

Т.Н. ЧЕЧЕНЕВА^{1,2}, И.В. КИРПИЧЕВА³¹ Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев² Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев³ Луганский национальный аграрный университет

E-mail: selerida@rambler.ru

НАСЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ ПО ОПУШЕНИЮ ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH



Установлено, что по признаку «опушение розеточных листьев» аллель *gl1-1* в гомозиготном состоянии подавляет проявление аллеля *dis2-1* ($dis2-1 < gl1-1$), поэтому расщепление в F_2 наблюдается в характерном для рецессивного эпистаза отношении 9:3:4. Наследование различий по опушению стеблевых листьев соответствует обычной для дигибридного скрещивания менделевской схеме расщепления (9:3:3:1). На стеблях тройного рецессива по генам *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1* опушение отсутствует, расщепление в F_2 наблюдается в отношении 9:3:4. По картированным мутантным рецессивным генам *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1* получена новая линия (Lug227).

© Т.Н. ЧЕЧЕНЕВА, И.В. КИРПИЧЕВА, 2011

Введение. У растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) дикого типа (WT) и мутантной линии *Landsberg erecta* (*er-1er-1*) (NW20) из вегетативных органов лишь семядольные листья не покрыты волосками (трихомами). Рecessивные мутации ряда генов влияют на характер опушения и по своему действию подразделяются на несколько групп. Это прежде всего мутации по генам *glabra* (лат. «голый») и *distorted trichomes* (англ. «искривленные волоски») [1–4]. Мутации второй группы не только укорачивают волоски, но детерминируют также формирование неразветвленных простых волосков (в отличие от разветвленных сложных волосков WT) и поэтому легко визуально выявляются.

В настоящее время известны три гена *GLABRA* (*GL1*, *GL2*, *GL3*) и два гена *DISTORTED TRICHOMES* (*DIS1*, *DIS2*) [5–10]. По гену *GL1* идентифицирована серия множественных аллелей *gl1-1*, *gl1-2*, *gl1-3*, *gl-unknown4*, *gl-unknown5* и *gl1-20990*. По гену *DIS2* пока известен лишь один мутантный аллель *dis2-1*. Существуют также гены, идентифицированные по мутациям, сильно изменяющим признаки (по которым они и идентифицированы) и плеiotропно влияющим на особенности опушения. К ним относится ген *FDH*, мутации которого приводят к сращиванию органов побега. Мутантный аллель *fdh* плеiotропно влияет также на образование трихом, уменьшая их количество на единицу площади розеточных листьев почти в два раза по сравнению с WT [11]. Целью настоящей работы являлось изучение наследования различий по характеру опушения, определяемых взаимодействием пар аллелей *GL1 – gl1-1* и *DIS2 – dis2-1*.

Материалы и методы. В работе использованы семена гомозиготных мутантных линий по генам *gl1-1*, *er-1* (N64) и *dis2-1*, *er-1* (N49), полученные из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (NASC, Великобритания) [12]. По отношению к дикому типу изучаемые линии – это двойные рецессивы, поскольку являются носителями и аллеля *er-1*. Для изучения взаимодействия генов *DIS2* и *GL1* скрещивали растения мутантных линий по генам *gl1-1*, *er-1* и *dis2-1*, *er-1*, и анализировали потомства F_1 , F_2 по особенностям опушения. Кастрацию и принудительную гибридизацию цветков проводили под микроскопом с бинокулярной насадкой типа МБС-10. Растения исходных линий

и F₁ культивировали в горшочной почвенной культуре. Почвосмесь готовили из почвы, песка и торфа в соотношении 4:2:1 [13]. Объем выборки F₂ составил 196 потомков. Математическую обработку данных осуществляли по критерию χ^2 [14]. Эксперименты выполнены в лаборатории светокультуры на кафедре биологии растений Луганского НАУ. Основным методом исследований являлся гибридологический анализ.

Результаты исследований и их обсуждение. Для растений исходной линии *er-1er-1* характерны довольно крупные и преимущественно сложные волоски на листьях и стебле. У гомозиготной по рецессивным генам линии *dis2-1, er-1* они укороченные простые. Линия *gll-1gll-1er-1er-1* не имеет волосков на розеточных листьях и стебле, а на стеблевых листьях по краю листовой пластинки выявлено наличие простых и сложных волосков (рис. 1).

