

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи

Альберт Евгений Владимирович

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

Специальность 03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор Ежова Т.А.

Москва-2015

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Стволовые клетки растений – типы и особенности.....	7
1.2. Генетическая регуляция возникновения и онтогенетических изменений... 13	
апикальной меристемы побега.	
1.2.1. Закладка и развитие АМП в эмбриогенезе.....	13
1.2.2. Поддержание гомеостаза АМП в постэмбриональный период онтогенеза.....	20
1.2.2.1. Система <i>WUS-CLV</i> и ее дополнительные регуляторы.....	20
1.2.2.2. Регуляция АМП генами, обеспечивающими биосинтез и ответ на растительные гормоны.....	34
1.2.2.3. Эпигенетическая регуляция поддержания активности АМП.....	37
1.2.2.4. Участие генов-регуляторов клеточного цикла в поддержании гомеостаза АМП.....	41
1.2.2.5. Взаимодействие генов стволовости с генами клеточного цикла.....	46
1.3 Онтогенетические изменения АМП в постэмбриональном периоде.....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	60
2.1. Растительный материал.....	60
2.2. Методы исследования.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Плейотропный эффект мутации <i>fas5</i> и её проявление в онтогенезе.....	64
3.1.1 Изменение размеров и морфологии АМП мутанта <i>fas5</i>	64
3.1.2. Формирование крупных клеток на поверхности АМП <i>fas5</i>	68
3.1.3. Ускорение выброса цветоноса мутанта <i>fas5</i>	70
3.1.4. Нарушение развития побега <i>fas5</i> в условиях короткого дня.....	71
3.1.5. Зависимость степени нарушения числа и типа органов от яруса цветка у мутанта <i>fas5</i>	74
3.1.6. Развитие очагов эктопической пролиферации на поверхности мутанта <i>fas5</i>	76
3.2. Анализ взаимодействия гена <i>FAS5</i> с генами, контролирующими поддержание постоянства пула стволовых клеток в АМП.....	79
3.2.1. Взаимодействие гена <i>FAS5</i> с генами <i>CLV1</i> , <i>CLV 2</i> , <i>CLV 3</i>	79
3.2.2. Взаимодействие гена <i>FAS5</i> с геном <i>WUS</i>	84

3.3. Анализ взаимодействия гена <i>FAS5</i> с генами, контролирующими развитие меристемы цветка.....	86
3.3.1. Взаимодействие гена <i>FAS5</i> с геном <i>LFY</i>	87
3.3.2. Взаимодействие гена <i>FAS5</i> с геном <i>AP2</i>	90
3.3.3. Взаимодействие гена <i>FAS5</i> с <i>PI</i>	92
3.4. Генетическое картирование мутации <i>fas5</i>	93
3.5. Общая характеристика и проявление в онтогенезе мутации <i>nana-D</i>	97
3.5.1. Влияние мутации <i>na-D</i> на пролиферативную активность АМП.....	98
3.5.2. Проявление мутации <i>na-D</i> на разном генетическом фоне	100
3.6 Анализ взаимодействия гена <i>NA</i> с генами, контролирующими поддержание постоянства пула стволовых клеток в АМП	107
3.6.1. Взаимодействие гена <i>NA</i> с генами <i>CLV1, CLV2, CLV3</i>	107
3.6.2. Взаимодействие гена <i>NA</i> с геном <i>FAS5/TOPI</i>	109
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	116
4.1. Функция гена <i>FAS5</i> в контроле развития растений.....	116
4.1.1 Ген <i>FAS5</i> контролирует размер и структуру АМП, взаимодействуя с геном <i>WUS</i>	116
4.1.2. Ген <i>FAS5</i> участвует в поддержании недетерминированности клеток АМП.....	119
4.1.3. Ген <i>FAS5</i> участвует в контроле восприятия фотопериодического Сигнала.....	121
4.1.4. Ген <i>FAS5</i> участвует в контроле перехода на репродуктивную стадию, взаимодействуя с геном <i>LFY</i>	122
4.1.5. Ген <i>FAS5</i> участвует в контроле развития цветка.....	125
4.1.6. Плейотропный эффект мутации <i>fas5</i> – результат мутации в гене топоизомеразы I.....	127
4.2. Функция гена <i>NA</i> в контроле развития растений.....	134
4.2.1. Роль гена <i>NA</i> в контроле пролиферативной активности АМП.....	137
4.3. Анализ взаимодействия генов <i>NA</i> и <i>TOPI</i>	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	144
ВЫВОДЫ.....	146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	147
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	168

ВВЕДЕНИЕ

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. В их число входят гены, регулирующие инициацию и поддержание постоянства пула стволовых клеток. Главную роль в данных процессах играет ген *WUS*, формирующий регуляторную петлю отрицательной обратной связи с геном *CLV3* (Haecker et al., 2004; Fletcher et al., 1999), что обеспечивает стабильную систему регуляции объёма пула стволовых клеток. Помимо гена *CLV3* экспрессия *WUS* находится под контролем дополнительных генов-регуляторов различной природы: транскрипционных регуляторов, хроматиновых регуляторов, а также регуляторных генов, 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 регуляции полярного транспорта 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).

Необходимо подчеркнуть, что АМП не является статичной структурой и с момента своей закладки претерпевает ряд трансформаций в ходе онтогенеза (Jacqumard et al., 2003), в течение которых меняется её размер и компетентность образовывать различные боковые органы стебля, однако генетический контроль таких онтогенетических изменений структуры АМП практически не исследован.

Изучение механизмов генетического контроля поддержания гомеостаза и функционирования АМП и 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 количество мутаций, затрагивающих функционирование АМП, анализ которых позволил выявить гены, обеспечивающие закладку, и поддержание пула стволовых клеток. Тем не менее, далеко не все гены сегодня идентифицированы. Например, до сих пор крайне ограничена информация о генах, контролирующих онтогенетические перестройки в строении АМП и связанные с ними изменения размера пула СК.

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, взаимодействует 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, 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 пока были предварительными.

Целью данной работы являлось проведение анализа 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 СК 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 *TOP1 Arabidopsis thaliana*. Показано, что ген *TOP1* принимает участие в регуляции фотопериодической реакции растений, а также задерживает переход растения на репродуктивную стадию. Помимо этого, впервые показано участие гена *TOP1* 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.

Практическая значимость. Выявление новых признаков у мутанта *fas5*, не описанных у других мутаций в гене *TOP1*, расширяет представление о функции данного гена на уровне организма. Мутация *fas5* может быть использована для изучения генетических механизмов, ответственных за переход к цветению и инициацию флоральной меристемы, а также для исследования генетических механизмов, регулирующих развитие растения в ответ на продолжительность фотопериода. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Стволовые клетки растений – типы и особенности

Стволовые клетки апикальной меристемы побега и корня. Также как и в организме животных, в организме растений существуют стволовые клетки (СК), находящиеся в специфическом микроокружении (нише), способные к длительному самообновлению и являются источником клеток, образующих все ткани и органы организма. В первую очередь это СК, локализующиеся в апикальных меристемах побега (АМП) и корня (АМК), которые аналогичны региональным СК животных.

Апикальная меристема побега (АМП) растений делится на несколько зон. В центральной зоне (ЦЗ) содержится пул медленно делящихся СК, в периферической зоне (ПЗ) - дифференцирующиеся быстро делящиеся клетки, дающие начало различным типам тканей. В ПЗ происходит закладка и формирование всех боковых органов стебля (рис. 1 А). Важнейшей и неотъемлемой частью АМП является организующий центр (ОЦ), расположенный в глубине ЦЗ под пулом СК и служащий источником сигнала, поддерживающего их в недетерминированном состоянии (Stahl et al., 2010, Додуева и др., 2012). Таким образом, ОЦ играет роль ниши стволовых клеток АМП. Под ОЦ располагается подстилающая зона, дающая начало внутренним тканям и структурам стебля. В АМП модельного объекта *Arabidopsis thaliana* СК организованы в 3 слоя, расположенные над организующим центром. Нормальное функционирование АМ

зависит от сохранения баланса между поддержанием пула стволовых клеток в ЦЗ и их дифференцировкой в ПЗ, который поддерживается сложными генетическими механизмами. Данный баланс между стволовыми клетками в ЦЗ и дифференцирующимися клетками в ПЗ обозначают как гомеостаз АМП.

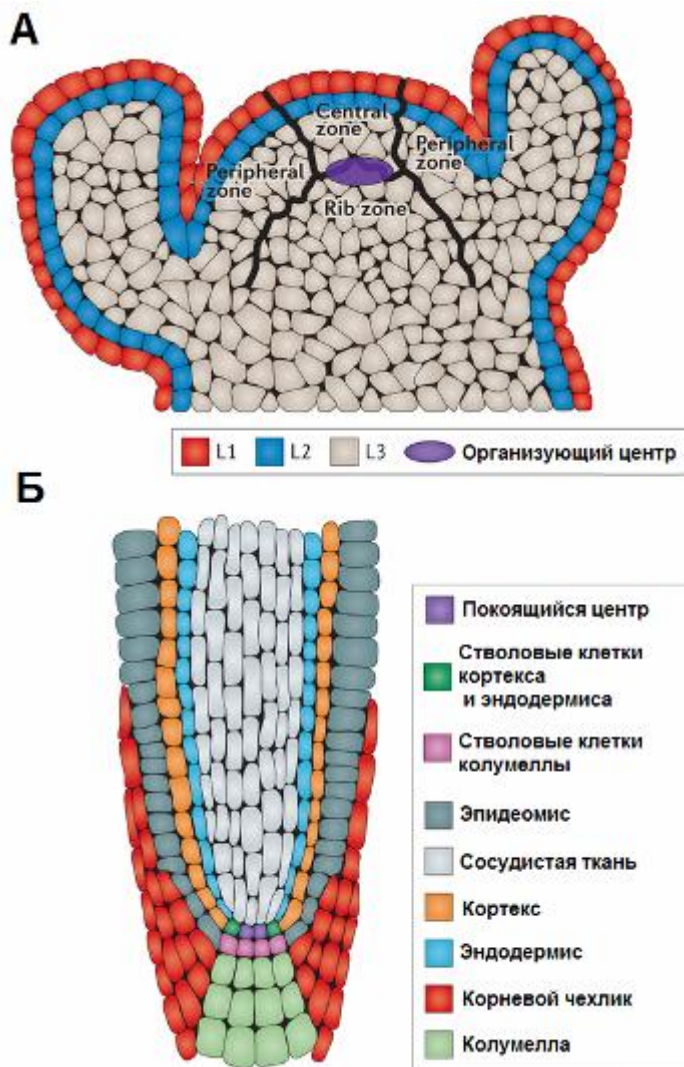


Рисунок 1. Структура апикальных меристем побега и корня (по Sparks et al., 2013). А – апикальная меристема побега (АМП), Central zone - центральная зона, Peripheral zone – периферическая зона; Rib zone - подстиляющая зона, L1, 2, 3 – клеточные слои АМП; Б – апикальная меристема корня (АМК),

Апикальная меристема корня состоит из расположенного в центре покоящегося центра и расположенных по его периферии СК (рис. 1 Б). Таким образом, СК растений, локализованные в апикальной меристеме побега и корня, как и региональные СК животных, контактируют с нишей. Сходство структуры и функции СК растений и животных позволяют говорить об их структурной и функциональной эквивалентности (обзор Matos, Bergmann, 2014). Тем не менее, возникновение взаимодействующих систем «СК – ниша» происходило независимо у многоклеточных предковых форм растений и животных, поскольку общий предок этих царств был одноклеточным.

Особенности СК растений. Первой из особенностей растительных СК является возможность их образования *de novo*. Об этом свидетельствует способность растений образовывать адвентивные меристемы на различных органах, которые обеспечивают возможность вегетативного размножения или регенерации повреждений. Ярким примером способности растений *de novo* образовывать СК являются опыты по выжиганию лазером центральной зоны АМП томата (Reinhardt et al., 2003). Уже по прошествии суток по краям выжженного и удалённого участка возникали клетки, которые начинали экспрессировать гены-маркеры ниши СК. Через двое суток их экспрессия усиливалась и её область локализовалась в компактном домене, после чего возникала новая ниша и пул СК (Reinhardt et al., 2003). Такая способность к трансдифференцировке является отличительной особенностью клеток растений, имеющих жёсткую клеточную стенку и не способных к миграциям внутри организма в отличие от клеток животных.

Вторая особенность – это наличие у растений генетических механизмов, обеспечивающих прекращение существования пула СК. Примером может служить флоральная меристема (ФМ): после закладки примордиев всех генеративных органов она полностью прекращает своё существование благодаря работе ряда генов (см. регуляция *WUS* в флоральной меристеме). Хотя существуют виды, у которых в определённых условиях флоральная меристема способна пролиферировать продолжительное время, превращаясь в нечто среднее между меристемой цветка и побега (Tooke et al., 2005).

Третьей особенностью можно назвать существование во взрослом организме растения плюрипотентных и тотипотентных клеток, которые не в полной мере соответствуют традиционным представлениям об СК, но вполне могут ими являться. К таким клеткам можно отнести клетки камбия, клетки, из которых развиваются адвентивные и выводковые почки и соматические эмбриониды.

Расширенные представления о СК растений. Помимо СК апикальных меристем корня и побега, а также цветка (как видоизменённого побега), к СК у растений могут быть отнесены и некоторые другие типы клеток. Так, по мнению Батыгиной и Рудского, к стволовым клеткам растений необходимо отнести все клетки, которые способны образовывать зиготические и соматические зародыши (Батыгина, Рудский, 2006), в том числе и зиготу, которая в таком случае именуется

стволовой клеткой первого порядка или прародительницей СК. Зигота находится в особом микроокружении, способна делиться и давать начало нескольким зародышам, но чаще *in vivo* не поддерживается, как и её производные – эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Основным же аргумент в пользу отнесения ЭСК к СК является их способность к самоподдержанию в особых условиях *in vitro*. Так, незрелые эмбрионы (например, у *A.thaliana*, кукурузы, подсолнечника и др.) способны образовывать соматические эмбриониды в культуре *in vitro*. В свете этого отнесение зиготы и её производных – ЭСК к стволовым клеткам выглядит вполне логичным, но требует дополнительных исследований.

Руководствуясь этой точкой зрения, к СК можно отнести и те клетки, которые служат инициальными при флоральной эмбриодогении. Например, у *Nothoscordum fragrans* и *Poa pratensis* разные клетки нуцеллуса демонстрируют различное поведение. Одни клетки нуцеллуса дифференцируются (утрачивают тотипотентность), другие функционируют как зиготы, а третьи – дедифференцируются, пролиферируют (самоподдерживаются) и образуют СЭ. Второй и третий тип тотипотентных нуцеллярных клеток можно рассматривать как СК (Батыгина, Виноградова, 2007).

К СК также можно относить инициали, возникающие в результате изменения программ развития. *In vivo* и в каллусных культурах эти клетки всегда находятся в клеточном окружении, которое, по-видимому, может в этих условиях брать на себя роль ниши СК. Так в работах с суспензионными культурами также отмечено, что для эффективного образования СЭ необходимы клеточные контакты (Karami et al., 2009).

В качестве СК могут также рассматриваться клетки прокамбия и камбия (по крайней мере, некоторые из них). Камбий содержит меристематические клетки, которые поддерживаются в недетерминированном состоянии и сохраняют способность к делениям в течение всей жизни растений. Показано, что поддержание недетерминированности и пролиферативной активности клеток камбия у *A.thaliana* основано на действии молекулярно-генетических механизмов, крайне схожих с теми, которые поддерживают активность АМ побега и корня. В основе поддержания пролиферативной активности камбия лежит регуляторный механизм TDIF-TDR-WOX4 (Jun et. al., 2008; Hirakawa et al., 2008; Ji et al., 2010;

Hirakawa et al., 2010), в который вовлечены гены, гомологичные тем, что участвуют в механизме поддержания активности АМП (см. Система регуляции *WUS-CLV3*) и АМК (Додуева и др., 2012). Хотя все детали механизма регуляции TDIF-TDR-*WOX4* на данный момент не выяснены, всё же его сходство с системами поддержания СК побега корня даёт основание считать клетки камбия региональными СК (Hirakawa et al., 2010; Suer et al., 2011).

Также показано, что тотипотентные клетки способны возникать *de novo* в различных тканях растения. Так, например, у люцерны *M. truncatula* тотипотентные клетки, возникающие при дедифференцировке покровных клеток листа и мезофила и формирующие соматические эмбриониды *in vitro* (Wang et al., 2011), маркированы экспрессией гена *SERK1* - маркера ранних эмбриональных стадий (Schmidt et al., 1997), экспрессирующегося обычно на ранних стадиях развития зиготических и соматических зародышей. Высокая активность гена *SERK1* обнаружена и в клетках прокамбия, что свидетельствует об их плюрипотентном состоянии. Более того, клетки, экспрессирующие *SERK1*, найдены во всех органах люцерны: в апикальных и латеральных меристемах побега и корня, в перицикле, на границах между разными органами и тканями, в клубеньках. При этом на более ранних этапах развития растений таких клеток больше, чем на последующих (Nolan et al., 2009).

Это свидетельствуют в пользу того, что кроме АМ побега, корня и камбия, у растений *in vivo* постоянно присутствуют клетки, которые сохраняют плюрипотентность и способность изменять программу своего развития. В культуре ткани именно такие плюрипотентные клетки принимают активное участие в каллусогенезе (Kwaaitaal, de Vries, 2007; Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2010). Точно так же они могут возникать в результате перепрограммирования дифференцированных клеток (например, по краям высечек из тканей листа люцерны *in vitro* (Nolan et al., 2009). Таким образом, только в надземной части растения можно выделить несколько типов СК (рис. 2).

Тем не менее, подавляющее большинство новых тканей и органов растительного организма *in vivo* образуются в результате деятельности апикальных меристем побега и корня, и находящихся в их составе пулов СК, в то время как остальные клетки, которые могут быть отнесены к СК, выполняют, очевидно,

вспомогательные функции (репарация повреждений и т.д.). Это делает необходимым подробное изучение сложных генетических механизмов, обеспечивающих закладку, поддержание и онтогенетические трансформации АМП и пула заключенных в ней СК.

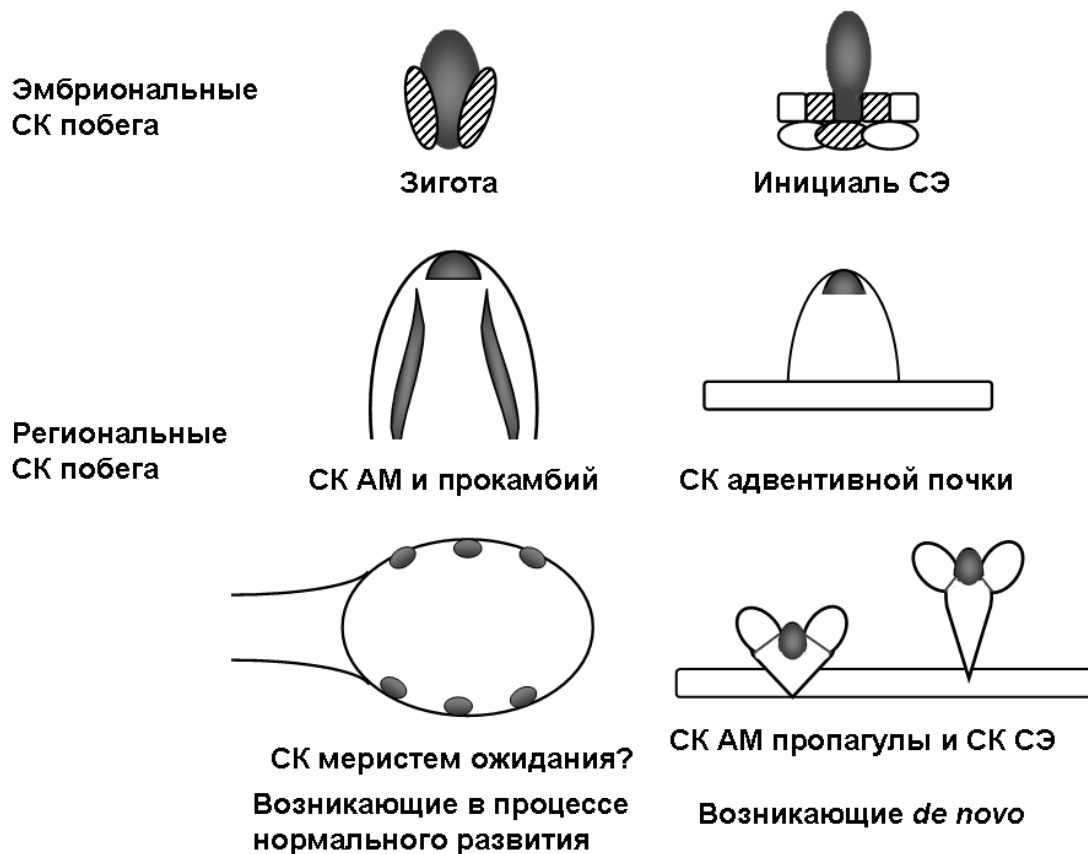


Рисунок 2. (По Альберт, Ежова, 2013) Эмбриональные и региональные СК побега растений. Среди СК надземной части растения можно выделить эмбриональные СК, дающие начало целому побегу (или же целому организму) и региональные, дающие начало определённым группам органов или тканей. По типу возникновения можно выделить СК, образующиеся в результате нормального развития организма растения, а также возникающие *de novo* в результате трансдифференцировки.

1.2. Генетическая регуляция возникновения и онтогенетических изменений апикальной меристемы побега.

1.2.1. Закладка и развитие АМП в эмбриогенезе

Разметка апикального домена зародыша путём установления полярного транспорта ауксина. Развитие АМП *A.thaliana* начинается на стадии формирования первичного плана тела зародыша (Laux and Jurgens, 1997). На стадии глобулы апикальные клетки зародыша, детерминируются как предшественники клеток АМП. В дальнейшем они начинают экспрессировать соответствующие маркерные гены, такие как *WUS* и *STM*, обеспечивающие дальнейшее формирование АМП.

Начиная с самых ранних стадий, ключевую роль играют гены, обеспечивающие разметку зародыша, в том числе его будущей апикальной части зародыша. Одним из генов, отвечающих за разметку апикального домена зародыша (клеток АМП и клеток будущих семядолей) у *A.thaliana* является ген *GURKE*, кодирующий ацетил-КоА карбоксилазу (Torres-Ruiz et al., 1994; Kajiwara et al., 2004). Мутанты по данному гену характеризуются значительными нарушениями закладки АМП и семядолей и эмбриональной летальностью (Torres-Ruiz et al., 1994). Несмотря на важную функцию, точный механизм регуляции разметки зародыша геном *GURKE* на данный момент не ясен.

Дальнейшая разметка зародыша *A.thaliana* и закладка АМП является следствием установления полярного транспорта ауксина и локальных максимумов его концентрации. По-видимому, корректное установление ауксинового градиента определяет будущие области экспрессии ключевых генов, отвечающих за закладку АМП, и их индукцию. На данном этапе важную роль в разметке апикального домена зародыша играет ген *GNOM*, экспрессирующийся на ранних эмбриональных стадиях, и кодирующий фактор ARF-GEF, необходимый для транспорта везикул, а также для поляризации белка транспорта ауксина PIN1 (см. Wolters et al., 2011), обеспечивая его локализацию в базальной части клеток зародыша. Потеря функции *GNOM* приводит к нарушению полярного транспорта ауксина. В результате чего развиваются сферические зародыши, лишённые апикально-базальной организации и не способные образовывать корни, АМП и

семядоли (Wolters et al., 2011). Экспрессия основных генов, поддерживающих активность АМП (*WUS* и *STM*) в зародышах *gnom*, не наблюдалась.

Ген *POPCORN* (*PCN*), также начинающий экспрессироваться на ранних стадиях эмбриогенеза практически во всех клетках эмбриона, кодирует ядерный белок, содержащий WD-40 мотив (Xiang et al., 2011). *PCN* также участвует в поляризации белка PIN1. Мутанты *pcn* демонстрировали нарушение полярного ауксинового транспорта в результате нарушения распределения белка PIN1 в мембранах клеток зародыша и, как следствие, нарушению полярного транспорта ауксина. Нарушения зародыша у *pcn* начинали проявляться уже на стадии 4-х клеток и прогрессировали на более поздних стадиях. Так на стадиях поздней глобулы и позднего сердечка у мутантов *pcn* наблюдалось существенное расширение и смещение областей экспрессии центральных генов поддержания АМП (*WUS*, *STM*, *CLV3*, и *CLV1*), что, видимо, обуславливало образование увеличенной АМП. Зародыши *pcn* обычно были летальны на поздних стадиях. Тем не менее, мутант *pcn* демонстрировал температуро-чувствительность, что позволяло выживать его эмбрионам при повышенной температуре (Xiang et al., 2011). Взрослые растения *pcn*, снова культивировавшиеся при нормальных температурах, характеризовались развитием pin-подобных структур вместо стебля, а также дезорганизацией клеточных делений в АМП. Что говорит о роли гена *PCN* не только в контроле закладки и развития АМП в эмбриогенезе, но и об его участии в поддержании гомеостаза АМП во взрослом растении.

В контроле разметки зародыша и закладки будущей АМП у *A.thaliana* важную роль играет регуляция генов полярного транспорта ауксина и ауксинового ответа посредством микро-РНК. Гипоморфные аллели мутантов в гене РНКазы III *DICER-LIKE1* (*DCLI*), участвующей в созревании микро-РНК, демонстрируют серьезные изменения уровня и области экспрессии генов ауксинового ответа и транспорта (Seefried et al., 2014). Мутанты *dcl1-15* демонстрировали широкий спектр нарушений, начиная уже с самых ранних стадий эмбриогенеза, и характеризовались дезорганизацией клеточных делений, нарушением закладки органов зародыша, также не происходило образования четко выраженной АПМ. При этом на ранних стадиях эмбриогенеза наблюдалось значительное увеличение экспрессии генов, кодирующих рецепторы ауксина и различные факторы

ауксинового ответа, что соотносилось с увеличением областей концентрации ауксина относительно дикого типа. Также наблюдалось смещение локального ауксинового максимума в центральную часть зародыша. Тем не менее, на поздних стадиях наблюдалось снижение уровня экспрессии большинства связанных с ауксином генов, локализация ауксиновых максимумов также была аномальной в сравнении с диким типом. При этом на поздних стадиях (стадия торпеды) не наблюдалось экспрессии большинства маркеров АМП, сам апикальный домен имел аномальное строение (Seefried et al., 2014). Это свидетельствует о важной роли посттрансляционной регуляции генов посредством микро-РНК в процессе развития зародыша и закладки АМП.

Закладка АМП. Первым признаком закладки непосредственно самой АМП у зародыша *A.thaliana* является возникновение области экспрессии гена *WUS* на стадии 16-ти клеточного зародыша (рис. 3). В дальнейшем на стадии поздней глобулы индуцируется экспрессия генов *CUC*, отвечающих за разметку апикального домена, а именно за разделение семядолей (рис. 3) (см. Laux et al., 2004).

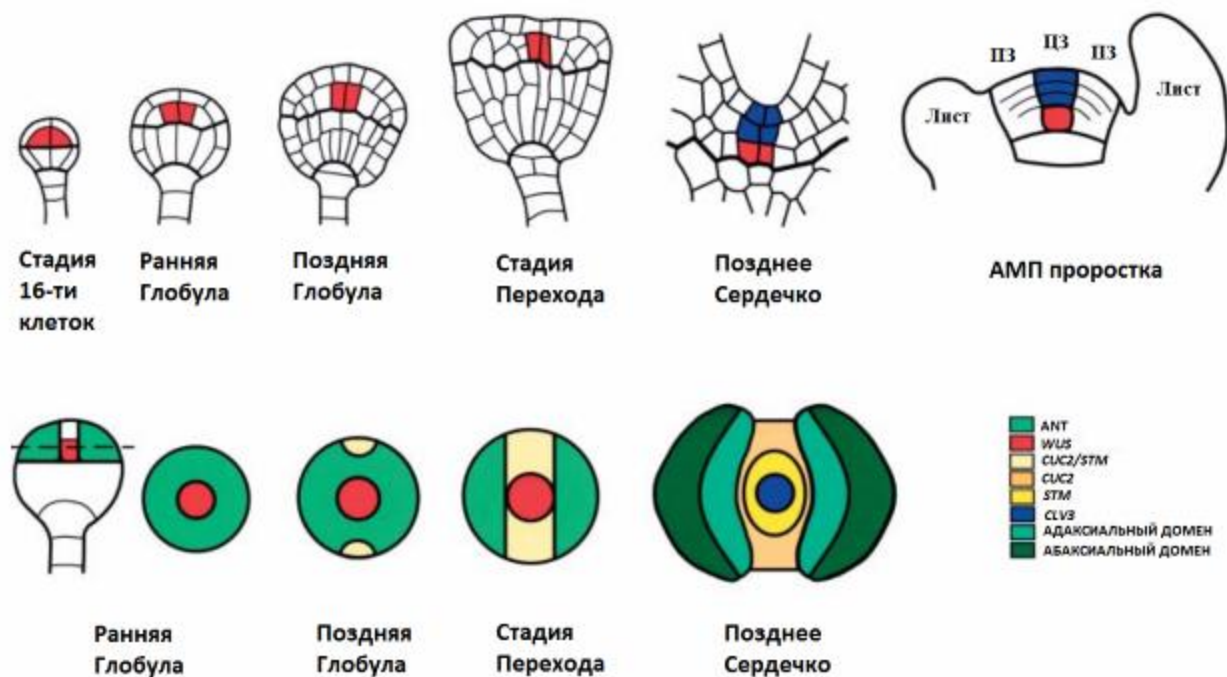


Рисунок 3. (по Laux et al., 2004, с изменениями) Схема разметки апикального домена зародыша *A.thaliana* и развития АМП в эмбриогенезе.

Их экспрессия вначале индуцируется по краям апикального домена, последовательно распространяясь к центру (Takada et al., 2001). Как указывалось выше, гены *CUC* индуцируют одновременно с началом своей экспрессии

экспрессию гена *STM*, играющего одну из важнейших ролей в поддержании АМП посредством индукции синтеза цитокинина (рис. 3).

В регуляции развития зародыша *A.thaliana* и корректного формирования АМП на стадии глобулы играет ген *BOBBER1 (BOB1)* (Jurkuta et al., 2009). *BOB1* кодирует NudC-домен содержащий белок, по структуре схожий с шапиронами. Зародыши мутанта *bob1* прекращают развитие на стадии глобулы, область экспрессии *CUC1* и *STM* уже на стадии 16 клеток сильно расширяется и захватывает всю апикальную часть зародыша, закладки семядолей не происходит, также отсутствуют локальные максимумы ауксина, образующиеся в местах их закладки (Jurkuta et al., 2009). В то же время уровень экспрессии *WUS* в 16 клеточных эмбрионах *bob1* снижен относительно дикого типа, хотя количество клеток, экспрессирующих его не изменено. При этом область экспрессии *WUS* может смещаться у *bob1* относительно дикого типа, и данное смещение варьирует у отдельных эмбрионов. Это может свидетельствовать об участии *BOB1* в синтезе или транспорте белков, контролирующих разметку эмбриона, в том числе определяющих область экспрессии *WUS* и других важных для закладки АМП генов.

Также необходимо отметить участие гена *EMB1611 A.thaliana* в регуляции развития зародыша. Жёсткие аллели, такие как *emb1611-3* летальны на ранних стадиях развития (Leasure et al., 2009). Также показано, что экспрессия *EMB1611* индуцируется на стадии ранней глобулы, и присутствует по всему зародышу. Такая обширная область экспрессии сохраняется до финальных стадий эмбриогенеза, сужаясь до АМП и примордиев молодых органов только после прорастания (Leasure et al., 2009). Видимо в процессе эмбриогенеза *EMB1611* обеспечивает упорядоченность клеточных делений, а к непосредственной регуляции *WUS* переходит уже во взрослом организме.

Экспрессия *CLV3* индуцируется на стадии позднего сердечка, петля отрицательной обратной связи *WUS-CLV*, являющаяся центральным генетическим механизмом поддержания гомеостаза АМП (см. раздел система регуляции *WUS-CLV*), скорее всего также формируется именно на данной стадии (см. Laux et al., 2004). Роль одного из ограничителей размеров области экспрессии *WUS* до

индукции *CLV* является *HAN*, экспрессирующийся по границам области экспрессии *WUS* (см. транскрипционные регуляторы *WUS*).

Также в процессе эмбрионального развития *A.thaliana* АМП принимает участие и ген *AP2*, для которого кроме регуляции флоральной меристемы было показано участие также в регуляции вегетативной АМП (см. транскрипционные регуляторы активности АМП). *AP2* начинает экспрессироваться на стадии ранней глобулы в различных тканях зародыша, в том числе, и в закладывающейся АМП (Wurschum et al., 2006). При этом у полудоминантной мутантной линии *l28* наблюдалось снижение или полное исчезновение экспрессии *WUS* и *CLV3* у значительной доли эмбрионов на стадиях торпеды, изгиба семядолей и более поздних (Wurschum et al., 2006).

Таким образом, первоначальная закладка АМП в эмбриогенезе начинается с успешной закладки ниши стволовых клеток, то есть зоны экспрессии *WUS*, которая в дальнейшем поддерживается и модулируется большим числом дополнительных регуляторов. Тем не менее, необходимость индукции экспрессии *WUS* прежде всех остальных ключевых генов, вовлечённых в контроль закладки и гомеостаза АМП, до сих пор остаётся неясным. Особенно в свете данных, полученных при изучении культур тканей, где индукция экспрессии *WUS* обуславливалась первоначальным возникновением области цитокининового максимума (обзор Альберт, Ежова, 2012).

Развитие и поддержание АМП на поздних стадиях эмбриогенеза. На более поздних стадиях развития зародыша *A.thaliana* важную роль в формировании (и дальнейшем функционировании) АМП играет ген *ARGONAUTE10* (*AGO10*) (также *ZWILEE* (*ZLL*) или *PINHEAD* (*PNH*)), отвечающий за деградацию микро-РНК miR165/166. Эмбрионы мутантов по данному гену не проявляют каких-либо нарушений в структуре АМП на стадиях развития от ранней глобулы до торпеды. Но у зрелых эмбрионов наблюдается дифференцировка клеток АМП: клетки увеличиваются в размерах, становятся более вакуолизированными, как и соседние дифференцирующиеся клетки (Moussian et al., 1998). Основной функцией гена *AGO10* является репрессирование экспрессии miR165/166. У мутантов по *AGO10* *zll* наблюдается значительная, хотя и варьирующая у отдельных эмбрионов, концентрация miR165/166 в АМП на стадии изгиба семядолей. В то же время на

данной стадии у дикого типа концентрация miR165/166 в АМП является незначительной или вообще не наблюдается (Liu et al., 2009). В свою очередь, miR165/166 является супрессором активности генов *CORONA (CNA)*, *PHABULOSA (PHB)* и *PHAVOLUTA (PHV)* (Williams et al., 2005), регулирующих экспрессию *WUS*, кодирующие гомеодоменные транскрипционные факторы класса III, содержащие лейциновую застёжку-молнию (HD-ZIP III). Одиночный мутант *sna* имеет незначительные дефекты АМ, в то время как двойной мутант *sna clv* демонстрирует усиление фенотипа *clv* (Green et al., 2005). *CNA* экспрессируется в развивающихся тканях *A. thaliana*, включая апикальную и флоральную меристемы, и является супрессором активности *WUS*, действуя параллельно с *CLV*. Два других транскрипционных регулятора HD-ZIP III семейства *PHABULOSA (PHB)* и *PHAVOLUTA (PHV)* видимо являются функциональными дублёрами *CNA*. Тройной мутант *sna phb phv* демонстрирует фенотип идентичный мутантам *clv* (Prigge et al., 2005). Негативная регуляция *WUS* генами *CNA*, *PHB* и *PHV* подтверждена и анализом доминантной мутации *jabba-1D (jba-1D)*, связанной с инсерцией Т-ДНК в регуляторную область гена, кодирующего микро-РНК miR166g. miR166g вызывает деградацию мРНК генов, кодирующих HD-ZIP III белки, в том числе *CNA*, *PHB* и *PHV*. Мутант *jba-1D*, суперэкспрессирующий miR166g, характеризуется значительным повышением уровня экспрессии *WUS*, что вызывает увеличение АМ побега уже у эмбрионов и фасциацию стебля у растений (Williams et al., 2005).

Показано, что у мутантов по гену *AGO10* уровень экспрессии HD-ZIP III транскрипционных факторов снижен (McConnell et al., 2001; Otsuga et al., 2001). Также было выявлено взаимодействие *AGO10* и *AGO1* в регуляции закладки АМП (Zhu et al., 2011). *AGO10*, экспрессирующийся в АМП, обладает большей связывающей активностью miR165/166, чем *AGO1*. В результате чего *AGO10* связывает большую часть miR165/166, предотвращая её связывание с *AGO1* и формирование функционального комплекса РНК-интерференции и, как следствие, предотвращая репрессирование *HD-ZIP III* генов (Zhu et al., 2011).

В свою очередь, гены *CNA*, *PHB*, *PHV* и *REV* на эмбриональных стадиях выполняют функции развития билатеральной симметрии зародыша и закладки АМП. Тройные мутанты *rev phb phv* формировали аномальные семядоли на стадии

сердечка и торпеды у значительной части зародышей, а также демонстрировали прекращение функционирования АМП на поздних стадиях эмбриогенеза (Prigge et al., 2005). Тем не менее, не до конца ясно, каким образом *CNA*, *PHB*, *PHV* и *REV* регулируют закладку АМП. Показано, что у мутантов *zll* на поздних стадиях эмбриогенеза снижается уровень экспрессии *STM* в центральной части АМП, сохраняясь только в небольшом количестве периферических клеток (Moussian et al., 1998). Поэтому можно предполагать, что, по крайней мере, одной из функций генов *HD-ZIP III* является поддержание экспрессии *STM* на поздних эмбриональных стадиях.

Помимо генов *HD-ZIP III* семейства, в регуляции формирования функциональной АМП в эмбриогенезе принимают участие также гены *HD-ZIP II* семейства. У *A.thaliana* данное семейство представлено генами *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 2 (ATHB2)*, *ATHB4*, *HOMEBOX ARABIDOPSIS THALIANA 1 (HAT1)*, *HAT2*, *HAT3*. Одиночные мутанты по данным генам либо имеют слабое фенотипическое проявление, либо вообще не отличаются от дикого типа, что говорит о перекрытии их функций. В то же время у тройных мутантов *hat3 athb4 athb2* на поздних стадиях эмбриогенеза наблюдается нарушение ауксинового ответа в апикальной части зародыша, на месте АМП формируется плоская или *pin*-подобная структура, не образующая примордии листьев, а также нарушается билатеральная симметрия зародыша. Также в АМП *hat3 athb4 athb2* отсутствует экспрессия *WUS* и *CLV3* (Turchi et al., 2013). При этом гены *HD-ZIP II* семейства достаточно тесно взаимодействуют с генами *HD-ZIP III* в регуляции развития зародыша – тройные мутанты *hat3 athb4 phv* и *hat3 athb4 phb* характеризовались усилением нарушений развития АМП по сравнению с двойными мутантами *hat3 athb4*. У мутанта *rev* и двойного мутанта *phv phb* снижается экспрессия *ATHB2*, также методом иммунопреципитации было показано, что ген *ATHB2* является мишенью регуляции со стороны *REV* (Turchi et al., 2013).

1.2.2. Поддержание гомеостаза АМП в постэмбриональный период онтогенеза

В процессе эмбрионального развития происходит закладка и формирование функциональной АМП растения. На постэмбриональной стадии развития АМП даст начало всем органам и тканям растительного организма, что требует поддержания её в функциональном состоянии на протяжении длительного времени. Это обеспечивается функционирование сложных генетических механизмов, часть из которых начинает функционировать ещё в эмбриогенезе, а часть запускается на более поздних стадиях.

1.2.2.1. Система *WUS-CLV* и ее дополнительные регуляторы

WUS – центральный регулятор поддержания стволового состояния клеток АМП. На поздних стадиях эмбриогенеза и на протяжении всего постэмбрионального периода центральную роль в поддержании активности АМП играет ген *WUSCHEL (WUS)*, кодирующий транскрипционный фактор *WOX*-семейства гомеодоменных транскрипционных факторов (Haescker et al., 2004). Растения *A.thaliana*, содержащие мутации в данном гене, характеризуются преждевременной дифференцировкой клеток АМП и терминацией роста (Laux et al., 1996). В то время как линии *A.thaliana*, суперэкспрессирующие *WUS*, демонстрируют существенное увеличение пула СК и размеров АМП, что приводит к эктопическому образованию побегов и соматических эмбриоидов (Zuo et al., 2002; Gallois et al., 2004). Показано, что продукт гена *WUS* оказывает в основном репрессирующее воздействие на гены мишени, что обусловлено составом доменов в его функционально важном С-концевом домене (Kieffer et al., 2006, Ikeda et al., 2009). Таким образом, *WUS*, скорее всего, поддерживает СК в недетерминированном состоянии, репрессируя гены, отвечающие за дифференцировку клеток. Исключением является индукция генов *CLV3* и *AG* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001, Yadav et al., 2011), что свидетельствует о бифункциональности *WUS*, как транскрипционного фактора (Ikeda et al., 2009). Область экспрессии *WUS* локализуется в организующем центре (ОЦ). Его продукт мигрирует в клеточные слои меристемы, расположенные над организующим центром, где продукт *WUS* активирует экспрессию гена *CLAVATA3 (CLV3)*,

негативно регулирующего экспрессию *WUS* по принципу отрицательной обратной связи (Fletcher et al., 1999), связываясь с его промоторными областями (Yadav et al., 2008). Миграция белка *WUS* осуществляется через межклеточные каналы – плазмодесмы. Индуцированное уменьшение диаметра плазмодесм или искусственное увеличение размеров белка *WUS* в результате трансляционного слияния у трансгенных линий *A.thaliana* приводит к развитию фенотипа, сходного с мутациями *wus* (Daum et al., 2014). Мобильность продукта *WUS* определяется его структурой. Экспрессия *WOX*-генов в АМП растений *A.thaliana* под контролем промотора *WUS* выявила прямую зависимость между степенью гомологии *WOX*-генов с *WUS* и активностью миграции их продуктов в вышележащие слои АМП (Daum et al., 2014). Стоит отметить, что мобильность белка *WUS* ингибируется уникальными последовательностями, расположенными в междоменных участках – замена этих последовательностей на имеющие совершенно иную структуру серьёзно повышает мобильность *WUS*, а также уровень его экспрессии, так как изменённый продукт обретает способность положительно регулировать ген *WUS* (Daum et al., 2014). Это может являться остатком существовавшего ранее механизма регуляции *WUS*, утраченного в ходе дальнейшей эволюции. Также мобильность *WUS* не зависит от клеточного окружения. Экспрессия нефункциональной копии *WUS* под контролем промотора, специфичного для эпидермиса, показала, что миграционная способность *WUS* не ограничивается стволовыми клетками АМП: *WUS* способен мигрировать в радиусе как минимум 5-ти клеток и в пределах других субдоменов АМП (Daum et al., 2014).

Таким образом, *WUS* является важнейшим регуляторным геном, определяющим место образования будущих стволовых клеток, и способен индуцировать их образование вне зависимости от локализации домена своей экспрессии. Этому способствует высокая мобильность его продукта, обеспечиваемая его структурой и не зависящая от окружения, и способность репрессировать экспрессию генов, ответственных за дифференцировку клеток. Также можно предполагать, что механизмы регуляции *WUS* (о которых подробнее речь пойдёт далее) претерпели ряд серьёзных изменений в ходе эволюции.

Система регуляции *WUS-CLV3*. Как уже упоминалось выше, ген *CLV3*, кодирующий небольшой секреторный белок, репрессировывает *WUS* в ОЦ по принципу

отрицательной обратной связи (Fletcher et al., 1999). Продукт *CLV3* действует опосредованно, связываясь с LRR-рецепторной киназой *CLV1* и рецептор-подобным белком *CLV2*, образуя комплекс лиганд-рецептор, инициирующий дальнейшую репрессию активности АМ (Ogawa et al., 2008). Белок *CLV2* способен передавать сигнал *CLV3* независимо от *CLV1*, образуя комплекс с рецепторной киназой *CORYNE* (*CRN*), также запускающий ряд регуляторных событий, приводящих к репрессии активности *WUS* (Muller et al., 2008). Мутации в гене *CRN* имеют схожее фенотипическое проявление с мутациями *clv1*, *clv2* и *clv3*, вызывая пролиферацию клеток АМ. Недавно обнаружен ещё один важный компонент передачи сигналов *CLV3* – рецептор *RPK2/TOAD2* (Kinoshita et al., 2010) Тройные мутанты *clv1 clv2 rpk2* являются фенотипическими мутантами *clv3*, что свидетельствует о наличии третьего пути передачи сигналов *CLV3* - *WUS* - опосредованного *RPK2*. При этом важное влияние на регуляцию пролиферативной активности АМ побега оказывает, в том числе, и стабильность белка *CLV3* (Song et al., 2013). Показано, что замена ряда аминокислотных остатков в составе белка *CLV3*, приводящая к снижению его стабильности, также значительно снижает способность восстанавливать фенотип мутантов *clv3* при экзогенной обработке (Song et al., 2013). Молекулярный механизм репрессии *WUS* белками семейства *CLV* и *RPK2* изучен пока не полностью.

Важным промежуточным звеном в системе *WUS-CLV* могут являться гены *POLTERGEIST* (*POL*) и *POLTERGEIST LIKE 1* (*PLL1*), кодирующие схожие протеин фосфотазы (Song et al., 2006). Двойные мутанты *pol pll1* летальны на ранних стадиях. Тем не менее, растения, которым был привит апекс двойного мутанта *pol pll1*, жизнеспособны и демонстрируют фенотип, идентичный мутантам *wus* (рис. 4), хотя проявляют не такой жёсткий фенотип, как мутант *wus-1*. Тройные мутанты *pol pll1 clv3* демонстрировали эпистаз мутации *clv3*, фенотипически не отличаясь от двойного мутанта *pol pll1*. Области экспрессии *WUS* и *CLV3* у двойного мутанта *pol pll1* существенно уменьшены по сравнению с диким типом. Тем не менее, области экспрессии *WUS* в *de novo* возникающих пазушных меристемах были хорошо различимы, что говорит о необходимости *POL* и *PLL1* для поддержания активности *WUS*, но не для инициации его экспрессии. Также суперэкспрессия гена *PLL1* в мутанте *clv3* серьёзно усиливала мутантный

фенотип, суперэкспрессия *PLL1* в организме мутанта *wus-1* не была способна восстановить его фенотип (Song et al., 2006). Таким образом, гены *POL* и *PLL1* с большой вероятностью являются промежуточным звеном в цепи регуляции *WUS-CLV*, играя роль важнейшего индуктора активности *WUS* и одновременно являясь мишенью негативной регуляции со стороны генов *CLV*, что может обуславливать ингибирующее воздействие на *WUS* со стороны генов *CLV*.

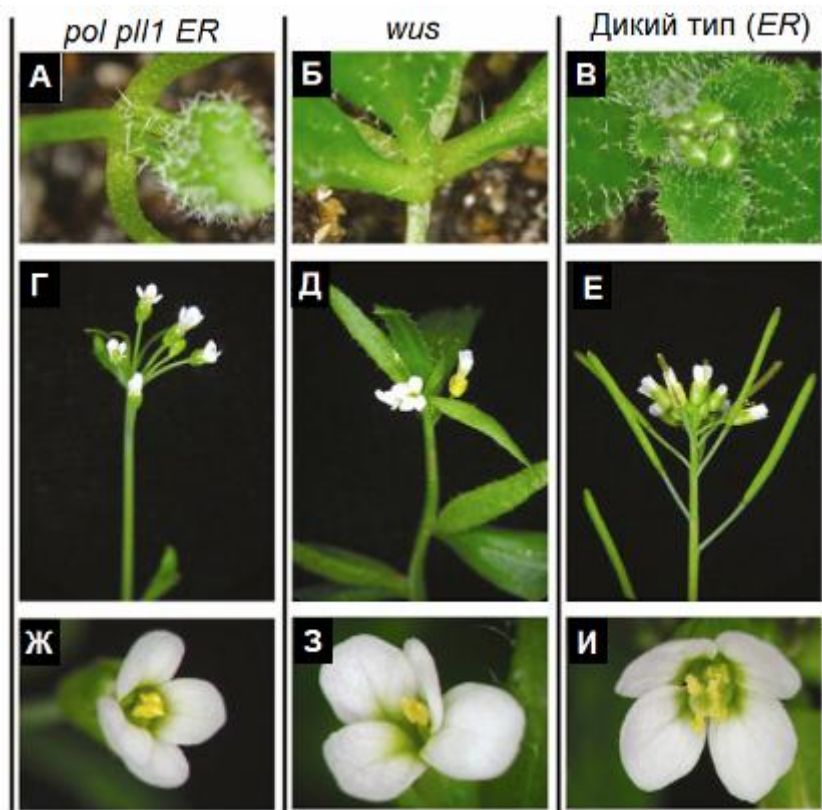


Рисунок 4. (по Song et al., 2006 с изменениями) Фенотип двойного мутанта *pol pll1* в сравнении с фенотипом мутанта *wus* и растения дикого типа. АМП большинства мутантных растений *pol pll1* (А) терминируется на вегетативной стадии, как и у *wus* (Б), АМП дикого типа (В). Иногда мутанты *pol pll1* выбрасывают укороченный цветонос с небольшим количеством цветков (Г), что также наблюдается и у *wus* (Д), соцветие дикого типа (Е). Фенотип цветков мутанта *pol pll1* (Ж) практически идентичен фенотипу цветков *wus* (З), цветок

дикого типа (И).

Система *WUS-CLV* является одним центральным механизмом поддержания постоянства пула стволовых клеток АМ побега. Тем не менее, система *WUS-CLV* не статична и способна компенсировать значительные колебания экспрессии *CLV3* (Muller et al., 2006). Трансгенные линии *A.thaliana*, содержащие *CLV3* под контролем этанол-индуцируемого промотора, при значительном увеличении уровня экспрессии *CLV3* демонстрировали супрессию активности *WUS* в ответ на обработку этанолом. Тем не менее, уже в течение первых 3 часов после индукции суперэкспрессии *CLV3* уровни экспрессии обоих генов выравнивались, что

свидетельствует о быстрой реакции системы на изменение концентрации её компонентов.

Гены *WUS* и *CLV3* являются основными маркерами ниши (ОЦ) и стволовых клеток АМ побега, соответственно (рис. 5). Тем не менее, выявлены и другие гены, область экспрессии которых ограничивается либо организующим центром, либо стволовыми клетками АМ (рис. 5) (Yadav et al., 2009). Это *AINTEGUMENTA-LIKE* (*AIL5*, *AIL6*, и *AIL7*), *TERMINAL EAR LIKE1* и ряд других (всего 8 генов), которые, как и *CLV3*, экспрессируются в СК, а также гены *At1g26680*, *At4g09760*, *At5g54510* и др. (6 генов), область экспрессии которых совпадает с таковой у *WUS* (ОЦ). Хотя для большинства генов функция не известна или исследована не полностью, данные гены успешно используются в ряде работ в качестве дополнительных маркеров различных зон АМ (Ung et al., 2011).

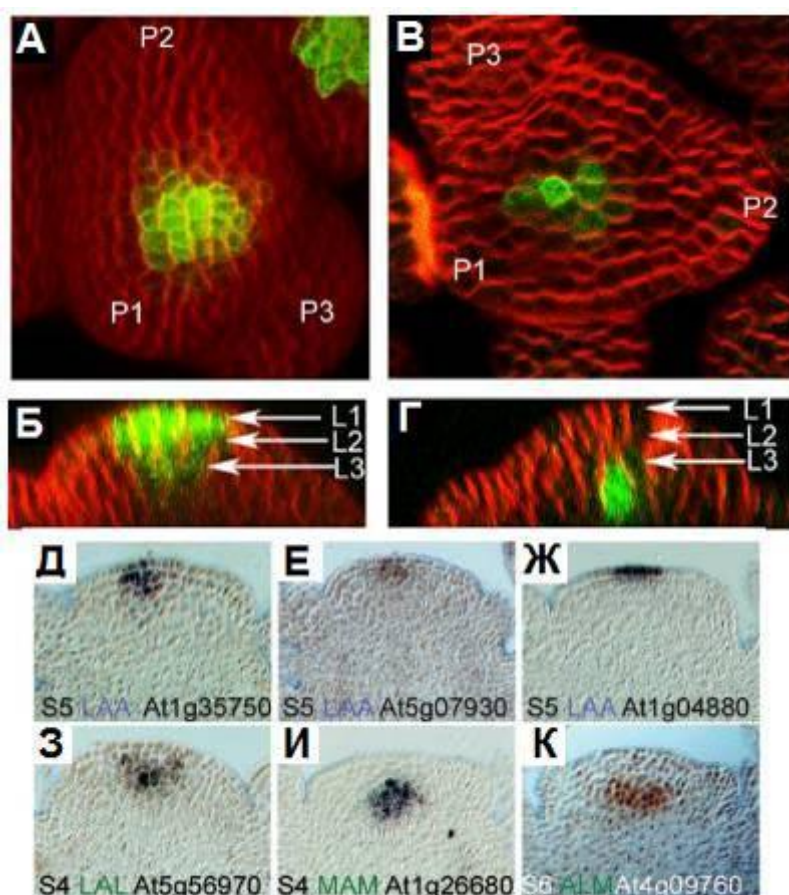


Рисунок 5. (по Yadav et al., 2009 с изменениями). Гены маркеры АМП. GFP-окраска областей экспрессии *CLV3*: А - вид сверху, Б – сбоку; и *WUS*: В - вид сверху, Г – сбоку. Клеточные слои АМП отмечены стрелками, P1, P2 и P3 - листовые примордии. *PHK in situ* гибридизация генов, маркирующих АМП помимо *WUS* и *CLV3*: Д-Ж - гены маркеры СК, З-К - гены маркеры ниши (ОЦ).

Дополнительные регуляторы *WUS*. Несмотря на то, что система *WUS-CLV* играет центральную роль в поддержании гомеостаза АМП, активность АМП *A.thaliana* находится под контролем большого количества дополнительных регуляторных генов, кодирующих белки различной природы. Мишенью

большинства дополнительных регуляторов является ген *WUS*, как центральный ген, обеспечивающий поддержание пула СК. Стоит отметить, что большинство данных дополнительных регуляторов *WUS* оказывает репрессирующее действие на его активность, ограничивая уровень или область его экспрессии.

Транскрипционные регуляторы *WUS*. Среди дополнительных регуляторов активности *WUS* у *A.thaliana* присутствует значительное число транскрипционных факторов. Одним из наиболее ранних негативных регуляторов *WUS* является *HANABA TARANU (HAN)*, кодирующий GATA-3-подобный транскрипционный фактор. *HAN* экспрессируется в периферической зоне АМ и участвует в процессах регуляции деления и дифференцировки клеток. У мутантов *han* наблюдается увеличение зоны экспрессии *WUS* уже на ранних стадиях развития, ещё до инициации экспрессии *CLV*. Таким образом, *HAN*, видимо, участвует в контроле количества клеток, экспрессирующих *WUS* и является супрессором его активности (Zhao et al., 2004). Ген *HAN* скорее всего регулирует экспрессию *WUS* опосредованно, через градиент ауксина (Nawy et al., 2010). На ранних стадиях эмбриогенеза *HAN* является индуктором экспрессии гена *PIN1*, ответственного за транспорт ауксина. Потеря функции *HAN* обуславливает нарушения экспрессии *PIN1*, что в свою очередь приводит к нарушению ауксинового градиента и, как следствие, нарушениям паттерна экспрессии *WUS*.

Гены семейства *YABBY*, кодирующие НМG-подобные транскрипционные факторы, экспрессируются в примордиях органов, образующихся на периферии АМ побега и выполняют широкий спектр функций, включая контроль развития латеральных органов растения. У *A. thaliana* мутации в *YAB*-подобных генах *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* и *YABBY3 (YAB3)* приводили к расширению области экспрессии *WUS* за пределы зоны, характерной для дикого типа (Goldshmidt et al., 2008). Вместе с этим расширились и области экспрессии *CLV3* - она охватывала в том числе и области будущих примордиев, что, видимо, является следствием экспансии *WUS*. Это говорит в пользу гипотезы, что *YAB*-подобные гены принимают участие в установлении границ АМ побега.

