

## АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК:575.87

### MADS-ГЕНЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ МОРФОГЕНЕЗ СОЦВЕТИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА<sup>1</sup>

© 2008 г. О. А. Шульга, А. В. Шенникова, Г. С. Ангенент\*, К. Г. Скрыбин

Центр “Биоинженерия” РАН

117312 Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7/1

\*Международный центр исследований растений, Вагенинген, Нидерланды

E-mail: shulga@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 29.05.07 г.

MADS-гены играют важную роль в онтогенезе растений, особенно в регуляции индукции и развитии цветковых органов. Мы выделили восемь полноразмерных кДНК *HAM*-генов (*Helianthus annuus* MADS) подсолнечника, кодирующих MADS-факторы транскрипции, которые экспрессируются в тканях соцветия. В рамках генетической ABCDE-модели идентичности цветковых органов проведена классификация *HAM*-белков согласно их структурной гомологии с известными MADS-факторами транскрипции растений. Гены *HAM45* и *HAM59* кодируют гомеозисную С-функцию и участвуют в контроле развития репродуктивных органов цветка, а *HAM75* и *HAM92* – А-функцию и идентичность цветковой меристемы, меристемы соцветия и лепестков. Гены *HAM31*, *HAM2*, *HAM63* и *HAM91* кодируют В-функцию и участвуют в формировании лепестков и тычинок, а ген *HAM137* кодирует Е-функцию. Анализ экспрессии *HAM*-генов подсолнечника показал, что структурно-функциональные различия язычковых и трубчатых цветков в соцветии могут являться следствием отсутствия экспрессии гена *HAM59* при инициации язычковых цветков.

Ключевые слова: MADS-факторы транскрипции, морфогенез цветка, *Helianthus annuus*, ABCDE-модель.

Правильность онтогенеза любого организма определяется строгим и многоуровневым контролем над экспрессией его генов. У эукариот MADS-гены кодируют семейство регуляторов транскрипции, участвующих в различных важных биологических функциях (Messenguay, Dubois, 2003). Эти белки регулируют переход растений от вегетативного роста к репродуктивному развитию, определяют идентичность цветковой меристемы и цветковых органов, развитие корня и семязачатка (Angenent, Colombo, 1996; Burgeff et al., 2002; Kim et al., 2002; de Folter et al., 2006; Ferrario et al., 2006). Известно несколько сотен предполагаемых MADS-генов у растений; белки, кодируемые ими, характеризуются наличием консервативных ДНК-связывающего домена (MADS-бокс) и К-домена, определяющих их функциональную специфичность (Krizek, Meyerowitz, 1996). Филогенетический анализ показал, что семейство растительных MADS-генов образовано несколькими ветвями (Becker, Theißen, 2003). Всего у покрытосемянных было определено 14 подсемейств различных паралофов MADS-генов (Alvarez-Buylla et al., 2000; Becker, Theißen, 2003), причем члены одного подсемейства характеризуются похожи-

ми паттернами экспрессии и взаимосвязанными функциями (Ng, Yanofsky, 2001).

Исследования цветковых гомеозисных мутантов модельных растений *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Petunia hybrida* позволили сформулировать основные принципы определения идентичности цветковых органов – ABCDE-модель (Coen, Meyerowitz, 1991; Angenent et al., 1995; Pelaz et al., 2001). Согласно этой модели цветковые органы в каждом круге идентифицируются комбинацией различных активностей: А + Е определяют идентичность чашелистиков, А + В + Е – лепестков, С + Е + D – семязачатков; В + Е + С и Е + С отвечают за формирование тычинок и плодолостика соответственно. Эти активности выявляются с помощью группы генов, кодирующих в основном MADS-факторы транскрипции. Исследования этих белков у различных растений выявили строгое соответствие между их структурой и функциональной активностью. Подсемейства растительных MADS-белков названы так по имени белков модельных растений *A. thaliana* и *A. majus*, образующих эти группы. Так, А-активность присуща определенным членам подсемейства *SQUAMOSA/APETALA1*, В-активность кодируют гены группы *GLOBOSA/PISTILLATA* и *DEFICIENS/APETAL3*, а С и D – *AGAMOUS/PLENA*, Е-активность представлена генами группы

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований и Нидерландской организацией по научным исследованиям (NWO) (проект NWO-РФФИ № 047-007-016).

*SEPALLATA*. Было показано, что идентичность органов цветка *A. thaliana* определяют следующие “квартеты” MADS-белков: AP1/AP1/SEP4/SEP4 – чашелистики, AP1/PI/AP3/SEP3 – лепестки, PI/AP3/SEP3/AG – тычинки, SEP3/SEP3/AG/AG – плодolistик (Honma, Goto, 2001; Pelaz et al., 2001).

