

БИОЛОГИЯ
РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 575.87.575.16.575.164.591

**МУТАЦИЯ “НЕДЕТЕРМИНИРОВАННОЕ РАЗВИТИЕ ФЛОРАЛЬНОЙ
МЕРИСТЕМЫ” У *Papaver somniferum* L.: СПОНТАННАЯ
ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФЕНОТИПА**

© 2008 г. Р. Г. Беляева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

Поступила в редакцию 18.12.06 г.
Окончательный вариант получен 13.04.07 г.

Получена новая морфогенетическая мутация “недетерминированное развитие флоральной меристемы” – *dfm* побега у растений *Papaver somniferum* L. с монокарпическим побегом. У мутанта нарушена экспрессия гена *DFM* (*DETERMINATION FLORAL MERISTEM*), ограничивающего пролиферативную активность стволовых клеток во флоральной меристеме. Мутация характеризуется спонтанной онтогенетической нестабильностью фенотипического проявления, изменчивой экспрессивностью мутантного признака на разных цветках одного растения в условиях одной генотипической среды. Изменчивость фенотипического выражения мутации возможна от полного непроявления или образования в центре первичной завязи отдельных филломов до формирования в крайнем выражении нового цветка и новой коробочки с жизнеспособными семенами.

Ключевые слова: генетика развития растений, морфогенез цветка, модификации, изменчивость.

Молекулярно-генетические исследования развития растений основаны на использовании генетических коллекций мутантов как индуцированных, так и спонтанных, созданных у многих видов растений, прежде всего у модельных объектов *Arabidopsis thaliana*, *Antyrrinum majus* и др. В этих исследованиях показано, что большинство генов, контролирующих таксономические морфологические признаки побеговой системы и цветка, являются регуляторными, изменяющими характер экспрессии структурных генов (Doebley, Lukens, 1998; Baum, 1998; Peng et al., 1999; Theisen et al., 2000; Ежова, Склярова, 2001). Однако выявление генной сети, адекватно описывающей наследование многих флоральных мутаций, не является достаточным фактором, объясняющим наследуемую модификационную изменчивость, наблюдаемую при формировании фенотипа этих мутаций. Признак исчезает из фенотипа, а затем вновь появляется у потомков. Значительная часть описанных мутаций структуры цветка отличается спонтанной изменчивостью фенотипа, характеризуется нестабильным проявлением и выражением (пенетрантность и экспрессивность) мутантного признака в индивидуальном развитии. Подтверждением тому являются результаты фенотипического изучения созданной нами генетической коллекции флоральных мутаций у мака *Papaver somniferum* L. (Невкрытая, 1981; Беляева и др., 1983; Беляева, 1995, 1997). Эффекты морфогенетических мутаций у растений оцениваются на

уровне фенотипического проявления, а каков механизм формирования этого фенотипа, можно проследить только в процессе онтогенеза этого признака-органа. В настоящей статье дано описание фенотипической изменчивости новой мутации “недетерминированное развитие флоральной меристемы” побега у *Papaver somniferum* L. в индивидуальном развитии и в разных условиях формирования цветка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на Кропотовской биостанции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. При изучении взаимодействия мутаций “пистиллодии” (линия 46 *psps*) и “махровость” (линия 51 *mSP PL₁ PL₂*) в потомстве гибридов F₂ выделено растение, которое имело супермахровые цветки с сильно рассеченными лепестками.

На основе этого растения в течение нескольких циклов самоопыления создана линия, в которой были обнаружены растения, несущие мутантный признак: внутри нормально развитой завязи-коробочки формировалась новая коробочка или в центре завязи развивались отдельные органы, элементы цветка. В результате длительного самоопыления (более 10 лет) и одновременного отбора на максимальное проявление признака создана линия 45 с мутацией “недетерминированное развитие флоральной меристемы” побега. В работе проведено описание формирования мутантного

признака в индивидуальном развитии у трех последовательно развивающихся цветков растений в разные годы выращивания с учетом пенетрантности проявления. К растениям с нормальным фенотипом относили такие, у которых мутантный признак не проявлялся у трех последовательно формирующихся цветков. Соответственно пенетрантность – это доля изученных растений в линии, у которых мутантный признак проявился хотя бы в одном цветке.