Гены HD-ZIP III транскрипционных факторов *CNA*, *PHB* и *PHV* также участвуют в регуляции АМП и на постэмбриональной стадии, ограничивая экспрессию *WUS*. В отличие от генов *CNA*, *PHB* и *PHV*, ген того же семейства

REVOLUTA (REV) является позитивным регулятором активности *WUS* (Paul et al., 1995). Мутанты *rev* характеризовались преждевременной терминацией АМП, а также нарушениями развития латеральных меристем, что приводило к уменьшению числа боковых побегов и ряду других морфологических нарушений. Ген *REV* также отличает отсутствие его регуляции со стороны miR166g. Показано, что у доминантных мутантов, характеризующихся увеличением уровня miR166g - *jba-1D* и *men1* (Williams et al., 2005; Kim et al., 2005) не происходило уменьшения уровня экспрессии гена *REV*. Это может объясняться отсутствием перекрытия либо слабым перекрытием области экспрессии гена *REV* с областью экспрессии miR166.

Также гены HD-ZIP III *REV*, *CNA*, *PHB* и *PHV* регулируются на посттрансляционном уровне небольшими лиганд-пептидами LITTLE ZIPPER Proteins (*ZPR*), кодируемыми четырьмя генами *ZPR1*, *ZPR2*, *ZPR3* и *ZPR4* (Wenkel et al., 2007; Kim et al., 2008). Связываясь с продуктами *REV*, *CNA*, *PHB* и *PHV* *ZPR*-пептиды формируют нефункциональные комплексы, не способные к транскрипционной регуляции. Одиночный мутант *zpr3* демонстрировал постепенное уменьшение размеров АМП в ходе онтогенеза. В то же время у двойного мутанта *zpr3 zpr4*, наблюдалось образование нефункциональной структуры вместо АМП, а развитие многочисленных аномальных листьев происходило из большого количества эктопических меристем, образующихся по периферии нефункциональной АМП-подобной структуры (Kim et al., 2008). Также было показано, что гены *REV*, *CNA*, *PHB* и *PHV* индуцируют экспрессию генов *ZPR*. Тройные мутанты *rev phv phb* демонстрировали падение экспрессии *ZPR3*, в то время как линии супкрэкспрессирующие гены *PHV* и *PHB* (микро-РНК нечувствительные мутации) характеризовались ростом экспрессионной активности *ZPR3* (Wenkel et al., 2007). Таким образом, гены *REV*, *CNA*, *PHB* и *PHV* и *ZPR1-4* формируют петлю отрицательной обратной связи, образуя ещё один важный регуляторный механизм, обеспечивающий формирование и поддержание нормально функционирующей АМП.

В поддержании СК АМП в недетерминированном состоянии у *A.thaliana* участвуют транскрипционные факторы GRAS-семейства, кодируемые генами *AtHAM1-4* (Engstrom et al., 2011), которые являются ортологами гена *HAIRY*

MERISTEM (HAM) Petunia hybrida (Stuurman et al., 2002). Фенотипическое проявление имеют только тройные мутанты *Atham1,2,3* или *Atham1,2,4*, которые характеризуются плейтропным эффектом. В то же время одиночные мутанты, как и разные комбинации двойных мутантов, не отличаются от дикого типа. Для тройного мутанта *Atham1,2,3/4* характерно образование гораздо более широкой и плоской АМП, по сравнению с растениями дикого типа (Engstrom et al., 2011). Для него также характерны нарушение филлотаксиса, серьезная задержка перехода на репродуктивную стадию и преждевременная терминация пазушных меристем и меристем цветков. В то же время терминация главной АМП наблюдается крайне редко или не наблюдается в принципе. Возможно, более серьезные нарушения в пазушных меристемах связаны с тем, что пазушные меристемы развиваются в постэмбриональный период, в то время как АМП закладывается в эмбриогенезе (McConnell and Barton, 1998; Laskowski et al., 2008). В то же время показано, что нарушения у мутанта *Atham1,2,3* развиваются в постэмбриональный период, что, скорее всего, является следствием его активности именно на постэмбриональных стадиях онтогенеза. В АМ соцветия мутанта *Atham1,2,3* наблюдается развитие ряда признаков не характерных для АМ соцветия дикого типа, в том числе вакуолизация клеток АМ, образование большого количества слоёв клеток и размытие границ между СК и дифференцирующимися клетками (Engstrom et al., 2011). Надо отметить, что тройной мутант *Atham1,2,4* демонстрирует более суровый фенотип, чем *Atham1,2,3*, что свидетельствует о более важной роли гена *AtHAM4* (Engstrom et al., 2011). Тройные мутанты *Atham* демонстрируют изменение области экспрессии *WUS*, которая не изменяется в размерах, но смещается в более глубокие слои относительно дикого типа (Schulze et al., 2010). Также у тройных мутантов *Atham* наблюдается изменение области экспрессии *CLV3*, которая сильно увеличивается, сдвигается в нижерасположенные слои, относительно дикого типа и охватывает область экспрессии *WUS* со всех сторон (Engstrom, 2012). Это может свидетельствовать об участии генов семейства *AtHAM* как в регуляции межклеточного транспорта продукта *WUS* из клеток ОЦ в вышележащие слои, так и в регуляции активности *CLV3*, по независимому от *WUS* пути.

Также стоит отметить, что в контроле активности АМП *A.thaliana* также принимает участие ген *APETALA2*, ранее описанный, как один из генов,

ответственных за развитие органов цветка (Drews et al., 1991). Описана полудоминантная мутация *l28*, заключающаяся в замене единичного нуклеотида в участке *AP2*, кодирующем первый из двух функциональных доменов (Wurschum et al., 2006). Гомозиготы *l28* характеризуются терминацией АМП в основном на стадии розетки, проявляя фенотип, схожий с жёсткими аллелями *wis* (Laux et al., 1996), изредка образуя укороченные цветоносы (Wurschum et al., 2006). Гетерозиготы *l28/+* способны образовывать цветонос и переходить к цветению. Тем не менее, для них характерно уменьшение размеров АМП относительно дикого типа, подавление активности пазушных АМП и уменьшение числа розеточных листьев. АМП двойных мутантов *l28/+ ap2-2*, (содержащих жёсткий аллель *ap2*) терминировалась у большинства растений на стадии розетки. При этом трансформация растений *l28/+* конструкциями, содержащими функциональные копии *AP2*, приводила к ослаблению фенотипа *l28/+*. Также стоит отметить, что некоторое уменьшение размеров вегетативной АМП отмечалось и у одиночного мутанта *ap2-2*. В свою очередь, мутации *clv* восстанавливали фенотип *l28*, что свидетельствует об участии *AP2* в системе *WUS-CLV*, а также о том, что влияние мутации *l28* на функциональность АМП является следствием нарушения природной функции гена, а не следствием его эктопической экспрессии, вызванной доминантной природой мутации (Wurschum et al., 2006). Тем не менее, точный механизм регуляции гомеостаза АМП геном *AP2* остаётся неясным. Фенотип двойных мутантов *l28 ag* не отличался от такового у одиночных мутантов *l28*, а значит преждевременная терминация АМП, в данном случае, не является результатом эктопической экспрессии гена *AG*, репрессирующего *WUS* во флоральной АМ (см. регуляция *WUS* во флоральной меристеме). Экспрессия *l28* мутантной копии гена *AP2*, слитой с различными генами-маркерами АМП выявила, что наибольший эффект на АМП оказывает экспрессия в области СК, приводящая к терминации АМП, в то же время экспрессия в районе ОЦ не приводила к каким-либо выраженным результатам (Wurschum et al., 2006). Таким образом, продукты *AP2* и *WUS*, возможно, связываются с одними и теми же факторами/регуляторными элементами в процессе регуляции активности СК. Связывание же нефункционального продукта *AP2* в линии *l28* с данными

факторами/регуляторными элементами препятствует связыванию *WUS* и потере его функции.

Прочие регуляторы *WUS*. В регуляции пространственной организации экспрессии *WUS* и ряда генов, специфичных для АМ, у *A.thaliana* принимают участие гены *PENNYWISE (PNY)* и *POUND-FOOLISH (PNF)* (Ung et al., 2011). Эти гены кодируют BELL-подобные гомеодоменные белки (BHL), экспрессируются АМ побега и во ФМ *A. thaliana* и участвуют в регуляции АМ, образуя гетеродимеры с KNOX-белками, что обуславливает транспорт KNOX-белков в ядро (Namant, Pautot, 2010). *PNY* экспрессируется в периферической зоне АМ (Cole et al., 2006), а *PNF* - в периферической и центральной зонах (Smith et al., 2004). В АМ двойных мутантов *pny pnf* область экспрессии *WUS* принимает «диффузный» характер и значительно расширяется. Аналогичные изменения происходят и с рядом генов, специфичных для ОЦ АМ побега (рис. 6).

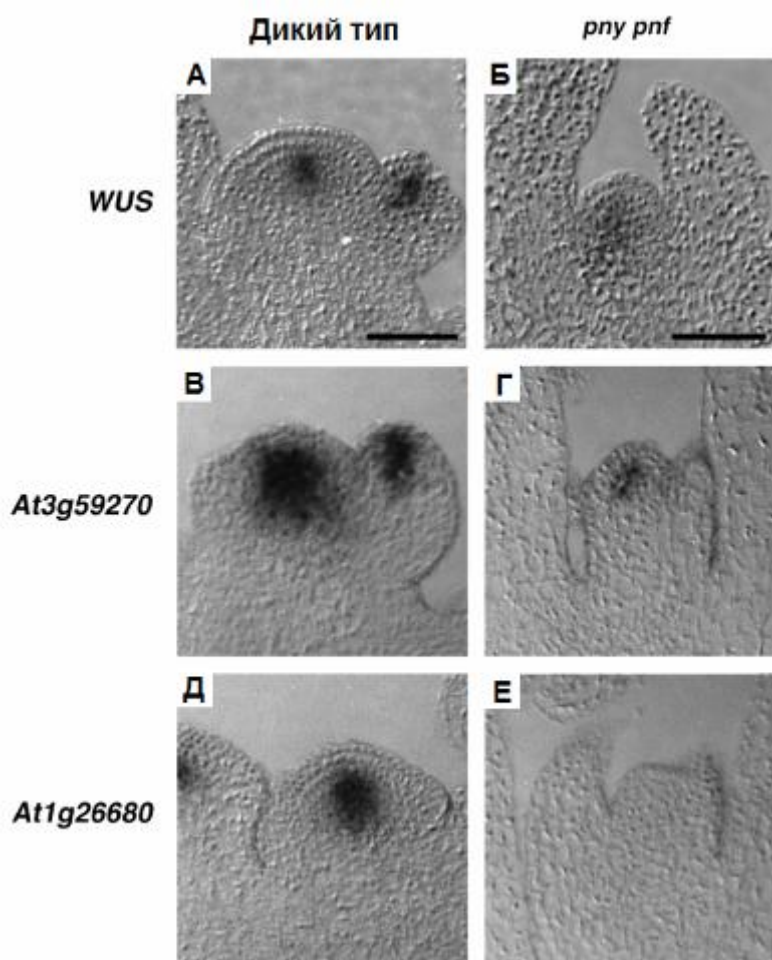


Рисунок 6. (по Ung et al., 2011, с изменениями) Экспрессия *WUS* и других генов маркеров ОЦ в АМП дикого типа и двойного мутанта *pny pnf*. Зона экспрессии *WUS*: А - в АМП дикого типа, Б - АМП мутанта *pny pnf*. Области экспрессии генов-маркеров ОЦ *At3g59270* и *At1g26680* соответственно: В, Д – в АМП дикого типа, Г, Е - мутанта *pny pnf*

У мутантов *pny pnf* часто наблюдается терминация АМ побега на стадии начала образования цветоноса (Ung et al., 2011). Это свидетельствует об участии генов

PNU и *PNF* в обеспечении «целостности» области экспрессии *WUS* и всего ОЦ АМ побега.

Важным положительным регулятором активности АМП *A.thaliana* является ген *EMB1611*, кодирующий белок, содержащий биспиральный (coiled-coil) домен в N-концевом участке, а также 2 трансмембранных домена в С-концевом (Leasure et al., 2009). Для жёстких мутантных аллелей данного гена характерна эмбриональная летальность. Мягкий мутантный аллель *emb1611-2* характеризуется преждевременной терминацией АМП в начале развития соцветия (рис. 6)

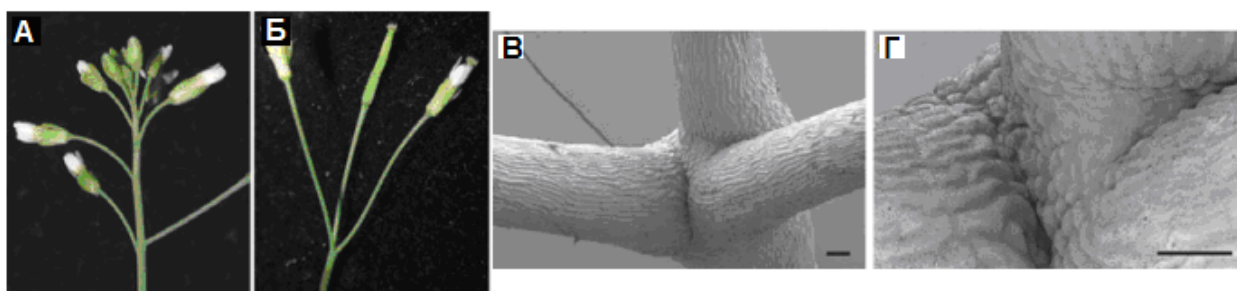


Рисунок 6. (по Leasure et al., 2009 с изменениями) Терминация АМП у мутанта *emb1611-2*. А - соцветие дикого типа. Б - недоразвившееся соцветие мутанта *emb1611-2*. Электронная микроскопия апекса мутанта *emb1611-2*: В - на среднем увеличении, Г- на большом увеличении. Бары соответствуют 50 мкм.

(Leasure et al., 2009). При этом уже через небольшой срок после прорастания АМП растений *emb1611-2* начинает существенно уменьшаться в размерах и полностью исчезает к моменту образования нескольких цветков. Уменьшение размеров АМП сопровождается прогрессирующими структурными нарушениями: АМП постепенно теряет апикальное расположение, внутренняя структура АМП также нарушается. В АМП *emb1611-2* нарушалось чёткое расположение клеток в пределах L2 и L3 слоёв. При этом сами клетки сильно варьируют по размерам и форме. Использование маркеров периферической зоны АМП слитых с геном β -глюкуронидазы выявило приобретение со временем клетками центральной зоны АМП *emb1611-2* свойств клеток периферической зоны. Мутации *clv* не были способны восстановить фенотип мутанта *emb1611-2*, а двойные мутанты *emb1611-2 clv* демонстрировали эпистаз *clv* со стороны *emb1611-2*. В то же время двойные мутанты *emb1611-2 wus-1* проявляли более жёсткий фенотип, чем одиночный мутант *wus-1*, образуя розетки меньшего размера и не будучи способными к формированию даже укороченных цветоносов, что характерно для одиночного *wus-1* (Leasure et al., 2009). Это свидетельствует об участии *EMB1611* в положительной регуляции

активности *WUS*, видимо за счёт обеспечения стабильности области его экспрессии. Также *EMB1611*, видимо, индуцирует активность СК АМП и по независимому от *WUS* пути, также возможно это *EMB1611* отвечает за остаточную активность АМП у одиночного мутанта *wus-1*.

Выявлено прямое участие гена *A. thaliana BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1)* в супрессии активности *WUS* и пространственном ограничении зоны его экспрессии (Han et al., 2008). Ген *BARD1* является растительным гомологом человеческого гена *BRCA1 (BRreast CAncer susceptible gene1)*, участвующего в контроле клеточного цикла. Мутации в гене *BARD1* приводят к значительному увеличению активности *WUS* и его распространению в периферические клетки АМ. На ранних стадиях развития мутантов *bard1* происходит увеличение АМ побега, что вызывает многочисленные нарушения его морфологии у растений (Han et al., 2008). Белок *BARD1* подавляет экспрессию *WUS*, связываясь непосредственно с его промоторной областью. Эктопическая экспрессия *BARD1* вызывает снижение активности *WUS* в клетках АМ побега и развитию *wus*-подобного фенотипа. Методом гибридизации *in situ* показано, что в растениях дикого типа мРНК *BARD1* локализуется в периферических слоях АМ, где в норме отсутствует экспрессия *WUS* (Han et al., 2008). Таким образом, *BARD1* может регулировать экспрессию *WUS*, ограничивая зону его активности пределами ОЦ АМ.

Недавно было показано участие в регуляции функционирования АМ *A. thaliana* генов *FAF2* и *FAF4*, относящихся к семейству генов с неизвестной функцией *FANTASTIC FOUR (FAF)*, путём репрессии *WUS*, механизм которого также остаётся неизвестным (Wahl et al., 2010). Было показано, что области экспрессии *FAF2* и *FAF4* расположены в центральной зоне АМ. Трансгенные линии *A. thaliana*, содержащие гены *FAF* под контролем конститутивного вирусного 35S промотора, демонстрировали подавление пролиферации клеток АМ у молодых проростков и снижение уровня экспрессии *WUS* в АМ. Фенотип при этом не зависел от того, какой ген семейства суперэкспрессировался. Это говорит о том, что гены *FAF*-семейства функционально дублируют друг друга.

Общая схема регуляции активности гена *WUS* показана на рисунке 7.

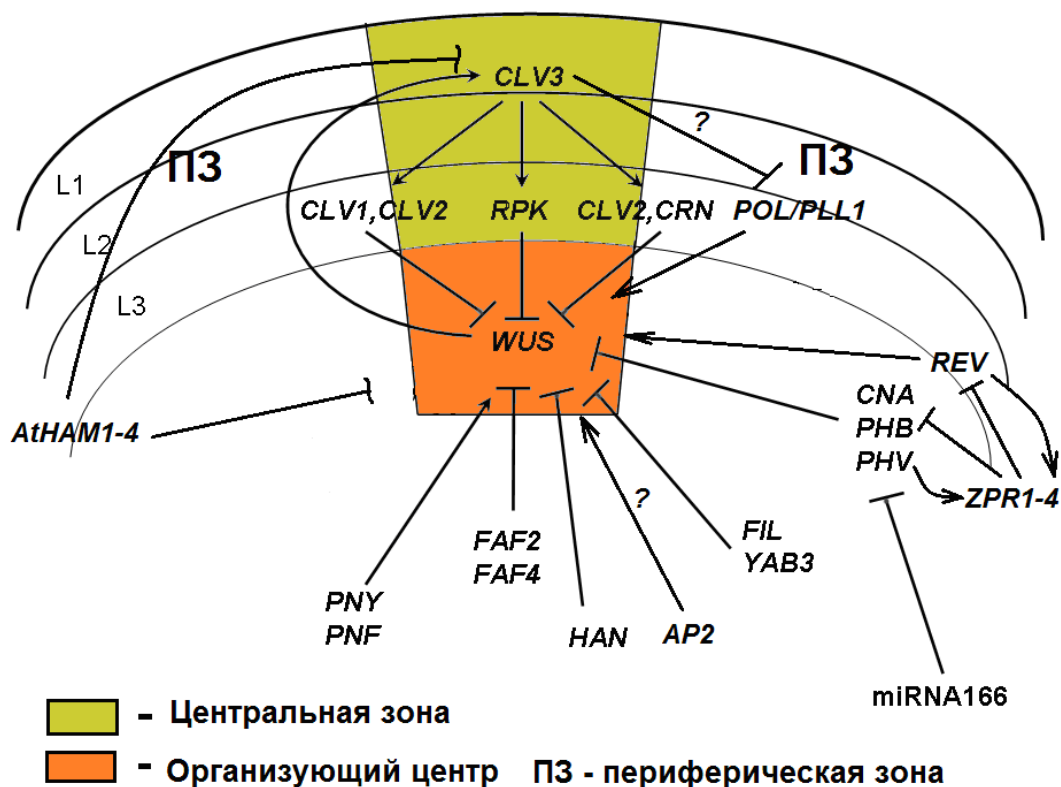


Рисунок 7. (По Альберт, Ежова, 2013 с изменениями) Общая схема регуляции активности гена *WUS* транскрипционными факторами в АМП *A.thaliana*. Центральную роль в ограничении активности *WUS* играет *CLV3*. Также в регуляции *WUS* принимают участие положительные регуляторы: *PNY*, *PNF*, *REV* (стрелки); и негативные регуляторы *FIL*, *YAB3*, *HAN*, *CNA*, *PHB*, *PHV*, *FAF2,4* (прямые линии). Гены *AtHAM1-4*, очевидно, определяют границы области экспрессии *WUS* (волнистые линии). Ген *AP2* взаимодействует с *WUS* через неизвестный механизм.

Регуляция *WUS* во флоральной меристеме. В основе поддержания активности ФМ *A.thaliana*, как и АМ, лежит взаимодействие генов *WUS* и *CLV3*. Однако во ФМ пул СК, маркированный экспрессией *CLV3*, существует ограниченное время. Сформировав органы всех четырёх кругов, ФМ меристема прекращает свое существование из-за прекращения экспрессии гена *WUS*. Основную роль в репрессии *WUS* во ФМ у *A.thaliana* играет ген *AGAMOUS (AG)*, выполняющий ключевую роль в процессе формирования репродуктивных органов цветка. Экспрессия *WUS* во флоральной меристеме поддерживается генами *LFY* и *APETALA1 (AP1)* (рис. 8) (Lohmann et al., 2001).

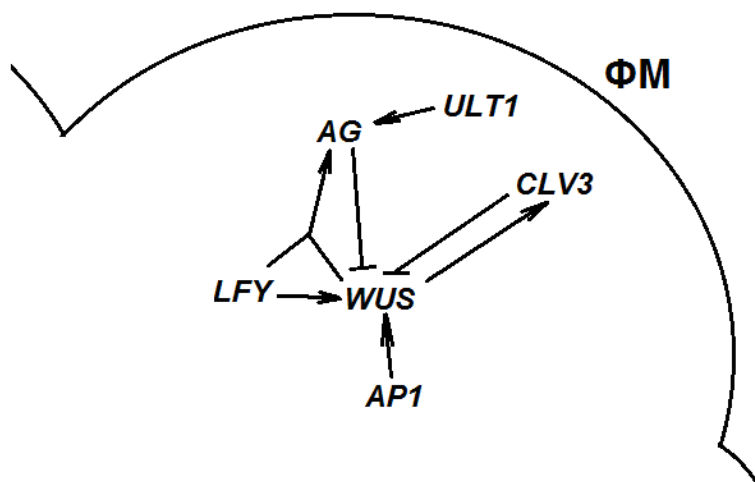


Рисунок 8. Регуляция *WUS* во флоральной меристеме. Во флоральной меристеме система *WUS-CLV3* существуют ограниченное время. Экспрессия *WUS* во флоральной меристеме поддерживается генами *LFY* и *AP1*. *WUS*, *LFY* и *ULT1* индуцируют экспрессию гена С-класса *AG*, который репрессирует экспрессию *WUS*. ФМ – флоральная меристема.

Продукт *WUS* вместе с продуктом гена *LEAFY (LFY)*, являющегося основным геном, определяющим переход к цветению, индуцируют транскрипцию гена *AG* (рис. 8), связываясь с регуляторными цис-элементами во втором интроне *AG* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). В свою очередь белок *AG* полностью подавляет экспрессию *WUS*, присоединяясь к его промоторной области и рекрутируя белки Polysomb Group (PcG), которые осуществляют метилирование гистонов в районе локуса *WUS* (Liu et al., 2011). У мутантов *ag* не происходит терминации ФМ, в результате чего они образуют лишённые генеративных органов цветки, состоящие из большого количества мутовок (Bowman et al., 1989).

Ген *ULT1*, ограничивающий пространственный паттерн экспрессии *WUS* в вегетативной АМ, во флоральной АМ, является одним из ключевых факторов терминации ФМ. *ULT1* выступает активатором *AG* (рис. 8) на определённом временном промежутке, индуцируя его экспрессию путём подавления метилирования гистонов в промоторной области *AG* (Carles et al., 2009).

1.2.2.2. Регуляция АМП генами, обеспечивающими биосинтез и ответ на растительные гормоны

Регуляция АМП генами *KNOX* семейства. Одними из важнейших регуляторов гомеостаза АМП являются гены *KNOX* класса I (*KNOX I*), которые представлены у *A.thaliana* генами *SHOOT MERISTEM-LESS (STM)*, *KNAT1 (BREVIPEDICELLUS (BP))*, *KNAT2*, и *KNAT6*. Данные гены экспрессируются в АМП, при этом их области экспрессии перекрываются, что хорошо соотносится с частичным перекрытием их функций. *STM* экспрессируется в центральной и периферической зонах АМП, в то время как *KNAT1* и *KNAT2* экспрессируются в периферической зоне (Lincoln et al., 1994; Long et al., 1996; Pautot et al., 2001). *KNOX I* гены регулируют активность АМП индуцируя синтез цитокинина и цитокининовый сигнал (Yanai et al., 2005).

Цитокинины синтезируются в разных частях растения – корне, стебле, незрелых семенах, о чём говорит анализ областей экспрессии генов *IPT*-семейства, играющих ключевую роль в контроле синтеза цитокинина (Miyawaki et al., 2004). В АМП также происходит синтез собственного цитокинина, который накапливается преимущественно в центральной зоне АМ и формирует градиент к периферии. Связываясь с рецепторами АНК2 и АНК4, цитокинин активирует экспрессию *WUS*, обеспечивая, таким образом, поддержание активности стволовых клеток АМП (Leibfried et al., 2005). Цитокинин одновременно активирует транскрипцию генов *ARR* семейства - негативных регуляторов цитокининового пути, ограничивающих ответ на цитокининовый сигнал (D'Agostino et al., 2000). Однако активированный цитокинином ген *WUS* ограничивает уровень транскрипции этих негативных регуляторов (Kieffer et al., 2006), поддерживая таким образом уровень своей транскрипции и пул СК. Продукт *AtIPT7* – аденилат-изопентинилтрансфераза катализирует синтез аденозин-изопентил-фосфата, являющегося предшественником цитокинина. Следующая стадия – превращение аденозин-изопентил-фосфата в активный цитокинин катализируется ферментом цитокинин рибозид 5'-монофосфат фосфорибогидролазой. Ген *LONELY GUY (LOG)*, кодирующий данный фермент, впервые был обнаружен в геноме риса *Oryza sativa* (Kurakawa et al., 2007). В геноме *A. thaliana* обнаружено 9 паралогов *LOG* – *AtLOG1*

– 9 (Kuroha et al., 2009). Их суперэкспрессия в трансгенных линиях *A. thaliana* приводила к повышенной пролиферативной активности СК.

Суперэкспрессия в растениях *A. thaliana* генов *KNOX I* семейства активирует уровень экспрессии гена *ISOPENTENYLTRANSFERASE 7 (IPT7)*, что ведет к увеличению содержания цитокинина и активации семейства генов *A ARR* (в частности *ARR15* и *ARR7*), а также к активации катаболизма гиббереллина – главного антагониста цитокинина (Yanai et al., 2005). Ген *STM* является одним из основных генов, поддерживающих нормальное функционирование и развитие АМП на ранних стадиях развития, индуцируя синтез цитокинина. Это подтверждается тем, фенотип мутантов *stm*, характеризующихся преждевременной дифференцировкой клеток АМП, может быть восстановлен суперэкспрессией гена *AtIPT7* или обработкой мутантов экзогенным цитокинином. В свою очередь, экзогенный цитокинин вызывает быстрое увеличение концентрации мРНК *STM* (и других *KNOX* генов) что говорит о наличии системы положительной обратной связи между цитокинином и *KNOX* генами (Wolters et al., 2009).

Недавние исследования выявили наличие системы отрицательной обратной связи между *WUS* и *A ARR* генами, действующей через *CLV3* (рис. 10). Показано, что ключевые гены *A ARR* семейства *ARR7* и *ARR15* необходимы для обеспечения нормального уровня экспрессии гена *CLV3* (Zhao et al., 2010), который как говорилось выше, является основным супрессором *WUS*. Ранее было известно, что обработка растений большими дозами ЦК способна приводить к формированию фенотипа *clv* с характерным усилением экспрессии *WUS* и снижением экспрессии *CLV1* (Lindsay et al., 2006; Gordon et al., 2009), что свидетельствует о наличии репрессии *CLV1* со стороны цитокинина и индукции, таким образом, активности *WUS*. По видимому, существует и *CLV*-независимый путь.

Также показано участие гена *A.thaliana STIMPY/WOX9 (STIP)*, кодирующего *WUS*-подобный гомеобокс-содержащий белок, в цитокининовом пути регуляции АМ побега. Суперэкспрессия *STIP* в растениях тройных мутантов *ahk2-2 ahk3-3 cre1-12* (содержат мутации в генах цитокининовых рецепторов), характеризующихся почти полным отсутствием АМП (Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004), вызывала образование АМ и индуцировала продолжительный рост побега (Skylar et al., 2010). В ответ на суперэкспрессию

STIP в клетках мутантов активировались гены, индуцируемые в норме транскрипционными факторами *B ARR* и *A ARR*, экспрессия которых нарушена у мутантов *ahk2-2 ahk3-3 cre1-12*. Тем не менее, восстановление фенотипа было неполным, что является свидетельством параллельного действия цитокинина и *STIP*.

Регуляция активности АМП генами ауксинового сигнала. Ауксин, как и цитокинин, играет важную роль в регуляции активности АМП *A.thaliana*. Он способен оказывать как индуцирующее, так и супрессорное действие на *WUS*. Ауксин накапливается в ПЗ АМ и регулирует экспрессию генов ауксинового ответа через Aux/IAA–ARF сигнальный путь (Zhao et al., 2008), включающий Aux/IAA-репрессоры и ARF-транскрипционные факторы. Он индуцирует деградацию Aux/IAA, освобождая ARF-факторы, что приводит к индукции ауксинового ответа (Chapman et al., 2009). Одним из таких факторов является ген *AUXIN RESPONSE FACTOR5/MONOPTEROS (MP)*. Мутации в гене *MP* приводят к эктопической экспрессии негативных регуляторов цитокининового ответа *ARR7* и *ARR15* по всей АМП (Zhao et al., 2010). Следовательно, ауксин, активируя *MP*, поддерживает активность цитокининового сигнала, который является важнейшим активатором *WUS*. Мутации в генах *YUCCA* (кодируют флавин-монооксигеназы), контролирующих синтез ауксина (Won et al., 2011) и генах *PIN1* (Okada et al., 1991) и *PINOID* (Christensen et al., 2000), контролирующих транспорт ауксина, также характеризуются усилением экспрессии *ARR7* и *ARR15*. Это также свидетельствует о том, что ауксин оказывает индуцирующее воздействие на *WUS*, поддерживая активность цитокининового сигнала. Одновременное нарушение функции генов *PID* и *AG* приводит к развитию побегоподобных ветвящихся цветков (Кавай-оол и др., 2011).

Ауксин способен оказывать и супрессорное действие на *WUS*. Он индуцирует транскрипцию микро РНК miR164 (Guo et al., 2005), основная функция которой состоит в деградации мРНК генов семейства *CUC* (рис. 10) (Sieber et al., 2007; Raman et al., 2008). Гены *A.thaliana CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1, CUC2)* кодируют транскрипционные факторы NAC-семейства, определяющие границы АМ (Hibara et al., 2006). *CUC* также являются активаторами экспрессии ряда *KNOX I* - генов, в том числе и гена *STM*, который способен индуцировать экспрессию

CUC1, *CUC2*, формируя систему положительной обратной связи (Spinelli et al., 2011). Поскольку *KNOX 1* – гены активируют синтез цитокинина (см. выше), ауксин, инициируя деградацию мРНК *CUC*, приводит к снижению синтеза цитокинина, а значит – и уровня экспрессии *WUS*.

Общая схема регуляции активности *WUS* растительными гормонами приведена на рисунке 9.

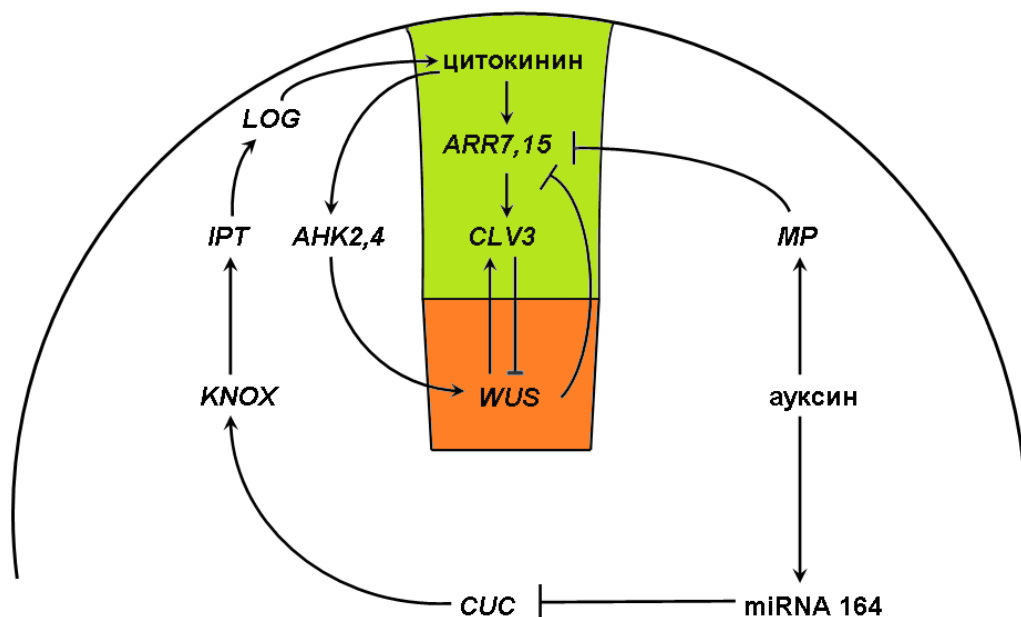


Рисунок 9. (По Альберт, Ежова, 2013) Регуляция активности *WUS* у *A.thaliana* генами гормонального синтеза и сигнала. *KNOX* гены индуцируют основные гены синтеза цитокинина. Цитокинин, индуцирует экспрессию *WUS* через рецепторы цитокининового ответа *АНК2,4*, а также индуцирует экспрессию *CLV3* через *ARR7,15*, оказывая как индуцирующее, так и супрессирующее воздействие на *WUS*. Ауксин с одной стороны индуцирует *WUS*, супрессируя *ARR7,15*, с другой оказывает репрессорное воздействие, негативно регулируя гены *CUC* -индукторы *KNOX* генов.

1.2.2.3. Эпигенетическая регуляция поддержания активности АМП

Эпигенетические механизмы также играют важную роль в регуляции активности АМП *A.thaliana* и поддержания постоянства её пула СК. В основном эпигенетическая регуляция сводится к модулированию экспрессии ключевых генов, поддерживающих гомеостаз АМП.

Эпигенетическая регуляция *WUS*. В контроль функционирования АМП *A.thaliana* вовлечён ряд факторов ремоделинга хроматина. *WUS* - один из центральных объектов подобной регуляции (Kwon et al., 2005). *WUS* является непосредственной мишенью фактора ремоделинга хроматина *SPLAYD* (*SYD*). *SYD*

относится к семейству SWI/SNF АТФаз, основная роль которых состоит в обеспечении транскрипции путём создания доступной для формирования транскрипционного комплекса матрицы ДНК, что обуславливает индукцию *WUS* продуктом *SYD*. Мутанты *A.thaliana syd* отличались постепенным уменьшением размеров АМ (начиная с перехода к генеративной стадии) и формировали меньше цветков, чем растения дикого типа. Также у мутантов *syd* заметно снижались уровни экспрессии *WUS* и *CLV3*, это снижение уровня экспрессии точно коррелировало с началом уменьшения размеров АМ (Kwon et al., 2005).

Мутанты *A.thaliana* с нарушениями функции генов *FASCIATA1* и *2* (*FAS1,2*), кодирующих субъединицы фактора сборки хроматина-1 (CAF1), демонстрируют расширение области экспрессии *WUS*, который экспрессируется в том числе и в поверхностных слоях АМП. Что вызывает развитие фасциацированного стебля. Белок CAF1 обеспечивает сохранение эпигенетического статуса после репликации ДНК (Kaya et al., 2001). Штаммы дрожжей с нарушенной функцией CAF1 не были способны поддерживать ряд генов в репрессированном состоянии (Monson et al., 1997). Видимо CAF1 репрессирует *WUS* путём гетерохроматинезации соответствующих участков ДНК.

В ограничении активности *WUS* участвует ген *BRUSHY1* (*BRU1*) *A.thaliana*, известный также как *MGOUN3* (*MGO3*) и *TONSOKU* (*TSK*) продукт которого участвует в пострепликативной стабилизации хроматина (Takeda et al., 2004, Guyomarç'h et al., 2004; Suzuki et al., 2004). *BRU1* кодирует белок, несущий два консервативных домена, участвующих в белок-белковых взаимодействиях и домен, отвечающий за взаимодействие с ДНК (Takeda et al., 2010). Ген *BRU1* не проявляет значительной гомологии с другими генами *A.thaliana*. Аллели *bru1-1* и *bru1-2* с частичной потерей функции гена *BRU1* характеризуются развитием сильной фасциации стебля, нарушением филлотаксиса, увеличением размеров АМП, что сходно с проявлением мутаций в генах *FAS1* и *2* (см. выше). Таким образом, одной из важных функций гена *BRU1* является ограничение активности *WUS*. Также стоит отметить, что мутанты *bru1-3*, несущие полностью нефункциональную копию гена *BRU1*, проявляют карликовый фенотип (Takeda et al., 2004). Это более вероятно связано с крайне высокой чувствительностью данных линий к генотоксическому стрессу, чем с изменением пролиферативной активности АМП.

В ограничении пула СК в АМП *A.thaliana* путём негативной регуляции *WUS* принимают участие гены *ULT1* и *ULT2*, кодирующие гомологичные белки, содержащие SAND-домен, а также B-box-подобный домен (Carles et al., 2009; Monfared et al., 2013). Продукты генов *ULT1* и *ULT2* действуют как белки группы trithorax (*trxG*), обеспечивающие метилирование H3K4, что поддерживает гены в транскрипционно-активном состоянии. Данная функция антагонистична белкам группы Polycomb (*PcG*), обеспечивающим репрессия активности генов, путём метилирования H3K27 (Schwartz and Pirrota, 2007; Zheng and Chen, 2011). Гены *ULT1* и *ULT2* экспрессируются в эмбриональной, вегетативной и флоральной АМ. Одиночные мутанты *ult1* и *ult2* демонстрируют увеличение размеров АМП, в то же время АМП двойных мутантов *ult1 ult2* значительно увеличивается относительно не только дикого типа, но и обоих одиночных мутантов. (Monfared et al., 2013). Тем не менее, учитывая специфику действия *trxG* белков, можно предполагать, что *ULT1* и *ULT2* являются дерепрессорами негативных регуляторов *WUS*, подобно тому, как *ULT1* дерепрессирует *AG* в ходе развития флоральной меристемы (Carles et al., 2009).

Эпигенетическая регуляция *KNOX* генов. Как и *WUS*, *KNOX* гены регулируются эпигенетическими механизмами. Репрессия *KNOX* генов в организме *A.thaliana* осуществляется посредством комплекса продукта гена *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* и фактора ремоделинга хроматина *HIRA* (Phelps-Durr et al., 2005) (рис. 10). *HIRA* является высоко консервативным белком: присутствует также в организме дрожжей, дрозофилы и мыши; *HIRA* контролирует процессы гетерохроматинового супрессирования активности генов (Spector et al., 1997; Nakayama et al., 2007; Hajkova et al., 2008). Мутанты *hira A.thaliana* летальны на ранних стадиях развития, тем не менее, у линий с нарушенной функцией *HIRA* наблюдается эктопическая экспрессия генов *KN1* и *KN2*, что приводит к развитию *as-1* подобного фенотипа (Phelps-Durr et al., 2005). Таким образом, *HIRA*, формируя комплекс с продуктами *AS*, присоединяется к промоторам *KN1* и *KN2* обеспечивая гетерохроматинизацию данных регионов. Стоит отметить, что *HIRA* проявляет гомологию с субъединицей *p60*, входящей в состав *CAF1* (Phelps-Durr et al., 2005). Тем не менее, слабые мутанты *hira* не демонстрируют изменений в экспрессии *WUS* и *CLV3*, что наблюдается у мутантов по генам, кодирующим

основные субъединицы CAF1 (см. выше *FAS1,2*). Это может свидетельствовать о специфичности регуляции генов, отвечающих за гомеостаз АМП, со стороны различных факторов ремоделинга хроматина.

В регуляции активности *KNOX* генов также участвуют белки группы Polycomb (PcG). Такие представители PcG белков, как SWINGER (SWN), CURLY LEAF (CLF), MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2) и VERNALIZATION2 (VRN2) участвуют в поддержании *KNOX* генов в репрессированном состоянии в процессе развития листа (рис. 10) (Katz et al., 2004; Schubert et al., 2006).

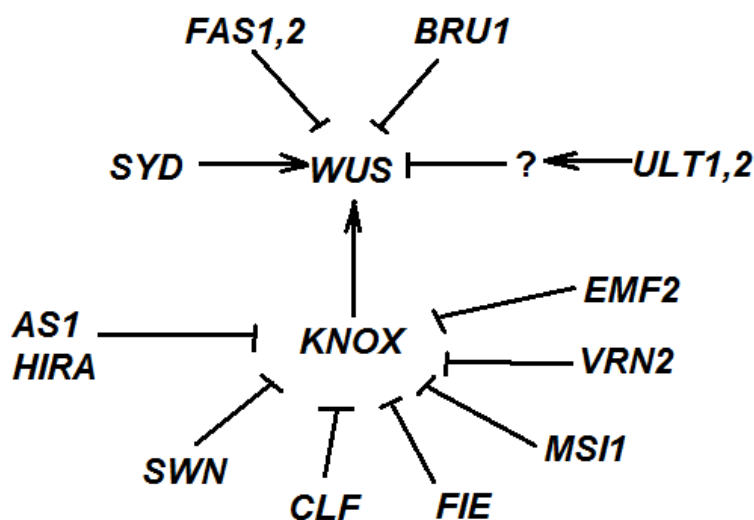


Рисунок 10. Эпигенетическая регуляция *WUS* и *KNOX* генов в организме *A.thaliana*. *WUS* и *KNOX* регулируются разными группами генов, оказывающих в основном негативное воздействие.

В том числе они ограничивают область экспрессии *STM* апикальной меристемой побега (Schubert et al., 2006). CLF, связываясь с *STM* в развивающихся листьях, катализирует метилирование H3K27. Уровень H3K27me3 в районе *STM* серьезно снижен у сильных мутантов *clf*, которые также демонстрируют эктопическую экспрессию *STM* в листьях. В то же время у двойных мутантов *clf swi* полностью отсутствует H3K27me3 в районе *STM*. Это может свидетельствовать о взаимодействии *CLF* и *SWN* в репрессировании *STM*. Также показано, что Polycomb белки участвуют в поддержании *KN1* и *KN2* в репрессированном состоянии в процессе развития листа (Lodha et al., 2009). Также следует отметить, что фактор HIRA действует прежде Polycomb факторов в ходе репрессии *KNOX*. У

слабых мутантов *hira* в листьях в *KN1* и *KN2* наблюдается отсутствие H3K27me3 и наоборот, наличие меток активного хроматина. Данные изменения не происходят в сайтах посадки AS1-HIRA комплексов, но встречаются по всей остальной длине *KN1* и *KN2* (Lodha et al., 2009). Это свидетельствует о том, что репрессия данных генов происходит посредством распространения области гетерохроматина от промоторной части по всей длине гена. Таким образом, эпигенетическая регуляция *KNOX* генов ведёт к ограничению областей их экспрессии, что обеспечивает формирование корректных границ между АМП и формирующимися примордиями органов.

1.2.2.4. Участие генов-регуляторов клеточного цикла в поддержании гомеостаза АМП

Помимо регуляторных генов, ответственных за поддержание недетерминированного состояния и пролиферативной активности СК, в регуляции гомеостаза АМП также принимают участие регуляторы клеточного цикла. Несмотря на то, что регуляция клеточного цикла у растений изучена достаточно хорошо, не так много известно об участии регуляторов клеточного цикла в развитии и регуляции и поддержании АМП (Inzé, De Veylder, 2006). На данный момент показано участие ряда генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, в поддержании активности клеток АМП.

Ген *A.thaliana AtCDC5* является ортологом гена *CDC5 S.pombe*, участвующего в регуляции перехода от стадии G2 к М клеточного цикла. Показано, что функция гена *AtCDC5* в значительной степени совпадает с таковой у его ортолога из *S.pombe* (см. Lin et al., 2007). Мутанты *atcdc5* летальны на стадии зиготы, в то время как линии, содержащие вызывающие интерференцию *AtCDC5* РНК конструкции, характеризуются рядом нарушений, в том числе и нарушением функционирования АМП. Линии *AtCDC5-RNAi* характеризовались задержкой роста, перехода на репродуктивную стадию и потерей апикального доминирования вследствие ослабления пролиферативной активности АМП. Также на поверхности листовых пластинок наблюдалось серьёзное увеличение числа клеток, прекративших деление и перешедших к эндоредупликациям, что происходило в результате нарушений перехода между G2 и М стадиями клеточного цикла. При

этом экспрессия *WUS* была серьёзно снижена в АМП *AtCDC5-RNAi* линий, как и экспрессия *CLV3*, которая также демонстрировала последовательное снижение в течение первых 10-ти дней после прорастания. Экспрессия гена *STM* также демонстрировала постепенное снижение в течение 8-ми дней после прорастания. Область экспрессии *STM* сокращалась до нескольких клеток (Lin et al., 2007). Одновременно с этим у линий *AtCDC5-RNAi*, суперэкспрессировавших *STM*, наблюдалось частичное восстановление фенотипа. Это свидетельствует о возможном участии гена *AtCDC5* в поддержании функциональной АМП на постэмбриональных стадиях путём индукции экспрессии *STM*, а, следовательно, и цитокининового сигнала.

В регуляцию функционирования и поддержания АМП *A.thaliana* также могут быть вовлечены гены *CYCD3;1-3*. Экспрессия данной группы генов наблюдается в АМП и примордиях боковых органов (Dewitte et al., 2007). Мутанты по генам *CYCD3;1-3* демонстрируют переход клеток листовой пластинки к эндоредупликациям на более ранних стадиях развития листа, чем это происходит у дикого типа. Также наблюдается уменьшение размеров АМП в результате сокращения пула входящих в её состав клеток. Это приводит к задержке роста, более позднему переходу на репродуктивную стадию и уменьшению числа цветков. При этом у мутантов *cuscd3* не наблюдалось снижения концентрации цитокинина (Dewitte et al., 2007). Однако каллусы, полученные из эксплантов *cuscd3*, в отличие от каллусов из эксплантов дикого типа, не были способны инициировать развитие стеблей даже при обработке значительными концентрациями цитокинина. Ранее было показано, что экспрессия *CYCD3;1* индуцируется цитокинином (Riou-Khamlichi et al., 1999). Это свидетельствует о том, что *CYCD3* являются мишенями цитокининовой регуляции и необходимы для развития цитокининового ответа.

Ген *CCS52A2/FZR1 A.thaliana*, кодирующий активатор APC/C (Anaphase-Promoting Complex) комплекса, участвующего в переходе между фазами клеточного цикла (Perez-Perez et al., 2008), также является одним из регуляторов АМП. Его экспрессия наблюдается по всему организму, но в АМП концентрация транскрипта *CCS52A2* выше, чем в остальных тканях (Liu et al., 2012). Растения линии *xct9*, несущей мутацию в гене *CCS52A2* характеризовались

преждевременной терминацией АМП, в результате чего развивался укороченный цветонос с уменьшенным относительно дикого типа числом цветков. В некоторых случаях наблюдалось полное исчезновение АМП (Liu et al., 2012). Мутанты *xcm9* характеризовались уменьшением толщины стебля, длины стручков и уменьшенными размерами листовых пластинок. А также уменьшением размеров и часто возникающими бифуркациями флоральных меристем. АМ мутанта *ccs52a2-3* имела нарушения в клеточной организации слоёв L1 и L2 и характеризовалась некоторым увеличением в размерах относительно дикого типа за счёт увеличения размеров клеток.

При этом области экспрессии *WUS* и *CLV3* увеличивались относительно дикого типа. Часто в пределах одной АМП мутанта *ccs52a2-3* формировались 2 независимые области экспрессии *WUS* и *CLV3*, что говорит о формировании двух независимых систем *WUS-CLV3* (рис. 11, А, Б). В ходе онтогенеза число таких независимых областей экспрессии *WUS-CLV3* могло возрастать в результате дальнейших бифуркаций АМП (рис. 11, В, Г). Двойные мутанты *ccs52a2-3 clv3-2* демонстрировали задержку перехода на репродуктивную стадию и сильными бифуркациями АМП, формирую в некоторых случаях до 30 независимых АМП на одном стебле в результате бифуркаций (рис. 11, Д, Е). АМП большинства двойных мутантов *ccs52a2-3 clv3-2* терминировалась уже после образования нескольких цветков. В то же время двойные мутанты *ccs52a2-3 wus-1* фенотипически практически не отличались от одиночных *wus-1*, за исключением отсроченного выброса цветоноса (рис. 11, З) (Liu et al., 2012).

При этом основной функцией *CCS52A2* является контроль эндоцикла (Lammens, 2008; Liu et al., 2008), что подтверждается соответственным увеличением или уменьшением плоидности клеток листа у растений с отсутствующей или усиленной экспрессией данного гена. Тем не менее, в АМП мутантов *ccs52a2-3* не происходит изменения плоидности клеток (Liu et al., 2012), что указывает на отсутствие связи механизма поддержания АМП геном *CCS52A2* с регуляцией уровня плоидности клеток. Таким образом, ген *CCS52A2* может поддерживать формирование правильной организации АМП, обеспечивая единство зоны экспрессии *WUS-CLV3*.

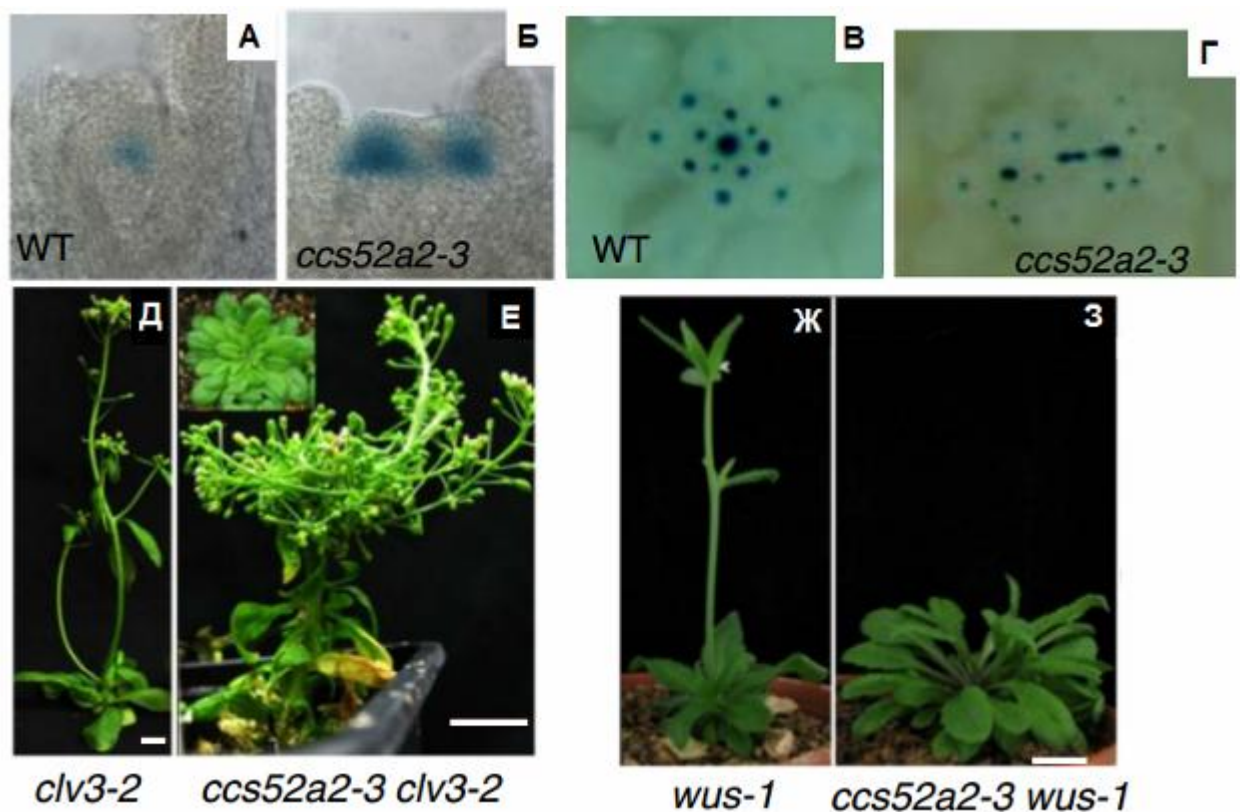


Рисунок 11. (по Liu et al., 2012) Фенотип мутанта *ccs52a2-3*. Экспрессия *WUS* в АМП 8-ми дневных проростков: А - дикого типа, Б - мутанта *ccs52a2-3*, хорошо видно наличие у *ccs52a2-3* двух областей экспрессии *WUS*. АМП соцветия: В -дикого типа, Г - мутанта *ccs52a2-3*, хорошо заметно наличие у *ccs52a2-3* множественных очагов экспрессии *WUS*, соответствующих множественным меристемам, развившимся в результате бифуркаций АМП. Д - одиночный мутант *clv3*. Е - двойной мутант *ccs52a2-3 clv3* с мощным аномальным ветвлением за счёт образования множественных АМП. Ж - одиночный мутант *wus-1*. З - двойной мутант *ccs52a2-3 wus-1*.

Также показано участие циклин-зависимых киназ А-типа (CDKA) в регуляции гомеостаза АМП *A.thaliana* (Gaamouche et al., 2010). Экспрессия доминантно-негаивного аллеля *CDKA;1.N146* под контролем промотора *STM* в растениях *A.thaliana* приводила к задержке роста, формированию уменьшенных листовых пластинок аномальной формы. АМП данных линий имела меньшие размеры и нарушенную организацию слоёв L1 и L2. Число клеток АМП было меньше, чем у дикого типа, а их размеры варьировали, частота деления клеток также была ниже по сравнению с диким типом. Области экспрессии таких генов как *STM*, *WUS* и *CLV3* не изменялись у большинства растений, суперэкспрессирующих *CDKA;1.N146*. Тем не менее, небольшая часть трансгенных растений на стадии розетки демонстрировала образование двух слившихся АМП на верхушке стебля. Данные растения также характеризовались большей степенью ингибирования

клеточных делений. При этом усиление экспрессии *CDKA;1.N146* приводило к увеличению доли растений с множественной АМП (Gaamouche et al., 2010). Это может свидетельствовать о наличии зависимости между корректной организацией АМП и частотой клеточных делений.

Стоит отметить, что уровень активности CDKA снижен у мутантной линии *fas1* (Ramirez-Parra et al., 2007), что хорошо коррелирует с серьезным снижением активности клеточных делений у данного мутанта. Это может свидетельствовать о том, что *FAS1* не только ограничивает размеры АМП посредством негативной регуляции области экспрессии *WUS*, но и положительно регулирует активность клеточных делений, индуцируя активность CDKA. Так как активные клеточные деления, обеспечиваемые работой CDKA, обеспечивают длительную пролиферативную активность АМП, можно заключить, что *FAS1* помимо ограничений размеров АМП поддерживает сохранение её пролиферативной активности на протяжении длительного времени.

