

УДК 575.164

## **FIMBRIATA PETIOLES – ГЕН *Arabidopsis thaliana*, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ ПРОЦЕССЫ ДЕЛЕНИЯ И РОСТА КЛЕТОК ОРГАНОВ ЦВЕТКА<sup>1</sup>**

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол\*, Т. А. Ежова

\*Тувинский государственный университет,

Кафедра общей биологии, 667000 Кызыл, ул. Ленина, д. 36

\*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук,

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Кафедра генетики, 119992 Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12

e-mail: dr.urana@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.10 г.

Окончательный вариант получен 21.10.10 г.

У *Arabidopsis thaliana* с помощью химического мутагенеза получен новый мутант *fimbriata petioles* (*fip*), характеризующийся необычными аномалиями развития органов цветка. В дистальной области чашелистиков и лепестков наблюдается появление групп очень крупных клеток, создающих бахромчатость краев этих органов. На основании анализа морфологии органов цветка и листьев у двойного мутанта *fip as1* выявлено комплементарное взаимодействие генов *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) и *FIMBRIATA PETIOLES* (*FIP*). Предполагается, что ген *FIP* вместе с геном *AS1* контролирует пролиферацию клеток, предотвращая преждевременную эндоредупликацию.

**Ключевые слова:** морфогенез растений, *Arabidopsis thaliana*, деления и рост клеток, развитие органов цветка.

Изучение генетического контроля развития цветка у *Arabidopsis thaliana* в последние годы позволило получить новые данные о генетических и молекулярных механизмах данного процесса. На основе анализа гомеозисных мутантов *apetala2*, *apetala3*, *pistillata*, *agamous*, была сформулирована классическая ABC-модель детерминации типа органов цветка (Coen, Meyerowitz, 1991), которая позже была дополнена новым классом E, представленным генами семейства *SEPALLATA* (*SEPI*, *SEP2*, *SEP3*, *SEP4*; обзор Krizek, Fletcher, 2005). Высококонсервативные гены ABCE-классов определяют тип органов цветка у большинства исследованных цветковых растений, но не существующее разнообразие их формы.

Сегодня внимание исследователей направлено на выявление генов, которые определяют особенности строения органов цветка (размер, форму). Эти особенности у растений не связаны с процессами миграции и апоптоза клеток, которые у живот-

ных играют ключевую роль в определении формы развивающегося органа, но являются результатом генетически запрограммированных изменений процессов пролиферации, растяжения и дифференцировки клеток как в самих примордиях органов, так и в участках флоральной меристемы, расположенных между органами. Показано, что у *Arabidopsis thaliana* гены *CUP-SHAPED COTYLEDONS1, 2* (*CUC1* и *CUC2*) и *PETAL LOSS* (*PTL*) нужны для формирования границ между органами и развития отдельных (не слитых) органов цветка путем подавления пролиферации клеток, расположенных между органами. При нарушении их функции у двойных мутантов *ptl cuc1* и *ptl cuc2* органы околоцветника сливаются (Brewer et al., 2004). Гены *AS1*, *AS2* и *JAGGED* (*JAG*) ограничивают действие “пограничников” в примордиях органов, прямо или опосредованно подавляя их транскрипцию в тех участках, где они сами экспрессируются. В околоцветнике двойных мутантов *as1 jag* и *as2 jag* из-за расширения областей непролиферирующих клеток формируются узкие филаменто-подобные органы (Xu et al., 2008). Одиночные мутанты *as1* и *as2* также имеют некоторые аномалии развития цветка (уко-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00859-а) и федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект № НШ-3293.2010.4)

Число органов цветка у одиночных мутантов *fip*, *as1* и двойного мутанта *fip as1*

