

УДК 575.16:581.44:573.22

## РАЗЛИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *APETALA1* НА РАЗВИТИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ В ЦВЕТКАХ МУТАНТА

*abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.<sup>1</sup>

© 2011 г. У. Н. Кавай-оол, Е. В. Куприянова\*, Т. А. Ежова\*

Тывинский 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](mailto:arabidopsis2004@mail.ru)

Поступила в редакцию 19.10.09

Окончательный вариант получен 25.02.10

Ген *A. thaliana APETALA1 (AP1)* кодирует белок MADS-белок типа II с доменами MADS, I, K и C. Роль K- и C-доменов в функционировании белка AP1 исследована недостаточно. Анализ фенотипического проявления мутаций, нарушающих активность разных доменов белкового продукта, позволяет получать информацию о функции доменов, а, значит, и о структурно-функциональной организации гена. Нами проведено изучение влияния на морфологию цветка мутанта *abr* (аллель гена *ABRUPTUS/PINOID*) мутантных аллелей гена *AP1*, белковые продукты которых предположительно лишены функционально активного домена K (*ap1-20*), доменов K и C (*ap1-1* и *ap1-6*), домена C (*ap1-3*). Обнаружено, что в отличие от *ap1-20*, аллели *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-1* приводят к редукции числа генеративных органов в цветках двойных мутантов *abr ap1-3*, *abr ap1-6* и *abr ap1-1*. Высказано предположение, что C-домен белка AP1 предотвращает нарушение детерминации типа репродуктивных органов при эктопической экспрессии гена *AP1* во внутренних мутовках цветка мутанта *abr*.

**Ключевые слова:** развитие цветка, взаимодействие генов *APETALA1* и *ABRUPTUS/PINOID*, мутанты, *Arabidopsis thaliana*.

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие органов цветка – сложный процесс, который начинается с этапа детерминации типа органов и следующего за ним этапа разметки их положения (Скрябин и др., 2006). У модельного растения *A. thaliana* тип органов цветка определяется экспрессирующимися в перекрывающихся участках флоральной меристемы гомеозисными генами ABC-классов. Продукты генов A-класса *APETALA1* и *APETALA2 (AP1 и AP2)* детерминируют развитие чашелистиков и, взаимодействуя с продуктами генов B-класса *APETALA3* и *PISTILLATA (AP3 и PI)*, – лепестков. Ген C-класса *AGAMOUS (AG)* детерминирует репродуктивные органы внутренних мутовок, причем при развитии тычинок белок AG взаимодействует с белками AP3 и PI (Соен, Meyerowitz, 1991).

Ген *AP1* кодирует MADS-ген типа II, продукт которого содержащие домены MADS, I, K и C (Mandel et al., 1992). Функциональная специфич-

ность белка AP1 в регуляции развития органов околоцветника определяется главным образом MADS- и I-доменами, причем MADS-домен участвует в связывании с ДНК и, вместе с I-доменом, в димеризации MADS-белков. Домены K и C также важны для функционирования AP1, хотя их роль менее ясна (Krizek, Meyerowitz, 1996). K-домен участвует в димеризации ряда MADS-белков и/или стабилизации взаимодействия между ними, однако его функция в димеризации AP1 не является обязательной (Riechmann et al., 1996). C-домен белка AP1 в системе *in vitro* проявляет функцию транскрипционного активатора (Cho et al., 1999). Недавно показано также, что C-домен AP1 участвует в образовании комплекса с белками SEUSS (SEU) и LEUNIG (LUG), который репрессирует транскрипцию *AG* в наружных мутовках, обеспечивая нормальное развитие околоцветника (Sridhar et al., 2006).

Место положения органов цветка определяется скоплением локальных концентраций ауксина, которые создаются благодаря активности генов, контролирующих полярный транспорт ауксина, в том числе гена *ABRUPTUS/PINOID*

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований.

