

На правах рукописи

Альберт Евгений Владимирович

**Изучение мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. с изменением
пролиферативной активности апикальной меристемы побега**

Специальность 03.02.07 генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание
ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор кафедры генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ежова Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет МСХА им. К.А. Тимирязева»

Соловьёв Александр Александрович

кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.К. Вавилова Российской академии наук

Хадеева Наталья Васильевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита состоится «__» ____ 2015г. в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.К. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, улица Губкина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» ____ 2015г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Основной особенностью онтогенеза растений является развитие органов и тканей на протяжении всего постэмбрионального периода. Это требует наличия длительно функционирующего пула стволовых клеток, который у высших растений локализуется в апикальной меристеме побега и корня. Апикальная меристема побега (АМП) является источником всех органов и тканей надземной части растения и обеспечивает её нормальное развитие.

Функционирование АМП, и развитие надземной части растения, находится под контролем сложных генетических механизмов. Главную роль в процессах инициации и последующего поддержания постоянства пула стволовых клеток играет ген *WUS*, формирующий регуляторную петлю отрицательной обратной связи с геном *CLV3* (Haescker et al., 2004; Fletcher et al., 1999), что обеспечивает стабильную систему регуляции объёма пула стволовых клеток. Помимо гена *CLV3* экспрессия *WUS* контролируется дополнительными генами-регуляторами различной природы: транскрипционными регуляторами, хроматиновыми регуляторами, а также регуляторными генами, чей точный механизм действия не установлен. Функция большинства дополнительных регуляторов *WUS* заключается в пространственном ограничении домена его экспрессии, что обеспечивает формирование чётких границ АМП и объёма пула стволовых клеток (Williams and Fletcher, 2005).

Важнейшую регуляторную роль в процессах инициации и поддержания пула стволовых клеток АМП играют растительные гормоны – ауксин и цитокинин (Zhao et al., 2010). Формирование локальных максимумов и минимумов цитокинина и ауксина определяет область экспрессии генов *WUS* и *CLV3* и соответственно место будущей закладки АМП. Таким образом, на формирование и гомеостаз АМП оказывают влияние гены, обеспечивающие и регулирующие синтез фитогормонов, а также гены, регулирующие полярный транспорт растительных гормонов. Помимо внутренних регуляторных механизмов, на гомеостаз АМП оказывают влияние и факторы внешней среды. Одним из важнейших внешних факторов, влияющих на активность стволовых клеток АМП является фотопериодический сигнал (Yoshida et al., 2011).

Важно подчеркнуть, что АМП не является статичной структурой и претерпевает ряд трансформаций в ходе онтогенеза (Jacqumard et al., 2003; Bull-Hevenu and Claben-Bockhoff, 2013), в течение которых меняется её размер и компетентность образовывать различные боковые органы стебля, однако генетический контроль таких онтогенетических изменений структуры АМП практически не исследован. Между тем, именно онтогенетические изменения АМП, а также пазушных меристем, которые имеют такое же строение как АМП, могут лежать в основе всего разнообразия структуры соцветий, встречающегося у покрытосеменных растений (Bull-Hevenu and Claben-Bockhoff, 2013).

Изучение механизмов генетического контроля поддержания гомеостаза и функционирования АМП, ее онтогенетических перестроек имеет важное практическое значение, так как расширяет возможности по созданию растений с новыми характеристиками роста и продуктивности. Одним из наиболее удобных объектов для изучения генетического контроля функционирования и поддержания гомеостаза АМП является классический модельный объект генетики растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. У этого вида описано большое число мутаций, затрагивающих функционирование АМП, анализ которых позволил

выявить гены, обеспечивающие закладку, поддержание пула стволовых клеток (Murray et al., 2012; Azizi et al., 2015). Тем не менее, далеко не все гены сегодня идентифицированы. В первую очередь, до сих пор крайне ограничена информация о генах, контролирующих онтогенетические перестройки в строении АМП и связанные с ними изменения размера пула стволовых клеток.

Имеются данные об участии в поддержании гомеостаза АМП генов, ответственных за регуляцию клеточных делений и клеточного цикла. Показано, что данная группа генов обеспечивает формирование правильной архитектуры АМП (Lin et al., 2007; Dewitte et al., 2007; Perez-Perez et al., 2008), и, очевидно, взаимодействуют с генами, вовлеченными в другие механизмы регуляции её гомеостаза (Sabatini et. al., 2003; Scofield et. al., 2013; Zhang et. al., 2013). Тем не менее, генетические механизмы, координирующие клеточные деления и их скорость с процессами поддержания недетерминированности /дифференцировки клеток также остаются неясными.

Эти и другие вопросы можно исследовать с помощью анализа мутантов с новыми характеристиками. Такие мутанты есть в коллекции *A.thaliana* кафедры генетики МГУ. Это рецессивная моногенная мутация *fasciata5* (*fas5*) и полудоминантная мутация *nana-D* (*na-D*). Мутация *na-D* картирована ранее в верхнем плече хромосомы I *A.thaliana* (Склярова, 2006); ее исследования недавно продолжены в работе У.Н. Кавай-оол (Кавай-оол, 2011), однако изучения изменения структуры АМП в онтогенезе проведены не были. Мутация *fas5* получена недавно, она не картирована и результаты ее изучения также пока были предварительными.

Целью данной работы являлся анализ мутаций *A.thaliana fas5* и *na-D* и изучение роли генов *FAS5* и *NA* в контроле пролиферативной активностью клеток апикальной меристемы побега

Задачи работы:

- 1) Изучение роли гена *FAS5* в развитие побега, его влияния на пролиферативную активность и структуру АМП.
- 2) Изучение роли гена *FAS5* в контроле гомеостаза стволовых клеток в АМП путем изучения взаимодействия с генами *WUS* и *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*.
- 3) Изучение роли гена *FAS5* в контроле времени зацветания и развитии цветка; анализ взаимодействия гена *FAS5* с геном *LFY*.
- 4) Генетическое картирование мутации *fas5* и идентификация гена *FAS5*.
- 5) Анализ влияния гена *NA* на пролиферативную активность клеток АМП на разных стадиях онтогенеза и изучение проявления мутации *na-D* на разном генетическом фоне.
- 6) Анализ взаимодействия генов *FAS5* и *NA*

Научная новизна. Автором установлены новые, ранее неизвестные функции гена *TOP1α A.thaliana*. Показано, что ген *TOP1α* принимает участие в регуляции фотопериодической реакции растений, а также задерживает переход растения на репродуктивную стадию. Помимо этого впервые показано участие гена *TOP1α* в инициации развития флоральной меристемы, путём положительной регуляции гена *LFY*. Впервые показано, что ген *NA* начинает функционировать в апикальной меристеме побега при переходе растений на репродуктивную стадию, по-видимому, контролируя структурную перестройку апикальной меристемы. Выявление гена, действующего на этой стадии

актуально, поскольку генетический контроль этого процесса не исследован.

Научно-практическая значимость работы. Выявление новых признаков у мутанта *fas5*, не описанных у других мутаций в гене *TOP1a*, расширяет представление о функции данного гена на уровне организма. Мутация *fas5* может быть использована для изучения генетических механизмов, ответственных за переход к цветению и инициации флоральной меристемы. Результаты изучения мутации *na-D* могут использоваться для поиска генетических механизмов, регулирующих пролиферативную активность стволовых клеток апикальной меристемы побега после перехода на генеративную стадию развития.

Личный вклад автора заключается в самостоятельном проведении генетического анализа мутаций, постановке скрещиваний и получении линий двойных мутантов, их детальном анализе с использованием электронно-микроскопических и морфофизиологических методов, генетическом картировании на основе анализа популяций F2 и F3, а также в создании пулов растений для высокопараллельного секвенирования ДНК. Результаты работы получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на отечественных и зарубежных конференциях: на конференции "Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии" (Москва, 2011, 2014), «Новости передовой науки» (София, Болгария, 2013), VI Съезде ВОГиС (Ростов-на-Дону, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 8 работ, из них 4 – в рецензируемых научных журналах и 4 – в сборниках материалов конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 178 печатных страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 203 наименования, и приложения. Работа содержит 16 таблиц и 43 рисунка, 7 таблиц и 12 рисунков вынесены в приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые мутантные линии. В работе исследовались мутанты из коллекции кафедры генетики МГУ с изменением пролиферативной активности апикальной меристемы побега: *fasciata5 (fas5)* и *nana-D (na-D)*. Рецессивная мутация *fas5* (линия М-21-1) получена на кафедре генетики МГУ на основе расы Dijon-M (линия К-1) с помощью химического мутагенеза с применением этилметансульфоната. Тестирование на аллелизм с другими мутантными линиями, характеризующимися развитием фасциации, были проведены в ранних работах (Кавай-оол, 2011;), в результате чего было установлено, что мутация *fas5* не является аллелем генов *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*, *FAS1* и *FAS2*. Доминантная мутация *na-D* (линия К-164) также получена на кафедре генетики МГУ на основе расы Enkheim-M (линия К-2).