Помимо CDKA в поддержании правильной организации АМП *A.thaliana* участвуют и CDKB (Andersen et al., 2008). Линии, экспрессирующие конструкции, вызывающие РНК-интерференцию одновременно генов *CDKB2;1* и *CDKB2;2*, демонстрировали фенотип, схожий с линиями, экспрессирующими доминантно-негаивный аллель *CDKA;1*. А именно карликовость, нарушение организации клеточных слоёв АМП, а также уменьшение числа и увеличение размеров её клеток. Частота клеточных делений была существенно снижена в результате нарушения перехода G2–M. В результате чего клетки АМП переходили к эндоредупликациям. АМП данных линий также была склонна к формированию нескольких слитых меристем, в которых возникало несколько независимых областей экспрессии *WUS-CLV3* и *STM*. Одновременно с этим происходило падение концентрации активного цитокинина и падение уровня экспрессии генов цитокининового ответа с одновременным ростом концентраций ауксина (Andersen et al., 2008). Это свидетельствует, что наблюдаемые нарушения вызваны изменением в механизмах гормональной регуляции.

1.2.2.5. Взаимодействие генов ствольности с генами клеточного цикла

В настоящий момент установлено наличие взаимодействия генов, отвечающих за поддержание СК апикальных меристем в недетерминированном состоянии с генами, регулирующими клеточные деления. Тем не менее, данные о взаимодействии генов ствольности с генами клеточных делений и о роли данных генетических механизмов в регуляции функционирования АМ являются неполными.

Ген *SCARECROW (SCR)* необходим для закладки и функционирования покоящегося центра (ПЦ) в АМ корня *A.thaliana* (Sabatini et. al., 2003). В клетках ПЦ мутантов *scr* экспрессия специфических маркеров отсутствовала, что говорит о потере данными клетками характерных черт клеток ПЦ (Sabatini et. al., 2003). Также инициальные клетки колумеллы мутантов *scr* демонстрировали экспрессию ряда маркеров, характерных для дифференцирующихся клеток, и в норме отсутствующих у инициалей (Sabatini et. al., 2003), что свидетельствует о потере ПЦ мутантов *scr* своих функций и неспособности поддерживать инициали в недетерминированном состоянии. Было показано, что ген *SCR* напрямую взаимодействует с геном *RETINOBLASTOMA RELATED (RBR)*, обеспечивая медленное деление клеток в ПЦ. Нарушение данного взаимодействия в результате точковых мутаций в *SCR* или *RBR* приводит к увеличению частоты ассиметричных делений в ПЦ, в результате чего увеличивается пул быстро делящихся СК в АМ корня (Cruz-Ramirez et. al., 2013). При этом не наблюдается каких-либо нарушений функционирования ПЦ как ниши СК. Тем не менее, ПЦ линий *A.thaliana*, с нарушенным взаимодействием *SCR-RBR* демонстрировал большую чувствительность к ДНК-повреждающим агентам, чем ПЦ линий дикого типа, у которых клетки ПЦ практически не погибали при обработке ДНК-повреждающими агентами. Это приводило к более серьёзным нарушениям функционирования АМП и роста корня, чем у растений дикого типа (Cruz-Ramirez et. al., 2013). Таким образом, медленные деления в ПЦ не влияют на его функциональность, а служат для повышения устойчивости к генотоксическому стрессу.

Стоит отметить, что ген *RBR* также является ключевым регулятором клеточного цикла, необходимым для координации клеточных делений, дифференцировки и общего гомеостаза различных меристем растительного

организма. Индуцированная РНК-интерференция *RBR* у трансгенных линий *A.thaliana* приводила к полной остановке развития проростков уже после 5-ти дней культивации на среде, содержащей индуцирующий агент (Borghì et. al., 2010). В случае обработки более взрослых растений индуцирующим агентом, образуемые после обработки листья были значительно меньше нормы и имели аномальную морфологию. Также после индукции РНК-интерференции *RBR* наблюдалось прогрессирующее нарушение клеточной организации АМП (особенно ярко проявлявшееся в L2 и L3) и общее изменение её морфологии с куполообразной на уплощённую. Помимо этого, наблюдалось нарушение формирования примордиев органов. Морфологические нарушения АМП сопровождались также прогрессирующим сокращением области и уровня экспрессии *CLV3*, что вначале сопровождалось некоторым увеличением активности *WUS*, которая, тем не менее, в дальнейшем снижалась до нормы (Borghì et. al., 2010). Также стоит отметить, что видимых изменений в экспрессии таких важных для функционирования АМП генов, как *STM* и *KNAT1*, не наблюдалось (Borghì et. al., 2010). Клеточные деления при этом были достаточно активны, о чём свидетельствовало увеличение уровня экспрессии *CYCB1;1*. Таким образом, можно говорить о возможном участии *RBR* не только в регуляции клеточных делений, но и в регуляции системы *WUS-CLV3*. Об этом свидетельствует тот факт, что при явном нарушении экспрессии *CLV3* при искусственной инактивации *RBR* уровень экспрессии *WUS* вырастает незначительно и лишь на непродолжительное время, после чего падает почти до уровня дикого типа. Такое сохранение уровня активности *WUS* в условиях явного нарушения системы регуляции *CLV3* может быть следствием наличия положительной регуляции *WUS* со стороны *RBR*, потеря которой компенсирует рост активности *WUS* в результате нарушения экспрессии *CLV3*. Стоит отметить также, что инактивация *RBR* вызывает нарушения пролиферации прокамбиальных клеток - их число сильно увеличивается и нарушается клеточная организация. Помимо этого, нарушения при инактивации *RBR* возникают и во флоральной меристеме (Borghì et. al., 2010). Это свидетельствует о том, что *RBR* является одним из ключевых регуляторов, связывающих механизмы поддержания постоянства пула СК и регуляции клеточных делений, который при этом действует во всех меристематических тканях организма *A.thaliana*.

Также есть данные, что гены, поддерживающие гомеостаз АМП *A.thaliana*, такие как *WUS*, способны влиять на интенсивность клеточных делений. Так у мутанта *stem ectopic flowers (sef)*, характеризующегося увеличением активности *WUS* наблюдается увеличение длины гипокотилия за счёт увеличения числа клеток, а не их растяжения, в то же время у мутанта *wus-1* наблюдается сокращение числа клеток гипокотилия и, соответственно, уменьшение его длины (Zhang et. al., 2013). В гипокотиле *sef* наблюдается активная пролиферация клеток, о чём говорит высокий уровень активности *CYCB1;1*, в то же время в гипокотилиях растений дикого типа подобной пролиферативной активности не наблюдается (Zhang et. al., 2013). Показано, что у растений линии *sef* наблюдается эктопическая экспрессия *WUS* в клетках гипокотилия, которая отсутствует у растений дикого типа; помимо этого в клетках гипокотилия растений *sef* наблюдался повышенный уровень экспрессии гена *GLUTAMINE-RICH PROTEIN 23 (GRP23)* (Zhang et. al., 2013), являющегося одной из мишеней регуляции со стороны *WUS* (Busch et. al., 2010). Суперэкспрессия гена *GRP23* вызывает увеличение длины гипокотилия за счёт интенсификации клеточных делений: у данных трансгенных линий наблюдалось увеличение числа клеток, находящихся на стадии перехода G2/M и более высокий митотический индекс, чем у дикого типа (Zhang et. al., 2013). В то же время инактивация гена *GRP23* у линии *sef* приводила к подавлению пролиферативной активности в гипокотиле и сокращению его длины (Zhang et. al., 2013). Это свидетельствует о том, что *WUS* индуцирует клеточные деления в гипокотиле посредством положительной регуляции *GRP23*, являющегося непосредственным индуктором клеточных делений через регуляцию G2/M перехода. Таким образом, *WUS* способен опосредовано регулировать активность клеточных делений, хотя наличие подобного механизма в АМП не показано.

Также показано, что ген *STM* способен индуцировать экспрессию *CYCD3* через цитокинин. Трансгенные линии *A.thaliana*, суперэкспрессирующие ген *STM*, характеризовались снижением числа клеток листа, перешедших к эндоредупликациям и усилением клеточных пролифераций, что приводило к формированию аномальной листовой пластинки (Scofield et. al., 2013). Также показано, что суперэкспрессия гена цитокинин оксидазы 1 (*CKX1*) вела к снижению уровня экспрессии генов семейства *CYCD3*. Суперэкспрессия одновременно и

CKX1 и *CYCD3* вызывала фенотип, характерный для суперэкспрессии только *CYCD3*, что свидетельствует о том, что эффекты снижения числа клеток, переходящих к эндоциклу, в результате суперэкспрессии *STM* (а значит и увеличения концентрации цитокинина) обусловлены индукцией *CYCD3* (экспрессия которых индуцируется цитокинином) (Scofield et. al., 2013). Также суперэкспрессия *STM* в растениях тройного мутанта *cycd3;1 cycd3;2 cycd3;3* не приводила к восстановлению мутантного фенотипа (повышенный уровень эндоредупликаций и ослабленная пролиферативная активность) (Scofield et. al., 2013).

На данный момент данные о взаимодействии генов, поддерживающих постоянство пула СК, и генов, регулирующих активность клеточных делений, представляются весьма неполными. Хотя точных данных, говорящих о наличии чёткого взаимодействия между генами, регулирующими гомеостаз АМП, и генами регуляторами клеточного цикла непосредственно в самой АМП, имеющиеся факты позволяют предположить наличие такого механизма, включающего обе группы генов, который обеспечивает поддержание гомеостаза и формирование правильной структуры не только АМП, но и других меристематических тканей организма *A.thaliana*.

Таким образом, генетический контроль активности стволовых клеток АМП *A.thaliana* представляет собой сложную систему, включающую большое количество генов. Центральным геном в данной системе является ген *WUS*, определяющий активность и границы пула СК побега и функционирующий в тесном взаимодействии с генами *CLV*. Вместе *WUS* и *CLV* формируют систему, контролирующую пролиферативную активность пула СК, в то время как роль остальных генов сводится в основном к модуляции действия данной системы. Среди данной группы генов помимо транскрипционных регуляторов встречается также значительное количество регуляторов других типов, среди которых важную роль играют эпигенетические регуляторы. Стоит отметить, что действие эпигенетических регуляторов в данном случае достаточно специфично и экспрессия *WUS* и других ключевых генов поддержания гомеостаза АМП, таких как *STM*, находится под контролем разных групп эпигенетических регуляторов. Важнейшая роль в контроле АМП принадлежит растительным гормонам –

цитокинину и ауксину, а, следовательно, и генам, обеспечивающим биосинтез и транспорт данных гормонов, и развитие гормональных ответов.. При этом работа генов гормональных сигналов, в свою очередь, находится под контролем генов клеточного цикла, поддерживающих таким образом корректное функционирование АМП.

1.3. Онтогенетические изменения АМП в постэмбриональном периоде

Если в процессе эмбриогенеза происходит закладка и формирование функциональной АМП, то на постэмбриональных стадиях основные изменения АМП связаны с увеличением её размеров, структурными изменениями и приобретением компетентности для закладки различных типов органов. Так на вегетативной стадии АМП закладывает розеточные листья и боковые вегетативные меристемы, дающие начало паракладиям. В то время как на стадии цветения АМП закладывает боковые флоральные меристемы, из которых развиваются цветки. Данные онтогенетические изменения АМП, как и поддержание её гомеостаза, требуют контроля со стороны сложных генетических механизмов.

Вегетативная стадия АМП. После прорастания семени первоначальная АМП *A.thaliana* переходит к вегетативной стадии, на которой она формирует розеточные листья. В составе вегетативной стадии можно выделить две подстадии: ювенильную и взрослую (Poethig, 2003). На ювенильной стадии развиваются небольшие листья, с отсутствием (или очень небольшим числом) трихом на верхней поверхности и простым жилкованием. На взрослой стадии формируются крупные листья, имеющие более сложное жилкование и образующие трихомы на обеих поверхностях (Poethig, 2003). Также на взрослой вегетативной стадии происходит переход к цветению (McDaniel et al., 1996; Tekfer et al., 1997; Van Lijsebettens and Clarke et al., 1998).

Переход от ювенильной к взрослой вегетативной АМП находится под контролем значительного количества генов. Ведущую роль в супрессии перехода АМП от ювенильной к взрослой вегетативной стадии играет ряд генов, участвующих в посттрансляционной негативной регуляции генов путём РНК-интерференции.

Ген *A.thaliana HASTY (HST)* является ортологом гена импортин β -подобного рецептора нуклеоцитоплазматического транспорта *exportin 5* млекопитающих (Bollman et al., 2003). Мутации в гене *HST* приводят к ускорению перехода к взрослой вегетативной стадии, а также ускорению последующего перехода к цветению, что выражается в более ранней относительно дикого типа закладке примордиев цветков. Также у мутантов *hst-1* часто наблюдается более ранняя закладка флоральных примордиев, но выброс цветоноса и раскрытие бутонов задержаны, относительно дикого типа (Bollman et al., 2003). *SERRATE (SE)* кодирует белок, содержащий домен «цинковые пальцы» (Clarke et al., 1999). Мутации в данном гене приводят к приобретению первыми листьями мутанта черт взрослых листьев, что ведёт к увеличению доли взрослых листьев относительно дикого типа.

Сходный фенотип демонстрируют мутанты в гене *A.thaliana ZIPPY (ZIP)*, принадлежащем к семейству *ARGONAUT* (Hunter et al., 2003). Мутанты *zip* образуют удлиненные, закрученные вниз листья и образуют трихомы на верхней поверхности более молодых листьев, в сравнении с диким типом. При этом мутанты *zip* не демонстрируют более раннего зацветания по сравнению с диким типом (Hunter et al., 2003).

Мутанты *A.thaliana* по генам *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3 (SGS3)* и *RNA-DEPENDENT POLYMERASE6 (RDR6)* фенотипически не отличаются от мутантов *zip* (Peragine et al., 2004). Растения гомозиготные по различным комбинациям *zip*, *sgs3*, и *rdr6* также демонстрируют фенотип, характерный для одиночных мутантов. В то же время мутанты *hst* эпистатируют все три мутанта *zip*, *sgs3*, и *rdr6* (Peragine et al., 2004), что свидетельствует об их участии в контроле одного процесса. Также показано, что у мутантов *sgs3*, и *rdr6* (но не у *zip*) наблюдается увеличение уровня экспрессии группы генов, в том числе и *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 (SPL3)*, являющийся мишенью регуляции со стороны miR156 (см. Peragine et al., 2004). Впоследствии было показано участие генов *SPL3*, *SPL4*, *SPL5* (Wu and Poethig, 2006) а также *SPL9* и *SPL15* (Schwarz et al., 2008) в положительной регуляции перехода на взрослую вегетативную стадию, а также наличие негативной регуляции данных генов со стороны miR156. Также в негативном контроле перехода между

ювенильной и взрослой вегетативными стадиями принимает участие *WUS*, так как мутации в данном гене приводят к приобретению всеми листьями розетки черт взрослых листьев (Hamada et al., 2000).

Таким образом, основная регуляция перехода от ювенильной к взрослой вегетативной стадии сводится к негативной регуляции генов, обеспечивающих данный переход. В то же время переход растения к вегетативной стадии после прорастания также является следствием репрессии генов, отвечающих за переход к цветению и генов развития цветка. Об этом свидетельствует фенотип мутантов *A.thaliana* по генам *EMBRYONIC FLOWER 1, 2 (EMF1, EMF2)*, у которых вместо розетки сразу после прорастания формируются либо недоразвитое соцветие, либо структура сходная с цветком, а также присутствует ряд морфологических изменений, связанных с нарушением развития всего организма (Sung et al., 1991; Chen et al., 1997). *EMF1* и *EMF2* кодируют предполагаемый транскрипционный фактор и белок PcG соответственно (Yoshida et al., 2001). Мутации *emf* эпистатируют мутации в таких генах цветения, как *APETALA1*, *APETALA2*, *LEAFY* и *TERMINAL FLOUER 1*, что указывает на их ведущую роль в репрессии перехода к цветению (Chen et al., 1997). Помимо этого гены *EMF* участвуют в репрессии генетических механизмов ответа на стрессы и развития семян (Kim et al., 2010). Мутации в генах *CURLY LEAF (CLF)* и *WAVY LEAVES AND COTYLEDONS (WLC)*, кодирующих PcG белки, также вызывают ряд нарушений развития, в том числе и раннее цветение (Goodrich et al., 1997; Levy et al., 1998).

В репрессировании генов, участвующих в переходе к репродуктивной стадии *A.thaliana* также принимает участие ген *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)*, кодирующий белок с (bromodomain) бромсвязанным доменом и доменом «цинковые пальцы» в составе. Домены, входящие в состав белка EBS свидетельствуют о его участии в формировании белковых комплексов, вовлечённых в процесс ремоделинга хроматина (Piñeiro et al., 2003). Мутации в данном гене приводят к более раннему зацветанию в условиях короткого дня, являющихся неиндукционными для цветения. Тем не менее, растения суперэкспрессирующие ген *EBS* характеризуются также более ранним зацветанием по сравнению с диким типом в условиях короткого дня (Piñeiro et al., 2003). Этот

фенотип трактуется как результат накопления продукта *EBS*, которое ведёт к формированию нефункциональных белковых комплексов.

Таким образом, вегетативная фаза развития растения обеспечивается репрессированием генов перехода к цветению в АМП, что позволяет растению накопить достаточно ресурсов для обеспечения дальнейшей репродукции. Причём основную роль в репрессии преждевременного перехода к репродуктивной стадии играют гены, ответственные за ремоделинг хроматина.

Переход к генеративной АМП. При переходе на генеративную стадию АМП приобретает компетентность к закладке флоральных примордиев. В ходе данной трансформации у *A.thaliana* наблюдается ряд морфологических изменений АМП. При переходе на репродуктивную стадию АМП увеличивается в размерах, по сравнению с вегетативной стадией, приобретая более выпуклую, куполообразную форму (рис. 12).

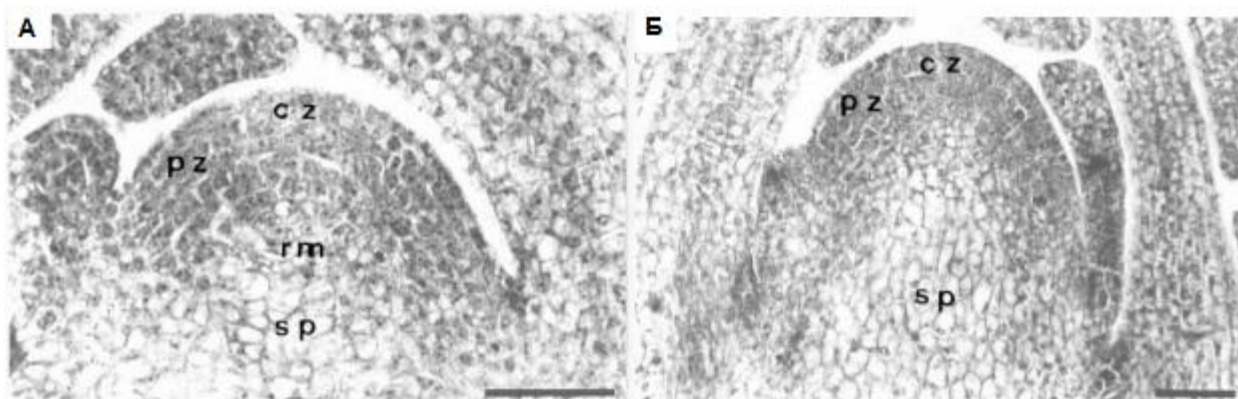


Рисунок 12. (по Jacquard et al., 2003) АМП *A.thaliana* до и после перехода на генеративную стадию. АМП на вегетативной стадии (А) меньше по размерам и менее куполообразная, чем на вегетативной стадии (Б). cz - центральная зона, pz - периферическая зона, tm - подстилающая зона, sp - субапикальный домен. Бары соответствуют 50 мкм.

Также наблюдается ускорение клеточных делений, как в периферической, так и в центральной зонах АМП (Jacquard et al., 2003) и ускорение закладки примордиев органов (Bernier, 1988), в результате чего на генеративной стадии образуется большее число органов в единицу времени, чем на предшествовавшей вегетативной. Тем не менее, генетические механизмы, обуславливающие морфологические изменения в АМП при переходе на генеративную стадию на данный момент остаются неясными. При этом есть данные, указывающие на

наличие специфических генетических механизмов, поддерживающих функциональность АМП при переходе к репродуктивной стадии.

Так, например, у мутанта по гену *A.thaliana SHOOT APICAL MERISTEM ARREST 1 (SHAI)* наблюдается терминация АМП при переходе на репродуктивную стадию (Sonoda et al., 2007), в результате чего происходит остановка развития растительного организма на стадии розетки. На вегетативной стадии мутант *shal-1* не проявляет серьёзных морфологических дефектов, кроме незначительного сокращения числа розеточных листьев и незначительного изменения их морфологии. Тем не менее, растения *shal-1* не способны выбрасывать цветонос и образовывать цветки (рис. 13, А, Б).

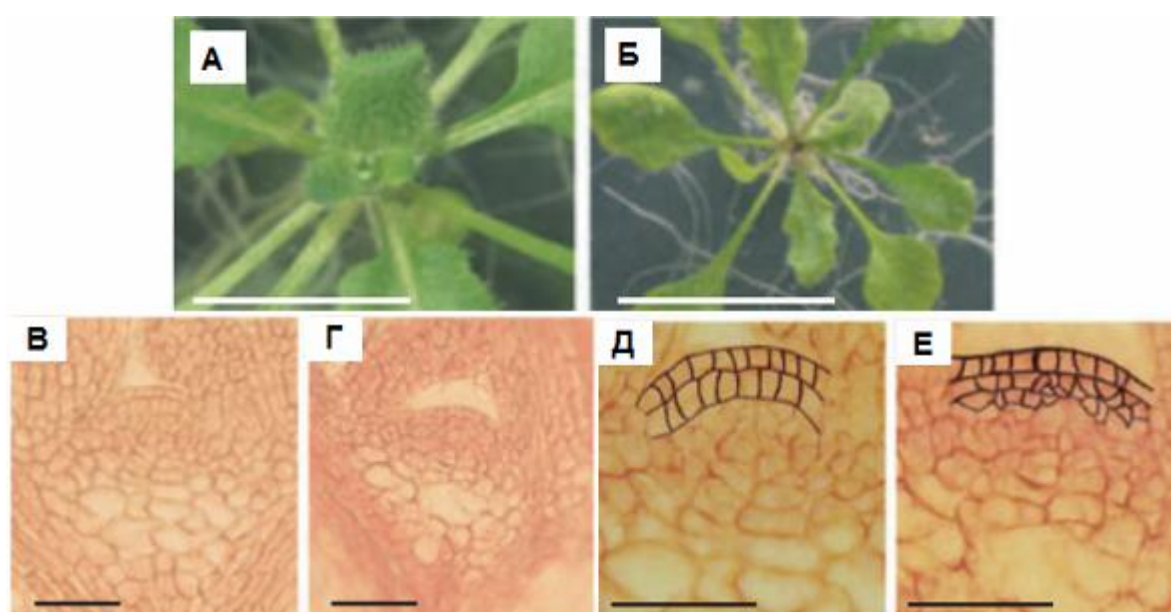


Рисунок 13. (по Sonoda et al., 2007 с изменениями). Фенотип мутанта *shal-1*. Растения на стадии перехода к генеративной АМП: А - дикого типа, Б - *shal-1*. Бары соответствуют 50мм. Продольные срезы АМП на 6-й день после прорастания: В - дикого типа, Г - *shal-1*. АМП на 6-й день после прорастания на большем увеличении: Д - дикого типа, Е - *shal-1*. Бары соответствуют 20 мкм.

Показано, что АМП *shal-1* начинает терять характерную для нормальной АМП клеточную организацию примерно на 7-й день после прорастания, что примерно соответствует остановке развития мутантных растений (рис. 13, В-Е). Закладки флоральных примордиев и экспрессии соответствующих генов при этом не наблюдалось. Экспрессия таких регуляторных генов, как *STM*, *CLV1*, *CLV2*, и *KNAT1* не была изменена на момент прекращения функционирования АМП *shal-1*, в то время как экспрессия *WUS* и *CLV3* не наблюдалась (Sonoda et al., 2007). В совокупности с данными о том, что мутация *wus* эпистатирует *shal-1*, это говорит о

важной роли гена *SHAL* в поддержании активности *WUS* при переходе АМП от вегетативной к генеративной стадии.

Суперэкспрессия гена *ETERNALLY VEGETATIVE PHASE1 (EVE1)* *A.thaliana*, кодирующего белок убиквитинового семейства, (в результате негативной полудоминантной мутации в данном гене) приводит к остановке развития растения на вегетативной стадии и отсутствию перехода на репродуктивную стадию в результате прекращения функционирования АМП (Hwang et al., 2011).

АМП гомозигот *eve1-D* сохраняет куполообразную форму, но прекращает пролиферировать на том этапе, когда растения дикого типа переходят на репродуктивную стадию (рис. 14, А-Д).

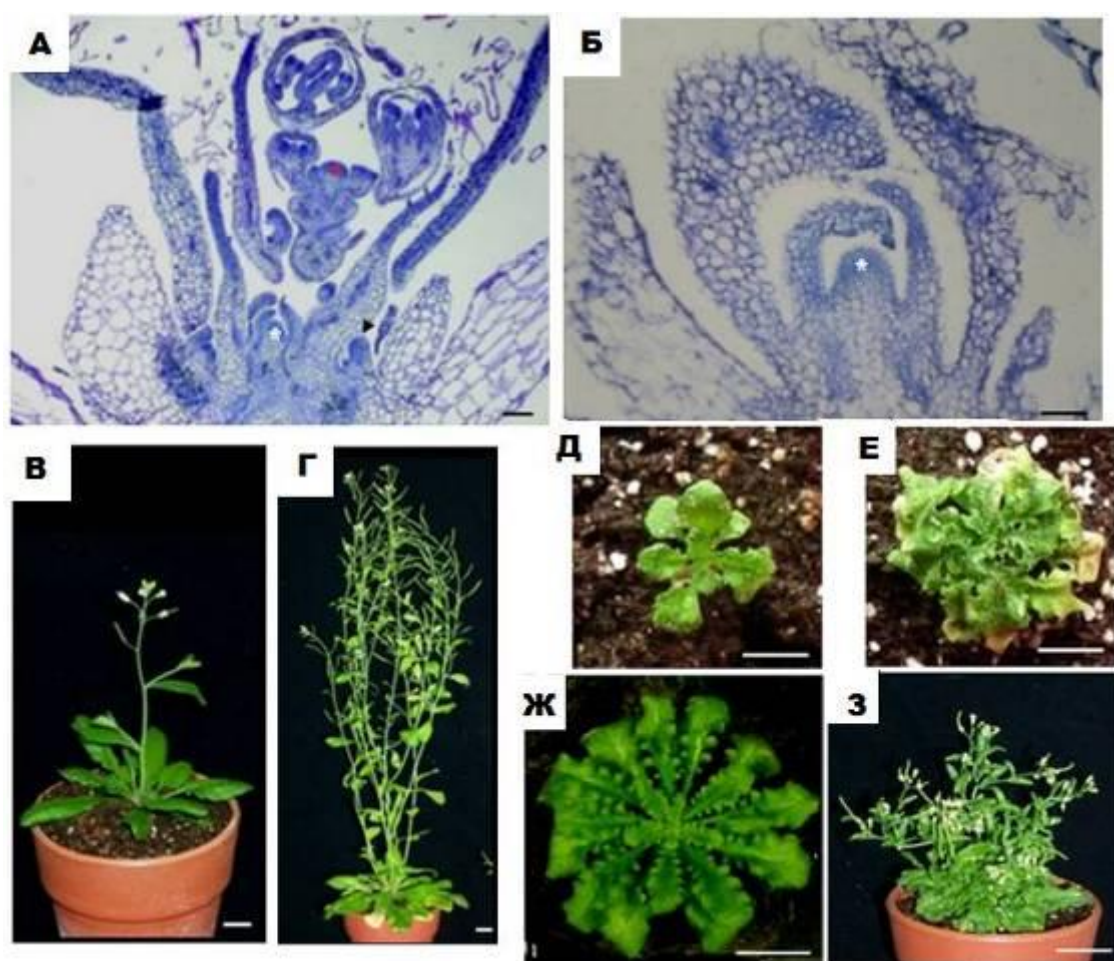


Рисунок 14. (по Hwang et al., 2011 с изменениями) Фенотип мутанта *eve1-D*. Продольные срезы АМП генеративной стадии: А - дикого типа; Б - мутанта *eve1-D*. Белая звездочка - вегетативная АМП, красная звездочка - АМП соцветия. Растения на стадиях начала выброса цветоноса и развитого соцветия: В, Г- дикий тип; Д, Е - гомозигота *eve1-D*, Ж, З - гетерозигота *eve1-D*. Бары в Д-Л соответствуют 10мм.

С большим запозданием АМП гомозигот *eve1-D* закладывает боковые АМП, которые, тем не менее, прекращают развитие, образовав лишь несколько

розеточных листьев, в результате чего на поздних стадиях развития, соответствующих стадии цветения у дикого типа, у растений *eve1-D* формируется характерный фенотип (рис. 14, Д-И). Растения *eve1-D/+* при этом переходят к цветению и выбрасывают цветонос, но его высота значительно меньше, чем у дикого типа за счёт сокращения длины междоузлий, толщина цветоноса также уменьшается по сравнению с диким типом. Также растения *eve1-D/+* характеризовались потерей апикального доминирования, в результате чего приобретали кустистый фенотип (рис. 14, К, Л) (Hwang et al., 2011). В то же время линии, экспрессирующие антисмысловую мРНК гена *EVE1* фенотипически практически не отличались от дикого типа. При этом у растений *eve1-D* не наблюдалось изменений в уровне экспрессии таких ключевых генов, как *WUS* и *KNOX* генов, а также широкого спектра генов-регуляторов *WUS*. Значительное снижение уровня экспрессии у мутанта *eve1-D* демонстрировали только гены *AP1* и *AP2* (Hwang et al., 2011). Это позволяет предположить, что ген *EVE1* является важным регулятором, репрессирующим активность генов, ответственных за активность АМП при переходе к репродуктивной стадии, которые на данный момент остаются неидентифицированными.

Способность генеративной АМП закладывать примордии цветков обеспечивается индукцией ряда генов цветения. Центральную роль в индукции цветения принадлежит генам *LEAFY (LFY)* и *APETALA1 (API)*, кодирующим специфичный для растений транскрипционный фактор и MADS-box транскрипционный фактор соответственно (Bowman et al., 1993; Busch et al., 1999). Мутанты по данным генам характеризуются частичной или полной трансформацией цветков в вегетативные структуры. Экспрессия *LFY* индуцируется ауксином и локализуется в примордиях цветков (пазушных меристемах), закладываемых АМП, после перехода на репродуктивную стадию. Также ген *LFY* способен индуцировать активное развитие пазушных меристем. Суперэкспрессия мутантной копии *LFY*, кодирующей белок с нефункциональным С-концевым доменом, приводит к усиленному развитию пазушных меристем у *A.thaliana* (Chahtane et al., 2013). Суперэкспрессия нормальной копии *LFY* также индуцирует преждевременное развитие пазушных меристем, но при этом они, как и АМП главного побега, трансформируются во флоральные меристемы. Показано, что *LFY*

индуцирует экспрессию таких генов, как *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS 1 (RAX1)* (участвующий в развитии пазушных меристем) и *TERMINAL EAR LIKE2 (TEL2)* (возможно участвующий в поддержании АМП), а также репрессирует *ARR7* (участвует в ингибировании цитокининового сигнала и опосредованном репрессировании *WUS*) (Chahtane et al., 2013). Это говорит о том, что *LFY* вначале индуцирует развитие пазушных меристем, а потом обеспечивает их трансформацию в меристемы цветка.

Индукция экспрессии ключевых генов перехода к цветению осуществляется несколькими независимыми путями (речью Komeda, 2004). Среди них можно выделить «автономный» путь, а также воздействие факторов внешней среды (температурный режим и продолжительность фотопериода). Сигналы от всех путей воздействуют на гены-интеграторы, центральным среди которых является ген *FT*, передающие сигнал далее генам индукторам цветения (речью Komeda, 2004).

На данный момент механизмы инициации цветения изучены достаточно подробно. Тем не менее, роль генов, поддерживающих гомеостаз АМП, в регуляции трансформации АМП из вегетативной в генеративную остаётся недостаточно изученной.

Показано, что в регуляции перехода от вегетативной к генеративной АМП принимают участие гены *PNY* и *PNF*, участвующие в поддержании гомеостаза АМП (см. выше). Двойные мутанты *pnf pny* не переходят на репродуктивную стадию, не выбрасывают цветонос и продолжают образовывать листья в течение продолжительного времени, хотя самые апикальные листья двойных мутантов *pnf pny* морфологически сходны со стеблевыми листьями растений дикого типа. (Smith et al., 2004). Тем не менее, у двойных мутантов *pnf pny* наблюдается ускорение образования листьев и возрастание активности пазушных меристем по времени совпадающее с ускорением образования новых органов у дикого типа в связи с переходом к цветению. Это говорит о том, что мутанты *pnf pny* отвечают на сигналы перехода к репродуктивной стадии, но при этом экспрессия таких генов как *LFY* и *API* не индуцируется (Smith et al., 2004). Стоит также отметить, что экспрессия *FT* не меняется у мутантов *pnf pny*, но это, в то же время, свидетельствует, что для реализации функции *FT* необходимы функциональные *PNY* и *PNF* (Kanrar et al., 2008). Как уже говорилось выше, основной функцией

PNY и *PNF* является обеспечение транспорта *KNOX* генов в ядро, что позволяет последним выполнять свои регуляторные функции. Также показано, что у мутантов *ft* и *fd* на цветоносе формируется на 2-3 вегетативных узла больше, чем у растений дикого типа, но при этом число генеративных узлов (цветков) не изменено. У растений, содержащих слабый мутантный аллель *stm-10*, также наблюдаются нарушения развития соцветия, сводящиеся к образованию большего числа вегетативных узлов цветоноса и сокращённое количество генеративных узлов с последующим формированием терминального цветка. Также стоит отметить, что у мутанта *stm-10* отсутствуют пазушные меристемы примерно у половины стеблевых листьев (Smith et al., 2011). В то же время, двойные мутанты *ft-2 stm-10* и *fd-3 stm-10* образуют значительно большее число вегетативных узлов цветоноса, чем одиночные мутанты, что свидетельствует о наличии взаимодействия между данными генами в процессе трансформации вегетативной АМП в генеративную. Также у двойных мутантов *ft-2 stm-10* и *fd-3 stm-10* наблюдается значительное снижение числа закладывающихся пазушных меристем по сравнению с одиночным *stm-10*. Это говорит об участии *STM* и *FT-FD* комплекса в индукции закладки пазушных меристем в ходе репродуктивной стадии. В то же время у двойного мутанта *fd-3 stm-10* отсутствует активность *LFY* и *API*, что свидетельствует о необходимости *STM* и *FT-FD* также и для индукции *LFY* и *API* (Smith et al., 2011).

Таким образом, гены *PNY* и *PNF*, участвуя в транспорте продукта *STM* в ядро, обеспечивают взаимодействие *STM* с генами *FT* и *FD*. Данное взаимодействие обеспечивает, с одной стороны, закладку пазушных меристем, а с другой индукцию *LFY* и *API*. Индукция *LFY* и *API*, в свою очередь, поддерживает процесс индукции пазушных меристем и обуславливает их дальнейшую трансформацию во флоральные меристемы.

Апикальная меристема побега и содержащийся в ней пул стволовых клеток являются жизненно важными для развития надземной части высших растений. В связи с этим в процессе эволюции были выработаны сложные генетические механизмы, обеспечивающие поддержание постоянства пула и пролиферативную активность СК апикальной меристемы побега. Центральная роль в поддержании гомеостаза АМП принадлежит гену *WUS* и функция большинства остальных генов, участвующие в этом процессе, сводится, в конечном счёте, к индукции,

поддержанию и модулированию экспрессии *WUS*. Стоит отметить, что число генов, ограничивающих область или уровень экспрессии *WUS*, значительно больше, чем генов, положительно регулирующих его активность. Это может быть связано в первую очередь с необходимостью строгого ограничения размеров пула СК для нормального развития растительного организма. Основная роль в индукции *WUS* принадлежит цитокининам и, соответственно, опосредованно генам, контролирующим биосинтез цитокинина, таким как гены семейства *KNOX I*. Растительный гормон ауксин также играет важную роль в регуляции экспрессии *WUS* в основном через взаимодействие с цитокинином.

В процессе онтогенеза АМП не статична, и с момента закладки на эмбриональных стадиях проходит ряд последовательно сменяющих друг друга фаз, отличие которых заключается в основном в индукции экспрессии специфических генов, обеспечивающих приобретение АМП компетентности к закладке тех или иных органов в определённый период жизни растительного организма. Наиболее вероятным биологическим смыслом данной регуляции является предоставление организму растения возможности накопить достаточно питательных веществ для обеспечения нормального зацветания и последующего созревания семян.

На данный момент выявлено большинство ключевых участников регуляции гомеостаза АМП и большое количество дополнительных регуляторов. Тем не менее, некоторые аспекты данного процесса, такие как регуляция переходов между различными стадиями, генетическая регуляция выброса цветоноса и участие генов стволовости в процессе перехода к цветению, остаются недостаточно изученными. В свете этого изучение новых мутантов, характеризующихся нарушением функционирования АМП представляется важным для расширения представлений о генетических механизмах, регулирующих гомеостаз АМП. Так, например, изучение мутанта *nana-D A.thaliana*, характеризующегося сокращением длины междоузлий цветоноса и уменьшением размеров АМП на репродуктивной стадии, может пролить свет на регуляцию АМП при переходе к генеративной стадии и выбросу цветоноса.

Также важной проблемой является установление точных механизмов взаимодействия генов, поддерживающих недетерминированность стволовых клеток, с генами, контролирующими клеточный цикл. Имеющиеся данные

указывают на их тесное взаимодействие в обеспечении гомеостаза и правильной организации АМП, тем не менее, на данный момент точные механизмы их взаимодействия в большинстве остаются неясными. Пролить свет на взаимодействие данных групп генов в контроле функционирования АМП может изучение мутации *fas5 A.thaliana*, характеризующейся увеличением размеров АМП, изменением её структуры и, в то же время, потерей клетками АМП недетерминированного состояния.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Исследуемые мутантные линии. В работе исследовались 2 мутанта 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; Альберт и др., 2015), 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 Enkhaim-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 (таблица 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, лаборатория генетики растений
<i>clv1</i> (K-205), <i>ap2-14</i> (K-217)	
<i>ap1-20</i> (I, 99) <i>er1</i> (II, 48) <i>gl1</i> (III, 46) <i>cer2</i> (IV, 52) - 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 агрикультура (ИГРА; Гатерслебен, Германия)
<i>ttg1</i> (V, 28) <i>yi1</i> (85) - mm5	

2.2. Методы исследования

Выращивание *A.thaliana* в асептической и почвенной культуре. Растения выращивались в смеси почвы и песка (2:1) 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). Состав среды Квитко содержал (на 1 л): KNO₃ - 0.1%, K₂HPO₄ - 0.015%, MgSO₄ × 7H₂O - 0.015%, FeSO₄ × 7H₂O - 0.007%, Ca(NO₃)₂ × 4H₂O - 0.05%, агар-агар - 0.8 - 1%, трилон Б (ЭДТА) - 1 мл 5% раствора. Раствор микроэлементов: H₃BO₃ - 0.30%, ZnSO₄ × 7H₂O - 0.20%, MnSO₄ × 7H₂O - 0.10%, CuSO₄ × 5H₂O - 0.006%, Na₂MoO₄ - 0.006%, Co(NO₃)₂ - 0.006%, KJ - 0.006%, NiCl₃ - 0.006%, AlCl₃ - 0.006% - 5 мл. FeSO₄ и добавляли непосредственно перед автоклавированием и стерилизацией среды в режиме 1А в течение 40 минут. Семена стерилизовали в смеси 70% спирта и перекиси водорода (3-5%) в течение 5 минут.

Морфометрический анализ. Измерения морфометрических параметров проводили у растений в возрасте 4-х и 8-ми недель. Квадратичное отклонение вычислялось по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / n - 1}$$

Средняя ошибка рассчитывалась по формуле (Лакин, 1990):

$$m = \sigma / \sqrt{n}$$

Для определения достоверности различий между средними значениями морфометрических показателей использовался критерий Стьюдента (Лакин, 1990):

$$t_d = (x_1 - x_2) / \sqrt{(m_1^2 + m_2^2)} \geq tst$$

где tst – стандартное значение критерия, при числе степеней свободы $K = n_1 + n_2 - 2$.

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 соответствии с положением в мутовке (I-IV).

Документирование материала. Съёмки растений осуществлялись посредством цифровой камеры Canon G9 (Япония) с использованием бинокюляра Stemі 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 выделялись на стадиях начала развития второго взрослого листа, перехода к цветению, раскрытия первых цветков и завершения цветения. Образцы фиксировались в 70% этаноле в течение 16 часов при 4°C. Затем образцы последовательно проводились через 80% этанол - 10 мин, 95% этанол 2 раза по 30 минут, после чего переносились в смесь 95%этанол/97% ацетон 1:1 на 30 минут, далее пробы инкубировались в 100% ацетоне в течение 2-х часов.

Материал сушился в критической точке (т.е. высушивался посредством возгонки жидкой фазы в газообразную, под высоким давлением и температуре), после чего прикреплялся к столикам и напылялся смесью палладия и платины в ионном напылителе ІВ-3 (Eiko, Япония) слоем 15 нм.

Генетическое картирование. Для локализации мутаций на генетической карте мутанты скрещивали с линиями, содержащими морфологические маркеры

(мутации, 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 . Критерий χ^2 раскладывался на компоненты (Серебровский, 1970), что позволяло определить причину несоответствия наблюдаемого расщепления теоретическому, которое может быть обусловлено как сцеплением между генами (χ^2_L), так и нарушением расщепления по отдельным генам (χ^2_A , χ^2_B). Частота рекомбинации между генами определялась с использованием методом произведений (Серебровский, 1970). При определении генетического расстояния по соотношению расщепляющихся и нерасщепляющихся семей F3 использовалась формула 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 нового поколения было проведено скрещивание мутантной линии *fas5* с линией дикого типа CS70000 расы Columbia, геном которой был секвенирован. Из F2 от данного скрещивания было отобрано 2 пула по 25 растений дикого типа и 25 мутантов *fas5*.

Анализ генных взаимодействий путём исследования фенотипа двойных мутантов. Для анализа взаимодействия предполагаемых генов *FAS5* и *NA* с генами, контролирующими различные аспекты развития растения, были получены двойные мутанты путём скрещивания линий *fas5* и *na-D* с линиями, несущими мутации в соответствующих генах. Анализировали фенотипы двойных мутантов (двойных гомозигот по мутациям, в случае двойного мутанта *fas5 na-D* в анализ включали и растения гомозиготные по *fas5* и гетерозиготные по *na-D*) F2 - F4 поколениях от скрещивания одиночных мутантов (родительских форм).

Так как мутанты *wus-1* и *na-D* стерильны в гомозиготном состоянии в скрещиваниях использовались растения, гетерозиготные по мутациям *wus-1* и *na-D*. В скрещиваниях мутантные растения *na-D* использовались в качестве отцовских, так как выщепление гетерозиготных растений *na-D* в F1 служит хорошим маркером успешности скрещиваний. Растения *fas5* обладают пониженной фертильностью пыльцы, что делает их неудобными при использовании в качестве

отцовских растений, поэтому в скрещиваниях растения *fas5* использовались в качестве материнских.

Мутант *clv3* содержит тесно сцепленную мутацию *er1*, таким образом, двойные мутанты *fas5 clv3* и *na-D clv3* являлись тройными мутантами. В связи с этим для адекватного сравнения использовались двойные мутанты *fas5 er1* и *na-D er1*. Линия *wus-1* свободная от мутации *er1*, была получена при помощи предварительного скрещивания с растениями дикого типа раса Dijon. Так как мутация *na-D* меняет экспрессивность и тип наследования в зависимости от генетического фона, при скрещивании линии *na-D* с другими линиями проводились возвратные скрещивания на линию *na-D* с целью нивелирования воздействия чужеродного генетического фона.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Плейотропный эффект мутации *fas5* и её проявление в онтогенезе

3.1.1 Изменение размеров и морфологии АМП мутанта *fas5*

Для мутанта *fas5* характерно изменение размеров и морфологии апикальной меристемы побега (АМП) относительно растений дикого типа (рис. 15). На стадии ранней розетки (стадия 2-х - 3-х развитых взрослых листьев) АМП растения *A.thaliana* дикого типа представляет собой небольшую округлую структуру (рис. 15 А). АМП мутанта *fas5* на той же стадии онтогенеза имеет большие размеры относительно дикого типа (рис. 15, Б).

Позднее при переходе к цветению АМП дикого типа сохраняет округлую форму, но несколько увеличивается в размерах относительно предыдущей стадии (рис. 15, В). При этом АМП мутанта *fas5* на стадии перехода к цветению продолжает увеличиваться в размерах относительно дикого типа и фрагментируется (рис. 15, Г), формируя в своём составе ряд частично слившихся "дочерних" меристем.

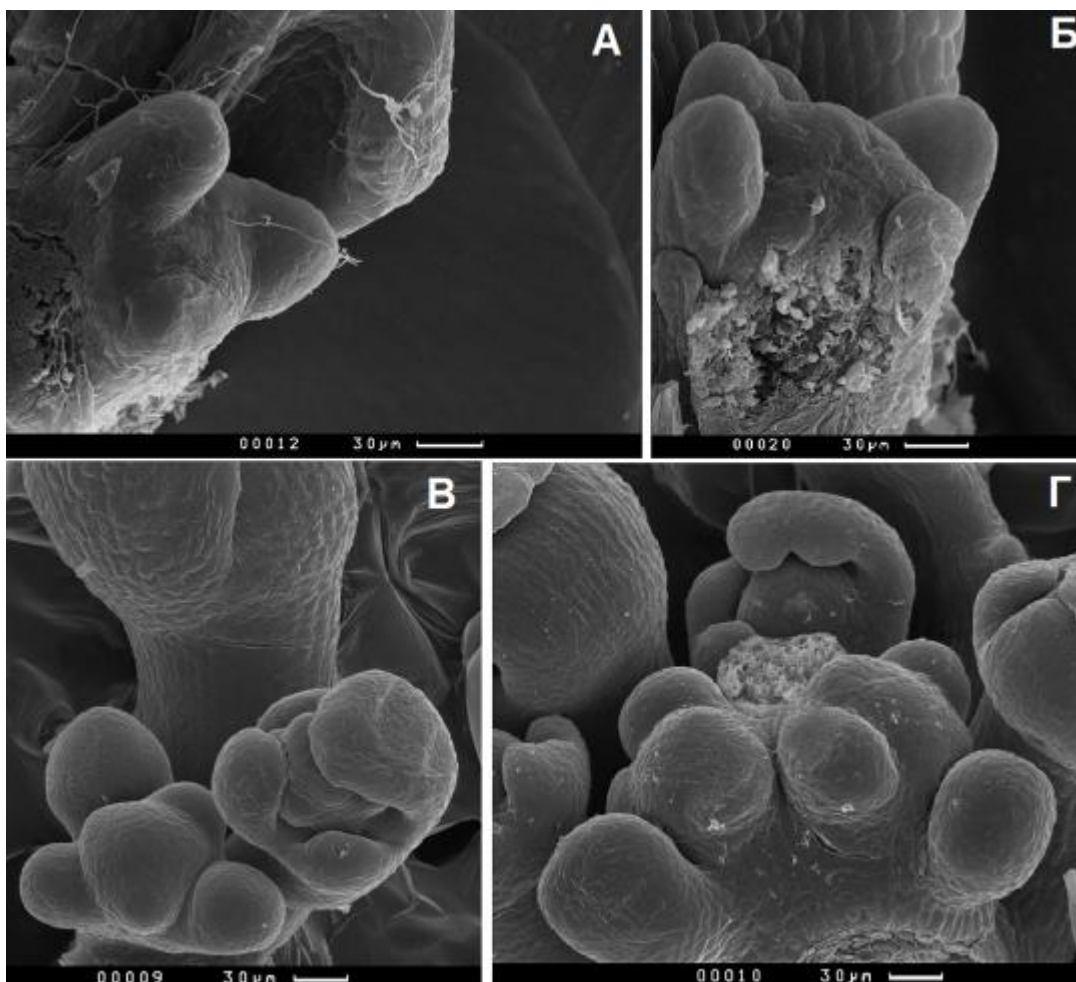


Рисунок 15. АМП растения дикого типа и мутанта *fas5* на стадии ранней розетки и перехода к цветению. На стадии ранней розетки (2 развитых взрослых листа): А - АМП растения дикого типа, Б - АМП мутанта *fas5*. На стадии перехода к цветению: В - АМП растения дикого типа, Г - АМП мутанта *fas5*. Бары соответствуют 30мкм.

В дальнейшем размеры АМП дикого типа изменяются слабо (рис. 16, А, Б). В то же время АМП *fas5* последовательно увеличиваются в ходе онтогенеза. АМП мутанта *fas5* демонстрирует последовательное увеличение при переходе от стадии начала цветения к стадиям раскрытия первых цветков и завершения цветения (рис. 16, В, Г). На стадии раскрытия первых цветков АМП *fas5* демонстрирует уже значительное увеличение размеров относительно АМП дикого типа (рис. 2, В), которое только усиливается к концу цветения (рис. 16, Г). В результате этого АМП мутанта *fas5* приобретает вид вытянутой в одной плоскости, сильно фрагментированной структуры. Таким образом, наибольшее увеличение размеров АМП *fas5* относительно АМП дикого типа наблюдается в ходе репродуктивной стадии развития и приводит к значимым различиям в количестве цветков, образуемых мутантом и диким типом (таблица 2).

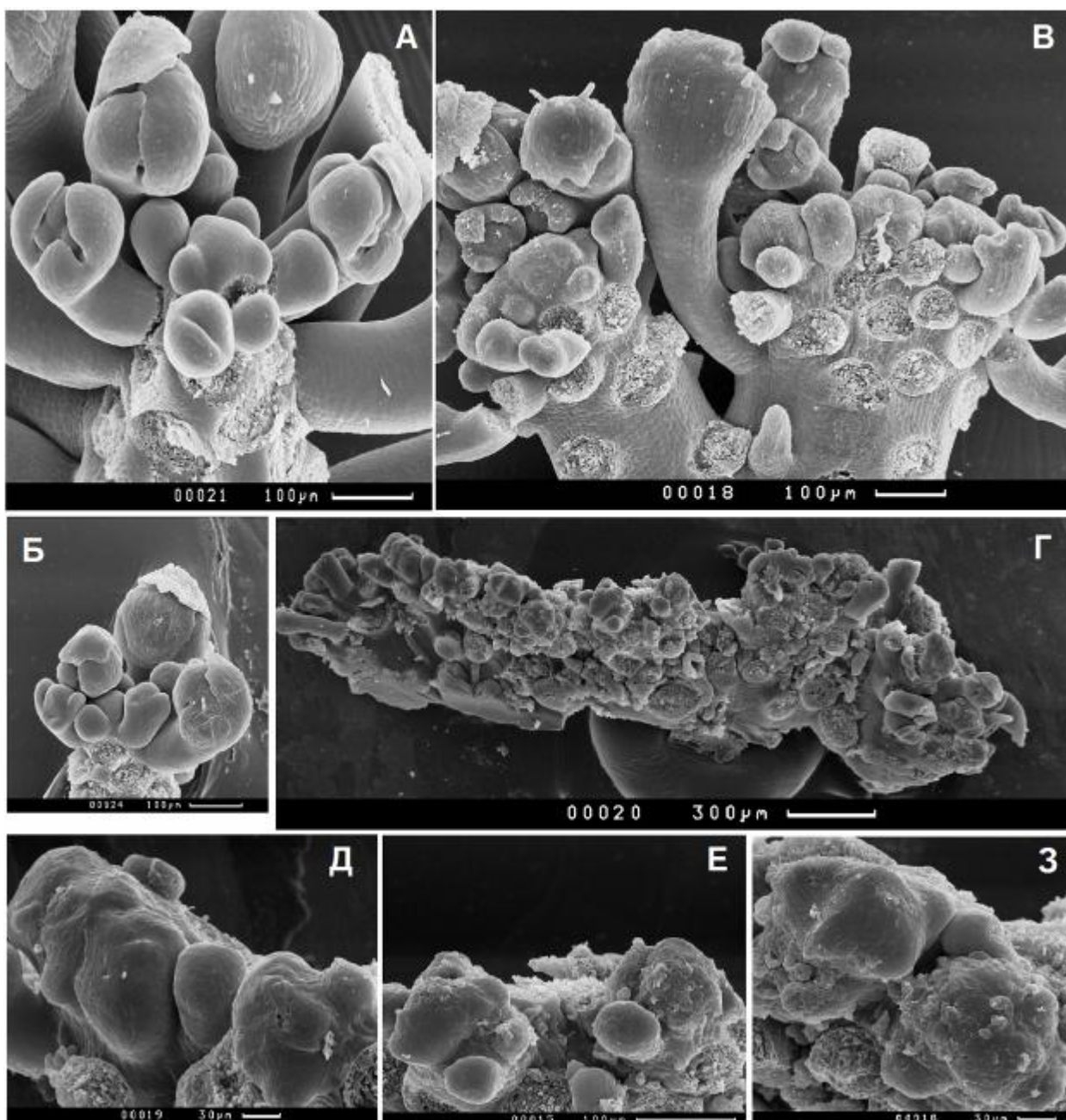


Рисунок 16. АМП мутанта *fas5* и дикого типа на стадиях раскрытия первых бутонов и завершения цветения. Стадия раскрытия первых бутонов: А - АМП дикого типа, Б - АМП мутанта *fas5*. Стадия завершения цветения: В - АМП дикого типа, Г - АМП мутанта *fas5*. Д-З – крупно фрагменты АМП мутанта *fas5* на стадии завершения цветения с дроблением на «дочерние» меристемы, звёздочками отмечены слившиеся меристемы. Бары соответствуют: А, Б, В, Е – 100мкм; Г – 300мкм; Д, З – 30 мкм.

Увеличение размеров АМП мутанта *fas5* в ходе онтогенеза происходит за счёт увеличения числа слившихся "дочерних" меристем. Так на стадии завершения цветения в составе АМП мутанта *fas5* образуется больше слитых меристем, чем на предыдущей наблюдаемой стадии онтогенеза, что коррелирует с общим увеличением размеров АМП (рис. 16, В, Г). АМП мутанта *fas5* склонна разделяться

по границам данных "дочерних" меристем на 2 или более независимых АМП (рис. 16, В). Стоит отметить, что образуемые в составе АМП мутанта *fas5* слившиеся "дочерние" меристемы по размерам сходны с АМП дикого типа (рис. 16, Д-3) и часто сходны с АМП дикого типа морфологически (рис. 16, А, Д-3). Часто можно наблюдать "дочерние" меристемы на разных стадиях разделения. Так "дочерние" меристемы могут составлять один массив, в котором границы между отдельными "дочерними" меристемами выражены относительно слабо (рис. 16, Д). Встречаются также полностью разделившиеся "дочерние" меристемы, которые начинают формировать собственные оси (рис. 16, Е, 3). Наиболее активное разделение "дочерних" меристем наблюдается на поздних стадиях онтогенеза, когда рост стебля сильно замедляется или приостанавливается.

Таблица 2. Количество цветков, образуемых растениями *fas5* и дикого типа

Линия	Количество развитых цветков*
Дикий тип	22,1±5,6
<i>fas5</i>	39,8±3**

* - учитываются все растения *fas5* вне зависимости от степени развития фасциации

** - среднее значение для *fas5* достоверно отличается от среднего значения для дикого типа при уровне значимости $P > 0,99$

Увеличение размеров АМП мутанта *fas5* может приводить к развитию широкого лентовидного стебля, состоящего из нескольких слившихся осей, с нарушенным филлотаксисом (приложение, рис. 1, А). Нарушение филлотаксиса выражается в образовании групп сильно сближенных узлов, которые разделены длинными междоузлиями и нарушением строгого спирального расположения органов стебля, наблюдаемого у дикого типа (приложение, рис. 1, А-В)

При этом степень развития фасциации не равномерна у всех растений *fas5*. Примерно 85-90% растений слабо фасцированы или не имеют фасциации (приложение, таблица 1, приложение, рис. 1, Б). Фасциация хорошо развита примерно у 10-15% растений. У сильно фасцированных растений *fas5* наблюдается подавление образования паракладиев (приложение, рис. 1, Б), которые нормально развиваются у растений *fas5* со слабой фасциацией или с отсутствием таковой (приложение, рис. 1, В). Показано, что доля мутантных растений, у которых развивается фасциация, не зависит от степени фасцированности родительского растения (приложение, таблица 1). В потомстве растения *fas5*, не имевшего

развитой фасциации стебля, выщеплялось лишь немного меньше растений с хорошо развитой фасциацией, чем в потомстве сильно фасциированного растения (приложение, таблица 1).

