

УДК 635.64:575.244.22

РОЛЬ МУТАЦИИ *LANCEOLATA*
В ФОРМИРОВАНИИ ЛИСТА У ТОМАТАН.А. МИЛЮКОВА, асп.; И.В. СКОРОБОГАТОВА, к. б. н.;
А.О. ЧИКАЛО, студ.; А.А. СОЛОВЬЕВ, д. б. н.

(Кафедра генетики, центр молекулярной биотехнологии)

Изучена роль гена *Lanceolata* в развитии листа у томата. Доминантный аллель этого гена определяет развитие нерассеченного листа. Показано, что растения, гомозиготные по доминантному аллелю, отличаются низкой жизнеспособностью и аномальным развитием, что позволяет констатировать плейотропное действие гена *Lanceolata* на закладку меристем и формирование семян. Сравнительный анализ взаимодействия этого гена с генами, отвечающими за развитие сильно рассеченных (ген *Mouse ears*) и нерассеченных (ген *entire*) листьев, позволил предположить, что ген *Lanceolata* начинает экспрессироваться на ранних этапах эмбриогенеза при закладке меристем. Обсуждается связь между эндогенным содержанием гормонов (ИУК, ЦК) в листьях разных ярусов у форм, различающихся по степени рассеченности листа.

Томат заслуженно является одним из модельных объектов генетических и молекулярно-генетических исследований. Это связано со многими достоинствами, касающимися его развития и возможностей выполнения генетического анализа. Среди этих достоинств — огромное разнообразие морфологических признаков, заметно превосходящее таковое у других модельных объектов — арабидопсиса, риса или кукурузы [2, 4, 7]. В настоящее время известно более 200 генов, в той или иной степени влияющих на развитие листа [11]. Как правило, большинство из этих генов описаны по морфологическим мутациям, проявляющимся в виде разных типов листа по рассеченности, размеру и другим признакам. В то же время тип листа определяется изменением числа и направления клеточных делений, на характер которых большое влияние оказывают фитогормоны. Анализ мутантов разных растений показал, что взрослые листья

являются результатом изменений развития примордиев на ранних стадиях формирования листа. Считается, что индукторами инициации листа могут выступать цитокинины или комбинации ауксинов и цитокининов [5]. В то же время на томате выявлено, что в формировании листа принимают участие гиббереллины и ауксины, влияющие на рассеченность листа [9,13]. Свидетельством важной роли фитогормонов в регуляции развития листа являются генотипзависимые изменения морфологии листа при экзогенной обработке растений томата [1].

Большинство из описанных мутаций по типу листа являются рецессивными по отношению к листу дикого типа. Наряду с ними имеются мутации с доминантным по отношению к дикому типу листа проявлением, к которым относятся мутации *Lanceolata*, *Mouse ears*, *Curl* и др. Доминантная мутация *Lanceolata* описана в литературе как летальная в гомозиготе [2].

В экспериментах с использованием данной мутации обнаружены растения, фенотипически четко выделяющиеся от остальных, что побудило провести генетический анализ наследования этого признака.

Материал и методы исследования

В качестве материала использовали образцы из коллекции кафедры генетики РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, а также из коллекции Центра генетических ресурсов томата (ЦГРТ) США. Характеристика образцов по типу листа представлена в таблице 1.

Растения выращивали в вегетационных сосудах и стеллажах [3]. Гибридизацию осуществляли методом предварительной кастрации бутонов с опылением их через сутки. Форму листа у растений F_1 и F_2 оценивали по 5–6-му листу на стадии восьми настоящих листьев [14]. Анализ расщепления F_2 проводили с использованием критерия χ^2 [7], оценку эндогенного содержания гормонов — методом дисперсионного анализа (AGROS 211). Морфолого-анатомическое исследование фор-

мирования семян и развития зародыша выполняли под микроскопом МБС-10. Документацию изображений осуществляли с помощью цифровой фотокамеры. Экстракция и очистка фитогормонов выполнены по методике [6].

Анализ цитокининов: ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор ультрафиолетовый (модель ВТ 3030), длина волны 268 nm, колонка Lichrosorb RP18, 10 m 4×250 mm. Подвижная фаза: ацетонитрил – вода – уксусная кислота (V/V — 55:44:1), скорость потока 0,7 мл/мин, время удерживания — 15 мин. Идентификацию зеатина проводили путем сравнения времени удерживания синтетического зеатина (Serva) с природным. Минимальная регистрируемая концентрация зеатина составила 14,0 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Анализ гиббереллинов (GA_3): определение биологической активности гиббереллинов проводили по росту гипокотилей салата сорта Берлинский. Количественно гиббереллины определяли по калибровочной кривой, для построения которой использовали гибберелловую кислоту (Россия).