При скрещивании N64 × N49 в F₁ волоски на розеточных листьях были сложные с примесью простых, т.е. наблюдался возврат к нор-

мальному или дикому типу. В F₂ растения группировались в три фенотипических класса: 117 особей с нормальными сложными волосками, 30 растений с укороченными простыми волосками и 49 растений без опушения. Как видим, в F₂ больше всего растений дикого типа, намного меньше растений с укороченными волосками. Довольно много неопушенных растений, их меньше, чем растений дикого типа, но больше, чем растений с простыми трихомами.

К последнему фенотипическому классу отнесены растения генотипа *Dis2-1er-1er-1gll-1gll-1*, несущие рецессивный аллель *gll-1* в гомозиготном состоянии. В этот же класс входят и тройные рецессывы по генам *dis2-1, er-1, gll-1*, поскольку при отсутствии волосков действие аллеля *dis2-1* не может проявиться даже в гомозиготном состоянии. Таким образом, в F₂ растения генотипов *Dis2-1er-1er-1gll-1gll-1* (их доля составляет 3/16) и *dis2-1dis2-1er-1er-1gll-1gll-1* (1/16) группируются в один фенотипический класс.

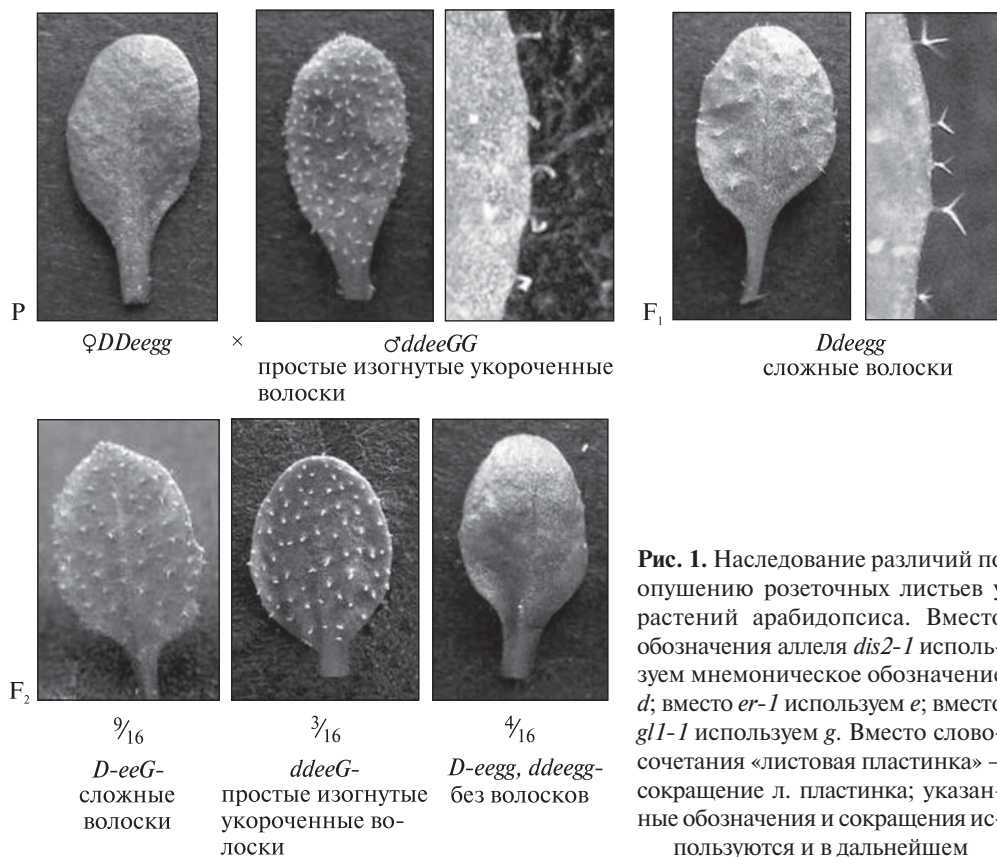


Рис. 1. Наследование различий по опушению розеточных листьев у растений арабидопсиса. Вместо обозначения аллеля *dis2-1* используем mnemonic обозначение *d*; вместо *er-1* используем *e*; вместо *gll-1* используем *g*. Вместо словосочетания «листовая пластинка» – сокращение л. пластинка; указанные обозначения и сокращения используются и в дальнейшем

