

УДК 581.154:582.683.2

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МУЛЬТИМУТАНТНОЙ ЛИНИИ АРАБИДОПСИСА (*ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.) С ПРИЗНАКАМИ, ВЫХОДЯЩИМИ ЗА РАМКИ СЕМЕЙСТВЕННОСПЕЦИФИЧЕСКИХ

И.Д. СОКОЛОВ, О.М. МЕДВЕДЬ

Луганский национальный аграрный университет,
Украина, 91008, г. Луганск, ЛНАУ, кафедра биологии растений
e-mail: olgamed060283@rambler.ru

Путем скрещивания тройных мутантов, последующего отбора в F_2 и F_3 и размножения была получена мультимутантная линия ar1,br,clv1,gl1, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм. Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта определенно выходят за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственоспецифических) признаков.

Ключевые слова: арабидопсис, мультимутантная линия, генотип, фенотип.

Введение. По Н.И.Вавилову [1] “монотипные виды существуют обычно только до того времени, как они изучаются в гербарии”. Типологической (монотипической) концепции вида Н.И. Вавилов [2] противопоставлял свои представления о виде как системе, включающей нередко огромное количество наследственно различающихся форм, и эти представления согласуются с современной биологической (политипической) концепцией вида. Для вскрытия генетического полиморфизма видов он предлагал использовать исследование естественных популяций, мутагенез, для растений-перекрестников также инцухт (инбридинг).

Для широко используемого в генетических исследованиях модельного объекта арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) как естественно инбредного вида эффективными методами выявления генетического полиморфизма являются поиски необычных форм в природных популяциях и индуцированный мутагенез. Для этой же цели пригоден также метод гибридизации мутантных линий с последующим отбором в расщепляющихся популяциях димутантов, при скрещивании димутантов – тримутантов и т.д. Так можно получить мультимутантные растения, которые по нескольким признакам выходят за

рамки видо-, родо- и семейственно-специфических. Их получение расширяет наши представления о генетической изменчивости живых организмов, ставя задачу определенной ревизии систематики растений.

Материалы и методы

Для исследований использованы гомозиготные мутантные линии *ap1-1*, *bp-1*, *clv1-1* и *gl1-1*, называемые по мутантным аллелям. Семена этих линий получены нами из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Center, NASC, (UK)) [3]. В качестве материала для создания мультимутантной линии *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* были использованы тройные мутанты *bp-1, clv1-1, gl1-1* и *ap1-1, bp-1, gl1-1*, синтезированные ранее в Луганском НАУ Л.И. Сигидиненко и О.М. Медведь, соответственно [4, 5]. Изображения получали с помощью цифрового фотоаппарата Canon A630. Общее описание линий, использованных для получения тетрамутантного рецессива *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1*, представлено в табл. 1.

Заметим, что описанные здесь три- и тетрамутантные линии, строго говоря, являются тетра- и пентамутантными

ми – все они несут также в гомозиготном состоянии рецессивный аллель *er*. Причина в том, что исходные мономутанты гомозиготны по этому аллелю, поскольку все получены на генетической основе линии *Ler* (генотип *erer*).