Таблица 1

Характеристика исходных форм

Форма, происхождение	Ген, влияющий на тип листа, его локализация (хромосома, локус)	Фенотипическое описание
Mo 319 (кафедра генетики РГАУ – МСХА)	<i>Lanceolata</i> (La) 7, 48	Простые цельнокрайние маленькие листья; стебли тонкие. Проявляется на стадии сеянца
La 0882 (CGRT)	<i>Lanceolata</i> (La) 7, 48	То же
LA 0715 (CGRT)	<i>Mouse ears</i> (Me) 2, 48	Листья рассеченные, 3–4-дольные с большим количеством булавовидных сегментов. Проявляется на стадии роста
LA 0790 (CGRT)	<i>Mouse ears</i> (Me) 2, 48	То же
LA 1786 (CGRT)	<i>potato leaf</i> (c) 6, 104	Листья менее рассеченные по сравнению с листом дикого типа, число сегментов невелико. Проявляется на стадии сеянца
LA 0784 (CGRT)	<i>entire</i> (e) 4, 66	Срединная жилка листа деформирована, число сегментов сильно уменьшено

Примечание. В таблице представлено только описание мутаций, влияющих на проявление листа.

Результаты и их обсуждение

Характеристика мутации Lanceolata и ее проявление в гетерозиготном состоянии в онтогенезе

Фенотипически мутация *Lanceolata* проявляется как простой, цельнокрайний лист, без долек и долек. Развитие этого листа осуществляется вследствие разрастания верхушечной доли, при этом боковые доли практически не формируются. Лист дикого типа формируется за счет разрастания как верхушечной, так и боковых долей.

Однако в процессе онтогенеза простыми нерассеченными остаются только первые 4–5 настоящих листьев, у более поздних листьев появляется слабая рассеченность листовой пластинки и начинают формироваться боковые дольки (рис. 1), что свидетельствует об онтогенетической изменчивости этого признака.

Проявление типа листа в потомстве от самоопыления гетерозигот по мутации Lanceolata

Как было отмечено выше, согласно литературным данным, мутация *Lanceolata* доминантна по отношению к дикому типу и в гомозиготе летальна [2, 4]. Однако в ходе эксперимента



Рис. 1. Ряд онтогенетической изменчивости строения листа у мутации *Lanceolata* — гетерозиготы по этому гену (слева направо — от нижних к верхним)

было установлено, что это не совсем так. В потомстве от самоопыления гетерозигот (Мо 319) с ланцетным листом наряду с растениями с диким типом и растениями с ланцетным листом были установлены 3 группы дополнительных фенотипов, отличающихся нетипичным для растений томата развитием:

1. Проростки, представляющие собой удлинённый гипокотиль длиной 2–4 см без семядольных листьев и меристем, гибнут через 2–3 недели (рис. 2).



Рис. 2. Фенотип проростков растений группы 1

Анализ степени формирования зародыша, проведенный на вычлененных зародышах, показал, что данная группа растений характеризуется недоразвитым зародышем, у которого нормально развивается зачаточный корешок и гипокотиль, а семядоли и зародышевая почка не формируются (рис. 3).

2. Проростки имеют сросшиеся семядоли и замедленное развитие. Семядоли внешне напоминают клюв или лодочку. При этом в отличие от первой группы данная форма, как правило, развивается нормально и в итоге выглядит как растение с ланцетным типом листа (рис. 4).

3. На стадии проростков семядоли срастаются одной стороной либо фор-

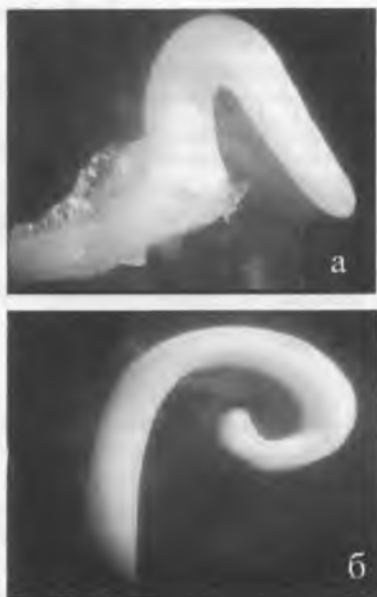


Рис. 3. Развитие зародышей у растений группы 1 (а) и дикого типа (б)

Листовая пластинка у взрослых растений нерассеченная, в то же время утолщена и похожа на семядолю (рис. 5).