Мутовка, органы	Дикий тип	<i>fip</i>	<i>as1</i>	<i>fip as1</i>
I – чашелистики ( $k_{\text{var}}$ )	4.0 ± 0 (0)	4.1 ± 0.1(5)	4.1 ± 0.2 (23)	4.6 ± 0.8 (70)
II – лепестки ( $k_{\text{var}}$ )	4.0 ± 0 (0)	3.4 ± 0.5 (26)	4.0 ± 0 (0)	4.8 ± 0.8 (57)
III – тычинки ( $k_{\text{var}}$ )	5.4 ± 0.2 (12.6)	4.4 ± 0.5 (17)	5.9 ± 0.4 (22)	7.2 ± 0.9 (53)
IV – плодолистики ( $k_{\text{var}}$ )	2.0 ± 0 (0)	2.6 ± 0.9 (9.6)	2.0 ± 0 (0)	2.5 ± 0.5 (63)

Примечание.  $k_{\text{var}}$  – коэффициент вариации значений выборки в процентах.

рочение и сужение чашелистиков, а у *as1* – и лепестков), а также листа (асимметричные бугристые листья; Ori et al., 2000; Byrne et al., 2002). В нашей работе приведены результаты изучения нового рецессивного моногенного мутанта *A. thaliana fimbriata petioles (fip)* из коллекции кафедры генетики, который характеризуется необычными аномалиями развития органов цветка, а также двойного мутанта *fip as1*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали линии из коллекции кафедры генетики МГУ: К-1 (дикий тип, раса Dijon-M) и М-40 (мутант *fip*). Мутант выделен с помощью химического мутагенеза (этилметансульфонат). Из-за женской стерильности мутант поддерживали путем размножения гетерозиготных фенотипически нормальных растений. Для изучения взаимодействия генов использовали мутант *as1* из коллекции кафедры генетики (линия К-102). Растения выращивали в теплице в смеси почвы и песка (2 : 1) в условиях теплицы на длинном дне.

Исследовали по 20 цветущих растений 8–9-недельного возраста дикого типа и мутантов *fip* и *as1*, а также 10 растений двойного мутанта *fip as1*. У каждого растения исследовали число и тип органов в 10-ти базально-расположенных цветках главного цветоноса. Съёмки растений проводили цифровым фотоаппаратом “Canon” (Япония) под бинокуля-

ром Stemi 2000-C (Германия). Детальный анализ структуры органов проводили с помощью аналитического и сканирующего электронного микроскопов JSM-6380LA и СЭМ S-405A (фирм Jeol и Hitachi, Япония, соответственно). Материал готовили, как описано ранее (Ондар и др., 2008).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Растения *A. thaliana* расы Dijon-M, на основе которой получен мутант *fip*, имеют типичный для семейства крестоцветных цветок: 4 чашелистика, 4 лепестка, от 4 до 6 тычинок (5.4 тычинки в среднем) и пестик из двух плодолистиков. У мутанта *fip* среднее число органов I-ой и II-ой мутовки цветка незначительно отличается от дикого типа, однако варьирует очень широко (от 3-х до 5-ти чашелистиков и от 2-х до 5-ти лепестков соответственно), что видно по величине коэффициента вариации (таблица). Число генеративных органов III-ей и IV-ой мутовок у мутанта варьируют в пределах от 2-х до 5-ти тычинок и от 2-х до 4-х плодолистиков. У мутанта *fip* также иногда встречаются единичные филаменты в III-ей мутовке. В цветках расы Dijon-M число органов I-ой, II-ой и VI-ей мутовок цветка стабильно – все 200 исследованных цветков имели по 4 чашелистика, 4 лепестка и 2 плодолистика, а коэффициент вариации числа тычинок составляет 12.6%, что также значительно ниже, чем у мутанта (таблица).