Стоит отметить, что АМП растений *fas5*, характеризующихся слабой фасциацией или её отсутствием, также фрагментирована на "дочерние" меристемы и увеличена в размерах относительно дикого типа, хотя и не так сильно, как АМП растений с хорошо развитой фасциацией (приложение, рис. 2).

Стебель мутантных растений *fas5* может аномально ветвиться без образования пазухи листа в результате расщепления стебля на несколько независимых осей (приложение, рис. 1, Г). Данному разделению стебля предшествует деление АМП (рис. 16, Б). Таким образом, АМП мутанта *fas5* фрагментируется и образует в своем составе ряд частично слившихся "дочерних" меристем. АМП мутанта *fas5* прогрессирует в размерах в ходе онтогенеза за счёт возникновения новых "дочерних" меристем. Такая морфология АМП часто приводит к развитию у *fas5* фасциации стебля, а также расщеплению стебля на независимые оси.

3.1.2. Формирование крупных клеток на поверхности АМП *fas5*

На поверхности АМП дикого типа присутствуют небольшие одинаковые по размерам клетки, формирующие ровную поверхность меристемы (рис. 17, А). На поверхности АМП мутанта *fas5* часто образуются крупные клетки, имеющие большие размеры, чем большинство окружающих их меристематических клеток, и выступающие над поверхностью АМП (рис. 17, Б-Г). Крупные клетки, возникающие на поверхности АМП *fas5*, могут располагаться как поодиночке, так и группами (рис. 17, Г). Такие клетки обычно имеют округлую форму и сильно выступают над поверхностью АМП. Морфология данных клеток делает их сходными с клетками, прекратившими деление и перешедшими к эндоредупликациям, что характерно для дифференцирующихся клеток (De Veylder et al., 2011). При возникновении большого числа крупных клеток на периферии меристемы, наблюдается полная или частичная приостановка закладки новых примордиев органов данной меристемой. Размер и количество крупных клеток на поверхности АМП *fas5* прогрессируют в ходе онтогенеза (рис. 17).

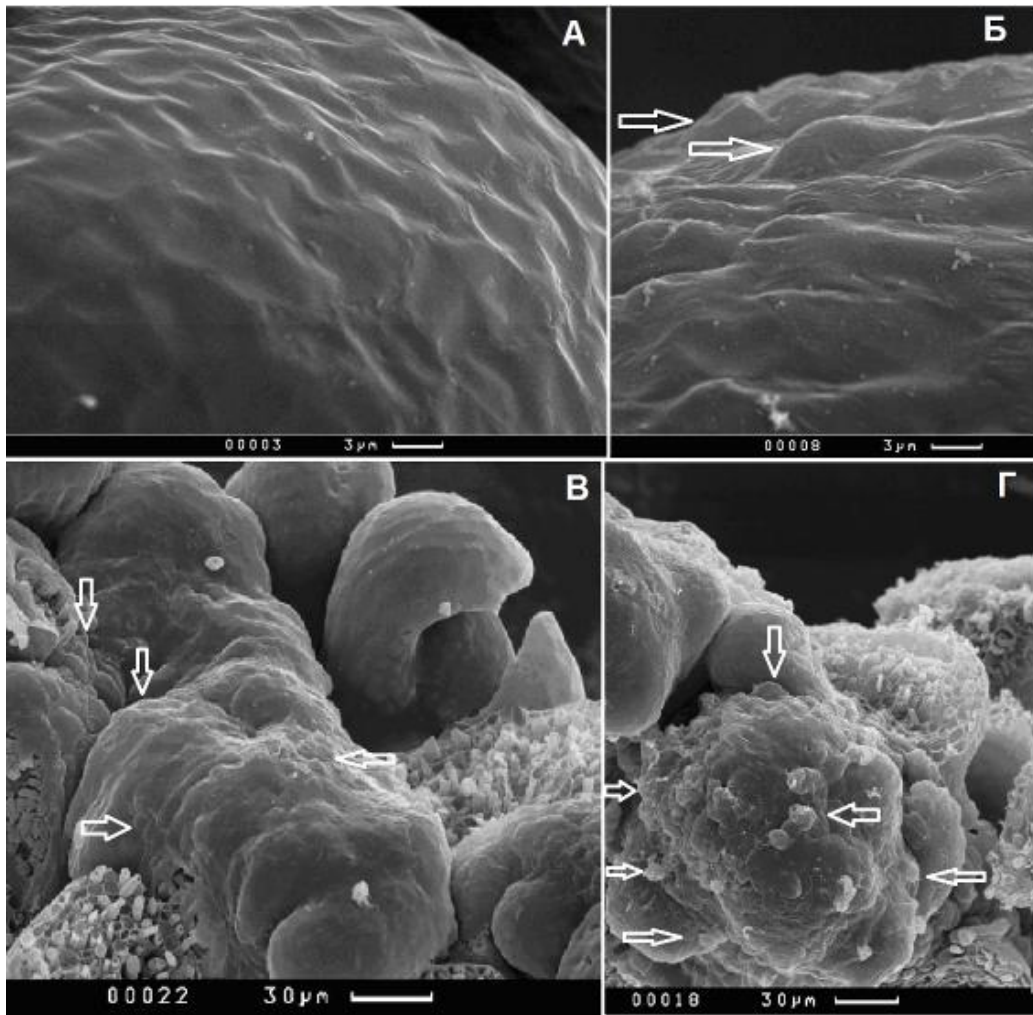


Рисунок 17. Крупные клетки на поверхности АМП *fas5*. А – АМП дикого типа. Б – АМП *fas5* на стадии ранней розетки. В- поверхность АМП *fas5* на стадии раскрытия первых цветков. Г - АМП растения *fas5* на стадии завершения цветения. Бары соответствуют: А, Б – 3мкм; В, Г – 30мкм.

Аномально крупные клетки также образуются на поверхности листовой пластинки мутанта *fas5*. Помимо этого на поверхности розеточных листьев *fas5* часто наблюдаются аномально разветвлённые трихомы, что свидетельствует о переходе клеток к эндоредупликациям. Возникновение крупных клеток на поверхности АМП мутанта *fas5* (а также крупных клеток и аномально ветвистых трихом на поверхности листьев) может свидетельствовать о нарушениях механизмов, регулирующих переход клеток к эндоциклу.

3.1.3. 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. 18).

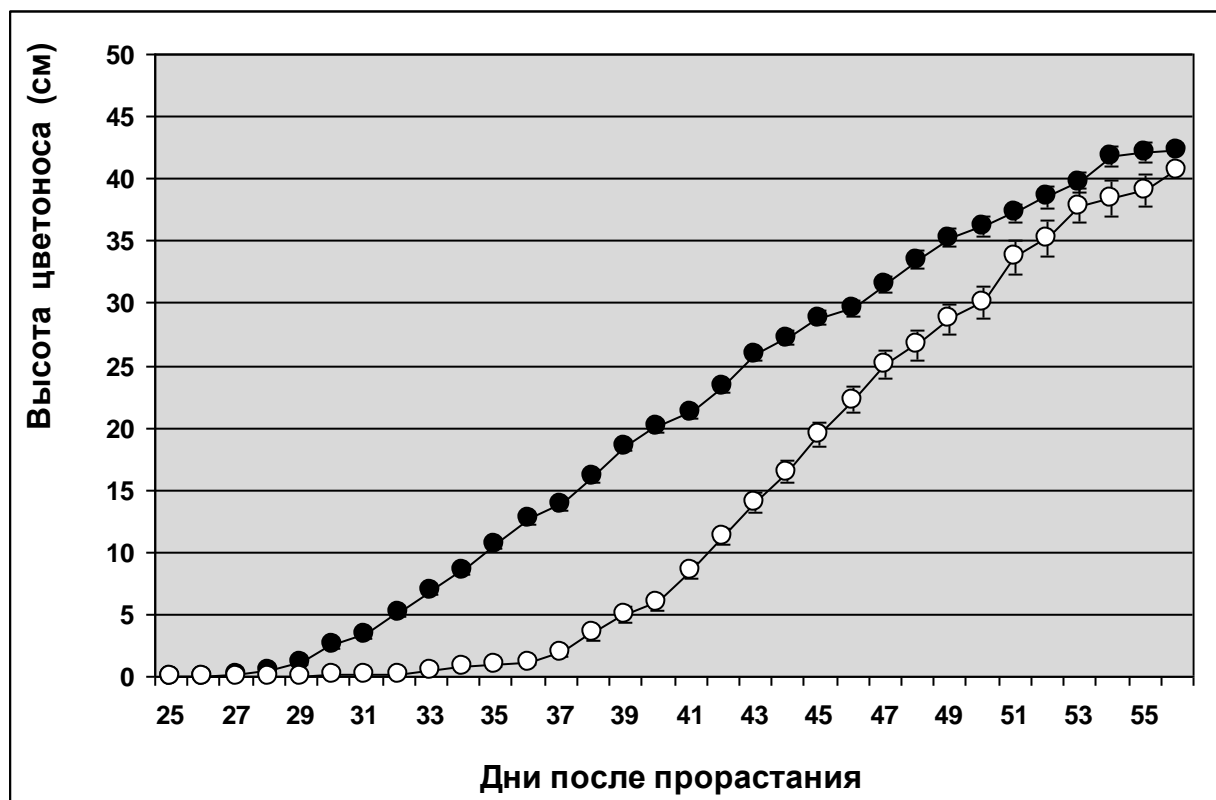


Рисунок 18. Динамика развития цветоноса мутанта *fas5* (черные кружки) и дикого типа (белые кружки).

Число листьев розетки у мутанта *fas5* ($4,7 \pm 0,6$) снижено относительно дикого типа ($8,2 \pm 0,7$) (приложение, таблица 2). 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 ($13,0 \pm 4,3$) (приложение, таблица 2). Также стоит отметить, что у растений *fas5*, с ярко выраженной фасциацией, наблюдалось уменьшение высоты цветоноса относительно растений *fas5* с неразвитой фасциацией побега (таблица 4). Причём наблюдаемое уменьшение роста растения происходило в основном за счёт сокращения длины генеративной части (приложение, таблица 2).

Как уже упоминалось выше, у растений *fas5* увеличивается количество цветков относительно растений дикого типа, при этом растения *fas5* с развитой фасциацией образуют больше цветков, чем растения *fas5* со слабой фасциацией или с её отсутствием (приложение, таблица 3).

Ускоренный выброс цветоноса, наблюдаемый у мутанта *fas5*, может являться следствием нарушения механизмов, регулирующих переход растения на репродуктивную стадию. Увеличение же количества цветков у мутанта *fas5* относительно дикого типа, скорее всего, является следствием увеличения размеров АМП, в результате чего она начинает закладывать большее количество примордиев.

3.1.4. Нарушение развития побега *fas5* в условиях короткого дня

При выращивании мутанта *fas5* в условиях короткого светового дня наблюдалась серьёзная задержка роста относительно растений дикого типа (рис. 19). Растения дикого типа, выращиваемые в условиях короткого дня, демонстрировали увеличение числа розеточных и стеблевых листьев относительно растений дикого типа, выращиваемых в условиях длинного дня, (рис. 19, А, таблица 3) при этом общая высота растений дикого типа достоверно не различалась в условиях короткого и длинного дня (таблица 3).

Таблица 3. Морфометрические данные розетки и цветоноса растений *fas5* и дикого типа, культивировавшихся в условиях короткого дня.

Линия	Розеточные листья	Стеблевые листья	Высота розетки	Высота цветоноса	Общая высота растения
Дикий тип	10,27±1,6	8,6±1,3	0,5±0,2	39,3±1,9	39,8±2,1
<i>fas5</i>	10,97±1,9	0	3,4±1,2**	1,6±0,5**	5,1±1,7**

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

Растения *fas5* демонстрировали сильное ветвление (рис. 19, А) на вегетативной стадии за счёт активации пазушных почек (рис. 19, В), число листьев розетки увеличивалось по сравнению с длинным световым днём (4,7±0,6 на длинном и 10,97±1,9 на коротком дне, таблица 3). Также происходило сильное растяжение

междоузлий розетки (рис. 19, Б, Г), что не наблюдалось в данных условиях у растений дикого типа (рис. 19, Б).



Рисунок 19. Растения *fas5* и растения дикого типа, выращиваемые в условиях короткого дня. А – взрослые растения *fas5* (слева) и дикий тип (справа). Б – Г – вытянутые междоузлия и активные пазушные почки розетки молодого растения *fas5*, активные пазушные почки отмечены стрелками. Д - молодые растения мутанта *fas5* (слева) и дикого типа (справа), стрелками отмечены растянутые междоузлия розетки растений *fas5*.

Растения дикого типа в условиях короткого дня выбрасывали цветонос с существенной задержкой относительно длинного дня: на 50-й – 55-й день после прорастания. При этом ~ 95% растений *fas5*, культивированных в условиях короткого светового дня, вообще не образовывали цветоноса, прекращая рост на стадии розетки. Лишь около 5% растений *fas5* в условиях короткого дня могли выбрасывать цветонос на 65-й – 68-й день после прорастания.

Средняя высота цветоноса, выбрасываемого растениями *fas5* в условиях короткого дня, не превышала 1-2 см, на таком укороченном цветоносе образовывалось не более 1-2 цветков (таблица 3, приложение, рис. 3, А), морфологически идентичных базальным цветкам *fas5*, развивающимся в условиях длинного дня (приложение, рис. 3, Б).

На верхушке такого цветоноса часто развивалась структура, сходная с терминальным цветком (приложение, рис. 3, В, Г).

Наблюдаемые нарушения развития растений *fas5* в условиях короткого светового дня служат свидетельством нарушений у мутанта *fas5* механизмов, регулирующих ответ организма растения на световые стимулы, в том числе продолжительность фотопериода.

3.1.5. Зависимость степени нарушения числа и типа органов от яруса цветка у мутанта *fas5*

В ранних работах было описано развитие у мутанта *fas5* морфологических нарушений цветка, а именно изменение числа органов и возникновение химерных карпеллоидных органов (Кавай-оол, 2011). Нами была выявлена новая особенность цветков мутанта *fas5*, а именно зависимость степени нарушений типа и числа органов от расположения цветка в соцветии. В то время как число и тип органа у растений дикого типа остаётся неизменным (рис. 20, А-В), у мутанта *fas5* прослеживается тенденция к усилению нарушений от базальной к апикальной частям цветоноса (рис. 20, Г-Е). При этом во 2-й – 3-й мутовках число органов у мутанта *fas5* снижено относительно дикого типа (рис. 20, А-В, Г-Е; приложение таблица 4), в то время как в 4-й мутовке у *fas5* наблюдается увеличение числа органов относительно растений дикого типа (приложение, таблица 4).

Число органов 2-й и 3-й мутовки цветка (лепестки и тычинки) мутанта *fas5* снижается в направлении от базальных цветков к апикальным. В 4-й мутовке (плодолистики) число органов остаётся неизменным у базальных и апикальных цветков, хотя наблюдается явное изменение морфологии – плодолистики становятся крупнее и часто приобретают изогнутую форму (рис. 20, Г-Е).

Доля аномальных органов во 2-й мутовке (узкие и/или филаментозные лепестки) у *fas5* последовательно увеличивается от базальных цветков к апикальным, в то время как в 1-й (карпеллоидные чашелистики), 3-й (карпеллоидные тычинки) и 4-й (несросшиеся плодолистики аномальной формы) мутовках наблюдалось некоторое увеличение доли аномальных органов у средних цветков относительно базальных и дальнейшее её падение у апикальных цветков (приложение, таблица 4).

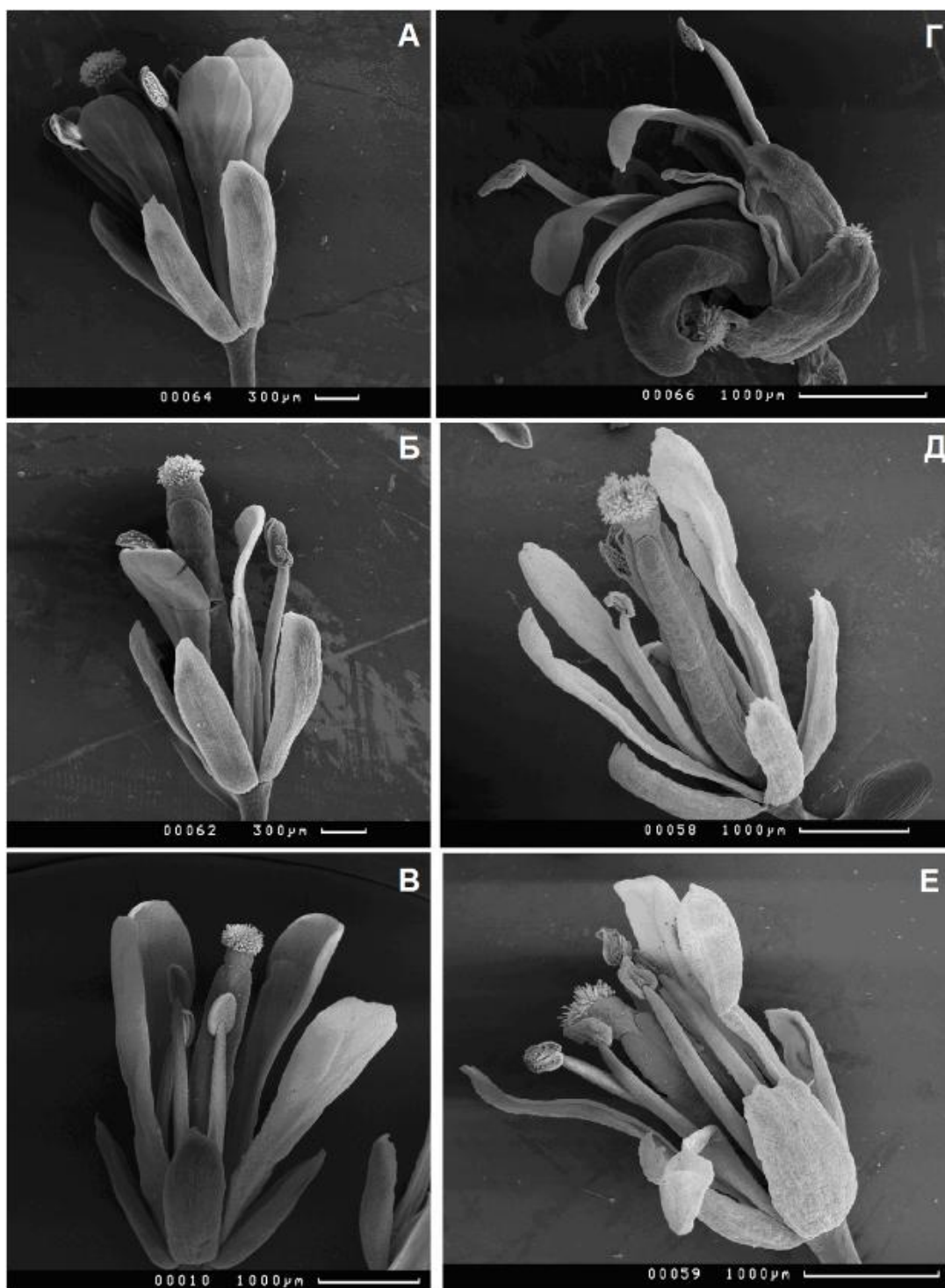


Рисунок 20. Цветки мутанта *fas5* и дикого типа, принадлежащие к разным ярусам соцветия. А, Б, В – соответственно апикальный, средний и базальный цветки дикого типа. Г, Д, Е – соответственно цветки мутанта *fas5*. Бары соответствуют: А, Б – 300мкм, В-Д – 1000мкм.

В ранних работах также было показано, что мутантная линия *fas5* характеризуется снижением продуктивности – только 40% стручков, развивающихся на цветоносе растений *fas5* способны образовывать семена (Кавай-оол, 2011). Данный феномен может быть обусловлен тем, что стручки, образуемые

апикальными цветками, имеют аномальную форму (приложение, рис. 4) из-за морфологических нарушений органов цветка, которые усиливаются к апексу соцветия. Также показано, что базальные стручки растений *fas5*, имеющие нормальную морфологию, но меньшие размеры, чем базальные стручки дикого типа (приложение, рис. 4) образуют значительно меньшее число семян. Если базальные стручки растений дикого типа (1-5-й стручки) образуют в среднем $72 \pm 8,4$ семян, то базальные стручки мутантных растений *fas5* способны образовать только $19,4 \pm 9,7$ семян. Это может свидетельствовать о том, что ген *FAS5* также участвует в регуляции генов, ответственных за развитие семязачатков и/или созревание семян.

Таким образом, у мутанта *fas5* наблюдается явная тенденция к усилению морфологических нарушений цветка от базальной части соцветия к апикальной. В том числе, усиливаются морфологические нарушения плодолистиков, что, очевидно, вызывает наблюдаемое прогрессирующее нарушение морфологии стручков в направлении от базальных к апикальным, что в свою очередь может являться основной причиной наблюдаемого снижения продуктивности мутанта *fas5*.

3.1.6. Развитие очагов эктопической пролиферации на поверхности мутанта *fas5*

Для мутации *fas5* характерно развитие очагов эктопической пролиферации на поверхности стебля (рис. 21, А-Д, рис. 22, А, Б). Наибольшая концентрация очагов эктопической пролиферации наблюдается в верхней части стебля мутанта *fas5*, непосредственно прилегающей к АМП (рис. 21, В). В результате эктопической пролиферации клеток на стебле развиваются выросты различной морфологии. На поверхности междоузлий, на протяжении всего стебля образуются выросты, напоминающие зачатки осевых структур (рис. 21, А, Б). Данные выросты могут давать боковые выросты существенной длины, сходные с примордиями боковых органов (рис. 21, Б), которые при этом дальше не развиваются. Структуры данного типа преимущественно возникают на поверхности междоузлий вегетативной части цветоноса растений *fas5*.

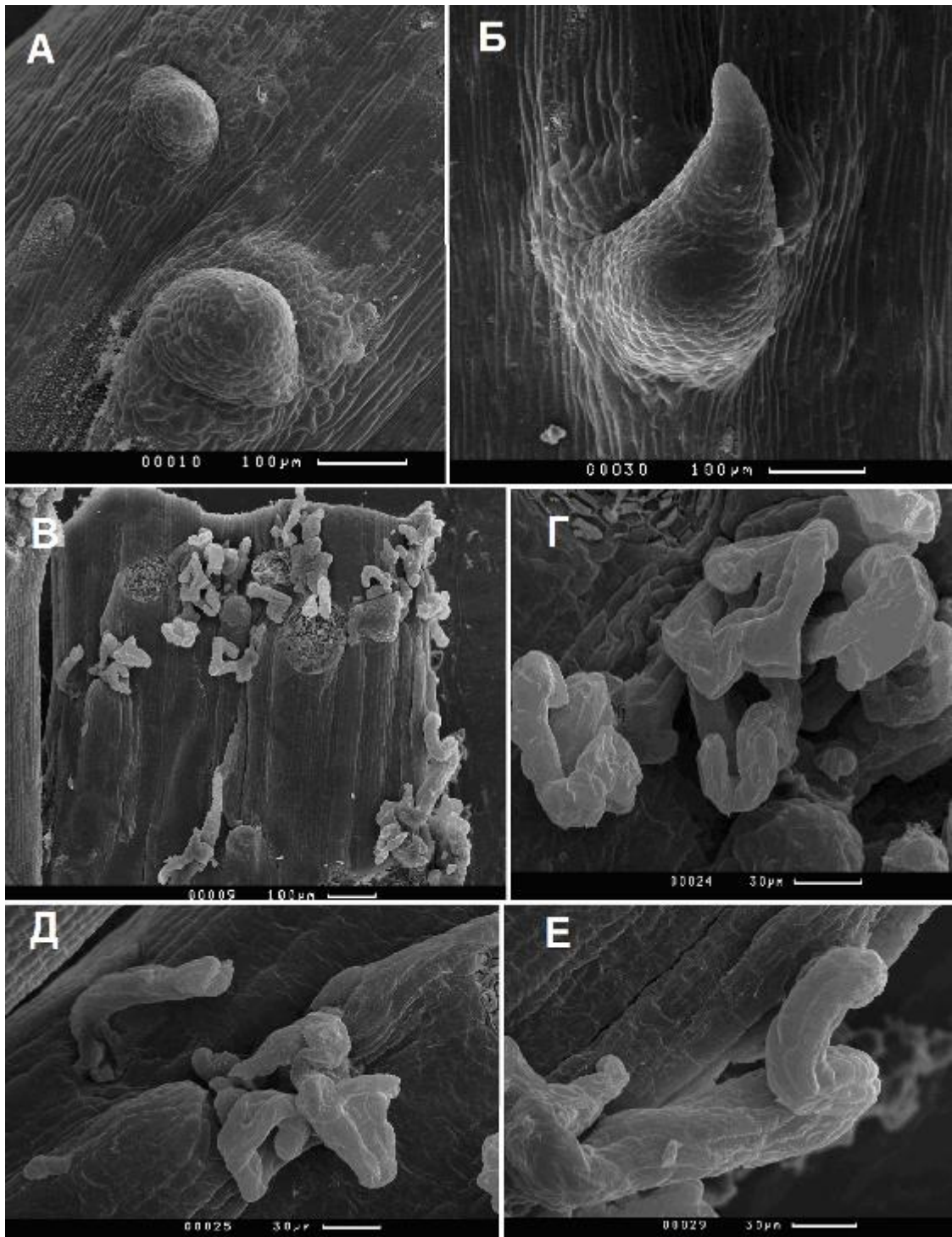


Рисунок 21. Очаги эктопической пролиферации различной морфологии на поверхности стебля мутанта *fas5*. А, Б – осевые структуры, возникающие преимущественно на поверхности междоузлий. В – скопление очагов пролиферации в области прилегающей к АМП. Г, Д, Е – очаги эктопической пролиферации, имеющие морфологию тяжей anomalно крупных клеток. Бары соответствуют: А-В – 100мкм, Г-Е – 3-мкм.

Очаги пролиферации, возникающие в непосредственной близости от АМП, в основном представляют собой структуры (клеточные тяжи), состоящие из anomalно крупных клеток, морфологически сходные с рыльцевой тканью (рис. 21,

Г, Д, Е). Данные образования возникают группами у основания флоральных примордиев. На остальной поверхности стебля эктопические структуры подобной морфологии не встречаются.

Также часто формируются структуры, морфологически сходные с семяпочками (рис. 22, А, Б). Внешне эти образования сходны с осевыми структурами, возникающими в вегетативной части стебля (рис. 21, А, Б), но обычно имеют большую длину (рис. 22, А) и сильнее приподнимаются над поверхностью стебля. На поверхности данных образований могут развиваться несколько вторичных структур, морфологически схожих с семяпочками (рис. 22, Б). Развитие подобных структур наблюдается преимущественно на поверхности генеративной части цветоноса.

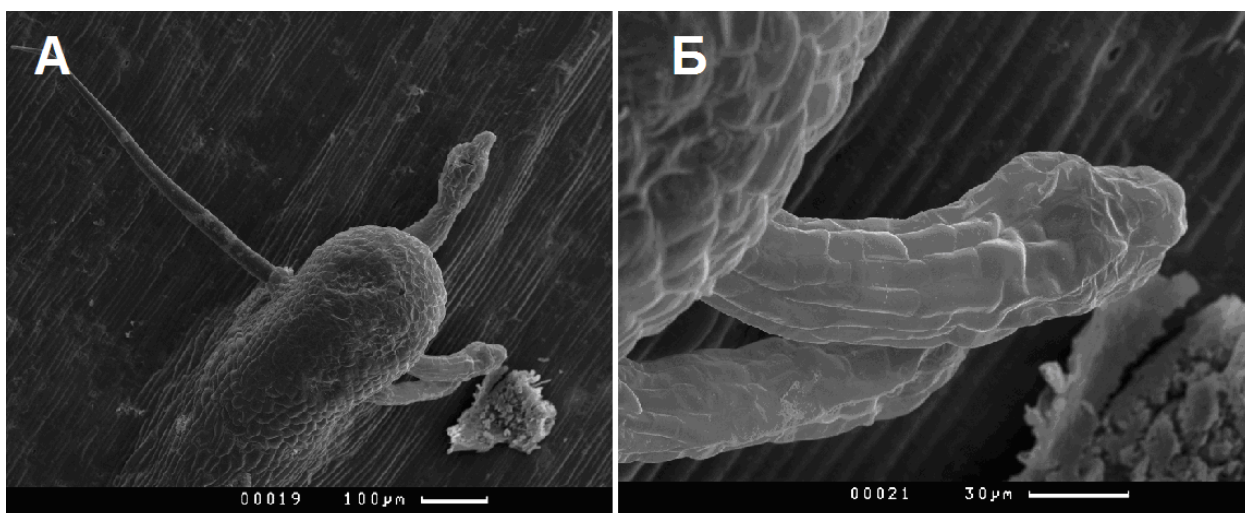


Рисунок 22. Эктопические структуры на стебле *fas5*, сходные с семяпочками. А – очаг эктопической пролиферации на стебле мутанта *fas5* сходный с почкой. Б – развивающиеся на его поверхности структуры, напоминающие семяпочки. Бары соответствуют: А – 100мкм, Б – 30мкм.

Возникновение подобных осевых структур на поверхности стебля мутанта *fas5* может являться следствием эктопической экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток или за образование пула СК (гены *WUS* и *CLV3*). Развитие же структур, сходных с рыльцевой тканью или семяпочками, особенно в генеративной части цветоноса, может свидетельствовать о наличии у *fas5* эктопической экспрессии генов, обеспечивающих развитие генеративных органов растения.

3.2. 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 линиями *clv 1*, *clv2-1*, *clv3-2* и *wus-1*.

3.2.1. Взаимодействие гена *FAS5* с генами *CLV1*, *CLV 2*, *CLV 3*

Гибриды поколения F1 от скрещивания линии *fas5* с линиями *clv1*, *clv2-1*, *clv3-2* и *er1* фенотипически не отличались от дикого типа. В поколении F2 наблюдалось расщепление, характерное для моногенных несцепленных мутаций (таблица 4). Различий в реципрокных скрещиваниях не наблюдалось.

Таблица 4. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещиваний *fas5* с линиями *clv1,2,3* и *er1*.

Линия	Фенотипические классы F2				Σ выборки	χ^2 (9: 3: 3: 1)			D(cM)
	A- B-	A- bb	aa B-	aa bb		A	B	L	
<i>clv1</i>	141	41	51	11	244	0,09	1,4	0,73	-
<i>clv2-1</i>	144	47	54	18	263	0,8	0,01	0,004	-
<i>er1</i>	161	47	58	14	270	0,08	1,6	0,32	-
<i>clv3-2</i>	150	43	51	12	256	0,02	1,69	0,39	-

$\chi^2_{\text{табл}} = 3,84$ при уровне значимости $\lambda = 0,05$ и степени свободы $df = 1$
 А – ген *FAS5*, В – гены *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* и *ER1*

Особенности фенотипа двойных мутантов *fas5 clv*. Для двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1*, *fas5 clv3-2* и *fas5 er1* были характерны нарушение филлотаксиса и изменение морфологии розеточных листьев, развитие фасциации наблюдалось только у двойных мутантов *fas5 clv2-1*, *fas5 clv3-2* и *fas5 er1* и отсутствовало у двойного мутанта *fas5 clv1*. Количество розеточных листьев двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1*, *fas5 clv3-2* и *fas5 er1* не отличалось от такового у одиночного мутанта *fas5* (таблица 5, таблица 6). Тем не менее, у двойных мутантов *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* наблюдалось сильное увеличение числа стеблевых листьев в сравнении с одиночными мутантами (таблица 5), что может объясняться развитием у данных линий мощной фасциации стебля. Двойной

мутант *fas5 clv1* по высоте побега не отличался от одиночных мутантов *fas5* и *clv1* (таблица 5).

Таблица 5. Морфометрический анализ одиночных мутантов *fas5*, *clv1*, *clv2-1* и двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1*

Признак	<i>fas5</i>	<i>clv1</i>	<i>fas5 clv1</i>	<i>clv2-1</i>	<i>fas5 clv2-1</i>
Розеточный лист	4,3±0,2*	8,1±2,03	4,2±0,5*	8,4±2,24	4,14±0,36*
Стеблевой лист	5,4±0,21	4,1±0,8	5,6±0,4	4,3±0,29	13,4±2,7**
Вегетативная часть	20,2±1,8	19,3±2,1	18,6±1,9	18,7±2,8	12,75±0,8**
Генеративная часть	21,1±1,1	19,7±1,6	20,1±2,2	20,1±1,8	4,38±1,3**
Общая высота	41,3±2,89	39,1±3,2	38,7±3,4	38,8±2,9	17,08±0,6**

* - значения для *fas5*, *fas5 clv1* и *fas5 clv2-1* отличаются от значений для *clv1* и *clv2-1* при уровне значимости $P > 0,95$

** - значения для *fas5 clv2-1* отличаются от значений для остальных представленных линий при уровне значимости $P > 0,99$

Таблица 6. Морфометрический анализ двойных мутантов *fas5 er1* и *fas5 clv3-2*, и одиночного мутанта *clv3-2*.

Признак	<i>fas5 er1</i>	<i>clv3-2 er1</i>	<i>fas5 clv3-2 er1</i>
Розеточный лист	4,5±0,7*	8,9±2,2	4,2±0,25*
Стеблевой лист	6,5±2,3	4,4±0,28	15,6±2,18**
Вегетативная часть	8,42±0,74*	11,8±1,5	12,4±1,92
Генеративная часть	3,9±0,3**	13,17±0,7	2,8±0,46**
Общая высота	12,25±1,9**	23,7±1,82	15,1±1,5**

* - значения для *fas5 er1* и/или *fas5 clv3-2* отличаются от значений для *clv3-2* при уровне значимости $P > 0,95$

** - значения для *fas5 er1* и/или *fas5 clv3-2* отличаются от значений для *clv3-2* при уровне значимости $P > 0,99$

В то время, как для двойных мутантов *fas5 clv2-1*, *fas5 er1* и *fas5 clv3-2* характерно заметное уменьшение высоты растения относительно одиночных мутантов *fas5*, *er1*, *clv2-1* и *clv3-2* (таблица 5, таблица 6), за счёт сокращения высоты генеративной части цветоноса.

Высота двойного мутанта *fas5 er1* не отличается от таковой у двойного мутанта *fas5 clv3-2*. Это может свидетельствовать, что серьёзное уменьшение роста у двойного мутанта *fas5 clv3-2* может быть в значительной степени обусловлено присутствием мутации *er1*.

АМП двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1*, *fas5 er1* и *fas5 clv3-2* демонстрировали увеличение размеров относительно родительских форм, а также морфологические феномены, характерные для АМП *fas5*.

Если АМП одиночного мутанта *clv 1* увеличена относительно дикого типа и представляет собой единую структуру (рис. 23, А), то АМП двойного мутанта *fas5 clv 1* демонстрирует значительное увеличение размеров относительно обеих родительских форм (рис. 23, Б), а также склонна к дроблению на отдельные «дочерние» АМП, что наблюдается у одиночного мутанта *fas5*.

АМП одиночного мутанта *clv2-1* имеет вытянутую валикообразную форму и является единой структурой (рис. 23, В). АМП двойного мутанта *fas5 clv2-1* имеет более крупные размеры, чем обе родительские формы (рис. 23, Г), при этом увеличивается относительно родительских линий значительно больше, чем АМП линии *fas5 clv 1*. АМП двойного мутанта *fas5 clv2-1* также образует в своём составе частично слившиеся «дочерние» меристемы и склонна к дроблению на независимые оси (рис. 23, Г), как и АМП одиночного мутанта *fas5*.

Частично слившиеся «дочерние» меристемы, образующиеся в составе АМП двойных мутантов *fas5 clv 1* и *fas5 clv2-1*, (рис. 23, Д, Е) по размерам и морфологии сходны с АМП одиночных мутантов соответственно *clv 1* и *clv2-1*.

Особенности структуры АМП двойных мутантов *fas5 clv*. АМП двойного мутанта *fas5 er1* не отличается по своим размерам и морфологии от АМП одиночного мутанта *fas5*, демонстрируя разрастание в одной плоскости, формирование в своём составе «дочерних» меристем и разделение на независимые оси (рис. 24, А, Б). АМП одиночного мутанта *clv3-2* является вытянутой валикообразной структурой, имеющей наибольшие размеры, среди остальных мутантных линий *clv* (рис. 24, В). АМП двойного мутанта *fas5 clv3-2* сильно увеличивается относительно обеих родительских форм и имеет наибольшие размеры среди двойных мутантов *fas5 clv* (рис. 24, Г, Д). Если АМП двойных мутантов *fas5 clv 1* и *fas5 clv2-1* разрастаются преимущественно в одной плоскости (рис. 24, Б, Г), то АМП двойного мутанта *fas5 clv3-2* способна разрастаться в нескольких плоскостях, формируя сложные структуры (рис. 24, Г, Д).

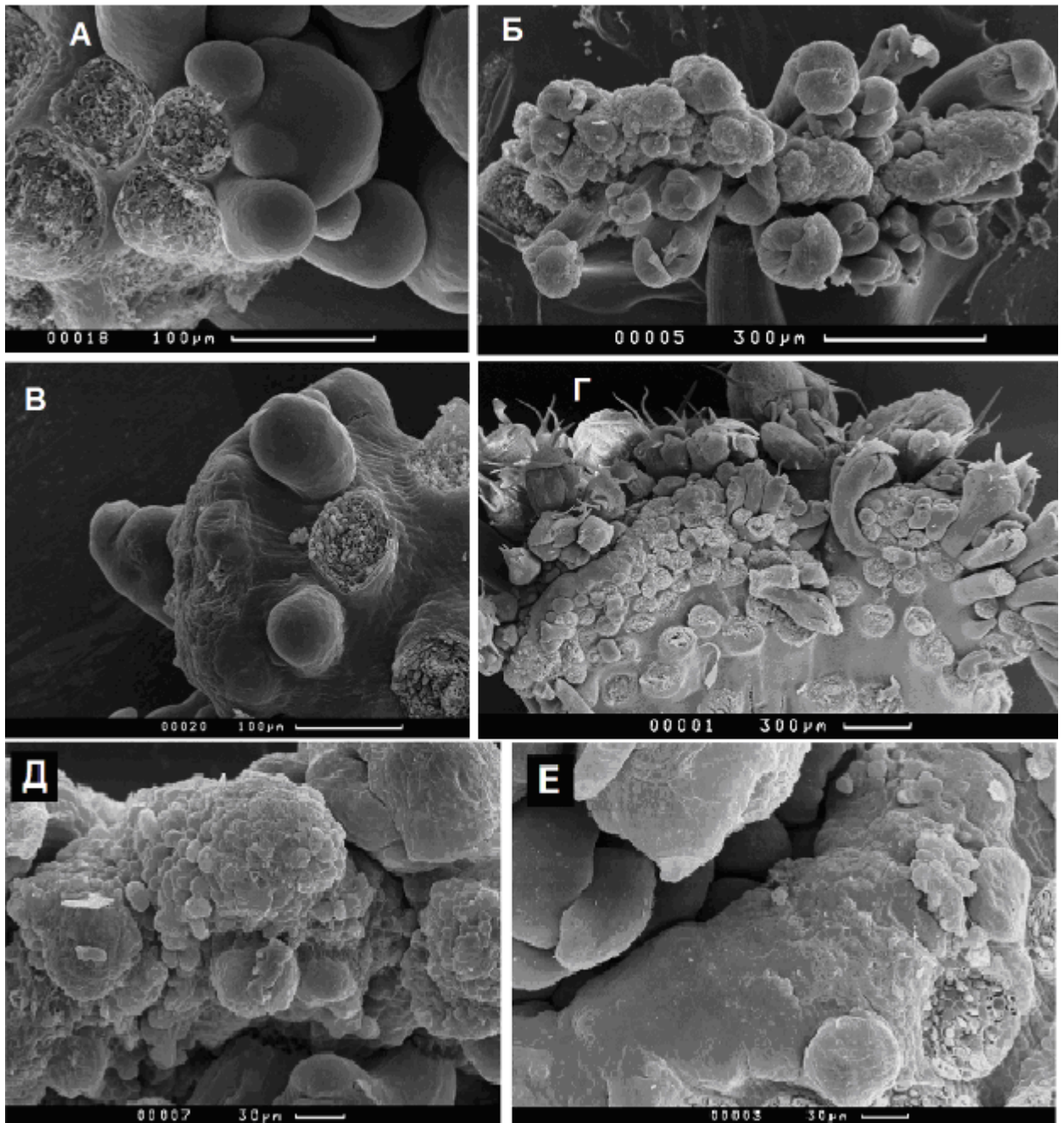


Рисунок 23. АМП двойных мутантов *fas5 clv1* и *fas5 clv2-1*. А – АМП одиночного мутанта *clv1*. Б – АМП двойного мутанта *fas5 clv1*. В – АМП одиночного мутанта *clv2-1*. Г – АМП *fas5 clv2-1*. Д - «дочерние» меристемы в составе АМП *fas5 clv1* (отмечены звёздочками), Е – «дочерняя» меристема в составе АМП *fas5 clv2-1* морфологически сходные с АМП одиночных мутантов соответственно *clv1* и *clv2-1*. Бары соответствуют: А, В – 100 мкм; Б, Г – 300 мкм; Д, Е – 30 мкм.

Подобно АМП двойных мутантов *fas5 clv 1* и *fas5 clv2-1* АМП двойного мутанта *fas5 clv3-2* не является единой структурой и образует в своём составе ряд слившихся «дочерних» меристем, которые в отдельности по размерам и морфологии схожи с АМП одиночного мутанта *clv3-2* (рис. 24, Е).

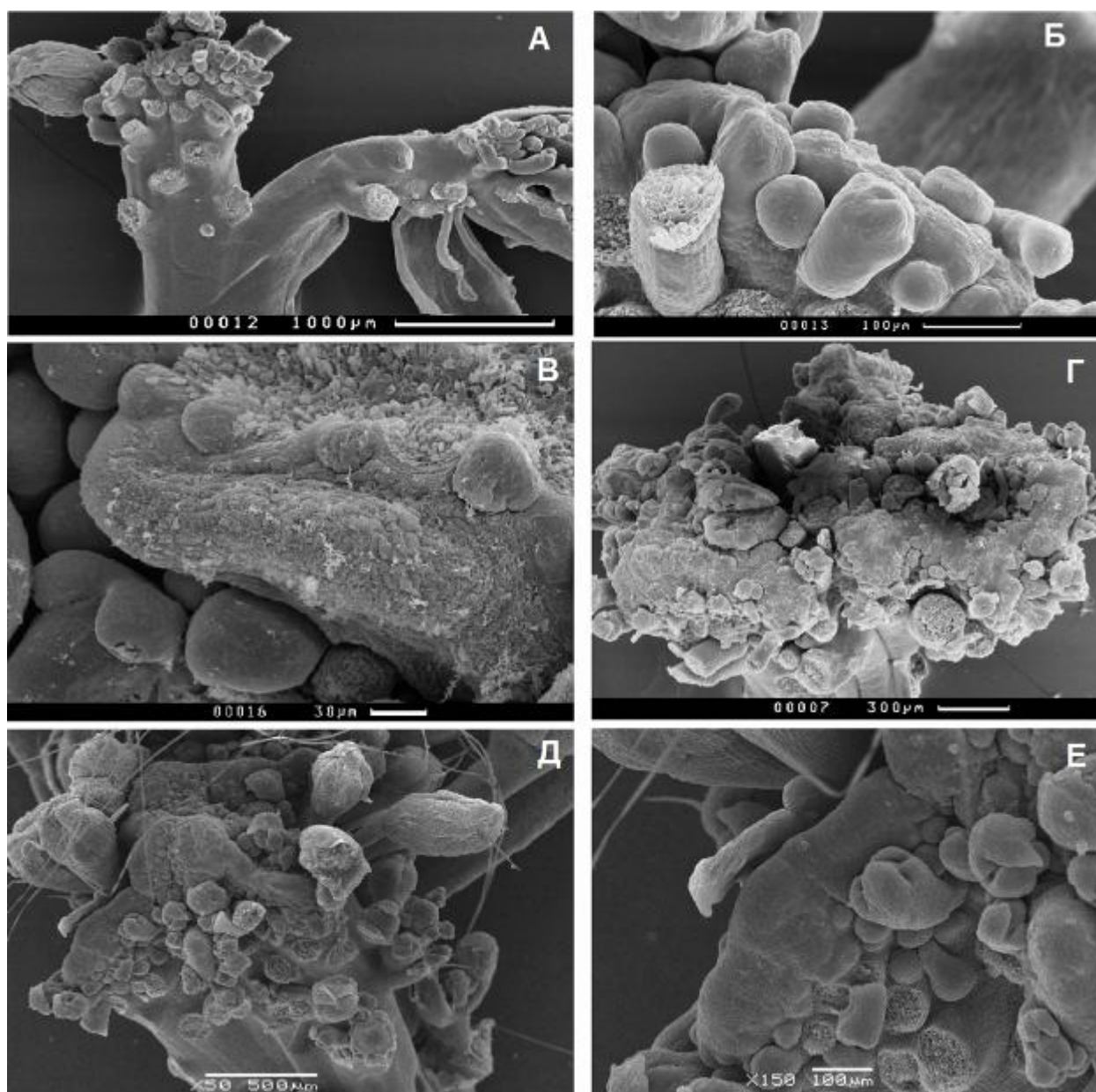


Рисунок 24. АМП двойных мутантов *fas5 er1* и *fas5 clv3-2*. А, Б – АМП двойного мутанта *fas5 er1*. В – АМП одиночного мутанта *clv3-2*. Г, Д - АМП двойного мутанта *fas5 clv3-2*. Е – одна из «дочерних» меристема *fas5 clv3-2* имеющая морфологию, сходную с АМП одиночного мутанта *clv3-2* (В). Бары соответствуют: А – 1000 мкм; Б, Е – 100 мкм, В – 30 мкм, Г – 300 мкм, Д – 500 мкм.

На поверхности АМП двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* также образовывались крупные клетки, морфологически схожие с клетками, прекратившими деление и перешедшими к эндоредупликациям, наблюдаемые у одиночного мутанта *fas5* (приложение, рис. 5). На стадии начала цветения крупные клетки на поверхности АМП двойных мутантов *fas5 clv* были относительно немногочисленны (приложение, рис. 5, А-В). Особенно обильным образование этих клеток становилось на поздних стадиях цветения (приложение, рис. 5, Г-Е).

Наибольшее число крупных клеток наблюдалось на поверхности АМП *fas5 clv3-2*. Прекращение роста большинства растений *fas5 clv3-2* и *fas5 clv2-1*, когда они достигали высоты около 16см, может свидетельствовать о прекращении пролиферации клеток АМП в результате потери ими недетерминированного состояния.

Таким образом, двойные мутанты *fas5 clv* демонстрируют ряд черт, характерных для одиночного мутанта *fas5*: увеличение размеров АМП и её фрагментация, возникновение крупных клеток на её поверхности, что объясняет наблюдаемые нарушения развития надземной части у данных растений. В то же время отдельные «дочерние» меристемы в составе АМП двойных мутантов *fas5 clv* приобретают морфологию характерную для АМП одиночных мутантов *clv*, что свидетельствует о существовании в каждой «дочерней» меристеме независимой системы регуляции *WUS-CLV*. Это говорит о том, что гены *FAS5* и *CLV* действуют по независимым путям.

3.2.2. 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 (таблица 7).

Таблица 7. Анализ расщепления в поколении F3 от скрещивания *fas5* × *wus-1* (гетерозигота).

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*

Особенности фенотипа двойного мутанта *fas5 wus-1*. Растения двойного мутанта *fas5 wus-1* уже на стадии молодой розетки демонстрировали замедленное развитие по сравнению с одиночным мутантом *fas5* (рис. 25, А). На более поздних стадиях двойной мутант *fas5 wus-1* демонстрирует ряд фенотипических черт, характерных для одиночного мутанта *wus-1*: раннее прекращение роста,

формирование листовых пластинок аномальной морфологии, стерильность (рис. 25, Б, В). Тем не менее, для двойного мутанта *fas5 wus-1* характерно ужесточение фенотипа *Wus*. Розетка взрослых растений двойного мутанта *fas5 wus-1* (рис. 25, Б) имеет меньшие размеры по сравнению с одиночным *wus-1* (рис. 25, В), размер листовых пластинок также меньше, чем у одиночного *wus-1* (рис. 25, В).

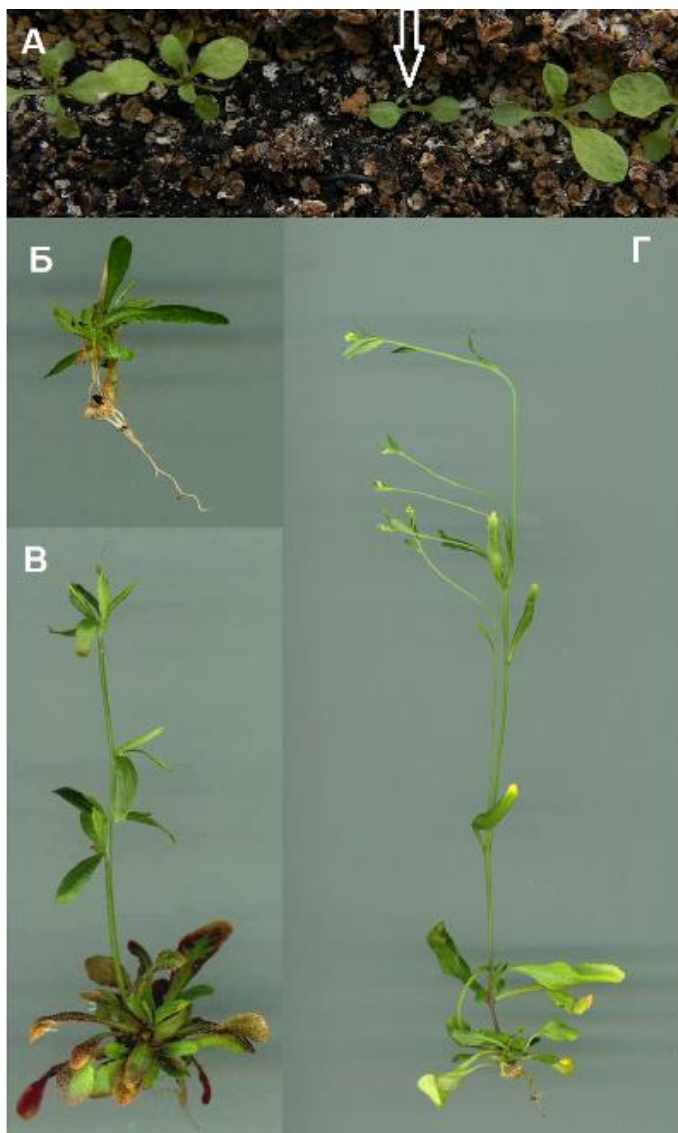


Рисунок 25. Фенотип двойного мутанта *fas5 wus-1*. А - двойной мутант *fas5 wus-1* (отмечен стрелкой) и растения одиночного мутанта *fas5* на стадии молодой розетки. Б - двойной мутант *fas5 wus-1*. В - одиночный мутант *wus-1*. Г - одиночный мутант *fas5*.

Хотя одиночный мутант *wus-1* не способен поддерживать клетки АМП в недетерминированном состоянии, что приводит к преждевременному исчерпанию АМП и прекращению роста на стадии розетки (Laux et al., 1996), мутант *wus-1* способен в некоторых случаях образовывать недоразвитый цветонос (рис. 25, В). Двойной мутант *fas5 wus-1* вообще не образует цветоноса (рис. 25, Б).

Особенности структуры АМП двойного мутанта *fas5 wus-1*. АМП одиночного мутанта *wus-1* представляет собой небольшую плоскую структуру

(рис. 26, А), что также характерно и для двойного мутанта *fas5 wus-1*, у которого при этом АМП несколько меньшего размера, чем у одиночного мутанта *wus-1* (рис. 26, Б). Образования крупных, выступающих над поверхностью АМП клеток, как у мутанта *fas5*, у двойного мутанта *fas5 wus-1* не наблюдается

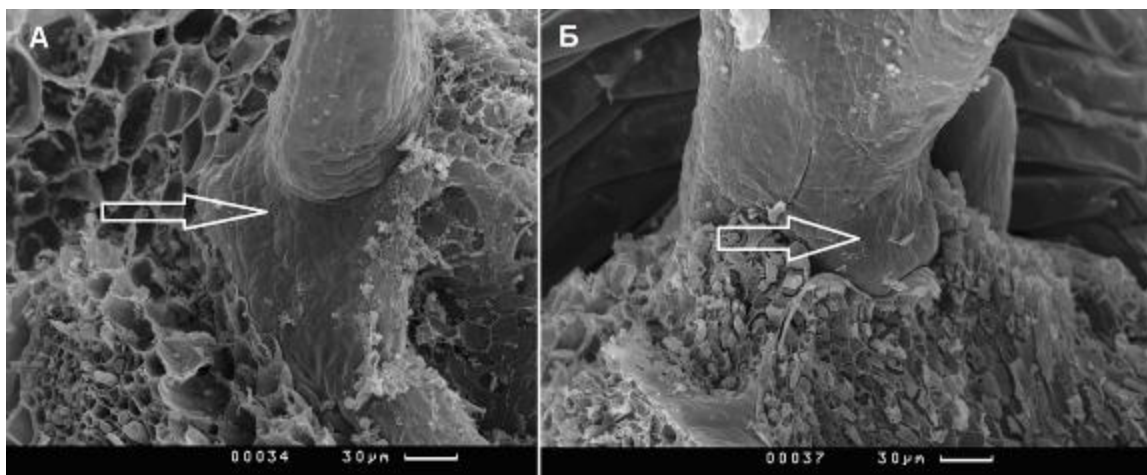


Рисунок 26. АМП мутанта *wus-1* и двойного мутанта *fas5 wus-1*. АМП отмечены стрелками. А - АМП *wus-1*. Б – АМП *fas5 wus-1*. АМП одиночного мутанта *wus-1* и двойного мутанта *fas5 wus-1* представляют собой плоские структуры, не имеющие характерной куполообразной формы. При этом АМП двойного мутанта *fas5 wus-1* имеет меньшие размеры, чем АМП одиночного мутанта *wus-1*. Возникновения крупных клеток на поверхности АМП *fas5 wus-1* не наблюдается. Бары соответствуют - 30мкм.

Фенотип двойного мутанта *fas5 wus-1* и морфология его АМП свидетельствуют о более быстром истощении пула стволовых клеток, чем у одиночного мутанта *wus-1*. В свою очередь, это говорит об участии гена *FAS5* в поддержании недетерминированного состояния стволовых клеток в апикальной меристеме побега.

3.3. 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 гена *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.

3.3.1. Взаимодействие гена *FAS5* с геном *LFY*

Растения поколения F1 от скрещивания *fas5* × *lfy-10* проявляли фенотип дикого типа. В поколении F2 наблюдалось расщепление близкое к расщеплению: 2 части растений дикого типа: 1 часть *fas5 LFY*: 1 часть *FAS5 lfy-10* (таблица 8); выщепления двойных мутантов *fas5 lfy-10* в поколении F2 не наблюдалось. В связи с этим был проведён анализ 41 индивидуальной семьи F3 (потомство гомозигот по мутации *fas5* из F2), среди которых 2 семьи F3 выщепляли двойные мутанты *fas5 lfy-10* с частотой 1/4, что соответствует моногенному наследованию (таблица 8).

Таблица 8 Анализ расщепления в поколениях F2 и F3 от скрещивания *fas5* × *lfy-10*

поколение F2	Фенотипические 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		χ^2 ^b (3: 1)
	196		56	252	1,04

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 $df = 1$

Растения *lfy-10* на генетическом фоне расы Dijon характеризуются задержкой цветения, в результате чего увеличения числа розеточных листьев не происходит ($10,6 \pm 1,3$ - *lfy-10*; $8,2 \pm 0,8$ - дикий тип, раса Dijon); но число вегетативных узлов цветоноса (узлов, имеющих стеблевые листья) у *lfy-10* образуется значительно больше ($18,5 \pm 3,3$), чем у растений дикого типа ($3,6 \pm 0,7$) (таблица 11).

