

ГЕННЫЕ МУТАЦИИ И РЕКОМБИНАЦИИ КАК ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ: ПОЛУЧЕНИЕ МУЛЬТИМУТАНТНЫХ ЛИНИЙ АРАБИДОПСИСА С ПРИЗНАКАМИ, ВЫХОДЯЩИМИ ЗА РАМКИ СЕМЕЙСТВЕННОСПЕЦИФИЧЕСКИХ

По Н.И.Вавилову [1, с. 10] «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-перекресников также инцухт (инбридинг). Для широко используемого в генетических исследованиях модельного объекта арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh.), как естественно инбредного вида, эффективными методами выявления генетического полиморфизма являются поиски необычных форм в природных популяциях и индуцированный мутагенез. Для этой же цели пригоден и метод гибридизации мутантных линий с последующим отбором в расщепляющихся популяциях. Так можно получить мультимутантные растения, которые по нескольким признакам выходят за рамки родо- и семейственноспецифических. 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 по рецессивным генам *apl-1*, *bp-1*, *clv1-1* и *gll-1*. Семена этих линий получены нами из Ноттингемского центра образцов арабидопсиса (NASC, (UK)) [3]. В качестве материала для создания мультимутантной линии генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* были использованы тройные мутанты по рецессивным генам *bp-1*, *clv1-1*, *gll-1* и *apl-1*, *bp-1*, *gll-1*, полученные ранее в Луганском НАУ ассистентом кафедры биологии растений Сигидиненко Л.И. и аспирантом Медведь О.М. соответственно [4, 5]. Описанные здесь мутации являются генными. Заметим, что три- и тетрамутантные линии, строго говоря, являются тетра- и пентамутантными – все они несут также в гомозиготном состоянии рецессивный аллель *er*. Исходные мономутанты гомозиготны по этому аллелю, поскольку все получены на генетической основе линии *Landsberg erecta* (генотип *erer*). Растения выращивали в почвенной культуре в лаборатории светокультуры на кафедре биологии растений Луганского НАУ. Путем скрещивания тройных мутантов и последующего отбора в F₃ была получена мультимутантная линия, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм. Изображения получали с помощью цифрового фотоаппарата Canon A630.

Результаты и обсуждение

Для получения тетрамутантной линии *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* в качестве родительских форм были использованы тройные рецесивы *Brevipedicellus, Clavata, Glabra* (генотип *bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1*) и *Apetala, Brevipedicellus, Glabra* (генотип *apl-1apl-1bp-1bp-1gll-1gll-1*). Ради компактности генетических формул далее вместо символа аллели *apl-1* будем использовать мнемоническое обозначение *apl*, вместо *gll-1* просто *gll*, вместо *clv1-1* просто *clv1* и взамен *bp-1* просто *bp*. Генотип P₁ – *Ap1Ap1bpbpclv1clv1gllgll*, генотип P₂ – *aplapl1bpbpClv1Clv1gllgll*. Генотип F₁ от скрещивания родительских линий –

Ap1ap1bpbpClv1clv1gllgll. В F₁ наблюдается полное доминирование признаков дикого типа (*ap1*<*Ap1*, *clv1*<*Clv1*): цветки растений с лепестками обычного белого цвета; плоды – стручки. Цветки и плоды почти без цветоножек и плодоножек, стручки повернуты вниз; волоски на листьях и стеблях отсутствуют, поскольку родители гомозиготны по рецессивным аллелям *bp* и *gll*.

Ген *API* расположен локусе 99 первой хромосомы. Ген *CLV1* расположен в первой хромосоме, локус 110 [6]. Расстояние между этими генами составляет 11 сМ, то есть процент кроссинговера равен ~ 11. Если расстояние между генами значительно меньше 50 сМ, гены считаются сцепленными (локализованными в одной хромосоме) [7]. Таким образом, гены *API* и *CLV1* сцеплены. По этой причине в F₂ будет наблюдаться отклонение от независимого распределения. Гены *BPI* и *GLI* расположены в разных хромосомах, а именно *BPI* в локусе 15 четвертой хромосомы, *GLI* в локусе 46 третьей хромосомы. По этой причине в F₂ наблюдалось их независимое распределение [6]. Далее расщепление рассматривается без участия генов *BPI* и *GLI*. Для выяснения ожидаемой частоты встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* провели теоретические расчеты. Ожидаемая частота встречаемости растений фенотипа «цветки без лепестков, плоды – коробочки» в F₂ приведена в табл.

