии), по оси Y - высота цветоноса (см), по оси X - день обработки; в - общий вид обработанных GA_3 (слева) и контрольных (справа) растений: 1 и 3 - Di-M, 2 и 4 - мутант *er2*, соответственно.

При обработке экзогенной GA_3 растения дикого типа (расы Di-M для мутантов *er1-1*, *er1-3* и *le-2* и En-M для мутанта *na*) увеличивали рост стебля на 25 – 42% по сравнению с необработанным контролем, как и мутант *le-2*. Мутанты *er1* увеличивали рост более чем в 2 раза, а мутант *na* вообще не реагировал на GA_3 (рис. 16а). Новый мутант *er2* также как *le-2* не показал изменений в чувствительности к экзогенной GA_3 (рис. 16а, б, в).

По результатам проведенных нами тестов на аллелизм с мутациями *er1-1*, *le-2* и *dwarf1* (*dwl1*; МГУ и ABRC) установлено, что мутация *er2* нарушает работу другого гена.

Анализ размера эпидермальных клеток *er2*. В связи с укорочением и утолщением всех органов у мутанта *er2* исследовали размеры клеток эпидермиса.

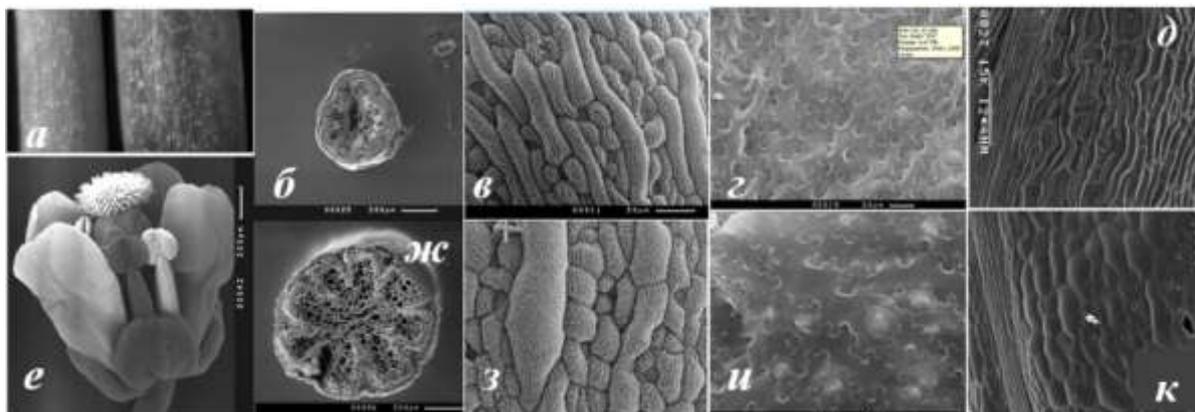


Рис. 17. Органы и клетки мутанта *er2* (е-к) и растений дикого типа (б-д). а - фрагменты стебля (*er2* справа); б и ж - их поперечные срезы; в и з - эпидермис чашелистиков; г, и - листьев; д, к - стручков.

Обнаружено, что клетки стебля мутанта *er2* короче, чем у дикого типа, а ширина не отличается достоверно от контроля (табл. 7). Для эпидермальных клеток чашелистиков мутанта *er2* проведен отдельный анализ двух типов клеток – крупных и мелких. Показано, что для обоих типов клеток мутанта характерно достоверное увеличение в ширину (рис. 17в, з), а укорочения клеток не наблюдалось или было не достоверным (табл. 7). Провести количественный анализ эпидермальных клеток листа оказалось сложным из-за их волнистых антиклинальных стенок. Тем не менее, даже качественный анализ показывает, что у мутанта наблюдается увеличение ширины клеток (рис. 17г, и).

Табл. 7. Размеры эпидермальных клеток дикого типа и мутанта *er2* (μм).

Параметры	Di -M	<i>er2</i>
Длина и ширина эпидермальных клеток стебля	195.9 ± 50.7	130.2 ± 32.1***
	13.2 ± 3.0	11.9 ± 2.7
Длина эпидермальных больших и малых клеток чашелистика	147.5 ± 69.2	139.6 ± 61.0
	34.8 ± 9.8	33.9 ± 10.0
Ширина эпидермальных больших и малых клеток чашелистика	16.2 ± 4.9	53.5 ± 8.2*
	13.1 ± 3.6	22.6 ± 5.1***

Примечание: * и ***- средние значения мутанта *er2* достоверно отличаются от дикого типа при уровнях значимости $P > 0.95$ и $P > 0.999$, соответственно.

Ширина клеток стручка мутанта *er2* (рис. 17 к) также превышает таковой дикого типа (рис. 17 д) в 2.3 раза, а её средняя длина ниже, чем у нормы в 2.5 раза. Выявленные изменения размеров клеток позволяют предположить, что ген *ER2* контролирует полярность клеток (соотношение клеточных осей) в растениях дикого

типа. Утрата его функции у *er2* вызывает нарушение закономерностей роста клеток. Большинство особенностей морфологии мутанта (утолщение стебля, укорочение листьев, междоузлий и органов цветка), могут быть следствием этих изменений на уровне клеток.

Изучение взаимодействия гена *ER2* с генами *ER1* и *LE/DWF5*, контролирующими рост стебля. У двойного мутанта *er2 er1* обнаружено существенное снижение длины цветоноса и его элементов (рис. 18) и стручков по сравнению с обеими родительскими формами, что свидетельствует о комплементарном взаимодействии генов *ER1* и *ER2* в регуляции линейного роста органов.

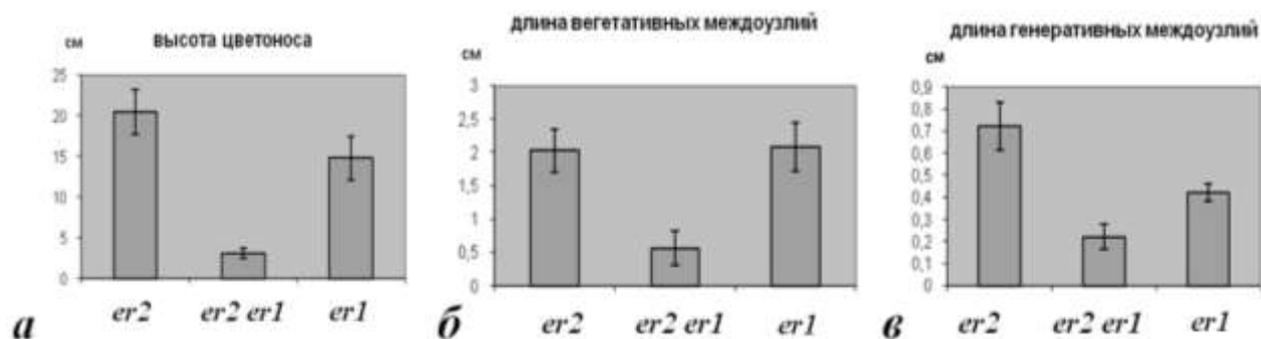


Рис. 18. Высота цветоноса (а), длины вегетативных (б) и генеративных междоузлий (в) двойного мутанта *er2 er1* в сравнение с *er2* и *er1* (выборки - по 10 растений).