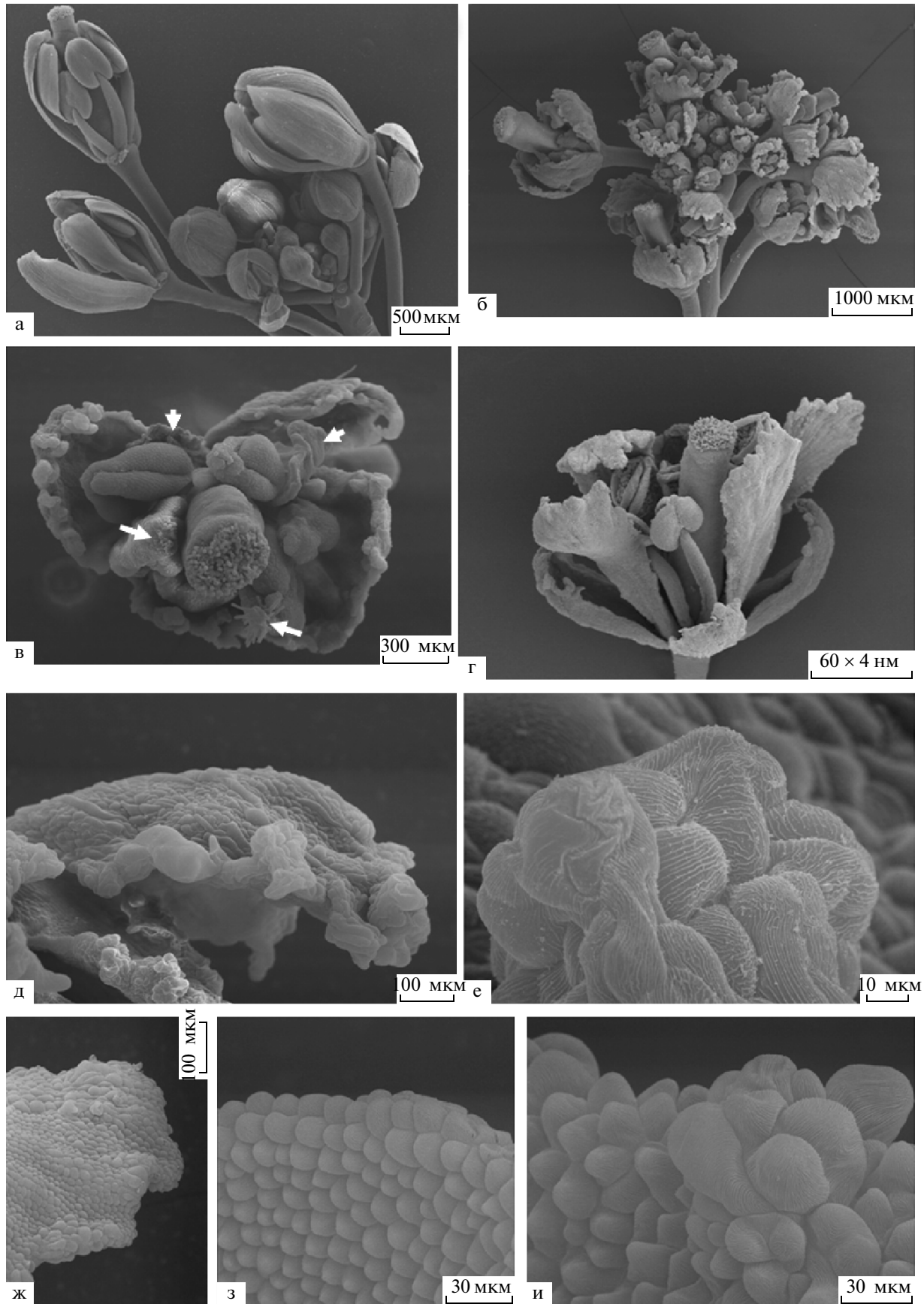
**Рис. 1.** Особенности морфологии цветка мутанта *fip* (сканирующая электронная микроскопия):

