

КАВАЙ-ООЛ У.Н.¹, ЕЖОВА Т.А.²

¹Тувинский государственный университет

Россия, 667000, Кызыл, ул. Ленина, д.36, e-mail: dr.urana@mail.ru,

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Москва, 119992, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12, e-mail: ezhova2001@mail.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ *ABRUPTUS/PINOID* И *APETALA2* В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЦВЕТКА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Развитие цветка контролируется сложной системой взаимодействующих генов и физиологических факторов. Важную роль в инициации развития меристемы цветка *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. играет ген *ABRUPTUS/PINOID1* (*ABR/PID1*), регулирующий полярный транспорт ауксина (ПТА). Ген *ABR/PID1* кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая участвует в обеспечении локализации на мембране клетки белка PIN1, выносящего ауксин из клетки [1–2]. Мутации в гене *ABR/PID1* приводят к нарушению ПТА в растениях и изменению многих признаков [3–5]. Одна из мутаций *abruptus* (*abr*) получена на кафедре генетики МГУ. Она приводит к температурозависимой инактивации гена *ABR/PID1*: при повышенной температуре (27–29 °С) растения формируют цветонос, который похож на булавку и на котором либо нет цветков, либо развиваются единичные стерильные цветки аномальной морфологии. При 21–24 °С растения фертильны. Цветки имеют небольшие чашелистики, крупные многочисленные лепестки, число которых достигает 10 (в среднем 5,4, вместо 4-х у дикого типа), тычинки и пестик (рис. 1, а, б). Цветонос таких растений после развития 8–12 цветков также

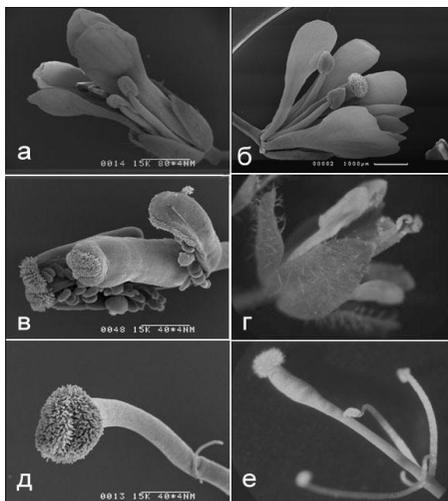


Рис. 1. Морфология цветков растений дикого типа (а), одиночных мутантов *abr* (б), *vaf2* (в), *ap2-1* (г) и двойных мутантов *abr vaf2* (д) и *abr ap2* (е)

терминируется булавовидной структурой. Фенотип мутанта свидетельствует о важной роли ПТА в контроле морфогенеза цветка как на самых ранних этапах детерминации и развития флоральной меристемы (ФМ), так и при образовании флоральных органов. [7].

Аномалии в развитии цветка мутанта *abr* могут быть результатом изменения активности гомеозисных генов, которые определяют тип органа цветка и запускают программы дифференцировки флоральных органов. Ген *APETALA2 (AP2)*, продуктом которого является транскрипционный фактор, вместе с геном *APETALA1 (API)* контролирует развитие органов околоцветника. Целью данной работы являлось изучение взаимодействия генов *AP2* и *ABR/PID1* в контроле развития органов околоцветника. В работе приведены результаты сравнительного анализа морфологии растений одиночных и двойных мутантов с разным уровнем активности генов *AP2* (*vaf2* — жесткая аллель, *ap2-1* — мягкая аллель) и *ABR*, а также результаты изучения уровня экспрессии генов *AP2* в растениях дикого типа и мутантах *abr*.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания. В работе использовали растения мутанта *abr* (линия К-150), *vaf2* (К-217) и расы дикого типа Dijon-M (К-1), а также растения мутанта *ap2-1* (*mm4*) из коллекций кафедры генетики МГУ им. М.В. Ломоносова и г. Гатерслебен (Германия). Растения выращивали в условиях теплицы и на агаризованной среде Квитко в лабораторных установках. Двойные мутанты *abr vaf* и *abr ap2-1* выделяли среди растений в поколениях F₂ и F₃ от скрещиваний мутанта *abr* с растениями *vaf2* и *ap2-1*.

Морфометрия. Для анализа морфологии цветков использовали критерии, принятые ранее для *A.thaliana*. Среднее число органов цветка рассчитывали для 10-ти цветков, базально-расположенных на главном цветоносе (с 1-го по 10-й цветки). Съёмки растений проводили цифровыми фотоаппаратами фирм “Minolta” (USA) и “Casio” QV-4000 (Japan).