Рис. 5. Развитие растений группы 3



Рис. 4. Развитие растений группы 2

Появление в потомстве растений с ланцетным листом форм с аномальным развитием позволило выдвинуть предположение о том, что мутация *Lanceolata* влияет не только на формирование ланцетного листа, но и на закладку и формирование семядолей и апикальных меристем у зародыша томата, т.е. обладает плеiotропным действием.

Проверка гипотез о проявлении жизнеспособности доминантной гомозиготы по гену *Lanceolata* с использованием критерия χ^2 показала правомочность гипотезы о жизнеспособности этого генотипа (табл. 2). При этом все нарушения развития семян, по нашим предположениям, обусловлены плеiotропным действием гена *Lanceolata* на развитие растений томата. Объединение фенотипов ланцетный лист (норма) и ланцетный лист (с нарушениями развития) также подтверждают эту гипотезу.

Полученные результаты свидетельствуют, что проявление мутации *Lanceolata*, различается у гомозигот и

мируется одна семядоля. Растения отстают в развитии. В отличие от нормальных растений при нарушении побеговых апикальных меристем у них функционируют пазушные меристемы.

Анализ наследования типа листа у формы Мо 319
(доминантная гомозигота жизнеспособна, расщепление 1:2:1)

Фенотипический класс, генотип	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение d (p-q)	d ²	d ² /q
		фактическая (p)	ожидаемая (q)			
Ланцетный лист <i>Lala</i> (норма)	0,50	385	414,50	29,50	870,25	2,10
Дикий тип <i>lala</i>	0,25	228	207,25	-20,75	430,56	2,08
Ланцетный лист <i>LaLa</i> (с нарушениями в развитии)	0,25	216	207,25	-8,75	76,56	0,37

$\chi^2_{\text{факт}} = 4,55$, $\chi^2_{\text{теор(0,05)}} = 5,99$. Гипотеза не отвергается.

гетерозигот, что схоже с проявлением мутаций *Curl* и *Mouse ears* в гомо- и гетерозиготном состоянии. Эти факты позволяют предположить наличие схожих структур в составе этих генов, а также схожих механизмов регуляции и экспрессии.

Взаимодействие гена Lanceolata с генами entire и Mouse ears, влияющими на степень рассеченности листа

Степень рассеченности листа у томата связана с числом активных меристем при закладке и формировании примордия листа. Мутация *entire* имеет сходное проявление рассеченности с мутацией *Lanceolata*. Она является рецессивной по отношению к дикому типу листа и характеризуется нерассеченным листом с искривленной центральной жилкой [2,4]. Генетический анализ наследования типа листа в комбинации скрещивания форма Мо 319 (мутация *Lanceolata*) × линия LA 0784 (мутация *entire*) показал, что у гибридов F₁ наблюдается расщепление на растения с ланцетным и диким типами листа. В потомстве растений с ланцетным листом выявлены 3 фенотипических класса с расщеплением, соответствующим соотношению 12:3:1. В данном случае имеет место подавление геном *Lanceolata* доминантного аллеля гена *entire*, обеспечивающего формирование дикого типа листа, и мы наблюдаем функционирование у гиб-

ридов F₁ одной меристемы и главную роль гена *Lanceolata* в определении нерассеченности листа.

С целью изучения взаимодействия гена *Lanceolata*, отвечающего за формирование нерассеченного листа, с геном, контролирующим формирование сильно рассеченного листа, была использована линия LA 0715, имеющая мутацию по гену *Mouse ears*. У гибридов первого поколения в комбинации скрещивания форма Мо 319 × линия LA 0715 проявился новый фенотип, имеющий первые настоящие листья ланцетной формы, на более поздних листьях появлялись булавовидные сегменты (рис. 6). В потомстве F₂ этого гибрида



Рис. 6. Фенотип растений F₁ Мо 319 × LA 0715 (обведены булавовидные сегменты, формирующиеся позднее, чем крупная центральная доля)

выявлены несколько фенотипов, среди которых были растения со следующими типами листьев: ланцетным; сильно рассеченным; дикого типа; подобным листу у гибридных растений F₁, а также растения с аномальным развитием, аналогичные потомству от самоопыления формы Мо 319.