(*ABR/PID*), кодирующего серин-треаниновую протеинкиназу (Christensen et al., 2000). Ген *ABR/PID* комплементарно взаимодействует с геном *API* при образовании чашелистиков и лепестков и ограничивает транскрипцию гена *API* органами околоцветника. В цветках мутанта *abr* ген *API* экспрессируется не только в околоцветнике, но и в репродуктивных органах. Цветки двойного мутанта *abr ap1-1* практически не имеют околоцветника и характеризуются существенной редукцией числа репродуктивных органов. Предполагается, что редукция числа тычинок и плодolistиков связана с нарушением определения типа органов во внутренних мутовках из-за эктопической транскрипции мутантного аллеля в репродуктивных органах двойного мутанта (Кавай-оол и др., 2010).

В данной работе продолжено изучение влияния мутантных аллелей гена *API* на развитие репродуктивных органов цветка мутанта *abr* и приведены результаты изучения структуры цветка еще трех двойных мутантов *abr ap1-3*, *abr ap1-6* и *abr ap1-20*. Показано, что редукция репродуктивных органов в цветке не наблюдается только в цветках двойных мутантов, содержащих аллель *ap1-20* с функционально активным С-доменом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Растительный материал и анализ морфологии цветка.* В работе использовали мутанты *abr* (линия К-150, полученная на основе расы Dijon-M) и *ap1-20* (линия К-200) из коллекции кафедры генетики МГУ, а также мутанты *ap1-3* и *ap1-6* из коллекции *Arabidopsis* Biological Resource Centre (<http://arabidopsis.org/abrc/>), которые трижды скрещивали с растениями расы Dijon-M для получения однородного генотипического фона. Двойные мутанты, получали от скрещиваний мутанта *abr* с растениями аллельных мутантов *ap1-20*, *ap1-3* и *ap1-6*. Анализ проводили на 5-ти нижних цветках растений двойных мутантов поколений F<sub>3</sub>–F<sub>5</sub>, выращенных в условиях теплицы. Среднее число органов цветка рассчитывали на выборке из 10 растений, анализируя с 1-го по 5-й цветки на главном цветonoсе. Сканирующее электронное микроскопирование проводили как описано ранее (Ондар и др., 2008).

### *Анализ последовательности ДНК и кДНК гена API у мутанта ap1-6*

Выделение ДНК проводили из соцветий дикого типа и мутанта *ap1-6* (по Dellaporta et al., 1983, с модификациями). Для амплификации ДНК использовали следующие праймеры: 5'-GCTCAT-TGATGGACTCGTACA-3', 5'-СТТАТТГСАСТ-GAGTCCGA-3'. Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной обработкой ДНКазой с помо-

щью RNase-Free DNase Set (Qiagen, Германия). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15Т праймером (Silex, Россия). Для выявления альтернативно сплайсированных форм проводили ПЦР-анализ полученной кДНК с использованием следующей пары праймеров: 5'-САТСТ-ТСТТГАТАСАГАССАССАТ-3' и 5'-ГТАТАА-САГГСТТААГГСТААГАТТГАГ-3'.

