

На правах рукописи

МИЛЮКОВА НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**РОЛЬ МУТАЦИИ *LANCEOLATA* В
ФОРМИРОВАНИИ ЛИСТА ТОМАТА**

Специальность 03.00.15 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена на кафедре генетики Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Соловьев Александр Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент

Ежова Татьяна Анатольевна

доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Мамонов Евгений Васильевич

Ведущая организация:

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится «__» _____ 2008 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.10 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49, Ученый совет РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева; тел/факс: (495)-976-08-94

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан «_18_» ноября 2008г.
и размещен на сайте <http://www.timacad.ru>

Ученый секретарь
диссертационного совета

Е.А. Калашникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Формирование листа у растений – один из важных процессов, является основополагающим в жизнедеятельности растения и определении его продуктивности. Понимание генетического контроля формирования листа имеет большое значение для программированного создания растений с заданными признаками.

Томат обладает широкой изменчивостью листа, представленного множеством вариантов размера и степени рассеченности. Это делает его уникальным модельным объектом для изучения морфогенеза листа, и прежде всего для исследования проблемы формирования листьев разной степени рассеченности.

Одним из основных генов, участвующих в морфогенезе листа, является ген *Lanceolata*. В гетерозиготном состоянии он отвечает за формирование простого нерассеченного листа. Несмотря на известные структуру и функции исследуемого гена, остается неясным как этот ген взаимодействует с другими генами, определяющими разную степень рассеченности листа.

Другим важным аспектом формирования листа является его гормональная регуляция. Изучение взаимосвязи между гормональным статусом растения и степенью рассеченности листа дает более полное представление о механизмах формирования листа. Исследование проявления и взаимодействия гена *Lanceolata* с другими генами имеет важное фундаментальное значение, связанное с пониманием генетических механизмов формирования признаков и их проявления в онтогенезе. **Цель и задачи исследования.** Целью данного исследования являлось изучение роли гена *Lanceolata* в формировании листа томата путем выявления особенностей его взаимодействия с генами, определяющими рассеченный и нерассеченный лист, и выявления связи гормонального статуса растений с разной степенью рассеченности листа.

В задачи исследования входило:

1. Морфологический анализ мутантных по гену *Lanceolata* растений;
2. Выявление взаимосвязи молекулярной организации аллелей гена *Lanceolata* с морфологическим проявлением признака;
3. Генетический анализ наследования признака ланцетный лист;
4. Изучение взаимодействия гена *Lanceolata* с генами, детерминирующими формирование слаборассеченного листа;
5. Изучение взаимодействия гена *Lanceolata* с геном *Mouse ears*, определяющим сильную рассеченность листа;

6. Анализ связи между содержанием эндогенных гормонов (ИУК, АБК, цитокининов, гиббереллинов) и степенью рассеченности листа у растений томата.

Научная новизна. Установлено, что изучаемый ген *Lanceolata*, определяющий формирование на растении нерассеченного цельнокрайнего листа, в гомозиготном состоянии имеет плейотропный эффект, влияя в эмбриогенезе на закладку побеговых апикальных меристем. Это проявляется в морфологических аномалиях, вызванных гомозиготным состоянием изучаемого гена, и проявляемых в отсутствии семядолей и побеговой апикальной меристемы; срастании семядолей и/или изменении структуры листа и побега. Гомозиготное состояние подтверждено молекулярно-генетическим анализом изучаемого локуса. Установлены типы взаимодействий гена *Lanceolata* с другими генами, контролирующими разную степень рассеченности листа. Впервые установлено, что ген *Lanceolata* обладает эпистатическим действием по отношению к генам *entire* и *potato leaf*, отвечающим за слабую рассеченность листа. Впервые показано, что у гибридов F₁ в комбинации скрещивания растений с ланцетным (ген *Lanceolata*) и сильнорассеченным (ген *Mouse ears*) типами листа формирование листовой пластинки обусловлено влиянием обоих генов, эффекты которых проявляются в различной степени у листьев разных периодов онтогенеза. Установлено, что слабая рассеченность листа обусловлена и особым фитогормональным статусом. Впервые показаны достоверные отличия по содержанию эндогенных гормонов у растений томата со слабой и сильной степенью рассеченности листа на разных этапах формирования листовой пластинки, что тесно связано с этапами образования сегментов листа в процессе морфогенеза.