Сканирующее электронное микроскопирование. Исследование органов и тканей растений проводили с помощью аналитического сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Jeol, Japan) и СЭМ S-405A (Hitachi, Japan). Материал фиксировали в 4% глутаральдегиде в 0,025M фосфатном буфере (pH 7.0) при 4 °C в течение 18 часов. Затем образцы опускали в 2%-ный осмий (OsO₄) (на ночь), три раза промывали фосфатным буфером, обезвоживали серией спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70% не более 10–15' и 80 и 96% по 2 раза 30') и переносили далее в 100%-ный ацетон на 30'. Материал высушивали проведением возгонки жидкой фазы в газобразную, под высоким давлением и температуре. Структуры прикрепляли к столикам и напыляли смесью палладия и платины в ионном напылителе IB-3 (Eiko, Japan) слоем 15 нм.

Анализ транскрипции гена AP2. Уровень транскрипции *AP2* оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной

обработкой ДНКазой с помощью RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15T праймером (Silex, Russia). ОТ-ПЦР-ПВ проводили на приборе АНК-32 (Syntol, Russia), с использованием наборов “Комплект реагентов для проведения ПЦР-ПВ в присутствии EVA Green” (Syntol, Russia). В качестве внутреннего контроля использовали ген *EF1* (фактор элонгации), который характеризуется конститутивной экспрессией в растениях *A. thaliana*. Последовательность праймеров для амплификации кДНК *AP2* (праймер 1: ACAGTCCCAAATATGAGATTCCCATC; праймер 2: AGGATTCCCTGATGACTCGGCATT) и *EF1* (праймер 1: TTGCTGTTGTAACAAGTGGATGC; праймер 2: AAGATTGGTGGTATTGGAACGG). Анализ проводили в 3-х повторностях.

Результаты и обсуждение

Для анализа генных взаимодействий использовали две мутации в гене *AP2* с разной степенью экспрессивности мутантного признака. Мутация *vaf* приводила к формированию цветков с существенно сниженным числом органов и изменениями типа органов в разных мутовках. Вместо 4-х чашелистиков в наружной мутовке формировались в основном плодолостики с семяпочками по краям и рыльцевой тканью на верхушке (в среднем 3,1), лепестки во II-ой мутовке чаще отсутствовали (рис. 1, в). В III мутовке развивались тычинки, число которых резко уменьшено (1.3) по сравнению с диким типом (5.6). Пестики имели нормальное строение (2 плодолостика). Вторая мутация *ap2-1* характеризуется заменой чашелистиков на листья (4,0). Во II мутовке вместо нормальных тычинок развиваются лепестко-тычинки (4,0), т.е. органы, которые по форме напоминают тычинку, но вместо пыльников на тычиночной нити формируются ткани лепестка (рис. 1, г). Число и тип органов III и IV мутовок не изменены. Интересно, что в отличие от других суровых аллелей, — мутация *vaf* вела себя, как рецессивная по сравнению с мягкой аллелью (гибриды F_1 имели фенотип *ap2-1*).

Главной особенностью двойных мутантов *abr vaf2* и *abr ap2-1* было отсутствие (в цветках апикальной части цветоноса) или существенная редукция (цветки базальной части цветоноса) органов околоцветника и III круга тычинок (рис. 1, д, е). Апикально расположенные цветки состояли из одних пестиков, имеющих морфологические особенности (палочковидный пестик) мутанта *abr*. Цветки базальной части цветоноса двойных мутантов *abr vaf2* изредка формировали тычинки (0,2 на цветок). Цветки *abr ap2-1* в I мутовке формировали в среднем 2 органа, которые были представлены либо листьями (25%), либо филаментами (16%), либо листоподобными плодолостиком (59%). Органы второго круга отсутствовали, а число тычинок (III мутовка) и плодолостиков (IV мутовка) было таким же, как у мутанта *abr 3,7* и 0,4, соответственно. У обоих двойных мутантов верхушки цветоносов оканчивались булавковидной структурой, как у мутанта *abr*.

Таким образом, морфология цветков двойных мутантов показывает существенные отличия от родительских форм. Основной особенностью обоих

двойных мутантов является редукция (полная или частичная) органов наружной мутовки. Этот фенотип свидетельствует о комплементарном взаимодействии доминантных аллелей дикого типа генов *AP2* и *ABR/PID1* в контроле развития органов околоцветника. По-видимому, при развитии чашечки и венчика ген *AP2* определяет тип органа I и II мутовок, а ген *ABR/PID1* — положение и размер органов. Согласно предсказаниям математической модели, описывающей развитие цветка *A.thaliana* [8], определение типа органов цветка предшествует разметке их будущих позиций. Можно предполагать, что отсутствие нормальных продуктов генов *AP2* и *ABR/PID1*, приводящее к нарушению обоих процессов, вызывает редукцию околоцветника у двойного мутанта.