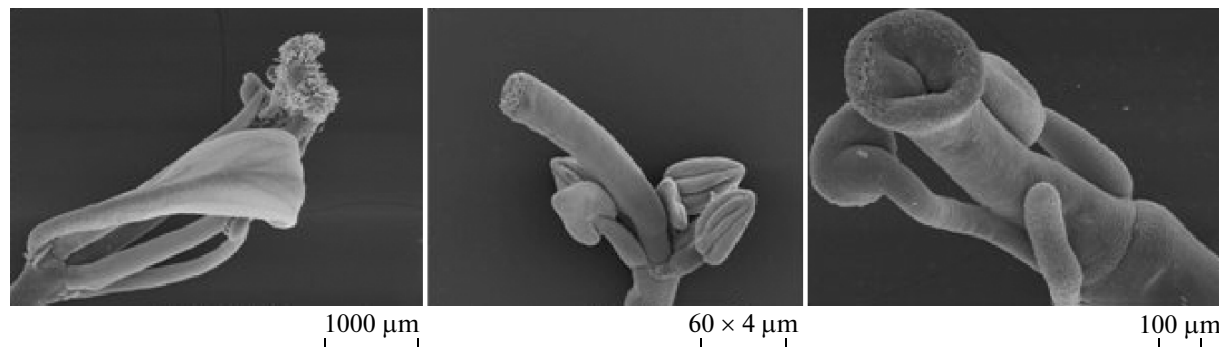
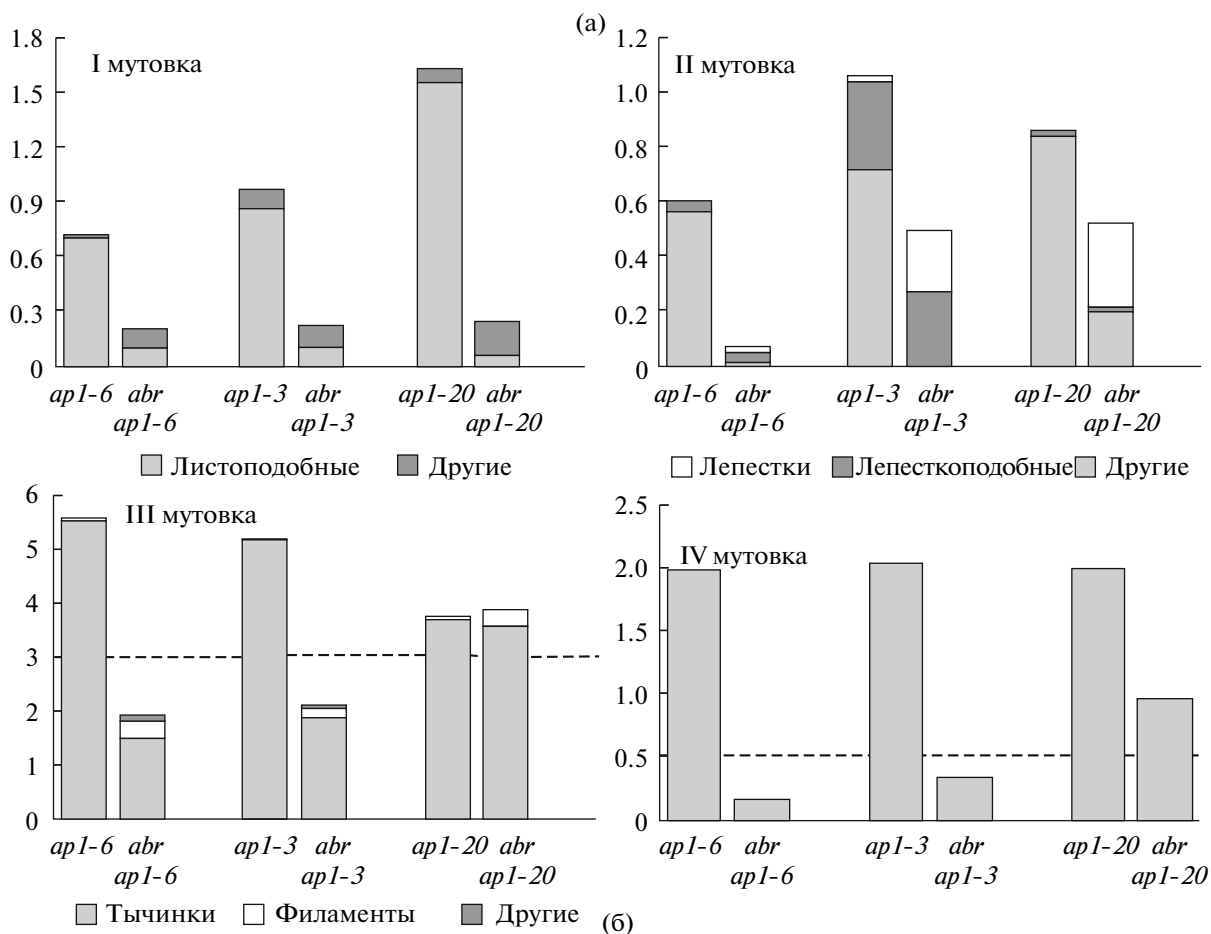
Положение праймеров указано на рис. 2. Продукты ПЦР анализировали в агарозном геле (рис. 3) Анализ проводили в 2-х повторностях. Полученные после амплификации фрагменты ДНК и кДНК очищали, клонировали в рAL-TA вектор и далее секвенировали. Секвенирование последовательностей клонированных ПЦР-продуктов проводилось в ЦКП "Геном".