Таблица

Расщепление по фенотипу в F₂

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%

Ожидаемая частота встречаемости растений генотипа *ap1ap1clv1clv1* в F₂ составляет 0.3% (3 растения из 1000) (табл.). На практике это означает, что для выделения растений с таким генотипом необходимо высадить минимум 5 ящиков, что очень обременительно. Для упрощения выделения растений с генотипом *ap1ap1clv1clv1* можно пойти другим путем, а именно выделить интересующий нас генотип и фенотип в F₃. Среди особей с лепестками и коробочками (*API-clv1-lclv1-l*) около 20% (0.048/0.246) такие, что в F₃ будут расщепляться (лепестки – без лепестков). Среди особей без лепестков и со стручками (*ap1-lap1-lCLV1-l*) тоже около 20% (0.048/0.246) таких, что в F₃ будут расщепляться (стручки – коробочки).

В ящике, где выращивали F₂, 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 F₃ из 14 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 3 семьях (рядах). Из 28 семей (рядов) расщепление ожидается в ~ 6 семьях. Фактически в семье *ap1-l* расщепление было обнаружено в 2-х семьях с числом особей в них равным 6 (фенотип – «цветок без лепестков, плод – коробочка»). В семье *clv1-l* расщепление было обнаружено в 3-х семьях с числом особей в них равным 5 с аналогичным фенотипом.

Таким путём в результате скрещивания и последующего отбора был получен новый тетрамутантный рекомбинант генотипа *ap1-lap1-lbp-lbp-lclv1-lclv1-lgll-lgll-l*. Новая линия имеет такой фенотип: растения без лепестков; короткие цветоножки и плодоножки, плоды повернуты вниз; плод – четырёхгнездная коробочка; волоски на розеточных листьях и стеблях отсутствуют (рис.).



Рис. Тетрамутантная линия *apl-1, bp-1, clv1-1, gl1-1*

а – розеточные листья голые; *б* – цветки без лепестков, почти без цветоножек, стебель слабо развит; *в* – соплодие состоит из сближенных плодов почти без плодоножек, плоды по-разному ориентированы в пространстве; *г* – вскрывшийся плод, представляющий собой коробочку; *д* – поперечный срез сформировавшегося плода в его верхней части. Пояснения: 1) одно деление шкалы на рис. *г* соответствует 0.5 мм.

Созданная нами новая мультимутантная линия имеет теоретический и практический интерес. Она пригодна для генетико-селекционных исследований. Получение новой линии способствует решению задач по картированию генов. Тетрамутантная линия может быть объектом для изучения совместного плейотропного действия мутантных аллелей на количественные признаки. Наконец, она может быть использована для облегчения поддержания коллекции мутантных аллелей. Одну линию легче поддерживать, чем четыре исходные линии.

Особый интерес привлекают выходящие за рамки семейственно-специфических изменения признаков, вызываемые влиянием аллелей *apl-1* и *clv1-1*. У представителей сем. *Brassicaceae* плоды стручки или стучочки, редко орешки [8, 9]. У растений *A. thaliana* линии *apl-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* в результате действия аллеля *clv1-1* 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 генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gl1-1gl1-1* под действием аллеля *apl-1* количество чашелистиков варьирует от 1 до 4, а лепестков в подавляющем большинстве цветков вообще нет. Наконец, под влиянием аллеля *apl-1* 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].

Полученная мультимутантная линия *A. thaliana* генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gl1-1gl1-1* 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 *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* несомненно относится к *A. thaliana* [10].

Выводы

1. Путем скрещивания тройных мутантов, последующего отбора в F₃ и размножения была получена мультимутантная линия генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1*, которая объединила в себе мутантные признаки родительских форм.
2. Синтезированная новая тетрамутантная линия пригодна для исследований в различных областях современной генетики, в том числе для решения задач по картированию генов.
3. Тетрарецессив *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* облегчает работу по сохранению генофонда (мутантных аллелей) *A. thaliana*.
4. Морфологические признаки мультимутантной линии генотипа *apl-1apl-1bp-1bp-1clv1-1clv1-1gll-1gll-1* входят в противоречия с описаниями *A. thaliana* во флорах, определителях, атласах.
5. Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* определенно выходят за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственноспецифических) признаков.