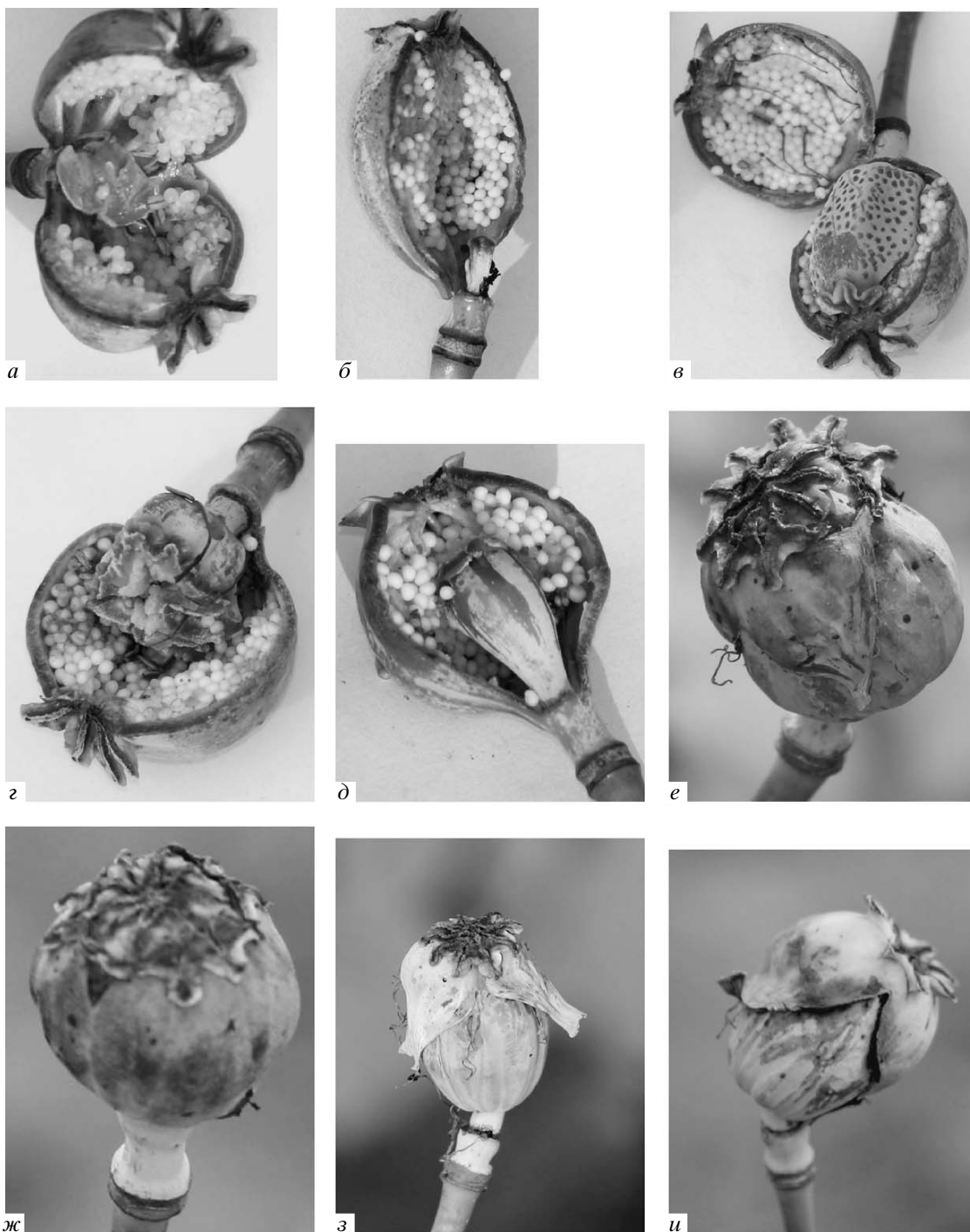
РЕЗУЛЬТАТЫ

Мак *Papaver somniferum* L. относится к растениям с детерминированным типом развития, формирующим монокарпический побег с терминальным цветком. Созданию линии с мутацией “недетерминированное развитие флоральной меристемы” побега предшествовали межвидовые и межлинейные скрещивания. Участвовавшие в скрещиваниях исходные линии (“пистиллодии” *psps* и “махровость” *msp Pl₁ Pl₂*) прошли более чем десятилетний цикл самоопыления и сохраняли структуру цветка, характерную для соответствующей мутации в течение всех лет наблюдений. Очевидно, появление новых мутантных фенотипов с недетерминированным развитием флоральной меристемы побега может быть объяснено как результат активности новых комбинаций генов или рекомбинирования скрытых мутаций генов, имевшихся в генотипах этих линий. Генетическая природа мутантного признака подтверждена способностью формировать новые цветковые структуры в центре первичной завязи, которая наследуется при длительном самоопылении. Мутация рецессивная, при скрещивании с растениями дикого типа в первом поколении все растения-гетерозиготы имели все цветки с нормальным фенотипом (изучено 34 растения). У растений дикого типа DFM с детерминированным типом развития побега осуществляется остановка пролиферативной активности ствольных клеток апекса и их дифференциация во флоральную меристему, формирующую терминальный цветок. У мутанта *dfm* уже после формирования примордиев цветка первого яруса пул ствольных клеток сохраняется с последующей их дифференциацией в меристему, формирующую органы цветка второго яруса. Наблюдается большая изменчивость экспрессивности мутантного признака между растениями внутри линии от полного не проявления