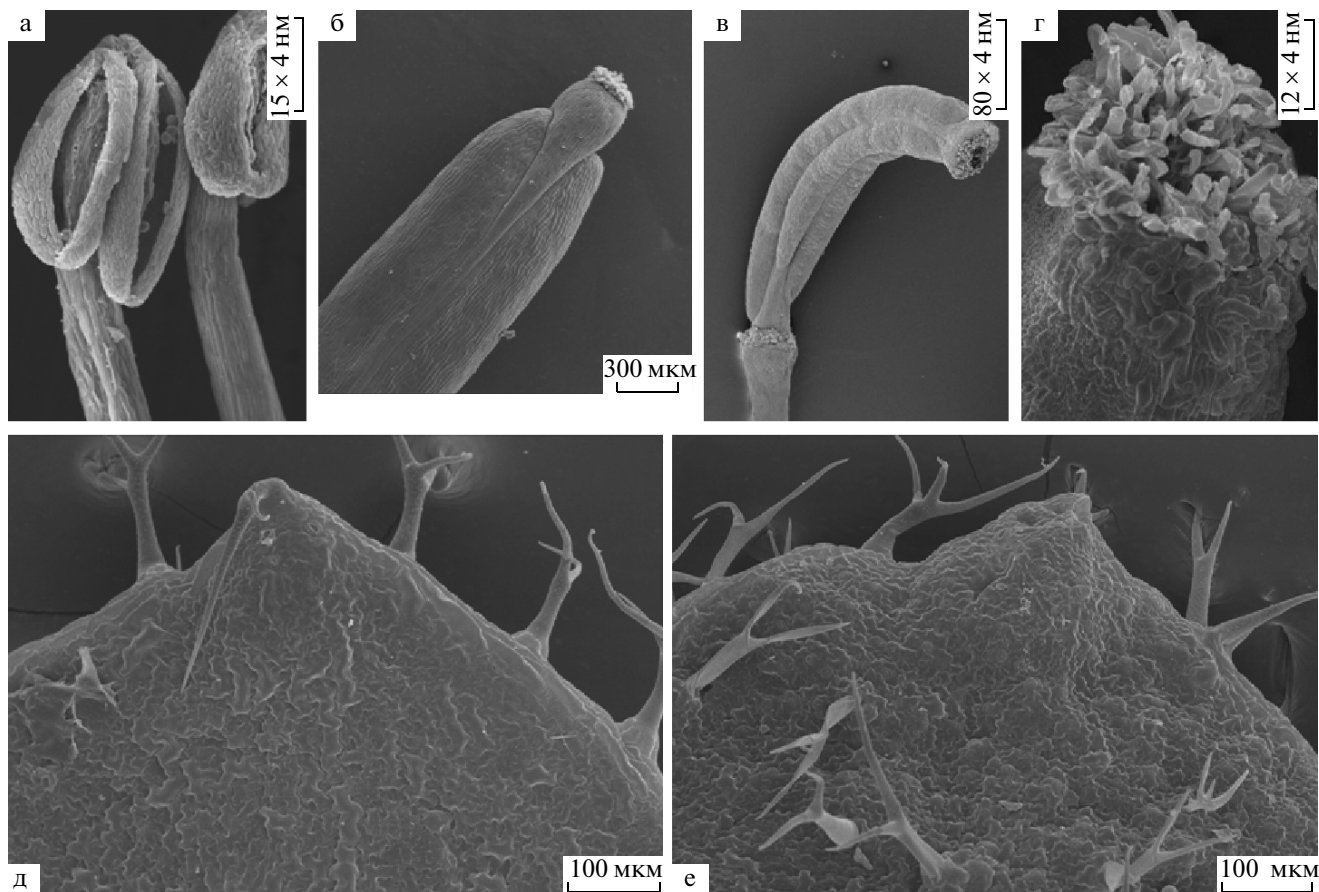
а и б – верхушки соцветий дикого типа и мутанта, соответственно; у мутанта молодые бутоны открыты; видны укороченные чашелистики с волнистыми краями;

в и г – цветки мутанта с бахромчатыми краями органов околоцветника (чашелистиков и лепестков); в более молодом цветке (в) лепестки короче чашелистиков (отмечены короткими стрелками), а на верхушках некоторых тычинок видна рыльцевая ткань (длинные стрелки);

д–и – дистальные края чашелистиков (д, е) и лепестков (ж, з, и) мутанта (д, е, ж, и) и дикого типа (з); у мутанта видны отдельные группы крупных клеток.

Бары соответствуют (а) – 500, (б) – 1000, (в) – 300, (г) – 600, (д) – 100, (е и ж) – 10, (з и и) – 30 мкм.