Линии *A.thaliana*, используемые в работе. В данной работе помимо исследуемых мутантов *fas5* и *na-D* был использован ряд других мутантных линий и растений дикого типа, принадлежащих к различным расам *A.thaliana* для анализа взаимодействия генов и картирования (табл. 1).

Таблица 1. Линии *A.thaliana* использованные в работе

Раса/мутант (линия)	Источник линии
Dijon-M (K-1), Enkheim-M (K-2), Blanes-M (K-6), Columbia-M (K-8)	МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия), биологический факультет, кафедра генетики
<i>clv1</i> (K-205), <i>ap2-14</i> (K-217)	
<i>ap1-20</i> , <i>er1</i> , <i>gl1</i> , <i>cer2</i> , (K-310)	
<i>clv2-1</i> (CS46), <i>clv3-2</i> (CS8066), <i>lfy-10</i> (CS6279), <i>pi-1</i> (CS77), <i>wus-1</i> (CS15)	Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC; http://arabidopsis.org/)
Columbia (CS70000)	
<i>er1</i> (Ler)	Институт генетики растений и агрокультура (ИГРА; Гатерслебен, Германия)
<i>ttg1</i> , <i>yi1</i> (mm5)	

Выращивание *A.thaliana* в асептической и почвенной культуре. Растения выращивали в смеси почвы и песка (2:1) в теплице или в комнате с постоянными климатическими условиями и на агаризованной среде (Квитко, 1960) в чашках Петри при температуре 24°C и фотопериоде 16 часов (в случае длинного дня) и фотопериоде 8 часов (в случае короткого дня). Автоклавировали среды в режиме 1А в течение 40 мин. Семена стерилизовали 5 мин в смеси 70% спирта и перекиси водорода (3-5%).

Морфометрический анализ. Измерения морфометрических параметров проводили у растений в возрасте 4-х и 8-ми недель. Квадратичное отклонение и среднюю ошибку вычисляли по стандартным формулам, для определения достоверности различий между средними значениями морфометрических показателей использовали критерий Стьюдента (Лакин, 1990) Среднее число органов цветка и число аномальных органов рассчитывали отдельно для 1-го - 5-го, 6-го - 10-го и 11-го – 15-го цветков. Типы органов цветка определяли в соответствие с положением в мутовке (I-IV).

Документирование материала. Съёмки растений осуществляли посредством цифровой камеры Canon (Япония) с использованием бинокля Stemi 2000-C (Германия), а также посредством сканирующих электронных микроскопов.

Сканирующая электронная микроскопия. Исследование апикальных меристем побега растений проводили с помощью: аналитического сканирующего электронного микроскопа JSM- 6380LA (Jeol, Япония), сканирующего электронного микроскопа S-405A (Hitachi, Япония) с ускоряющим напряжением 15кВ. Анализируемые апикальные меристемы побега выделяли на стадиях начала развития второго взрослого листа, перехода к цветению, раскрытия первых цветков и завершения цветения. Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 16 часов при 4°C. Затем образцы последовательно проводили через 80% этанол - 10 мин, 95% этанол 2 раза по 30 минут, после чего переносили в смесь 95% этанол/97% ацетон 1:1 на 30 минут, далее пробы инкубировали в 100% ацетоне в течение 2-х часов. Материал сушили в критической точке (т.е. высушивали посредством возгонки жидкой фазы в газообразную под высоким давлением и температуре), после чего прикрепляли к столикам и напыляли смесью палладия и платины в ионном напылителе IB-3 (Eiko, Япония) слоем 15 нм.

Генетическое картирование. Для локализации мутаций на генетической карте мутанты скрещивали с линиями, содержащими морфологические маркеры (таблица 1), после чего анализировали расщепление в F2, в отдельных случаях – F3. Соответствие наблюдаемого расщепления дигибриднему расщеплению 9:3:3:1 проверяли с помощью критерия χ^2 ,

раскладывая его на компоненты (Серебровский, 1970), что позволяло определить причину несоответствия наблюдаемого расщепления теоретическому. Частоту рекомбинации между генами определяли методом произведений (Серебровский, 1970). При определении генетического расстояния по соотношению расщепляющихся и нерасщепляющихся семей F3 использовали формулу Корнеефа-Стамма (Koorneef, Stam, 1987). Для преобразования полученного значения % рекомбинации в сМ использовали функцию Косамби (Захаров, 1979).

Для подготовки картирования мутации *fas5* методом высокопараллельного секвенирования было проведено скрещивание мутантной линии *fas5* с линией дикого типа CS70000 расы Columbia, геном которой секвенирован. Из F2 от данного скрещивания было отобрано 2 пула по 25 растений дикого типа и 25 мутантов *fas5*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плейотропный эффект мутации *fas5* и её проявление в онтогенезе

Изменение размеров и морфологии АМП мутанта *fas5*. Для мутанта *fas5* характерно изменение размеров и морфологии апикальной меристемы побега (АМП) относительно растений дикого типа. АМП мутанта *fas5* имеет большие размеры относительно дикого типа (рис. 1). При этом размер АМП *fas5* последовательно увеличивается в ходе онтогенеза.

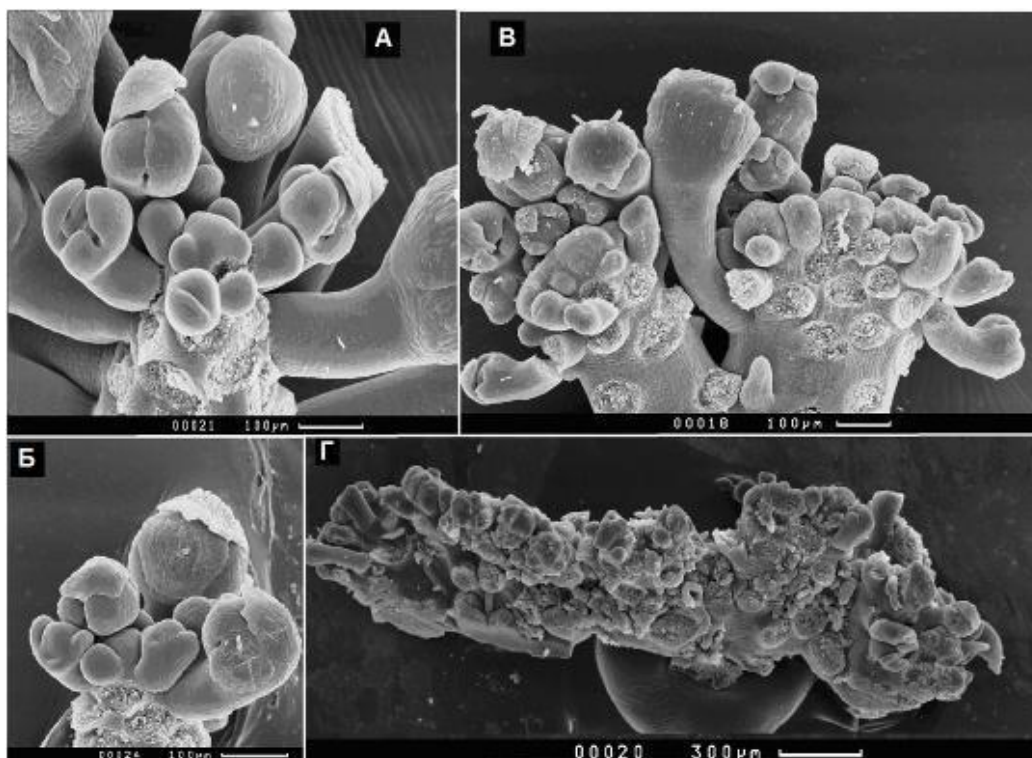


Рисунок 1. АМП растений дикого типа (А, Б) и мутанта *fas5* (В, Г)

У мутанта *fas5* изменяется также морфология АМП. У дикого типа АМП представляет собой единую куполообразную структуру (рис. 1, А, Б), в то время как АМП *fas5* склонна к образованию в своем составе ряда слитых «дочерних» меристем, число которых растёт со временем (рис. 1, В, Г). АМП мутанта *fas5* часто разделяется по границам данных «дочерних» меристем на 2 или более независимых АМП (рис. 1, В).