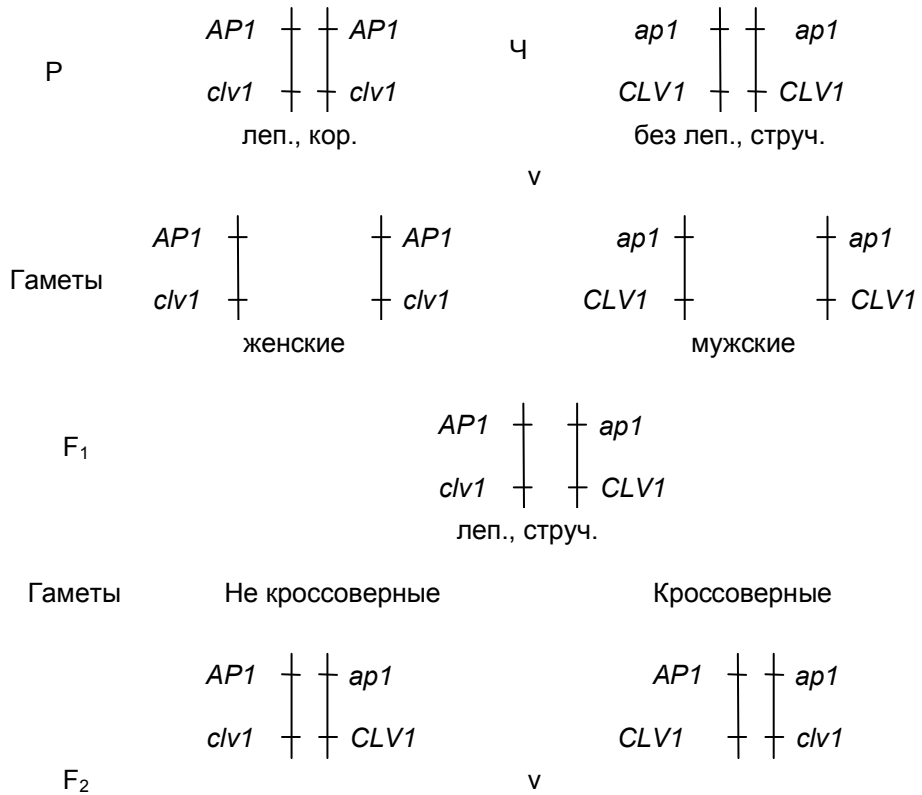
Растения выращивали в горшочной почвенной культуре в лаборатории светокультуры на кафедре биологии растений Луганского НАУ [6]. Путем скрещивания тройных мутантов и последующего отбора в F_2 и F_3 была получена мультимутантная линия, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм.

Результаты и обсуждение

Для получения тетрамутантной линии *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* в качестве родительских форм были использованы такие тройные рецессивы: *Brevipedicellus, Clavata, Glabra* (*bp-1, clv1-1, gl1-1*) и *Apetala, Brevipedicellus, Glabra* (*ap1-1, bp-1, gl1-1*). Ради компактности генетических формул далее вместо символа аллеля *ap1-1* будем использовать мнемоническое обозначение *ap1*, вместо *gl1-1* – просто *gl1*, вместо *clv1-1* – просто *clv1* и взамен *bp-1* – просто *bp*. Генотип P_1 – *AP1AP1bpbpc1v1clv1gl1gl1*, генотип P_2

Таблица 1. Характеристика мутантных линий, использованных в скрещивании

Линия	Название	Фенотип	Расположение аллелей в хромосоме
<i>ap1-1, bp-1, gl1-1</i>	<i>Apetala, Brevipedicellus, Glabra</i>	Лепестки обычно отсутствуют, соцветие тирс. Цветки и плоды почти без цветоножек и плодоножек, стручки повернуты косо вверх, вбок или косо вниз. Волоски на розеточных листьях и стеблях отсутствуют.	1-99, 4-15, 3-46
<i>bp-1, clv1-1, gl1-1</i>	<i>Brevipedicellus, Clavata, Glabra</i>	Цветки и плоды почти без цветоножек и плодоножек, плоды повернуты вниз. Плод – трёх-четырёхгнездная коробочка. Волоски на розеточных листьях и стеблях отсутствуют.	4-15, 1-110, 3-46