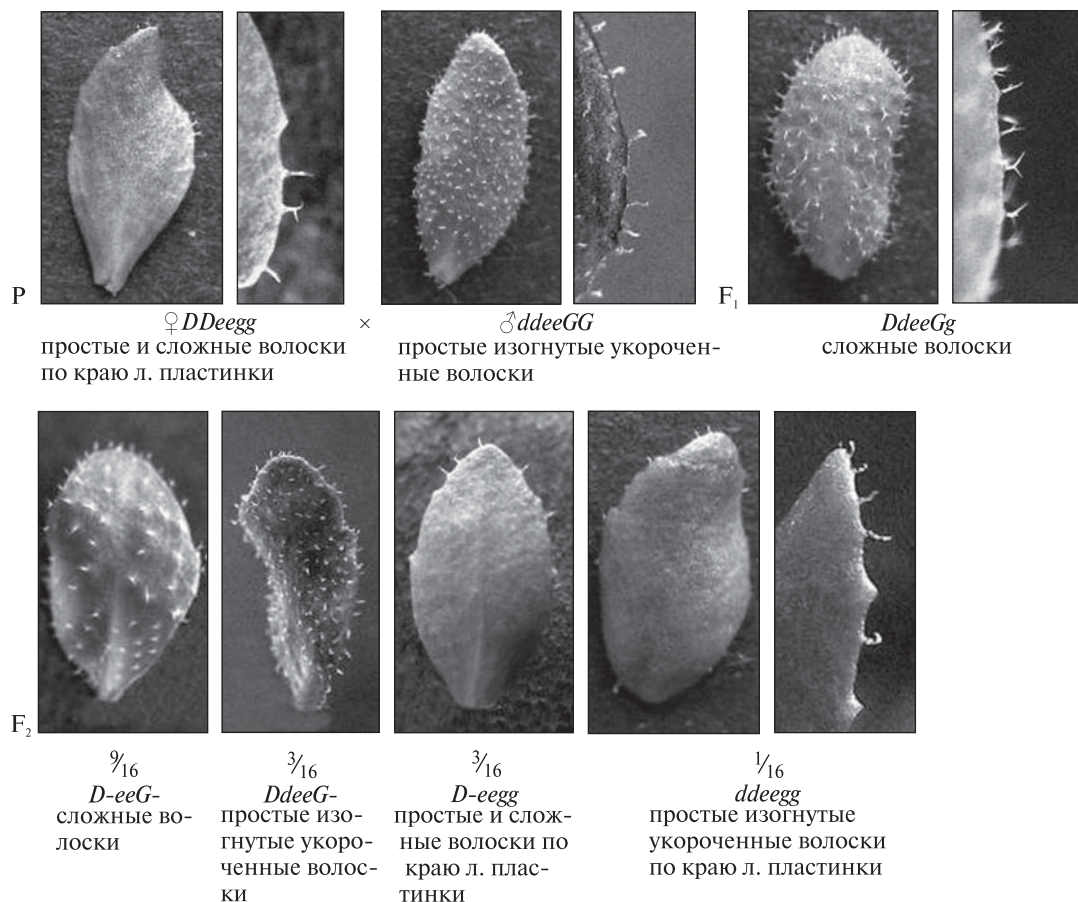


Рис. 2. Наследование различий по опушению стеблевых листьев у растений арабидопсиса

При проверке гипотезы о расщеплении в F_2 в отношении 9:3:4 получены следующие результаты: $\chi^2 = 1,7$, $\chi^2_{st} = \{6,0-9,2-13,8\}$, $\chi^2 < \chi^2_{st}$, ($p > 0,05$). Следовательно, гипотеза о расщеплении в отношении 9:3:4 подтверждается, указывая на взаимодействие генов по типу рецессивного эпистаза, когда аллель *gl1-1* в гомозиготном состоянии подавляет эффект аллеля *dis2-1* (*dis2-1 < gl1-1*). Полученные результаты согласуются с уже известными данными [14, 15]. При рассмотрении наследования различий по опушению стеблевых листьев получены иные результаты. У носителей гена *DIS2* имеется возможность проявиться на стеблевых листьях, так как по краю голей листовой пластинки наблюдаются редкие волоски (рис. 2).