На поверхности АМП мутантных растений *fas5* формировались крупные клетки, морфологически сходные с клетками, прекратившими деление, и перешедшими к

эндоредупликациям (De Veylder et al., 2011). Их число и размеры прогрессировали в ходе онтогенеза. Это может являться следствием потери стволовыми клетками АМП мутанта *fas5* недетерминированного состояния.

Ускорение выброса цветоноса мутанта *fas5*. Мутант *fas5* характеризуется более ранним выбросом и ускоренным развитием цветоноса относительно растений дикого типа. Выброс цветоноса у мутанта *fas5* осуществляется на 34-й – 35-й день после прорастания семян, в среднем на 5 - 6 дней раньше растений дикого типа, которые выбрасывают цветонос на 39-й – 40-й день после прорастания (рис. 2).

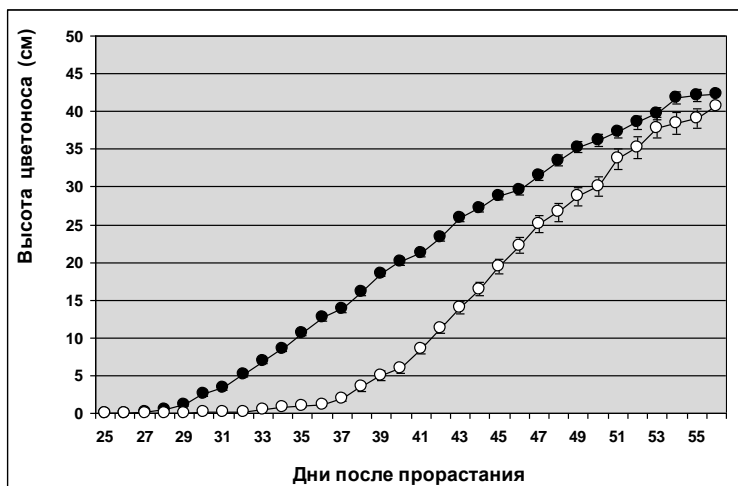


Рисунок 2. Динамика развития цветоноса мутанта *fas5* (черные кружки) и дикого типа (белые кружки).

Число листьев розетки у мутанта *fas5* ($4,7 \pm 0,6$) снижено относительно дикого типа ($8,2 \pm 0,7$), что также отражает ранний переход мутантов к цветению. Число стеблевых

листьев мутанта *fas5* ($5,7 \pm 1$) незначительно увеличено относительно растений дикого типа ($3,6 \pm 0,7$), тем не менее, достоверные различия наблюдаются только у растений *fas5* с ярко выраженной фасциацией ($13,0 \pm 4,3$).

Нарушение развития побега *fas5* в условиях короткого дня. При выращивании мутанта *fas5* в условиях короткого светового дня наблюдалась серьезная задержка роста относительно растений дикого типа (табл. 2), при этом общая высота растений дикого типа достоверно не различалась в условиях короткого ($39,8 \pm 2,1$) и длинного дня ($42 \pm 0,8$). Растения *fas5* демонстрировали сильное ветвление на вегетативной стадии за счёт активации пазушных почек, число листьев розетки увеличивалось по сравнению с длинным световым днём ($4,7 \pm 0,6$ на длинном и $10,97 \pm 1,9$ на коротком дне, табл. 2). Также происходило сильное растяжение междоузлий розетки, что не наблюдалось в данных условиях у растений дикого типа. Растения дикого типа в условиях короткого дня выбрасывали цветонос с существенной задержкой относительно длинного дня: на 50-й – 55-й день после прорастания.

Таблица 2. Морфометрические данные розетки и цветоноса растений *fas5* и дикого типа, культивированных в условиях короткого дня

Линия	Число розеточных листьев	Число стеблевых листьев	Высота розетки	Высота цветоноса	Общая высота растения
Дикий тип	$10,27 \pm 1,6$	$8,6 \pm 1,3$	$0,5 \pm 0,2$	$39,3 \pm 1,9$	$39,8 \pm 2,1$
<i>fas5</i>	$10,97 \pm 1,9$	0	$3,4 \pm 1,2^{**}$	$1,6 \pm 0,5^{**}$	$5 \pm 1,7^{**}$

** - значения для мутанта *fas5* достоверно отличаются от значений для дикого типа при $P > 0,99$

Примерно 95% растений *fas5*, культивированных в условиях короткого светового дня, вообще не образовывали цветоноса, прекращая рост на стадии розетки. Это свидетельствует об

участии гена *FAS5* в регуляции ответа на фотопериод.

Анализ взаимодействия гена *FAS5* с генами, контролирующими поддержание постоянства пула стволовых клеток в АМП

Для более подробного анализа влияния гена *FAS5* на формирование АМП и развитие побега, а также развитие цветка и переход к цветению, был проанализирован ряд двойных мутантов, полученных от скрещивания линии *fas5* с линиями, содержащими мутации в известных генах, играющих ключевые роли в данных процессах. В частности с мутантными линиями *clv1*, *clv2-1*, *clv3-2* и *wus-1*.

Взаимодействие гена *FAS5* с генами *CLV1*, *CLV2* и *CLV3*. АМП двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1*, *fas5 clv3-2* характеризовались увеличением размеров относительно обеих родительских форм (рис. 3). АМП двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1*, *fas5 clv3-2* фрагментировалась на «дочерние» меристемы (рис. 3), в то время как АМП одиночных мутантов *clv1*, *clv2-1*, и *clv3-2* АМП представляли собой единую валикообразную структуру. Увеличение размеров АМП двойных мутантов *fas5 clv* происходило вследствие увеличения размеров «дочерних» меристем, которые приобретали морфологию, сходную с таковой у одиночных мутантов *clv*.

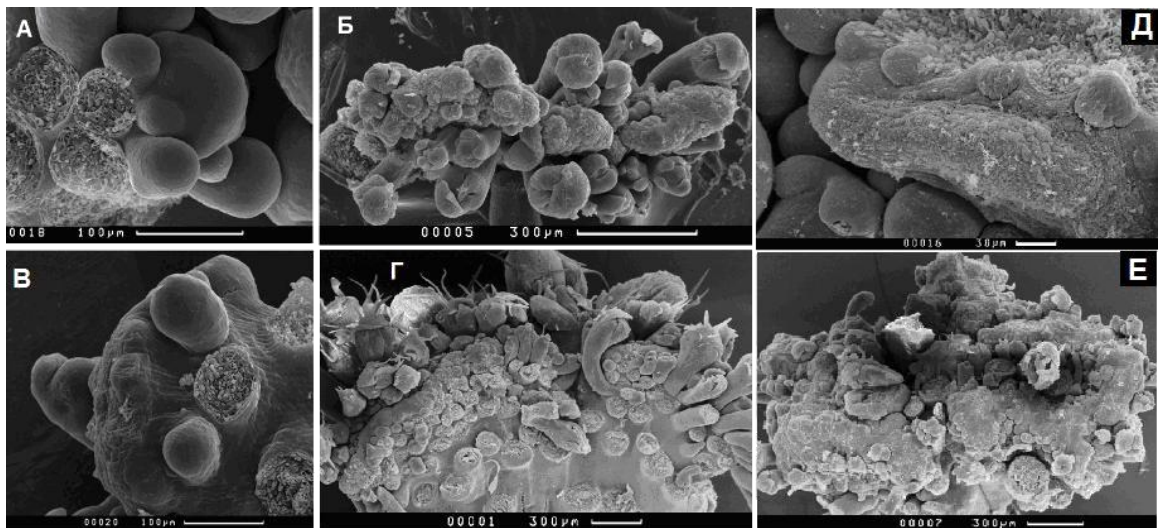


Рисунок 3. АМП двойных мутантов *fas5 clv* и одиночных мутантов *clv*. А - АМП одиночного мутанта *clv1*, Б – АМП двойного мутанта *fas5 clv1*, В - АМП одиночного мутанта *clv2-1*, Г – АМП двойного мутанта *fas5 clv2-1*, Д – АМП одиночного мутанта *clv3-2*, Е - АМП двойного мутанта *fas5 clv3-2*.