Литература

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. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Линнеевский вид как система – Л.: Наука, 1967. – С. 91.
3. *Seed List*. The Nottingham Arabidopsis Stock Centre. – Nottingham: The University of Nottingham, 1994. – 147p.
4. Сигидиненко Л.И., Шелихов П.В. Синтез тримутантных линий арабидопсиса *bp-1, ch5-1, gll-1; bp-1, clv1-1, gll-1; ch5-1, clv1-1, gll-1* // Збірник наукових праць Луганського НАУ. – 2004. – №39 (51). – С. 18-20.
5. Медведь О.М., Соколов И.Д. Морфологические особенности тримутанта *apl-1, bp-1, gll-1 Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. (в печати).
6. Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 220 с.
7. Соколов И.Д., Шелихов П.В., Соколова Т.И. *та інші*. Генетика. Практикум. – Київ: Арістей, 2003. – 176с.
8. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений. В 6-ти т. – М.: Просвещение, 1980. – Т. 5. Ч. 1. – 430 с.
9. Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. – М. – Л.: Наука, – 1966. – 611с.
10. Соколов И.Д., Сыч Е.И., Медведь О.М. Морфологическая генотипическая изменчивость *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в связи с типологической концепцией вида. – Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2006. – Т.3. – С. 53-57.

Резюме

Мутационные изменения у тетрамутантного рекомбинанта *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* определенно выходят за рамки диагностических (видо-, родо- и семейственноспецифических) признаков.

Мутаційні зміни у тетрамутантного рекомбінанту *apl-1, bp-1, clv1-1, gll-1* безумовно виходять за рамки діагностичних (видо-, родо- і родинноспецифічних) ознак.

Tetramutant rekombinant of *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* certainly have mutational changes beyond diagnostic (species-, genera- and familyspesific) attributes.

ЦВЕТОВА М.И.¹, ЭЛЬКОНИН Л.А.¹, ИШИН А.С.²

¹ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: elkonin@mail.saratov.ru

²ФГНУ Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы, 410010 Саратов, пос. Зональный; e-mail: rossorgo@yandex.ru

ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ АУТОТЕТРАПЛОИДОВ СОРГО, ИНДУЦИРОВАННЫХ КОЛХИЦИНОМ

У большинства изученных видов растений в зиготе содержится диплоидный, а в гаметах гаплоидный набор хромосом и соответствующее им количество ДНК. Постоянство числа хромосом – один из фундаментальных признаков вида, обеспечивающих сохранение генетической информации в ряду поколений, по крайней мере, у амфимиктичных видов растений.

В то же время многочисленными исследованиями показано, что у многих видов растений в ходе онтогенеза возникает миксоплоидия - наличие клеток с различающимися числами хромосом [1]. В данной работе речь идёт об изменении чисел хромосом в клетках апикальных меристем, из которых в процессе онтогенеза формируются генеративные органы и гаметы. Это явление отлично от мультипликации или редукции генома или частей генома, связанных с клеточной дифференциацией.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что возникновение миксоплоидии связано с нарушениями клеточного цикла у растительных форм, произошедших в результате гибридогенеза и полиплоидизации [1,2]. Мы наблюдали нестабильность числа хромосом в потомстве аутотетраплоидов, индуцированных колхицином у константного отселектированного сортообразца сорго и полустерильной линии, полученной с использованием культуры *in vitro*.

Материал и методы

Исследованы аутотетраплоиды линий Н-3366/2-тетра, полученной на основе сортообразца Негритянское кремово-бурое к-3366/2 и АС-1-30, которая является потомством одного растения из линии АС-1, происходящей из каллуса, полученного от метёлки полностью стерильного растения из F₂ гибрида [А1]Саратовское-3/С-752 [3]. Тетраплоиды индуцированы путём колхицинирования апикальных меристем проростков [4].

В скрещиваниях использованы линии со стабильной цитоплазматической мужской стерильностью: [А2]КВВ-181, [9Е]Желтозёрное-10, [А4]Желтозёрное-10 и [А3]Фетерита-14. Метелки растений до начала цветения тщательно изолировали пергаментными изоляторами.

Пыльцу анализировали на временных препаратах, окрашенных раствором йодистого калия; диаметры пыльцевых зёрен (ПЗ) измеряли с помощью окуляр-микрометра. Подсчёт хромосом проводили в корневых меристемах, зафиксированных в ацето-алкоголе (1:3) после предобработки в растворе α-монобромнафталина и окрашенных ацето-гематооксилином.

Результаты и обсуждение

В поколении С₅ среди аутотетраплоидов линии Н-3366/2-тетра, которые отличаются уменьшенной по сравнению с исходной линией высотой, крупными колосковыми чешуями и низкой озёрнёностью метёлок, было выделено растение НТ-12, которое отчётливо выделялось высотой и полностью озёрнённой метёлкой.