Мы изучали генетический контроль морфогенеза соцветия подсолнечника и роль MADS-генов в этом процессе. Подсолнечник – характерный представитель семейства астровых. Соцветие подсолнечника – корзинка состоит из сотен маленьких цветков двух типов. На периферии во внешнем круге расположены язычковые неполные (отсутствуют тычинки и пестик) стерильные цветки, а вся внутренняя часть корзинки занята фертильными трубчатými цветками. Несмотря на многочисленные исследования морфологии и развития цветка астровых (Palmer, Steer, 1985; Hernandez, Green, 1993; Harris, 1995), очень мало известно о развитии соцветия и цветка в этом огромном семействе покрытосемянных с точки зрения молекулярной генетики (Yu et al., 1999; Kotilainen et al., 2000; Dezar et al., 2003; Щенникова и др., 2003; Shchennikova et al., 2004). Выделение и изучение генов, регулирующих морфогенез подсолнечника, может объяснить одновременное присутствие в одном соцветии морфологически и функционально различных цветков, а также дать новую информацию о происхождении цветковых органов и эволюционных изменениях в структуре цветка.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали растения подсолнечника сорта Передовик, выращенные в теплице при 20–25°C и 16-часовом световом дне. РНК выделяли из целого соцветия диаметром не более 1 см без обертки и из отдельных цветков, собранных из соцветия диаметром не более 4 см.

Получение кДНК-библиотеки, молекулярное клонирование и анализ экспрессии генов осуществляли согласно описанному ранее методу (Маниатис и др., 1984). Анализ кДНК-библиотеки и MADS-белков хризантемы и петунии в дрожжевой системе GAL4 проводили согласно протоколу фирмы-производителя (“Stratagene”, США) и методике Хонма и Гото (Honma, Goto, 2001).

Для секвенирования плазмидной ДНК использовали секвенатор Amersham ABI-PRISM и набор реактивов (“Stratagene”, США). Полученные последовательности сравнивали с данными Банка Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью поисковой программы BLAST (Altschul et al., 1997). Выделенные MADS-гены сравнивали друг с другом и с уже известными из других растений с по-

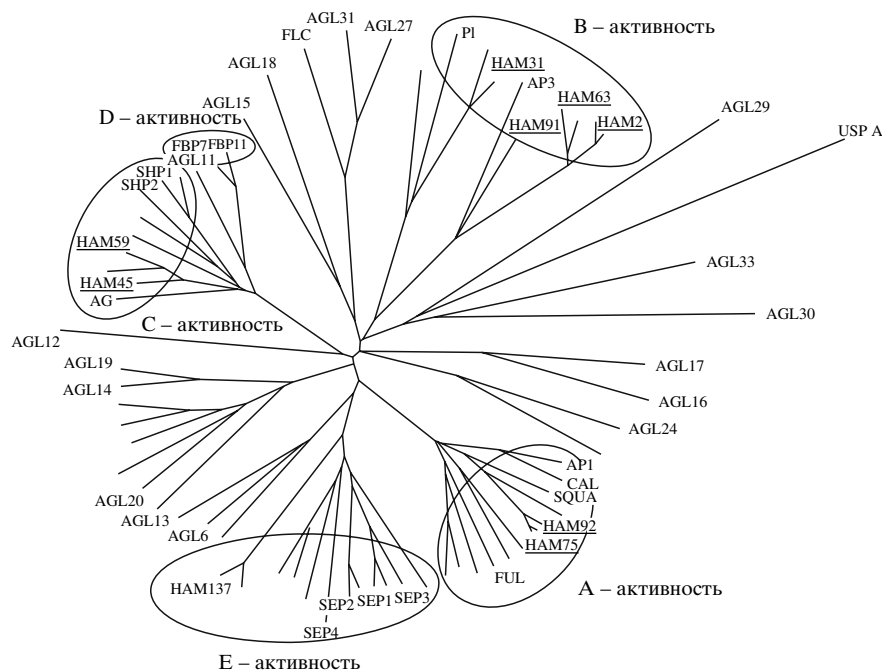
Характеристика кДНК *HAM*-генов подсолнечника

кДНК	Номер доступа в GenBank	Число аминокислот кодируемого белка	Гены-гомологи <i>A. thaliana</i> и <i>A. majus</i>
<i>HAM2</i>	EF612597	239	<i>AP3, DEF</i>
<i>HAM31</i>	AAO18230	196	<i>PI, GLO</i>
<i>HAM45</i>	AAO18228	267	<i>AG, PLENA</i>
<i>HAM59</i>	AAO18229	247	<i>AG, PLENA</i>
<i>HAM63</i>	EF612598	239	<i>AP3, DEF</i>
<i>HAM75</i>	AAL83209	248	<i>API, SQUA</i>
<i>HAM91</i>	AAO18231	210	<i>AP3, DEF</i>
<i>HAM92</i>	AAO18232	251	<i>API, SQUA</i>
<i>HAM137</i>	AAO18233	253	<i>AGL9 (SEP3)</i>