Это свидетельствует о том, что в каждой «дочерней» меристеме в составе АМП мутанта *fas5* функционирует независимая система регуляции *WUS-CLV*, а также о том, что гены *FAS5* и *CLV* действуют по независимым путям.

Взаимодействие гена *FAS5* с геном *WUS*. В потомстве растений F2 от скрещивания *fas5* × *wus-1* (гетерозигота), гомозиготных по мутации *fas5*, доля выщепляющихся двойных мутантов *fas5 wus-1* соответствовала 1/4 (табл. 3). Для двойного мутанта *fas5 wus-1* характерно ужесточение фенотипа, характерного для мутации *wus-1*. Розетки взрослых растений двойного мутанта *fas5 wus-1* имеют меньшие размеры по сравнению с одиночным *wus-1*, размер листовых пластинок также меньше, чем у одиночного *wus-1*, также растения

fas5 wus-1 не способны формировать даже укороченный цветонос. АМП одиночного мутанта *wus-1* представляет собой небольшую плоскую структуру (рис. 5,А).

Таблица 3. Анализ расщепления в поколении F3 от скрещивания *fas5* × *wus-1*

Поколение	Фенотипические классы		Σ Выборки	χ^2 (3: 1)
	aa B-	aa bb		
F3	89	23	112	1,2

$\chi^2_{\text{табл}} = 3,84$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 1$, A – *FAS5*,

B – *WUS*

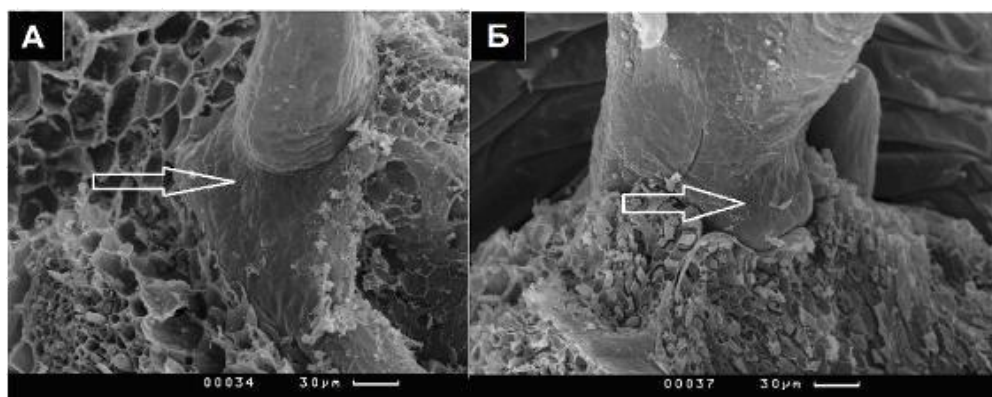


Рисунок 4. АМП одиночного мутанта *wus-1* и двойного мутанта *fas5 wus-1* (стрелки) А- двойной мутант *fas5 wus-1*. Б – одиночный мутант *wus-1*.

Такая же морфология АМП наблюдается и у двойного мутанта *fas5 wus-1*, у которого при этом АМП несколько меньшего размера, чем у одиночного *wus-1* (рис. 4, Б). Уменьшение размеров АМП у двойного мутанта *fas5 wus-1* относительно одиночного мутанта *wus-1* может быть следствием потери стволовыми клетками недетерминированного состояния в результате мутации *fas5*, что приводит к более быстрому истощению их пула на фоне мутации *wus-1*. Таким образом, ген *FAS5* поддерживает клетки АМП в недетерминированном состоянии и обеспечивает её целостность, формируя единую область экспрессии *WUS*.

Анализ взаимодействия гена *FAS5* с генами, контролирующими развитие меристемы цветка

Ускорение выброса цветоноса и морфологические нарушения цветка у мутанта *fas5* свидетельствуют об участии гена *FAS5* в регуляции перехода к цветению и развития цветка. С целью уточнения роли *FAS5* в данных процессах был проведён анализ двойных мутантов, полученных от скрещивания линии *fas5* с линиями *A.thaliana* несущими мутации в ключевых генах контролирующих переход к цветению и развитие цветка.

Взаимодействие гена *FAS5* с геном *LFY*. Растения F1 скрещивания *fas5* × *lfy-10* не отличались от дикого типа, в F2 не наблюдалось выщепления двойных мутантов (табл.4), в F3 (потомство гомозигот *fas5* F2) доля растений *fas5 lfy-10* составляла 1/4 (табл. 4). Растения двойного мутанта *fas5 lfy-10* выбрасывают цветонос в среднем на 10 дней раньше, чем растения одиночного мутанта *lfy-10* и практически одновременно с одиночным мутантом *fas5* (рис. 5).

Таблица 4. Анализ расщепления в поколениях F2 и F3 от скрещивания *fas5* × *lfy-10*

Поколение F2	Фенотипич. классы			Σ Выборки	χ^2 ^a (1: 2: 1)
	A- B-	A- bb	aa B-		
	221	112	91	424	3,44
Поколение F3	aa B-		aa bb	Σ	χ^2 ^b (3: 1)
	196		56		

A – *FAS5*, B – *LFY*, ^a - $\chi^2_{\text{табл}} = 5,99$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 2$, ^b - $\chi^2_{\text{табл}} = 3,84$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 1$

Ускоренный выброс цветоноса двойным мутантом *fas5 lfy-10* относительно одиночного мутанта *lfy-10* подтверждает раннее предположение об участии гена *FAS5* в репрессии перехода на репродуктивную стадию.

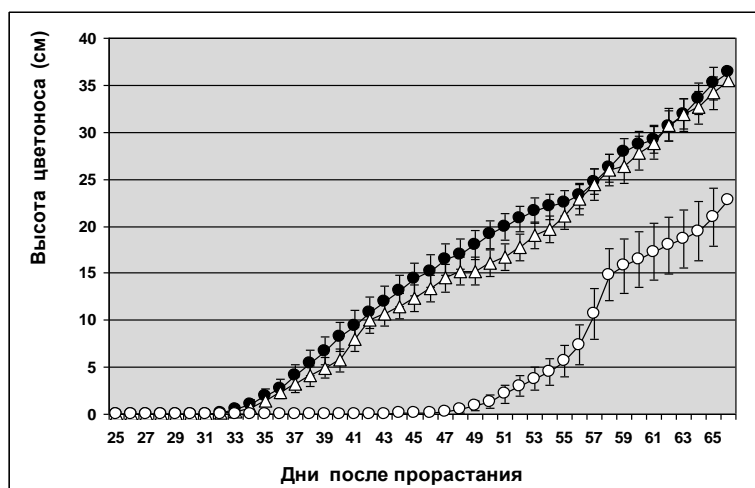


Рисунок 5. Динамика развития цветоноса у линий *fas5*, *fas5 lfy-10* и *lfy-10*. Чёрные кружки - *fas5*, белые кружки - *lfy-10*, белые треугольники - *fas5 lfy-10*.

У двойного мутанта *fas5 lfy-10* происходит превращение всех цветков в ветвистые побегоподобные структуры не способные образовывать генеративные органы (рис. 6, А), в результате чего растения двойного мутанта полностью стерильны.