Как отмечали ранее мутация *er1* повышает чувствительность растений к экзогенной ГАЗ, а чувствительность к этому гормону у мутанта *er2* такая же, как у дикого типа (Ондар, 1995; Ежова, Ондар и др., 1997; Солтабаева, Кавай-оол и др., 2011). Кроме того, показано, что ген *ER1* контролирует пролиферацию и растяжение клеток (Woodward et al., 2005) и их поляризацию (Shpak et al., 2005), которая связана со структурой цитоскелета. Наши данные показывают комплементарное взаимодействие гена *ER1* с геном *ER2*. По-видимому, ген *ER2* контролирует перестройку цитоскелета, которая не связана с действием гиббереллина.

Значительное отставание в росте побега в сравнение с родителями (*er2* и *le-2*), обнаружено и у двойного мутанта *er2 le-2*, что указывает на комплементарное взаимодействие генов *ER2* и *LE/DWF5*. Известно, что мутация *le-2* приводит к дефициту эндогенных брассиностероидов и уменьшению длины клеток, поскольку ген *LE/DWF5* кодирует фермент стеролредуктазу (Лебедева и др., 2004; Складорова, 2006). Гены *LE/DWF5* и *ER1* не взаимодействуют между собой (Ежова, 2003), хотя по нашим данным есть комплементарное взаимодействие обоих генов с геном *ER2*. Таким образом, ген *ER2* может выполнять роль интегратора разных гормональных сигналов, возможно контролируя перестройку цитоскелета под действием разных фитогормонов. Ген *ER2* показывает сцепление с генами *AP1* (99 сМ) и *GL2* (118 сМ), т.е. локализован в правом плече I-ой хромосомы, правее указанных маркерных генов (табл. 1).

2.4. Изучение роли гена *MIN2* в контроле развития побега

Особенности морфологии мутанта *min2*. Рecessивная мутация *mini2* (*min2*, T-38-2б, МГУ) вызывает уменьшение линейных размеров всех частей и органов побега и ускорение зацветания. Миниатюрность мутантных растений заметна уже на стадии раннего проростка (рис. 19а); конечные размеры полноценных органов у мутанта *min2* в среднем в 2 раза меньше, чем у дикого типа. Уменьшены размеры листьев розетки и стебля, верхушки цветоноса и цветков (рис. 19б). В цветке уменьшены размеры органов (рис. 19б, в), как и размер стручка, а также семян.

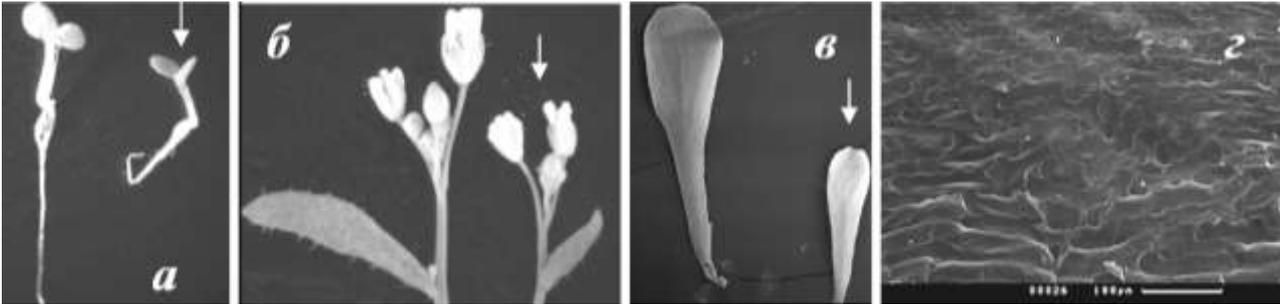


Рис. 19. Проростки (а), верхушки цветоносов (б), лепестки (в) мутанта *min2* (стрелки) и растений дикого типа (а, б, в); г - эпидермальные клетки листа *min2*.

Диаметр стебля *min2* (возраст - 4 недели) в 2 раза меньше, чем у дикого типа (рис. 19б). Длина эпидермальной клетки стебля у мутанта в среднем снижена в 1.6 раза по сравнению с диким типом (соответственно 39.1μм и 62.5 μм), а её ширина в 1.5 раза превышает таковой дикого типа (22.5μм по сравнению с 15μм в контроле). Общая площадь лепестка *min2* меньше и достигает всего 3570μм² (у дикого типа 9675 μм²; рис. 19в), в котором круглые клетки имеют диаметр всего 8.9μм (у дикого типа 14.3μм). Противоположная картина наблюдается для клеток листьев, которые у мутанта имеют более вытянутую форму (рис. 19г) в сравнение с диким типом. Средние длины клеток листьев у мутанта и дикого типа составляют 129.2μм и 71.1μм соответственно. Таким образом, в отличие от выше описанных мутантов *er1*, *er2* и *le-2* мутант *min2* обнаруживает более сложные закономерности изменения размера клеток. Возможно, размер клеток – не является причиной миниатюрности мутанта, а является следствием его ускоренного развития. Ускорение развития проявляется в раннем вступлении мутанта *min2* в фазу плодоношения (на 1.5 недели раньше, чем дикий тип). Ускорение развития видно и по уменьшению числа листьев розетки у мутанта (4.7, у дикого типа - 7.4), и по снижению числа узлов в вегетативной части цветоноса (2.3, у дикого типа - 3.4). Таким образом, миниатюрность мутанта *min2*, как и других, рано зацветающих мутантов, является следствием раннего вступления на репродуктивную стадию развития.

Еще одной яркой особенностью мутанта *min2* является нарушение апикального доминирования. Развитие цветоноса у *min2* прекращается вследствие остановки функционирования АМ (рис. 20а), что несколько напоминает развитие цветоноса у мутанта *na*. Развитие мутанта *min2* после замирания АМ продолжается за счёт

формирования множественных паракладиев и дополнительных побегов. Мутант характеризуется также нарушением филлотаксиса (стеблевые листья и цветки часто имеют супротивное расположение).

