

УДК 575.16:581.44:573.22

## НОВЫЙ ДЕЛЕЦИОННЫЙ МУТАНТ *apetala1-20 Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup>

© 2008 г. У. Н. Ондар, Ч. Х. Ву\*, Т. А. Ежова\*

Тувинский государственный университет

667000 Кызыл, ул. Ленина, д. 36

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: arabidopsis2004@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.08 г.

Окончательный вариант получен 05.05.08 г.

Идентифицирован новый делеционный аллель гена *APETALA1 (AP1)*, играющего важную роль в инициации цветения и развитии органов околоцветника у *A. thaliana* и кодирующего MADS-белок типа II. Выпадение у мутанта *ap1-20* семи аминокислот в консервативном районе К-домена приводит к существенной задержке цветения и к менее выраженному нарушению развития венчика, чем у аллелей *ap1-3* и *ap1-6* с низкой и средней экспрессивностью соответственно. В то же время у *ap1-20* в отличие от аллелей *ap1-3* и *ap1-6* выявлена существенная редукция тычинок. Эти данные свидетельствуют о том, что К-домен белка AP1 может играть важную роль в инициации цветения и регуляции экспрессии генов В-класса, контролирующих развитие тычинок.

*Ключевые слова:* развитие цветка, ген *APETALA1*, мутанты, *Arabidopsis thaliana*.

Ген *APETALA1 (AP1)* играет ключевую роль в инициации цветения у *A. thaliana*, активируя транскрипцию гена *LEAFY*, контролирующего развитие флоральных меристем (Irish, Sussex, 1990; Mandel et al., 1992; Weigel, Meyerowitz, 1994). Кроме того, гены *AP1* и *AP2* регулируют развитие околоцветника в соответствии с ABC-моделью морфогенеза цветка (Weigel, Meyerowitz, 1994). При нарушении активности гена *AP1* наблюдается задержка цветения; цветки мутантов *ap1* сохраняют признаки побегоподобности: вместо чашелистиков развиваются листья (брактей), в пазухах которых формируются цветки второго порядка, которые в свою очередь могут образовывать цветки третьего порядка и т.д. Венчик у мутантов с высокой и средней экспрессивностью не развивается или состоит из листо- или тычинкоподобных органов (Irish, Sussex, 1990; Bowman et al., 1993).

Ген *AP1* кодирует MADS-белок типа II с доменами MADS, I, K и C. Анализ трансгенных растений, содержащих в геноме слитые гены разной конструкции, показал, что функциональная специфичность *AP1* определяется MADS- и I-доменами (Krizek, Meyerowitz, 1996). Роль K- и C-доме-

нов в функционировании белка AP1 исследована пока недостаточно. Изучение мутаций в разных доменах белка AP1 может способствовать лучшему пониманию его структурно-функциональной организации. Цель работы – изучение фенотипического проявления и молекулярной структуры мутантного аллеля *ap1-20* из коллекции кафедры генетики МГУ. Для сравнения использовали также мутанты *ap1-3* и *ap1-6* с низкой и средней экспрессивностью.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали мутант линии К-200 из коллекции кафедры генетики МГУ с изменением структуры цветка (Янушкевич, 1985). Ранее были проведены скрещивания мутанта из этой линии с мутантом *ap1-1* (маркерная линия *tm1R* из коллекции Института генетики растений, Гатерслебен, Германия). Все гибриды F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> имели аномальные цветки, характерные для мутантов по гену *AP1*, т.е. был установлен аллелизм мутации из линии К-200 с мутацией *ap1-1*, и мутация была названа *ap1-20*.

Происхождение аллеля неизвестно, поэтому для описания его морфологии мутантную линию К-200 многократно скрещивали с растениями расы Dijon-M из линии К-1. В работе использовали

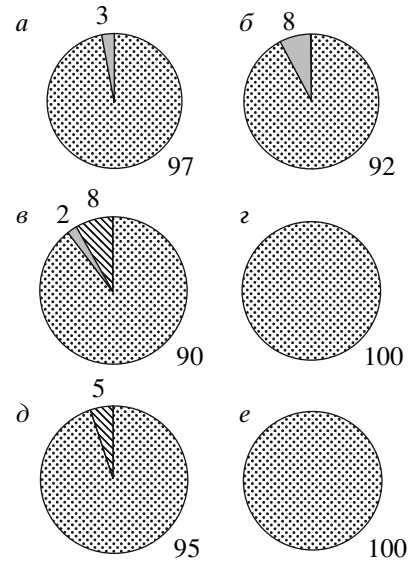
<sup>1</sup>Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 07-04-01515а) и Федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект НШ-4202.2008.4).