♀ \ ♂	$AP1clv1$ 0.445	$ap1CLV1$ 0.445	$AP1CLV1$ 0.055	$ap1clv1$ 0.055
$AP1clv1$ 0.445	леп., кор. $AP1clv1 \ AP1clv1$ 0.198	леп., струч. $AP1clv1 \ ap1CLV1$ 0.198	леп., струч. $AP1clv1 \ AP1CLV1$ 0.024	леп., кор. $AP1clv1 \ ap1clv1$ 0.024
$ap1CLV1$ 0.445	леп., струч. $ap1CLV1 \ AP1clv1$ 0.198	без леп., струч. $ap1CLV1$ $ap1CLV1$ 0.198	леп., струч. $ap1CLV1$ $AP1CLV1$ 0.024	без леп., струч. $ap1clv1 \ ap1CLV1$ 0.024
$AP1CLV1$ 0.055	леп., струч. $AP1CLV1$ $AP1clv1$ 0.024	леп., струч. $AP1CLV1$ $ap1CLV1$ 0.024	леп., струч. $AP1CLV1$ $AP1CLV1$ 0.003	леп., струч. $AP1CLV1 \ ap1clv1$ 0.003
$ap1clv1$ 0.055	леп., кор. $ap1clv1$ $AP1clv1$ 0.024	без леп., струч. $ap1clv1 \ ap1CLV1$ 0.024	леп., струч. $ap1clv1 \ AP1CLV1$ 0.003	без леп., короб. $ap1clv1 \ ap1clv1$ 0.003

Рис. 1. Наследование строения цветка и формы плода у арабидопсиса. При записи фенотипов использованы сокращения: 1) леп., струч. – цветки с лепестками, плоды – стручки; 2) леп., кор. – цветки с лепестками, плоды – коробочки; 3) без леп., струч. – цветки без лепестков, плоды – стручки; 4) без леп., короб. – цветки без лепестков, плоды – коробочки

– *ap1ap1bpbpCLV1CLV1gl1gl1*. Генотип особей F_1 от скрещивания родительских линий – *AP1ap1bpbpCLV1clv1gl1gl1*. В F_1 наблюдается полное доминирование признаков нормального или дикого типа (*ap1 < AP1, clv1 < CLV1*): цветки растений с лепестками; плоды – стручки. Цветки и плоды почти без цветоножек и плодоножек, стручки повёрнуты вниз; волоски на листьях и стеблях отсутствуют, поскольку родители гомозиготны по рецессивным аллелям *bp* и *gl1*.

Ген *AP1* расположен в локусе 99 первой хромосомы. Ген *CLV1* тоже расположен в первой хромосоме, локус 110 [7]. Гены *AP1* и *CLV1* сцеплены. Расстояние между этими генами составляет 11 сМ, то есть процент кроссинговера равен ~ 11. По этой причине в F_2 будет наблюдаться отклонение от независимого распределения. Далее расщепление рассматривается без учета генов *BP1* и *GL1*, по которым расщепление не происходит (все особи F_1 имеют генотип *bp1bp1gl1gl1*). Для установления ожидаемой частоты встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* провели теоретические расчеты, суть которых иллюстрирует приведенная ниже схема скрещивания тройных рецессивов: *bp, clv1, gl1* и *ap1, bp, gl1* (рис. 1).

Ожидаемая частота встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* в F_2 составляет 0.3 % (3 растения из 1000) (табл. 2). На практике это означает, что

для выделения растений с таким генотипом необходимо высадить минимум 5 ящиков (по 196 растений в каждом), что очень обременительно. Для упрощения выделения растений с генотипом *ap1ap1clv1clv1* можно пойти другим путем, а именно выделить интересный нас фенотип и генотип в F_3 . Среди особей с лепестками и коробочками (*AP1-clv1clv1*) около 20 % (0,048/0,246) такие, что в F_3 будут расщепляться (лепестки – без лепестков). Среди особей без лепестков и со стручками (*ap1ap1CLV1-*) тоже около 20 % (0,048/0,246) таких, что в F_3 будут расщепляться (стручки – коробочки).

В ящике, где выращивали F_2 , собрали семена с 14 растений фенотипа “цветки с лепестками, плоды – коробочки” и с 14 растений фенотипа “цветки без лепестков, плоды – стручки”. Семена растений с разными фенотипами высадили в два отдельных ящика. В ящике 14 рядов по 14 посадочных мест в ряду (всего 196 растений в ящике). В F_3 из 14 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 3 семьях (рядах). Из 28 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 6 семьях. Фактически в семье *ap1* расщепление было обнаружено в 2-х семьях с 6-ю особями, имеющими фенотип “цветок без лепестков, плод – коробочка”. В семье *clv1* расщепление было обнаружено в 3-х семьях с общим числом особей, равным 5, с аналогичным фенотипом. В общем, фактическое расщепление в F_3 было близко к ожидаемому.