или образования в центре первичной завязи отдельных филломов в виде зачатков плаценты или одной-двух тычинок (рисунок, *а, б, г, д*) до формирования в крайнем выражении нового цветка и новой коробочки с хорошо выполненными жизнеспособными семенами (рисунок, *в, е, ж*). Растения с максимальным выражением мутантного признака “коробочка в коробочке” встречаются с незначительной частотой. Так же редко в цветках второго

яруса формируются лепестковые структуры, за весь период наблюдений (более 10 лет) у мутантов не встречали образования чашелистиковых структур. Иногда завязь-коробочка второго яруса разрастается так, что наружная первичная завязь-коробочка отделяется от плодоножки и оказывается “сидящей” в виде колпачка на внутренней коробочке (рисунок, *з, и*). Фенотипическое проявление мутации *dfm* зависит от средовых условий, оно колебалось по годам наблюдений от 30 до 100%. Высокая температура и низкая влажность в период формирования флоральной меристемы и органов цветка в 2006 г. явились оптимальными условиями для 100%-ного проявления и сильного выражения мутантного признака (таблица). В том же году растения с максимальной экспрессией мутантного признака “коробочка в коробочке” составляли 6–19% в сублиниях, тогда как в предыдущие годы наблюдений это были единичные растения (таблица).

Большая изменчивость экспрессивности мутантного признака наблюдалась в индивидуальном развитии растений у трех последовательно формирующихся цветков (таблица). При этом выявлены самые разные варианты фенотипического проявления мутантного признака, когда на одном растении формируется второй цветок с мутацией, первый и третий – нормальные, или первый цветок с мутацией, второй и третий – нормальные и так далее.