также мутанты *ap1-3* и *ap1-6* из коллекции Arabidopsis Biological Resource Centre (ABRC). Растения выращивали в оранжерее и лабораторных установках при температуре 22–26°C. Для устранения влияния мутации *er* на фенотипы мутантов *ap1-3* и *ap1-6* (получены на основе линии Lansberg egesta) их скрещивали с расой Dijon-M и проводили отбор в потомстве поколений F<sub>2</sub> и F<sub>3</sub> высоких растений.

Морфометрическое описание цветков *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-20* проводили по мере их созревания на растении согласно критериям, принятым ранее для *A. thaliana* (Bowman et al., 1993), – отдельно для нижних цветков главного цветоноса (с 1-го по 5-й) и цветков, расположенных выше (6–10-е, в тексте названы верхними цветками). Для съемок использовали цифровой фотоаппарат “Minolta”, США. При изучении влияния мутаций на время зацветания рассматривали связанные с этим показателем признаки (число листьев розетки, число вегетативных узлов цветоноса и длину вегетативной части побега) у мутантов *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-20*.

Детальное исследование органов и тканей проводили с помощью микроскопа СЭМ S-405A (“Hitachi”, Япония). Материал фиксировали в 4%-ном глютаральдегиде на 0.025 М фосфатном буфере (рН 7.0) при температуре 4°C в течение 18 ч. Затем образцы опускали в 2%-ный осмий (OsO<sub>4</sub>) на ночь, три раза промывали фосфатным буфером, обезвоживали серией спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70% – не более чем 10–15' и 80 и 96% – по два раза 30') и переносили далее в 100%-ный ацетон на 30'. Материал проводили через critical point dry (т.е. высушивали проведением возгонки жидкой фазы в газообразную при высоких давлении и температуре). Структуры прикрепляли к столикам и напыляли смесью палладия и платины в ионном напылителе IB-3 (“Eiko”, Япония) слоем 15 нм.

Выделение ДНК проводили по известной методике (Dellaporta et al., 1983) с модификациями. Последовательности праймеров подбирали при помощи программы “Web primer” (<http://genome-www2.stanford.edu/SGB/web-primer>). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали полимеразы Taq и Pfu (в соотношении 1 : 100) (“Силекс”, Россия). Секвенирование последовательностей ПЦР-продуктов выполнено в Межинститутском центре коллективного пользования “Геном”.