**Рис. 2.** Морфология генеративных органов цветка и листа мутанта *fip* (сканирующая электронная микроскопия):

а – тычинки мутанта;

б–г – пестики дикого типа (б) и мутанта (в, г), состоящие из 2-х и 4-х плодолистиков соответственно; на рисунке г видны аномалии столбика и рыльца;

д и е – верхушки листьев розетки растения дикого типа и мутанта, соответственно; на листе мутанта видны расположенные группами трихомы, бугристость поверхности и асимметрия края листа.

Бары соответствуют (а) – 150, (б) – 300, (в) – 800, (г) – 120, (д и е) – 100 мкм.

Чашелистики мутанта существенно короче, чем у цветков дикого типа, и не закрывают внутренние органы цветка на стадии бутонизации (рис. 1а, б). Размер и форма чашелистиков сильно варьирует, но, как правило, чашелистики мутанта *fip* имеют более широкую, чем у дикого типа, дистальную область и асимметричную форму (рис. 1а, б, в). Встречаются слитые у основания чашелистики. Некоторое расширение дистальной области характерно и для лепестков (рис. 1г). Лепестки также короче, чем у дикого типа, причем их размеры сильно варьируют: лишь единичные по размеру приближаются к дикому типу, большинство (около 60%) не превышают длины чашелистиков, а остальные короче, чем у дикого типа примерно на треть. Отмечены случаи слияния тканей лепестков и чашелистиков.

Наиболее ярким признаком мутанта *fip* является изменение структуры органов околоцветника – бахромчатый край чашелистиков и особенно лепестков (рис. 1б, в, г), что отражено в названии мутанта (*fimbriata petioles*). По краю чашелистиков и лепестков хорошо заметны отдельные группы крупных клеток (рис. 1д, е, ж, и), которых не наблюдается у дикого типа (рис. 1а, з). Неравномерное распределение этих групп создает “бахрому” по краю органов околоцветника у мутанта. По мере роста органов происходит некоторое сглаживание их края, однако зубчатость края лепестка остается хорошо заметной и после завершения его роста (рис. 1г).

Часть тычинок развивается нормально и имеет фертильную пыльцу (рис. 2а); встречаются и стерильные тычинки. Изредка встречаются тычинки с

рыльцевой тканью на верхушках (рис. 1в). Развитие пестика нарушено — наблюдается недоразвитие столбика, аномалии рыльца (рис. 2б, в, г). Семязпочки по краям плодолистиков не развиваются, что приводит к женской стерильности.

Некоторым изменениям подвергаются и листья. У мутанта *fip* листья имеют неровную бугристую поверхность с неравномерно разбросанными и часто образующими группы трихомами (рис. 2д, е). Отметим, что у мутанта листья толще и поэтому имеют более темную окраску по сравнению с листьями дикого типа. Таким образом, у мутанта *fip* в органах околоцветника и листьях наблюдаются сходные нарушения деления и роста клеток.

Мутант *as1* напоминает мутант *fip*. Наши исследования показали, что для мутанта *as1* характерна не только асимметричность листа и бугристость его поверхности, что описано ранее, но и аномалии развития органов околоцветника. Чашелистики и лепестки не только мельче, чем у дикого типа (Ori et al., 2000; Byrne et al., 2002), но и имеют неровный зубчатый край, как у мутанта *fip* (рис. 3а, б). На поверхности молодых чашелистиков и лепестков (рис. 3б) как и у *fip* встречаются клетки разного размера, хотя этот признак у *as1* выражен не так ярко, как у *fip*. У *as1* выявляются и некоторые аномалии развития пестика (столбика и рыльца, рис. 3в, д), которые несколько напоминают структуру гинецея мутанта *fip*. Плодолистики мутанта *as1* могут быть неправильной формы вследствие незавершенности процесса закладки новых плодолистиков (рис. 3г).

Цветки двойного мутанта *fip as1* характеризуются некоторым увеличением числа всех типов органов (таблица). Более того, в органах околоцветника еще сильнее заметны различия размеров клеток (рис. 3е, ж).