Изучение взаимодействия гена *MIN2* с генами *CLV1*, *CLV2* и *CLV3*. Поскольку у *min2* нарушено функционирование АМ (рис. 20а), исследовали фенотип двойных мутантов *min2 clv1*, *min2 clv2* и *min2 clv3* (рис. 20б). Двойные мутанты имели признаки родителей: увеличение числа плодолистиков в гинецее (стручке), как у *clv* и миниатюрность органов, как у *min2* (рис. 20б). Обнаружено, что мутации *clv* не восстанавливают нормальное апикальное доминирование (АД) у мутанта *min2* (рис. 20б). У *min2 clv*, как у *min2*, наблюдали преждевременную терминацию развития АМ (рис. 20а, б). На верхушке цветоносов двойных мутантов *min2 clv* можно увидеть кластеры из недоразвившихся бутонов, которые сначала прекращают расти, а затем постепенно отмирают (рис. 20б). Таким образом, нами не выявлено взаимодействия генов *MIN2* и *CLV*, то есть ген *MIN2* не оказывает прямого влияния на систему генов *WUS - CLV*.



Рис. 20. Верхушки соцветий и стручки *min2* (а, в) и *min2 clv3* (б, г).

Изучение взаимодействия гена *MIN2* с геном *ABR/PID1*. В связи со снижением апикального доминирования (рис. 20а, стрелка) и «кустистой» архитектурой побега, характерных для ауксиновых мутантов (в том числе, и мутанта *abr*), а также преждевременным истощением верхушки цветоноса, проанализирован двойной мутант *min2 abr*. Двойной мутант, как и одиночный мутант *min2* характеризуется миниатюрным габитусом, имеет мелкие цветки, которые по морфологии околоцветника (редуцированные чашелистики и тычинки, многолепестковость) напоминают цветки одиночного мутанта *abr*. Главной особенностью *min2 abr* является более выраженное нарушение филлотаксиса, чем у обеих родителей, а также более раннее, чем у *min2*, - отмирание верхушки цветоноса, поэтому увидеть характерные для мутанта *abr* булавковидные структуры, терминирующие цветоносы, нам не удалось. В то же время, на дополнительных розеточных цветоносах, которые развивались очень быстро, иногда можно увидеть подобие терминального цветка, состоящего из одного палочковидного пестика, что характерно для *abr* и является отличительной особенностью двойного мутанта *abr tfl* (Ежова, 2003). Их образование у мутантов *abr min2* и *abr tfl*, по-видимому, связано с большей скоростью развития растений под влиянием мутаций *min2* и *tfl*.

Таким образом, более ярко выраженное, чем у родителей нарушение АД и филлотаксиса у двойного мутанта *abr min2*, позволяют говорить о комплементарном взаимодействии генов *MIN2* и *ABR/PID1* в регуляции развития цветоноса и поддержании его апикального доминирования. Исследования мутанта *min2* пока не завершены. По предварительным данным, у этого мутанта, как и у мутанта *abr* изменено распределение ауксина в растениях (результаты по экспрессии *DR5::GUS*). Возможно, что дефицит ауксина в апикальной части побега и его накопление в розетке листьев (как и у мутанта *abr*) является основой выявленного комплементарного взаимодействия и объясняет увеличение размера клеток листьев, несмотря на их уменьшенный размер в остальных органах. Ген *MIN2* локализован в правом плече I-ой хромосомы (рекомбинанты между генами *min2* и *ap1* отсутствовали, следовательно, расстояние между ними - при допущении наличия одного рекомбинанта, составляет менее 16 сМ; табл. 1).

2.5. Изучение роли гена *NANA* в контроле развития побега

Особенности морфологии мутанта *na*. Мутант *nana* (*na*, К-164, МГУ) является суперкарликом (рис. 21а) со значительной редукцией апикального доминирования вследствие нарушения функционирования АМ побега. Анализ морфологии мутанта показывает, что у гомозигот *na* АМ имеет меньший размер (рис. 21б), чем у дикого типа (раса Еп-М). Карликовость стебля проявляется как полудоминантный признак. Мутантные растения *na* показывают нечувствительность к ГА₃ (рис. 16а; Ондар, 1995; Ежова, Ондар, Солдатова, Маманова, 1997). На нижней стороне черешка листьев розетки мутантных гомозигот *na* нами обнаружены очаги эктопической пролиферации клеток (рис. 21г), что ранее описано у мутантов кукурузы *Kn1*, а также трансгенных растений с усиленной экспрессией генов *KNOX I*.

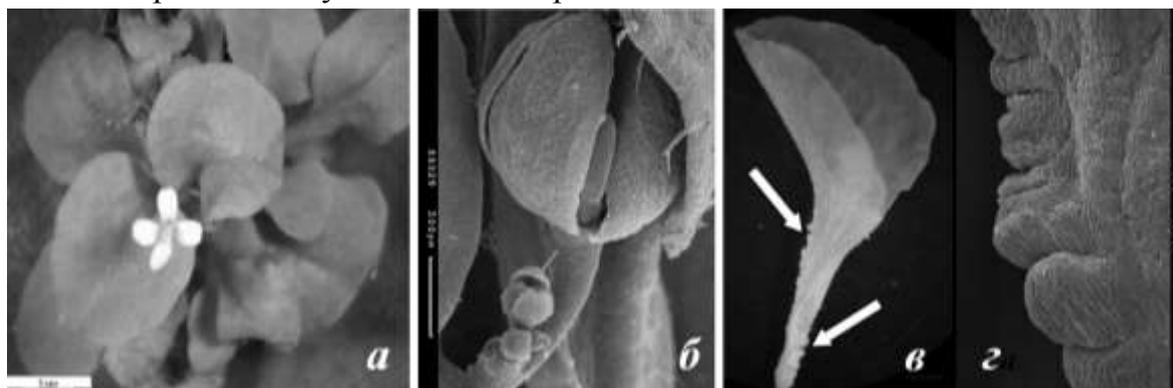


Рис. 21. Гомозигота по мутации *na*. а - общий вид, б – АМ цветоноса, замершая после формирования трех цветков; в и г - эктопическая пролиферация клеток на черешках листьев розетки *na cv1* (в, стрелки) и *na* (г).