Таблица 2. Расщепление по фенотипу в F_2

Цветки с лепестками, плоды – стручки	Цветки с лепестками, плоды – коробочки	Цветки без лепестков, плоды – стручки	Цветки без лепестков, плоды – коробочки
0,198+0,024+0,198+ +0,024+0,024+0,024+ +0,003+0,003+0,003= =0,501 50,1%	0,198+0,024+0,024= =0,246 24,6%	0,198+0,024+0,024= =0,246 24,6%	0,003 0,3%



Рис. 2. Исходная (а) и полученная на её генетической основе тетрамутантная линия *ap1, bp, clv1, gl1* (б-ж): а – растение исходной гомозиготной линии *Landsberg erecta* (*Ler*); б – растение линии *ap1, bp, clv1, gl1* до начала цветения, розеточные листья голые; в – цветки без лепестков, почти без цветоножек, стебель слабо развит; г – соплодие состоит из сближенных плодов почти без плодоножек, плоды по-разному ориентированы в пространстве; д – вскрывшийся плод, представляющий собой коробочку; е – поперечный срез сформировавшегося четырёхгнездного плода; ж – поперечный срез сформировавшегося трёхгнездного плода. Пояснения: одно деление шкалы на рис. д соответствует 0.5 мм.

Таким путём в результате скрещивания и последующего отбора был получен новый тетрамутантный рекомбинант *Apetala, Brevipedicellus, Clavata, Glabra* (*ap1, bp, clv1, gl1*). Новая линия имеет такой фенотип: растения без лепестков; короткие цветоножки и плодоножки, плоды повернуты косо вверх, вбок или косо вниз; плод – четырёхгнездная, реже трёхгнездная коробочка; волоски на розеточных листьях и стеблях отсутствуют (рис. 2 б-ж). Габитус растений линии *ap1, bp, clv1, gl1* (рис. 2 в, г) сильно отличается от габитуса растений дикого типа (рис. 2 а).

Синтезированная нами новая мультимутантная линия имеет теоретический и практический интерес. Она пригодна для генетико-селекционных исследований. Синтез новой линии способствует решению задач по картированию генов. Тетрамутантная линия может быть объектом для изучения совместного плейотропного действия мутантных аллелей на количественные признаки. Данная линия – донор селекционно-ценных мутантных аллелей *bp* и *clv1*. Наконец, она может быть использована для облегчения поддержания коллекции мутантных аллелей

(одну линию легче поддерживать, чем четыре исходные).

В рамках типологического подхода принимается, что розеточные (прикорневые) листья *A. thaliana* дикого типа (WT) покрыты преимущественно разветвлёнными (сложными) волосками с примесью простых. Стеблевые листья покрыты разветвлёнными и неразветвлёнными волосками. На нижней части стебля простые длинные волоски, на верхней части волосков нет. Стебли развитые. Цветки актиноморфные с двойным околоцветником. Цветок состоит из 4 чашелистиков, 4 лепестков, 6 тычинок (из них 2 – более короткие) и 2 сросшихся плодолистиков. Формула цветка $Ca_4Co_4A_6G_{(2)}$. Лепестки белого цвета, длиннее чашелистиков примерно в 1,5 раза. Соцветие простая или сложная кисть. Плод – стручок, образованный двумя плодолистиками. Стручки косо вверх направленные. Верхушка стручка островатая. Плодоножки примерно одной длины со стручками (рис. 2 а).