Не только чашелистики и лепестки, но и листья двойного мутанта *fip as1* характеризуются более выраженной асимметрией и неровностью поверхности по сравнению с обоими родителями (рис. 2е, 3з, 3и).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что клетки растений могут увеличиваться в размере более чем в 1000 раз за счет амплификации хромосомной ДНК, не сопровождающейся делением клетки (Sugimoto-Shirasu et al., 2005). Переход от делений к процессу эндоредупликации — нормальное явление, которое сопровождает процессы окончательной дифференцировки клеток. В исследованиях на *A. thaliana* показано, что различия в размере дифференцированных клеток на поверхности листа и органов цветка (в первую очередь, чашелистиков) являются результатом раз-

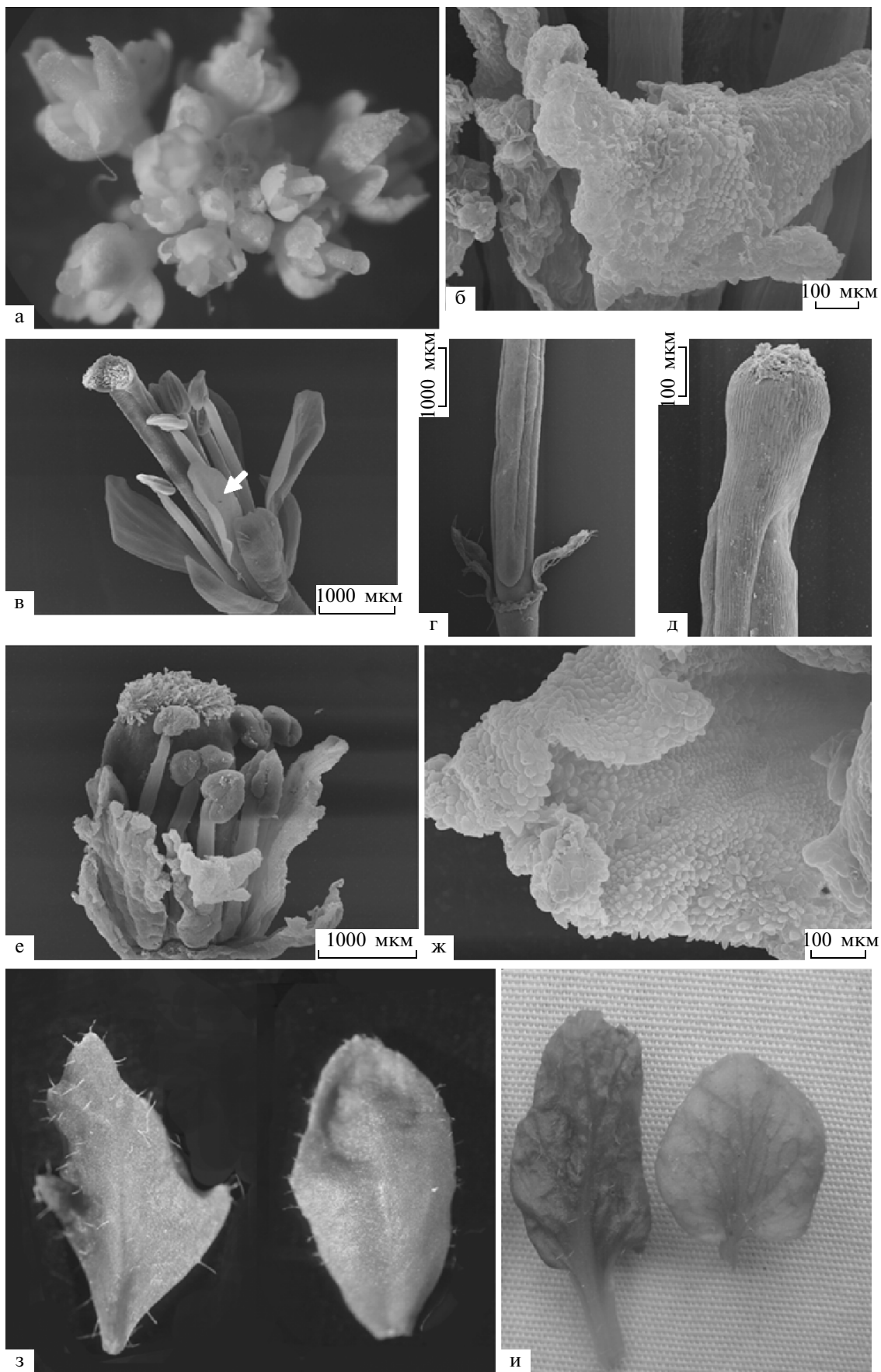
ного уровня их ploидности. Чем раньше клетка приступает к эндоредупликации, тем более крупной она может стать (Roeder et al., 2010).