В F_1 на стеблевых листьях обнаружены сложные волоски дикого типа. В F_2 растения группируются в четыре фенотипических клас-

са: 117 растений с нормальными сложными волосками, 30 растений с укороченными простыми волосками, 38 растений без опушения с простыми и сложными волосками по краю листовой пластинки и 11 растений с укороченными изогнутыми волосками по краю голей листовой пластинки. При проверке гипотезы о расщеплении в F_2 в отношении 9:3:3:1 получены следующие результаты: $\chi^2 = 0,86$, $\chi^2_{st} = \{7,8-11,3-16,3\}$, $\chi^2 < \chi^2_{st}$, ($p > 0,05$). Гипотеза о расщеплении в отношении 9:3:3:1 подтверждается. Следовательно, расщепление в F_2 по фенотипу 9:3:3:1 является результатом независимого комбинирования расщеплений по двум признакам. В общем различия наследуются по обычной для дигибридного скрещивания менделевской схеме.

При изучении наследования различий по опушению стеблей растений арабидопсиса

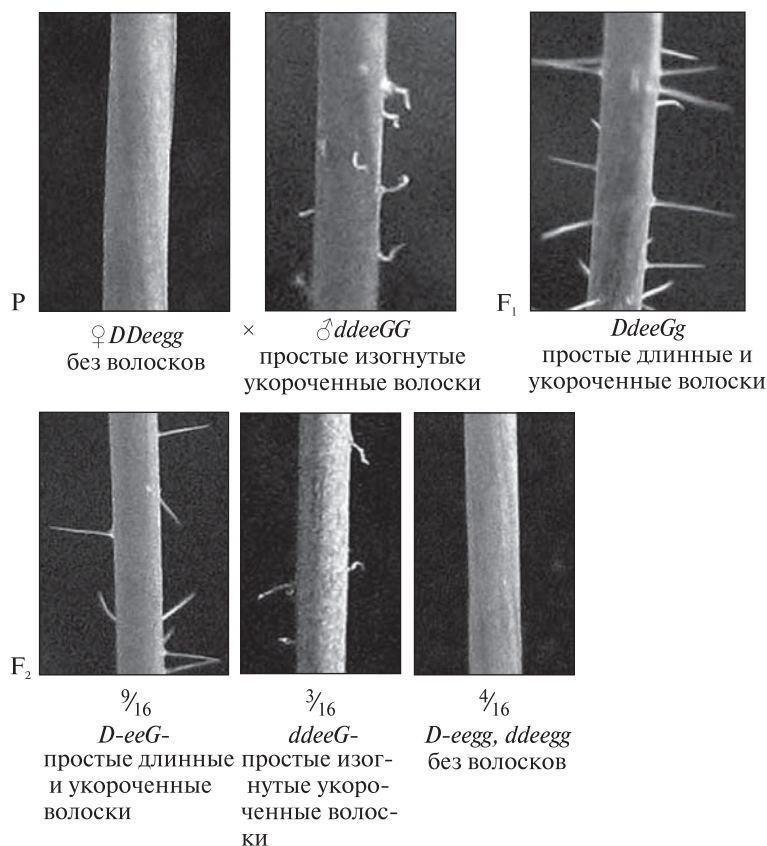


Рис. 3. Наследование различий по опушению стеблей у растений арабидопсиса

Сравнительная характеристика опушения растений линий арабидопсиса

Органы растения	<i>Landsberg erecta</i> (NW20, хромосома 2, сайт 48)	<i>gl1-1, er-1</i> (N64, хромосома 3, сайт 46)	<i>dis2-1, er-1</i> (N49, хромосома 1, сайт 45)	<i>dis2-1, er-1, gl1-1</i> (Lug 227)
Семядольные листья	Неопушенные	Неопушенные	Неопушенные	Неопушенные
Розеточные листья	Преимущественно сложные волоски с примесью простых	Неопушенные	Простые изогнутые укороченные волоски	Неопушенные
Стеблевые листья	Преимущественно сложные волоски с примесью простых	Листовая пластинка – голая, по краю листовой пластинки сложные волоски с примесью простых	Простые изогнутые укороченные волоски	Листовая пластинка – голая, простые изогнутые укороченные волоски по краю листовой пластинки
Нижняя часть стебля	Преимущественно простые длинные волоски с примесью укороченных простых и сложных	Неопушенная	Простые изогнутые укороченные волоски	Неопушенная
Верхняя часть стебля	Обычно простые длинные волоски с примесью сложных; иногда голый стебель	Неопушенная	Неопушенная	Неопушенная

(рис. 3) получены такие же результаты, как и при наследовании различий по опушению розеточных листьев.