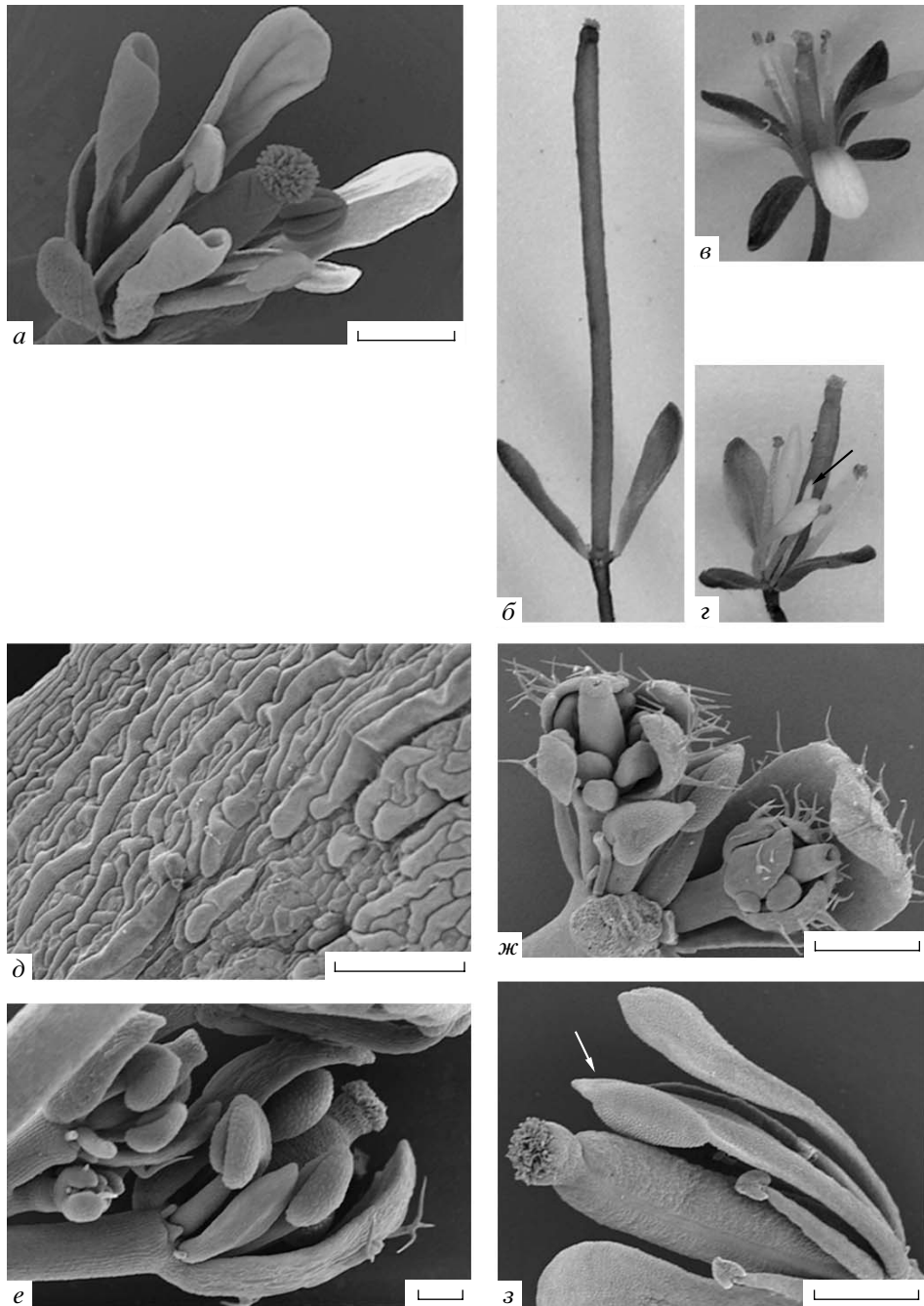


**Рис. 1.** Относительное содержание органов разного типа в наружной мутовке нижних (а, в, д) и верхних (б, з, е) цветков мутантов *ap1-6* (а, б), *ap1-3* (в, з) и *ap1-20* (д, е), %. (▨) – листья и брактей, (■) – плодolistико-подобные листья и брактей, (▨) – филаменты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические особенности мутантных растений *ap1-20*.** Как и другие аллельные мутанты, *ap1-20* формировал фертильные цветки с нарушениями структуры околоцветника – изменением типа органов и уменьшением их числа. Основным типом органов в наружной мутовке, где у растений дикого типа развиваются чашелистики, у мутанта *ap1-20* были листоподобные органы, которые составляли от 95 до 100% от всех органов внешней мутовки (рис. 1; 2, а–з). В отличие от чашелистиков листоподобные органы характеризовались задержкой старения и не опадали даже после развития стручка (рис. 2, б–з). На листоподобных органах (как и на листьях розетки и стебля) обнаружены вильчатые трихомы (чашелистики лишены трихом или имеют простые трихомы) (рис. 2, е, ж). Листоподобные органы мутанта *ap1-20* часто показывали химерное строение: наряду с типичными для листьев эпидермальными клетками они имели участки с продолговатыми исчерченными клетками, характерными для чашелистиков (рис. 2, д).