В настоящее время благодаря изучению мутантов и трансгенных растений идентифицированы гены, контролирующие переход между митотическим циклом и циклом эндоредупликаций, например, ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ (Verkest et al., 2005), начали приоткрываться молекулярные механизмы, останавливающие деления клеток и направляющие их в цикл эндоредупликаций, который предложено называть эндоциклом (Vinardell et al., 2003; Lammens et al., 2008; Vanstraelen et al., 2009). Тем не менее, информация о регуляторных системах, которые включают в нужное время и в нужном месте (определенном органе и ткани) эти клеточные механизмы митоза/эндоредупликаций, пока ограничена.

Хотя для изучения мутанта *fip* требуются дальнейшие исследования с использованием ДНК-цитометрии, его фенотипические особенности позволяют предполагать, что ген *FIP* может быть одним из репрессоров перехода клеток к эндоредупликациям. Нарушение его функции у мутанта приводит к преждевременному прекращению клеточных делений и включению процесса эндоредупликации, приводящему к появлению аномально крупных клеток в органах околоцветника.

Похожие аномалии выявлены и в цветке мутанта *as1* из коллекции кафедры генетики, а у двойного мутанта *fip as1* обнаружена еще более выраженная неравномерность размера клеток и асимметрия формы листа. Полученные данные свидетельствуют о комплементарном взаимодействии генов *FIP* и *AS1* в контроле пролиферации клеток листа и органов цветка и, по-видимому, в подавлении процессов эндоредупликации. Хотя обе мутации вызывают нарушения, как в листе, так и в цветке, тем не менее, наиболее яркое проявление они имеют в разных органах (мутация *as1* нарушает главным образом развитие листа, а мутация *fip* — органов цветка). Это указывает на специфичность действия генов *AS1* и *FIP*.

Ген *FIP* пока не идентифицирован. По нашим данным он локализован в верхнем плече I-ой хромосомы на расстоянии 18.7 сМ от маркерного гена *AN*. Ген *AS1* кодирует белок с доменом MYB и имеет несколько разных функций — он ограничивает пролиферацию листовой меристемы, подавляя экспрессию генов *KNAT* в примордиях листьев (Guo et al., 2008), и участвует в поляризации примордия листа *A. thaliana* (Xu et al., 2003). Укорочение органов цветка у мутанта можно объяснить повышением уровня экспрессии *KNAT*-генов, которые подав-



**Рис. 3.** Особенности морфологии органов цветка и листа одиночного мутанта *as1* и двойного мутанта *fip as1* (б–ж – сканирующая электронная микроскопия):

а и б – соответственно, верхушка соцветия и лепесток мутанта *as1*; на поверхности лепестков видны клетки разного размер (сравните с рис. 1з);

в – цветок мутанта *as1*; виден аномальный пестик и лепестко-тычинка (стрелка);

г, д – основание и верхушка аномального пестика мутанта *as1*;

е, ж – крупный цветок и лепесток двойного мутанта *fip as1*, соответственно; видна ярко выраженная бахромчатость края и разный размер клеток на поверхности лепестка;

з – стеблевые листья мутанта *as1* (слева) и мутанта *fip* (справа); виден зубчатый край листа мутанта *as1* и неровный край листа мутанта *fip*;

и – листья розетки мутанта *as1* (справа) и двойного мутанта *fip as1* (слева); видно более выраженное проявление неровности (бугристости) поверхности листа у двойного мутанта.