Стебли растений F₁ были опушены простыми волосками. В F₁ потомки группировались в три фенотипических класса: 117 особей с простыми длинными и укороченными волосками, 30 растений с укороченными простыми волосками и 49 растений без опушения. К последнему фенотипическому классу, так же как и по особенностям розеточных листьев, относятся растения генотипа *Dis2-1-er-1er-1gl1gl1* и тройные рецессивы по генам *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1*. В F₂ растения этих генотипов образуют один класс расщепления. При проверке гипотезы о расщеплении в F₂ в отношении 9:3:4 получены следующие результаты: $\chi^2 = 1,7$, $\chi^2_{st} = \{6,0-9,2-13,8\}$, $\chi^2 < \chi^2_{st}$, ($p > 0,05$). Следовательно, гипотеза о расщеплении в отношении 9:3:4 подтверждается, свидетельствуя о взаимодействии по типу рецессивного эпистаза, когда аллель *gl1-1* в гомозиготном состоянии подавляет действие аллеля *dis2-1* (*dis2-1 < gl1-1*).

Возможность дифференцировать в F₂ при анализе опушения стеблевых листьев особей генотипов *D-eegg* и *ddeegg* (рис. 2) позволила отобрать и размножить тройной рецессив *dis2-1dis2-1er-1er-1gl1-1gl1-1*, выходящий за рамки принимаемых ботаниками видоспецифических признаков опушения листа и стебля у *A. thaliana*. Различия легко диагностируются на взрослых растениях (таблица).

Семена полученной нами новой линии *Distorted trichomes, Erecta, Glabra* (Lug227) хранятся и ежегодно пересеваются в Lugansk Arabidopsis Seed Stock Center (LASSC) [16].

Выводы. По признаку «опушение розеточных листьев» аллель *gl1-1* в гомозиготном состоянии подавляет проявление аллеля *dis2-1* (*dis2-1 < gl1-1*), поэтому расщепление в F₂ наблюдается в типичном для рецессивного эпистаза отношении 9:3:4. Наследование различий по опушению стеблевых листьев осуществляется по обычной для дигибридного скрещивания менделевской схеме. По фенотипу в F₂ наблюдается расщепление в отношении 9:3:3:1, что является результатом независимого комбинирования различий по двум признакам (опушение верхней поверхности листа и опушение края листовой пластинки).

На стеблях тримутантной линии по рецессивным генам *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1* опушение отсутствует, поскольку аллель *gl1-1* в гомозиготном состоянии подавляет действие аллеля *dis2-1* (так же как и по опушению розеточных листьев). Расщепление в F₂ наблюдается в характерном для рецессивного эпистаза отношении 9:3:4. При анализе опушения стеблевых листьев в F₂ выделен и размножен тройной рецессив по генам *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1*. Новая линия может быть использована при картировании неизвестных генов.