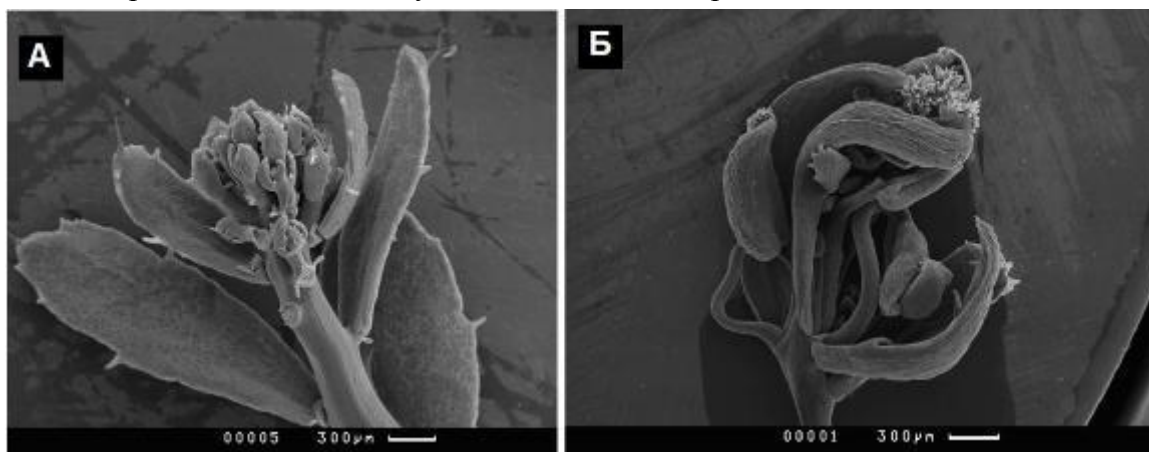


Рисунок 6. Цветки двойного мутанта *fas5 lfy-10* и одиночного мутанта *lfy-10*. А – цветок двойного мутанта *fas5 lfy-10*. Б - цветок одиночного мутанта *lfy-10*

В то же время у одиночного мутанта *lfy-10* в апикальных цветках образуются генеративные органы (рис. 6, Б). Фенотип двойных мутантов *fas5 lfy-10* является следствием усиления экспрессивности аллеля *lfy-10*. Это говорит об участии гена *FAS5* в положительной регуляции гена *LFY*. Таким образом, *FAS5* являясь негативным регулятором перехода на

репродуктивную стадию, уже после осуществления данного перехода индуцирует развитие флоральной меристемы, по-видимому, активируя экспрессию гена *LFY*.

Генетическое картирование мутации *fas5*

Картирование мутации *fas5* с применением морфологических маркеров. Мы провели анализ сцепления мутации *fas5* с маркерами всех хромосом *A.thaliana*. Эти исследования не подтвердили предварительных данных о локализации мутации *fas5* в хромосоме II (Кавай-оол, 2011), но обнаружили сцепление с хромосомой V *A.thaliana* (табл. 5).

Таблица 5. Анализ сцепления мутации *fas5* с маркерными мутациями из хромосом I – V *A.thaliana*

№ Хромосомы	Маркер	Фенотипические классы F2				Σ Выборки	χ ²			D(cM)
		A- B-	A- bb	aa B-	aa bb		A	B	L	
I	<i>ap1-1(99)</i>	252	79	76	30	437	0,13	0,001	0,83	-
II	<i>er1(48)</i>	258	74	81	24	437	0,22	1,54	0,02	-
	<i>sty(8)</i>	222	81	69	15	387	2,24	0,07	2,48	-
	<i>as1(64)</i>	206	93	66	18	383	1,9	3,56	3,4	-
	<i>cer8(76)</i>	212	81	63	14	370	3,46	0,09	2,84	-
III	<i>gl1(46)</i>	259	68	84	26	437	0,01	2,83	0,35	-
IV	<i>cer2(52)</i>	149	67	88	33	437	1,68	1,04	1,67	-
V	<i>ttg1(28)</i>	279	75	79	30	463	0,49	1,33	1,81	-
	<i>yi1(85)</i>	266	96	99	2	463	2,5	3,62	21,7**	5,71 ±1

A – *FAS5*, B – маркерный ген, χ²_{табл} = 3,84 при уровне значимости λ = 0,05 и степени свободы df = 1, ** - отклонение от теоретического расщепления не случайно при P > 0,99

Нами выявлено сцепление мутации *fas5* с маркером *yi1*, расположенным в нижнем плече хромосомы V в положении 85сМ (табл. 5). Локализация *fas5* на хромосоме V *A.thaliana* также подтверждена сцепления мутации *fas5* с мутацией *lfy-10*. Был проведен анализ потомков 41 гомозиготы по мутации *fas5* из поколения F2. Среди 41 семьи F3 было выявлено 2 расщепляющиеся и 39 нерасщепляющихся семей. Расчет силы сцепления определяет генетическое расстояние в 2,5±0,01сМ. Ген *LFY* находится выше гена *YI* в положении 82 сМ, и расстояние между генами *YI* и *LFY* равно 3сМ. Таким образом, что мутация *fas5* локализуется левее *lfy-10* на генетической карте V хромосомы *A.thaliana* (рис. 7).

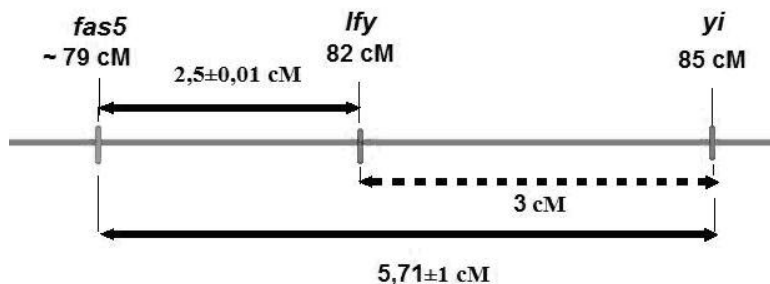


Рисунок 7. Локализация мутации *fas5* на генетической карте нижнего плеча V хромосомы (сплошными стрелками показаны экспериментально найденные генетические расстояния, пунктирная стрелка показывает расстояние, рассчитанное по карте).

Картирование мутации *fas5* методом высокопараллельного секвенирования. Параллельно с картированием мутации *fas5* с использованием морфологических маркеров к.б.н. с.н.с. А.А. Пениным и сотрудниками его группы было проведено картирование данной мутации методом высокопараллельного секвенирования нового поколения в лаборатории профессора А.С.Кондрашова на факультете биоинженерии и биоинформатики (Альберт Е.В., Клепикова А.В., Демиденко Н.В., Ежова Т.А., Логачёва М.Д., Пенин А.А., 2014). Для этого были использованы полученные пулы растений из F2 скрещивания F2 *fas4* × Col CS70000. Полученные данные были обработаны с использованием программы SNPtrack, что позволило локализовать ген в районе 22-23 МБ хромосомы V и показать, что мутация *fas5* затрагивает ген *At5g55300* (*TOP1α*) (рис. 8), кодирующий ДНК топоизомеразу I α.

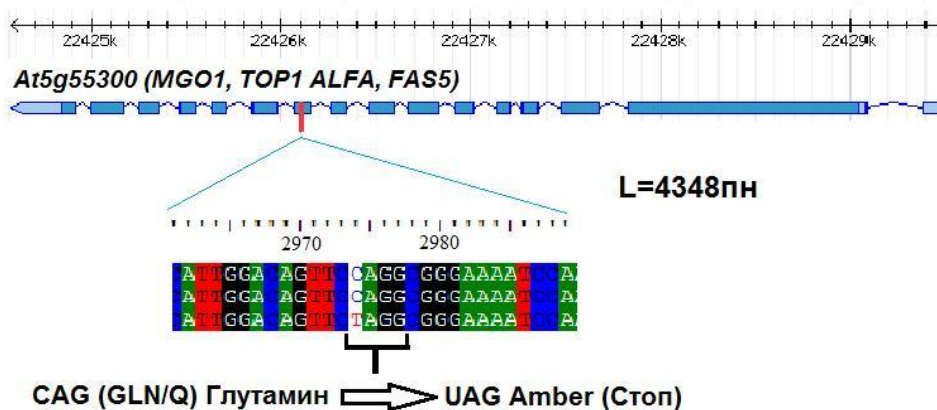


Рисунок 8. Локализация мутации *fas5* в гене *TOP1α* *A.thaliana*

Анализ мутации *fas5* in silico. Был проведён анализ структуры продукта гена *TOP1α* с использованием баз данных InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Mitchell et al., 2014) и CD Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer et al., 2011), на основе которого были сделаны выводы о нарушениях, вызываемых различными описанными мутациями в данном гене, в том числе и *fas5* (рис. 9).