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цветки исходных одиночных мутантов характеризуются изменением числа органов околоцветника. В цветках мутанта *abr* среднее число чашелистиков ниже (3.0), а лепестков – выше (5.3), чем у дикого типа (по 4 органа в I и II-ой мутовке). Мутанты *ap1-3*, *ap1-6* и *ap1-20* имели сниженное число органов во I-ой и II-ой мутовках (рис. 1а). В цветках двойных мутантов редукция органов околоцветника, которые были представлены в основном листьями и брактеями (как и у одиночных мутантов *ap1*), выражена сильнее, чем в родительских формах (рис. 1а). Эти данные находятся в соответствии с выявленной ранее редукцией органов околоцветника у двойного мутанта *abr ap1-1* (Кавай-оол и др., 2010) и подтверждают вывод о комплементарном взаимодействии генов *API* и *ABR/PID* в контроле развития околоцветника.

Отметим, что во II-ой мутовке у всех двойных мутантов среди единичных органов преобладали лепестки и лепесткоподобные органы, доля которых была выше, чем у исходных одиночных мутантов (рис. 1а). Даже у ранее исследованного *abr ap1-1* лепестки, которые вообще не развивались у одиночного мутанта *ap1-1*, составляли 16% от всех органов (рис. 1б). Эти данные свидетельствуют о частичном восстановлении в цветках двойного мутанта функции определения типа органов околоцветника гена *API*, которое связано главным образом с функциональной активностью MADS и I доменов (Krizek, Meyerowitz, 1996; Riechmann et al., 1996) и, по-видимому, объясняется выявленным ранее усилением экспрессии этого гена при нарушении работы гена *ABR* (Кавай-оол и др., 2010).

Наиболее интересные отличия между двойными мутантами наблюдали по числу репродуктивных органов. Как и у ранее изученного мутанта *abr ap1-1*, у *abr ap1-3* и *abr ap1-6* наблюдали редукцию числа тычинок и плодolistиков не только по сравнению с мутантами *ap1* (у *ap1-20* несколь-