Апробация результатов работы. Основные положения диссертации были представлены на I (IX) Международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006 г.); на Всероссийской выставке научно-технического творчества молодежи (Москва, 2006 г.); Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 2007 г.); Международной научной конференции «Регуляция роста и развития растений» (Республика Беларусь, Минск, 2007 г.); Международной научно-практической конференции «Экспериментальный мутагенез в биологии и селекции растений» (Киров, 2008 г.); на XVI съезде EUCARPIA Meeting Working Group Tomato (Wageningen, The Netherlands, 2008 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 1 – в журнале, рекомендованном ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на __ страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», выводов и списка литературы, включающего ___ источников, в том числе ___ из них на иностранном языке. Работа содержит ___ рисунков, и ___ таблиц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал и условия выращивания. В работе использованы линии из коллекции кафедры генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и Центра генетических ресурсов томата (TGRC, США): Mo 319 (кафедра генетики РГАУ-МСХА) и LA 0882 (TGRC) – мутация *Lanceolata* (*La*) проявляется в виде ланцетного нерассеченного листа; LA 0715 и LA 0790 (оба TGRC) – мутация *Mouse ears* (*Me*) – сильно рассеченный лист; LA 1786 (TGRC) – мутация *potato leaf* (*c*) – число сегментов листа уменьшено; LA 0784 (TGRC) – мутация *entire* (*e*) – слабо рассеченный цельнокрайний лист с искривленной центральной жилкой.

Растения выращивали в теплице кафедры генетики (2006-2007 гг.) и оранжерее Центра молекулярной биотехнологии (2008 г.) РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева в стеллажах и вегетационных сосудах. В течение вегетации уход за растениями проводили в соответствии со стандартными рекомендациями. Гибридизацию и самоопыление растений проводили в утренние или вечерние часы с опылением кастрированных цветков через сутки.

Анализ формы листа у растений F_1 и F_2 проводили по пятому-шестому листу на стадии семи-восьми настоящих листьев (Sinha, 1999; Kessler, 2001).

Цитозэмбриологический анализ проводили на зрелых зародышах, вычлененных из семян от самоопыления образца Mo 319 с использованием микроскопов МБС-10 и Stemi DV4.

Определение содержания гормонов. Для анализа содержания гормонов использовали растения исходных форм с разной степенью рассеченности листа, включая гибриды от скрещивания форм Mo 319 и LA 0715. Отбирали листья из разных частей вегетирующего растения:

1. верхний лист (только начавший свое развитие);
2. средний лист (частично дифференцированный, развивающийся);
3. нижний лист (полностью сформированный, имеющий типичную для генотипа форму).

Навеска растительного материала составила 10 г, опыт проводили в двойной биологической и в двойной химической повторности.

Экстракция, очистка фитогормонов (ИУК, АБК, ЦК, ГА) выполнены по методике, разработанной в лаборатории регуляторов роста и развития с/х растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Скоробогатова И.В. и др., 1999).

Анализ ИУК: ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор флуоресцентный RF-350 (Shimadzu), Em-350 нм, Ex-280 нм, колонка Lichrosorb RP 18, 10 м 4x250 мм. Подвижная фаза - 40%-ный водный раствор метанола, скорость потока 0,7 мл/мин, время удерживания - 8 мин. Идентификацию ИУК проводили сравнением времен удерживания синтетической ИУК (Sigma) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация ИУК составила 4 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Анализ АБК: ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор ультрафиолетовый (модель BT 3030), длина волны 254 нм, колонка Lichrosorb RP 18, 10 м 4x250 мм. Подвижная фаза – 40%-ный водный раствор метанола, скорость потока 0,7 мл/мин, время удерживания АБК 9 мин. Идентификацию АБК проводили сравнением времен удерживания синтетической АБК (Calbiochem) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация АБК составила 10,0 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Анализ цитокининов: ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic), детектор ультрафиолетовый (модель BT 3030), длина волны 268 нм, колонка Lichrosorb RP18, 10 м 4x250 мм. Подвижная фаза: ацетонитрил-вода-уксусная кислота (V/V – 55:44:1), скорость потока 0,7 мл/мин, время удерживания - 15 мин. Идентификацию зеатина проводили сравнением времен удерживания синтетического зеатина (Serva) с природным. Минимальная регистрируемая концентрация зеатина составила 14,0 нг в аликвоте пробы (50 мкл).