В отличие от этого, у растений полученной нами мультимутантной линии на розеточных листьях трихомы отсутствуют, розеточные листья голые (рис. 2 б). Края листовых пластинок стеблевых листьев покрыты разветвлёнными и неразветвлёнными волосками. Стебли не развитые и не опушенные. Цветки актиноморфные, но количество органов цветка изменяется в довольно широких пределах. Количество чашелистиков варьирует от 1 до 4, в среднем составляя примерно 3 чашелистика на цветок. В большей части цветков лепестки отсутствуют. В случаях, когда таковые имеются, они белого цвета, длиннее чашелистиков примерно в 1,5 раза. Количество тычинок варьирует от 6 до 11 и составляет в среднем примерно 8 тычинок на

цветок. Число плодолистиков варьирует от 3 до 4, обычно бывает 4 плодолистика. Формула цветка $Ca_{(1-4)}Co_{(0-1)}A_{(6-11)}G_{(3-4)}$. Соцветие тирс, структурными единицами которого являются простые верхушечники, моно-, ди- и плейохазии, из-за укороченных цветоножек и скученности цветков внешне напоминающее головку (рис. 2 в). Плод – четырехгнездная, редко трёхгнездная коробочка, образованная четырьмя или тремя плодолистиками и вскрываемая четырьмя (тремя) швами (рис. 2 д-ж). Плодоножки укорочены в такой степени, что плоды выглядят почти сидячими. Ориентация плодов в пространстве различная (косо вверх, вбок или косо вниз по отношению к центральному цветоносу) (рис. 2 г).

Особый интерес привлекают выходящие за рамки семейственноспецифических изменения признаков, вызываемые влиянием аллелей *ap1* и *clv1*. У представителей сем. *Brassicaceae* плоды стручки или стручочки, редко орешки [8, 9]. У растений *A. thaliana* линии *ap1, bp, clv1, gl1* в результате действия аллеля *clv1* плоды четырёхгнездные или реже трёхгнездные коробочки, не отмечавшиеся до сих пор ботаниками в сем. *Brassicaceae*. Цветки в сем. *Brassicaceae* принимаются за четырёхчленные (чашелистиков 4, лепестков 4) [9], а в цветках линии *ap1, bp, clv1, gl1* под действием аллеля *ap1* количество чашелистиков варьирует от 1 до 4, а лепестков в подавляющем большинстве цветков вообще нет. Наконец, под влиянием аллеля *ap1* у нашей линии *A. thaliana* формируется соцветие тирс, тогда как считалось, что у *A. thaliana*, в целом в роде *Arabidopsis* и во всем сем. *Brassicaceae* соцветие простая или сложная кисть (последняя называется также метелкой) [8, 9].

Наследственные изменения под влиянием мутантных аллелей *ap1*, *bp*, *clv1* и *gl1* входят в противоречия с описаниями *A. thaliana* во флорах, определителях, атласах. Используемые морфологические критерии не позволяют успешно классифицировать виды в пределах рода *Arabidopsis*. Ряд мутационных и комбинационных изменений определён выходя за рамки признаков, принимаемых за видоспецифические (*bp*) родоспецифические (*clv1*, *gl1*) и семейственноспецифические (*ap1*, *clv1*).

Полученная мультимутантная линия *A. thaliana ap1, bp, clv1, gl1* имеет такую совокупность признаков, которая не позволяет уверенно отнести её к виду *A. thaliana*, роду *Arabidopsis* и сем. *Brassicaceae*. Совершенствование системы классификации сем. *Brassicaceae* требует поиска признаков, которые действительно являются видо-, родо- и семейственноспецифическими. Оно невозможно без широкого использования основного, генетического критерия вида, по которому рекомбинант *ap1, bp, clv1, gl1* несомненно относится к *A. thaliana* [10].

Выводы

Путем скрещивания тройных мутантов, последующего отбора в F_2 и F_3 и размножения была получена мультимутантная линия *ap1, bp, clv1, gl1*, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм.

Синтезированная новая тетрамутантная линия пригодна для исследований в различных областях современной генетики, в том числе для решения задач по картированию генов.

Тетрарецессив *ap1, bp, clv1, gl1* облегчает работу по сохранению генофонда (селекционно-ценных мутантных аллелей) *A. thaliana*.