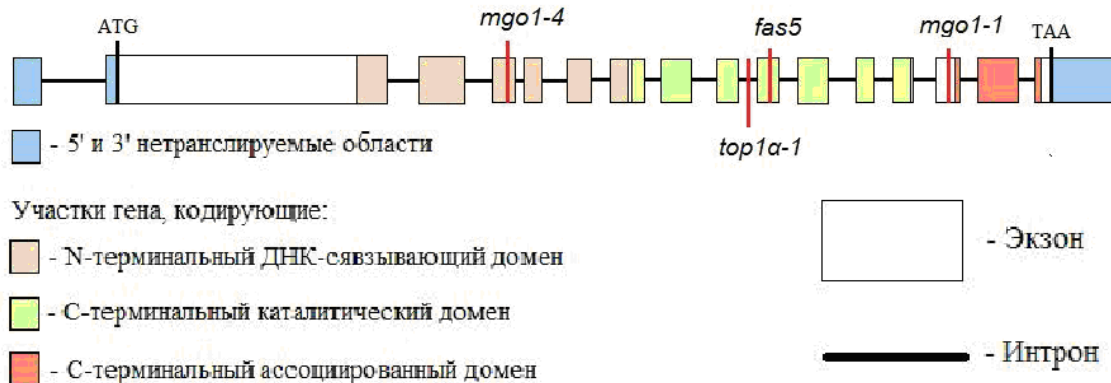


Рисунок 9. Структура гена *TOP1α* и расположение мутаций *fas5*, *mgo1-1*, *top1α-1* и *mgo1-4*.

Было показано, что 4 описанных мутации - *fas5*, *mgo1-1*, *top1α-1* и *mgo1-4* приводят к потере С-концевого домена, содержащего активный центр фермента. Таким образом, мутация *fas5* (как и остальные проанализированные мутации) может быть отнесена к нуль-аллелям.

Общая характеристика и проявление в онтогенезе мутации *na-D*

Доминантная мутация *nanpa-D* (*na-D*) из коллекции кафедры генетики вызывает формирование укороченного цветоноса за счет сокращения длины междоузлий и уменьшения числа самих узлов. Ещё одной важной отличительной чертой мутации *na-D* является уменьшение размеров АМП за счёт сокращения числа клеток (АМП мутантных растений на генеративной стадии в 2-3 раза меньше в сравнении с растениями дикого типа, Ежова и др., 2002). Для выяснения времени проявления мутации *na-D* в онтогенезе и изучения ее влияния на структуру и функцию АМП нами проведен анализ АМП и морфологии растений мутанта и дикого типа на разных стадиях развития.

Влияние мутации *na-D* на пролиферативную активность клеток АМП. АМП гомозигот *na-D* демонстрировала меньшие размеры относительно растений дикого типа родительской расы Enkheim (En) (рис. 10, А, В), а при переходе на генеративную стадию продолжает уменьшаться в размерах (рис. 10, Б), в то время как АМП растений En увеличивается (рис. 10, Г). На генеративной стадии АМП гомозигот *na-D* способна закладывать несколько флоральных примордиев, но лишь у незначительной части гомозиготных растений они развиваются в цветки.

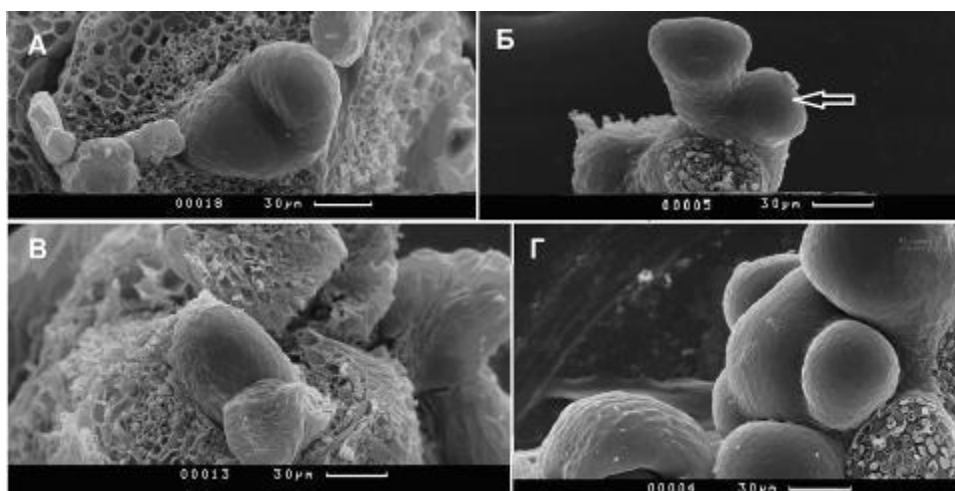


Рисунок 10. АМП гомозиготных растений *na-D* и растений дикого типа. АМП гомозигот *na-D* А – на стадии розетки, Б – на стадии начала цветения (отмечена стрелкой). АМП дикого типа (En): В – на стадии розетки, Г – на

стадии начала цветения.

В ранних работах было показано, что гомозиготы *na-D* способны образовать то же число розеточных листьев, что и растения исходного экотипа (Ежова и др., 2002). В данной работе показано, что, несмотря на отсутствие различий в числе листьев, у растений *na-D*, в отличие от дикого типа, начиная со 2-й – 3-й пары розеточных листьев, начинается уменьшение размеров листовой пластинки (рис. 11, Б).

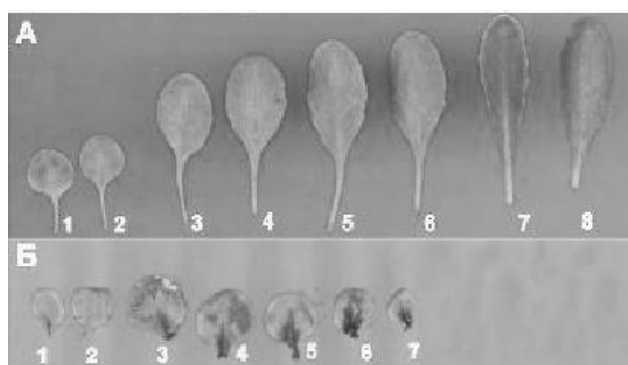


Рисунок 11. Розеточные листья гомозиготные листья растения дикого типа расы En. Б – розеточные листья гомозиготного растения *na-D*. Цифрами отмечены номера листьев в порядке их образования.

Наблюдаемое уменьшение размеров листовых пластинок имеет очевидную связь с уменьшением размера АМП в онтогенезе и отражает нехватку клеточного материала для формирования полноценных репродуктивных органов.

Проявление мутации *na-D* на разном генетическом фоне. У мутации *na-D* наблюдается изменение характера наследования в зависимости от генетического фона. На фоне родительской расы Enkheim (En) мутация *na-D* проявляет себя как ядерная моногенная доминантная. На фоне расы En гомо- и гетерозиготные растения *na-D* являются карликами (высота не превышает 2-х сантиметров, гетерозиготы отличаются способностью образовывать цветки). Соотношение гомозиготных и гетерозиготных растений *na-D* и растений дикого типа составляло 1:2:1, что соответствует моногенному типу наследования (табл. 6).

Таблица 6. Анализ расщепления в F2 от скрещивания En × *na-D*

Скрещивание (F2)	Мутантные растения		Дикий тип	∑ Выборки	χ^2
En × <i>na-D</i>	Гомозиготы <i>na-D</i>	Гетерозиготы <i>na-D</i>	Дикий тип	258	(1:2:1) 0,763
	64	135			

$\chi^2_{\text{табл}} = 5,99$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 2$

На фоне расы Columbia (Col) наблюдалось падение экспрессивности мутации *na-D*. Гетерозиготы F1 скрещивания Col × *na-D* имели высоту 19 – 27см и отличались от растений дикого типа только сокращением длины междоузлий (в 2-3 раза). В потомстве гетерозигот *na-D* из F2 наблюдалось выщепление стерильных карликовых гомозигот *na-D*, фенотипически идентичных гомозиготам на фоне расы En. Гетерозиготы не были фенотипически однородными и подразделялись на ряд фенотипических классов по высоте главного цветоноса (0,5 – 3см; 1,2-1,5см; 3-5см; 7-8см; 20-22 см). При этом расщепление в F2 Col × *na-D* не соответствовало моногенному и характеризовалось избытком растений дикого типа и недостатком мутантных растений *na-D* (табл. 7).