Данное расщепление соответствует соотношению 9:3:2:1:1, минимальные доли составляют растения с диким типом листа и растения с аномальным

развитием (генотип *LaLateme*) (табл. 3), что согласуется с данными, полученными на исходной форме Мо 319.

Полученные результаты свидетельствуют, что в случае присутствия в генотипе растений сразу двух доминантных генов *Mouse ears* и *Lanceolata* их действие проявляется поочередно, что свидетельствует о разной роли в определении процессов дифференцировки, растяжения, роста и деления клеток.

Т а б л и ц а 3

Анализ наследования формы листа томата в комбинации Мо 319 × LA 0715
(расщепление 9:3:2:1:1)

Фенотипический класс, генотип	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение d (p-q)	d ²	d ² /q
		фактическая (p)	ожидаемая (q)			
Гибридный лист <i>Me-La-</i> Ланцетный лист («норма») <i>temeLala</i>	9/16	504	516,38	-12,38	153,14	0,30
Лист «мышинные уши» («норма») <i>Me-lala</i>	2/16	143	114,75	28,25	798,06	6,96
Ланцетный лист (с атипичным развитием) <i>LaLateme</i>	3/16	155	172,13	-17,13	293,44	1,71
Дикий тип <i>lalateme</i>	1/16	61	57,37	3,63	13,18	0,23
	1/16	55	57,37	-2,37	5,62	0,10

$\chi^2_{\text{факт}}=9,30$, $\chi^2_{\text{теор}(0,05)}=9,49$. Гипотеза не отвергается.

Определение эндогенного содержания гормонов в листьях томата разной рассеченности

Важную роль в формировании листа играют фитогормоны. Нами выполнено исследование содержания всех классов фитогормонов в листьях, различающихся по степени развития. Для анализа использовали листья нижнего (взрослые), среднего (сформированные) и верхнего (молодые) ярусов. В результате исследования установлено, что содержание в листьях ауксинов и абсцизовой кислоты ниже порога чувствительности прибора. Низкое содержание АБК может быть объяснено тем фактом, что для исследования на растении отбирали молодые и функционально активные листья.

Ауксины стимулируют рост клеток, играют важную роль в формировании проводящих пучков и апикальном доминировании. Они определяют реакцию фототропизма растений. При рассмотрении роли ауксинов в определении формы листа следует отметить, что основную роль играет не столько наличие ауксина, сколько изменение его концентрации в определенном направлении (ауксиновый градиент). Вероятно, что именно благодаря ауксиновому градиенту обеспечивается полярное развитие растений. В любом случае, ауксины являются крайне важными сигнализаторами листовых процессов, в т.ч. сложных листьев, вызывая в основном растяжение клеток, а также их дифференциацию. Ингибирование ауксинов приводит к замет-

ному изменению морфологии органов растений, в частности, формы листьев. Кроме того, продемонстрировано сложное взаимодействие ауксинов с другими группами гормонов. В частности, доказано, что ауксины участвуют в управлении синтезом гиббереллинов, блокируя их образование на определенных стадиях [5, 8, 10, 15, 16].

Гиббереллины в процессе морфогенеза стимулируют деление и рост клеток. Повышение концентрации гиббереллинов у длиннодневных растений является сигналом перехода к цветению. У семян повышение концентрации гиббереллинов приводит к выходу из состояния покоя, прорастанию. Кроме того, гиббереллины ускоряют процессы дыхания, фотосинтеза и транспирации [5, 12]. Сравнение мутаций *La* с нерассеченным листом и *Me* — с сильно-рассеченным листом свидетельствует о разном гормональном статусе этих

генотипов. Для мутации *Mouse ears* характерно высокое содержание гиббереллинов, для мутации *Lanceolata* — пониженное (рис. 7). В среднем и верхнем ярусах у растений с нерассеченным листом содержание гиббереллинов значительно возрастает, что вполне закономерно, так как продолжается равномерный рост клеток и формирование характерной ланцетной формы листа. У сильно-рассеченного листа в среднем ярусе происходит некоторое снижение уровня гиббереллинов, поскольку идет формирование сегментов, а возрастание содержания гормона на более поздних этапах развития можно объяснить продолжающимся активным ростом зрелого листа. Динамика содержания гиббереллинов в листьях гибридных растений в целом отлична от таковой у форм *La* и *Me* (рис. 7). Возрастание содержания этого гормона в среднем ярусе может