мощью программ ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX>). Для филогенетического анализа использовали данные ClustalX и Tree-View (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе выделили полноразмерные кДНК MADS-генов, экспрессирующихся в соцветии подсолнечника. Для этого с помощью мРНК, выделенной из ткани соцветия на стадиях закладки цветков и закрытых (до пыления) трубчатых цветков, составили кДНК-библиотеку (Маниатис и др., 1984). В результате гибридизации кДНК-библиотеки с генами *pMADS3* (X72912) петунии и *CAULIFLOWER* (NM\_102395) *A. thaliana* выделили семь полноразмерных кДНК MADS-генов подсолнечника, названных *HAM*-генами (*Helianthus annuus MADS*). Анализ кДНК-библиотеки, продолженный в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе, выявил полноразмерные кДНК белков *HAM2*, *HAM63*, взаимодействующих с белком *HAM31* (таблица). Сравнение аминокислотных последовательностей *HAM*-белков с известными MADS-белками при помощи программы BLAST показало, что идентичность первых известным MADS-белкам сложноцветных составляет от 84 до 99%, а MADS-белкам других семейств покрытосемянных – от 52 до 80%. Блот-гибридизация суммарной РНК, выделенной из разных частей цветков подсолнечника, показала, что гены *HAM75*, *HAM92* экспрессируются в лепестках и в семянной оболочке, *HAM45* – в семязачатке, а *HAM59* – в семязачатке, тычинках, столбике и рыльце пестика (неопубл. данные). Поскольку структурные гомологи MADS-генов выполняют схожие функции, мы предполагаем, что гены *HAM75*, *HAM92* кодируют активность А, *HAM45*, *HAM59* – С, *HAM137* – Е, а гены *HAM31*, *HAM2*, *HAM63* и *HAM91* – В.



Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей МНК-фрагментов HAM-белков и MADS-белков *A. thaliana*, *P. hybrida*, *A. majus* и *Chrysanthemum morifolium*. В качестве представителя другой филогенетической группы использован белок UPS A. (Указаны только HAM-белки и группированные MADS-белки *A. thaliana*, *P. hybrida*, *A. majus*.)

Для определения общих эволюционных взаимосвязей этих белков с другими MADS-белками провели филогенетический анализ МНК-фрагментов MADS- и HAM-белков *Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, *Chrysanthemum morifolium* и ключевых белков *Antirrhinum majus* с помощью программ ClustalX и Tree-View. Согласно полученным результатам большинство выделенных HAM-генов кодируют белки разных подсемейств семейства MADS-факторов транскрипции (рисунок), что указывает на возможную дупликацию генома подсолнечника в процессе эволюции (Sossey-Alaoui et al., 1998; Alvarez-Buylla et al., 2000).

Мы провели анализ экспрессии выделенных генов в различных частях соцветия на разных стадиях его развития (неопубл. данные). Наибольший интерес представляет паттерн экспрессии гена *HAM59*. Гибридизация *in situ* среза соцветия подсолнечника на стадиях закладки цветков и начала дифференцировки цветковых органов показала отсутствие транскрипта гена *HAM59* в центральной части зародыша язычкового цветка. В то же время отмечался сильный сигнал в центральной части трубчатых цветков, где впоследствии развивались тычинки и столбик пестика. Возможно, именно отсутствие белка *HAM59* определяет стерильность язычковых цветков подсолнечника. Для проверки этой гипотезы мы планируем в дальнейшем получить трансгенные растения с конститутивной экспрессией гена *HAM59*. Наши данные

о наличии у подсолнечника гомологов MADS-генов, контролирующих морфогенез цветка, свидетельствуют о том, что развитие отдельных цветков сложноцветных происходит в соответствии с ABCDE-моделью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Щенникова А.В., Шульга О.А., Ангенетн Г.С. и др. О генетической регуляции развития соцветия хризантемы // Докл. АН. 2003. Т. 391. № 5. С. 1–3.
- Altschul S.F., Thomas L.M., Alejandro A.S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Alvarez-Buylla E.R., Pelaz S., Liljegren S.J. et al. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 5328–5233.
- Angenent G.C., Colombo L. Molecular control of ovule development // Trends Plant Sci. 1996. V. 1. P. 228–232.
- Angenent G.C., Franken J., Busscher M. et al. A novel class of MADS-box genes is involved in ovule development in *petunia* // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1569–1582.
- Becker A., Theißen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 29. P. 464–489.