Изучение взаимодействия гена *NA* с геном *ER2*. Мутант *na* имеет сниженный линейный размер клеток стебля (Лебедева и др., 2004), как у *er2* (данная работа). Анализ показал, что двойной мутант *na er2* имеет аддитивный фенотип: габитус, как у *na* и уменьшенный размер розетки и стручка, как у *er2*. Таким образом, гены *NA* и *ER2* не взаимодействуют и осуществляют независимый контроль роста клеток.

Изучение взаимодействия гена *NA* с генами *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*. Известно, что гены *CLV* участвуют в негативной регуляции размера АМ и ФМ, поэтому у рецессивных мутантов *clv* наблюдается увеличение размера меристем (фенотип, противоположный мутанту *na*). Общим признаком для двойных мутантов *na clv1*, *na clv2*, *na clv3* является увеличение количества плодolistиков (4-6), как у мутантов *clv*. Кроме того, как у родителя *na* у двойных мутантов наблюдается преждевременное прекращение пролиферации клеток АМ. Даже в случае наличия ярко выраженной фасциации цветоносов, которая наблюдается у части растений двойного мутанта *na clv3* (как у родителя *clv3*) и приводит к образованию очень крупной валикообразной меристемы, мы не наблюдали восстановления роста цветоноса из-за преждевременной остановки пролиферативной активности АМ. Следовательно, мутация *na* приводит к остановке деления клеток, не зависимо от размера пула меристематических клеток в АМ цветоноса. Эти данные указывают на более позднее действие в онтогенезе растений гена *NA* по сравнению с генами *CLV*, которые, как известно, начинают экспрессироваться уже в эмбриональный период.

По-видимому, ген *NA* можно отнести к генам, которые регулируют активность деления клеток в АМ цветоноса. Возможно, в растениях дикого типа ген *NA* ограничивает скорость пролиферации пула ствольных клеток (которые, как известно, делятся очень медленно), но не влияет на образование самого пула ствольных клеток под действием системы генов *WUS – CLV*. Доминантная мутация *na* приводит к эктопической экспрессии мутантной аллели, что и приводит к остановке клеточных делений в АМ, даже при наличии большого пула ствольных клеток у мутантов *clv3*. Эта гипотетическая функция, по-видимому, реализуется именно в АМ цветоноса, но не во ФМ, поскольку развитие цветков у мутанта *na* не нарушается. Признаков ограничения пролиферации клеток нет и в листьях мутанта. Более того, здесь отмечен противоположный эффект эктопических клеточных делений в черешке. По-видимому, ген *NA* специфически влияет на пролиферацию клеток только центральной оси побега. Образование полноценных цветков и нормально развитых листьев свидетельствует о прохождении там клеточных делений, которые (возможно в силу каких-то компенсаторных механизмов) проходят там даже более активно, чем у дикого типа.

Анализ экспрессии генов *CYCB1;1::GUS* и *DR5::GUS* подтвердил наличие эктопических делений в растениях мутанта *na*. В семядолях проростков мутанта *na* выявлена усиленная экспрессия трансгена *CYCB1;1::GUS*. В отличие от проростков дикого типа, демонстрирующих активность *CYCB1;1::GUS* только в кончике корня (рис. 22а), у мутанта *na* активная экспрессия трансгена отмечалась как в корне, так и по всей площади семядольных листьев (рис. 22б), хотя в цветоносе и цветках уровень экспрессии *CYCB1;1::GUS* был таким же, как у дикого типа. Лишь на кончиках стеблевых листьев мутанта обнаруживается экспрессия *CYCB1;1::GUS*, которая не наблюдается у дикого типа. Отметим, что стеблевые листья мутанта имеют лентовидную форму (в отличие от округлой формы у дикого типа), что может быть связано с дополнительными делениями верхушечной меристемы листа.

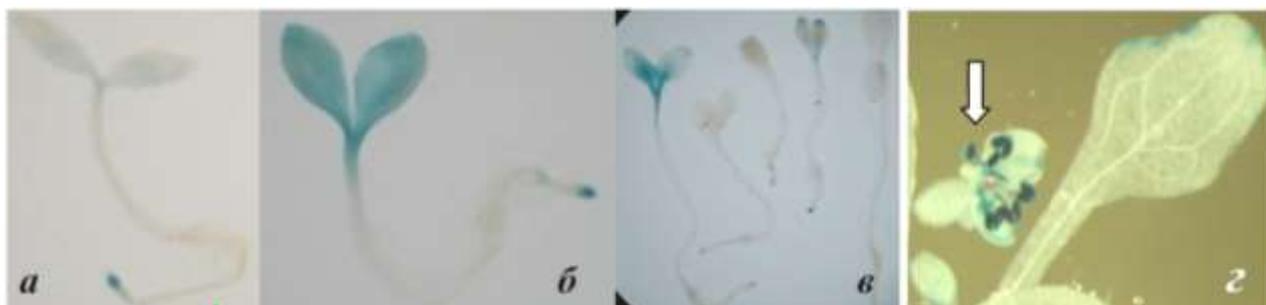


Рис. 22. Экспрессия трансгенов *CYCB1;1::GUS* (а, б) и *DR5::GUS* (в, г) в растениях дикого типа (а) и мутанта *na* (б, г); в – проростки из семьи, гетерозиготной по мутации *na*.

Эктопические деления клеток сопровождаются и аномалиями экспрессии трансгена *DR5::GUS* в растениях мутанта (рис. 22в, г). На ранней стадии развития в семядольных листьях у мутанта *na* ауксин накапливается не только в гидатодах (как у дикого типа), но и в основаниях семядольных листьев, и в апикальных участках гипокотыля (рис. 22в). В молодых листьях розетки гомозиготных мутантов видны расширенные по сравнению с диким типом участки асимметричного накопления гормона в районах гидатод (рис. 22г). Неожиданно высокий уровень активного ауксина выявлен в цветках мутанта (рис. 22г, стрелка). В отличие от цветков дикого типа, в которых ауксин можно обнаружить только в пыльниках (рис. 2б), у гомозигот *na* высокий уровень ауксина обнаружен и в тычиночных нитях. Кроме того, экспрессия *DR5::GUS* заметна в чашелистиках (рис. 22г) и во всех других органах цветка. Таким образом, у мутанта *na* наблюдается существенное увеличение активного ауксина, которое может быть результатом, как нарушений его транспорта, так и усилением синтеза в клетках.