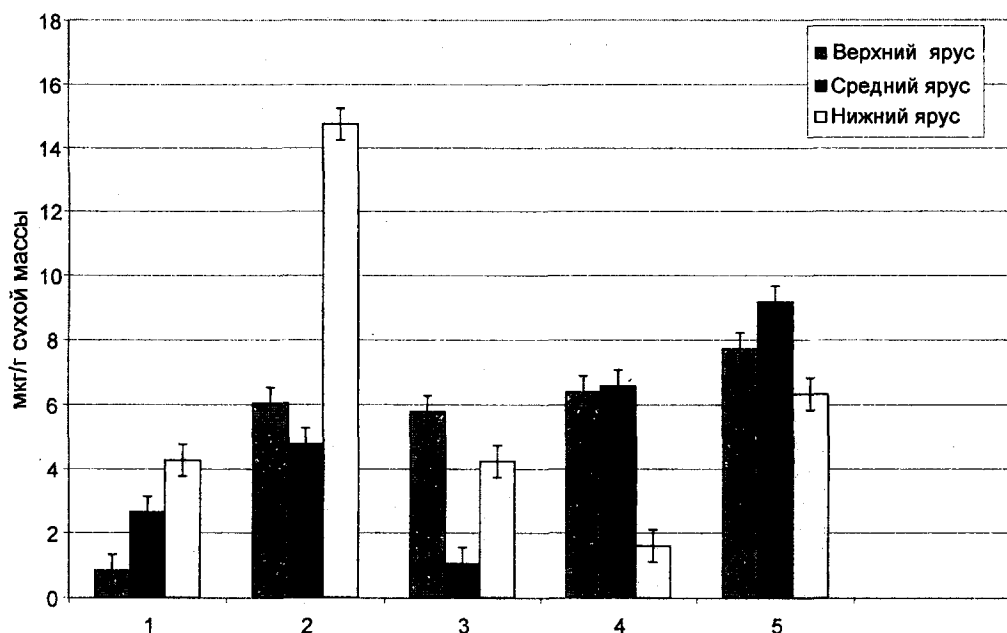


Рис. 7. Содержание гиббереллинов в различных по рассеченности листьях верхнего, среднего и нижнего ярусов: 1 — нерассеченный лист, 2 — сильно-рассеченный лист, 3 — слаборассеченный лист, 4 — лист дикого типа, 5 — лист гибрида F₁, Mo 319×LA 0715

быть связано с образованием центральной крупной доли листа и образованием сегментов на более поздних этапах.

Цитокинины участвуют в регуляции всех физиологических процессов в растениях, обладая большой полифункциональностью. Они являются индукторами клеточного деления, а у двудольных также активируют рост клеток. Кроме того, цитокинины играют важную роль в делении, растяжении и дифференцировке клеток. Повышение концентрации гормонов этой группы стимулирует формирование почек и рост побегов, однако угнетает удлинение и развитие корней. Кроме того, цитокинины снимают апикальное доминирование, в результате чего начинается ускоренный рост боковых побегов. В семенах концентрация цитокининов повышается во время выхода из стадии покоя, в листьях и других

органах эти вещества замедляют процессы старения, активируют синтез стрессовых белков в растениях [5].

Начальное содержание цитокининов у растений с нерассеченным листом (мутация *La*) выше, чем у гибридного и сильнорассеченного листа, но снижение их содержания происходит в большей степени, чем у листьев гибридов, что опять же связано с неразвитием боковых долей (рис. 8). У гибридного листа в среднем ярусе содержание цитокининов остается на достаточно высоком уровне, что способствует возможности образования сегментов. Для сильнорассеченных листьев характерно некоторое повышение уровня цитокининов в нижней части растения. В данном случае образование сегментов листа происходит с самых ранних этапов органогенеза и до конца развития.