Мутантный признак может пропадать в фенотипе, но потом вновь появляется в потомстве. Изучали потомства растений с мутантным и нормальным фенотипами. Для этого в линии отбирали растения, у которых все три цветка имели нормальный фенотип, и растения, у которых все три цветка были с мутантным фенотипом. Далее сублинии формировали по такому же принципу, и описание растений в них проводили в течение трех поколений (в таблице даны результаты двух лет наблюдений). Как оказалось, сублинии этих растений мало различались по степени проявления и выражения мутантного признака. Таким образом, в течение длительного периода наблюдений (более 10 лет) в линии с мутацией *dfm* “недетерминированное развитие флоральной меристемы” у *Papaver somniferum* L. сохраняется изменчивость мутантного признака в индивидуальном развитии растений в условиях одной генотипической среды, а также независимое варьирование признака на разных цветках одного растения. Эта изменчивость может быть спонтанной, модификационной, обусловленной нестабильной реакцией онтогенеза на новые факторы развития вследствие нарушения экспрессии гена *DFM*, участвующего в регуляции функционирования апикальной меристемы.



Экспрессия фенотипического проявления мутации *dfm* “недетерминированное развитие флоральной меристемы” у *Papaver somniferum* L.: а, б, г, д – формирование отдельных филломов внутри первичной завязи; в, е, ж – фенотип “коробочка в коробочке”; з, и – первичная завязь-коробочка, “сядущая” в виде колпачка на внутренней завязи.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие побеговой системы у высших растений состоит в повторяющемся формировании органов в процессе функционирования побеговой апикальной меристемы, которая формируется в эмбриогенезе после закладки тканей семядолей и

гипокотыля (Лутова и др., 2000). В центральной зоне апикальной меристемы поддерживается популяция недифференцированных стволовых клеток, пролиферативная активность которых регулируется через систему их клеточного цикла, которая, очевидно, настроена на постоянное размножение.

Изменчивость проявления мутации “недетерминированное развитие флоральной меристемы” в сублиниях растений *Papaver somniferum* L. с нормальным и мутантным фенотипами

Потомство растений с фенотипом									
нормальным					мутантным				
Сублинии, цветков	Изучено растений, цветков	Фенотип цветка		Пенетрантность, %	Сублинии, цветков	Изучено растений, цветков	Фенотип цветка		Пенетрантность, %
		норма	мутантный				норма	мутантный	
2002 г.									
2-1	43				2-4	45			
1	43	29	14	32.6	1	45	28	17	37.7
2	40	25	15	37.5	2	39	28	11	28.2
3	27	22	5	18.5	3	25	19	6	24.0
2-2	25				2-5	34			
1	25	15	10	40.0	1	34	20	14	41.2
2	25	16	9	36.0	2	27	19	8	29.6
3	19	14	5	26.3	3	20	13	7	35.0
2-3	52				2-6	49			
1	52	29	23	44.2	1	49	31	18	36.7
2	36	24	12	33.3	2	33	23	10	30.3
3	24	18	6	25.0	3	24	19	5	20.8
2006 г.									
6-1	63				6-4	112			
1	63	11	52	82.5	1	112	1	111	99.1
2	12	0	12	100	2	22	0	22	100
6-2	103				6-5	102			
1	103	4	99	96.1	1	102	3	99	97.0
2	20	2	18	90.0	2	24	6	18	85.0
6-3	101				6-6	83			
1	101	3	98	97.0	1	83	4	79	95.0
2	18	7	11	61.1	2	16	3	13	81.2

Ограничение интенсивности или полное прекращение делений стволовых клеток, которое осуществляется у растений с детерминированным ростом побега *Papaver somniferum* L., происходит при их дифференцировке в меристему, формирующую терминальные структуры. В настоящее время идентифицированы группы генов, контролирующих функционирование апикальной меристемы побега. У *Arabidopsis thaliana* гомеобоксодержащие гены *WUS (WUSHEL)*, *STM (SHOOTMERISTEMLESS)*, *KNOX*, а также гены *CLV (CLAVATA)* поддерживают тонкий баланс, определяющий динамическое равновесие пула стволовых клеток и размера меристемы, и регулируют границу между центральной и периферической зонами апекса (Clark et al., 1996; Schoof et al., 2000; Lenhard et al., 2002). Гены *AS (ASYMETRIC)*, *BOP-1 (BLADE-on-PETIOLE1)* играют важную роль в последующей дифференцировке меристемы, апекса (Barton, 2001; Ha et al., 2003). Ортологи некоторых генов выявлены у других растений. Так, у кукурузы гомеобоксный ген *KN1* экспрессируется только в апикальной меристеме до начала инициации листа (Jackson et al., 1994). У мутанта *dfm* “недетерминированное развитие флоральной меристемы” побега у *Papaver somniferum* L. нарушена активность гена *DFM*, ограничивающего пролифера-