Особенности фенотипа двойного мутанта *fas5 lfy-10*. 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. 27). Число листьев розетки одиночного мутанта *fas5* ($4,93 \pm 0,78$) и двойного мутанта *fas5 lfy-10* ($5,9 \pm 0,8$) достоверно не отличается. (таблица 11).

Таким образом, можно утверждать, что переход к вымётыванию цветоноса у двойного мутанта *fas5 lfy-10* происходит одновременно или с минимальной задержкой относительно одиночного мутанта *fas5*. Тем не менее, на цветоносе двойного мутанта *fas5 lfy-10* формируется такое же количество вегетативных узлов, что и на цветоносе одиночного мутанта *lfy-10* (таблица 9).

Таблица 9. Число розеточных и стеблевых листьев дикого типа расы Dijon, одиночного мутанта *lfy-10* и двойного мутанта *fas5 lfy-10*.

Линия	Число розеточных листьев	Число стеблевых листьев
Дикий тип (Dijon)	8,2±0,8	3,6 ± 0,7
<i>lfy-10</i> (на фоне Dijon)	10,6±1,3**	18,5±3,3**
<i>fas5 lfy-10</i>	5,9±0,8*	19,2±3,7**

* - Значение числа розеточных листьев для *fas5 lfy-10* достоверно отличается от значения для дикого типа при уровне значимости P>0,95

** - Значения для *lfy-10* и/или *fas5 lfy-10* достоверно отличаются от значений для дикого типа при уровне значимости P>0,99

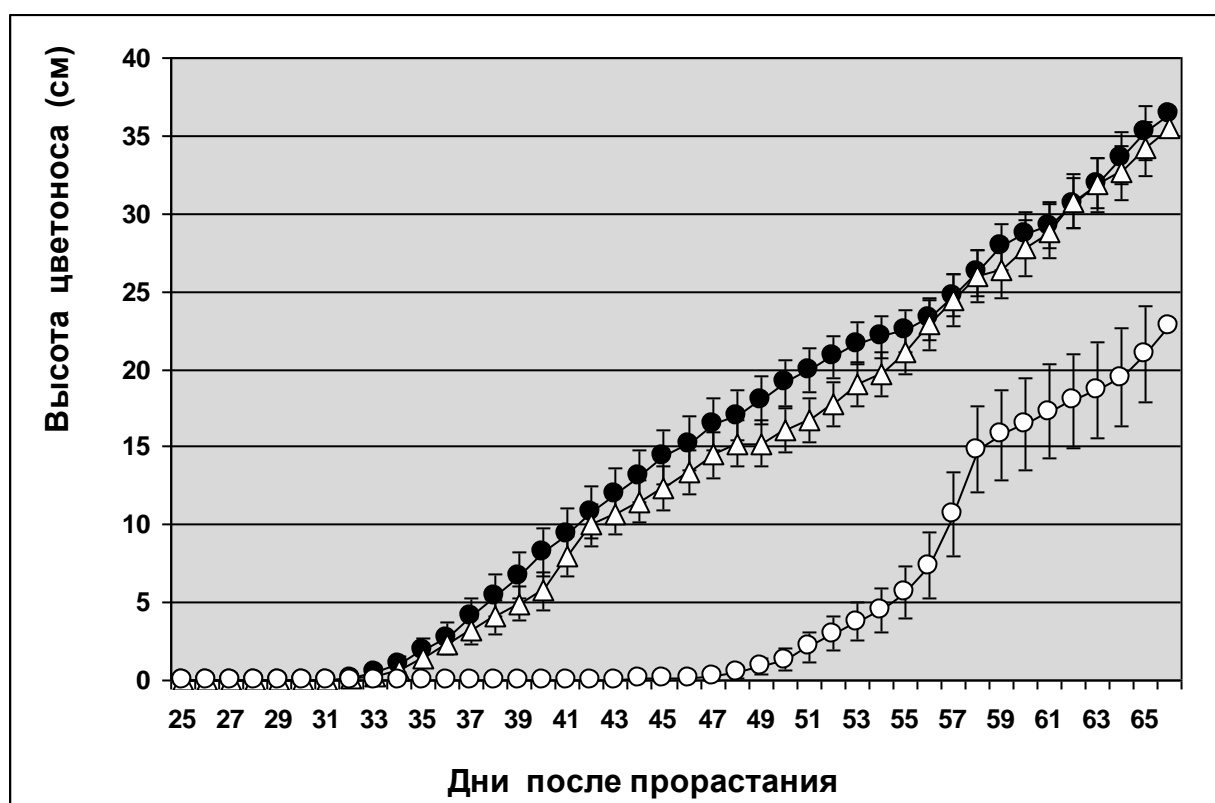


Рисунок 27. Динамика развития цветоноса у линий *fas5*, *fas5 lfy-10* и *lfy-10*. Чёрные кружки - *fas5*, белые кружки - *lfy-10*, белые треугольники - *fas5 lfy-10*. Выброс цветоноса линиями *fas5* и *fas5 lfy-10* происходит примерно на 33-й – 35-й день после прорастания, в то время как выброс цветоноса линией *lfy-10* происходит только на 48-й – 49-й день после прорастания семян.

У двойного мутанта *fas5 lfy-10* происходит превращение всех цветков в ветвистые побегоподобные структуры, не способные образовывать генеративные органы (рис. 28, А - Г), в результате чего растения двойного мутанта полностью стерильны. Также на поверхности АМП апикальных побегоподобных структур (трансформированных цветков) двойного мутанта *fas5 lfy-10* часто наблюдается образование крупных клеток (рис. 28, Е), как у одиночного мутанта *fas5*.

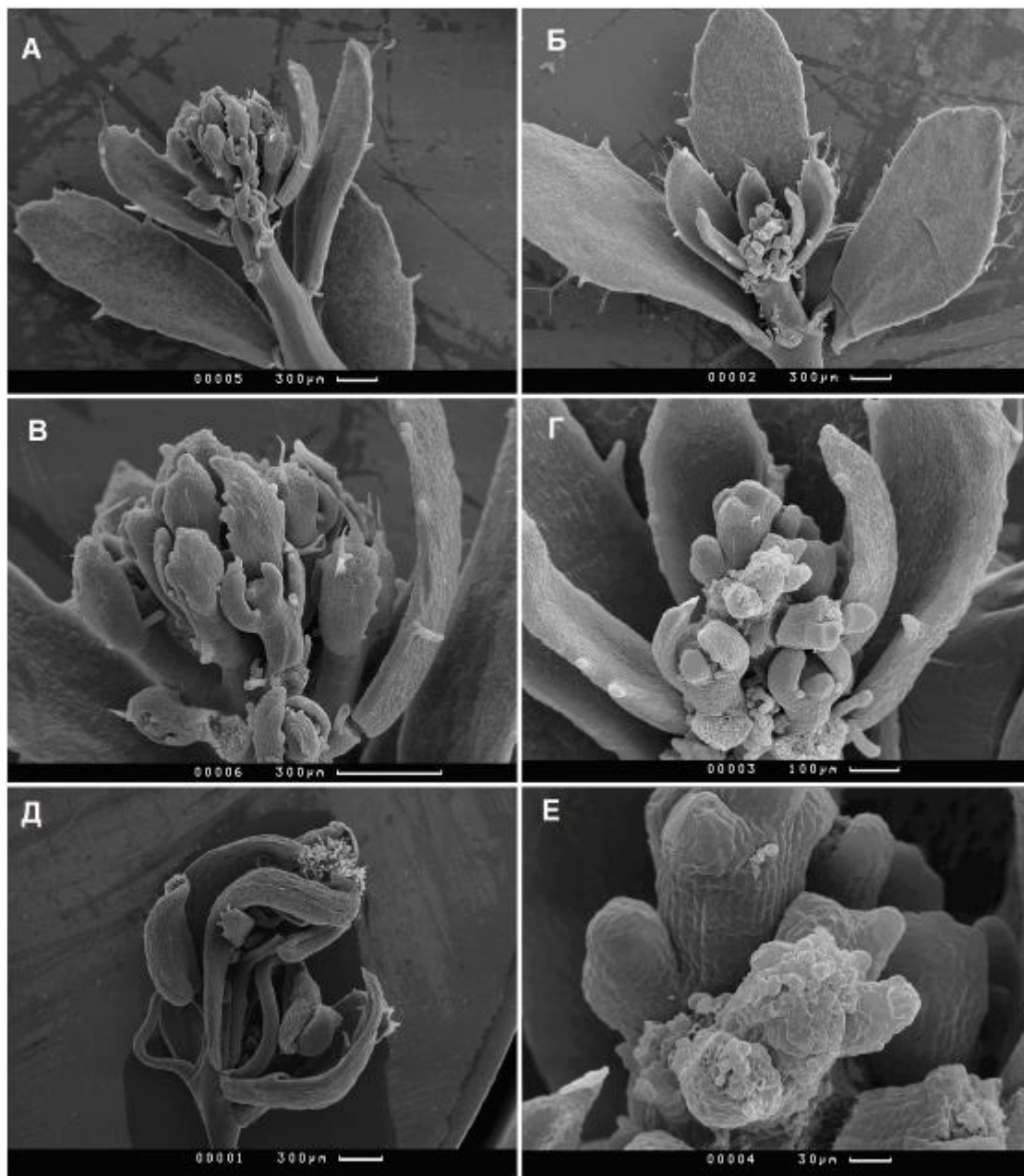


Рисунок 28. Цветки двойного мутанта *fas5 lfy-10* и одиночного мутанта *lfy-10*. А – базальный цветок двойного мутанта *fas5 lfy-10*. Б – апикальный цветок двойного мутанта *fas5 lfy-10*. В, Г – соответственно базальный и апикальный цветки *fas5 lfy-10* – большое увеличение. Д – цветок одиночного мутанта *lfy-10*. Е – крупные клетки на верхушке апикального цветка *fas5 lfy-10*.

У одиночного мутанта *lfy-10* только базальные цветки полностью трансформированы в ветвящиеся побегоподобные структуры, в то же время апикальные способны формировать лепестки и тычинки (число которых снижено) а также плодолистики, число которых не изменено (рис. 28, Д). Апикальные цветки *lfy-10* способны образовывать семена, хотя фертильность таких цветков существенно снижена. Наблюдаемый у двойных мутантов *fas5 lfy-10* феномен трансформации всех цветков (как базальных, так и апикальных) в побегоподобные структуры характерен для жёстких и нуль-аллелей *lfy*. К примеру, растения *lfy-1* формируют ветвящиеся побегоподобные структуры вместо базальных цветков, полностью лишённые генеративных органов, в то время как апикальные структуры более схожи с цветками, имеют гинецей, но лишены андроеца и органов околоцветника, в результате чего полностью стерильны (Schultz and Haughn, 1991).

Фенотип двойных мутантов *fas5 lfy-10* является следствием усиления экспрессивности аллеля *lfy-10*. Это говорит об участии гена *FAS5* в положительной регуляции гена *LFY*. 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.

3.3.2. Взаимодействие гена *FAS5* с геном *AP2*

Ранее в совместной работе с У.Н. Кавай-оол было исследовано взаимодействие *FAS5* с двумя аллелями *AP1* (с высокой и низкой экспрессивностью) и одной аллелью *AP2* с низкой экспрессивностью. Частично эти исследования приведены в докторской диссертации У.Н. Кавай-оол и совместных публикациях (Кавай-оол, 2011, Альберт и др., 2015). Двойные мутанты *fas5 ap1* и *fas5 ap2* демонстрировали широкий спектр нарушений (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2015). Цветки двойных мутантов *fas5 ap1* характеризовались усилением побегоподобности. Это может объясняться участием гена *FAS5* в положительной регуляции *AP1* или *LFY* (Альберт и др., 2015). Цветки двойных мутантов *fas5 ap2-1* также характеризовались усилением побегоподобности, в том числе развитием в пазухах листовидных органов наружной мутовки у *fas5 ap2-1* дополнительных цветков (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2015), что более характерно для мутантов *ap1*. В

прошлых работах (Кавай-оол, 2011) был проанализирован только двойной мутант *fas5 ap2-1*, содержащий аллель *ap2* с низкой экспрессивностью.

Особенности структуры цветков двойного мутанта *fas5 ap2-14*. В данной работе с целью уточнения роли гена *FAS5* в контроле развития цветка был проведён анализ двойного мутанта *fas5 ap2-14*, содержащего нуль аллель *ap2* (Penin, Logacheva, 2011). Единственной отличительной особенностью цветков двойного мутанта *fas5 ap2-14* от цветков одиночного мутанта *ap2-14* (рис. 29, А, Б) является увеличение числа плодолистиков и частое нарушение их срастания, что характерно для *fas5*.

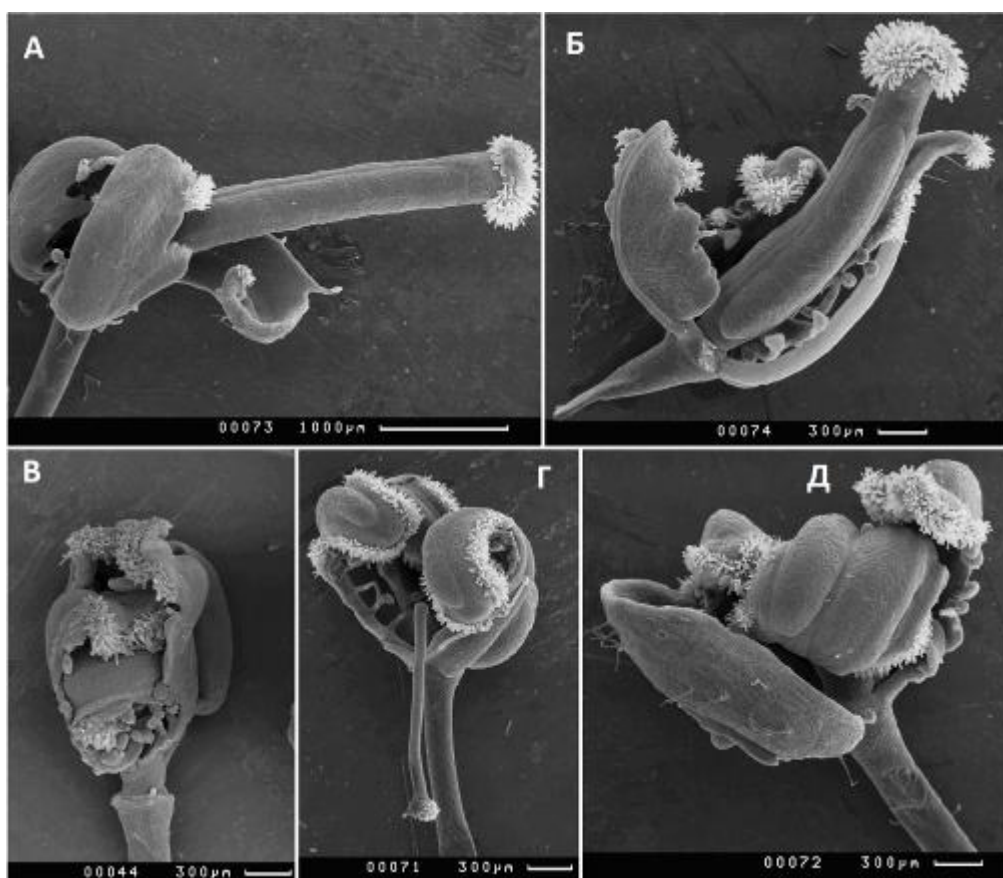


Рисунок 29. цветки двойного мутанта *fas5 ap2-14* и одиночных мутантов *fas5* и *ap2-14*. А – цветок одиночного мутанта *ap2-14*. Б - цветок двойного мутанта *fas5 ap2-14*. Апикальные цветки: В - одиночного мутанта *fas5*, Г – одиночного мутанта *ap2-14*, Д – двойного мутанта *fas5 ap2-14*.

Аналогично цветкам одиночного мутанта *ap2-14* в 1-ой мутовке цветков двойного мутанта *fas5 ap2-14* развиваются карпеллоидные структуры, органы 2-ой мутовки (лепестки) полностью отсутствуют (рис. 29, А, Б). В 3-ой мутовке у цветков (как двойного мутанта *fas5 ap2-14* так и одиночного *ap2-14*), расположенных в базальной части соцветия, встречаются одиночные тычинки.

Апикальные цветки двойного мутанта *fas5 ap2-14* состоят из одних плодолистикоподобных структур, что характерно как для одиночного мутанта и для обеих родительских форм (рис. 29, В-Д).

Таким образом, на фоне мутации *fas5* не наблюдается усиления экспрессивности нуль-аллеля *ap2-14*.

3.3.3. Взаимодействие гена *FAS5* с *PI*

На генетическом фоне расы Dijon одиночный мутант *pi-1* образовывал цветки, имеющие в среднем 4 чашелистика в 1-й и 2-й мутовках, около 3-х плодолистиков и 2-х плодолистиков в 3-ей и 4-ой мутовках соответственно (приложение, таблица 5). Плодолистики 3-ей мутовки у большинства цветков срастались, заключая внутри плодолистики 4-й мутовки (приложение, рис. 6, А-В).

Особенности структуры цветков двойного мутанта *fas5 pi-1*. Базальные цветки двойного мутанта *fas5 pi-1* отличались от цветков одиночного мутанта *pi* увеличением числа плодолистиков в 4-й мутовке, что характерно для одиночного мутанта *fas5* (приложение, таблица 5).

Наблюдалась тенденция к снижению числа органов в цветках двойного мутанта *fas5 pi-1* по сравнению с одиночным *pi-1* от базальных цветков к апикальным во 2-й и 3-ей мутовках (приложение, таблица 6). В то же время происходило увеличение числа плодолистиков в 4-й мутовке цветков двойного мутанта *fas5 pi-1* по сравнению с цветками одиночного мутанта *pi-1*, особенно сильное в апикальных цветках. Аналогичная динамика изменения числа органов характерна для одиночного мутанта *fas5*.

Также в цветках двойного мутанта *fas5 pi-1* не наблюдалось развития карпеллоидных чашелистиков. В 1-ой мутовке цветка двойного мутанта *fas5 pi-1* возникновения аномальных органов не наблюдалось. Аномальные органы возникали, начиная со 2-й мутовки, в которой они были представлены узкими чашелистиками (приложение, рис. 6, Г-Е), морфология которых сходна с таковой у узких лепестков одиночного мутанта *fas5*. В 3-ей и 4-ой мутовках цветков двойного мутанта *fas5 pi-1* часто наблюдалось развитие плодолистиков изменённой формы (приложение, рис. 6, Г, Д), характерной для одиночного мутанта *fas5*. Следует отметить, что тенденции к увеличению доли аномальных органов в направлении от

базальных цветков к апикальным не наблюдалось во 2-й мутовке, но она присутствовала в 3-ей и 4-ой (приложение, таблица 6).

Таким образом, у цветков двойного мутанта *fas5 pi-1* прослеживается тенденция к усилению морфологических нарушений цветка в направлении от базально-расположенных цветков к апикально-расположенным цветкам. Характер морфологических нарушений, наблюдаемых у цветков двойного мутанта *fas5 pi-1*, полностью совпадает с нарушениями, наблюдаемыми у одиночного мутанта *fas5*, за исключением тех, что затрагивают органы, отсутствующие у мутанта *pi-1* (лепестки и тычинки). Это говорит об аддитивном фенотипе цветков *fas5 pi-1*.

3.4. Генетическое картирование мутации *fas5*

Ранее были проведены исследования по локализации мутации *fas5*. К сожалению, эти исследования были проведены на ограниченной выборке растений и привели лишь к предположению о сцеплении *fas5* с маркером *er* из 2 хромосомы (30сМ). Анализ сцепления с хромосомой V выполнен не был (Кавай-оол, 2011). В данной работе нами продолжены эксперименты по картированию *fas5*. Была расширена выборка растений F2 от скрещивания с линией K-310, проанализировано сцепление с дополнительными маркерами на хромосоме II, где по данным Кавай-оол может лежать ген *FAS5*, а также проанализировано сцепление *fas5* с хромосомами I - V.

Картирование мутации *fas5* с применением морфологических маркеров. Подтверждено отсутствие сцепления *fas5* с хромосомами I, III, IV (таблица 10). Анализ сцепления с маркерами хромосомы II не подтвердил предварительные данные У.Н. Квай-оол о сцеплении с маркером *er* (48сМ). Было исследовано также сцепление с другими маркерами той же хромосомы. Этот анализ не выявил сцепления с маркерами *sty*, *as1* и *cer8*, которые находятся в той же хромосоме в положении 8 сМ, 64 сМ и 76 сМ, соответственно, что также подтверждает отсутствие сцепления мутации *fas5* с хромосомой II (таблица 10).

В то же время, нами было обнаружено сцепление мутации *fas5* с хромосомой V *A.thaliana*. Анализ расщеплений в F2, полученного от скрещивания *fas5* x *mm5* (таблица 10) не выявил сцепления с маркером *ttg* (28сМ), локализованным в верхнем плече хромосомы V, но продемонстрировал наличие сцепления мутации

fas5 с маркером *yi*, расположенным в нижнем плече хромосомы V в положении 85сМ.

Локализация *fas5* на хромосоме V *A.thaliana* также подтверждается наличием сцепления мутации *fas5* с мутацией *lfy-10*. В F2 скрещивания *fas5* × *lfy-10* не наблюдалось выщепления двойных мутантов (см. раздел взаимодействие гена *FAS5* с геном *LFY*), что свидетельствует о тесном сцеплении генов. Поэтому анализ силы сцепления проводили на растениях поколения F3 (приложение, таблица 7). Был проведён анализ потомков 41 гомозиготы по мутации *fas5* из поколения F2. Среди 41 семьи F3 было выявлено 2 расщепляющиеся семьи и 39 нерасщепляющихся семей (приложение, таблица 7). Расчет силы сцепления с использованием метода Корнеева-Стамма определяет генетическое расстояние в $2,5 \pm 0,01$ сМ. Ген *LFY* находится выше гена *YI* в положении 82 сМ, и расстояние между генами *YI* и *LFY* равно 3сМ. Рассчитанное генетическое расстояние между мутацией *fas5* и маркером *yi* в $5,71 \pm 1$ сМ свидетельствует о том, что мутация *fas5* локализуется левее *lfy-10* на генетической карте V хромосомы *A.thaliana* (рис. 30).

Таблица 10. Анализ сцепления мутации *fas5* с маркерными мутациями из хромосом I – V *A.thaliana*

№ Хромосо- мы	Маркер	Фенотипические классы F2				Σ Выборки	χ^2			D(сМ)
		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

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

** - отклонение от теоретического расщепления не случайно при $P > 0,99$

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 нами была получена популяция F2 от скрещивания мутанта *fas4* с линией дикого типа Columbia. Из этой популяции были собраны пулы растений дикого типа и растений мутантного фенотипа, содержащие по 25 растений. Далее А.А.Пениным и его сотрудниками ДНК пулов была секвенирована с использованием платформы Illumina HiSeq 2000. Полученные данные были обработаны с использованием программы SNPtrack, что позволило локализовать ген в районе 22-23 МБ 5 хромосомы и показать, что мутация *fas5* затрагивает ген *At5g55300* (*TOP1*, *TOP1ALFA*) (рис. 30), кодирующий ДНК топоизомеразу I α . Мутация *fas5* локализуется в области 9-го экзона и представляет собой транзицию (замена цитозина на тимин), ведущую к замене глутаминового кодона CAG на стоп-кодон UAG (рис. 30), что приводит к преждевременной терминации транскрипции и потере функционально значимого С-концевого домена топоизомеразы I. Мутации в гене *At5g55300 TOP1*, кодирующем ДНК топоизомеразу I α , приводят к развитию фенотипа, сходного с фенотипом *fas5* (Laufs et. al., 1998; Graf et. al., 2010).

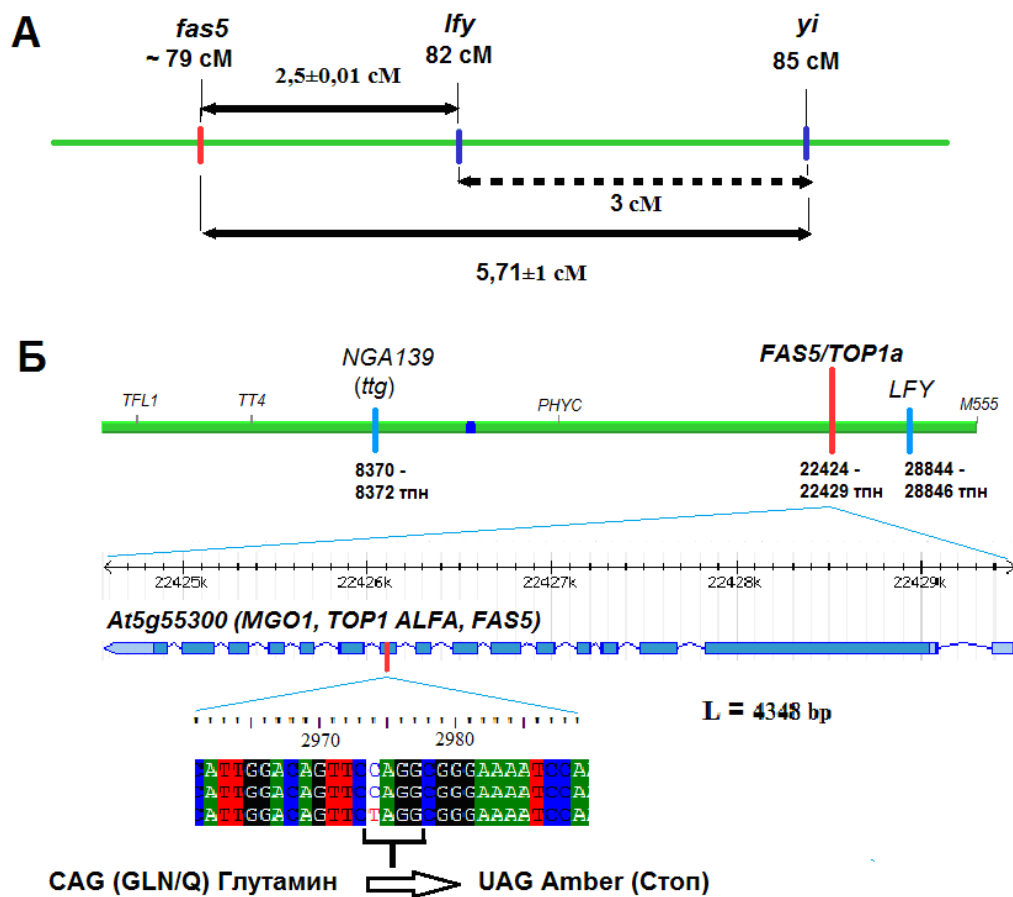


Рисунок 30. Картирование гена *FAS5*. А – локализация мутации *fas5* на генетической карте нижнего плеча V хромосомы (сплошными стрелками показаны экспериментально найденные генетические расстояния, пунктирная стрелка показывает расстояние, рассчитанное по карте). Б – локализация мутации *fas5* на физической карте хромосомы V *A.thaliana*, тпн – тысячи пар нуклеотидов.

Анализ структуры продукта мутантного аллеля *fas5* и других мутантных аллелей *TOP1 in silico*. На данный момент описан ряд мутаций в гене *TOP1*, приводящих к нарушениям развития *A.thaliana*. Мутации *mgol-1*, *mgol-4* представляют собой соответственно замену нуклеотида, приводящую к возникновению стоп-кодона, и сдвиг рамки считывания (Graf et al., 2010); мутация *top1α-1* является результатом инсерции мобильного элемента (Takahashi et al., 2002). Мутации *mgol-1*, *mgol-4* локализуются, соответственно, в 3-ем и 14-ом экзонах гена *TOP1* (Graf et al., 2010). Мутация *top1α-1* локализована в интроне между 8-м и 9-м экзонами *TOP1* (Takahashi et al., 2002).

Был проведён анализ структуры продукта гена *TOP1*, а также предполагаемых продуктов мутантных аллелей *fas5*, *mgol-1*, *top1 α-1* и *mgol-4* 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).

Продукт гена *TOP1* имеет длину 932 аминокислотных остатка (АО). В составе N-концевой части белка длиной примерно 360 АО консервативных доменов обнаружено не было, выявляемые консервативные домены локализируются в районе 360-900 АО: ДНК-связывающий домен в районе 364 - 582 АО, С-терминальный каталитический домен, в районе 585-811 АО, а также С-терминальный топоизомераза I ассоциированный домен (844-908 АО) (приложение, рис. 7). Активный центр фермента находится в составе С-терминального ассоциированного домена в районе 858-876 АО (приложение, рис. 7), активный остаток тирозина расположен в позиции 871 АО.

Учитывая данные о локализации мутаций *fas5*, *mgol-1*, *top1a-1* и *mgol-4* в гене *TOP1* были сделаны выводы об их влиянии на доменную структуру белка. Все анализируемые мутации локализируются в участке гена, расположенном выше части, кодирующей С-терминальный ассоциированный домен и активный центр (рис. 31).

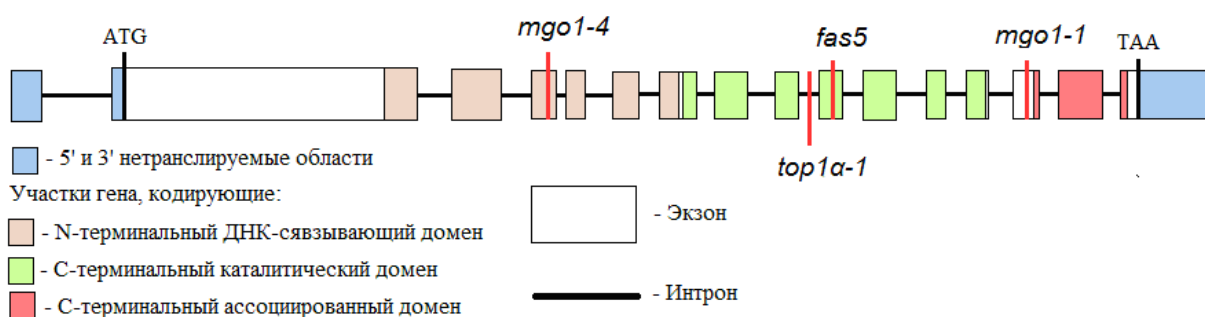


Рисунок 31. Структура гена *TOP1* и расположение мутаций *fas5*, *mgol-1*, *top1a-1* и *mgol-4*. *fas5* - стоп-кодон в 9-ом экзоне (в позиции 2974 пн), *mgol-1* – сдвиг рамки считывания в середине 14-го экзона (после позиции 3920 пн), *top1a-1* – инсерция Т-ДНК в интрон между 8-м и 9-м экзонами, *mgol-4* – стоп-кодон в 3-ем экзоне (замена нуклеотида в позиции 1747 пн).

Так мутации *mgol-4* и *fas5* (рис. 31) приводят к возникновению стоп-кодонов (замены нуклеотидов в позициях соответственно 1747 и 2974 пн) и преждевременной терминации трансляции, что ведёт к потере С-терминальных участков длиной соответственно 231 и 442 АО. В случае мутации *fas5* утрачиваемый фрагмент содержит половину каталитического домена, ассоциированный домен и, как следствие, активный центр фермента (рис. 31). В случае *mgol-4* утраченный фрагмент белка содержит половину ДНК-связывающего домена, каталитический и ассоциированный домен (рис. 31).

В результате мутации *top1a-1* (инсерция Т-ДНК в интрон между экзонами 8 и 9) (рис. 39) (Takahashi et al., 2002) утрачивается фрагмент длиной около 260 АО, содержащий часть каталитического и весь ассоциированный домен. Мутация *mgol-1* (Laufs et al., 1998) приводит к сдвигу рамки считывания после 3920 пн (рис. 31), в результате чего нарушается аминокислотная последовательность участка, содержащего С-терминальный топоизомераза I ассоциированный домен и активный центр (рис. 31).

Таким образом, мутация *fas5* (как и остальные рассмотренные мутации) приводит к потере активного центра фермента (участок белка 858-876 АО), что позволяет отнести данную мутантную аллель к нуль-аллелям.

3.5. Общая характеристика и проявление в онтогенезе мутации *nana-D*

Доминантная мутация *nana-D* (*na-D*) из коллекции кафедры генетики вызывает формирование укороченного цветоноса (у гетерозиготных по мутации *na-D* растений в 8-13 раз короче по сравнению с диким типом) за счёт сокращения длины междоузлий и уменьшения числа самих узлов. Длина главного цветоноса гетерозиготных растений *na-D* обычно не превышает 0,8 – 2,0 см. Гетерозиготы *na-D* при этом способны формировать 5 – 15 цветков на главном цветоносе. Укорочение междоузлий мутанта *na-D* связано с уменьшением размеров клеток (Ежова и др., 2002; Лебедева и др., 2005) и не восстанавливается при обработке экзогенным гиббереллином (Ежова и др., 1997, 2002). При этом в АМП мутанта *na-D* не наблюдается уменьшения размеров клеток, тем не менее, размер 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.

3.5.1. Влияние мутации *na-D* на пролиферативную активность АМП

АМП дикого типа *Enkhaim* (*En*) на генеративной стадии увеличивается в размерах относительно АМП на вегетативной стадии (рис. 32, А, Б).

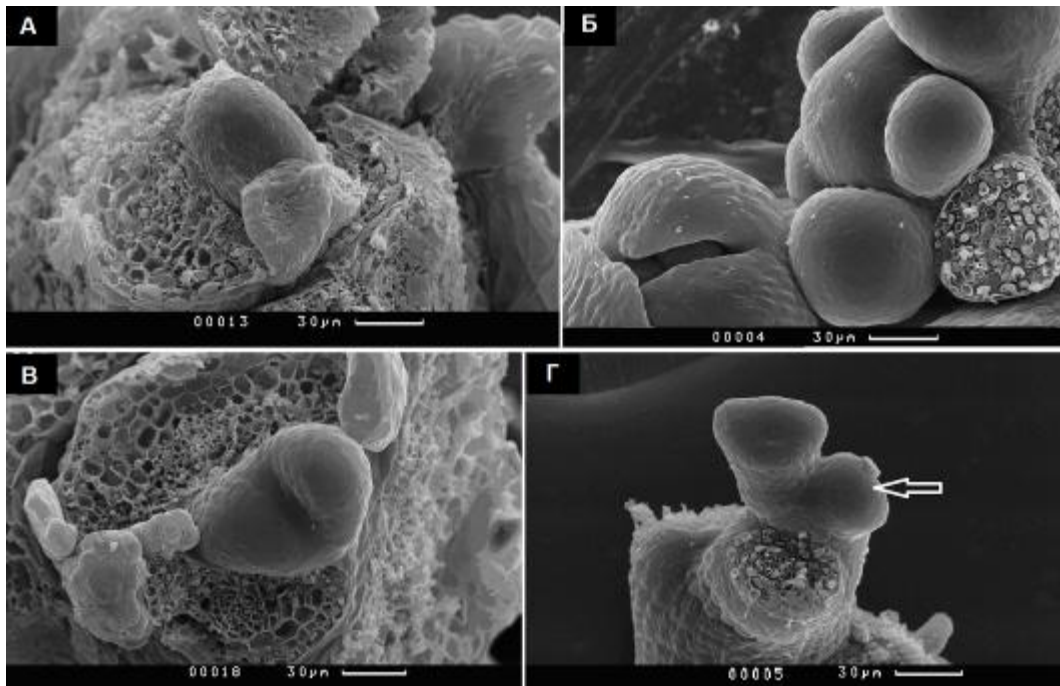


Рисунок 32. АМП гомозиготных растений *na-D* и растений дикого типа на разных стадиях развития. АМП дикого типа расы Ep: А – на стадии, Б – на стадии начала цветения. АМП гомозигот *na-D* (главный побег): В – на стадии розетки, Г – на стадии начала цветения (отмечена стрелкой) Бары соответствуют – 30мкм.

В то же время, АМП гомозиготы *na-D* уже на вегетативной стадии имеет меньшие размеры, чем АМП дикого типа на той же стадии (рис. 32, В). При переходе на генеративную стадию АМП гомозигот *na-D* уменьшается в размерах относительно предыдущей стадии (рис. 32, Г). Несмотря на то, что АМП гомозиготы *na-D* способны формировать некоторое количество флоральных примордиев (рис. 32, Г), лишь у редких гомозигот *na-D* они развиваются в цветки. Гомозиготы *na-D* способны формировать не более 1-3 цветков на главном цветоносе. Таким образом, АМП гомозигот *na-D* имеет меньшие размеры, чем АМП дикого типа расы Ep, и склонна к дальнейшему уменьшению размеров в ходе онтогенеза.

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). У растений дикого типа (Ep) розеточные листья демонстрируют тенденцию к увеличению размеров листовой пластинки у более поздних листьев по сравнению с более ранними (рис. 33, А).

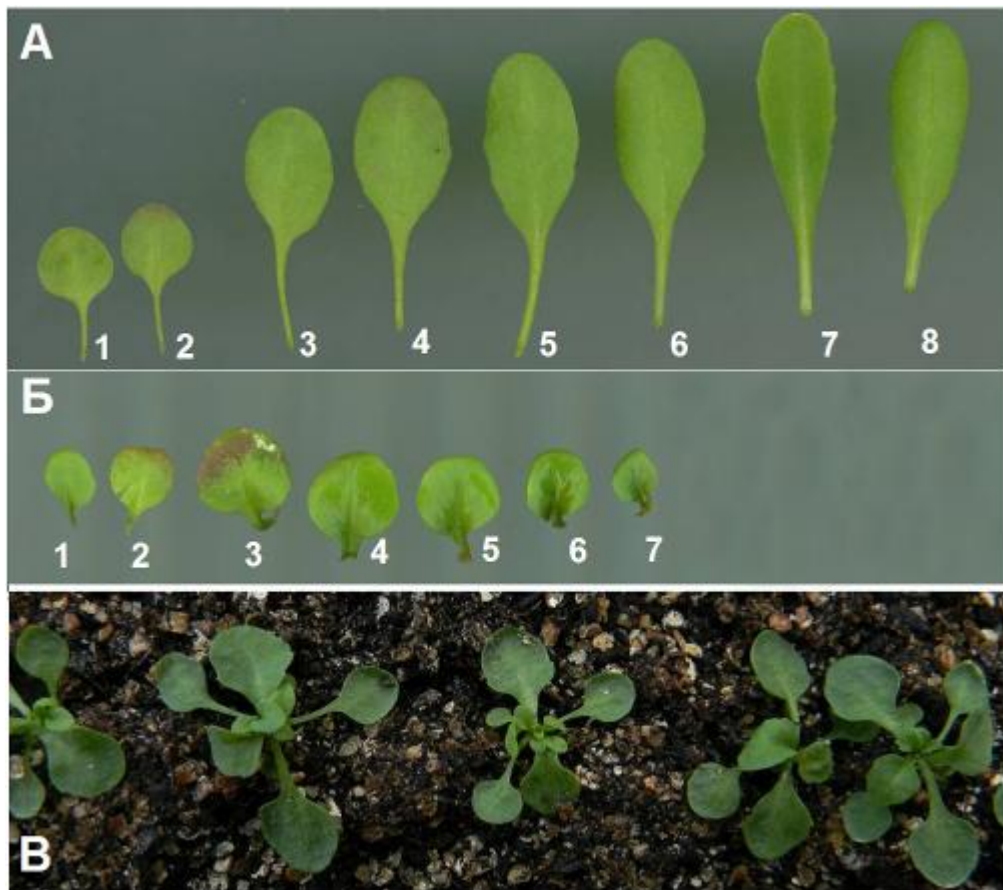


Рисунок 33. Розеточные листья гомозиготы *na-D* и дикого типа. А – розеточные листья растения дикого типа расы En. Б – розеточные листья гомозиготного растения *na-D*. Цифрами отмечены номера листьев в порядке их образования. В – общий вид растений гомозиготных по *na-D*.

У гомозиготных растений *na-D*, начиная со 2-й – 3-й пары розеточных листьев, начинается уменьшение размеров листовой пластинки (рис. 33, Б, В). Уменьшение размера листовых пластинок по мере приближения растений к репродуктивному возрасту имеет очевидную связь с уменьшением размера АМП в онтогенезе и отражает нехватку клеточного материала для формирования полноценных репродуктивных органов (рис. 33, В).

3.5.2. Проявление мутации *na-D* на разном генетическом фоне

У мутации *na-D* наблюдается изменение характера наследования в зависимости от генетического фона.

Проявление мутации *na-D* на фоне расы Enkhaim. На фоне родительской расы Enkhaim (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) (рис. 34, А-В). Различия между

гомо- и гетерозиготами заключаются только в способности гетерозигот образовывать цветки (рис. 34, А). При этом в F2 поколении от скрещивания гетерозиготных растений *na-D* с растениями дикого типа расы Ep наблюдается расщепление карлики (растения фенотипа *na-D*): растения дикого типа в соотношении 3:1 (таблица 11), что характерно для доминантной мутации.



Рисунок 34. Мутация *na-D* на фоне расы Ep. А – F2 от скрещивания Ep × *na-D*, слева направо: растение дикого типа, гетерозигота *na-D*, гомозигота *na-D*. Б, В - F2 от скрещивания Ep × *na-D* общий вид, гомозиготы *na-D* отмечены стрелками

Соотношение гомозиготных и гетерозиготных растений *na-D* и растений дикого типа составляло 1:2:1 (гетерозиготы отличали от гомозигот по способности образовывать цветки) (таблица 11), что соответствует моногенному типу наследования.

Таблица 11. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещивания Ep × na-D.

Скрещивание (F2)	Мутантные растения		Дикий тип	∑ Выборки	χ^2
Ep × na-D	Карлики		59	258	(3:1) ^a 0,64
	199				
	Гомозиготы na-D	Гетерозиготы na-D	Дикий тип		(1:2:1) ^b 0,763
	64	135	59		

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

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

Проявление мутации na-D на фоне расы Columbia. На фоне расы Columbia наблюдалось снижение экспрессивности мутации na-D. Гетерозиготы F1 от скрещивания Columbia (Col) × na-D имели высоту 19 – 27см (рис. 35, А) 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 Ep (рис. 35, Б). В то же время гетерозиготные растения na-D из F2 не были фенотипически однородными. Среди них встречались как полукарликовые растения, высота которых колебалась в пределах ~ 5 - 20см (рис. 35, Б, В), так и карликовые (с фенотипом гетерозигот на фоне Ep) высотой ~ 0,5 – 3см (рис. 35, Г). Среди гетерозигот na-D F2 можно было выделить несколько фенотипических классов - растения с высотой главного цветоноса 1,2-1,5см; 3-5см; 7-8см; 20-22 см. Соотношение численности гомозиготных и гетерозиготных растений na-D и растений дикого типа в F2 не соответствовало моногенному расщеплению, и характеризовалось избытком растений дикого типа и недостатком гомо- и гетерозигот na-D (таблица 12).



Рисунок 35. Проявление мутации *na-D* на фоне расы Columbia. А – F1 от скрещивания Columbia × *na-D*, слева направо: растение дикого типа, два гетерозиготных растения *na-D* (в центре), для сравнения гетерозигота *na-D* на фоне расы Ep. Б-Г - F2 скрещивания Col × *na-D*: Б – справа налево: растение дикого типа, гомозигота *na-D*, гетерозигота *na-D* (h ~ 15 см); В, Г – гетерозиготы *na-D* (h соответственно ~4-6см и ~1-3см). Бары соответствуют 5см.

Таблица 12. 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 $P > 0,99$

Гетерозиготы F₂, принадлежащие к разным фенотипическим классам, различались также по размерам АМП, которые были прямо пропорциональны росту растения (рис.36).

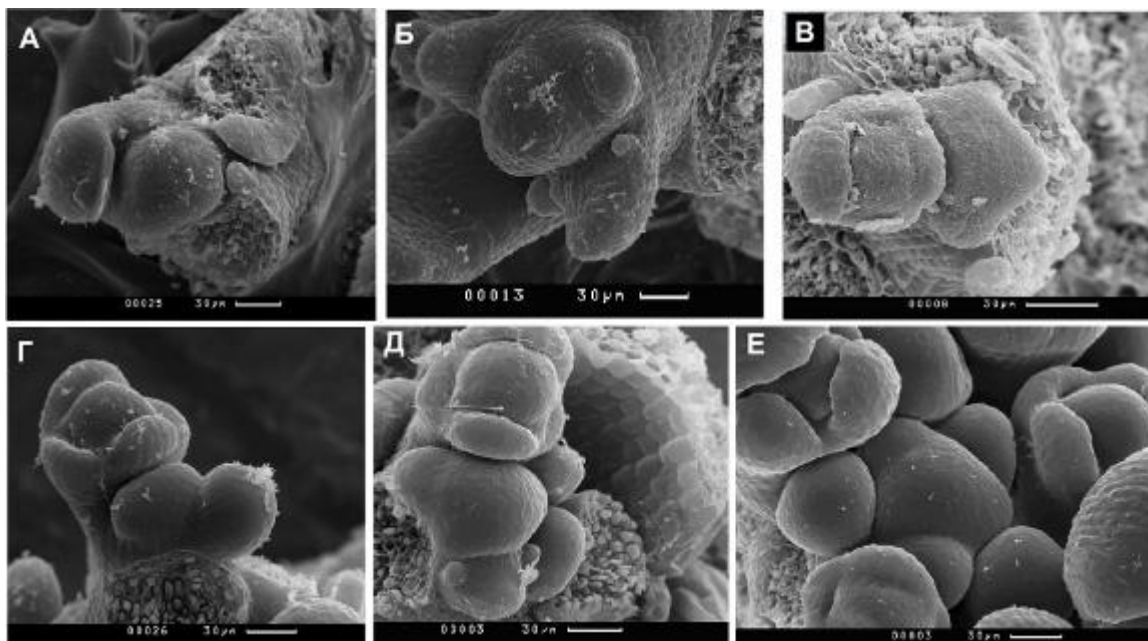


Рисунок 36. АМП растений *na-D* на фоне расы Col. На стадии розетки: А – АМП гомозиготы *na-D*, Б – гетерозиготы *na-D*. На стадии начала цветения: В – гомозигота *na-D*, Г – гетерозигота *na-D* с высотой главного цветоноса ~ 3см, Д – АМП гетерозиготы *na-D* высотой 4,5см, Е – АМП гетерозиготы *na-D* 6,5. Бары соответствуют 30 мкм.

На стадии розетки, АМП гомозигот *na-D* (рис. 36, А) имели меньшие размеры, чем АМП гетерозиготных растений *na-D* (рис. 36, Б). На стадии начала цветения у гомозигот *na-D* АМП сохраняли небольшие размеры, и имели тенденцию к уменьшению (рис. 36, В). Размеры АМП гетерозигот F₂ *na-D* были прямо пропорциональны высоте растения. Так наименьшая АМП наблюдалась у гетерозигот *na-D* высотой ~ 3см (рис. 36, Г), гетерозиготы высотой ~ 4,5см имели АМП чуть больших размеров (рис. 36, Д). Наибольшие размеры АМП встречались у гетерозигот высотой ~ 6,5см, и по размерам практически не отличались от АМП дикого типа (рис. 36, Е). Стоит отметить, что этот класс гетерозигот развивался быстрее остальных и образовывал наибольшее число флоральных примордиев (рис. 36, Е).

Проявление мутации *na-D* на фоне линии Ler и расы Di. На фоне линии Ler мутация *na-D* демонстрировала экспрессивность сходную с таковой на фоне расы

Еп. Гетерозиготы F1 от скрещивания *Ler* × *na-D* имели высоту 1,5 – 2,5см (рис. 37, А, Б). В F2 выщеплялись стерильные гомозиготные растения *na-D*, и гетерозиготы

Рисунок 37. Проявление мутации *na-D* на фоне линии *Ler*. А, Б – гетерозиготы *na-D* из F1 от скрещивания *Ler* × *na-D*. В – F2 от скрещивания *Ler* × *na-D*, слева направо: растение фенотипа *Ler*, гетерозигота *na-D*, гомозигота *na-D*. Бары соответствуют 5см.



na-D, фенотипически идентичные гомозиготам из F1 (имели высоту главного цветоноса $2,6 \pm 0,7$ см, рис. 37, В). Соотношение гомо- и гетерозигот *na-D* и растений дикого типа (растений с фенотипа *Ler*) составляла 1:2:1 (таблица 13).

Аналогичная экспрессивность мутации *na-D* наблюдалась и на фоне расы *Di*. Гетерозиготные растения F1 *Di* × *na-D* имели высоту 1,5 - 3см (приложение, рис. 8, А, Б). Гомозиготные растения *na-D* F2 имели фенотип, идентичный гомозиготам на фоне. Гетерозиготы *na-D* F2 были фенотипически сходны с таковыми на фоне линии *Ler* и имели высоту $2,7 \pm 0,6$ см (приложение, рис. 8, Г, Д). Соотношение гомо- и гетерозигот *na-D* и растений дикого типа в поколении F2 *Di* × *na-D* соответствовало 1:2:1 (таблица 13).

Таблица 13. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещивания *Ler* × *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

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

Проявление мутации *na-D* на фоне рас *Ws* и *Vla*. На фоне рас *Ws* и *Vla* наблюдалось падение экспрессивности мутации *na-D*, сходное с наблюдаемым на фоне расы *Col*. Гетерозиготы *na-D* из поколения F1 от скрещивания *Ws* × *na-D* имели высоту 16 - 26см (рис. 38, А). В F2 наблюдались несколько фенотипических классов гетерозигот: высотой 1 - 3см (рис. 38, Б, верхний ряд), фенотипически сходные с гетерозиготами на фоне *En*; 9 - 14см; 16 - 18см; 22 - 24см (рис. 38, Б, нижний ряд) – сходные с полукарликовыми гетерозиготными растениями на фоне расы *Col*.

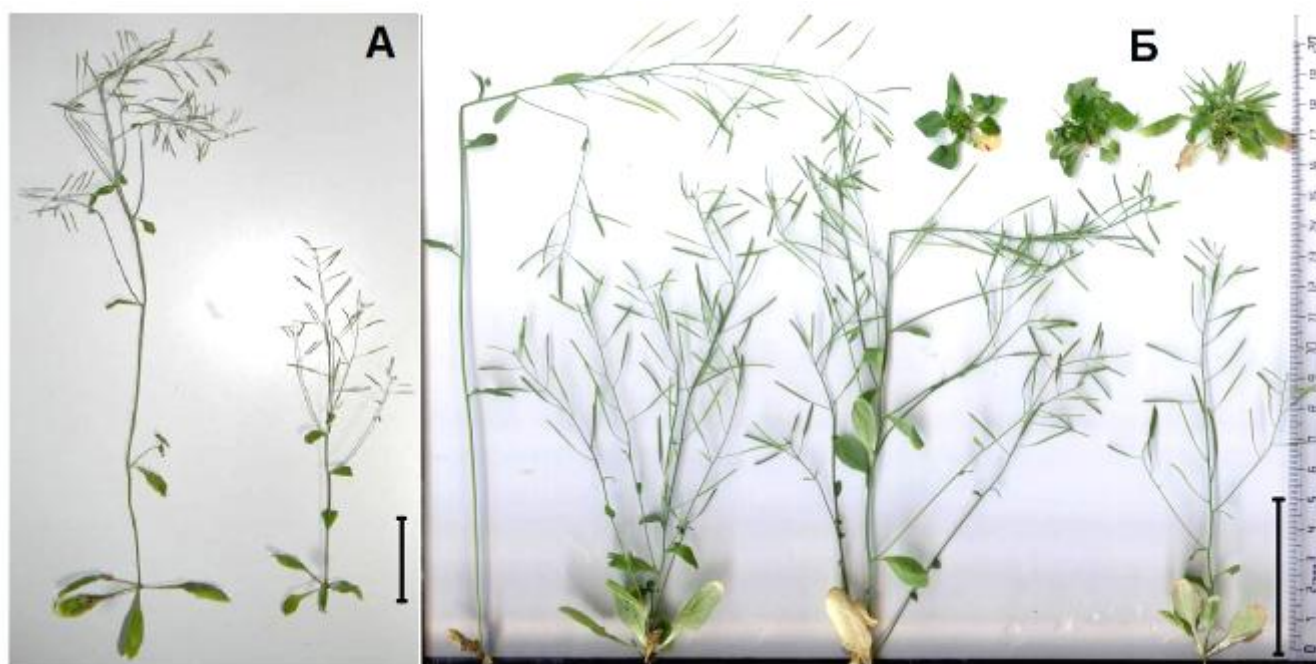


Рисунок 38. Проявление мутации *na-D* на фоне расы *Ws*. А – F1 от скрещивания *Ws* × *na-D*, слева направо: растение дикого типа, гетерозигота *na-D*. Б – F2 от скрещивания *Ws* × *na-D*, нижний ряд, слева направо: растение дикого типа, гетерозиготы *na-D* высотой соответственно 24см, 16,5см и 13,5см; верхний ряд – справа налево: гетерозиготы *na-D* с высотой 2см и 0,5см; гомозигота *na-D*. Бары соответствуют 5см.

Гетерозиготы F1 от скрещивания *Vla* × *na-D* имели высоту 17 – 22см (рис. 48, А), аналогично гомозиготам F1 на фоне рас *Col* и *Ws*. В F2 от скрещивания *Vla* × *na-D* также можно было наблюдать выщепление нескольких фенотипических классов гетерозигот *na-D*, как карликовых – 0,5-2см, так и полукарликовых: 4-6см, 8-12см и 19-22см (приложение, рис. 9, Б, В). Фенотип гомозиготных растений *na-D* в F2 был идентичен таковому на фоне всех остальных рас (приложение, рис. 9, В, верхний ряд). В F2 от скрещиваний *Ws* × *na-D* и *Vla* × *na-D* наблюдалось выщепление избытка растений дикого типа и недостаток гомозиготных и

гетерозиготных растений *na-D* (таблица 14), как и в поколении F2 от скрещивания Col × *na-D*.

Таблица 14. Анализ расщепления в поколении F2 от скрещиваний Ws × *na-D* и Vla × *na-D*.

Скрещивание (F2)	Гомозиготы <i>na-D</i>	Гетерозиготы <i>na-D</i>	Дикий тип	∑ Выборки	χ^2 (1:2:1)
Ws × <i>na-D</i>	7	20	27	54	21,54**
Vla × <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 $P > 0,99$

У мутации *na-D* на генетическом фоне исследованных рас *A.thaliana* нами не было выявлено различий в продуктивности гетерозигот *na-D* на разном генетическом фоне. Гетерозиготные растения *na-D* вне зависимости от генетического фона образовывали в среднем $69 \pm 7,9$ семян в одном стручке. В ранних работах (Склярова и др., 2004) также было показано, что продуктивность гетерозиготных растений *na-D* не отличалась от таковой у растений дикого типа.

Таким образом, можно выделить две группы рас *A.thaliana*, на генетическом фоне которых мутация *na-D* имеет два разных уровня экспрессивности. К первой группе относятся расы Ep, Di и линия Leg. На их генетическом фоне мутация *na-D* имеет высокий уровень экспрессивности: как гомо- так и гетерозиготы *na-D* на фоне данных рас являются карликовыми растениями, высота главного побега которых не превышает 2-3см. Зачастую различия между гомо- и гетерозиготами в данном случае сводятся к способности гетерозигот образовывать цветки, в то время как гомозиготы в большинстве случаев стерильны. Ко второй группе относятся расы Col, Ws и Vla. На их фоне происходит снижение экспрессивности мутации *na-D*, в результате чего гетерозиготные растения F1 *na-D* достигают значительной высоты, а в F2 от скрещиваний *na-D* с данными расами, наблюдается выщепление нескольких фенотипических классов гетерозигот. Также в F2 от скрещивания с расами Col, Ws и Vla наблюдается недостаток растений *na-D*, как гомозиготных, так и гетерозиготных и избыток растений дикого типа. Такое отклонение от моногенного расщепления может объясняться многими причинами, в том числе возможной дигенной природой мутации *na-D*. Например, наличием генов-

модификаторов, ослабляющих воздействие мутантной аллели *na-D* и имеющих разный аллельный состав у рас En, Di и линии Ler и рас Col, Ws и Bla.