В наружной мутовке цветков мутантов *ap1-3* и *ap1-6* чашелистики также не развивались, и преобладали листоподобные органы (рис. 1), кроме того, здесь обнаружены филаменты (8% от всех органов в нижних цветках *ap1-3*) и плодolistико-подобные листья, а также и брактей (3 и 8% в нижних и верхних цветках *ap1-6* соответственно, рис. 1). Для всех



**Рис. 2.** Цветки мутанта *ap1-20*.

Цветки дикого типа (*a*) и с одного растения мутанта *ap1-20* разного возраста (с 1-го по 3-й в соответствии с порядком распускания на главном цветоносе) (*б – г*): в 1-м цветке видны два нестареющих органа и зрелый стручок (*б*); во 2-м – четыре нестареющих органа, четыре лепестка, шесть тычинок и один пестик (*в*); в 3-м – три нестареющих органа, два лепестка и один филаментоподобный лепесток (→), четыре тычинки и один пестик (*г*);

*д – з* – электронно-микроскопические изображения: *д* – эпидермальных клеток наружной части листоподобного органа мутанта, *е* – соцветия мутанта с молодыми цветками и вильчатыми трихомами на листоподобных органах наружной мутовки, *ж* – двух цветков второго порядка, развивающихся в пазухах листоподобных органов цветка первого порядка, гинецей цветка первого порядка удален; на переднем плане видны филамент и две тычинки цветка первого порядка, одна тычинка удалена, на заднем плане – два листоподобных органа с вильчатыми трихомами, в пазухах которых развиваются новые цветки; *з* – цветка мутанта с нормальным гинецеем, двумя нормальными лепестками, одной лепестко-тычинкой (→) и двумя редуцированными тычинками. Масштаб: *a* – 600, *д* – 120, *е* – 100, *ж*, *з* – 400 мкм.

мутантов характерно уменьшение числа органов внешней мутовки. Вместо четырех органов (чашелистиков у дикого типа) у *apl-3* и *apl-6* развивается в среднем менее одного органа (от 76 до 85% органов редуцировано, таблица<sup>2</sup>). У *apl-20* в нижних цветках чаще развивалось по два органа, а в верхних – по одному (редуцировано 59 и 74% органов, таблица). Изредка встречались цветки с тремя–четырьмя органами (рис. 2, в, з). В пазухах листовидных органов у *apl-20*, как и у других мутантов, развивались цветки следующего порядка (рис. 2, ж), причем среднее число цветков, приходящихся на одну цветоножку, у мутанта *apl-20* выше, чем у *apl-3* и *apl-6* (таблица). Этот факт может быть связан с менее значимой редукцией числа органов внешней мутовки у мутанта *apl-20* (таблица).

Существенная редукция органов наблюдалась и в мутовке II, причем уровень редукции был примерно одинаковым у всех мутантов (таблица). В то же время выявлена специфичность по типу развивающихся органов: у мутанта *apl-3* до 33% органов (в верхних цветках) развиваются как лепестки, а 30–67% – как филаменты (в нижних и верхних цветках соответственно). В нижних цветках *apl-3* 38% органов представлены тычинками, а 28% – тычинкоподобными лепестками (рис. 3). Тычинки и тычинкоподобные органы (лепестки и листья) – основной тип органов в цветках мутанта *apl-6* (рис. 3). У мутанта *apl-20* в отличие от *apl-3* и *apl-6* тычинки во второй мутовке не развивались. Лишь 2–15% органов в верхних и нижних цветках *apl-20* соответственно развивались как тычинкоподобные лепестки и наряду с типичными для лепестков эпидермальными клетками содержали ткани тычинок (рис. 2, з; 3). Основным типом органов являлись узкие и филаментоподобные лепестки (рис. 2, в, з); такие лепестки встречались в 98 и 64% случаев в нижних и верхних цветках соответственно (рис. 3, д, е). В верхних цветках 6% органов представлены лепестками обычной формы (рис. 3, е).

По выявленной у *apl-20* тенденции к сохранению нормального типа органов венчика (наличию лепестков и отсутствию тычинок в венчике) эту мутацию можно отнести к мутациям с низкой экспрессивностью. Нетипичным для мутации с низкой экспрессивностью является лишь обнаруженная у *apl-20* высокая степень редукции числа тычинок в мутовке III (в пять–семь раз выше, чем у *apl-6*, и в три–четыре раза выше, чем у *apl-3*,

Число цветков на цветоножку и доля редуцированных органов в мутовках I–IV нижних/верхних цветков дикого типа и мутантов *apl-6*, *apl-3* и *apl-20* *A. thaliana*

Линия	Число цветков на цветоножку	Редуцированные органы в мутовке, %			
		I	II	III	IV
Dijon-M	1.0/1.0	0/0	0/0	0.5/0.3	0/0
<i>apl-6</i>	2.52/2.6	82/80.5	85/83	6.7/7.0	1.0/0.5
<i>apl-3</i>	2.94/1.2	76/85	73.5/85	13.3/10	0*/0
<i>apl-20</i>	4.2/2.6	59/73.9	79/80.7	37/48.5	0*/0

Примечания: для всех линий, кроме *apl-20*, анализировали по 50 нижних и верхних цветков (для *apl-20* – 44 верхних цветка); \* в нижних цветках изредка наблюдали развитие дополнительных плодolistиков (менее 1% у *apl-20* и около 2% – у *apl-3*).