Анализ гиббереллинов (ГА₃): определение биологической активности гиббереллинов проводили по росту гипокотилей салата сорта Берлинский. Количественно гиббереллины определяли по калибровочной кривой, для построения которой использовали гибберелловую кислоту.

Исследование молекулярно-генетической структуры локуса *Lanceolata*. Выделение ДНК осуществляли по стандартной методике Fulton et al., 1995). Праймеры, условия амплификации использовали по методике Ori N. et al. (Ori N. et al., 2007). ПЦР-анализ осуществляли на амплификаторе «DNA Engine Tetrad 2» (Bio-Rad, USA). Продукты ПЦР разделяли в 1,5 % агарозном геле. В качестве маркера размеров использовали 100 bp leader (Fermentas). Секвенирование продукта ПЦР выполнено в Центре молекулярной биотехнологии.

Документацию изображений осуществляли с помощью цифровой камеры Olympus. Редактирование изображений осуществляли с использованием программы Adobe Photoshop.

Статистический анализ. Для анализа расщепления F₂ использовали критерий χ^2 (Орлова, 1991); при анализе содержания гормонов применяли дисперсионный анализ с использованием пакета программ AGROS 211.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности проявления мутации *Lanceolata*. Изучаемая мутация *Lanceolata* (*La*, локализован в хромосоме 7, локус 48) фенотипически проявляется в виде простого цельнокрайнего мелкого листа, образованного за счет разрастания одной верхушечной доли. Стебли растений тонкие, сильно ветвятся. Семядоли часто сросшиеся. Плоды мелкие (Бочарникова Н.И., Козлова В.М., 1992; <http://tgrc.ucdavis.edu/Data/Acc/Genes.aspx>). У мутантных по гену *Lanceolata* растений томата боковые доли практически не формируются. Однако в процессе онтогенеза абсолютно нерассеченными остаются только первые 4-5 настоящих листьев (рисунок 1). Более поздние листья имеют слабую рассеченность листовой пластинки, что выражается в наличии одной – двух небольших долей в нижней части листа. В данном случае имеет место онтогенетическая изменчивость признака. Гомозиготы *LaLa* нежизнеспособны, хотя в отдельных случаях образуется гипокотиль с некоторым количеством листовой ткани (Kerstetter R., Hake S., 1997; <http://tgrc.ucdavis.edu/Data/Acc/Genes.aspx>).

В экспериментах обычно используют гетерозиготу.



Рисунок 1 – Ряд онтогенетической изменчивости строения листа у мутации *Lanceolata* – гетерозиготы по этому гену (слева направо – от нижних листьев к верхним).

В нашем исследовании установлено, что жизнеспособность гомозигот *LaLa* может проявляться по-разному. Теоретически в потомстве от

самоопыления гетерозиготных растений Мо 319 должно быть расщепление на растения с листом дикого типа и растения с ланцетным листом в соотношении 1:2 соответственно учитывая, что гомозиготы *LaLa* погибают. Тем не менее, в потомстве выделены формы с нетипичным для растений томата развитием, как проростков, так и взрослых растений. Они объединены в следующие группы:

Первая группа проростков представляет собой удлинённый гипокотиль длиной 2-4 см без семядольных листьев (рисунок 2). Эмбриологический анализ формирования зародыша, выполненный на вычленившихся зародышах, показал, что зародыш имеет нормально развитые зачаточный корешок и гипокотиль, а семядоли и зародышевая почка не формируются. Рост таких растений заключается только в удлинении гипокотыля, который продолжается 2 – 3 недели. В дальнейшем происходит сначала отмирание верхушечной части, а затем погибает все растение.



Рисунок 2 – Фенотип проростков растений группы 1.

Проростки **второй группы** имеют сросшиеся семядоли (рисунок 3) клювовидной формы. У проростков наблюдается срастание семядолей в разной степени:

- незначительное, меньше, чем на 1/3 длины семядолей;
- наполовину длины семядолей;
- полное, либо краями, формируя клювовидную семядолю.