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

3.6.1. 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*. Двойные мутанты *na-D clv1*, *na-D clv2-1*, *na-D clv3-2* были карликами (приложение, рис. 10, А-В), как и одиночные мутанты *na-D*. Кроме того, было показано, что у двойных мутантов на репродуктивной стадии развития наблюдается увеличение размеров АМП, как и у одиночных мутантов *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2* (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2014). Так как мутация *na-D* проявляется уже на вегетативной стадии развития, а в ранее проведенном анализе двойных мутантов *na clv* использовались только растения, находящиеся на репродуктивной стадии онтогенеза, в данной работе анализ двойных мутантов был продолжен. Нами был проведен анализ структуры АМП двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1*, *na-D clv3-2* на вегетативной стадии развития.

У ювенильных растений дикого типа (стадия развитых 2-х пар настоящих листьев) АМП имеет ярко выраженную куполообразную форму (рис. 39, А). У ювенильных гомозигот *na-D* на той же стадии АМП существенно уменьшена в размерах (рис. 39, Б). Обнаруженное уменьшение размеров АМП гомозиготного мутанта *na-D* в процессе развития растения может служить объяснением почти полной стерильности гомозигот *na-D*.

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. 50, В-Е). У двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1* и *na-D clv3-2* вегетативная АМП образует больше примордиев листьев (рис. 50, В-Е), чем у одиночного мутанта *na-D* и дикого типа (рис. 50, А, Б), что характерно и для одиночных мутантов *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2*.

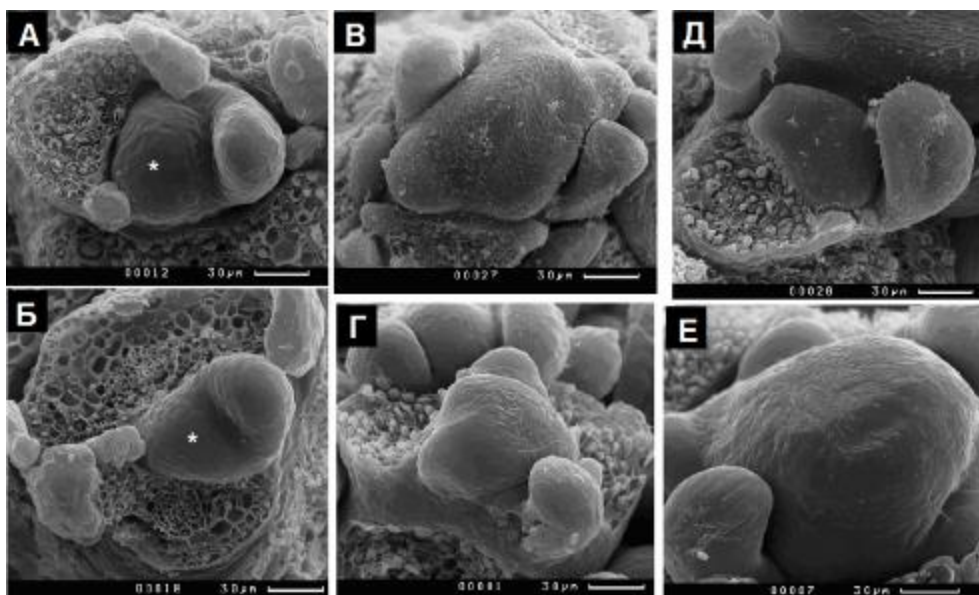


Рисунок 39. Вегетативная АМП главного побега двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1* и *na-D clv3-2*, дикого типа и одиночного мутанта *na-D*. А – дикого типа. Б - гомозиготы *na-D* (* - АМП). Двойных гомозигот: В - двойной гомозиготы *na-D clv1*, Г - *na-D clv2-1*, Е - *na-D clv3-2*. Бары соответствуют: А – Е - 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.

Таким образом, результаты анализа структуры АМП двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2-1* и *na-D clv3-2* на ранней вегетативной стадии вместе с ранее проведёнными исследованиями совместно с У.Н. Кавай-оол выявили, что АМП двойных мутантов *na-D clv* сохраняет крупные размеры на протяжении всего онтогенеза растения. Это указывает на то, что ген *NA* не влияет на объём пула СК АМП, но, возможно регулирует пролиферативную активность СК. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о том, что ген *NA* начинает работать значительно позже, чем гены *WUS* и *CLV* – не на эмбриональной, а на постэмбриональных стадиях, когда объём пула СК и общий размер АМП уже сформирован за счёт деятельности системы *WUS-CLV*. Более того, ген *NA*, скорее всего, относится к группе генов, которые регулируют структурные и динамические преобразования АМП при переходе на репродуктивную стадию развития.

3.6.2. Взаимодействие гена *NA* с геном *FAS5/TOP1*

С целью уточнения роли генов *NA*, а также гена *FAS5/TOP1* в регуляции активности АМП был проведён анализ полученных двойных мутантов *fas5 na-D*. Для этого было проведено скрещивание *fas5* x *na-D*. Необходимо отметить, что поскольку мутация *na-D* проявляется в гетерозиготном состоянии, то к в качестве двойных мутантов *fas5 na-D* нами рассматривались как растения *fas5* гомозиготные по *na-D* так и растения *fas5* гетерозиготные по *na-D*.

Так как в скрещивании *fas5* x *na-D* использовались гетерозиготы *na-D*, в поколении F1 доля гетерозиготных растений *na-D* составляла 1/2 (таблица 15) Гетерозиготы *na-D*, выщеплявшиеся в F1, обладали низкой продуктивностью – в среднем около 20 семян с растения (~5 семян в стручке). Семена, собранные с растений F1 гетерозиготных по *na-D* характеризовались низкой всхожестью. Всходило приблизительно 50% высаженных на почву семян (41 семя из 84 высаженных). В то же время, для материнских растений одиночного мутанта *fas5* характерна высокая всхожесть семян (97 из 100 высаженных на почву).

В поколении F2 не наблюдалось выщепления двойных гомозигот *fas5 na-D*, возможно связанное с низкой численностью выборки. Из 41 растения F2 29 принадлежали к дикому типу, 7 имели фенотип одиночных гомозигот *na-D*, 5 растений были гомозиготны по *fas5* и гетерозиготны по *na-D*. Поэтому был проведён анализ поколения F3, являющегося потомством растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* из F2.

Таблица 15 Анализ расщепления в поколении F1 от скрещивания *fas5* × *na-D*

поколение	Фенотипические классы		Σ выборки	χ ² (1: 1)
	A- B-	A- bb		
F1	9	5	14	1,14

A - *FAS5*, B - *NA*

χ²_{табл} = 3,84 при уровне значимости λ = 0,05 и степени свободы df = 1

Растения поколения F2 также характеризовались низкой продуктивностью – в среднем с растения удавалось получить около 30 семян. Всхожесть данных семян также была низкой ~ 50% (из 120 высаженных семян взошло 54). В поколении F3 соотношение растений *fas5* гомозиготных по *na-D*, *fas5* гетерозиготных по *na-D* и

растений дикого типа составило 1:2:1 (таблица 16). Расщепление, наблюдаемое в F3, свидетельствует о том, что семена, образуемые растениями *fas5* гетерозиготными по *na-D*, гибнут в равной пропорции вне зависимости от их генотипа.

Таблица 16. Анализ расщепления в поколении F3 скрещивания *fas5* × *na-D* (потомство растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*)

поколение	Фенотипические классы			Σ выборки	χ^2 (1: 2: 1)
	aa BB	aa Bb	aa bb		
F3	16	25	13	54	0,67

A - FAS5, B - NA

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

Особенности фенотипа 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*. (рис. 40, А-В).

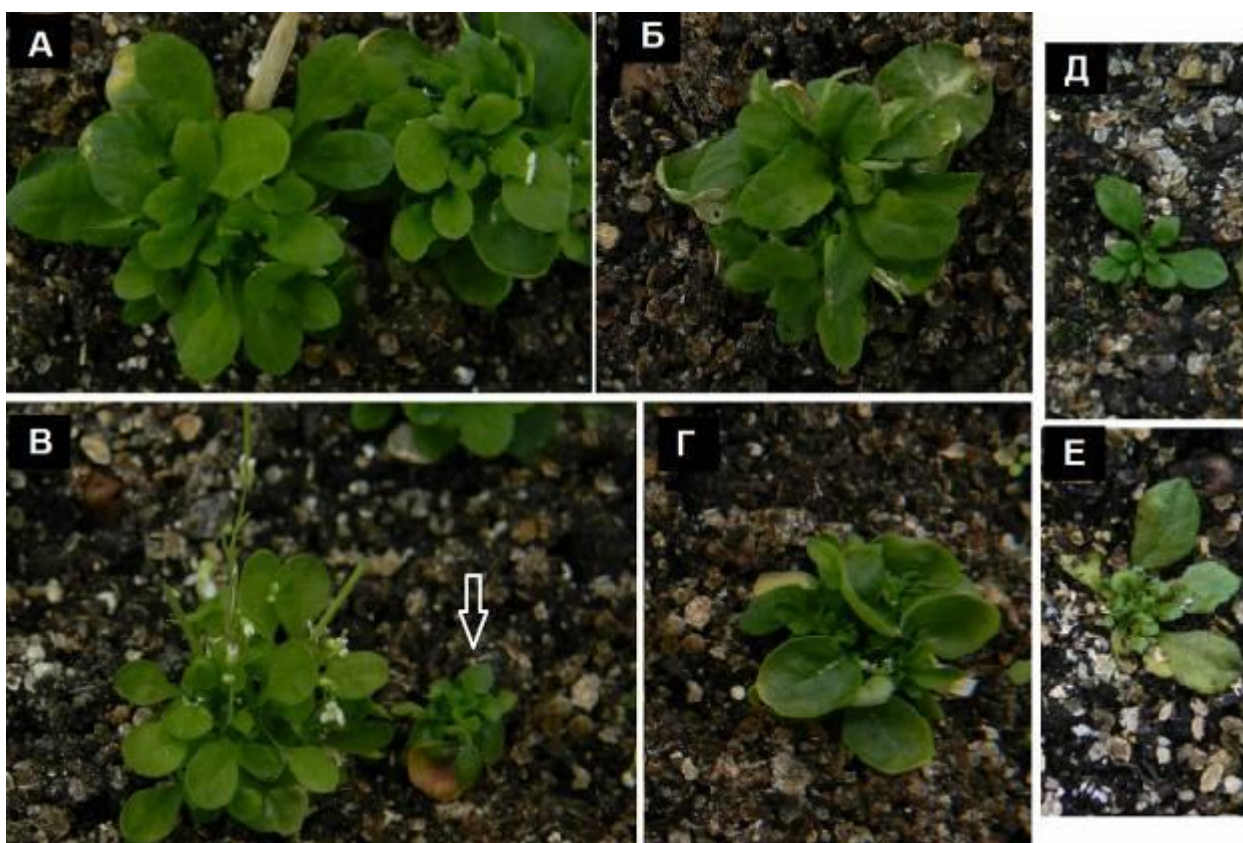


Рисунок 40. Растения из F2 от скрещивания *fas5* × *na-D*. А - растения *fas5* гетерозиготные по *na-D*. Б - *fas5* гетерозиготные по *na-D*, формирующие короткие боковые побеги с 1-2 стручками. В - цветущее растение *fas5* гетерозиготное по *na-D*, с хорошо выраженным главным побегом и одиночная гомозигота *na-D* (отмечена стрелкой). Г - гетерозиготное растение *na-D*. Д, Е - гомозиготы *fas5 na-D* на стадии соответственно ранней и поздней розетки.

Растения *fas5*, гетерозиготные по *na-D*, характеризовались изменением морфологии листовой пластинки (рис. 40, А), которая приобретала зауженную форму, напоминающую ромб, характерную для одиночного мутанта *fas5*. Число листьев розетки у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D* ($5,5 \pm 0,7$), достоверно не отличается от такового у растений одиночного мутанта *fas5* ($5,1 \pm 0,8$) из F2 или F3 от скрещивания *fas5* x *na-D*.

Часто растения *fas5*, гетерозиготные по *na-D*, не формировали ярко выраженного главного побега, но вместо него развивались несколько одинаковых побегов, длиной 1 – 1,5 см, образующие по 1 – 2 цветка (рис. 40, Б). В некоторых случаях развивался хорошо различимый главный побег, имевший высоту 2 - 3 см (рис. 40, В), на котором образовывались в среднем 3-4 цветка, и боковые побеги меньшей длины (1,5 - 2 см), образующие по 1 - 2 цветка (рис. 40, В). Развития фасциации и сопутствующих признаков, таких как аномальное ветвление, свойственное для одиночного мутанта *fas5* не наблюдалось.

Цветки одиночного мутанта *na-D* фенотипически не отличаются от цветков дикого типа (приложение, рис. 11, А). Цветки растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* фенотипически идентичны цветкам одиночного мутанта *fas5* и характеризуются теми же морфологическими нарушениями (приложение, рис. 11, Б, В). Это подтверждает гипотезу об отсутствии влияния гена *NA* на флоральную меристему.

Таким образом, мутация *na-D* подавляет проявление признака развития фасциации у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*. Высота цветоноса растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, соответствует таковой для растений *na-D* на фоне расы Di ($2,5 \pm 0,8$ см). В то же время у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, наблюдается развитие таких, характерных для одиночного мутанта *fas5* признаков, как развитие ромбовидной листовой пластинки и нарушения морфологии органов цветка, усиливающиеся к апексу соцветия.

Растения *fas5*, гомозиготные по *na-D*, не образовывали цветоноса, как и одиночные гомозиготы *na-D*, и отличались от последних только характерной формой листовой пластинки (рис. 40, Д, Е).

Растения *fas5* гомозиготные по *na-D* образуют несколько большее число розеточных листьев ($7,4 \pm 1,3$), чем у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*, которое приближается к таковому у растений дикого типа.

Особенности структуры АМП двойных мутантов *fas5 na-D*. С целью детального изучения взаимодействия между генами *FAS5/TOP1ALPHA* и *NA* был проведён анализ структуры АМП растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, на стадиях ранней розетки, поздней розетки и раскрытия первых бутонов. Анализ растений *fas5*, гомозиготных по *na-D*, проводился на стадиях ранней и поздней розетки, а также на стадии хронологически совпадавшей с раскрытием первых бутонов у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, но морфологически идентичной стадии поздней розетки. Такой выбор был обусловлен тем, что гомозиготные растения *na-D* либо вообще не переходят на репродуктивную стадию без обработки экзогенным гиббереллином, либо переходят в крайне редких случаях.

АМП растения *fas5*, гетерозиготного по *na-D*, на стадии ранней розетки (стадия 3-х развитых взрослых листьев) имеет более крупные размеры (рис. 41, А, Б), относительно АМП одиночной гетерозиготы *na-D* (рис. 41, В). В некоторых случаях АМП *fas5*, гетерозиготного по *na-D*, демонстрирует деление на части (рис. 41, Б), как и АМП одиночного мутанта *fas5*, что говорит о наличии в её составе "дочерних" меристем. На стадии поздней розетки (стадия 6-ти - 8-ми развитых взрослых листьев) АМП *fas5*, гетерозиготного по *na-D*, уменьшается в размерах относительно предыдущей стадии (рис. 41, Г), хотя всё ещё превосходит по размерам АМП одиночной гетерозиготы *na-D* (рис. 41, Д). Стоит также отметить, что растения *fas5*, гетерозиготные по *na-D*, были склонны к образованию значительного количества боковых побегов, определить принадлежность которых к розеточным побегам или паракладиям было затруднительно из-за сильного укорочения цветоноса (по крайней мере, его вегетативной части). На репродуктивной стадии (стадия раскрытия первых бутонов) АМП растения *fas5*, гетерозиготного по *na-D*, сильно уменьшается в размерах (рис. 41, Е), и становится сравнимой с АМП одиночных гомозигот *na-D* на фоне расы Еп. Увеличения в ходе онтогенеза числа слившихся "дочерних" меристем в составе АМП у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, характерного для одиночного мутанта *fas5*, не наблюдается (рис. 41, А, Б, Г, Е).

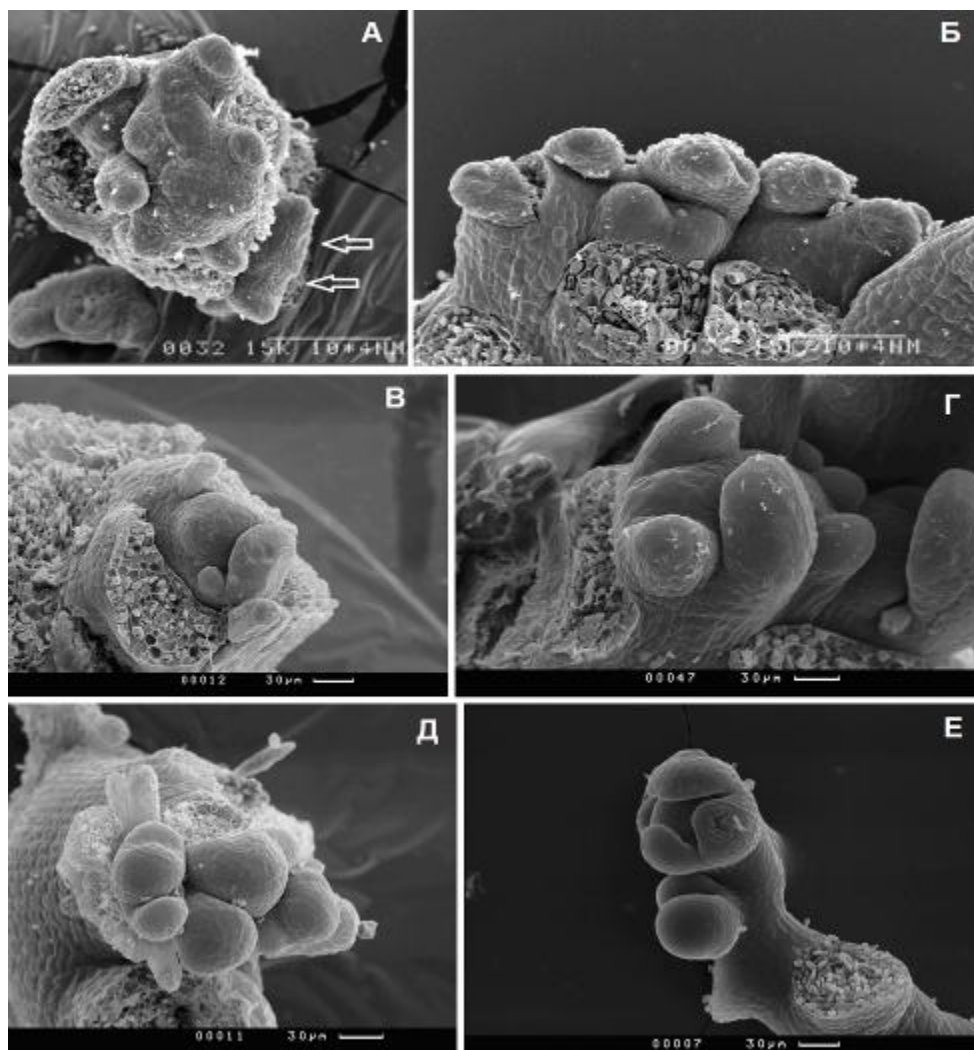


Рисунок 41. АМП растений гетерозиготных по *na-D* на разных стадиях онтогенеза. А, Б - АМП на стадии ранней розетки. В - АМП одиночной гетерозиготы *na-D* на стадии ранней розетки. Г- АМП двойного мутанта на стадии поздней розетки. Д - АМП одиночного гетерозиготы *na-D* на стадии поздней розетки. Е - АМП двойного мутанта на стадии раскрытия первых бутонов. Бары соответствуют: А, Б - 100мкм, В - Е - 30мкм.

Необходимо отметить, что у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, боковые АМП, закладывающиеся в пазухах более поздних листьев были меньше по размерам, чем боковые АМП, закладывающиеся в пазухах более ранних листьев. Так боковая АМП, закладывающаяся в пазухе 1-го листа (рис. 41, А, отмечена стрелками) имеет крупные размеры и морфологически сходна с АМП главного побега. В то же время боковая АМП, закладывающаяся в пазухе 5-го листа (рис. 41, А, отмечена звездочкой) имеет уже значительно меньшие размеры.

АМП растения *fas5*, гомозиготных по *na-D*, на стадии ранней розетки (стадия развитых 3-х взрослых листьев) представляет собой крупную валикоподобную структуру с большим количеством листовых примордиев (рис. 42, А).

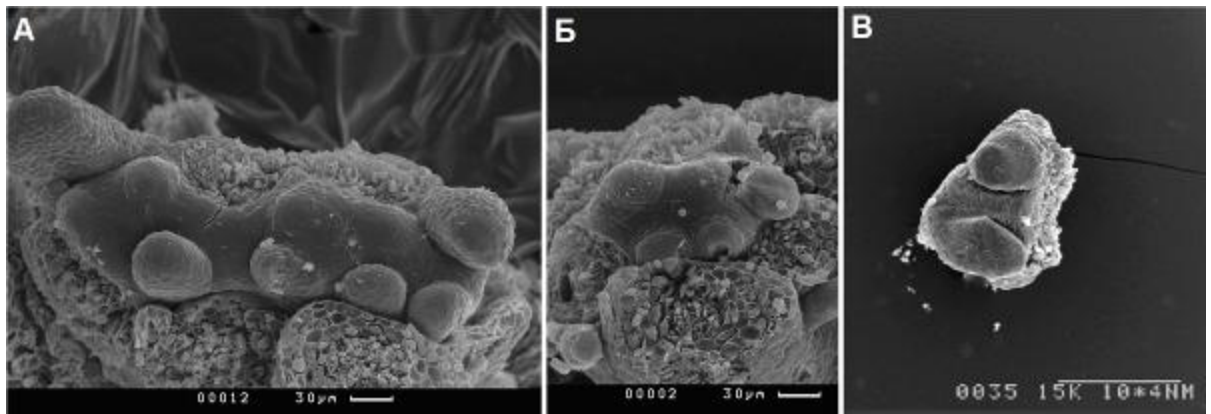


Рисунок 42. АМП растений *fas5* гомозиготных по *na-D* на разных стадиях онтогенеза. А - АМП на стадии ранней розетки. Б - АМП на стадии поздней розетки. В - АМП на стадии, которая хронологически совпадает с началом раскрытия первых цветков у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*. Бары соответствуют: А, Б - 30мкм, В - 100мкм.

На данной стадии АМП двойной гомозиготы *fas5 na-D* по размерам практически идентична АМП *fas5*, гетерозиготного по *na-D* (рис. 41, А, Б). На стадии поздней розетки (стадия 6 развитых взрослых листьев) АМП *fas5* гомозиготного по *na-D* значительно уменьшается в размерах по сравнению со стадией ранней розетки (рис.42, Б). Хотя она по-прежнему сравнима с АМП растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, на такой же стадии (рис. 41, В). Число листовых примордиев при этом также уменьшается. На стадии онтогенеза, хронологически совпадающей со стадией раскрытия первых бутонов у растений *fas5*, гетерозиготных по *na-D*, АМП двойных гомозигот *fas5 na-D* продолжает закладывать примордии листьев и ещё больше уменьшается в размерах (рис. 42, В), хотя и не так существенно, как АМП *fas5*, гетерозиготного по *na-D* (Е).

Это свидетельствует о том, что АМП растений *fas5 na-D* демонстрируют тенденцию к уменьшению размеров в ходе онтогенеза. При этом на самых поздних из наблюдаемых стадий развития у растений, гомозиготных по *na-D*, АМП, переходящие к образованию флоральных примордиев, уменьшаются сильнее, чем АМП растений *fas5*, гомозиготных по *na-D*, продолжающие закладывать примордии листьев.

Таким образом, фенотип АМП двойных мутантов *fas5 na-D* схож с фенотипом АМП двойных мутантов *fas5 clv* тем, что изначально размер АМП увеличен относительно одиночного мутанта *na-D* и также не происходит восстановления фенотипа *na-D* за счёт увеличения размеров АМП. Тем не менее, у двойных мутантов *fas5 na-D* (как гетеро- так и гомозиготных по *na-D*) наблюдается

последовательное уменьшение размеров АМП в ходе онтогенеза, что не встречается у двойных мутантов *fas5 clv*, сохраняющих крупный размер АМП на протяжении всего жизненного цикла.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Функция гена *FAS5* в контроле развития растений

Проведенные исследования показали, что мутация *fas5* вызывает широкий плейотропный эффект. Тем не менее, у мутанта *fas5* можно ряд специфических и не связанных между собой изменений морфологии, которые указывают на участие гена *FAS5* в контроле ряда морфогенетических процессов. Анализ онтогенеза мутанта *fas5* позволил детализировать функцию гена *FAS5* в регуляции развития растений.

4.1.1 Ген *FAS5* контролирует размер и структуру АМП, взаимодействуя с геном *WUS*

Увеличение размеров АМП у мутанта *fas5* свидетельствует об участии гена *FAS5* в ограничении её размеров. При этом увеличение размеров АМП происходит за счёт возникновения в её составе дополнительных слитых меристем, число которых увеличивается в процессе онтогенеза. Тем не менее, размеры самих «дочерних» меристем практически не изменяются, что позволяет сделать вывод об увеличении размеров АМП в основном за счёт развития новых слитых меристем в её составе. В результате этого у мутанта *fas5* увеличивается количество закладываемых примордиев боковых органов стебля, что выражается в повышении числа цветков у мутанта *fas5* относительно дикого типа. На стадии ранней розетки АМП мутанта *fas5* уже демонстрирует увеличенные относительно дикого типа размеры, однако всё ещё является единой структурой. У растений *fas5* на стадии начала АМП ещё сильнее увеличивается относительно дикого типа, слившиеся меристемы на данном этапе развития уже хорошо выражены, но пока относительно малочисленны. На более поздних стадиях их число начнёт прогрессировать, вызывая дальнейшее увеличение размеров АМП мутанта *fas5*. Таким образом, основной функцией гена *FAS5* может являться обеспечение существования единой АМП и предотвращение возникновения множественных меристем в апексе стебля.

Ещё одним свидетельством в пользу данной гипотезы служит образование очагов эктопической пролиферации на поверхности стебля мутанта *fas5*. Очаги эктопической пролиферации на стебле *fas5* имеют различную морфологию в зависимости от их расположения на стебле. На поверхности междоузлий развиваются осевые структуры, возникновение которых может быть следствием эктопической экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток и, возможно, за закладку апикальных меристем. Это предположение хорошо соотносится с наблюдаемым формированием множественных частично слитых меристем в апексе мутанта *fas5*. На поверхности, прилегающей к АМП, на стадии цветения развиваются преимущественно структуры, сходные с рыльцевой тканью. Это может быть результатом эктопической экспрессии генов, отвечающих за развитие генеративных органов и тканей.

Образование очагов эктопической пролиферации на поверхности стебля мутанта *fas5* в совокупности с формированием «множественной» АМП, свидетельствует о роли гена *FAS5*, как ограничителя области экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток, и формирование чёткой зоны их экспрессии. В том числе, возможно, и области экспрессии гена *WUS*. Это подтверждается тем, что у линий *A.thaliana*, суперэкспрессирующих *WUS*, также наблюдаются эктопические новообразования на цветоносе (Xu et al., 2005).

Поскольку в контроле инициации и поддержания гомеостаза пула СК в АМП основную роль играют гены *WUS* и *CLV3*, было исследовано взаимодействие гена *FAS5* с ключевыми генами, контролирующими активность АМП – генами *WUS* и *CLV3*. У двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* наблюдается развитие увеличенной АМП относительно одиночных мутантов *fas5*, *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2*. Тем не менее, если для одиночного мутанта *fas5* характерно развитие увеличенной относительно дикого типа АМП, состоящей из слитых меристем, каждая из которых фенотипически идентична АМП дикого типа, а АМП мутантов *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2* представляют собой единые валикообразные структуры, то у двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* наблюдается такой же эффект, но «дочерние» слитые меристемы в составе АМП приобретают фенотип, характерный для целых АМП одиночных мутантов *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2*. То есть увеличенные относительно дикого типа размеры и характерную вытянутую форму. Этот

характерный для двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* фенотип АМП может быть результатом возникновения нескольких отдельных областей экспрессии *WUS*, в каждой из которых формируется своя петля отрицательной обратной связи *WUS-CLV*. Ещё одним подтверждением служит анализ экспрессии *WUS* и *CLV3* у мутанта *mgo1* (аллельного *fas5*) (Graf et. al., 2010), у которого вместо единой области экспрессии как *WUS*, так и *CLV3* наблюдаются множественные очаги их экспрессии.

Уменьшение роста двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* относительно одиночных мутантов *fas5*, *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2* может являться следствием более ранней потери стволовыми клетками АМП двойных мутантов недетерминированного состояния. На поверхности АМП двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* наблюдается образование значительно большего числа крупных клеток, чем у одиночного мутанта *fas5*. Иногда у двойных мутантов крупные клетки покрывают всю поверхность АМП уже в начале развития соцветия, что, по видимому, и обуславливает значительное укорочение генеративной части цветоноса у двойных мутантов *fas5 clv 1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* по сравнению с одиночными мутантами *fas5*, *clv 1*, *clv2-1* и *clv3-2*.

Таким образом, увеличение размеров АМП двойных мутантов происходит за счёт увеличения размеров составляющих её слившихся меристем. В то же время общая морфология АМП двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2* соответствует таковой у одиночного мутанта *fas5*, что позволяет говорить об аддитивном фенотипе двойных мутантов. Это свидетельствует о том, что гены *FAS5* и *CLV* регулируют гомеостаз АМП по независимым регуляторным путям.

Двойные мутанты *fas5 wus-1* проявляют фенотип, характерный для одиночных мутантов *wus-1*. Тем не менее, фенотип двойных мутантов *fas5 wus-1* жёстче по сравнению с одиночными мутантами *wus-1*. Двойной мутант *fas5 wus-1* образует розетки меньшего диаметра и не способен выбрасывать даже укороченный цветонос, который часто наблюдается у одиночных мутантов *wus-1*. АМП двойного мутанта *fas5 wus-1* фенотипически сходна с АМП одиночного мутанта *wus-1* и также представляет собой плоскую структуру, не имеющую характерной для нормальной АМП куполообразной формы, и имеет меньшие размеры, чем у

одионого мутанта *wus-1*. Возникновения крупных клеток на поверхности АМП растений *fas5 wus-1* не наблюдалось.

Проявление двойными мутантами *fas5 wus-1* фенотипа, сходного с *wus-1* свидетельствует о том, что в отсутствие функции *WUS* фенотипические особенности *fas5*, такие как развитие крупной АМП, состоящей из многих слившихся меристем, и последующего развития фасцированного стебля не происходит. Это говорит о том, что основной причиной развития характерной для *fas5* аномальной АМП является именно эктопическая экспрессия *WUS*. Таким образом, это ещё раз подтверждает выдвигаемую ранее гипотезу об участии гена *FAS5* в обеспечении формирования единой зоны экспрессии *WUS* и предотвращении возникновения очагов его эктопической экспрессии.

Таким образом, можно сделать вывод, что ген *FAS5* обладает двумя важными функциями в регуляции гомеостаза АМП. Первой является формирование единственной области экспрессии *WUS* (а, следовательно, и *CLV3*) и предотвращение развития очагов его эктопической пролиферации, что обеспечивает формирование нормальной АМП и, как следствие, дальнейшее развитие нормальной структуры растительного организма.

4.1.2. Ген *FAS5* участвует в поддержании недетерминированности клеток АМП

У мутанта *fas5* на поверхности АМП отмечено возникновение крупных клеток. Крупные клетки, часто наблюдаемые на поверхности АМП мутантных растений *fas5* морфологически сходны с клетками, перешедшими от делений к эндоредупликациям, т.е. к удвоению ДНК без последующего деления клетки, что приводит к возникновению более крупных полиплоидных клеток. Это характерно для дифференцирующихся клеток (De Veylder et al., 2011) и не является типичным для СК меристем, которые поддерживаются в недифференцированном состоянии. Это говорит о возможных нарушениях механизмов поддержания СК в недетерминированном состоянии у мутанта *fas5*.

Ещё одним признаком, свидетельствующим об усилении клеточных эндоредупликаций у мутанта *fas5*, является развитие на поверхности листовой пластинки мутантных растений аномально разветвлённых трихом (трихомы с 4-мя

ветвями), которые не встречаются у дикого типа. Сходный феномен наблюдался в экспериментах по суперэкспрессии гена *BLT A.thaliana*. Суперэкспрессия копии гена *BLT* под контролем промотора *GL2* (Kasili et al., 2011) приводила к развитию аномально разветвлённых трихом (5 и более ветвей), а также серьёзно увеличивала количество ДНК в клетках трихом (Kasili et al., 2011). Это говорит о наличии связи между степенью ветвистости трихом и количеством актов эндоредупликации. Также на поверхности листовой пластинки мутанта *fas5* наблюдается развитие крупных клеток, значительно превосходящих размерами те, что встречаются у растений дикого типа. Показано, что размер клеток эпидермиса листа прямо пропорционален их ploидности. Так, например, у мутанта *an3 A.thaliana*, характеризующегося уменьшением размера листовой пластинки за счёт уменьшения размеров клеток и одновременным увеличением размеров самих клеток. Стоит отметить, что морфология листовой пластинки у мутанта *fas5* имеет некоторое сходство с таковой у *an3*. Тем не менее, обязательной зависимости между размером клеток листа и их ploидностью показано не было (Fujikura et al., 2007)

Это свидетельствует об участии гена *FAS5* в регуляции перехода клеток к эндоредупликациям. *FAS5* может служить репрессором перехода клеток к циклу эндоредупликации, что позволяет поддерживать клетки АМП в недетерминированном состоянии.

Ужесточение фенотипа *Wus*⁻ у двойного мутанта *fas5 wus-1* по сравнению с одиночным *wus-1* скорее всего является следствием потери клетками АМП двойного мутанта недетерминированного состояния. Это подтверждает участие *FAS5* в механизмах, обеспечивающих недетерминированное состояние стволовых клеток в АМП *A.thaliana*.

Таким образом, ещё одна важная функция *FAS5* заключается в поддержании стволовых клеток АМП в недетерминированном состоянии, что предотвращает её преждевременную терминацию и обеспечивает нормальную закладку органов и развитие растительного организма.

4.1.3. Ген *FAS5* участвует в контроле восприятия фотопериодического сигнала

Нами обнаружено существенное нарушение развития надземной части растений *fas5* в условиях короткого светового дня. Сильное растяжение междоузлий розетки и нарушение перехода к цветению у растений *fas5* в условиях короткого светового дня может быть следствием нарушений у данного мутанта ответа на световые стимулы. Фотопериод является одним из факторов внешней среды, индуцирующих переход на репродуктивную стадию и, соответственно, связанные с этим перестройки в АМП. В составе данного механизма можно выделить три основных компонента: фоторецепторы, внутренние часы (циркадные ритмы) и пути передачи сигнала от внутренних часов и фоторецепторов к генам, непосредственно индуцирующим цветение (Simpson, 2003). Свет воспринимается фитохромами (PHY) А-Е и криптохромами (CRY) 1 и 2, в то время как продолжительность светлого и тёмного периода измеряется циркадными ритмами (Simpson, 2003).

Растения, несущие мутации в генах фитохромов, демонстрируют морфологические нарушения, сходные с наблюдаемыми у растений *fas5*, культивирующихся в условиях короткого дня (Devlin et al., 1998). Так например мутанты *A.thaliana phyA phyB*, несущие мутации в генах фитохромов А и В, характеризуются удлинением междоузлий розетки в ответ на воздействие дальнего красного света в конце светового периода. В то же время тройные мутанты *phyA phyB phyE* демонстрировали удлинение междоузлий розетки и без воздействия дальнего красного света (Devlin et al., 1998). Тем не менее, мутанты *phyA phyB* и *phyA phyB phyE* характеризуются ранним зацветанием относительно дикого типа как в условиях короткого (Devlin et al., 1998), так и длинного светового дня, в то время как растения *fas5* в условиях короткого дня либо вообще не переходят к цветению, либо переходят с большой задержкой.

Показано, что при выращивании проростков *A.thaliana* в темноте в АМП происходит серьёзное увеличение области и уровня экспрессии генов *CLV3* и *CLV1*, в то время как область и уровень экспрессии *WUS* не претерпевает значимых изменений (Yoshida et al., 2011). Помимо этого в АМП проростков *A.thaliana* наблюдается сокращение области активности синтетического репортера цитокининового ответа *TCS*, что говорит о снижении уровня цитокининового

сигнала (Yoshida et al., 2011), играющего важнейшую роль в поддержании активности АМП. Нарушение развития мутанта *fas5* в условиях короткого дня может быть также следствием участия гена *FAS5* в пути регуляции экспрессии ключевых для поддержания АМП генов световыми сигналами.

Цветки мутанта *fas5*, образованные в условиях короткого дня, фенотипически не отличались от базальных цветков *fas5*, развивавшихся в условиях длинного дня. Серьезных морфологических нарушений при этом не наблюдалось. Это может быть следствием того, что растения *fas5*, перешедшие к цветению в условиях короткого дня, успевали образовывать в среднем около 2-х цветков, прежде чем их АМП прекращала существование, образуя терминальную структуру. Сама терминальная структура представляла собой цветок, часто с увеличенным числом органов во 2-ой и 3-ей мутовках, или же бифуркацию цветка.

Таким образом, можно предполагать, что ген *FAS5* является регулятором генов, участвующих в развитии ответа на световые стимулы. Тем не менее, отличия во времени перехода к цветению у мутанта *fas5* и мутантов по генам фито хромов, говорит об участии гена *FAS5* в других механизмах регуляции ответа на световые стимулы или же перехода к цветению. Например, ген *FAS5* может участвовать в генетических механизмах, обеспечивающих изменение экспрессии генов, поддерживающих АМП и обеспечивающих переход к цветению, в ответ на световые стимулы. Преждевременная терминация АМП и развитие терминальной структуры у растений *fas5* в условиях короткого светового дня может являться дополнительным свидетельством, что *FAS5* является интегратором генетических механизмов, регулирующих морфогенез растения и переход на репродуктивную стадию в ответ на световые сигналы.

4.1.4. Ген *FAS5* участвует в контроле перехода на репродуктивную стадию, взаимодействуя с геном *LFY*

Более ранний выброс цветоноса у мутанта *fas5* может быть обусловлен более ранним переходом мутантных растений к цветению относительно дикого типа. Об этом также свидетельствует сокращение числа листьев розетки мутанта *fas5* по сравнению с растениями дикого типа. Сходный фенотип характерен для линий, несущих мутации в генах, контролирующих переход к вегетативной стадии

развития в период после прорастания семени. Так как большинство генов, обеспечивающих переход к вегетативной стадии, являются негативными регуляторами генов-индукторов цветения, можно предполагать, что ген *FAS5* является позитивным регулятором генов вегетативной стадии. В результате мутации *FAS5* их активность может снижаться, что приводит к более раннему переходу к репродуктивной стадии, что выражается в сокращении числа розеточных листьев и ускоренном выбросе цветоноса. Серьёзное увеличение числа стеблевых листьев у растений *fas5* с развитой фасциацией стебля может быть следствием образования большого числа слившихся осей в составе единого стебля, расположение вегетативных узлов на которых может не совпадать. Вследствие чего на стебле формируется большое количество близкорасположенных стеблевых листьев.

Известно, что в контроле перехода к цветению и развитию цветка важнейшую роль играет ген *LFY*. Поэтому нами было исследовано взаимодействие гена *FAS5* с этим геном.

Показано, что у двойного мутанта *fas5 lfy-10* наблюдается ускорение выброса цветоноса по сравнению с одиночным мутантом *lfy-10*, который характеризуется некоторой задержкой цветения на фоне расы Dijon. Выброс цветоноса у растений *fas5 lfy-10* происходил практически одновременно с растениями *fas5*, у которых, как уже упоминалось выше, наблюдается ускорение выброса цветоноса относительно растений дикого типа. Это свидетельствует об участии гена *FAS5* в регуляции перехода к цветению в качестве негативного регулятора данного перехода. В организме *A.thaliana* в течение вегетативной стадии развития гены инициации цветения находятся в репрессированном состоянии и переход к репродуктивной стадии фактически осуществляется за счёт снятия данной репрессии со стороны генов регуляторов вегетативной стадии (см. обзор литературы). Это даёт возможность предположить, что ген *FAS5* либо является негативным регулятором генов индукторов цветения, либо положительно регулирует экспрессию генов, репрессирующих переход к репродуктивной стадии.

Также на фоне *fas5* наблюдается усиление экспрессивности слабого аллеля *lfy-10*. Усиление экспрессивности *lfy-10* выражается в трансформации всех цветков двойного мутанта *fas5 lfy-10*, что явно свидетельствует о важной роли гена *FAS5* в

поддержании активности гена *LFY*. Аналогичный фенотип, выражающийся в трансформации цветков в вегетативные побегоподобные структуры, характерен для двойных мутантов *lfy ap1*, у которых нарушены оба ключевых гена инициации цветения (Huala and Sussex, 1992).

Таким образом, ген *FAS5* выполняет две важные и разнонаправленные функции в процессе перехода организма *A.thaliana* к цветению. Первая – на стадии выброса цветоноса, где *FAS5* играет роль негативного регулятора, задерживающего выброс и развитие цветоноса. Стоит отметить, что на данном этапе, скорее всего, *FAS5* действует опосредованно, возможно индуцируя экспрессию генов ответственных за репрессию перехода на репродуктивную стадию. Это подтверждается усилением экспрессивности слабого аллеля *lfy-10* на фоне мутации *fas5*: в случае наличия супрессорного воздействия *FAS5* непосредственно на *LFY*, в отсутствие функции *FAS5* усиления экспрессивности мутантных аллелей *LFY* не наблюдалось бы. В то же время наблюдаемое усиление экспрессивности *lfy-10* у двойного мутанта *fas5 lfy-10* является свидетельством участия *FAS5* в положительной регуляции *LFY*, напрямую или опосредованно, индуцируя, таким образом, развитие флоральной меристемы.

Стоит также отметить, что увеличение побегоподобности цветков ранее наблюдалось также у двойных мутантов *fas5 ap1-2*, *fas5 ap1-1* и *fas5 ap2-1* (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2015). Это даёт основания предполагать, что мишенью положительной регуляции со стороны *FAS5* может являться, в том числе, и ген *API*. Учитывая, что гены *LFY* и *API* формируют петлю положительной обратной связи (Wellmer, Riechmann, 2010), то возможно, что *FAS5* индуцирует экспрессию *LFY* через индукцию *API* или наоборот. Стоит также отметить, что положительная регуляция со стороны *FAS5* действует, скорее всего, только на один из генов пары *LFY* - *API*, о чём говорит отсутствие каких-либо признаков побегоподобности у цветков одиночного мутанта *fas5*.

Таким образом, можно заключить, что ген *FAS5* принимает участие в таких важных процессах, как переход на репродуктивную стадию, индукция развития флоральной меристемы. *FAS5* негативно регулирует переход к репродуктивной стадии, видимо индуцируя регуляторные гены, супрессирующие активность генов перехода к цветению. Потеря функции *FAS5* приводит к более раннему выбросу

цветоноса и зацветанию. При этом *FAS5* индуцирует развитие флоральной меристемы, положительно регулируя один из ключевых генов цветения - *LFY* или *API*.

4.1.5. Ген *FAS5* участвует в контроле развития цветка

У цветков растений *fas5* наблюдается тенденция к усилению морфологических нарушений у апикальных цветков по сравнению с базальными. В направлении от базиса соцветия к его апексу у цветков *fas5* прослеживается чёткая тенденция к сокращению числа органов во 2-й и 3-ей мутовках, а также к увеличению доли аномальных органов 2-й и 4-ой мутовок (филаментоподобные лепестки и деформированные плодолистики). При этом доля химерных органов 3-ей мутовки (карпеллоидные тычинки) достоверно не изменяется у апикальных цветков в сравнении с базальными. Данный феномен может являться следствием увеличения активности гена *AG*. Сокращение числа органов цветка преимущественно в 2-й и 3-й мутовках характерно для линий, несущих нарушения в негативных регуляторах гена *AG*, таких, как *LUG*, *SEU* и *SLK*, у которых наблюдается эктопическая экспрессия *AG* (Conner and Liu, 2000; Bao et al., 2010). Для гена *AG* характерно постепенное усиление экспрессии в ходе онтогенеза, что может приводить к постепенному усилению нарушений развития цветка у более апикально расположенных цветков. В пользу гипотезы об участии гена *FAS5* в пространственном ограничении экспрессии гена *AG* также свидетельствует развитие структур сходных с рыльцевой тканью и семяпочками на стебле мутанта *fas5*. Увеличение числа органов 4-ой мутовки (плодолистиков), которое наблюдается у цветков *fas5* и не изменяется значительно у цветков различных ярусов, может быть следствием увеличения размеров АМП. Сходные феномены наблюдаются и у других линий, несущих мутации в негативных регуляторах активности АМП, таких как *clv2* и *clv3* (Fletcher et al., 1999).

Цветки двойных мутантов *fas5 ap2-14* фенотипически практически не отличаются от цветков одиночного мутанта *ap2-14*, за исключением увеличения числа плодолистиков в 4-ой мутовке. Стоит отметить, что для цветков двойного мутанта *fas5 ap2-1* (содержащего мягкий аллель *ap2*) характерно усиление экспрессивности мягкого аллеля *ap2-1*, а также усиление побегоподобности

цветков, что более характерно для мутантов *ap1* (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2015). Отсутствие усиления экспрессивности нуль-аллеля *ap2-14* в совокупности с наличием такового у мягкого аллеля *ap2-1* на фоне *fas5*, говорит о наличии индуцирующего воздействия гена *FAS5* на ген *AP2*. Отсутствие признаков побегоподобности цветков *fas5 ap2-14* может быть следствием значительного усиления активности гена *AG* при полном отсутствии активности *AP2*, являющегося негативным регулятором *AG* (Drews et al., 1991). *AG* играет ключевую роль в терминации флоральной меристемы, подавляя экспрессию *WUS* (Lenhard et al., 2001). По-видимому, именно отсутствие экспрессии *WUS* и является причиной отсутствий признаков побегоподобности у цветков *fas5 ap2-14*. Аналогичное снижение побегоподобности наблюдалось и у цветков двойного мутанта *ap1-1 ap2-2*, несущего оба сильных аллеля, по сравнению с цветками *ap1-1 ap2-1*, у которого аллель *ap2-1* частично функционален (Bowman et al., 1993).

Цветки двойных мутантов *fas5 pi* демонстрировали усиление нарушений у апикальных цветков в сравнении с базальными. Для цветков двойного мутанта прослеживается чёткая тенденция к уменьшению числа органов (чашелистиков) во 2-й и 3-й мутовках и увеличению числа органов (плодолистиков) в 4-й мутовке в направлении от базиса соцветия к апексу. Также присутствовала тенденция к увеличению доли аномальных органов в 3-й и 4-й мутовках. Таким образом, наблюдается та же тенденция к усилению нарушений цветка от базальных цветков к апикальным, что и у цветков одиночного мутанта *fas5*. Стоит отметить, что изменения органов цветка двойного мутанта носят такой же характер, как и у одиночного мутанта *fas5*: развитие узких или филаментоподобных структур и развитие деформированных плодолистиков. Развитие филаментоподобных структур наблюдалось во 2-й мутовке, как и у одиночного *fas5*, в то же время деформированные плодолистики развивались не только в 4-ой, но и в 3-ей мутовке, где у одиночного мутанта *fas5* часто развиваются карпеллоидные тычинки, в то время как у *pi* органы 3-ей мутовки представлены плодолистиками. Таким образом, с одной стороны наблюдается аддитивный фенотип цветков *fas5 pi*, с другой характер нарушений цветков *fas5 pi* говорит о росте активности гена *AG*. Что ещё раз подтверждает участие гена *FAS5* в ограничении активности *AG*.

Анализ цветков одиночного мутанта *fas5* и двойных мутантов *fas5 ap2-14*, *fas5 pi* позволяет заключить, что ген *FAS5* ограничивает активность гена *AG* во флоральной меристеме, что обеспечивает нормальное развитие цветка. Наблюдаемое снижение продуктивности растений *fas5* по сравнению с растениями дикого типа, впервые показанное в работе У.Н. Кавай-оол (2011), может являться следствием прогрессирующих морфологических нарушений цветка, приводящим в том числе и к серьезным изменениям морфологии плодолистиков и стручков, что может влиять на развитие семян. Тем не менее, уменьшение количества семян, созревающих в базальных стручках, имеющих нормальную морфологию, говорит о возможном нарушении экспрессии генов, отвечающих за развитие семязачатков.

4.1.6. Плейотропный эффект мутации *fas5* – результат мутации в гене топоизомеразы I

Анализ локализации *fas5* методом высокопараллельного секвенирования нового поколения, проведенный группой А.А. Пенина установил точную локализацию мутации *fas5* в гене *TOP1ALPHA*, кодирующем ДНК-топоизомеразу Ia. Мутация *fas5* расположена в конце 9-го экзона гена *TOP1ALPHA* и приводит к возникновению стоп-кодона, что вызывает синтез усеченного белкового продукта, лишённого С-концевого домена.

Известно, что у *A.thaliana* присутствует два гена, кодирующих ДНК топоизомеразу IB типа - *TOP1ALPHA* (в дальнейшем просто *TOP1*) и *TOP1BETA*. Данные гены локализируются тандемно на хромосоме V *A.thaliana* и демонстрируют большую степень гомологии друг с другом, что свидетельствует об их происхождении в результате дупликации (Takahashi et al., 2002). Несмотря на высокую степень гомологии, данные гены функционально не равноценны. Мутации в гене *TOP1* приводят к многочисленным морфологическим нарушениям (Laufs et al., 1998; Takahashi et al., 2002; Graf et al., 2010), в то время как трансгенные линии *A.thaliana*, несущие конструкцию, обеспечивающую РНК-интерференцию гена *TOP1BETA*, не имеют никаких выраженных нарушений развития (Takahashi et al., 2002). Тем не менее, для нормального развития организма *A.thaliana* необходимы оба гена *TOP1* и *TOP1BETA*. Растения *A.thaliana*, у которых были инактивированы оба гена, прекращали развитие на

стадии проростка, хотя не имели при этом никаких видимых морфологических нарушений (Takahashi et al., 2002).

Стоит отметить, что топоизомеразы играют важную роль в регуляции развития живых организмов. Основной функцией ДНК топоизомераз является релаксация сверхспирализации ДНК. ДНК топоизомеразы могут быть разделены на 2 типа: I – не зависящие от АТФ и расщепляющие одну цепь ДНК, и II – требующие АТФ и расщепляющие обе цепи ДНК (обзор Бургеев, 2009). На данный момент ДНК топоизомеразы обнаружены у большого количества живых организмов, принадлежащих к самым разным таксономическим группам: вирусы, археи, бактерии, грибы, растения, животные. Стоит отметить, что каталитический С-концевой домен, играющий ключевую роль в функционировании ДНК топоизомераз, эволюционно консервативен у представителей разных, в том числе, и отдалённых таксонов (обзор Бургеев, 2009). Контроль сверхспирализации играет важную роль в таких биологических процессах, как рекомбинация, репликация и транскрипция. Особенно чувствительными к сверхспирализации являются процессы инициации репликации и транскрипции, а также дифференциальная экспрессия различных генов, так как сверхспирализация делает некоторые участки ДНК доступными для связывания регуляторных белков (обзор Бургеев, 2009). Таким образом, ДНК топоизомеразы, релаксируя сверхспирализацию, способны регулировать дифференциальную экспрессию генов. Так показано, что ДНК топоизомеразы (I и II) необходимы для инициации и терминации транскрипции, так как обеспечивают диссоциацию нуклеосом в промоторных участках и сайтах терминации (Durand-Dubief et al., 2010, 2011). Тем не менее, влияние ДНК топоизомераз на экспрессию генов остаётся недостаточно изученным.

Данные о функции ДНК-топоизомераз объясняют выявленный нами плейотропный эффект мутации *fas5* на развитие растений. Тем не менее, у мутанта *fas5* выявлены ряд специфических изменений морфологии, которые указывают на то, что у топоизомеразы, кодируемой геном *TOP1*, есть специфические гены-мишени, участвующие в контроле морфогенеза. Такими мишенями могут быть гены, отвечающие за формирование единой области экспрессии *WUS* (а значит и *CLV3*) и предотвращение его эктопической экспрессии. Об этом свидетельствует формирование у мутанта *fas5* множественной АМП и эктопических очагов

пролиферации на стебле. При этом ген *TOP1* действует по независимому от генов *CLV* пути, о чём говорит аддитивный фенотип двойных мутантов *fas5 clv*. В число мишеней гена *TOP1* могут также входить гены, регулирующие переход клеток к эндоредупликациям, свидетельством чего являются крупные клетки на поверхности АМП мутанта *fas5*. Помимо этого ген *TOP1* положительно регулирует экспрессию генов, репрессирующих переход к цветению, в результате потери функции гена *TOP1* у мутантной линии *fas5* ускоряется выброс цветоноса и переход на репродуктивную стадию. В то же время уже после индукции цветения ген *TOP1* индуцирует экспрессию одного из ключевых генов цветения – *LFY* или *API*. Непосредственно в апикальной меристеме цветка регуляторная роль *TOP1* сводится к ограничению активности гена С-класса *AG*, что обеспечивает корректное морфологическое развитие цветка.

Мутации в данном гене ранее были полученные и другими исследовательскими группами (Laufs et al., 1998; Takahashi et al., 2002; Graf et al., 2010). Мутанты *mgol-1* (Laufs et al., 1998) и *mgol-4* (Graf et al., 2010), полученные соответственно на фоне расы Col и линии Ler, демонстрируют сходный фенотип с мутантом *fas5*. Данные мутанты образуют увеличенную и фрагментированную АМП, что ведёт к развитию фасциации стебля, а также характеризуются нарушением филлотаксиса, морфологии листовой пластинки, сокращением числа розеточных листьев и морфологическими нарушениями цветка (Laufs et al., 1998; Graf et al., 2010).

Показано, что в АМП мутанта *mgol-1* образуются множественные области экспрессии таких генов, как *KNAT2* и *STM* (Laufs et al., 1998), в то время как у мутанта *mgol-4* показано наличие множественных очагов экспрессии *WUS* и *CLV3* (Graf et al., 2010) о подтверждает предположение о важной роли *TOP1ALPHA* в обеспечении формирования единой области экспрессии *WUS* и *CLV3*, что обуславливает нормальное развитие АМП. Двойные мутанты *mgol-1 fas1* и *mgol-1 fas2* характеризуются остановкой развития на стадии семядолей, так как их АМП теряет способность образовывать примордии органов (Laufs et al., 1998). Аналогичный фенотип характерен и для двойных мутантов *fas1 wus*, *mgol-4 wus* (Graf et al., 2010) и *fas5 wus-1*. Это говорит о том, что ген *TOP1* взаимодействует с генами фактора сборки хроматина 1 - *FAS1* и *FAS2* для поддержания стволовых клеток АМП в недетерминированном состоянии. Также показано, что мутация *ag*

рецессивно эпистатирует мутацию *mgol-4*: цветки двойного мутанта *mgol-4 ag* демонстрируют фенотип, характерный для цветков одиночного мутанта *ag* (Graf et al., 2010). При этом у мутанта *mgol-4* показано наличие очагов эктопической экспрессии экспрессия *AG* в розеточных листьях, цветоножках и генеративной части цветоноса, что хорошо соотносится с наблюдаемыми эктопическими структурами, сходными с семяпочками или рыльцевой тканью на поверхности цветоноса *fas5*. Область экспрессии *AG* непосредственно в цветках сильно расширяется относительно дикого типа (Graf et al., 2010). Это подтверждает участие гена *TOP1* в ограничении области экспрессии *AG* и предотвращении возникновения эктопических очагов его экспрессии.

Мутант *top1 α -1* (Takahashi et al., 2002), полученный на фоне расы Col, имеет гораздо более слабое проявление, чем *mgol-1*, *mgol-4* и *fas5*. АМП мутанта *top1 α -1* не увеличивается в размерах относительно АМП растений дикого типа, из видимых нарушений присутствовали только нарушение филлотаксиса, морфологические нарушения листовой пластинки розеточного листа и морфологические нарушения цветка.