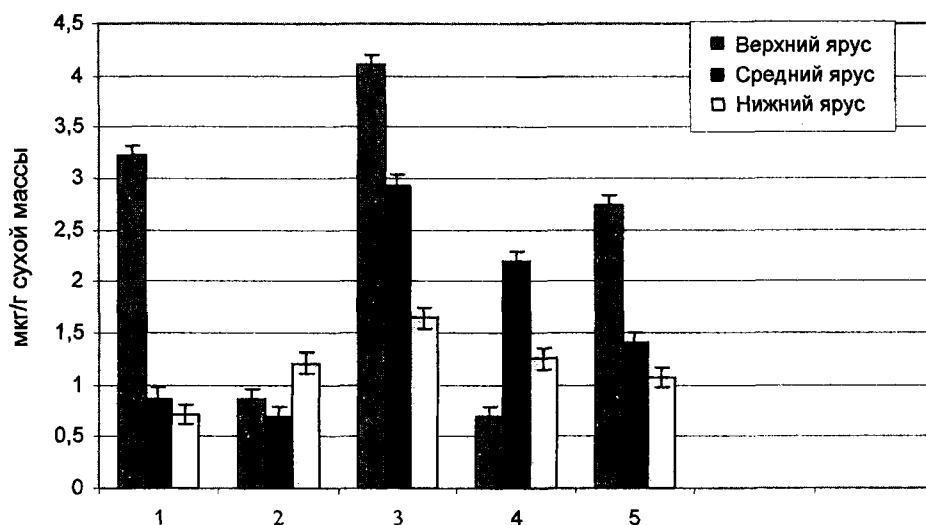


Рис. 8. Содержание цитокининов в различных по рассеченности листьях верхнего, среднего и нижнего ярусов

Полученные данные свидетельствуют о связи генотипа растения и фитогормонального состава, который различается в процессе онтогенеза растения.

Заключение

Исследуемый ген томата *Lanceolata* обладает разносторонней активностью в процессе органогенеза. Доказано, что ген начинает работать с самых ранних ста-

дий развития растения, оказывая влияние на заложение побеговой апикальной меристемы и формирование семядолей. В присутствии в генотипе растения других генов, влияющих на разные формы листа (как доминантных, так и рецессивных) влияние гена сохраняется и проявляется в виде эпистатических взаимодействий, что приводит к формированию листа совершенно новой формы. Действие генов типа листа у томатов, возможно, следует связать с синтезом эндогенных гормонов, содержание которых меняется в зависимости от стадии органогенеза.

Библиографический список

1. *Ахмед М.* Генетический контроль и влияние регуляторов роста на формирование листа у некоторых мутантных форм культурного томата: Автореф. канд. дисс., 2005. — 2. *Бочарникова Н.И.* Мутантные формы томатов / Н.И. Бочарникова, В.М. Козлова. Кишинев: Штиинца, 1992. — 3. *Гавриш С.Ф.* Томаты. М:

НИОЗГ, 2003. — 4. *Жученко А.А.* Генетика томатов. Кишинев: Штиинца, 1973 — 5. *Генетика развития растений* / Лутова Л.А. и др. СПб.: Наука, 2000 — 6. Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост / Скоробогатова И.В. и др. // *Агрохимия*, 1999. № 8. С. 49–53. — 7. *Орлова Н.Н.* Генетический анализ. М., 1991. — 8. *Полевой В.В.* Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989. — 9. *Fleming A.J.* // *Planta*, 2002. Vol. 216. P. 17–22. — 10. *Friml J.* // *Cur Opin Plant Biol.*, 2003. Vol. 6. P. 7–12. — 11. *Holtan H.E.* // *Genetics*, 2003. Vol.165 P. 1541–1550. — 12. *Sekhar K.N.* // *Can. J. Bot.*, 1998. Vol. 68. P. 713–718. — 13. *Shekhar K.N.* // *Am. J. Bot.*, 1990. Vol. 77. P.46–53. — 14. *Sinha N.* // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999. Vol. 50. P. 419–446. — 15. *Sieburth L.E.* // *Plant Physiol.*, 1999. Vol. 121. P. 1179–1190. — 16. *Uggla C.* // *Proc Natl Acad Sci.*, 1996. Vol. 93. P. 9282–9286.

Рецензент — д. с.-х. н. Ю.Б. Коновалов

SUMMARY

The role of *Lanceolata* gene in leaf forming with tomato-plants has been investigated. Prepotent allele of this gene determines the development of undivided leaf. Plants homozygous in prepotent allele are characterized by low vital capacity and anomalous development which allows to establish a fact that pleiotropic effect of *Lanceolata* gene influences forming both meristems and seed-lobes. Comparative analysis of interactions between this gene and those responsible for the development of greatly divided (*Mouse ears* gene) and undivided (*entire* gene) allows to suppose that the gene *Lanceolata* starts expressing at early stage of embryogenesis when forming meristems. Connections between endogenous hormones [IUK, CK] content in leaves of various tiers, differing in liaf division level have been discussed in the article.