Таким образом, мутация *na* нарушает не только чувствительность к гиббереллину, что показано нами ранее (Ондар, 1995; Ежова, Ондар и др., 1997), но и содержание ауксина в тканях растения. Между разными фитогормонами существуют сложные взаимодействия, обусловленные влиянием гормональных сигнальных путей на содержание гормонов и чувствительность к ним. Более того, в последние годы появились данные о влиянии фитогормональных сигналов на уровень экспрессии генов, поддерживающих функционирование АМ в растениях *A.thaliana* (Piazza et al., 2005). По-видимому, противоречивые проявления действия мутации *na* на разные органы растения (подавление пролиферации клеток АМ и эктопическая активность клеток листьев) обусловлены полифункциональностью действия самих фитогормонов и зависимостью функции от взаимодействия с другими гормональными сигнальными путями. Известно, что например, ауксин в сочетании с цитокининами вызывает активные клеточные деления, а при увеличении его относительного содержания – стимулирует растяжение клеток и их дифференцировку (Weiss & Ori, 2007). Ген *NA* пока не клонирован, поэтому можно лишь предполагать, что ген *NA* влияет на пролиферацию клеток, осуществляя координацию разных фитогормональных систем.

Заключение

Итак, нами дополнены представления о функции 3-х генов, исследования которых были начаты при выполнении кандидатской диссертации и продолжены другими исследователями (*ABR/PID1*, *TAE*, *NA*), а также охарактеризована роль 5 ранее не исследованных генов в контроле морфогенеза растений *A.thaliana*. Подводя итог проведенным исследованиям можно заключить, что большинство исследованных генов контролируют пролиферацию клеток, либо ограничивая клеточные деления (как *FAS4* и *TAE*), либо поддерживая их (как гены *FIP1*, *FIP2* и *MIN2*, рис. 23). Ген *ABR/PID1*, основной функцией которого является контроль ПТА и развития цветоноса и цветков, также оказывает влияние на пролиферацию клеток, комплементарно взаимодействуя с геном *AG* - ранее описанным регулятором экспрессии гена *WUS*, инициирующим и поддерживающим пул стволовых клеток в АМ и ФМ. Выявлено комплементарное взаимодействие *ABR/PID1* с генами *CLV* и *TAE*, которые также являются негативными регуляторами пролиферации клеток. Влияние *ABR/PID1* на пролиферацию клеток обусловлено важнейшей ролью этого гена в контроле распределения ауксина в тканях растения, что согласуется с данными последних лет, свидетельствующими о том, что градиенты цитокинина и ауксина определяют уровень и место экспрессии гена *WUS* (Zhao et al., 2010; Su et al., 2011).

Судя по особенностям фенотипа, все гены проявляют плейотропный эффект. Например, ген *NA* по нашим данным контролирует скорость пролиферации клеток: он ограничивает деления клеток АМ цветоноса, но активирует деления клеток междоузлий и проксимальной части листа. По данным исследований О.Лебедевой и Ч.Ву ген *TAE* также ограничивает деления клеток листа, однако нами выявлена еще одна функция этого гена – его участие в поддержании экспрессии генов *LFY* и *API* (рис. 23), что делает этот ген похожим на ген *SPLAYED*, который также контролирует пролиферацию клеток и уровень экспрессии гена *LFY*.

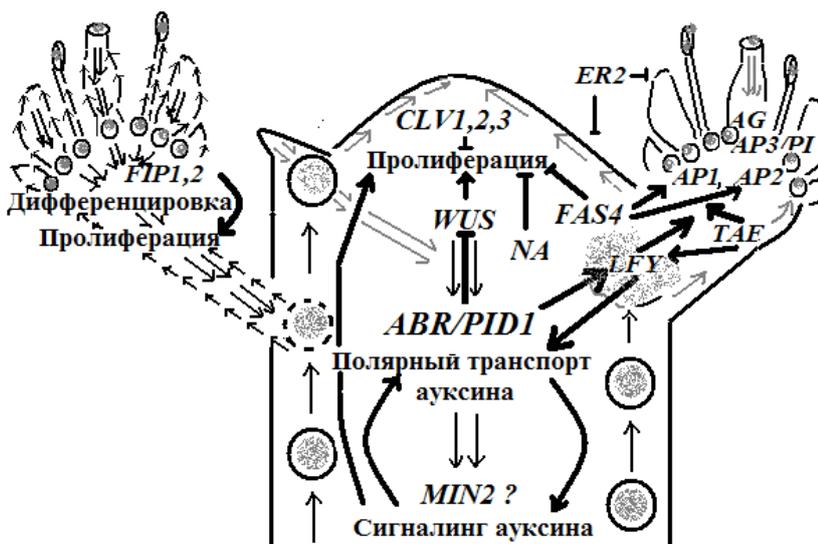


Рис. 23. Модель генетической и гормональной регуляции морфогенеза побега и цветка *A. thaliana* с участием гена *ABR/PID1*, контролирующего ПТА, генов *TAE*, *NA*, *FAS4*, *FIP1*, *FIP2*, *ER2* и *MIN2*. Кружками показаны локальные сайты градиентов ауксина; маленькими стрелками обозначены направления потоков ауксина, жирными - позитивная регуляция, стрелками с тупым концом - негативная регуляция процессов морфогенеза.

Влияние гена *MIN2* на развитие растений, по-видимому, связано с его влиянием на распределение ауксина или передачу ауксинового сигнала, о чем свидетельствует комплементарное взаимодействие *MIN2* с геном *ABR/PID1*.

Гены *ER2* и *NA* также обеспечивают взаимодействие с фитогормонами. Ген *NA* контролирует деления клеток и, одновременно, - чувствительность к гиббереллину, а ген *ER2*, по-видимому, участвует в интеграции разных фитогормональных сигналов, взаимодействуя с геном *LE/DWF5*, контролирующим синтез брассиностероидов и геном *ER1*, контролирующим чувствительность к гиббереллину или его содержание.

Таким образом, нами выявлены новые гены, контролирующие морфогенез путем влияния на пролиферацию клеток и показано, что это влияние у части генов опосредовано влиянием генов на фитогормональный статус растений. Проведенные исследования показывают, что плеiotропный эффект исследованных генов является результатом взаимодействия с другими генами, контролирующими морфогенез. Причем, большинство из исследованных генов показали взаимодействие с геном *ABR/PID1*, контролирующим ПТА (это не только ген *LFY* и гомеозисные гены А-, В- и С-классов (*AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI* и *AG*), но и ген *MIN2*, *TAE*, *FIP1*). Кроме того, нами установлено, что многие из исследованных генов, основная функция которых не связана с влиянием на ПТА, также оказывают влияние на распределение ауксина в тканях растения. Эти данные подтверждают важнейшую роль ауксина в регуляции морфогенеза растений и показывают, что в основе плеiotропного эффекта многих генов, контролирующих морфогенез, лежат генные взаимодействия, которые опосредованы изменениями ауксиновых градиентов.