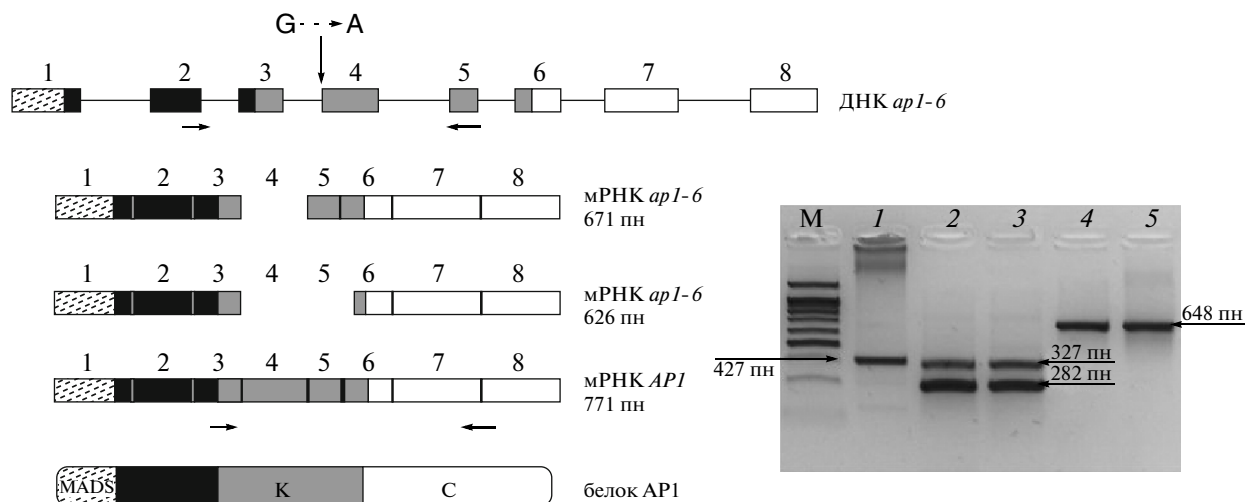


**Рис. 1.** Структура цветка двойных и одиночных мутантов *A. thaliana*.  
*a* – Среднее число и тип органов цветка в I–IV мутовках у одиночных и двойных мутантов. Пунктиром на нижних рисунках обозначено среднее число органов в цветках мутанта *abr*. В IV мутовке показано число плодolistиков.  
*б* – Цветки двойных мутантов: слева *abr ap1-1* (виден нормально развитый лепесток, аномальный пестик и 3 тычинки), в центре *abr ap1-20* (околоцветник отсутствует, 5 тычинок, пестик из 2-х плодolistиков) и справа *abr ap1-6* (филаментоподобный орган, 2 тычинки и аномальный пестик).

ко снижено число тычинок по отношению к дикому типу, у *ap1-3* и *ap1-6* редукции репродуктивных органов не наблюдается), но и по сравнению с мутантом *abr* (рис. 1а, б). Наименьший уровень редукции наблюдали у двойных мутантов по мягкому аллелю *ap1-3*, средний – по аллелю *ap1-6*, а наибольший выявлен ранее (Кавай-оол и др., 2010) по аллелю с самой высокой экспрессивностью (жесткому аллелю) *ap1-1*. В отличие от *abr ap1-1*, *abr ap1-3* и *abr ap1-6*, в цветках мутанта *abr*

*ap1-20* число репродуктивных органов было даже несколько выше (3.8 тычинок и 0.96 плодolistиков), чем у мутанта *abr* (в среднем, 3 тычинки и 0.5 плодolistиков). Очевидно, разное влияние мутантных аллелей гена *AP1* на развитие репродуктивных структур цветка связано с их структурными особенностями.

Аллели *ap1-1* и *ap1-3* имеют мутации в акцепторных сайтах сплайсинга в 3 и 5-м экзонах соответственно (Mandel et al., 1992), что, по-видимо-



**Рис. 2.** Структура аллеля *ap1-6* и кодируемых им альтернативно сплайсированных форм мРНК.

Положение мутации *ap1-6* в геномной копии гена (вверху, стрелка) и образующиеся у мутанта *ap1-6* формы мРНК. Под ними – мРНК и белок AP1 из растений исходной линии Ler. Горизонтальными стрелками показано положение праймеров для амплификации ДНК и кДНК. Разными цветами показаны участки гена и мРНК, кодирующие разные домены белка. Справа показана электрофореграмма продуктов амплификации кДНК. М – маркер молекулярного веса; 1 – кДНК дикого типа, 2,3 – кДНК *ap1-6*; 4 – ДНК дикого типа Ler; 5 – ДНК *ap1-6*.