Бары соответствуют (б и ж) – 100, (в, г и е) – 1000, (д) – 300 мкм.

ляют синтез гиббереллина (Hay et al., 2002). В то же время причины наиболее яркого проявления фенотипа мутанта *as1* (бугристый лист) не связаны с эктопической экспрессией *KNAT*, поскольку у двойных, тройных и даже четверных мутантов с одновременным нарушением активности гена *as1* и *KNAT*-генов (*KNAT1*, 2, 6), восстановления этой аномалии не наблюдалось (Ikezaki et al., 2010). Повидимому, ген *AS1* может контролировать пролиферацию клеток по дополнительному пути (не зависящему от генов *KNAT*), комплементарно взаимодействуя с геном *FIP*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ондар У.Н., Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala1-20 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. Том 39. № 6. 2008. С. 430–436.
- Brewer P.B., Howles P.A., Dorian K. et al. *PETAL LOSS*, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the *Arabidopsis* flower // Development. 2004. V. 131. P. 4035–4045.
- Byrne M.E., Simorowski J., Martienssen R.A. *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis* // Development. 2002. V. 129. P. 1957–1965.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // Nature. 1991. V. 353. № 6339. P. 31–37.
- Guo M., Thomas J., Collins G. et al. Direct repression of *KNOX* loci by the *ASYMMETRIC LEAVES1* complex of *Arabidopsis* // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 48–58.
- Hay A., Kaur H., Phillips A. et al. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans // Current Biology. 2002. V. 12. № 18. P. 1557–1565.
- Ikezaki M., Kojima M., Sakakibara H. et al. Genetic networks regulated by *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *AS2* in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: *KNOX* genes control five morphological events // The Plant J. 2010. V. 61. P. 70–82.
- Krizek B.A., Fletcher J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6. P. 688–698.
- Lammens T., Boudolf V., Kheibarshekan L. et al. Atypical E2F activity restrains APC/C<sup>CC52A2</sup> function obligatory for endocycle onset // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008.
- Ori N., Eshed Y., Chuck G. et al. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot // Development. 2000. V. 127. P. 5523–5532.
- Roeder A.H.K., Chickarmanel V., Cunha A. et al. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana* // PLoS Biology. 2010. V. 8. Issue 5. doi: 10.1371/journal.pbio.1000367.
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R., Stacey N.J. et al. RHL1 is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18736–18741. V. 105. № 38. P. 14721–14726.
- Vanstraelena M., Balobana M., Inesa O.D. et al. APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 28. P. 11806–11811.
- Verkest A., Manes C.L., Vercruyse S. et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes // Plant Cell. 2005. V. 17. № 6. P. 1723–1736.
- Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A. et al. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* Nodules // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2093–2105.
- Xu B., Li Z., Zhu Y. et al. *Arabidopsis* genes *AS1*, *AS2*, and *JAG* negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development // Plant Physiology. 2008. V. 146. P. 566–575.
- Xu L., Xu Y., Dong A. et al. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity // Development. 2003. V. 130. № 17. P. 4097–5007.

***Arabidopsis thaliana* FIMBRIATA PETIOLES Gene, Controlling Cell Division and Growth in Floral Organs**

**U. N. Kawai-ool\* and T. A. Ezhova**

\* *Department of General Biology, Tuva State University, Kyzyl, Russia*

\* *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*Department of Genetics, Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: dr.urana@mail.ru*

**Abstract**—A new mutant, *fimbriata petioles* (*fip*), of *Arabidopsis thaliana* was obtained by chemical mutagenesis. The mutant is characterized by unusual anomalies of floral organs. Clusters of very large cells formed in the distal region of sepals and petals, which created fringed edges of these organs. An analysis of the morphology of the floral organs and leaves of the *fip as1* double mutant revealed a complementary interaction of the *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *FIMBRIATA PETIOLES* (*FIP*) genes. It was assumed that the *FIP* gene, together with the *AS1* gene, controls cell proliferation, preventing their premature entry into endocycle.

**Keywords:** plant morphogenesis, *Arabidopsis thaliana*, cell division and growth, floral organ development