таблица). У мутантов *apl-3* и *apl-6* наблюдали лишь незначительное снижение числа тычинок (от 7 до 13% редуцированных органов, таблица), которое можно объяснить влиянием генетиче-

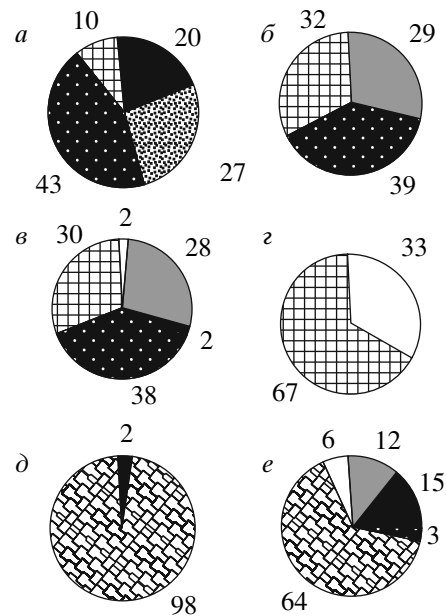


Рис. 3. Относительное содержание органов разного типа во второй мутовке нижних (а, в, д) и верхних (б, з, е) цветков мутантов *apl-6* (а, б), *apl-3* (в, з) и *apl-20* (д, е), %. (■) – лепестки, (□) – лепесткоподобные листья, (▣) – тычинкоподобные листья, (▤) – тычинкоподобные лепестки, (▥) – тычинки, (▧) – узкие и филаментоподобные лепестки.

<sup>2</sup> Полученные в нашей работе количественные характеристики строения цветка у мутантов *apl-3* и *apl-6* существенно отличаются от приведенных ранее (Vowman et al., 1993) большей степенью редукции органов и экспрессивности мутантных признаков, что связано с другим генетическим фоном и иными условиями выращивания растений.



ления этой делеционной мутации. По времени зацветания аллель *ap1-20* характеризуется большей экспрессивностью, чем аллели *ap1-3* и *ap1-6*. В то же время по особенностям развития венчика аллель *ap1-20* характеризуется меньшей экспрессивностью мутантных признаков, чем *ap1-3* и *ap1-6*, которые по фенотипическому проявлению относят к аллелям с низкой и средней экспрессивностью соответственно (Bowman et al., 1993).

Более выраженное сохранение типа органов венчика у мутанта *ap1-20* (развитие лепестков и отсутствие тычинкоподобных органов), по-видимому, можно объяснить тем, что мутация не вызывает нарушения активности доменов MADS и I, которые наиболее значимы для определения функциональной специфичности белка AP1 (Krizek, Meyerowitz, 1996).

В отличие от мутантов *ap1-3* и *ap1-6*, у которых развитие репродуктивных органов практически не нарушено, аллель *ap1-20* характеризуется значительной редукцией числа тычинок. У других аллельных мутантов нарушения развития органов третьей мутовки также не наблюдали. Лишь у мутанта *ap1-1* с высокой экспрессивностью мутантного признака отмечена некоторая редукция тычинок (Bowman et al., 1993). Ранее показано, что белок AP1, содержащий MADS-домен, связывается с промотором гена *AP3*, активируя его экспрессию (Hill et al., 1998; Tilly et al., 1998). Можно предполагать, что существенная редукция числа тычинок и органов видоизмененного околоцветника у мутанта *ap1-20* может быть связана с нарушением этой функции белка AP1. Делеция 21 нуклеотида в аллеле *ap1-20* приводит к выпадению семи аминокислот в высококонсервативном районе K2 К-домена, который предположительно участвует в белок-белковых взаимодействиях (Yang et al., 2003). В делетированный участок входят два гидрофобных лизиновых остатка, которые, по результатам исследований гомологов AP1 риса, играют важную роль во взаимодействии с другими белками (Moon et al., 1999). По-видимому, для эффективной регуляции транскрипции гена *AP3* белок AP1 должен взаимодействовать (при участии домена K2) с другим белковым корегулятором. Следует отметить, что мутанты *ap1-1* и *ap1-3* также имеют изменения в районе К-домена (изменения нуклеотидной последовательности гена *AP1* у мутанта *ap1-6* не исследовали). У мутантов *ap1-1* и *ap1-3* выявлены нарушения в акцепторных сайтах сплайсинга. У *ap1-3* мутация произошла в 5-м интроне (Mandel et al., 1992; рис. 4), что, по-видимому, может нарушать структуру са-