T.M. Checheneva, I.V. Kirpicheva

INHERITANCE OF DIFFERENCES IN ORGANS HAIRINESS IN *ARABIDOPSIS* *THALIANA* (L.) HEYNH. PLANTS

It was determined that, according to the character «hairiness of rosette leaves», *gl1-1* allele in homozygote state suppresses action of *dis2-1* allele (*dis2-1 < gl1-1*), therefore F₂ segregation is identified in a typical for recessive epistasis ratio of 9:3:4. Inheritance of differences in hairiness of stem leaves corresponds to the Mendel scheme of segregation (9:3:3:1), which is typical for dihybrids. Hairiness is absent on stems of triple recessive for *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1* plants, and segregation in F₂ is observed in the ratio of 9:3:4.

T.M. Чеченева, И.В. Курпичева

УСПАДКУВАННЯ ВІДМІННОСТЕЙ ЗА ОПУШЕННЯМ ОРГАНІВ РОСЛИН *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

Встановлено, що за ознакою «опушення розеткового листа» алель *gl1-1* в гомозиготному стані інгібує прояв алеля *dis2-1* (*dis2-1 < gl1-1*), тому розщеплення у F₂ спостерігається в характерному для рецессивного епістазу відношенні 9:3:4. Успадкування різноманіття за опушенням стеблевого листа відповідає звичайній для дигібридного схрещування схемі розщеплення Менделя (9:3:3:1). На стеблах потрійного рецесива за генами *dis2-1*, *er-1*, *gl1-1* опушення відсутнє, розщеплення в F₂ спостерігається у відношенні 9:3:4.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ежова Г.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
2. *Germplast Detail* [электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=germplasm&id=1005003824>
3. Szymanski D.B., Lloyd A.M., Marks M.D. Progress in the molecular genetic analysis of trichome inflation and

- morphogenesis in *Arabidopsis* // Trends Plant Sci. – 2000. – 5. – P. 53.
4. Hulskamp M., Misera S., Jiirgens G. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis* // Cell. – 1994. – 76. – P. 555–566.
 5. Larki J.C., Oppenheimer D.G., Pollock S., Marks M.D. Arabidopsis *GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function // Plant Cell. – 1993. – 5. – P. 1739–1748.
 6. Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* // Genetics. – 2000. – 156. – P. 1349–1362.
 7. Schnittger A., Jut-gens G., Hulskamp M. Tissue layer and organ specificity of trichome formation are regulated by *GLABRA1* and *TRIPTYCHON* in *Arabidopsis* // Development. – 1998. – 125. – P. 2283–2289.
 8. Szymanski D.B., Marks M.D. *GLABROUS1* overexpression and *TRIPTYCHON* alter the cell cycle and trichome cell fate in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 1998. – 10. – P. 2047–2062.
 9. Szymanski D.B., Jilk R.A., Pollock S.M., Marks M.D. Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* eaves and trichomes // Development. – 1998. – 125. – P. 1161–1171.
 10. Esch J.J., Chen M., Sanders M., Hillestad M., Ndkium S., Idelkope B., Neizer J., Marks M.D. A contradictory *GLABRA3* allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis* // Development. – 2003. – 130. – P. 5885–5894.
 11. Ефремов А.А. Транспозонный мутагенез и характеристика гена арабидопсиса, контролирующего срастание органов, их опушение и состав жирных кислот : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар, 1999. – 26 с.
 12. *The Nottingham Arabidopsis Stock Centre*. Seed List. – Nottingham : Univ. press., 1994. – 147 p.
 13. Соколов І.Д., Шелихов П.В., Соколова Т.І. та ін. Генетика : Практикум. – Київ : Арістей, 2003. – 176 с.
 14. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
 15. Соколов І.Д., Харченко В.Є., Наумов С.Ю. та ін. Мінливість характеру опушення рослин арабідопсису Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) // Наук. вісн. Волин. ун-ту. – 2003. – № 11. – С. 102–106.
 16. Соколов І.Д., Сигидиненко Л.І., Соколова Е.І., Медведь О.М., Кирпичева І.В., Шелихов П.В. Lugansk Arabidopsis Seed Stock Center : Каталог генетической коллекции. – Луганск : Элтон-2, 2009. – 60 с.

Поступила 01.12.09