Таблица 7. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещивания Col × *na-D*

Скрещивание (F2)	Гомозиготы <i>na-D</i>	Гетерозиготы <i>na-D</i>	Дикий тип	∑ Выборки	χ^2 (1:2:1)
Col × <i>na-D</i>	85	164	188	437	75,11**

$\chi^2_{\text{табл}} = 5,99$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 2$, ** - отклонение от теоретического расщепления не случайно при $P > 0,99$

АМП гомозиготных растений *na-D*_{Col} на вегетативной стадии демонстрировала несколько большие размеры, чем АМП гомозигот *na-D*_{En}, хотя также уменьшалась при переходе на генеративную стадию (рис. 12, А,В). В то же время размеры АМП гетерозигот *na-D*_{Col} были прямо пропорциональны высоте главного цветоноса (рис. 12, Г-Е).

На генетическом фоне расы Dijon (Di) и линии Landsberg erecta (Ler) мутация *na-D* демонстрировала проявления сходное с таковым на фоне расы En. Гетерозиготы F1 от скрещиваний Ler × *na-D* и Di × *na-D* имели высоту соответственно 1,5 – 2,5см и 1,5 – 3см. В F2 выщеплялись стерильные гомозиготные растения *na-D*, и гетерозиготы *na-D*, фенотипически идентичные гомозиготам из F1. Расщепление F2 от скрещиваний *na-D* с растениями Di и Ler соответствовало ядерному моногенному (табл. 8).

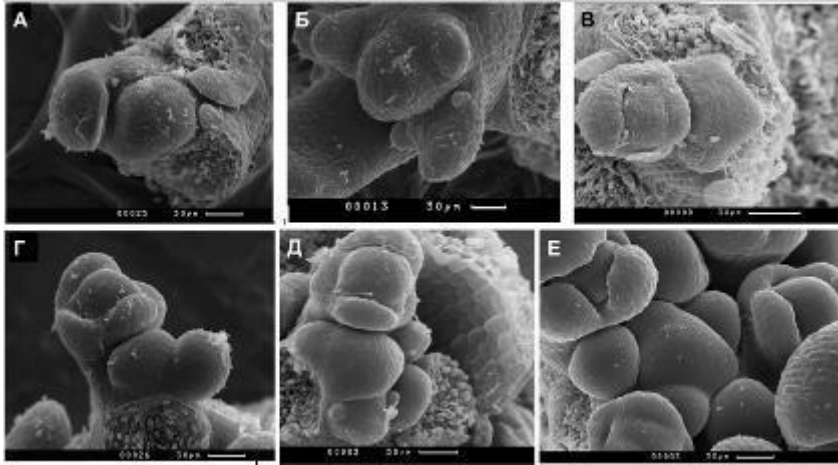


Рисунок 12. АМП растений *na-D* на фоне расы Columbia. На стадии розетки: А – АМП гомозиготы *na-D*, Б – гетерозиготы *na-D*. На стадии начала цветения: В – гомозигота *na-D*; АМП гетерозигот *na-D* с высотой главного цветоноса Г – 3см, Д – 4,5см, Е – 6,5.

Таблица 8. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещивания *Ler* × *na-D* и *Di* × *na-D*

Скрещивание (F2)	Гомозиготы <i>na-D</i>	Гетерозиготы <i>na-D</i>	Дикий тип	∑ Выборки	χ^2 (1:2:1)
<i>Ler</i> × <i>na-D</i>	24	65	30	120	1,65
<i>Di</i> × <i>na-D</i>	23	49	34	106	2,88

$$\chi^2_{\text{табл}} = 5,99 \text{ при уровне значимости } \lambda = 0,05 \text{ и степени свободы } df = 2$$

На фоне рас *Wassilewskija* (*Ws*) и *Blanes* (*Bla*) мутация *na-D* демонстрировала проявление, аналогичное наблюдаемому на фоне расы *Col*. Гетерозиготы *na-D* из F1 от скрещиваний *Ws* × *na-D* и *Bla* × *na-D* имели высоту главного цветоноса соответственно 16-26 и 17-22см. В F2 от скрещивания *Ws* × *na-D* и *Bla* × *na-D* также наблюдались несколько фенотипических классов гетерозигот, различающихся по высоте главного цветоноса: 1 - 3см; 9 - 14см; 16 - 18см; 22 - 24см *Ws* 0,5-2см; 4-6см, 8-12см и 19-22см на фоне *Bla*. Фенотип гомозиготных растений *na-D* из F2 на фоне *Ws* и *Bla* соответствовал фенотипу гомозигот *na-D_{En}* как и на фоне расы *Col* (рис.13).



Рисунок 13. F2 от скрещивания *Ws* × *na-D*, нижний ряд, слева направо: растение дикого типа, гетерозиготы *na-D* высотой соответственно 24см, 16,5см и 13,5см; верхний ряд – справа налево: гетерозиготы *na-D* с высотой 2см и 0,5см; гомозигота *na-D*. Бары соответствуют 5см.

Расщепление в F2 от скрещивания *Ws* × *na-D* и *Bla* × *na-D* отличалось от моногенного и характеризовалось недостатком мутантных растений *na-D* и избытком растений дикого типа (табл. 9).

Табл. 9. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещиваний *Ws* × *na-D* и *Bla* × *na-D*.

Скрещивание (F2)	Гомозиготы <i>na-D</i>	Гетерозиготы <i>na-D</i>	Дикий тип	∑ Выборки	χ^2 (1:2:1)
<i>Ws</i> × <i>na-D</i>	7	20	27	54	21,54**
<i>Bla</i> × <i>na-D</i>	8	17	28	53	18,87**

$\chi^2_{\text{табл}} = 5,99$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 2$, ** - отклонение от теоретического расщепления не случайно при $P > 0,99$

Наблюдаемое изменение типа наследования мутации *na-D* в зависимости от генетического фона может быть следствием наличия генов-модификаторов, влияющих на экспрессивность мутантной аллели *na-D*, при этом их аллельный состав различается у разных рас *A.thaliana*.

Анализ взаимодействия гена *NA* с генами, контролирующими поддержание постоянства пула стволовых клеток в АМП

Взаимодействие гена *NA* с генами *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*. С целью уточнения роли гена *NA* в контроле активности АМП в совместной работе с У.Н. Кавай-оол был проведён анализ полученных двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1*, *na-D clv3-2*, которые на репродуктивной стадии характеризовались увеличением размеров АМП, хотя и являлись карликами (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2015). Так как мутация *na-D* проявляется уже на вегетативной стадии развития, нами был проведен анализ структуры АМП двойных мутантов *na-D* на данной стадии. На стадии развитых 2-х пар настоящих листьев у растений двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1* и *na-D clv3-2* наблюдалось увеличение размеров АМП относительно одиночного мутанта *na-D* и дикого типа (рис. 14).

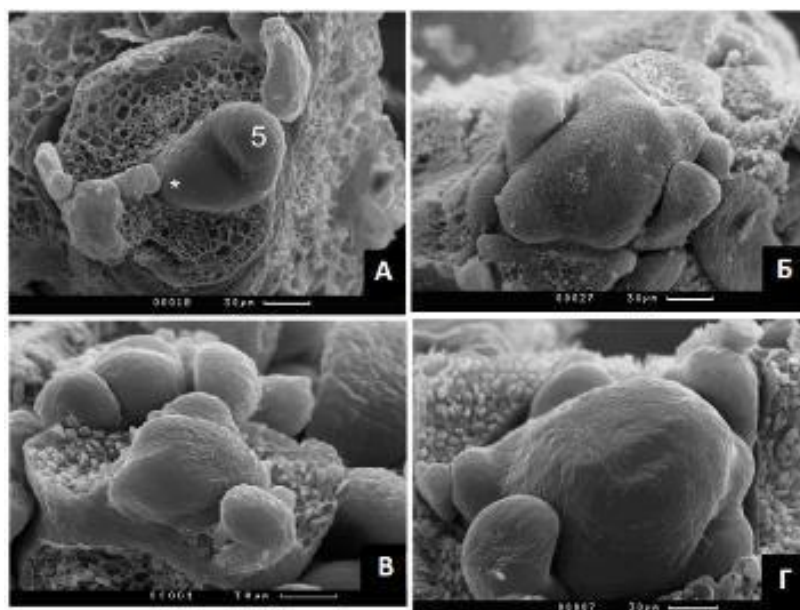


Рисунок 14. Вегетативная АМП главного побега двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1*, *na-D clv3-2*, и одиночного мутанта *na-D*. А – АМП гомозиготы *na-D* (* - АМП 5 – примордий 5-го листа). Двойных гомозигот: Б - *na-D clv1*, В - *na-D clv2-1*, Г - *na-D clv3-2*. Бары соответствуют 30 мкм.