Нами был проведен также анализ уровня транскрипции гена *AP2* в цветках растений дикого типа и мутанта *abr* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Установлено, что уровень транскрипции *AP2* в цветках мутанта превышает таковой в растениях дикого типа почти в 2 раза. Возможно, что усиление транскрипции нормальной аллели *AP2* в цветках мутанта *abr* может вызывать образование большого числа лепестков у одиночного мутанта *abr*. В цветках двойных мутантов восстановления образования лепестков не происходит, т.к. усиление транскрипции мутантных аллелей не может вызвать нормализацию определения типа органов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ и Научные Школы.

Литература

1. Christensen S.K., Dagenais N., Chory J. et al. Regulation of Auxin Response by Protein Kinase PINOID // *Cell*. 2000. V.100. P. 469–478.
2. Friml J., Yang X., Michniewicz M. et al. A PINOID dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux // *Science*. 2004. V.306. P. 862–865.
3. Bennet S.R.M., Alvares J., Bossinger G., Smyth D.R. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1995. V.8. P. 505–520.
4. Калинина А.Ю., Ежова Т.А., Голубева Н.В. и др. Полярный транспорт ауксина у мутанта *abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Вестник СпбГУ. 2000. Сер.3. Вып.1. №3. С. 44–51.
5. Ежова Т.А., Солдатова О.П., Калинина А.Ю. и др. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *LEAFY* в процессе флорального морфогенеза у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Генетика. 2000. Т.36. №12. P. 1–6. (Ezhova T.A., Soldatova O.P., Kalinina A.Yu. Interactions between the *ABRUPTUS/PINOID* and *LEAFY* genes during floral morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Rus. J. Genetics*. 2000. V.36. №12. P. 1418–1422).
6. Benjamins R., Quint A., Weijers D. et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // *Development*. 2001. V.128. P. 4057–4067.
7. Ежова Т.А., Ондар У.Н., Солдатова О.П., Кузнецова Т.А. Изучение роли гена *ABRUPTUS* в дифференцировке цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Доклады Акад. наук. 1997. Т.354. №6. С. 839–842.
8. Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. №5.

9. Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. №6. С. 645–659.

Резюме

Приведены результаты анализа морфологии растений одиночных мутантов *abr* и *vaf2* и *ap2-1*, двойных мутантов *abr vaf* и *abr ap2-1*, а также результаты изучения уровня экспрессии гена *AP2* в цветках растений дикого типа и мутанта *abr*. Установлено, что при развитии околоцветника гены *AP2* и *ABR/PID1* комплементарно взаимодействуют. Показано увеличение уровня транскрипции гена *AP2* в цветках мутанта *abr*.

We have studied the morphology of single mutants *abr*, *vaf2*, *ap2-1* and double mutants *abr vaf* and *abr ap2-1*, and also the level of *AP2* gene transcription in wild type and *abr* mutant flowers. It is established that *ABR* and *ABR/PID1* genes complementary interact in regulating perianth development. The increasing level of *AP2* transcription was demonstrated in *abr* mutant flowers.

КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., ТИХАНОВИЧ Н.И.

ГНУ “Институт генетики и цитологии НАН Беларуси”,
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27,
e-mail: M.Mikhailova@igc.bas-net.by

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА *RYR1*, АССОЦИИРОВАННОМУ С ПОВЫШЕННОЙ СТРЕССЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Новые достижения в области биотехнологий дают возможность для качественно новых подходов в селекции свиней. По статистическим данным около половины всего изготовленного в мире мяса занимает свинина. Значительный спрос на постную свинину привел к разработке селекционных программ, направленных на выведение пород животных, характеризующихся высокой мясностью.

В то же время интенсивная селекция свиней на мясность привела к нежелательным тенденциям — ослаблению природной устойчивости, ухудшению качества мяса и увеличению стрессчувствительности (PSS-синдром). Под действием стрессовых факторов, таких как перегрев, скученность, транспортировка, избежать которых в условиях животноводческого комплекса очень трудно, у животных развивается злокачественный гипертермический синдром (MHS — Malignant Hyperthermia Syndrome), наблюдается резкое снижение рН на фоне высокой температуры тела (38–40 °С), что приводит к гибели животных. У таких свиней после убоя происходят быстрые биохимические изменения в скелетной мускулатуре, в результате чего образуется так назы-