Полученные данные по генетическому картированию с использованием морфологических маркёров (табл. 1) являются основой для молекулярно-генетического картирования с использованием ДНК-маркёров и позволяют существенно экономить средства для проведения более тонкого картирования в пределах группы сцепления. Благодаря исследованиям сотрудников и студентов группы генетики развития растений сегодня подтверждена и уточнена локализация гена *FIP1* в левом плече и генов *ER2* - в конце правого плеча хромосомы I, а также гена *FAS4* в середине хромосомы II.

A. thaliana - идеальный объект для обучения студентов методам генетики растений (генетики развития растений), в том числе методам анализа транскрипции генов с помощью конструкций, содержащих репортерный ген слитый с промотором изучаемого гена. Это один из наиболее точных и доступных методов, позволяющих оценивать пространственные и временные особенности транскрипции генов и качественно исследовать уровень генной экспрессии. При выполнении данной диссертационной работы нами использованы полученные в исследованиях других авторов линии трансгенных растений, в геноме которых содержатся кассеты с репортерным геном β-глюкуронидазы под контролем регуляторных участков (транскрипционные слияния) генов, контролирующих морфогенез. Ген *GUS* позволяет выявить даже слабый уровень экспрессии гена, который трудно детектировать другими методами. На основе этих линий нами получено 32 мутантная

линия, несущая слитые гены (*abr LFY::GUS*, *tae LFY::GUS*, *abr AP1::GUS*, *tae AP1::GUS*, *tae KN1::GUS*, *abr KN1::GUS*, *as1 KN1::GUS*, *sa KN1::GUS*, *as1 DR5::GUS*, *sa DR5::GUS*, *tae DR5::GUS*, *abr DR5::GUS*, *lfy-107 DR5::GUS*, *lfy-109 DR5::GUS*, *ap1-1 DR5::GUS*, *ap1-20 DR5::GUS*, *ap2-1 DR5::GUS*, *vaf DR5::GUS*, *ap3 DR5::GUS*, *ag-1 DR5::GUS*, *er2 DR5::GUS*, *na DR5::GUS*, *fas4 DR5::GUS*, *min2 DR5::GUS*, *as1 CYCB1;1::GUS*, *sa CYCB1;1::GUS*, *tae CYCB1;1::GUS*, *abr CYCB1;1::GUS*, *na CYCB1;1::GUS*, *er2 CYCB1::GUS*, *fas4 CYCB1::GUS*, *min2 CYCB1;1::GUS*). Созданные линии позволяют наглядно демонстрировать возможности использования репортерных генов для решения важнейших задач генетики развития, связанных с анализом взаимодействия генов и фитогормональных факторов, детализацией функции генов и изучения их роли в контроле активности клеточных делений. Эти линии являются хорошим учебным материалом, который уже апробирован на занятиях Большого практикума по генетике растений, на кафедре генетики МГУ им. М.В. Ломоносова и кафедре общей биологии Тувинского ГУ, на занятиях со стажерами и слушателями курсов повышения квалификации. По результатам данной диссертационной работы написано учебно-методическое пособие «Репортерные гены в решении прикладных и фундаментальных вопросов генетики растений».

Выводы

1. Повышение температуры снижает содержание активного ауксина в цветке и листе растений дикого типа *A.thaliana*. Мутация *abr* изменяет распределение активного ауксина в тканях и является удобной моделью для анализа влияния зависимых от температуры градиентов ауксина на процессы морфогенеза.
2. На ранних стадиях развития меристемы цветка ген *ABR/PID1 A.thaliana* эпистатически взаимодействует с генами, инициирующими формирование флоральной меристемы морфогенеза *LFY* и *API*, а также гомеозисными генами, контролирующими развитие органов цветка *AP2*, *AP3*, *PI*, *AG*. При формировании органов цветка ген *ABR/PID1* комплементарно взаимодействует со всеми перечисленными генами.
3. Ген *ABR/PID1* участвует в контроле пролиферации клеток апикальной меристемы побега и флоральной меристемы, комплементарно взаимодействуя с генами *CLV1*, *TAE* и *AG*.
4. Гены *FIP1* и *FIP2 A. thaliana* участвуют в поддержании клеточных делений в органах цветка и листьях, предотвращая их преждевременную дифференцировку.
5. Гены *FIP1* и *FIP2* комплементарно взаимодействуют с генами *AS1* и *AS2* при развитии органов околоцветника.
6. Полудоминантная мутация *NA* приводит к остановке клеточных делений в апикальной меристеме побега, но вызывает эктопическую пролиферацию клеток в листьях. Влияние гена *NA* на пролиферацию клеток апикальной меристемы не связано с действием генов системы *CLV*.
7. Ген *FAS4* предотвращает эктопическую пролиферацию апикальной меристемы побега и флоральной меристемы, а также оказывает влияние на детерминацию типа органов околоцветника, которую он выполняет, комплементарно взаимодействуя с генами А-класса *API* и *AP2*.
8. Ген *ER2* определяет полярность клеток, комплементарно взаимодействуя с геном *LE/DWF5*, контролирующим синтез brassinosteroidов и геном *ER1*, регулирующим чувствительность к гиббереллину. Функция гена *ER2* важна и для нормального развития корня.
9. Для ранее исследованного гена *TAE* выявлена дополнительная функция определения времени и места экспрессии генов *API* и *LFY*, контролирующих развитие меристемы цветка.
10. Выявлены изменения распределения ауксина в мутантах с нарушением развития флоральной меристемы (*lfy-107*, *lfy-109*), гомеозисных мутантах с изменением типа органов цветка (*ap1-1*, *ap1-20*, *ap2-1*, *vaf / ap2-14*, *ap3-1*, *ag-1*) и мутантах с нарушением развития листа и цветка (*as1* и *sa / as2*), свидетельствующие о важной роли этих генов в контроле ауксинового гомеостаза.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах списка ВАК РФ, рекомендованных для публикации основных материалов докторских диссертаций :