му, приводит к нарушению функции К и С доменов у мутанта *ap1-1* и С-домена у *ap1-3*. Мутант *ap1-20* имеет делецию 7 аминокислот в К-доме; функция С-домена у него не затронута (Ондр и др., 2008). Природа мутации *ap1-6* не известна. Поэтому нами проведен анализ последовательности ДНК и кДНК у этого мутанта. Как и у *ap1-1*, у мутанта *ap1-6* выявлено нарушение в акцепторном сайте сплайсинга 3-го интрона (рис. 2): наблюдается замена динуклеотида АГ на АА, приводящая к нарушению правила сплайсинга ГТ/АГ. Анализ кДНК показал наличие у мутанта *ap1-6* двух альтернативно сплайсированных форм (размеры амплифицированных фрагментов составили 327 и 282 пн), отсутствующих у дикого типа (один фрагмент 427 пн, рис. 2).

Секвенирование клонированных фрагментов показало, что у более протяженной формы кДНК отсутствует 4-й экзон, а у короткой формы – 4-й и 5-й экзоны и короткая последовательность GAG от 6-го экзона. Нуклеотидные последовательности, соответствующие эксонам 6–8, есть у обеих форм кДНК, однако из-за отсутствия 4-го экзона происходит сдвиг рамки считывания (вместе с двумя последними нуклеотидами 3-го экзона первый нуклеотид 4-го экзона составляет один триплет). Стоп-кодон при обоих вариантах сплайсинга образуется раньше на 42 нуклеотида. С учетом участков кДНК, соответствующих доменам MADS и I, которые не амплифицировались при использовании наших праймеров, общий размер альтернативно сплайсированных форм мРНК должен составлять 626 и 671 пн (полноразмерная мРНК *AP1* дикого типа имеет размер 771 пн).

Т.о. мРНК мутанта может транслироваться с образованием форм белка, которые кодируют домены MADS и I, а также часть К-домена. Образование функционального С-домена в результате сдвига рамки считывания невозможно.

Таким образом, *ap1-20* отличается от *ap1-1*, *ap1-3* и *ap1-6* нормально функционирующим С-доменом. Следовательно, именно в этом структурном различии аллелей кроется причина различий по числу репродуктивных органов, которые обнаружены у двойных мутантов. В растениях *35S::AP1*, эктопически экспрессирующих ген *AP1* во всех мутовках, морфогенез цветка не нарушен, и развитие репродуктивных органов происходит нормально. При эктопической экспрессии в III и IV мутовках цветка мутанта *abr* аллеля *ap1-20* с делецией в К-доме развитие репродуктивных органов также практически не нарушено. В то же время, эктопическая экспрессия аллелей *ap1-1*, *ap1-3* и *ap1-6*, общим для которых является отсутствие функционирующего С-домена, приводит к существенной редукции числа репродуктивных органов у двойных мутантов.

Согласно предсказаниям математической модели, описывающей развитие цветка *A. thaliana* (Скрябин и др., 2006), определение типа органов цветка предшествует разметке их будущих позиций. Можно предполагать, что отсутствие С-домена у мутантов *ap1-3*, *ap1-1* и *ap1-6* нарушает детерминацию типа органов в репродуктивной части цветка, а значит и разметку их будущих позиций, что является причиной редукции числа репродуктивных органов. Наличие функционального С-домена в белке AP1 (у аллелей дикого типа и *ap1-20*) предотвращает нарушение процес-

са детерминации тычиной и плодолистиков при эктопической экспрессии во внутренних мутовках мутанта *abr*.