Несмотря на это, увеличение АМП вследствие роста активности *WUS* (в результате отсутствия его негативной регуляции со стороны *CLV*) не способно восстановить фенотип цветоноса *na-D*. Это говорит о том, что терминация АМП у мутанта *na-D* не связана с её размерами, а значит и с объёмом пула СК.

Взаимодействие гена *NA* с геном *FAS5/TOPIa*. С целью уточнения роли генов *NA*, а также гена *FAS5/TOPIa* в регуляции активности АМП был проведен анализ полученных двойных мутантов *fas5 na-D*. Двойные мутанты *fas5 na-D* (как гомо- так и гетерозиготные по *na-D*) являлись карликами, как и одиночный мутант *na-D*. АМП двойных мутантов *fas5 na-D*

демонстрировала увеличенные размеры относительно одиночного мутанта *na-D* и постепенно уменьшалась в ходе онтогенеза, что особенно ярко проявлялось при переходе на репродуктивную стадию (рис. 15).

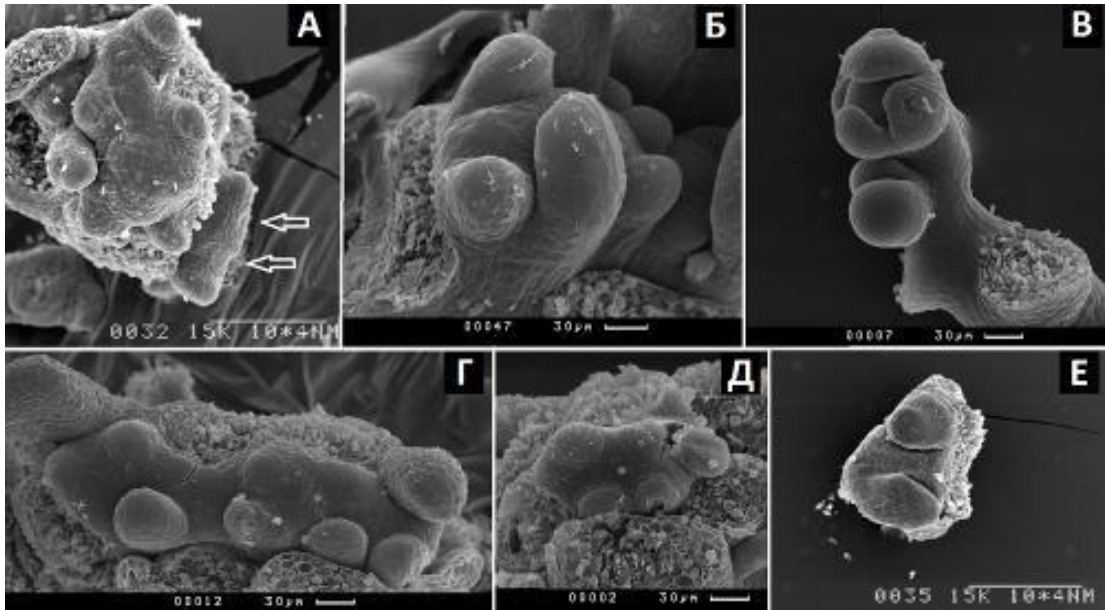


Рисунок 15. АМП двойных мутантов *fas5 na-D* на стадиях соответственно ранней розетки, поздней розетки, генеративной стадии (или хронологически с ней совпадающей). А-В - АМП растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* на стадиях: Г-Е – АМП растений *fas5* гомозиготных по *na-D*.

Полученные данные свидетельствует, что гены *TOP1α* и *NA* действуют по независимым регуляторным путям. Если гены *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* и *TOP1α* начинают функционировать на эмбриональных стадиях развития и определяют размер пула стволовых клеток АМП и его структуру (в случае *TOP1α*), то ген *NA*, очевидно, начинает функционировать уже в постэмбриональный период развития растения – при переходе на репродуктивную стадию. На этом этапе ген *NA* регулирует пролиферативную активность стволовых клеток АМП, не влияя на размер их пула.

ВЫВОДЫ:

1. Мутация *fas5 A.thaliana* приводит к возникновению стоп-кодона в 9 экзоне гена *TOP1α*, кодирующего ДНК топоизомеразу I α, и оказывает плейотропный эффект на развитие всех органов побега.
2. Ген *TOP1α* играет важную роль в контроле пролиферативной активности клеток АМП - поддерживает недетерминированность и определяет целостность АМП, взаимодействуя с геном *WUS* – ключевым геном, иницирующим и поддерживающим пул стволовых клеток.
3. Ген *TOP1α* задерживает переход растений *A.thaliana* на репродуктивную стадию развития, но после данного перехода активирует развитие флоральной меристемы, взаимодействуя с геном *LFY*.
4. Ген *TOP1α* участвует в регуляции фотопериодической реакции растений.
5. Проявление мутации *na-D A.thaliana* и характер ее наследования зависит от генетического фона.

6. Ген *NA* играет важную роль в контроле пролиферативной активности стволовых клеток АМП на стадии перехода растений на репродуктивную стадию развития, не влияя на величину пула стволовых клеток и действуя независимо от генов *TOP1α*, *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах:

1. Альберт, Е.В. Стволовые клетки побега растений – генетическая регуляция / Е.В. Альберт, Т. А. Ежова // Генетика. – 2013. – Т.49. - №2. - С. 149 – 163.
2. Альберт, Е.В. Ген *NANA* регулирует пролиферацию клеток апикальной меристемы побега *Arabidopsis thaliana*, не взаимодействуя с генами *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* / Е.В. Альберт, У. Н. Кавай-оол, Т. А. Ежова // Онтогенез. - 2014. - Т.45. - № 5. - С. 326-332.
3. Альберт, Е.В. Плейотропный эффект мутации *fas5* на развитие побега *Arabidopsis thaliana* / Е.В. Альберт, У. Н. Кавай-оол, Т. А. Ежова // Онтогенез. - 2015. - Т.46 - №1. – С. 10-18.
4. Альберт, Е.В. Изучение роли гена *FASCIATA5* в развитии цветка *Arabidopsis thaliana* / Е.В. Альберт, У. Н. Кавай-оол, Т. А. Ежова // Онтогенез. - 2015. - Т.46 - №1. – С. 22-30.

Тезисы докладов:

5. 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.
6. Альберт, Е. В., Ежова Т. А. Влияние генетического фона на экспрессивность мутации *na* *Arabidopsis thaliana*. Международная научно-практическая конференции «Новости передовой науки». - 2013. - Болгария. – София. - Электронная публикация. - http://www.rusnauka.com/15_NPN_2013/Biologia/4_139412.doc.htm
7. Альберт Е.В. Нестабильность проявления карликовости у *Arabidopsis thaliana* на разном генетическом фоне - результат взаимодействия аллелей / Альберт Е.В., Мамошина П.О., Ежова Т.А. // VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону. – 2014. – С.76.
8. Альберт Е.В. Идентификация нового аллеля гена *DNA TOPOISOMERASE I ALPHA (TOP1)* *Arabidopsis thaliana* и анализ функции этого гена с использованием метода RNA-seq / Альберт Е.В., Клепикова А.В., Демиденко Н.В., Ежова Т.А., Логачева М.Д., Пенин А.А. // VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону. – 2014. – С.55.

Благодарности:

Выражаю искреннюю благодарность Татьяне Анатольевне Ежовой за неоценимую помощь при выполнении и подготовке работы и Уране Николаевне Кавай-оол за помощь в освоении методов работы с объектом исследования.

Особая благодарность - Алексею Александровичу Пенину, Анне Владимировне Клепиковой и Наталье Владленовне Демиденко, выполнившим картирование мутации *fas5* методом высокопараллельного секвенирования нового поколения.

Выражаю глубокую признательность Ольге Павловне Солдатовой за ценные консультации, а также Амине Курбидаевой и Полине Мамошиной за дружескую поддержку. Благодарю всех сотрудников и преподавателей кафедры генетики за теплую атмосферу и знания.

Хочу поблагодарить также Анну Владимировну Широкову за ценные навыки работы по выделению химически-индуцированных мутантов крестоцветных и незабываемую рабочую атмосферу в условиях Кропотовской биостанции ИБР РАН.