1. Солдатова О.П., Ежова Т.А., **Ондар (Кавай-оол) У.Н.**, Гостимский С.А., Конрад У., Арцаенко О. Мутанты *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., толерантные к ингибитору биосинтеза каротиноидов норфлуразону // Генетика. 1996. Т. 32. №7. С.956-961.
2. Ежова Т.А., **Ондар У.Н.**, Солдатова О.П., Кузнецова Т.А. Изучение роли гена *ABRUPTUS* в дифференцировке цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Доклады Академии наук. 1997. Т. 354. № 6. С. 839-842.
3. Ежова Т.А., Солдатова О.П., **Ондар У.Н.**, Маманова Л.Б., Радюкина Н.Л., Софьин А.В., Романов В.И., Шестаков С.В. Толерантные к норфлуразону карликовые мутанты *Arabidopsis* как объекты изучения резистентности к окислительному стрессу // Физиология растений. 1997. Т. 44. №5. С.665-670.
4. Ежова Т.А., **Ондар У.Н.**, Солдатова О.П., Маманова Л.Б. Генетическое и физиологическое изучение карликовых мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. 1997. Т. 28. №5. С.344-351.
5. Лебедева О.В., **Ондар У.Н.**, Пенин А.А., Ежова Т.А. Влияние гена *ABRUPTUS/PINOID* *Arabidopsis thaliana* на экспрессию гена *LEAFY* // Генетика. 2005. Т. 41. № 4. С. 559-565.
6. Ву Х.Ч., **Ондар У.Н.**, Солдатова О.П. Особенности проявления новых аллелей генов *AS 1* и *AS 2*, контролирующих морфогенез листа *Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. Том 39. № 1. 2008. С. 8-14.
7. **Ондар У.Н.**, Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala1-20* *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. Том 39. № 6. 2008. С. 430-436.
8. **Кавай-оол У.Н.**, Ежова Т.А. Анализ распределения ауксина в растениях дикого типа и мутанта *abruptus* *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с использованием химерного гена *DR5::GUS* // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2010. № 3. С. 17-19.
9. **Кавай-оол У.Н.**, Карпенко О.Ю., Ежова Т.А. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *APETALA1* в регуляции развития цветоноса *Arabidopsis thaliana* // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 373-382.
10. **Кавай-оол У.Н.**, Куприянова Е.В., Ежова Т.А. Различное влияние аллелей гена *APETALA1* на развитие репродуктивных органов в цветках мутанта *abruptus* *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 4. С. 307-311.
11. **Кавай-оол У.Н.** Генетическая регуляция полярного транспорта ауксина и его роль в контроле морфогенеза побега // Успехи современной биологии. 2011. Т. 131. № 3. С. 270-277.

12. **Кавай-оол У.Н.**, Карпенко О.Ю., Ежова Т.А. Взаимодействие гена *PINOID/ABRUPTUS* с геном *AGAMOUS* - негативным регулятором пролиферации стволовых клеток в меристеме цветка *Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 146-150.
 13. **Кавай-оол У.Н.**, Ежова Т.А. Влияние гена *ABRUPTUS/PINOID* на проявление гомеозисных мутаций *apetala3-1* и *pistillata-1* у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2011. № 3. С. 151-158.
 14. **Кавай-оол У.Н.**, Ежова Т.А. *FIMBRIATA PETIOLES1* – ген *Arabidopsis thaliana*, контролирующей процессы деления и роста клеток органов цветка // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 151-158.
 15. Kupriyanova E.V., **Kavai-ool U.N.** Alleles of *APETALA1* gene with truncated C and K domains differently affect on the reproductive floral organ development in *Arabidopsis thaliana abruptus* mutant // The FEBS JOURNAL. 2010. P. 171.
 16. Солтабаева А.Д, **Кавай-оол У.Н.**, Куприянова Е.В., Ежова Т.А. Изучение мутанта *er2 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с изменением структуры побега // Вестник ВОГИС. 2011 (в печати).
- Статьи в сборниках научных конференций и симпозиумов, учебные пособия:
17. Ву Х.Ч., Ежова Т.А., **Ондар У.Н.** Генетическая и фитогормональная регуляция стволовости клеток у *Arabidopsis thaliana*. Материалы докладов, посвященных 300-летию со дня рождения К.Линнея. Луганск. 2007. С.113-115.
 18. **Кавай-оол У.Н.**, Ежова Т.А. Использование коллекции диких и мутантных форм *Arabidopsis thaliana*, содержащих репортёрный ген *GUS*, слитый с промоторами ключевых генов морфогенеза, на занятиях по генетике растений // Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии. Сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой памяти Л.В. Бардунова. Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. 2010. С.701-703.
 19. **Кавай-оол У.Н.**, Ежова Т.А. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *APETALA2* в регуляции развития цветка *Arabidopsis thaliana* // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сборник научных трудов VI-ой Международной научной конференции. Киев: ЛОГОС. 2010. Т. 9. С. 35-39.
 20. **Кавай-оол У.Н.**, Ву Х.Ч., Сарыглар Р.Р. Взаимодействие генов *TAENIATA* и *LEAFY* в регуляции развития цветоноса *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Апомиксис и репродуктивная биология. Материалы Всероссийской научной конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения С.С. Хохлова. Саратов: Изд-во СГУ им. Н.Г. Чернышевского. 2010. С.160-163.
 21. **Кавай-оол У.Н.**, **Ежова Т.А.** Репортерные гены в решении прикладных и фундаментальных вопросов генетики растений. Учебно-методическое пособие по генетике растений. Кызыл: Изд-во ТувГУ. 2011. 63 с.

Тезисы конференций и симпозиумов:

1. **Ондар У.Н.**, Высоцкий В.А. Изучение мутации, вызывающей нарушение дифференцировки цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Генетика. 1994. Т. 30. С. 113.
2. Ezhova T.A., **Ондар У.Н.**, Soldatova O.P., Kof E.M. The *ABRUPTUS* gene function in the differentiation of *Arabidopsis* inflorescence. In Program and Abstracts. German-Russian Cooperation in Biotechnology Workshop IV. Plant Molecular Biology Genetics and Biotechnology. St.-Petersburg, Russia. 1996. P. 36.
3. Ежова Т.А., Пенин А.А., **Ондар У.Н.** Генетический контроль морфогенеза цветоноса у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Материалы II-го съезда ВОГИС. Санкт-Петербург. 2000. Т. 2. С. 245.
4. **Ондар У.Н.**, Ежова Т.А., Сарыглар А.Д. Фенотипическое изучение мутации *fasciata* из линии *nfz 21 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Труды III-ей Российской конференции «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока». Красноярск: Изд-во КГПУ. 2001. С.211.
5. **Ондар У.Н.**, Полковниченко Е.М. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *APETALA1 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Материалы III съезда ВОГИС // Генетика. 2004. Т. 1. С. 238.
6. Будаев Р.Б., Полковниченко Е.М., **Ондар У.Н.** Анализ взаимодействия между геном *BRACTEA* и генами *LEAFY* и *APETALA1* с использованием репортёрного гена *GUS*. Труды XIV-ой научной школы по биологии развития // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 5. С. 311.
7. **Ондар У.Н.**, Солдатова О.П. *ERECTA2* и *FASCIATA4* – новые гены, регулирующие дифференцировку главного и боковых побегов *Arabidopsis thaliana*. Сборник материалов докладов симпозиума «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза». Москва. 2007. С. 124-125.
8. **Ондар У.Н.**, Ежова Т.А. Изучение распределения активного ауксина в растениях мутантов *Arabidopsis thaliana* с изменениями структуры цветоноса и цветка. Материалы Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты». Минск. 2008. С. 140-141.
9. **Кавай-оол У.Н.**, Зайцев А.А., Солдатова О.П. Изучение мутанта *FIMBRIATA PETIOLUS 1* с нарушением развития дистальных участков органов цветка *Arabidopsis thaliana*. Сборник трудов V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва. 2009. Ч. 1. С. 147.
10. Альберт Е.В., **Кавай-оол У.Н.** Влияние мутации *fasciata4* на развитие цветка *Arabidopsis thaliana* // Сборник тезисов конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии». Москва. 2011. С. 3.
11. **Кавай-оол У.Н.**, Карпенко О.Ю. Взаимодействие генов *TAE* и *API* в регуляции развития цветка *Arabidopsis thaliana* // Сборник материалов III-ей Международной научно-практической конференции «Биоразнообразие и сохранение генофонда флоры, фауны и народонаселения Центрально-Азиатского региона». Кызыл: ТувГУ. 2011. С. 23-24.

Благодарности

- искренняя благодарность **Татьяне Анатольевне Ежовой** за научное руководство, консультации и внимательное отношение к моей научной работе, в течение всего периода выполнения диссертаций.
- глубокая благодарность академику **Сергею Васильевичу Шестакову**, проф. **Марлену Мкртычевичу Асланяну**, проф. **Сергею Александровичу Гостимскому**, проф. **Владиславу Владимировичу Зинченко** (ныне зав. кафедрой генетики МГУ), зам. зав. кафедрой **Елене Алексеевне Карбышевой**, в.н.с. **Тамаре Афанасьевне Кокшаровой**, доц. **Вадиму Моисеевичу Глазеру** и всем сотрудникам кафедры генетики, способствовавшим осуществлению и подготовке к защите данной работы.
- особая благодарность своему учителю из Петербургской школы генетики, чл.-корр. РАН, проф. **Илье Артемьевичу Захарову-Гезехусу** за докторантуру в МГУ имени М.В.Ломоносова от Института общей генетики имени Н.И.Вавилова РАН (г. Москва), научное руководство, неоценимую помощь и поддержку тувинской школы генетики.
- глубокая признательность **Ольге Павловне Солдатовой** за оказанную разностороннюю помощь в работе.
- глубокая благодарность заведующему и сотрудникам лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова **Г.Н.Давидовичу**, **А.Г.Богданову** и **Ю.В.Просиной** за созданные комфортные условия работы на сканирующей электронной микроскопии.
- особая признательность сотрудникам, аспирантам и студентам группы генетики развития кафедры генетики МГУ **А.А.Пенину**, **Е.В.Куприяновой**, **М.Г.Новокрещёновой**, **О.В.Лебедевой**, **О.А.Скляровой**, **Л.Помякшевой**, **Р.А.Будаеву**, **Чанг Ву**, **О.Ю.Карпенко**, **Е.Н.Полковниченко**, **А.С.Курбидаевой**, **Т.Ю.Прошляковой**, **Р.Ю.Сарыглар**, **Е.В.Альберту**, **А.Д.Солтабаевой** и **Е.А.Тармосину** за сотрудничество, поддержку и помощь.
- огромная благодарность своему наставнику от тувинской научной школы - **Маадыру Алдын-Хереловичу Ондар** за внимание к моей научной деятельности.
- искренняя признательность зав. кафедрой общей биологии Тувинского университета **Чечек Дембиреловне Назын**, ректору ТувГУ проф. **Сергею Октябревичу Ондар**.
- огромная признательность дорогим сёстрам **Б.А. Тугур-оол**, **Ч.Н. Монгуш**, **Г.А.Салчак** и **С.С. Салчак**, **Д.А. Ензак**, **Селенге Ханды** и **Мергену Салчак**, за безграничную поддержку и помощь.

- особое спасибо дорогим детям **Андрею** и **Буяну Ондар**, **Баиру Монгуш** за понимание, помощь и долготерпение.
- особая признательность коллегам и друзьям: д.и.н. **Марине Монгуш** и к.м.н. **Айтен Сафаровой**, педагогам **Блиновой Наталье Владимировне**, **Васильевой Марине Юрьевне** и **Ширяевой Ольге Георгиевне**, а также ученикам: к.м.н. **Аясу Маады**, **Руслану Геворкяну** и **Анай-Хаак Дамба-Хуурак**, курсантам **Василию Стяжкину**, **Сергею Швец**, **Евгению Бородащенко** и **Артёму Смирнову** за поддержку и помощь.

Сокращённые названия генов:

ABR/PID1 - ABRUPTUS/PINOID1

AG - AGAMOUS

AP1, AP2 и AP3 - APETALA1, APETALA2 и APETALA3

AS1 и AS2 - ASYMMETRIC LEAVES1 и ASYMMETRIC LEAVES2

BP - ген KNAT1 (другое его название - BREVIPEDICELLUS)

CLV1, CLV2 и CLV3 - CLAVATA1, CLAVATA2 и CLAVATA3

ER1 и ER2 - ERECTA1 и ERECTA2

FAS4 - FASCIATA4

FIP1 и FIP2 - FIMBRIATA PETIOLES1 и FIMBRIATA PETIOLES2

GL2 - GLABRA2

KN1 - KNAT1

KN1::GUS - KNAT1::GUS

LFY - LEAFY

LE/DWF5 - LEPIDA/DWARF5

LUG - LEUNIG

MIN2 - MINI2

NA - NANA

PI - PISTILLATA

SEU - SEUSS

TAE - TAENIATA

WUS - WUSHEL

Другие сокращения:

АМ - апикальная меристема

АВРС - *Arabidopsis* Biological Resource Center

ГА - гиббереллин

ГА₃ - гибберелловая кислота

ИУК - индолилуксусная кислота

ИФА - иммунно-ферментный анализ

ПТА - полярный транспорт ауксина

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

ФМ - флоральная меристема