цию пула стволовых клеток во флоральной меристеме. У мутанта происходит снятие запрета на деление стволовых клеток апекса с последующей дифференциацией их во флоральную меристему, формирующую органы нового цветка второго яруса. Мутация характеризуется наследуемой онтогенетической нестабильностью проявления в фенотипе, независимым варьированием экспрессивности мутантного признака на разных цветках одного растения. Подобная нестабильность развития описана у гомеозисной мутации *Ant* “пыльник в лепестке” у *P. somniferum* L., когда наблюдается независимое выражение признака на разных лепестках одного цветка от не проявления до формирования вместо лепестка тычинки (Беляева и др., 1983). Эта изменчивость наследуется и сохраняется в течение длительного времени (25 поколений), хотя постоянно ведется отбор на максимальное проявление признака.

Б.Л. Астауров (1927) в своей классической работе, анализируя фенотипические эффекты мутации *tetraptera* у *D. melanogaster*, показал, что изменчивость развития не сводима только к разнообразию генотипов и среды, так как в совершенно одинаковых условиях под контролем абсолютно идентичного генотипа (в пределах одного организма) наблюдается независимое варьирование разви-

тия мутантного признака на сторонах тела одной особи – билатеральная асимметрия. Детерминация развития мутантного признака определяется не организмом как целым, а независимо каждой из половин организма. Сформулирован важный общебиологический принцип вероятностной (статистической) детерминации процессов онтогенеза. Многие возникающие морфогенетические мутации, если они не затрагивают основных механизмов жизнеобеспечения организмов, характеризуются нестабильным проявлением в фенотипе. В индивидуальном развитии модификации могут происходить спонтанно, как и мутации. Анализируя роль генетических процессов в онтогенетической изменчивости, С.Г. Инге-Вечтомов (2005) рассматривает различные типы изменчивости фенотипа в связи с изменчивостью в воспроизведении и реализации генетической информации. Модификационная изменчивость фенотипа может быть обусловлена нормой реакции, заданной генотипом; случайными “ошибками” в воспроизведении и экспрессии генетической информации, так как неоднозначность присуща всем матричным процессам; регуляторными механизмами в экспрессии генетической информации.

Апекс растений представляет относительно постоянную для каждого вида и фазы развития популяцию меристематических клеток. Показано, что дифференциация таких клеток у растений осуществляется только в популяциях достаточно определенного размера. Популяция с критическим числом клеток создает градиенты факторов по своему радиусу, локально дифференцирует клетки и располагает их в определенных местах (Бурень, 2005). Соответственно дифференциация клеток меристемы апекса в ответ на градиенты факторов (морфогенов) зависит от их положения в апикальной меристеме как целостной структуре. Очевидно, у мутанта *dfm* флоральная меристема не имеет строго выдержанной организации, необходимой для формирования нормальной структуры цветка второго яруса. Но “если система находится в процессе перестройки морфогенетических связей, естественно ее ответ на любые воздействия не вполне предсказуем” (Черданцев, 2003). А поскольку у мутанта развивающаяся система флорального апекса находится в процессе перестройки морфогенетических связей вследствие мутации гена *DFM*, то, очевидно, этим можно объяснить спонтанную онтогенетическую изменчивость фенотипического проявления мутации “недетерминированное развитие флоральной меристемы” у *P. somniferum* L.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Астауров Б.Л. Исследование наследственного изменения гальтеров у *Drosophila melanogaster* Schin. // Журн. эксперим. биологии. Сер. А. 1927. Т. 3. Вып. 1–2. С. 1–61.