Согласно данным по локализации описанных мутаций в гене *TOP1* и данным анализа структуры белка *TOP1 in silico* для полной потери функциональности продукта *TOP1* достаточна потеря участка С-концевого каталитического домена, содержащего активный центр фермента. Все проанализированные *in silico* мутации приводят к потере С-концевого фрагмента белка, содержащего активный центр фермента. Таким образом, все мутации: *mgol-1*, *mgol-4*, *top1 α -1* и *fas5* являются аллелями с высокой экспрессивностью. В свете данного наблюдения можно предполагать, что слабая экспрессивность мутации *top1 α -1* в сравнении с мутациями *mgol-1*, *mgol-4* и *fas5* обусловлена не локализацией мутации *top1 α -1*, а условиями выращивания растений. При выращивании растений *fas5* в условиях комнаты с постоянными климатическими условиями (см. материалы и методы) можно было наблюдать развитие крупной фрагментированной АМП. Однако при выращивании растений *fas5* в климатической камере увеличения размеров АМП и развития в её составе частично слившихся «дочерних» меристем не наблюдалось (приложение, рис. 12).

Несмотря на проведенные зарубежные исследования аллельных мутантов *mgol-1*, *mgol-4* и *top1a-1*, ряд признаков, которые обнаружены у мутанта *fas5*, ранее описаны не были. Уникальными особенностями мутации *fas5* являются формирование очагов эктопической пролиферации на поверхности стебля, ускоренный выброс цветоноса и переход на репродуктивную стадию, а также нарушение развития в условиях короткого дня.

Таким образом, исследования мутанта *fas5* подтверждают данные об участии гена *TOP1* в большом количестве важных регуляторных процессов, обеспечивающих нормальный рост и развитие *A.thaliana*. Кроме того, они показывают, что ген *TOP1* контролирует также ответ на некоторые факторы внешней среды, а именно на продолжительность фотопериода. Недавно показано, что у растений, мутантных по гену *TOP1* (линия *top1a-2*) среди генов с изменённой экспрессией перепредставлены гены, являющиеся мишенями регуляции PcG (Liu et al., 2014). У мутанта *top1a-2* было выявлено около 794 гена, уровень экспрессии которых изменился. При этом число генов, у которых уровень экспрессии снизился, приблизительно в 3 раза превышало численность тех, чей уровень экспрессии возрос. При этом среди генов со снизившейся экспрессией были перепредставлены гены, аннотированные как участвующие в регуляции процессов развития и репродукции (Liu et al., 2014). Приблизительно 30% дифференциально экспрессирующихся генов у *top1a-2* являются мишенями регуляции PcG. Помимо этого было выявлено увеличение плотности нуклеосом как в транскрибируемых частях генов, так и в 5'- и 3'-межгенных участках. Увеличение плотности нуклеосом наблюдалось у всех генов, вне зависимости от их уровня экспрессии и вне зависимости от того, являлись ли данные гены мишенями PcG или нет (Liu et al., 2014). Стоит отметить, что мутация *top1a-2* не влияет на распределение нуклеосом в районе сайта инициации транскрипции (СИТ). В то же время гены, являющиеся мишенями PcG, в норме не имеют 5'-участка свободного от нуклеосом в районе СИТ, что делает их особо чувствительными к увеличению плотности нуклеосом в отсутствие функции гена *TOP1a*. Так как гены регулируемые PcG комплексом являются важными участниками ряда процессов развития, нарушение их экспрессии приводит к многочисленным нарушениям развития (Liu et al., 2014).

А. А. Пениным и его сотрудниками также был проведён анализ изменения экспрессии в апексах соцветий у мутанта *fas5* методом RNA-seq (Альберт, Клепикова, Демиденко, Ежова, Логачева, Пенин, 2014). Было выявлено 1130 дифференциально экспрессирующихся генов; среди них у 520 наблюдалось снижение уровня экспрессии, и у 610 – увеличение. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов с использованием пакета Pathway Studio 9.0 не выявил присутствия среди них известных генов, участвующих в регуляции гомеостаза АМП. Тем не менее, была показана вовлеченность гена *TOP1* в пути синтеза абсцизовой кислоты и ауксина.

Нарушение функционирования этих путей может приводить к наблюдаемому фенотипу мутанта. Так показано, что ключевую роль в определении места экспрессии ключевых генов поддержания АМП – *WUS* и *CLV3* играет соотношение градиентов ауксина и цитокинина.

Например в работах по индукции эмбриогенеза в каллусах, что на среде с ауксином в центральной части каллуса происходит накопление ауксина. При переносе на среду без ауксина наблюдалась поляризации белка PIN1, ответственного за вынос ауксина из клеток, в результате чего формировался ауксиновый градиент и устанавливалась неравномерная концентрация ауксина в периферических слоях каллуса (Su, Zhang, 2009; Wisniewska et al., 2006). Одновременно, в зонах с наименьшей концентрацией ауксина индуцировалась экспрессия вначале *WUS*, а в дальнейшем и *CLV3*. Области экспрессии этих генов в формирующихся соматических эмбриоидах в целом соответствовали таковым в зиготических эмбрионах, хотя и были несколько расширены. Подтверждения решающей роли ауксинового и цитокининового градиента подтверждается и в работах, проведённых на зиготических эмбрионах (см. обзор литературы, раздел закладка и развитие АМП в эмбриогенезе). У зиготических эмбрионов разметка апикального домена и определение будущей области экспрессии *WUS* (а значит и всей АМП) обеспечивается установлением полярного транспорта ауксина. В результате этого ауксин начинает накапливаться в периферической зоне апикального домена, а в центральной зоне, где его концентрация снижается, индуцируется экспрессия генов, ответственных за синтез цитокинина и возникает цитокининовый максимум (который и определяет место экспрессии *WUS*). Таким

образом, возможные нарушения в распределении ауксина и цитокинина и формировании их локальных максимумов и минимумов способны привести к некорректному развитию области экспрессии *WUS* и *CLV3*, и, возможно, к возникновению множественных очагов их экспрессии.

Также нарушение цитокининового и ауксинового регуляторных путей может быть следствием нарушения восприятия световых сигналов, которое наблюдается у мутанта *fas5*. Показано, что в АМП проростков томата, выращивавшихся в темноте, наблюдалось нарушение полярного распределения и дальнейшее исчезновение из мембран клеток белка PIN1, ответственного за полярный транспорт ауксина (Yoshida et al., 2011). Вместе с этим происходило серьёзное падение уровня ауксина во всей АМП и полное прекращение закладки листовых примордиев (Yoshida et al., 2011). Свидетельства падения уровня цитокинина в АМП в темноте были получены и на проростках *A.thaliana* (Yoshida et al., 2011). Таким образом, световые стимулы оказывают влияние на гормональные регуляторные пути, обеспечивающие, как упоминалось выше, корректную экспрессию *WUS* и *CLV3*. Учитывая, что у мутанта *fas5* нарушается ответ на световые стимулы, можно предполагать, что это оказывает влияние и на гормональные пути регуляции в АМП мутанта, а значит, может влиять и на общую архитектуру АМП и влиять на развитие надземной части растения.

Растительный гормон абсцизовая кислота (АБК) регулирует ряд процессов, связанных с ростом и развитием растений, играет важнейшую роль в развитии ответа на изменение условий окружающей среды, в том числе стрессовые воздействия (Cutler et al., 2010; Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki, 2013). В последнее время показано, что АБК-зависимые регуляторные пути взаимодействуют со светозависимыми регуляторными путями. Так показано, что мутант *A.thaliana bbx21-1* (содержащий мутацию в одном из генов, ответственных за изменение морфогенеза в ответ на световые сигналы) характеризуется повышенной чувствительностью к воздействию экзогенной АБК (Xu et al., 2014). Мутанты *bbx21* также теряли воду гораздо медленнее, чем растения дикого типа, так как предотвращение чрезмерной потери воды путём закрытия устьиц регулируется АБК, то это ещё раз свидетельствует о большей активности АБК-зависимых регуляторных путей у мутантов *bbx21* (Xu et al., 2014). При этом было

показано, что ген *BBX21* взаимодействует с геном *HY5*, контролирующим фотоморфогенез (Osterlund et al., 2000), в регуляции гена *ABI5*, являющегося участником передачи АБК сигнала (Xu et al., 2014). В то время как продукт *HY5* является активатором *ABI5*, продукт *BBX21* репрессирует его активность, присоединяясь к промотору *ABI5* и предотвращая связывание активатора *HY5*. В свою очередь, *ABI5* участвует в репрессии прорастания семян обеспечении ареста развития после прорастания (Lopez-Molina et al., 2001). Таким образом, нарушение ответа на световые сигналы у мутанта *fas5* может влиять на чувствительность растения к АБК и передачу АБК-сигнала, что способно вызывать дефекты развития.

4.2. Функция гена *NA* в контроле развития растений

Мутант *na-D* является объектом изучения на кафедре генетики уже многие годы. Полученные в результате анализа мутанта *na-D* в предыдущих работах данные позволяют предполагать участие гена *NA* в ограничении объёма пула стволовых клеток АМП, а также ограничении их пролиферативной активности (Ezhova et al., 2002; Lebedeva et al., 2004).

Доминантный характер мутации чаще всего обусловлен эктопической или оверэкспрессией мутантного аллеля. В этом случае уменьшение объёма пула стволовых клеток и общих размеров АМП, а также уменьшение размеров клеток междоузлий относительно растений дикого типа, свидетельствует в пользу функции гена *NA* как негативного регулятора общего роста растения (Lebedeva et al., 2004).

Также мутация *na-D* может являться доминантно-негативной (антиморфной). К данному типу относятся мутации, нарушающие функцию нормального аллеля в гетерозиготе. Чаще всего в этих случаях продукты обоих аллелей входят в состав одного мультибелкового комплекса. Включение в такой комплекс дефектного белка (продукта мутантного аллеля) приводит к нарушению его работы и доминантному или полудоминантному типу наследования мутации. Если предполагать доминантно-негативную природу мутации *na-D*, то функцией нормального аллеля *NA* будет уже не негативный, а позитивный контроль развития растения. Это подчёркивает необходимость дальнейших исследований гена *NA*, как важного регулятора развития растения.

Трактовка функции гена *NA* осложняется еще и тем, что нами выявлено влияние генетического фона на фенотипическое проявление мутации *na-D*. На фоне родительского экотипа *En* мутация *na-D* наследуется по строго моногенному доминантному типу – гомо- и гетерозиготы *na-D* являются карликами, фенотипическое отличие гетерозиготных растений от гомозиготных заключается только в их способности переходить на репродуктивную стадию и образовывать цветки, чего не происходит у подавляющего большинства гомозиготных растений *na-D*. Лишь очень небольшая часть гомозигот *na-D* на фоне расы *En* способна образовывать цветки, которые часто не развиваются полностью. Сходное поведение мутация *na-D* также проявляет на фоне рас *Ler* и *Dj*.

В то же время на фоне рас *Col*, *Vla* и *Ws* мутация *na-D* меняет характер наследования. Гетерозиготные растения *na-D* из F1 от скрещиваний гетерозигот *na-D_{En}* с растениями дикого типа рас *Col*, *Vla* и *Ws* имели большую для гетерозигот *na-D* высоту (17 - 27 см) и отличались от растений дикого типа только некоторым укорочением нижних междоузлий стебля. В поколении F2 на фоне рас *Col*, *Vla* и *Ws* наблюдалось выщепление нескольких фенотипических классов гетерозигот по высоте стебля: от растений, практически идентичных гетерозиготам F1, до растений с фенотипом гетерозигот *na-D_{En}*. При этом гомозиготные растения *na-D* на фоне *Col*, *Vla*, *Ws* фенотипически не отличались от гомозигот *na-D_{En}*. Также необходимо подчеркнуть, что расщепления в поколении F2 от скрещиваний гетерозигот *na-D_{En}* с растениями дикого типа рас *Col*, *Vla*, *Ws* не соответствовали моногенным.

Такое различие в характере наследования мутации *na-D* на фоне различных рас может свидетельствовать о наличии генов, взаимодействующих с мутантным аллелем *na-D* и модулирующих (ослабляющих) его действие. Данные гены модификаторы, видимо, различаются по аллельному составу у различных рас *A.thaliana*, что и обуславливает разное наследование мутации *na-D*. Вполне возможно, что такие расы, как *En*, *Ler* и *Dj* содержат нефункциональные или лишь частично функциональные аллели генов-модификаторов, что и обуславливает отсутствие ослабления экспрессивности мутантной аллели *na* и приближение фенотипа гетерозиготных растений *na-D*, к фенотипу гомозигот. В то же время, в геноме рас *Col*, *Vla* и *Ws* присутствуют функциональные аллели генов

модификаторов, в результате чего гетерозиготы $na-D_{Col}$, $na-D_{Ws}$ и $na-D_{Bla}$ приобретают фенотип полукарликов. Подтверждением этого предположения служит факт некоторого увеличения размеров АМП у растений $na-D_{Col}$ (имеющих полукарликовый фенотип) по сравнению с $na-D_{En}$, так как это может являться следствием увеличения пролиферативной активности клеток АМП у $na-D_{Col}$, что говорит об ослаблении действия мутантного аллеля $na-D$. Тем не менее, при достижении растением репродуктивной стадии, АМП гомозиготных растений $na-D_{Col}$ демонстрировала тенденцию к уменьшению в размерах. Сходную тенденцию демонстрирует и АМП гомозиготных растений $na-D_{En}$, хотя её размер изначально меньше, чем у $na-D_{Col}$. Однако здесь необходимо подчеркнуть, что уменьшение размеров АМП при переходе на репродуктивную стадию наблюдалось только у гомозигот $na-D_{Col}$ и гетерозигот $na-D_{Col}$ с высотой главного побега около 3 см. В то время как гетерозиготы $na-D_{Col}$ с высотой главного побега около 4-5 см не демонстрировали уменьшения размеров АМП на стадии цветения, а гетерозиготы $na-D_{Col}$ с высотой главного побега больше 6 см на стадии цветения имели АМП практически неотличимую по размерам от дикого типа.

Увеличение размеров АМП $na-D_{Col}$ относительно $na-D_{En}$ свидетельствует о том, что на фоне расы Col даже наличие двух мутантных аллелей $na-D$ приводит к развитию более мягкого фенотипа, чем на фоне расы En. Данный феномен является свидетельством наличия модулирования действия мутантных аллелей $na-D$ со стороны других генов, которое варьирует между экотипами *A.thaliana* в результате различного аллельного состава этих генов у растений различных экотипов. К таким генам-модификаторам могут относиться и гены, контролирующие эпигенетические изменения в клетках, поскольку выявленное изменение экспрессивности мутантной аллели в гетерозиготе при сочетании с определенными аллелями дикого типа напоминает явление парамутаций. Например, для объяснения частичного восстановления карликовости у гетерозиготных растений $na-D_{Col}$ можно предположить, что аллель *NA* дикого типа, присутствующий у расы Columbia, вызывает изменение метилирования мутантного аллеля $na-D$, что приводит к его замолчанию.

Большинство парамутаций описано на кукурузе, причем во всех случаях локусы, вовлеченные в это явление, характеризовались наличием повторов ДНК

(Brzeski, Brzeska, 2011). У *Arabidopsis thaliana* описан ряд локусов, которые подвержены эпигенетическим модификациям (Tetsuji, 2002), однако типичных парамутаций пока не выявлено. Лишь для локуса *PAI* у гибридов F1 от скрещивания растений расы Ws с растениями расы Col обнаружено замолкание одного из генов этого локуса (*PAII*) в результате взаимодействия с аллельным геном (Martienssen, 1996), однако о наследовании половыми потомками этого эпигенетического изменения не сообщается. Эпигенетические изменения мутантного аллеля гена *na-D* под влиянием аллеля этого гена из расы Columbia передаются потомкам. Таким образом, мутация *na-D* в гетерозиготе проявляет себя также, как классические парамутации, обнаруженные у кукурузы. Тем не менее, причины неизменности фенотипа гомозиготных растений *na-D* вне зависимости от генетического фона остаются неясными и противоречат гипотезе об эпигенетических изменениях мутантной аллели на фоне рас Col, Vla и Ws.

Несмотря на изменение проявления мутации *na-D* на разном генетическом фоне, моногенное наследование карликовости на генетическом фоне Di, Ep и Ler позволяет абстрагироваться от наличия генов-модификаторов и исследовать функцию самого гена *NA*, анализировать его взаимодействие с другими генами, контролирующими пролиферативную активность АМП. Для этого необходимо лишь с помощью дополнительных отборов и/или возвратных скрещиваний убирать влияние генетического фона тех рас, которые имеют аллели генов-модификаторов (или парамутагенные аллели).

4.2.1. Роль гена *NA* в контроле пролиферативной активности АМП

В проведенных ранее исследованиях мутанта *na-D* было показано, что на поздней генеративной стадии наблюдается существенное уменьшение размера АМП (Ezhova et al., 2002; Lebedeva et al., 2004). В данной работе проведен анализ АМП мутантов *na-D* на двух более ранних стадиях – вегетативной и ранней генеративной стадии (стадии перехода розетки к выметыванию цветоноса). Показано, что АМП мутанта *na-D* на стадии вегетативной розетки имеет немного меньшие размеры, чем у дикого типа, и начинает заметно уменьшаться в размерах при переходе к цветению. Таким образом, мутация приводит к нарушению пролиферативной активности АМП, причем наиболее яркий эффект мутации *na-D*

проявляется при переходе на генеративную стадию развития. Отметим, что на данный момент известно не так много генов, регулирующих активность и функционирование АМП при переходе от вегетативной к генеративной стадии. Причём мутации некоторых из этих генов, как например *shal*, приводят к полной остановке развития растения по окончании вегетативной стадии, что осложняет их изучение. Мутация *na-D* в гетерозиготном состоянии не приводит к остановке развития растения (аналогично доминантной мутации *eve1-D*). Это делает мутацию *na-D* удобным объектом для изучения контроля активности АМП на стадии онтогенетического перехода от вегетативной АМП к АМП соцветия.

В предыдущих работах, посвящённых изучению мутации *na-D* (Кавай-оол, 2011), анализ фенотипа двойных мутантов *na-D clv* проводился на растениях, достигших репродуктивной стадии развития. Было показано, что двойные мутанты *na-D clv* прекращали рост после образования нескольких цветков, как и одиночные мутанты *na-D*, не смотря на значительно увеличенную АМП (Кавай-оол, 2011; Альберт и др., 2013). Это свидетельствует об отсутствии влияния гена *NA* на размер пула стволовых клеток. Анализ АМП двойных мутантов *na-D clv* на ранней вегетативной стадии, проведённый в данной работе, выявил увеличение АМП двойных мутантов *na-D clv1*, *na-D clv2* и *na-D clv3-2* уже на этой стадии. Это служит свидетельством, что двойные мутанты *na-D clv* характеризуются увеличением размеров АМП (а значит и пула стволовых клеток) уже на ранних стадиях развития. Это подтверждает гипотезу об отсутствии влияния гена *NA* на объём пула стволовых клеток. А также даёт некоторые основания предполагать, что ген *NA* начинает функционировать на более поздних стадиях онтогенеза, чем гены *WUS* и *CLV*, которые определяют размер АМП.

Таким образом, подтверждаются сделанные в предыдущих работах (Ежова и др., 2002; Лебедева и др., 2004) выводы об участии гена *NA* в регуляции пролиферативной стволовых клеток АМП, но об отсутствии его влияния на объём их пула. А также получен ряд свидетельств того, что работа гена *NA* может модулироваться другими генами, аллельный состав которых различается у разных экотипов *A.thaliana*.

В последнее время получены данные, что количество узлов в сложных соцветиях прямо пропорционально размерам АМП (Bull-Herenu and Claßen-

Bockhoff, 2013). Перед переходом на репродуктивную стадию АМП увеличивается в размерах (Bull-Heeren and Claßen-Bockhoff, 2013). При этом разные типы сложных соцветий демонстрируют разные типы поведения своих апикальных меристем: так соцветия типа метёлка характеризуются постоянным уменьшением апикальной меристемы соцветия, начиная с самого перехода на генеративную стадию. В то же время апикальная меристема соцветия типа сложная кисть переживает два этапа увеличения, после чего снова начинает уменьшаться в размерах (Bull-Heeren and Claßen-Bockhoff, 2013). В свете этих данных можно предполагать, что ген *NA* является регулятором размера АМП при её переходе на репродуктивную стадию посредством регуляции пролиферативной активности стволовых клеток, что определяет размер будущего соцветия. Тот факт, что генетическая регуляция данных переходов остаётся неизученной, делает особенно актуальным дальнейшее изучение гена *NA*.

4.3. Анализ взаимодействия генов *NA* и *TOP1*

Так как ген *NA* принимает участие в контроле развития цветоноса и пролиферативной активности АМП, был проведён анализ его взаимодействия с геном *TOP1*, который оказывает влияние на скорость выброса цветоноса и вовлечён в контроль активности и архитектуры АМП. Для этого было проведено скрещивание линий *fas5* и *na-D* и получены двойные мутанты.

Вначале стоит отметить, что гетерозиготные растения *na-D* из поколения F1 от скрещивания *fas5* x *na-D*, характеризовались низкой продуктивностью, относительно отцовских гетерозиготных растений *na-D*. Такая же низкая продуктивность наблюдается и у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* из поколения F2 того же скрещивания. Стоит отметить, что продуктивность гетерозигот *na-D* не отличается от таковой у растений дикого типа. Также в предыдущих работах (Кавай-оол, 2011) было показано снижение продуктивности у мутанта *fas5*, у которого семена образовывались только в 40% стручков. В нашей работе было показано также серьёзное снижение числа семян в стручках *fas5* относительно дикого типа. Стоит добавить, что недоразвитие семян у *fas5* наблюдается не только в апикальных стручках, имеющих обычно нарушенную морфологию, но и в базальных, не отличающихся от таковых у дикого типа. Хотя

такой признак, как продуктивность подробно не рассматривался в данной работе, у гетерозигот *na-D* из F1 и *fas5* гомозиготных по *na-D* из F2 наблюдалось значительное снижение продуктивности относительно растений родительских линий.

Также семена, образуемые гетерозиготными растениями *na-D* из F1 и *fas5* гетерозиготными по *na-D* из F2, характеризовались низкой всхожестью (~ 50%), что контрастирует с высокой всхожестью у семян одиночного мутанта *fas5* (~ 95%) и достаточно высокой всхожестью у одиночного мутанта *na-D* (~ 80%).

Если снижение продуктивности двойных мутантов можно объяснить влиянием мутации *fas5*, то снижение всхожести семян растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*, видимо, является следствием присутствия обеих мутантных аллелей.

Анализ морфологии побега двойных мутантов *fas5 na-D*. Карликовый фенотип отсутствие фасциации и видимого увеличения размеров АМП у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* и у двойных мутантных гомозигот свидетельствуют о том, что мутация *na-D* подавляет проявление мутации *fas5* по признакам развития цветоноса и общего роста растения, а также по признаку развития фасциации. Это позволяет сделать вывод о наличии взаимодействия генов *NA* и *TOP1*. Однако, на основе данных, полученных при анализе двойных мутантов *na-D clv*, можно также предполагать, что карликовость и отсутствие фасциации у двойного мутанта *fas5 na-D* является следствием подавления пролиферативной активности стволовых клеток в АМП мутантной аллелью *na-D*, в то время как непосредственное взаимодействие генов отсутствует.

Анализ морфологии АМП двойных мутантов *fas5 na*. АМП как растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* так и двойных гомозигот *fas5 na-D* демонстрировала увеличение размеров относительно АМП одиночного мутанта *na-D*, что ещё раз доказывает отсутствие влияния гена *NA* на размеры пула стволовых клеток АМП. АМП растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* на стадии ранней розетки при этом по размерам мало отличается от АМП одиночного мутанта *fas5* на аналогичной стадии. А также в некоторых случаях демонстрировала дробление на «дочерние» меристемы, что встречается у одиночного мутанта *fas5*. Это свидетельствует о том, что ген *NA* начинает функционировать на более поздних стадиях, чем ген *TOP1*. Принимая во внимание тот факт, что у одиночных растений *na-D* число листьев

соответствует исходному экотипу (Альберт и др., 2013), и наиболее выраженные нарушения развития проявляются у последних розеточных листьев и цветоноса, то можно предполагать, что ген *NA* начинает функционировать на стадии поздней розетки, непосредственно перед переходом на репродуктивную стадию. На стадии поздней розетки у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* АМП демонстрирует тенденцию к уменьшению размеров относительно предыдущей стадии, но сохраняет склонность к дроблению. После перехода к цветению размер АМП у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* серьезно уменьшается. Это может являться следствием наложения эффектов подавления активности ствольных клеток мутантным аллелем *na* и постепенной потери клетками АМП недетерминированного состояния вследствие утраты функции гена *TOP1*. Развития крупных клеток на поверхности АМП *fas5* гетерозиготных по *na-D* при этом не наблюдается, что характерно также для линии *fas5 wus-1*, характеризующейся потерей пролиферативной активности АМП. Видимо такая черта, как развития на поверхности АМП выступающих крупных клеток, сходных с дифференцирующимися клетками, характерна только для поздних стадий онтогенеза. В то время как развитие растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* останавливается относительно рано.

Также важной особенностью, наблюдаемой у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*, является уменьшение размеров АМП боковых побегов, закладывающихся в пазухах розеточных листьев. Боковые апикальные меристемы в пазухах более молодых листьев демонстрируют гораздо более крупные размеры, чем боковые АМ в пазухах более молодых листьев. Это может говорить о том, что на ранних стадиях развития, когда ген *NA* еще не активировался, АМП (как главная, так и боковые) постепенно увеличиваются в размерах в результате отсутствия функции гена *FAS5/TOP1α*. На более поздних стадиях после активации мутантного аллеля гена *NA* пролиферативная активность АМП снижается, в результате чего закладывающиеся на этих стадиях апикальные меристемы не могут серьезно увеличить свои размеры.

АМП двойных мутантных гомозигот *fas5 na-D* на стадии ранней розетки демонстрирует не менее крупные размеры, чем у *fas5* гетерозиготных по *na-D*. На стадии, поздней розетки АМП двойных гомозигот *fas5 na-D* уменьшается в

размерах, и соответствует таковой у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* на аналогичной стадии. Наконец на стадии, хронологически совпадающей со стадией вымётывания цветоноса у растений *fas5* гетерозиготных по *na-D*, АМП двойных мутантных гомозигот *fas5 na-D* ещё существеннее уменьшается в размерах, хотя и не так сильно как АМП мутантов *fas5* гетерозиготных по *na-D*, а также теряет куполообразную форму. Это может быть следствием того, что *fas5* гетерозиготные по *na-D* переходят к цветению, что вызывает более быстрое расходование стволовых клеток АМП, чем на предыдущей вегетативной стадии. В то же время двойные гомозиготы *fas5 na-D* практически прекращают развитие на данной стадии, в результате чего их пул стволовых клеток, скорее всего не успевает израсходоваться в достаточной степени. Тем не менее, у АМП растений *fas5* гетерозиготных по *na-D* на репродуктивной стадии АМП сохраняет характерную морфологию. Это может свидетельствовать о том, что мутантный аллель *na-D* подавляет не только переход к цветению, но и общее развитие организма растения.

Важной особенностью АМП двойных мутантов *fas5 na-D* являются практически идентичные размеры АМП у растений *fas5* гомо- и гетерозиготных по мутации *na-D*. Это служит ещё одним важным свидетельством того, что ген *NA* не влияет на объём АМП, но оказывает влияние на её пролиферативную активность.

Таким образом, анализ морфологии АМП двойных мутантов *fas5 na-D* и динамики её изменений в онтогенезе, позволяет заключить, что гены *TOP1* и *NA*, скорее всего, задействованы в разных регуляторных механизмах, тем не менее, они оба оказывают влияние на пул СК в АМП растения. Ген *TOP1* предотвращает возникновение эктопических областей экспрессии генов стволовости, а значит и эктопических пулов СК, а также поддерживает СК в недетерминированном состоянии. В то же время ген *NA*, в зависимости от возможной природы мутации, может играть роль либо отрицательного, либо положительного регулятора пролиферативной активности СК.

Анализ взаимодействия генов *TOP1* и *NA* в совокупности с данными об особенностях их фенотипа и взаимодействии с рядом важных регуляторных генов позволяет построить предварительную схему их участия в контроле развития организма растения. Закладка первоначальной АМП *A.thaliana* происходит на стадии эмбриогенеза с установлением функциональной регуляторной петли *WUS-*

CLV3. Ген *TOP1* начинает экспрессироваться ещё на эмбриональных стадиях (Takahashi et al., 2002), тем не менее, на этих стадиях его функция дублирована, и оказывать значимое влияние на развитие растения он начинает уже после прорастания семени (рис. 44). Об этом свидетельствует гибель растений с нарушением функции обоих генов, кодирующих ДНК топоизомеразу I, на стадии проростка (Takahashi et al., 2002). Основная функция гена *TOP1* в регуляции АМП состоит в обеспечении единства домена экспрессии генов *WUS* и *CLV3* и предотвращение возникновения очагов их эктопической экспрессии, а также поддержание стволовых клеток АМП в недетерминированном состоянии. Это обеспечивает формирование функциональной АМП и дальнейшее развитие правильной архитектуры надземной части растительного организма. На вегетативной стадии (стадии розетки) ген *TOP1* супрессирует переход на репродуктивную стадию, видимо индуцируя гены-репрессоры данного перехода. После перехода к цветению, *TOP1* выступает индуктором таких генов цветения, как *LFY* и/или *API*, обеспечивая развитие флоральных меристем. При этом в ходе дальнейшего развития цветка *TOP1* ограничивает область активности гена *AG*, регулируя корректное развитие цветка. Также ген *TOP1* на протяжении, видимо, всего жизненного цикла растительного организма участвует в регуляции ответа на световые стимулы.

Ген *NA*, по-видимому, начинает активно функционировать на стадии поздней розетки, непосредственно перед переходом к цветению, (рис. 44). Основной функцией гена *NA* является регуляция пролиферативной активности стволовых клеток АМП. Если предполагать, что доминантная мутация *na-D* является результатом эктопической экспрессии гена *NA*, то его функция заключается в подавлении пролиферативной активности АМП и развития растения. В случае если аллель *na-D* является антиморфным, т.е. происходит образование нефункционального продукта, к примеру, образующего нефункциональные белковые комплексы, функция гена *NA* может заключаться в поддержании пролиферативной активности СК АМП на должном уровне

Таким образом, можно заключить, что гены *TOP1* и *NA* играют важную роль в регуляции развития растительного организма. Поиск генов, являющихся мишенями регуляции со стороны *TOP1* и *NA*, может выявить ранее неизвестные регуляторные

механизмы развития растения, а также расширить представления об уже имеющихся.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе выявлены новые, ранее не установленные функции гена *TOP1*, кодирующего ДНК топоизомеразу Ia. В ряде ранних работ было показано участие данного гена в таких аспектах развития, как формирование правильной архитектуры апикальной меристемы побега и поддержание содержащихся в ней стволовых клеток в недетерминированном состоянии. Нами показана вовлечённость данного гена в регуляцию процессов перехода на репродуктивную стадию и инициацию флоральной меристемы. При этом, если в случае перехода к репродуктивной стадии ген *TOP1* играет роль негативного регулятора, то уже после осуществления данного перехода *TOP1* индуцирует формирование флоральной меристемы, положительно регулируя ключевой ген цветения *LFY*, а возможно ещё и гены *AP1* и *AP2*. Это свидетельствует о том, что в ходе этих двух процессов *TOP1* оказывает влияние на разные группы генов, что обеспечивает такую разнонаправленность его действия. Также нами показано участие гена *TOP1* в регуляции фотопериодической реакции растений. Изменение реакции на световые стимулы хорошо соотносится с полученными А.А. Пениным данными о перепредставленности среди дифференциально экспрессирующихся генов у мутанта *fas5* генов, ответственных за биосинтез ауксина и АБК (Альберт Е.В., Клепикова А.В., Демиденко Н.В., Ежова Т.А., Логачёва М.Д., Пенин А.А., 2014). Цитокининовый и ауксиновый регуляторные пути могут нарушаться при нарушении восприятия световых сигналов, как и чувствительность организма к АБК.

В нашей работе установлено, что ген *NA*, ранее охарактеризованный как регулятор пролиферативной активности стволовых клеток АМП, является также одним из генов, регулирующих гомеостаз АМП при переходе на репродуктивную стадию. Нами показано, что в отличие от генов *CLV3* и *TOP1*, функционирующих начиная с эмбриональных стадий, ген *NA* начинает функционировать на поздней вегетативной стадии - стадии перехода к цветению и, очевидно, регулирует гомеостаз АМП в ходе данного перехода.

Таким образом, в ходе проведённой работы были расширены представления о функции гена *TOP1*, уточнена роль гена *NA* в развитии растения и составлена примерная схема их действия (рис. 43). Ген *FAS5/TOP1α* экспрессируется, начиная с эмбриональной стадии на всех постэмбриональных стадиях развития и обеспечивает поддержание единой области экспрессии ключевых генов, регулирующих активность АМП (*WUS* и *CLV3*), предотвращая возникновение эктопических очагов их экспрессии. Также *FAS5/TOP1α* поддерживает СК АМП в недетерминированном состоянии на протяжении всего онтогенеза. При этом на вегетативной стадии (проросток, розетка) *FAS5/TOP1α* негативно регулирует переход на репродуктивную стадию, видимо, индуцируя гены-репрессоры цветения. После перехода к цветению *FAS5/TOP1α* начинает положительно регулировать экспрессию генов цветения (*LFY* или *AP1*) и ограничивать область экспрессии *AG* во флоральной меристеме, что обеспечивает соответственно нормальную закладку и развитие флоральных меристем и правильное развитие цветка. Ген *NA* активируется на стадии поздней розетки или непосредственно при переходе к цветению. Функция гена *NA*, исходя из доминантного характера мутации *na-D*, может заключаться либо в стимулировании, либо в супрессировании пролиферативной активности СК в АМП. Таким образом, гены *FAS5/TOP1α* и *NA* не взаимодействуют напрямую, но вместе влияют на СК.

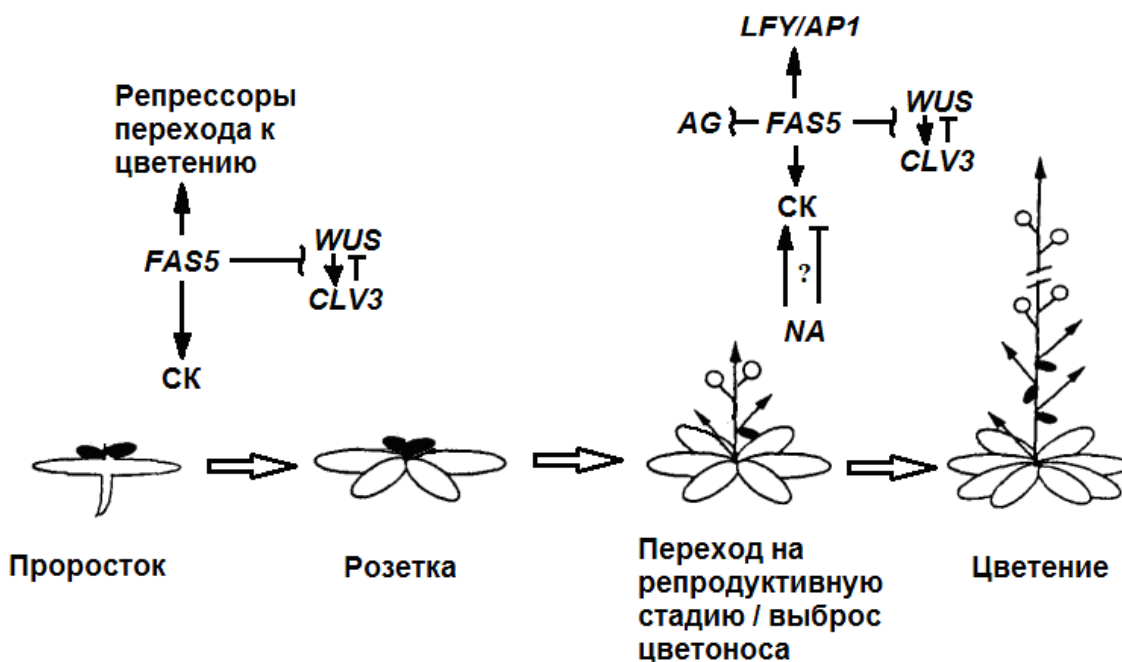


Рисунок 43. Функции генов *FAS5/TOP1α* и *NA* на разных стадиях развития *A.thaliana*.

ВЫВОДЫ

1. Мутация *fas5 A.thaliana* приводит к возникновению стоп-кодона в 9 экзоне гена *TOP1*, кодирующего ДНК топоизомеразу I α , и оказывает плейотропный эффект на развитие всех органов побега.
2. Ген *TOP1* играет важную роль в контроле пролиферативной активности клеток АМП – поддерживает недетерминированность клеток и определяет целостность АМП, взаимодействуя с геном *WUS* – ключевым геном, иницирующим и поддерживающим пул стволовых клеток.
3. Ген *TOP1* задерживает переход растений *A.thaliana* на репродуктивную стадию развития, но после данного перехода активирует развитие флоральной меристемы, взаимодействуя с геном *LFY*.
4. Ген *TOP1* 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 *TOP1*, *CLV1*, *CLV2*, *CLV3*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АМП – апикальная меристема побега

АМК – апикальная меристема корня

ДТ – дикий тип

СК - ствольные клетки

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

- 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.
- 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.,** Влияние генетического фона на экспрессивность мутации *na* *Arabidopsis thaliana*. / Е.В. Альберт, Т.А. Ежова // 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 3. С. 166–191
2. Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль стволовых клеток в морфогенезе растений // Доклады академии наук. 2006. Т. 410 №5 С. 702-704
3. Бургеев Д.В., Невинский Г.А. Структурв и механизм действия ДНК-топоизомераз IА-типа // Успехи биологической химии. – 2009.- Т.49. – С.129-158.
4. Додуева И. Е., CLE-Пептиды – Универсальные Регуляторы Развития Меристем / Додуева И. Е., Юрлова Е. В., Осипова М. А., Лутова Л. А.// Физиология Растений. - 2012. - Т.59. - №. 1. - С. 17-31.
5. Додуева И. Е., Юрлова Е. В., Осипова М. А., Лутова Л. А. CLE-Пептиды – Универсальные Регуляторы Развития Меристем // Физиология Растений. - 2012. - Т.59. - № 1.- С. 17-31
6. Захаров И.А. Генетические карты высших растений. 1979. Л.: Наука. С. 2 -28.
7. Кавай-оол У.Н., Взаимодействие гена *PINOID/ABRUPTUS* с геном *AGAMOUS* - негативным регулятором пролиферации стволовых клеток в меристеме цветка *Arabidopsis thaliana* / Кавай-оол У.Н., Карпенко О.Ю., Ежова Т.А. // Онтогенез. - 2011. - Т.42. - №. 2. - С.146–150
8. Кавай-оол, У.Н., Взаимодействие генетических и фитогормональных факторов в контроле развития растений // Москва. - 2011.
9. Квитко К.В. Асептическая культура *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и перспективы её использования в ботанических исследованиях. Вестник Ленинградского университета. 1960. - Т. 15. - Сер. «Биол.». - № .3. - С.47-56.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: изд-во «Высшая школа». 1990. 352 с.
11. Серебровский А.С. Генетический анализ. М.: изд-во «Наука». 1970. С. 288-290.
12. Andersen, S.U. Requirement of B2-Type Cyclin-Dependent Kinases for Meristem Integrity in *Arabidopsis thaliana* / Andersen SU, Buechel S, Zhao Z, Ljung K, Novak O, Busch W, Schuster C, Lohmann JU // Plant Cell . — 2008. — V.20. — № 1. — P. 88–100.
13. Atta R., Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro / Atta R., Laurens L., et al. // The Plant J. - 2009. - V.57. - P. 626–644.

14. Bernier, G. The control of floral evocation and morphogenesis // *Annu. Rev. Plant Physiol.* - 1988. - V.39. - P.175–219.
15. Bollman, K.M. *HASTY*, the *Arabidopsis* ortholog of *exportin 5/MSN5*, regulates phase change and morphogenesis / K.M. Bollman, M.J. Aukerman, M.-Y. Park, C. Hunter, T.Z. Berardini, R.S. Poethig // *Development*. — 2003. — V.130. — P. 1493-1504.
16. Bowman J.L. Genes directing flower development in *Arabidopsis* / Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M.// *Plant Cell*. - 1989. -V.1 - №1. - P. 37-52.
17. Bowman, J.L. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes / J.L. Bowman, J. Alvarez, D. Weigel, E.M. Meyerowitz, D.R. Smyth // *Development* . — 1993. — V.119. — P. 721–743.
18. Brzeski, J. The maze of paramutation: a rough guide to the puzzling epigenetics of paramutation / J. Brzeski, K. Brzeska // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* . — 2011. — V.2. — № 6. — P. 863-874.
19. Bull-Herenu K. and Claßen-Bockhoff R. Testing the ontogenetic base for the transient model of inflorescence development // *Ann. Bot.* - 2013. -V.112. - P.1543–1551.
20. Busch, M.A. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis* / M.A. Busch, K. Bomblies, D. Weigel // *Science*. — 1999. — V.285. — P. 585–87.
21. Carles C.C., The *ULTRAPETALA1* gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral meristem determinacy / Carles C.C., Lertpiriyapong K., Reville K., Fletcher J.C. // *Genetics*. - 2004. - V. 167. - P. 1893-1903.
22. Carles C.C. The SAND domain protein *ULTRAPETALA1* acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants / Carles C.C., Fletcher J.C. // *Genes Dev.* - 2009.- V.23.- №23. - P. 2723-8.
23. Chahtane, H. A variant of *LEAFY* reveals its capacity to stimulate meristem development by inducing *RAX1* / H. Chahtane, G. Vachon, M. L. Masson, E. Thevenon, S. Perigon, N. Mihajlovic, A. Kalinina, R. et al. // *The Plant J.* — 2013. — V.74. — C. 678–689.
24. Chapman E.J., Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants / Chapman E.J., Estelle M. // *Annu Rev Genet.* - 2009. - V. 43. - P. 265-85.
25. Chen, L. *EMF* genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development / L. Chen, J.C. Cheng, L. Castle, Z.R. Sung // *Plant Cell* . — 1997. — V.9. — P.2011–2024

26. Christensen S.K., Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID / Christensen S.K., Dagenais N., Chory J., Weigel D. // Cell. - 2000. - V. 100. - №.4. - P. 469-78.
27. Cole M., Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* / Cole M., Nolte C., Werr W. // Nucleic Acids Res. - 2006. - V. 34 P. - 1281–1292.
28. Clarke, J.H. The *SERRATE* locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in *Arabidopsis* / J.H. Clarke, D. Tack, K. Findlay, M. Van Montagu, M. Van Lijsebettens // Plant J. — 1999. — V.20. — P.493–501.
29. Cutler, S.R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network / S.R. Cutler , P.L. Rodriguez, R.R. Finkelstein, S.R. Abrams // Annu. Rev. Plant. Bio. — 2010. — V.61. — P. 651–679.
30. D’Agostino I.B., Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin / D’Agostino I.B., Deruere J., Kieber J.J.// Plant Physiol. - 2000. V. 124. - P. 1706–1717.
31. Daum G., A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis* / Daum G., Medzihradzsky A., Suzaki T. and Lohmann J.U. // P.N.A.S. - 2014 - V. 111 -№.40 - P.14619–14624
32. DeVeylder, Molecular control and function of endoreplication in development and physiology / DeVeylder, L., Larkin, J.C., and Schnittger, A., // Trends Plant Sci. - 2011. - V. 16. - P. 624 -634.
33. Devlin, P.F. Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis* / P.F. Devlin, S.R. Patel, G.C. Whitelam // Plant Cell. — 1998. — V.10. — P. 1479–1487.
34. Drews G.N. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. / Drews G.N., Bowman J.L., Meyerowitz E.M. // Cell. — 1991. — V.65. — № 6. — P. 991-1002.
35. Durand-Dubief, M. Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo / M. Durand-Dubief, J. Persson, U. Norman, E. Hartsuiker, K. Ekwall // EMBO J. — 2010. — V.29. — P. 2126–2134.

36. Durand-Dubief, M. Topoisomerases, chromatin and transcription termination / M. Durand-Dubief, J.P. Svensson, J.Persson, K. Ekwall, // *Transcription*. — 2011. — V.2. — P. 66–70.
37. Dewitte, W. *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses / Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, et al. // *P.N.A.S.* — 2007. — V.104. — № 36. — P. 14537–14542.
38. Endrizzi, K., The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE* / Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z., and Laux, T. // *Plant J*. 1996. 10: 967–979.
39. Engstrom E. M., *Arabidopsis* Homologs of the *Petunia HAIRY MERISTEM* Gene Are Required for Maintenance of Shoot and Root Indeterminacy / Engstrom E. M., Andersen C. M., J. Gumulak-Smith, J. Hu, E. Orlova, R. Sozzani, and J. L. Bowman // *Plant Physiol*. - 2011. - V.155. - P. 735–750.
40. Engstrom, E. M. HAM proteins promote organ indeterminacy But how? // *Plant Sig. & Behav.* - 2012. - V.7. - №2. - P. 227–234.
41. Ezhova T.A., Soldatova O.P., Sklyarova O.A. The *NANA* Gene Regulates Division and Elongation of Stem Cells in *Arabidopsis thaliana* (L) Heinh // *Russian Journal of Genetics*. — 2002. — V. 38. - №.1. — P. 50–57.
42. Fletcher J.C., Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems / Fletcher J.C., Brand U., Running M.P., R. Simon, E. M. Meyerowitz // *Science*. - 1999. - V. 283.- №5409. - P. 1911–1914.
43. Fujikura U., Dissection of enhanced cell expansion processes in leaves triggered by a defect in cell proliferation, with reference to roles of endoreduplication / Fujikura U., Horiguchi G., Tsukaya H. // *Plant Cell Physiol*. - 2007. - V.48. - №.2. - P.278–86.
44. Gaamouche T., Cyclin-dependent kinase activity retains the shoot apical meristem cells in an undifferentiated state / Gaamouche T., Manes C.-L.O., Kwiatkowska D., Berckmans B., Koumproglou R., Maes S., Beeckman T., Vernoux T., Doonan J., Traas J., et al. // *Plant J*. - 2010. - V.64. - №.1. - P.26–37.

45. Gallois J.L., *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem / Gallois J.L., Nora F.R., Mizukami Y., and Sablowski R. // *Genes Dev.* - 2004. - V.18. - P. 375–380.
46. Goldshmidt A., Signals derived from *YABBY* gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems / Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L. and Eshed Y. // *Plant Cell.* - 2008. - V.20. - №.5. - P. 1217-30.
47. Goodrich, J.A. Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis* / J. Goodrich, P. Puangsomlee, M. Martin, D. Long, E.M. Meyerowitz, G. Coupland // *Nature.* — 1997. — V.386. — P.44–51.
48. Gordon S. P., Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem / Gordon S. P., Chickarmane V. S., Ohno C., and Meyerowitz E. M. // *P.N.A.S.* - 2009. - V. 106. - №.38. - P. 16529–16534.
49. Graf P., *MGOUN1* Encodes an *Arabidopsis* Type IB DNA Topoisomerase Required in Stem Cell Regulation and to Maintain Developmentally Regulated Gene Silencing / Graf P., Dolzblasz A., Wurschum T., Lenhard M., Pfreundt U. and Laux T. // *The Plant Cell* / -0 V.22. - P.716–728.
50. Green K.A., *CORONA*, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis / Green K.A., Prigge M.J., Katzman R.B., Clark S.E. // *Plant Cell.* - 2005. - V. 17. - P. 691-704.
51. Guo H.S., Micro RNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development / Guo H.S., Xie Q., Fei J.F., Chua N.H. // *Plant Cell.* - 2005. - V.17. - №.5. - P. 1376-1386.
52. Guyomarch, S., *MGOUN3*, an *Arabidopsis* gene with Tetratrico Peptide-Repeat-related motifs, regulates meristem cellular organization / Guyomarch, S., Vernoux, T., Traas, J., Zhou, D.X., and Delarue, M. J. // *Exp. Bot.* - 2004. - V.55. - P. 673–684.
53. Haecker A., Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* / Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. // *Development.* - 2004 - V.131. - P. 657-668.
54. Hamada, S. Mutations in the *WUSCHEL* gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shoots without juvenile leaves / S. Hamada, H. Onouchi, H. Tanaka, M.

- Kudo, Y.-G. Liu, Shibata D., C. Machida, Y. Machida // *The Plant J.* — 2000. — V.24. — № 1. — P.91-101.
55. Hamant O., Plant development: a TALE story / Hamant O., Pautot V. // *C R Biol.* - 2010. - V.333. - P. 371–381.
56. Han P., Mutation of *Arabidopsis BARD1* Causes Meristem Defects by Failing to Confine *WUSCHEL* Expression to the Organizing Center / Han P., Li Q., and Zhu Y.-X. // *Plant Signal Behav.* - 2008. - V. 4. - P. 52.
57. Hajkova, P., Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line / Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C. Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., Surani M.A. // *Nature.* - 2008. - V.452. - P. 877–881.
58. Hibara K., *Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3* regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation / Hibara K., Karim M.R., Takada S., Taoka K., Furutani M., Aida M., Tasaka M. // *Plant Cell.* - 2006. - V.18. - P. 2946–2957.
59. Higuchi M., In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family / Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P, et al. // *P.N.A.S.* - 2004. - V.101. - №.23. - P. 8821-8826.
60. Hirakawa Y., TDIF Peptide Signaling Regulates Vascular Stem Cell Proliferation via the *WOX4* Homeobox Gene in *Arabidopsis* / Hirakawa Y., Kondo Y., and Fukuda H. // *The Plant Cell.* - 2010. - V.22. - P. 2618–2629.
61. Hirakawa Y., Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system / Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y et al. // *P.N.A.S.* - 2008. - V.105. - P.15208–15213.
62. Hunter, C. The *Arabidopsis* Heterochronic Gene *ZIPPY* Is an *ARGONAUTE* Family Member / C. Hunter, H. Sun, R.S. Poethig // *Current Biology.* — 2003. — T.13. — C. 1734–1739.
63. Hwang H.-J., Overexpression of *EVE1*, a novel ubiquitin family protein, arrests inflorescence stem development in *Arabidopsis* / Hwang H.-J., Kim, H. Jeong Y.-M., M. Choi Y., S.-Y. Kim L. and Kim S.-G. // *J Exp. Bot.* - 2011. - V.62. - №.13. - P.4571-4581.
64. Huala, E. and Sussex, I.M., *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development // *Plant Cell.* - 1992. - V.4. - P.901–913.
65. Hülskamp M. and Larkin J.C., *BRANCHLESS TRICHOMES* links cell shape and cell cycle control in *Arabidopsis* trichomes // *Development.* – 2011. – V.138. - P.2379-2388.

66. Ikeda M., *Arabidopsis* WUSCHEL Is a Bifunctional Transcription Factor That Acts as a Repressor in Stem Cell Regulation and as an Activator in Floral Patterning / Ikeda M., Mitsuda N., and Ohme-Takag M. // *The Plant Cell*. - 2009. - V.21. - №.11. - P.3493-3505.
67. Inzé, D. Cell cycle regulation in plant development / Inzé D, De Veylder L // *Annu Rev Genet.* — 2006. — V.40. — P.77 — 105.
68. Jacquard, A. Cell division and morphological changes in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana* during floral transition / A. Jacquard, I. Gadisseur, G. Bernier // *Annals of Botany.* — 2003 . — T.91. — C. 571-576.
69. Ji J., *WOX4* promotes procambial development / Ji J., Strable J., Shimizu R., et al. // *Plant Physiol.* - 2010. - V.152. - P.1346–1356.
70. Jurkuta R. J. Partitioning the Apical Domain of the *Arabidopsis* Embryo Requires the BOBBER1 NudC Domain Protein / R. J. Jurkuta, N. J. Kaplinsky, J. E. Spindel, M. K. Barton // *The Plant Cell*. - 2009. - V.21. - P.1957–1971.
71. Jun J.H., The CLE family of plant polypeptide signaling molecules / Jun J.H., Fiume E., and Fletcher J.C.// *Cell. Mol. Life Sci.* - 2008. - V.65. - P.743–755.
72. Kajiwara, T. The *GURKE* Gene Encoding an Acetyl-CoA Carboxylase is Required for Partitioning the Embryo Apex into Three Subregions in *Arabidopsis* / T. Kajiwara, M. Furutani, K. Hibara and M. Tasaka // *Plant Cell Physiol.* - 2004. - V.45. - №.9. - P.1122–1128.
73. Kanrar S., Bhattacharya M., Arthur B., Courtier J., Smith H.M. Regulatory networks that function to specify flower meristems require the function of homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH* in *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. -2008. – V54. - P.924–937.
74. Karami O., Aghavaisi B., Pour A.M. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants // *J Chem Biol.* - 2009. - V.2. - P.177–190.
75. Kasili R., *BRANCHLESS TRICHOMES* links cell shape and cell cycle control in *Arabidopsis* trichomes / Kasili R., Huang C.-C, Walker J.D., Simmons L.A., Zhou J., Faulk C., // *Development.* - 2011. - V.138. - P.11. - P.2379-2388.
76. Katz, A., *FIE* and *CURLY LEAF* polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development / Katz, A., Oliva, M., Mosquna, A., Hakim, O., Ohad, N. // *Plant J.* - 2004. - V.37. - P.707–719.

77. Kaya H., *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems / Kaya H., Shibahara K.I., Taoka K.I., Iwabuchi M., Stillman B., Araki T. // *Cell*. - 2001. - V.104. - P.131-142.
78. Kieffer M., Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance / Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E., Maulbetsch C., Laux T., and Davies B. // *Plant Cell*. - 2006. -V.18. - P.560–573.
79. Kinoshita A., RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*/ Kinoshita A., Betsuyaku S., Osakabe Y. Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S.// *Development*. - 2010. - V.137. - P. 3911-3920.
80. Kim J., microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems / Kim J., Jung J.H., Reyes J.L., Kim Y.S., Kim S.Y., Chung K.S., Kim J.A., Lee M., Lee Y., Narry Kim V., et al. // *Plant J*. - 2005. - V.42. - P.84–94.
81. Kim Y.S., HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in *Arabidopsis* shoot apical meristem development/ Kim Y.S., Kim S.G., Lee M., Lee I., Park H.Y., Seo P.J., Jung J.H., Kwon E.J., Suh S.W., Paek K.H., et al. // *Plant Cell*. - 2008. - V.20. - P.920–933.
82. Kim, S.Y. Sung Epigenetic Regulation of Gene Programs by *EMF1* and *EMF2* in *Arabidopsis* / S.Y. Kim, T. Zhu, Z.R. // *Plant Physiol*. — 2010. — V.152. — P.516–528.
83. Komeda Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana* // *Annu. Rev. Plant Biol*. - 2004. - V.55. - P.521– 535
84. Koorneef, M. Procedurefor mapping by using F2 and F3 population / M. Koorneef, P. Stam, // *Arabidopsis Inf. Serv*. – 1987. - V.23. – P.46-55.
85. Kurakawa T., Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme / Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. // *Nature*. - 2007. - V.445. - №.7128. - P.652-655.
86. Kuroha T., Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis* / Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. // *Plant Cell*. - 2009. - V.21. - №.10. - P.3152–3169.

87. Kwaaitaal M.A., de Vries S.C. The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells // J. Exp. Bot. - 2007. - V.58. - №.11. - P.2887-2896.
88. Kwon C.S., *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis* / Kwon C.S., Chen C., Wagner D. // Genes Dev. - 2005. - V.19. - P.992-1003.
89. Lammens, T. Atypical *E2F* activity restrains *APC/CCCS52A2* function obligatory for endocycle onset / Lammens T., Boudolf V., Kheibarshekan L., Panagiotis Z.L., Gaamouche T., Maes S., Vanstraelen M., Kondorosi E., La Thangue N.B., Govaerts W., et al // P.N.A.S. — 2008. — V.105. — № 38. — P.14721–14726.
90. Laskowski M., Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport / Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis H., Hove C.A., Hogeweg P., Maree A.F., Scheres B. // PLoS Biol. - 2008. - V.6. - e307.
91. Laufs P., *MGOUN1* and *MGOUN2*: two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana* / Laufs P., Dockx J., Kronenberger J. and Traas J. // Development. - 1998. - V.125. - P.1253-1260.
92. Laux T., The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* / Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jurgens G. // Development. - 1996. - V.122. - P.87-96.
93. Laux, T., Embryogenesis: a new start in life / Laux, T., Jurgens, G. // Plant Cell. - 1997. - V.9. - P.989–1000.
94. Laux, T., Genetic regulation of embryonic pattern formation / Laux, T., Wurschum, T., Breuninger, H. // Plant Cell. - 2004. - V.16. - P.190-202.
95. Leasure, C.D. The essential gene *EMB1611* maintains shoot apical meristem function during *Arabidopsis* development / C.D. Leasure, E. Fiume, J.C. Fletcher // The Plant J. 2009. - V.57. - P.579–592.
96. Lebedeva O.V., Skliarova O.A., and Ezhova T.A.. The roles of the *NANA* and *LEPIDA* genes in regulating the stem growth in *Arabidopsis thaliana* // Russian Journal of Genetics. - 2004. - V.40.- №.7.- P.940–948.
97. Leibfried A., *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators / Leibfried A., To J.P., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.U. // Nature. - 2005. - V.438. - P.1172–1175.