Морфологические признаки мультимутантной линии *ap1, bp, clv1, gl1* входят в противоречия с описаниями *A. thaliana* во флорах, определителях, атласах.

Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта *ap1, bp, clv1, gl1* определён выходя за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственноспецифических) признаков.

Список литературы

1. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. – В кн. Н.И.Вавилов. Избранные произведения в двух томах. Т. 1. – Л.: Наука, 1967. – С. 7–61.
2. Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система – В кн. Н.И.Вавилов. Избранные произведения в двух томах. Т. 1. – Л.: Наука, 1967. – С. 91.
3. *Seed List*. The Nottingham Arabidopsis Stock Centre. – Nottingham: The University of Nottingham, 1994. – 147р.
4. Сигидиненко Л.И., Шелихов П.В. Синтез тримутантных линий арабидопсиса *bp-1, ch5-1, gl1-1*; *bp-1, clv1-1, gl1-1*; *ch5-1, clv1-1, gl1-1* // Збірн. наук. праць Луганського НАУ. – 2004. – №39 (51). – С. 18–20.
5. Медведь О.М. Получение и изучение тримутантного рекомбинанта арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) *ap1-1, bp-1, gl1-1* – В сб. “Материалы чтений, посвященных 300-летию со дня рождения К. Линнея” – Луганск: Элтон-2, 2007. – С. 134.
6. Соколов И.Д., Шелихов П.В., Соколова Т.И. та інш. Генетика. Практикум. – Київ: Арістей, 2003. – 176 с.
7. Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
8. Аветисян В.Е. Семейство Крестоцветные (*Brassicaceae* или *Cruciferae*). – В кн. Жизнь растений. В 6-ти т. / Под ред. Тахтаджян А.Л. – М.: Просвещение, 1980. – Т. 5. Ч. 1. – С. 67–74.

9. Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. – Л.: Наука, – 1966. – 611с.
10. Соколов И.Д., Сыч Е.И., Медведь О.М. Морфологическая генотипическая изменчивость *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в связи с типологической концепцией вида. – Факторы экспериментальной эволюции организмов: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2006. – Т.3. – С. 53-57.

*Представлена С.С. Малютой
Поступила 15.05.2008*

**ОТРИМАННЯ І ВИВЧЕННЯ
МУЛЬТИМУТАНТНОЇ ЛІНІЇ АРАБІДОПСИСУ
ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH.
З ОЗНАКАМИ, ЩО ВИХОДЯТЬ ЗА РАМКИ
РОДИННОСПЕЦИФІЧНИХ**

І.Д. Соколов, О.М. Медвідь

Луганський національний аграрний університет,
Україна, 91008, м. Луганськ, ЛНАУ, кафедра
біології рослин
e-mail: olgamed060283@rambler.ru

Шляхом схрещування потрійних мутантів, подальшого відбору в F₂ та F₃ і розмноження була отримана мультимутантна лінія

ap1, bp, clv1, gl1, яка об'єднала в собі ознаки мутантів батьківських форм. Мутаційні зміни у тетрамутантного рекомбінанту безумовно виходять за рамки діагностичних (видо-, родо- і родинноспецифічних) ознак.

Ключові слова: арабідопсис, мультимутантна лінія, генотип, фенотип.

**RECEIVING AND STUDYING OF THE
MULTIMUTANT LINE OF *ARABIDOPSIS
THALIANA* (L.) HEYNH. WITH ATTRIBUTES
GOING BEYOND FAMILY-SPECIFIC**

I.D. Sokolov, O.M. Medved'

Lugansk National Agrarian University,
Ukraine, 91008, Lugansk, LNAU, department
of biology
e-mail: olgamed060283@rambler.ru

By crossing of triple mutants, the subsequent selection in F₂ and F₃ and duplication mutant lines *ap1, bp, clv1, gl1* have been received, which united in itself the mutant attributes of parents forms. Tetramutant recombinant certainly have mutational changes beyond diagnostic (species-, genera- and family-specific) attributes.

Key words: arabidopsis, multimutant line, genotype, phenotype.