Беляева Р.Г. Генетическое изучение мутации махровость у растений с монокарпическим побегом // Генетика. 1995. Т. 31. № 5. С. 674–677.

Беляева Р.Г. Феногенетическое изучение флоральной гомеозисной мутации лепесток-чашелистик // Онтогенез. 1997. Т. 28. № 6. С. 433–436.

Беляева Р.Г., Андреев В.С., Кузнецов А.И. и др. Генетический контроль морфогенеза цветка у мака снотворного. 2. Феногенетический анализ мутации “пыльник в лепестке” // Генетика. 1983. Т. 19. № 8. С. 1313–1321.

Бурень В.М. Возникновение организмов и происхождение их видов. СПб.: ПРОФИ-ИНФОРМ, 2005. С. 52–67.

Ежова Т.А., Склярова О.А. Гены, контролирующие структуру соцветия, и их возможная роль в эволюции // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 6. С. 462–470.

Инге-Вечтомов С.Г. Роль генетических процессов в модификационной изменчивости. Пророчество Б.Л. Астаурова // Там же. 2005. Т. 36. № 4. С. 274–279.

Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. СПб.: Наука, 2000. 530 с.

Невкрытая Н.В., Андреев В.С., Беляева Р.Г. и др. Развитие цветка мутантных пистиллоидных растений мака. 1. Особенности морфогенеза. 2. Развитие и строение пистиллодиев // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 1. С. 72–86.

Черданцев В.Г. Морфогенез и эволюция. М: Тов-во науч. изданий КМК, 2003. 355 с.

Barton M. Leaving the meristem behind: regulation of KNOX genes // Genome Biol. 2001. V. 2. № 1. P. 1–3.

Baum D. The evolution of plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 1998. V. 1. P. 79–86.

Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin I., Meyerowitz E.M. The *CLAVATA* and *SHOOTMERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis* // Development. 1996. V. 122. P. 1567–1575.

Doebly J., Lukens L. Transcriptional regulators and the evolution of plant form // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 1075–1082.

Ha C.-H., Kim G.-T., Kim B.-C. et al. The *BLADE-on-PETIOLE* gene controls leaf pattern formation through regulation of meristematic activity // Development. 2003. V. 130. P. 161–172.

Jackson D., Veit B., Hake S. Expression of maize *KNOTTED 1* – related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot // Ibid. 1994. V. 120. P. 405–413.

Lenhard M., Jurgens G., Laux T. The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation // Ibid. 2002. V. 129. P. 3195–3206.

Peng J., Richards D.E., Hartley N.M. et al. “Green revolution” genes encode mutant gibberellin response regulators // Nature. 1999. V. 400. P. 256–261.

Schoof H., Lenhard M., Haecker A. et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes // Cell. 2000. V. 100. № 6. P. 635–644.

Theissen G., Becker A., Di Rosa A. et al. A short history of *MADS*-box genes in plant // Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 115–149.

The Floral Meristem Undetermination Mutation in *Papaver somniferum* L.: Spontaneous Phenotypic Variation in Ontogeny

R. G. Belyaeva

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

Abstract—A new morphogenetic mutation of the shoot, floral meristem undetermination, was found in *Papaver somniferum* L. with monocarpic shoot. The expression of the *DFM* (determination of floral meristem) gene, which limits the proliferative activity of stem cells in the floral meristem, was affected. The mutation displayed spontaneous phenotypic instability in ontogeny, variation in the mutant character expression on different flowers of the same plant in the same genotypic environment. The mutation phenotype varied from no expression or formation of individual phyllomes in the center of the primary ovary to formation of a new flower and a new capsule with viable seeds.

Key words: genetics of plant development, flower morphogenesis, modifications, variation.