Недавно установлено, что С-домен белка AP1 обеспечивает взаимодействие с белком SEU, который в свою очередь взаимодействует с транскрипционным репрессором LUG. Образовавшийся белковый комплекс подавляет транскрипцию гена *AG* в органах околоцветника, где *AP1* в норме экспрессируется (Sridhar et al., 2006). В растениях *35S::AP1* развитие репродуктивных органов происходит нормально, несмотря на транскрипцию *AP1* во всех мутовках (Gustafson-Brown et al., 1994; Mandel, Yanofsky, 1995), т.е. репрессии *AG* не наблюдается. Присутствие репрессорной активности комплекса AP1/SEU/LUG только в наружных мутовках цветка объясняют тем, что в 3 и 4 мутовках существуют антогонисты, препятствующие осуществлению этой репрессии. В качестве таких антогонистов могут выступать активаторные белки, которые поддерживают необходимый для нормального развития репродуктивной сферы уровень транскрипции *AG* (Sridhar et al., 2006). Проведенное в нашей работе сравнение разных аллелей гена *AP1* свидетельствует о том, что ограничение функционирования репрессорного комплекса AP1/SEU/LUG в III и IV мутовках может быть связано с взаимодействиями С-домена белка AP1 с другими белками, разрушающими или дестабилизирующими комплекс AP1/SEU/LUG.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кавай-оол У.Н., Карпенко О.Ю., Ежова Т.А. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *APETALA1* в

- регуляции развития цветоноса *Arabidopsis thaliana*. Генетика. 2010. № 3 (в печати).
- Ондар У.Н., Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala 1-20 Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 6. С. 430–436.
- Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. № 5.
- Christensen S.K., Dagenais N., Chory J., Weigel D. Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID // Cell. V. 2000. № 100. P. 469–478.
- Cho S., Jang S., Chae S. et al. Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana APETALA1* as a transcription activation domain // Plant Mol. Biol. 1999. V. 40. P. 419–429.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // Nature. 1991. V. 353. P. 31–37.
- Gustafson-Brown C., Savidge B., Yanofsky M.F. Regulation of the arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1* // Cell. 1994. V. 76. P. 131–143.
- 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.
- 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.
- Mandel M.A., Yanofsky M.F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* // Nature. 1995. V. 377. P. 522–524.
- Riechmann J.L., Wang M., Meyerowitz E.M. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS // Nucleic Acids Research. 1996. V. 24. № 16. P. 3134–3141.
- Sridhar V.V., Surendrarao A., Liu Z. APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development // Development. 2006. V. 133. P. 3159–3166.

## Different Action of the *APETALA1* Gene on the Development of Reproductive Organs in Flowers of the *abruptus* Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

U. N. Kavai-ool<sup>a, b</sup>, E. V. Kupriyanova<sup>c</sup>, and T. A. Ezhova<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Tyva State University, Department of General Biology, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia

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

<sup>c</sup> Moscow State University, Department of Genetics, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119992 Russia

e-mail: arabidopsis2004@mail.ru

**Abstract**—The *APETALA1* (*AP1*) gene of *A. thaliana* codes type II MADS protein with domains MADS, I, K, and C. The role of K- and C-domains in the functioning of AP1 protein is poorly investigated. The analysis of phenotypic manifestation of mutations disrupting the activity of various domains of the protein product allows us to obtain information on the function of domains and, thereby, on the structural-functional organization of the gene. We investigated the action of mutant alleles of the *AP1* gene whose protein products are probably lacking the functionally active domains K (*ap1-20*), K- and C-domains (*ap1-1* and *ap1-6*), and C-domain (*ap1-3*) on the flower morphology in *abr* mutant (the *ABRUPTUS/PINOID* gene allele). It was detected that, unlike the *ap1-20* allele, the presence of *ap1-3*, *ap1-6*, and *ap1-1* alleles results in reduction of a number of the generative organs in the flowers of the double mutants *abr ap1-3*, *abr ap1-6*, and *abr ap1-1*. It was suggested that C-domain of the AP1 protein prevents the alteration of determination of the type of reproductive organs at ectopic expression of the *AP1* gene in the inner whorls of a flower in the *abr* mutant.

**Keywords:** floral development, interaction between the *APETALA1* and *ABRUPTUS/PINOID* genes, mutants, *Arabidopsis thaliana*