- Burgeff C., Liljegren S.J., Tapia-Lopez R. et al. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots // *Planta*. 2002. V. 214. № 3. P. 365–372.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // *Nature*. 1991. V. 353. P. 31–37.
- de Folter S., Shchennikova A.V., Franken J. et al. A B-sister MADS-box gene involved in ovule and seed development in *Petunia* and *Arabidopsis* // *Plant J*. 2006. V. 47. P. 934–946.
- Dezar C.A., Tioni M.F., Gonzalez D.H. et al. Identification of three MADS-box genes expressed in sunflower capitulum // *J. Exp. Bot*. 2003. V. 11. P. 1–3.
- Ferrario S., Shchennikova A.V., Franken J. et al. Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factors // *Plant Physiol*. 2006. V. 140. P. 890–898.
- Harris E.M. Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts // *Bot. Rev*. 1995. V. 61. P. 193–208.
- Hernandez L.F., Green P.B. Transductions for the expression of structural pattern: analysis in sunflower // *Plant Cell*. 1993. V. 5. P. 1725–1738.
- Honma T., Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs // *Nature*. 2001. V. 409. P. 525–529.
- Kim S.-H., Mizuno K., Fujimura T. Isolation of MADS-box genes from sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) expressed specifically in vegetative tissues // *Plant Cell Physiol*. 2002. V. 43. P. 314–322.
- Kotilainen M., Elomaa P., Uimari A. et al. GRCD1, an AGL2-like MADS-box gene, participates in the C function during stamen development in *Gerbera hybrida* // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1893–1902.
- Krizek B.A., Meyerowitz E.M. Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ-identity proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 4063–4070.
- Messenguy F., Dubois E. Role of MADS-box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development // *Gene*. 2003. V. 316. P. 1–21.
- Ng M., Yanofsky M.F. Function and evolution of the plant MADS-box gene family // *Nat. Rev. Genet*. 2001. V. 2. P. 186–195.
- Palmer J.H., Steer B.T. The generative area as the site of floret initiation in the sunflower capitulum and its integration to predict floret number // *Field Crops Res*. 1985. V. 11. P. 1–12.
- Pelaz S., Tapia-Lopez R., Alvarez-Buylla E.R. et al. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis* // *Cur. Biol*. 2001. V. 11. P. 182–184.
- Shchennikova A.V., Shulga O.A., Immink R. et al. Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-box genes, belonging to the *APETALA1/FRUITFULL* and *SEPALLATA3* subfamilies // *Plant Physiol*. 2004. V. 134. P. 1632–1641.
- Sossey-Alaoui K., Serieys H., Tersac M. et al. Evidence for several genomes in *Helianthus* // *Theor. Appl. Genet*. 1998. V. 97. P. 422–430.
- Yu D., Kotilainen M., Pollanen E. et al. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) // *Plant J*. 1999. V. 17. P. 51–62.

## MADS-Box Genes Controlling Inflorescence Morphogenesis in Sunflower

O. A. Shulga<sup>a</sup>, A. V. Shchennikova<sup>a</sup>, G. C. Angenent<sup>b</sup>, and K. G. Skryabin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Center “Bioengineering,” Russian Academy of Sciences, prosp. 60-letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia

<sup>b</sup> Plant Research International, P.O. Box 16, Wageningen, 6700 AA The Netherlands

E-mail: shulga@biengi.ac.ru

**Abstract**—MADS-box genes play an important role in plant ontogeny, particularly, in the regulation of floral organ induction and development. Eight full-length cDNAs of *HAM* (*Helianthus annuus* MADS) genes have been isolated from sunflower. They encode MADS-box transcription factors expressed in inflorescence tissues. In the frames of the ABCDE model, the *HAM* proteins were classified according to their structural homology to known MADS-box transcription factors. The *HAM45* and *HAM59* genes encode the homeotic C function and are involved in the control of the identity of pistil and stamens, while the *HAM75* and *HAM92* genes determine the A identity of floral and inflorescence meristems and petal identity. The *HAM31*, *HAM2*, *HAM63*, and *HAM91* genes encode the B function and are involved in the formation of petals and stamens; and the *HAM137* gene encodes the E function. Analysis of the expression of MADS-box genes in sunflower has demonstrated that the structural and functional differences between the ray and tubular flowers in the inflorescence could be a consequence of the lack of *HAM59* expression during ray flower initiation.

**Key words:** MADS-box transcription factors, flower morphogenesis, *Helianthus annuus*, ABCDE model.