98. Lenhard M., Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS* / Lenhard M., Bohnert A., Jurgens G., and Laux, T. // *Cell*. - 2001. - V.105. - P.805–814.
99. Levy, Y.Y. The transition to flowering / Y.Y. Levy, C. Dean // *Plant Cell*. — 1998. — V.10. — P.1973–1989.
100. Lin Z., *AtCDC5* regulates the G2 to M transition of the cell cycle and is critical for the function of *Arabidopsis* shoot apical meristem / Lin Z, Yin K, Zhu D, Chen Z, Gu H, Qu L-J // *Cell Res*. — 2007. — V.17. — № 9. — P. 815–828.
101. Lincoln, C., A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants / Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., and Hake, S. // *Plant Cell*. - 1994. - V.6. - P. 1859–1876.
102. Lindsay D.L., Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis* / Lindsay D.L., Vipen K.V., Bonham-Smith P.C. // *Plant Science*. - 2006. - V. 170. - P. 1111–1117.
103. Liu, Q. The *ARGONAUTE10* gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis* / Q. Liu, X. Yao, L. Pi, H. Wang, X. Cui, H. Huang // *The Plant J*. - 2009. - V.58. - P.27–40.
104. Liu X., *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of Polycomb Group proteins / Liu X., Kim Y.J., Müller R., Yumul R.E., Liu C., Pan Y., Cao X., Goodrich J., Chen X. // *Plant Cell*. - 2011. - V. 23. - №.10. - P. 3654-3670.
105. Liu, Y. *CCS52A2/FZR1*, a cell cycle regulator, is an essential factor for shoot apical meristem maintenance in *Arabidopsis thaliana* / Y. Liu, W. Ye, B. Li, X. Zhou, Y. Cui, M.P. Running, K. Liu // *Plant Biology*. — 2012. — V.12. — P.135 — 149.
106. Liu, X. DNA Topoisomerase I Affects Polycomb Group Protein-Mediated Epigenetic Regulation and Plant Development by Altering Nucleosome Distribution in *Arabidopsis* / X. Liu, L. Gao, T. T. Dinh, T. Shi, D. Li, R. Wang, L. Guo, L. Xiao, X. Chena // *The Plant Cell*. — 2014. — V.26. — № 7. — P. 2803–2817.
107. Lodha, M., Genetic and Epigenetic Regulation of Stem Cell Homeostasis in Plants / M. Lodha, C.F. Marco, M.C.P. Timmermans // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. - 2008. - V.73. - P.243-251.

108. Lohmann J.U., A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis* / Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., and Weigel D. // *Cell*. - 2001. - V.105. - P.793–803.
109. Long, J.A., A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis* / Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K. // *Nature*. - 1996. - V.379. - P.66–69.
110. Lopez-Molina, L. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the *ABI5* transcription factor in *Arabidopsis* / L. Lopez-Molina, S. Mongrand, N.H. Chua // *P.N.A.S.* — 2001. — V. 98. — P. 4782–4787.
111. Matos J. L. and Bergmann D. C. Convergence of stem cell behaviors and genetic regulation between animals and plants: insights from the *Arabidopsis thaliana* stomatal lineage // *F1000Prime Rep*. - 2014. - V.6. - №.53. - P.1-8.
112. Marchler-Bauer A et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins // *Nucleic Acids Res*. -2011.– V.39. - P.225-229.
113. McConnell, J.R. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis* / McConnell J.R., Barton M.K. // *Development*. - 1998. - V.125. - P.2935–2942.
114. Martienssen, R. Epigenetic phenomena: Paramutation and gene silencing in plants / R. Martienssen // *Current Biol*. — 1996. — V.6. — № 7. — P. 810–813.
115. McDaniel, C.N. Developmental Physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. // *J. Exp. Bot*. — 1996. — V.47. — P. 465— 475.
116. McConnell J.R., Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. / McConnell J.R., Emery J., Eshed Y., Bao N., Bowman J., Barton M.K. // *Nature*. - 2001. - V.411. - P.709–713.
117. McNellis, T.W. Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains / T.W. McNellis, A.G. von Arnim, T. Araki, Y. Komeda, S. Misera, X.-W. Deng // *Plant Cell*. — 1994. — V.6. — P.487–500.
118. Mitchell, A. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years / A. Mitchell, H.Y. Chang, L. Daugherty, M. Fraser, S. Hunter, R. Lopez, C. McAnulla // *Nucleic Acids Res.* — 2014. - V.43. - P.213-221.
119. Miyawaki K., Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate / Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. // *The Plant J*. - 2004. - V.37. - P.128–138.

120. Monfared, M. M. The *ULT1* and *ULT2* trxG Genes Play Overlapping Roles in *Arabidopsis* / M. M. Monfared, C. C. Carlesa, P. Rossignol, H. R. Piresa and J. C. Fletcher // Development and Gene Regulation Molecular Plant. – 2013- V. 6 - N. 5 - P.1564–1579.
121. Monson E.K., The yeast Cac1 protein is required for the stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres / Monson E.K., De Bruin D., and Zakian V.A. // P.N.F.S. - 1997. - V.94. - P.13081–13086.
122. Moussian, B. Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis / B. Moussian, H. Schoof, A. Haecker, G. Jurgens, T. Laux // The EMBO J. - 1998. - V.17. - №.6. - P.1799–1809.
123. Muller R., The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1* / Muller R., Bleckmann A., Simon R. // Plant Cell. - 2008. - V.20. - №.4. - P.934–946.
124. Muller R., Dynamic and compensatory responses of *Arabidopsis* shoot and floral meristems to *CLV3* signaling / Muller R., Borghi L., Kwiatkowska D., Laufs P, Simon R.// *Plant Cell* .2006. - V.18. - №.5. - P.1188–1198.
125. Nakashima, K. ABA signaling in stress-response and seed development / K. Nakashima, K. Yamaguchi-Shinozaki // Plant Cell Rep. — 2013. — V.32. — P. 959–970.
126. Nakayama, T., *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading / Nakayama, T., Nishioka, K., Dong, Y.X., Shimojima, T., and Hirose, S. // Genes Dev. - 2007. - V.21. - P.552–561.
127. Nawy T., The GATA Factor HANABA TARANU Is Required to Position the Proembryo Boundary in the Early *Arabidopsis* Embryo / Nawy T., Bayer M., Mravec J., Friml J., Birnbaum K.D., Lukowitz W. // Developmental Cell. - 2010. - V.19. - P.103–113.
128. Nishimura, C., Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis* / Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C. // Plant Cell. - 2004. - V.16. - №.6. - P.1365-1377.
129. Nolan K.E., Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula* / Nolan K.E., Kurdyukov S., Rose R.J.// J Exp Bot. - 2009. - V.60. - №.6. - P.1759-1771

130. Ogawa M., *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain / Ogawa M., Shinohara H., Sakagami Y., Matsubayashi Y. // *Science*. - 2008. - V.319. - №.5861. - P. 294.
131. Okada K., Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation / Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J., Shimura Y. // *Plant Cell*. - 1991. - V.3. - №.7. - P.677-684.
132. Osterlund, M.T. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. / M.T. Osterlund, C.S. Hardtke, N. Wei, X.W. Deng // *Nature*. — 2000. — T.405. — C. 462–466.
133. Otsuga D., *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions / Otsuga D., DeGuzman B., Prigge M.J., Drews G.N., Clark S.E. // *Plant J*. 2001. 25:223–236.
134. Pautot, V., *KNAT2*: Evidence for a link between knotted-like genes and carpel development / Pautot, V., Dockx, J., Hamant, O., Kronenberger, J., Grandjean, O., Jublot, D., Traas, J. // *Plant Cell*. - 2001. - V.13. - P.1719–1734.
135. Penin A.A. and Logacheva M.D. Correlation between number and position of floral organs in *Arabidopsis* // *Annals of Botany*. - 2011. - V.108. - P.123–131.
136. Peragine, A. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* / A. Peragine, M. Yoshikawa, G. Wu, H.L. Albrecht, R.S. Poethig // *GEN. & DEV.* — 2004. — V.18. — P. 2368–2379.
137. Perez-Perez, J.M. Specialization of *CDC27* function in The *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C) / Perez-Perez J.M., Serralbo1 O., Vanstraelen M., Gonzalez C., Criqui M.-C., Genschik P., Kondorosi E., Scheres B. // *The Plant J*. - 2008. - V.53. - №.1. - P.78–89.
138. Phelps-Durr, T.L., Maize rough *sheath2* and its *Arabidopsis* orthologue *ASYMMETRIC LEAVES1* interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis / Phelps-Durr, T.L., Thomas, J., Vahab, P., and Timmermans, M.C. // *Plant Cell*. - 2005. - V.17. - P.2886–2898.
139. Poethig R.S. Phase Change and the Regulation of Developmental Timing in Plants / Poethig R.S. // *SCIENCE*. — 2003. — V.301. — № 5631. — P. 334-336.
140. Prigge, M. J. Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in *Arabidopsis* Development / M. J. Prigge,

- D. Otsuga, J. M. Alonso, J. R. Ecker, G. N. Drews, S. E. Clark // *The Plant Cell*. - 2005. - V.17. - P.61–76.
141. Raman S., Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana* / Raman S., Greb T., Peaucelle A., Blein T., Laufs P., Theres K. // *Plant J*. - 2008. -V.55. - P.65–76.
142. Ramirez-Parra, E. *E2F* Regulates *FASCIATA1*, a Chromatin Assembly Gene Whose Loss Switches on the Endocycle and Activates Gene Expression by Changing the Epigenetic Status / Ramirez-Parra E, Gutierrez C // *Plant Physiol*. — 2007. — V.144. — P.105 – 120.
143. Reinhardt D., Frenz M., Mandel T. and Kuhlemeier C. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem // *Development*. - 2003. - V.130 - P. - 4073-4083
144. Riou-Khamlichi, C. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin / Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA // *Science*. — 1999. — V.283. — № 5407. — P.1541 — 1544.
145. Schulze, S., *LOST MERISTEMS* genes regulate cell differentiation of central zone descendants in *Arabidopsis* shoot meristems / Schulze, S., Schäfer, B.N., Parizotto, E.A., Voinnet, O., Theres, K. // *Plant J*. - 2010. - V.64. - P.668-678.
146. Schultz, E.A. and Haughn, G.W., *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. - 1991. - V.3. - P.771–781.
147. Schmidt E.D.L., A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos / Schmidt E.D.L., Guzzo F., Toonen M.A.J., de Vries S.C.// *Development*. - 1997. - V. 4. - P. 2049-2062.
148. Schubert, D., Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27 / Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp,A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T., and Goodrich, J. // *EMBO J*. - 2006. - V.25. - P.4638–4649.
149. Schwartz, Y.B., Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes / Schwartz, Y.B., Pirrota, V. // *Nat. Rev. - Genet*. - 2007. -V.8. - P. 9–22.
150. Schwarz, S. Huijser The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis* / S. Schwarz, A.V. Grande, N. Bujdoso, H. Saedler, P. Huijser // *Plant. Mol. Biol* . — 2008. — T.67. — C. 183–195.

151. Seefried, W.F., Global Regulation of Embryonic Patterning in Arabidopsis by MicroRNAs / W. F. Seefried, M. R. Willmann, R. L. Clausen, P. D. Jenik // *Plant Physiol.* - 2014. - V. 165. - P. 670–687.
152. Smith H.M., Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH* / Smith H.M., Campbell B.C., Hake S // *Curr. Biol.* - 2004. - V. 14. - P. 812–817.
153. Smith H.M.S., Specification of reproductive meristems requires the combined function of *SHOOT MERISTEMLESS* and floral integrators *FLOWERING LOCUS T* and *FD* during *Arabidopsis* inflorescence development / Smith H.M.S., Ung N., Lal S. and Courtier J.// *Journal of Experimental Botany.* - 2011 - V. 62. - №. 2 - P. 583–593
154. Song X.-F., Individual amino acid residues in CLV3 peptide contribute to its stability *in vitro* / Song X.-F., Xu T.-T., Ren S.-C. and Liu C.-M.// *Plant Sign. & Behav.* - 2013. -V.8. - №.9. - e25344.
155. Sonoda Y., SHA1, a novel RING finger protein, functions in shoot apical meristem maintenance in *Arabidopsis* / Sonoda Y., Yao S.-G., K. Sako, T. Sato, Kato W., Ohto M., Ichikawa T., Matsui M., Ikeda Y. and Ikeda A. Ikeda // *The Plant J.* - 2007. - V.50. - P. 586–596
156. Sieber P., Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness / Sieber P., Wellmer F., Gheyselinck J., Riechmann J.L., Meyerowitz E.M. // *Development.* - 2007. - V. 134. - P. 1051–1060.
157. Simpson, G.G. Evolution of flowering in response to day length: flipping the *CONSTANS* switch / G.G. Simpson, // *Bioessays.* — 2003. — T.25. — C. 829–832.
158. Skylar A., *STIMPY* mediates cytokinin signaling during shoot meristem establishment in *Arabidopsis* seedlings / Skylar A., Hong F., Chory J., Weigel D., Wu X. // *Development.* - 2010. - V. 137. -№.4. - P. 541–549.
159. Sparks E., Spatiotemporal signalling in plant development / Sparks E., Wachsman G., Benfey P.N. // *Nature Rev. Genet.* - 2013. - V.14. - P. 631-644.
160. Spector, M.S., Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle / Spector, M.S., Raff, A., DeSilva, H., Lee, K., and Osley, M.A. // *Mol. Cell. Biol.* - 1997. - V.17. P. 545–552.

161. Spinelli S.V., A Mechanistic Link between *STM* and *CUC1* during *Arabidopsis* Development / Spinelli S.V., Martin A.P., Viola I.L., Gonzalez D.H., Palatnik J.F. // *Plant Physiol.* - 2011. - V. 156. - №.4. - P. 1894–1904.
162. Stahl Y., Plant Primary Meristems: Shared Functions and Regulatory Mechanisms / Stahl Y., Simon R. // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2010. - V.13. - P.53–58.
163. Stuurman J., Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells / Stuurman J., Jaggi F., Kuhlemeier C. // *Genes Dev.* - 2002. - V.16. - P. 2213–2218
164. Su Y.H., Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis / Su Y.H., Zhang X.S.// *Plant Signal Behav.* - 2009. - V.4. - №.7. - P. 574–576.
165. Suer S., *WOX4* Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in *Arabidopsis* / Suer S., Agusti J., Sanchez P., et al. // *The Plant Cell.* - 2011. - V. 23. - P. 3247–3259.
166. Sugimoto K., *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway / Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.// *Dev. Cell.* - 2010. - V. 18. - P. 463–471.
167. Sung, Z.R. *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development / Z.R. Sung, A. Belachew, B. Shunong, R. Bertrand-Garcia // *Science.* — 1992. — T.258 . — C. 1645–1647.
168. Suzuki T., A novel *Arabidopsis* gene *TONSOKU* is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems. / Suzuki T., Inagaki S., Nakajima S., Akashi T, Ohto M.A., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Nakamura K., Morikami A. // *Plant J.* - 2004. - V.38. - P. 673–684.
169. Takada, S., The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation / Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. // *Development.* - 2001. - V.128. - P.1127–1135.
170. Takeda S., *BRUI*, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis* / Takeda S., Tadele Z., Hofmann I., Probst A.V., Angelis K.J., Kaya H., Araki T., Mengiste T., Mittelsten S. O., Shibahara K., Scheel D., Paszkowski J. // *Genes Dev.* - 2004. - V.18. - P.782-793.
171. Takahashi T., Disruption of a *DNA Topoisomerase I* Gene Affects Morphogenesis in *Arabidopsis* / Takahashi T., Matsuhara S., Abe M., Komeda Y. // *Plant Cell.* - 2002. - V.4. - №.9. - P.2085–2093.

172. Tekfer, A. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana* / Tekfer A., Bollman K.M., Porethig R.S. // *Development*. — 1997. — V.124. — T. 645-654.
173. Tetsuji, K. Epi-Alleles in Plants: Inheritance of Epigenetic Information over Generations / K. Tetsuji // *Plant Cell Physiol*. — 2002. — V.43. — № 10. — P.1106–1111.
174. Tooke F., Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion / Tooke F., Ordidge M., Chiurugwi T., Battey N. // *Journal of Exp. Bot.* - 2005. - V.56. - No.420. - P.2587–2599.
175. Torres-Ruiz, R.A., Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development / Torres-Ruiz, R.A., Jurgens, G. // *Development*. - 1994.- V.120. - P.2967–2978.
176. Turchi, L. *Arabidopsis* HD-Zip II transcription factors control apical embryo development and meristem function /, M. Carabelli, V. Ruzza, M. Possenti, M. Sassi, A. Peñalosa, G. Sessa, S. Salvi, V. Forte, G. Morelli, I. Ruberti // *Development*. - 2013. - V.140. - P. 2118-2129.
177. Ung N., The Role of *PENNYWISE* and *POUND-FOOLISH* in the Maintenance of the Shoot Apical Meristem in *Arabidopsis* / Ung N., Lal S., and. Smith H.M.S. // *Plant Physiology*. - 2011. - V.156. - P.605–614.
178. Van Lijsebettens M., Leaf development in *Arabidopsis* Plant / Van Lijsebettens M., Clarke J. // *Physiol. Biochem*. — 1998. — V.36. — P. 47—60.
179. Wahl V., The FANTASTIC FOUR proteins influence shoot meristem size in *Arabidopsis thaliana* / Wahl V., Brand L.H., Guo Y.-L., and Schmid M.// *BMC Plant Biol*. - 2010. - V.10. - P. 285-297.
180. Wang X.-D., Nolan K.E., Irwanto R.R., et al. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells // *Ann Bot*. - 2011. - V. 107. - №.4. - P.599–609.
181. Wellmer F., Networks controlling the initiation of flower development / Wellmer F., Riechmann J.L. *Gene* // *Trends Genet*. - 2010. – V.26. - №.12. - P.519-527.
182. Wenkel S., A feedback regulatory module formed by *LITTLE ZIPPER* and *HD-ZIP III* genes / Wenkel S., Emery J., Hou B.H., Evans M.M., Barton M.K. // *Plant Cell*. - 2007. - V.19. - P.3379–3390.

183. Williams L., Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes / Williams L., Grigg S.P., Xie M., Christensen S., Fletcher J.C. // *Development*. - 2005. - V.132. - P.3657-3668.
184. Williams L., Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. / Williams L., Fletcher J.C. // *Curr Opin Plant Biol.* — 2005. — V8. — № 6. — P 582-586.
185. Wisniewska J., Xu J., Seifertova D., et al. Polar PIN localization directs auxin flow in plants // *Science*. - 2006. - V. 312. - P. 883.
186. Wolters H., Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development / Wolters H., Jurgens G. // *Nat. Rev. Genet.* - 2009. - V.10. - P.305–317.
187. Wolters, H. Coordination of apical and basal embryo development revealed by tissue-specific *GNOM* functions / H. Wolters, N. Anders, N. Geldner, R. Gavidia, G. Jürgens // *Development*. - 2011. - V.138. - P.117-126.
188. Won C., Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN Aminotransferases of *Arabidopsis* and *YUCCAs* in *Arabidopsis* / Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., et al.// *P.N.A.S.* - 2011. - V.45. - P.18518-21853.
189. Wurschum, T. *APETALA2* Regulates the Stem Cell Niche in the *Arabidopsis* Shoot Meristem / T. Wurschum, R. Groß-Hardt, T. Laux // *The Plant Cell*. - 2006. - V.18. - P.295–307.
190. Wu, G. Temporal Regulation of Shoot Development in *Arabidopsis thaliana* By Mir156 and Its Target SPL3 Development / G. Wu, R.S. Poethig // *Development*. — 2006. — V.133. — № 18. — P.3539–3547.
191. Xiang, D. *POPCORN* Functions in the Auxin Pathway to Regulate Embryonic Body Plan and Meristem Organization in *Arabidopsis* / D. Xiang, H. Yang, P. Venglat, Y. Cao, R. Wen, M. Ren, S. Stone, E. Wang, H. Wang, W. Xiao, D. Weijers, T. Berleth, T. Laux, G. Selvaraj, R. Datla // *The Plant Cell*. - 2011. - Vol. - V.23. - P.4348–4367.
192. Xu, D. Convergence of Light and ABA Signaling on the *ABI5* Promoter / D. Xu, J. Li, S.N. Gangappa, C. Hettiarachchi, F. Lin, M.X. Andersson, Y. Jiang, X.W. Deng, M. Holm // *PLOS Genet.* — 2014. — T.10. — № 2. — e1004197.
193. Yadav R.K., WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex / Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Girke T, Jönsson H, Reddy G.V. // *Genes Dev.* 2011 V. 25(19) P. 2025-2030.

194. Yadav R.K., Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche / Yadav R.K., Girke T., Pasala S., Xie M., Reddy G.V. // P.N.A.S. - 2009. - V.106 . - №. 12. - P. 4941–4946.
195. Yanai O., *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis / Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A., Ori N. // Curr Biol. - 2005. - V.6. - №.15. - P.1566-1571.
196. Yoshida, N. *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel Polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis* / N. Yoshida, Y. Yanai, L. Chen, Y. Kato, J. Hiratsuka et al. // Plant Cell . — 2001. — V.13. — P. 2471–2481.
197. Yoshida, S. Stem cell activation by light guides plant organogenesis / S. Yoshida, T. Mandel, C. Kuhlemeier // Genes & Dev. — 2011. — V.25. — P. 1439–1450.
198. Zhao Y., HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis* / Zhao Y., Medrano L., Ohashi K., Fletcher J.C., Yu H., Sakai H., Meyerowitz E.M.// Plant Cell. - 2004. - V.16. - P.2586-2600.
199. Zhao Y.D. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development / Zhao Y.D. // Curr. Opin. Plant Biol. - 2008. - V.11. - P.16–22.
200. Zhao Z., Hormonal control of the shoot stem-cell niche / Zhao Z., Andersen S.U., Ljung K., Dolezal K., Miotk A., Schultheiss S.J., Lohmann J.U. // Nature. - 2010. - V.465. №.7301. - P.1089-1092.
201. Zheng, B., Dynamics of histone H3 lysine 27 trimethylation in plant development / Zheng, B., Chen, X. // Curr. Opin. Plant Biol. - 2011. - V.14. - P.123–129.
202. Zhu H., *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem / Zhu H., Hu F., Wang R., Zhou X., Sze S.H., Liou L.W., Barefoot A., Dickman M., Zhang X. // Cell. - 2011. - V.145. - P.242–256.
203. Zuo, J., The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis* / Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., and Chua, N.H. // Plant J. - 2002. - V.30. - P.349–359.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Рисунок 1 . Особенности морфологии стебля мутанта *fas5*. А – фасцированный лентовидный стебель мутанта *fas5* (слева) и дикого типа справа. Б - растение мутанта *fas5* без развития фасциации, В - растение мутанта *fas5* с ярко выраженной фасциацией. Г – Аномальное ветвление стебля мутанта *fas5* (отмечено стрелкой).

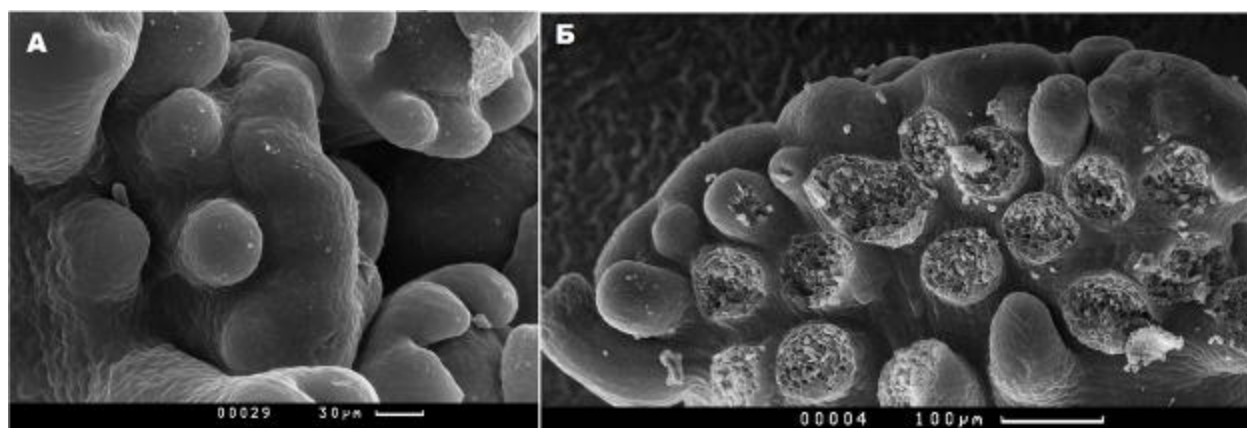


Рисунок 2. АМП растений *fas5* со слабой фасциацией. А – на стадии раскрытия первых цветков, Б – на стадии завершения цветения

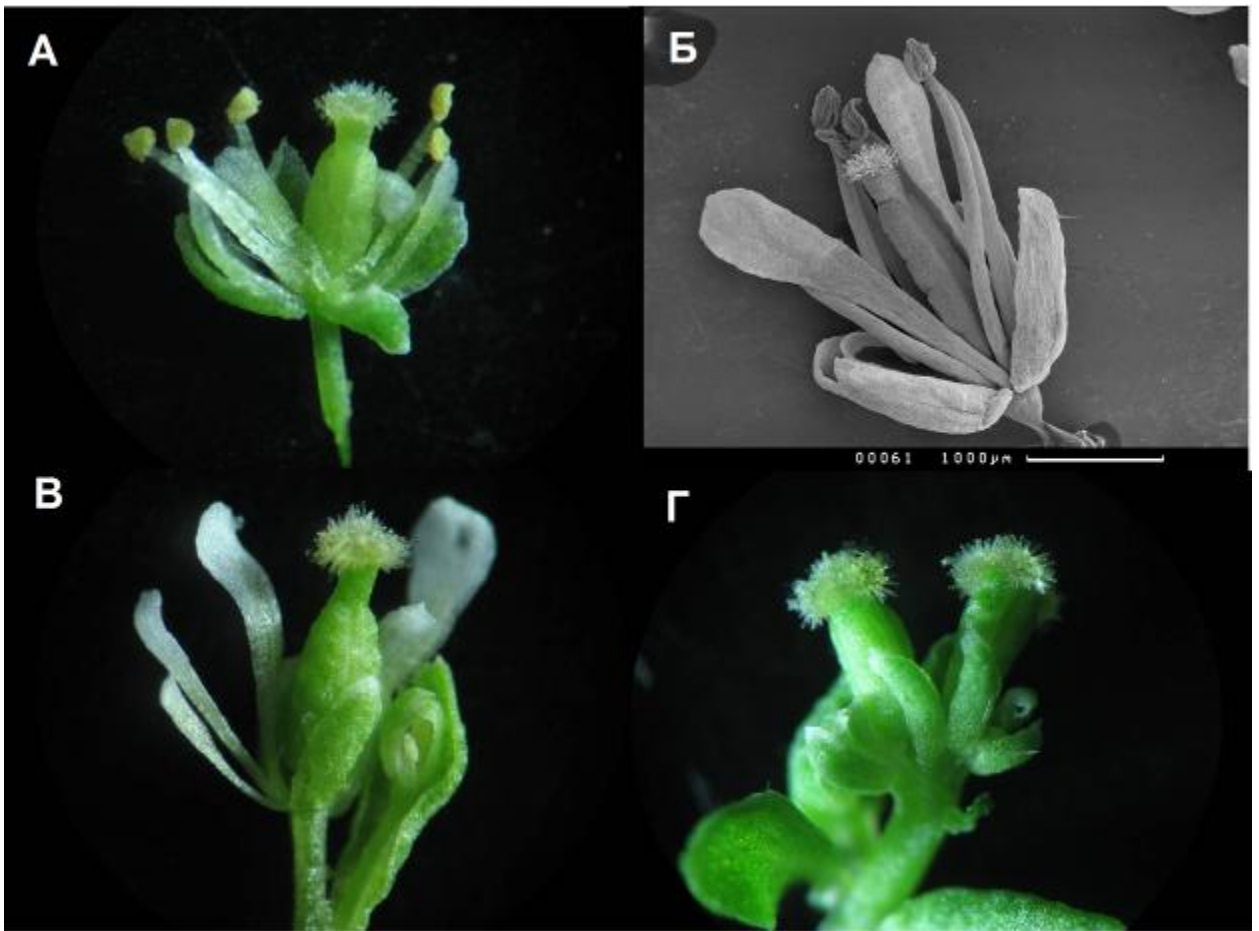


Рисунок 3. Цветки *fas5*, развивающиеся в условиях короткого дня. А - цветок мутанта *fas5*, выращивавшегося в условиях короткого дня. Б – базальный цветок мутанта *fas5*, выращивавшегося в условиях длинного дня (бар соответствует 1000мкм). В, Г – сходные с терминальными цветками структуры, развивающиеся на цветоносе мутанта *fas5* в условиях короткого дня.



Рисунок 4. Стручки мутанта *fas5* и дикого типа. Снизу вверх: стручок дикого типа, базальный стручок *fas5*, апикальный стручок *fas5*.

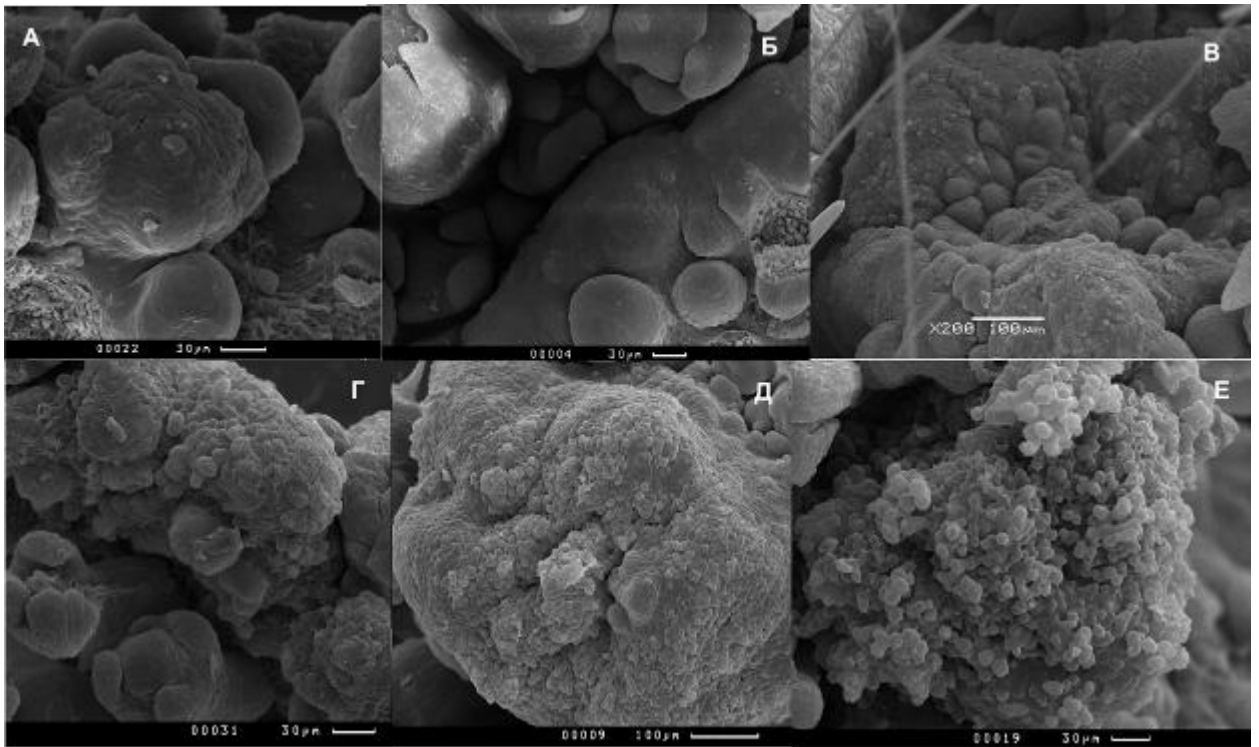


Рисунок 5. Поверхность АМП двойных мутантов *fas5 clv1*, *fas5 clv2-1* и *fas5 clv3-2*. Поверхность АМП на стадии раскрытия первых бутонов: А - *fas5 clv1*, Б - *fas5 clv2-1*, В - и *fas5 clv3-2*, крупные клетки малочисленны. Поверхность АМП на стадии завершения цветения: Г - *fas5 clv1*, Д - *fas5 clv2-1*, Е - и *fas5 clv3-2*, крупные клетки покрывают всю поверхность АМП. Бары соответствуют: А, Б, Г, Е – 30 мкм; В, Д – 100 мкм.

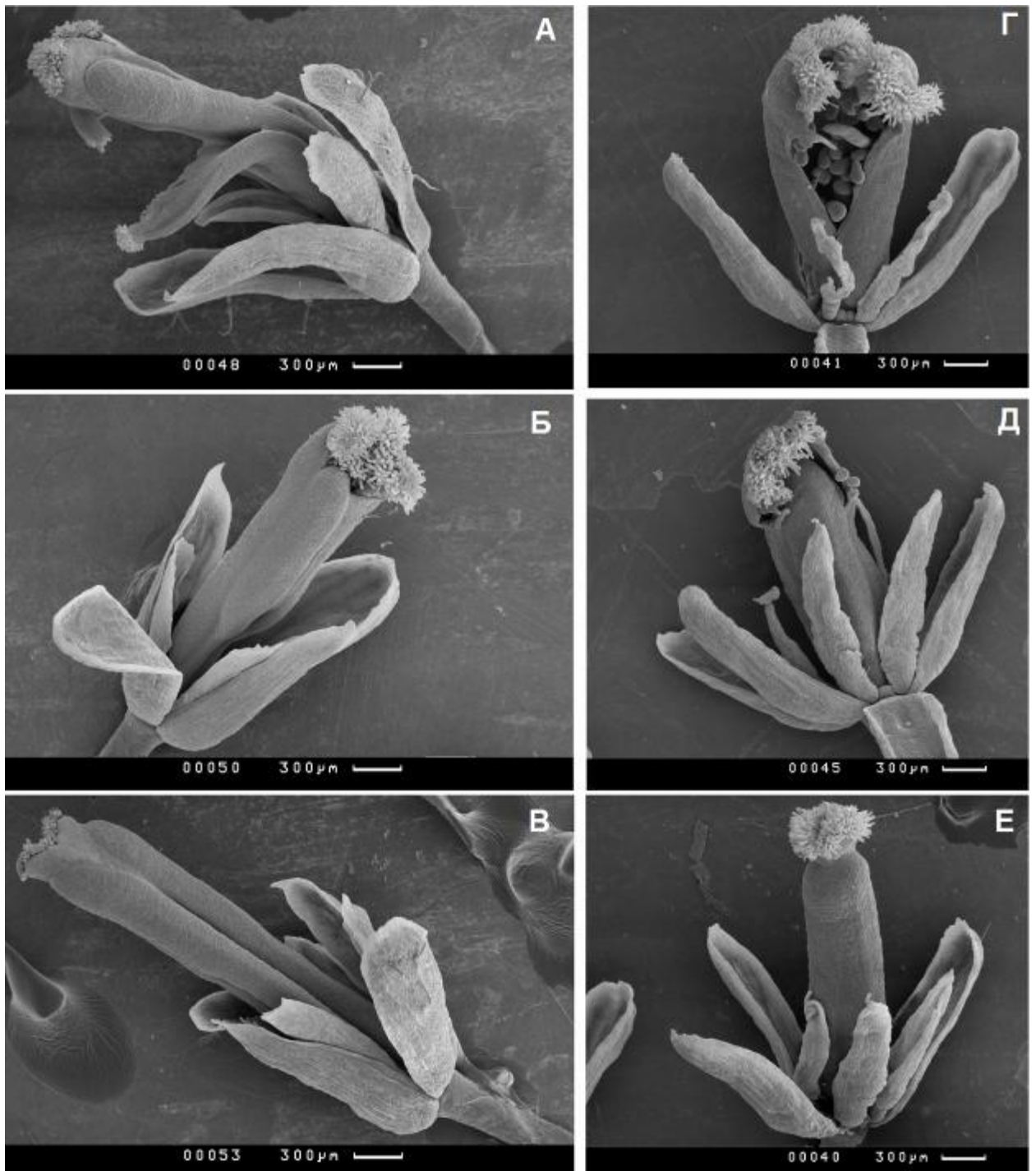


Рисунок 6. Цветки двойного мутанта *fas5 pi-1* и одиночного мутанта *pi-1* принадлежащие к разным ярусам соцветия. А, Б, В - соответственно апикальный, средний и базальный цветки одиночного мутанта *pi-1*. Г, Д, Е - соответственно апикальный, средний и базальный цветки двойного мутанта *fas5 pi-1*. Бары соответствуют: А-Е – 300мкм.



Рисунок 7. Структура продукта гена *TOP1*. Консервативные функционально-значимые домены (обозначены прямоугольниками): N-терминальный ДНК-связывающий домен (364 - 582 АО), С-терминальный каталитический домен (585-811 АО), С-терминальный топоизомераза I ассоциированный домен (858-876 АО): содержит активный центр фермента (858-876 АО), активный остаток тирозина расположен в позиции 872 (отмечен зелёным). Шкала – сотни АО.

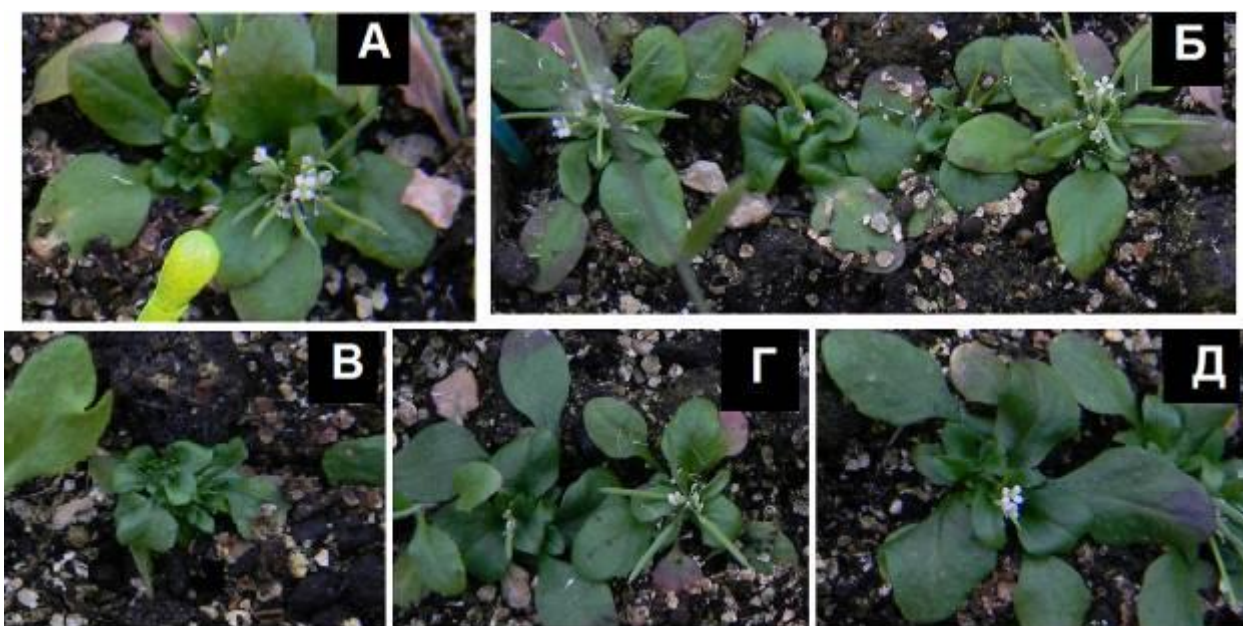


Рисунок 8. Проявление мутации *na-D* на фоне расы Di. А, Б – гетерозиготы F1 *na-D*. В – гомозигота *na-D* F2. Г, Д – гетерозиготы F2.

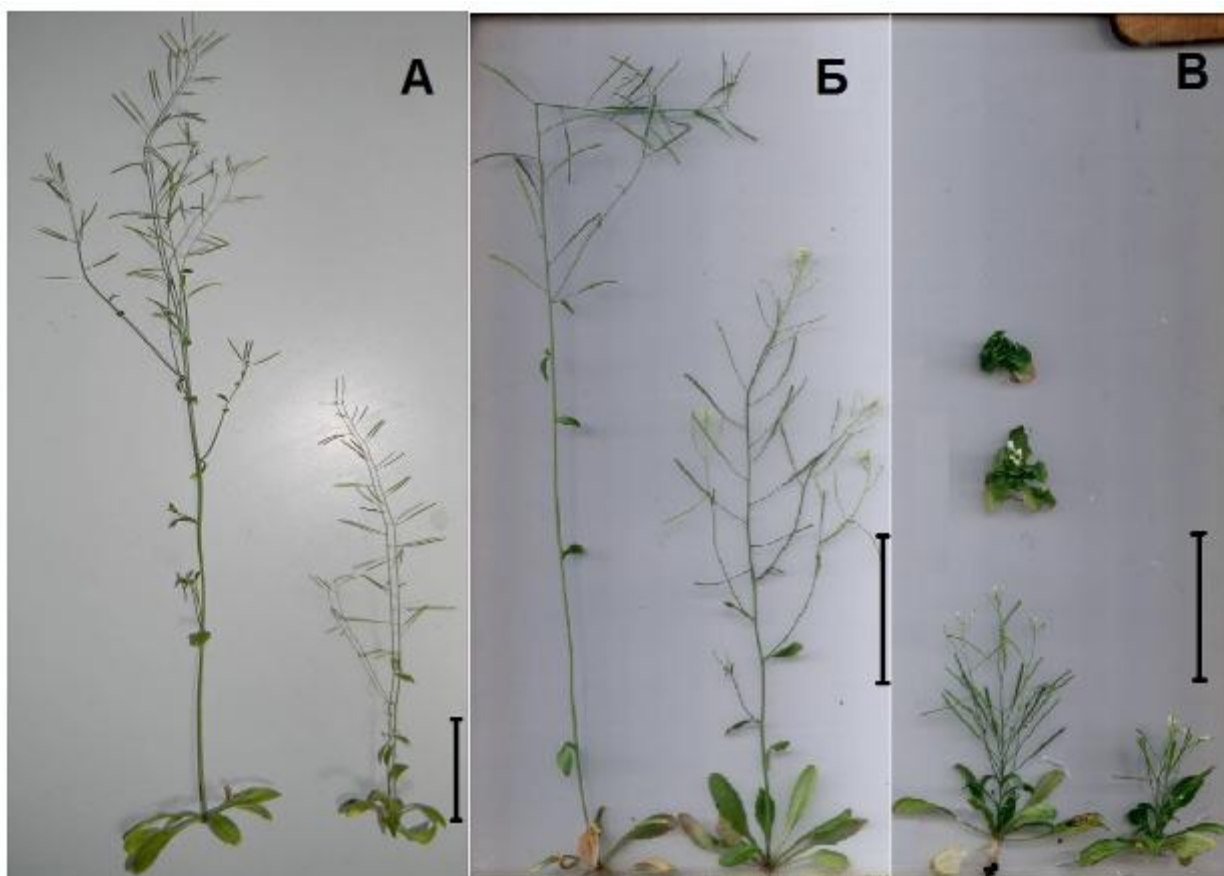


Рисунок 9. Проявление мутации *na-D* на фоне расы Vla. А - F1 от скрещивания Vla × *na-D*, слева направо: растение дикого типа, гетерозигота *na-D*. Б, В – F2 от скрещивания Vla × *na-D*, нижний ряд, слева направо: растение дикого типа, гетерозиготы *na-D* высотой соответственно 22см, 9см и 5см; верхний ряд – снизу вверх: гетерозигота *na-D* с высотой 1см, гомозигота *na-D*. Бары соответствуют 5см.

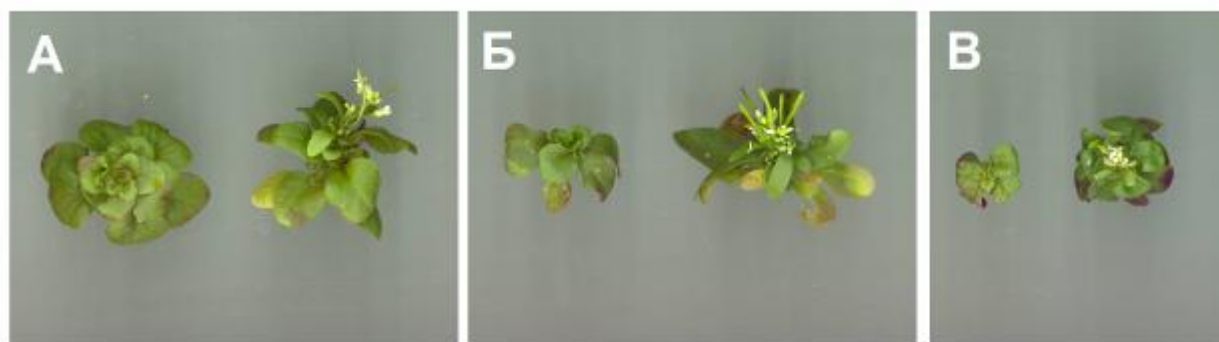


Рисунок 10. Мутация *na-D* на фоне мутаций *clv1*, *clv2-1* и *clv3-2*. А – на фоне *clv1*. Б – на фоне *clv2-1*. В - *clv3-2*. Справа налево – растение *clv*, гомозиготное по *na-D*, растение *clv* гетерозиготное по *na-D*.

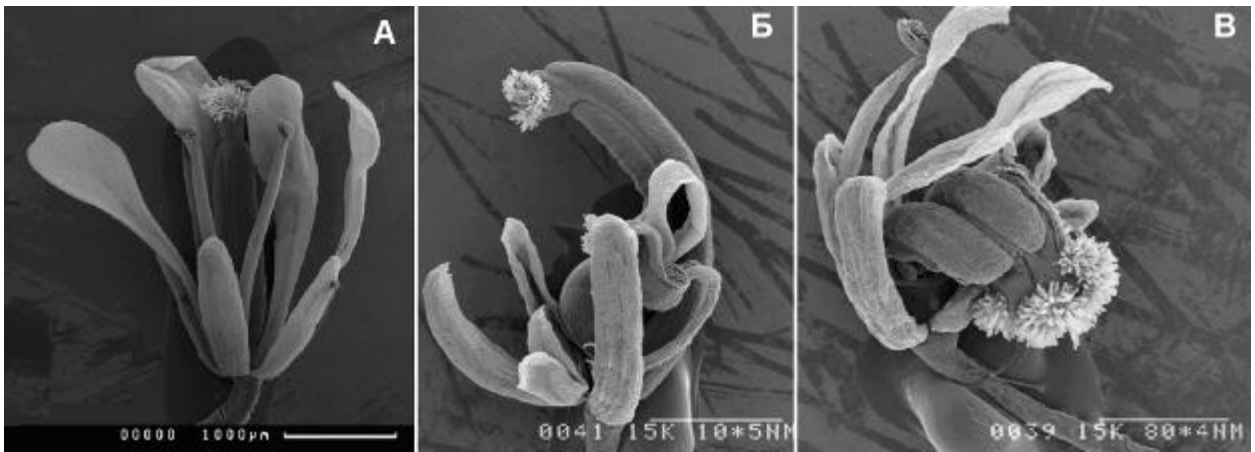


Рисунок 11. Цветки двойного мутанта *fas5 na-D* и одиночного мутанта *na-D*. А - цветок гетерозиготного растения *na-D*. Цветки растения *fas5* гетерозиготного по *na-D*: Б - базальный цветок. В - апикальный цветок. Бары соответствуют: А, Б - 1000мкм, В - 800мкм.

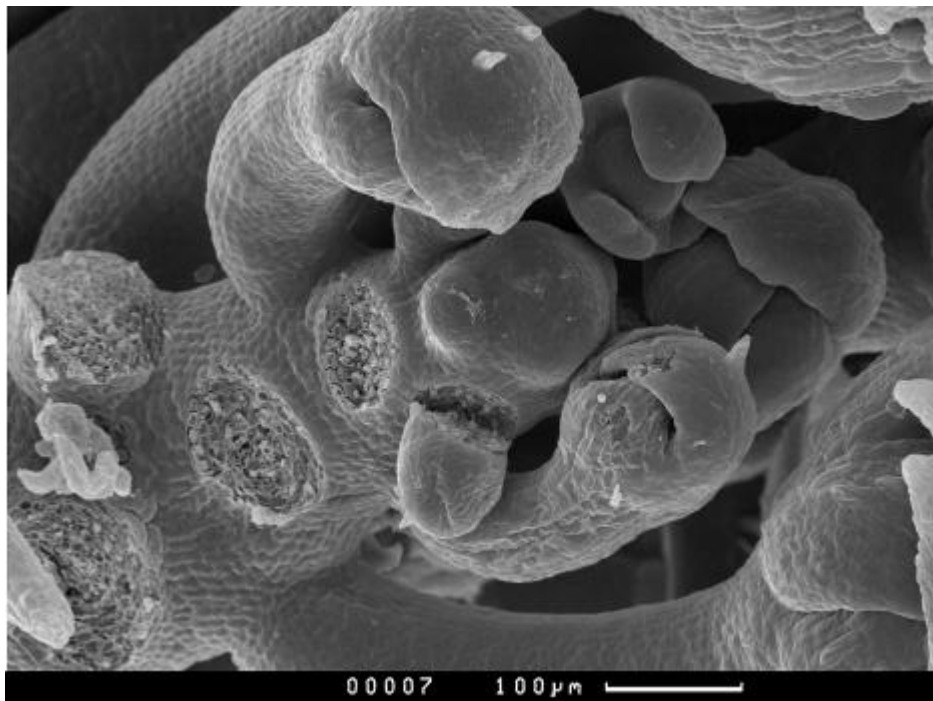


Рисунок 12. АМП растения *fas5*, выращивавшегося в климатической камере.

Таблица 1. Доля растений с развитой фасциацией/отсутствием развитой фасциации в потомстве мутантных растений *fas5* с разной степенью развития фасциации.

Родительское растение	Число растений со слабой фасциацией/без фасциации	Число растений с сильной фасциацией	Σ Выборки	% растений с сильной фасциацией
Растение с сильной фасциацией	132	23	155	15±2,9%
Растений со слабой фасциацией	140	17	157	11±2,5%

Таблица 2. Морфометрические данные розетки и цветоноса растений дикого типа и мутанта *fas5* без развитой фасциации и с ярко выраженной фасциацией стебля

Линия	Розеточные листья	Стеблевые листья	Высота вегетативной части	Высота генеративной части	Общая высота растения
Дикий тип	8,2±0,7	3,6±0,7	20,1±1,4	20,2±1,3	40,3±1,3
<i>fas5</i>	4,7±0,6**	5,7±1	21,1±0,9	20,9±1,1	42±0,8
<i>fas5</i> с ярко выраженной фасциацией	4,3±0,64**	13,0±4,3	18,3±1,2	15,7±0,8**	34,6±1,7**

** - средние значения числа розеточных листьев для *fas5* достоверно отличаются от значений для дикого типа и средние значения высоты генеративной части и общей высоты растения для *fas5* с ярко выраженной фасциацией отличаются от таковых для *fas5* со слабой фасцией и дикого типа при уровне значимости $P > 0,99$

Таблица 3. Число цветков у растений дикого типа и *fas5* с разной степенью развития фасциации

Линия	Число цветков
ДТ	22,1±5,6**
<i>fas5</i> (слабая фасциация)	36±2,7*
<i>fas5</i> (сильная фасциация)	49,7±7,4*

** - среднее значение для дикого типа отличается от средних значений для *fas5* при $P > 0,99$

* - средние значения для *fas5* со слабой и сильной фасциацией отличаются друг от друга при $P > 0,95$

Таблица 4. Характеристика типа и числа органов цветка в базальной, средней и апикальной частях цветоноса мутанта *fas5* и дикого типа.

Орган	1-5 цветки		6-10 цветки		11-15 цветки	
	<i>fas5</i>	Дикий тип	<i>fas5</i>	Дикий тип	<i>fas5</i>	Дикий тип
Чашелистики	4,13 ±0,51	4,02 ±0,13	4,07 ±0,47	4,05 ±0,22	3,89 ±0,90	4 ±0
Карпеллоидные чашелистики	0,04 ±0,27	-	0,24 ±0,79	-	0,15 ±0,68	-
Лепестки	3,15 ±1,01**	4,03 ±0,26	1,89 ±1,17**	4,03 ±0,18	1,53 ±0,98	4 ±0
Узкие лепестки	0,58 ±0,76**	-	1,13 ±0,94**	-	1,36 ±0,97	-
Тычинки	4,8 ±1,53**	5,67 ±0,51	4,31 ±1,37	5,75 ±0,44	3,87 ±1,69**	5,53 ±0,54
Карпеллоидные тычинки	0,15 ±0,36	-	0,29 ±0,57	-	0,24 ±0,47	-
Плодолистики	2,56 ±0,16	2 ±0	2,44 ±0,14	2 ±0	2,65 ±0,89	2 ±0
Несросшиеся плодолистики	1,25 ±1,68	-	0,65 ±1,16	-	1,16 ±1,64	-

"-" - отсутствие данного типа органов

** - средние величины мутанта *fas5* в соответствующих мутовках достоверно отличаются друг от друга при уровне значимости $P > 0,99$

Таблица 5. Число органов в цветках разных ярусов одиночного мутанта *pi-1* и дойного мутанта *fas5 pi-1*

органы	1-5 цветки		6-10 цветки		11-15 цветки	
	<i>fas5 pi-1</i>	<i>Pi-1</i>	<i>fas5 pi-1</i>	<i>Pi-1</i>	<i>fas5 pi-1</i>	<i>Pi-1</i>
1 мутовка	4,16±0,1	4	4,07±0,05	4	4	4
2 мутовка	3,93±0,1	4	3,2±0,1**	3,97±0,03	3,1±0,17**	3,9±0,02
3 мутовка	2,9±0,11	3,14±0,12	2,73±0,1**	3,17±0,07	2,73±0,08**	3,08±0,06
4 мутовка	2,23±0,08*	2,1±0,04	2,56±0,09**	2,05±0,04	2,8±0,07**	2,03±0,03

* - значения *fas5 pi-1* достоверно отличаются от значений для *pi-1* при уровне значимости $P > 0,95$

** - значения *fas5 pi-1* достоверно отличаются от значений для *pi-1* при уровне значимости $P > 0,99$

Таблица 6. Доля органов дикого типа и аномальных органов в цветках *fas5 pi-1* разных ярусов

органы	1-5 цветки		6-10 цветки		11-15 цветки	
	Д.Т.	Аномальные	Д.Т.	Аномальные	Д.Т.	Аномальные
1 мутовка	4,16±0,1	0	4,07±0,05	0	4	0
2 мутовка	3,87±0,12	0,07±0,05	2,97±0,12	0,27±0,12	2,73±0,18	0,3±0,14
3 мутовка	2,77±0,14	0,13±0,1**	1,43±0,26	1,3±0,26**	1±0,23	1,73±0,27
4 мутовка	2,1±0,13	0,067±0,06**	0,27±0,15	2,3±0,17**	2,8±0,07	2,43±0,19

** - значения числа аномальных органов для 1-5 цветков достоверно различаются от значений для 6-10 и 11-15 цветков при уровне значимости $P > 0,95$

Таблица 7. Анализ соотношения числа семей F3 гомозиготных по мутации *fas5*, выщепляющих и не выщепляющих двойные мутанты *fas5 lfy-10*.

Общее число семей F3	Нерасщепляющиеся семьи	Расщепляющиеся семьи	Генетическое расстояние
41	39	2	2,5±0,01сМ

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.