мого терминального конца района K3 (всего три аминокислоты) К-домена, поэтому такая мутация может приводить лишь к незначительным нарушениям функции К-домена. У *ap1-1* мутация произошла в 3-м интроне (Mandel et al., 1992; рис. 4). Можно предполагать, что у мутантов *ap1-1* полностью нарушена структура районов K2 и K3, но частично сохраняется функция района K1 К-домена. Редукция числа органов третьей мутовки у аллелей с нарушением функции К-домена указывает на его важную роль в функционировании *AP1* как регулятора гена В-класса *AP3*.

*Авторы благодарят Г.Н. Давидовича и А.Г. Богданова за помощь в получении фотоизображений растений.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Янушкевич С.И.* Использование арабидопсис в практических занятиях по общей генетике. М.: Изд-во МГУ, 1985. 62 с.
- Bowman J.L., Alvarez J., Weigel D. et al.* Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes // *Development*. 1993. V. 119. P. 721–743.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.* A plant DNA miniprep- aration: version II // *Plant Mol. Biol.* 1983. Rep. 1. P. 19–21.
- Hill T.A., Day C.D., Zondlo S.C. et al.* Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3* // *Development*. 1998. V. 125. P. 1711–1721.
- Irish V.F., Sussex I.M.* Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 741–753.
- Krizek B.A., Meyerowitz E.M.* Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ-identity proteins // *Plant Biol.* 1996. V. 93. P. 4063–4070.
- Mandel M.A., Gustafson-Brown C., Savidge B. et al.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* // *Nature*. 1992. V. 360. P. 273–277.
- Moon Y.-H., Kang H.-G., Jung J.-Y. et al.* Determination of the motif responsible for interaction between the rice *APETALA1/AGAMOUS-LIKE9* family proteins using a yeast two-hybrid system // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. P. 1193–1203.
- Tilly J.J., Allen D.W., Jack T.* The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects // *Development*. 1998. V. 125. P. 1647–1657.
- Weigel D., Meyerowitz E.M.* The ABCs of floral homeotic genes // *Cell*. 1994. V. 78. P. 203–209.
- Yang Y., Fanning L., Gack T.* The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins *APETALA 3* and *PISTILLATA* // *Plant J.* 2003. V. 33. P. 47–59.

## A New *Arabidopsis thaliana* Deletion Mutant *apetala1-20*

U. N. Ondar<sup>a,b</sup>, H. T. Vu<sup>n</sup>, and O. P. Soldatova

<sup>a</sup> Moscow State University, Vorob'evy Gory, 119992 Russia

<sup>b</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Tyva State University, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia

e-mail: arabidopsis2004@mail.ru

**Abstract**—A new deletion allele of the *APETALA1* (*API*) gene encoding a type II MADS-box protein with the key role in the initiation of flowering and development of perianth organs has been identified in *A. thaliana*. The deletion of seven amino acids in the conserved region of the K domain in the *ap1-20* mutant considerably delayed flowering and led to a less pronounced abnormality in the corolla development compared to the *ap1-3* and *ap1-6* alleles with low and medium expression, respectively. At the same time, a considerable stamen reduction has been revealed in *ap1-20* as distinct from *ap1-3* and *ap1-6* alleles. These data indicate that the K domain of AP1 can be crucial for the initiation of flowering and expression regulation of B-class genes controlling stamen development.

*Key words:* flower development, *APETALA1* gene, mutants, *Arabidopsis thaliana*.