Растения этой группы могут не развиваться, в дальнейшем погибая, или развиваются медленнее растений с ланцетным листом. Взрослые растения могут формировать ланцетный лист аналогично гетерозиготам.



Рисунок 3 – Развитие растений группы 2.

Третья группа растений характеризуется сросшимися одной стороной семядолями с формированием одной семядоли и появлением в дальнейшем

нитевидных структур. Растения этой группы отстают в развитии. У них функционируют пазушные меристемы, из которых развиваются нитевидные побеги с вытянутыми цельнокрайними листьями. У взрослых растений листовая утолщена и усечена по площади. На нитевидных побегах формируются боковые меристемы, из которых развиваются новые побеги (рисунок 4). Растения не переходят к цветению.

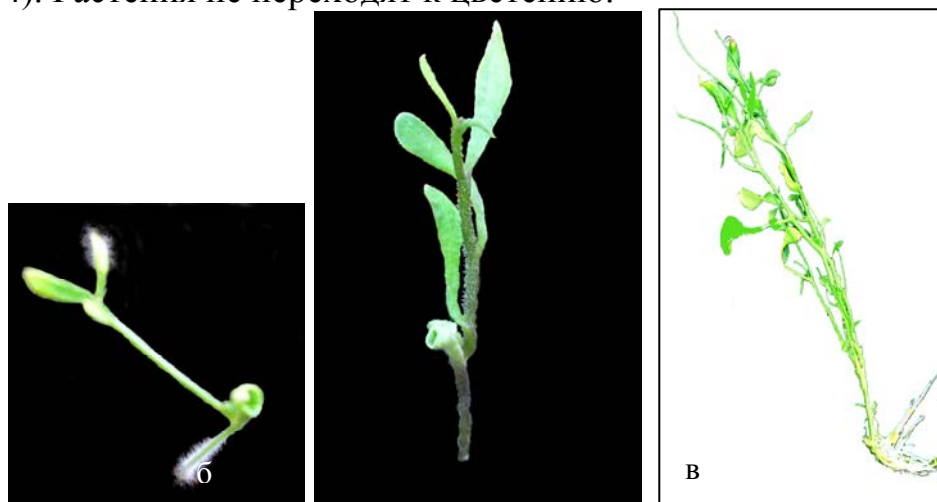


Рисунок 4 – Развитие растений группы 3 (а, б – молодые растения; в – взрослое растение).

Выделенные формы с аномалиями в развитии, особенно в формировании побеговой апикальной меристемы и семядольных листьев, позволяют утверждать, что мутация *Lanceolata* обладает плеiotропным эффектом, то есть определяет развитие не только ланцетного листа, но и влияет на закладку и развитие апикальных меристем у зародышей томата. Исследуемый образец не несет более никаких мутантных генов, что также свидетельствует о плеiotропном эффекте, а не о взаимодействии генов. Исходя из полученных разных вариантов аномалий, можно предположить, что действие гена проявляется на разных этапах эмбриогенеза. При изменении активности гена на ранних этапах эмбриогенеза, вероятно, на стадии глобулы, у растений, гомозиготных по этому гену, происходит блокировка закладки побеговых апикальных меристем и семядолей, вследствие чего развиваются проростки без семядолей. Более поздние изменения активности гена *Lanceolata* приводят к деформациям у проростков в виде сросшихся семядолей, нитевидных структур.

Статистический анализ полностью подтвердил выдвинутую гипотезу о жизнеспособности гомозигот и, соответственно, о плеiotропном действии гена *Lanceolata* (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ наследования типа листа в потомстве от самоопыления формы Мо 319 (доминантная гомозигота жизнеспособна 1:2:1)

Фенотипические классы, генотипы	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение d (p-q)	d ²	d ² /q
		Фактическая (p)	Ожидаемая (q)			
Ланцетный лист <i>Lala</i> (обычный)	0,50	385	414,5	29,5	870,25	2,10
Дикий тип <i>lala</i>	0,25	228	207,25	-20,75	430,56	2,08
Ланцетный лист <i>LaLa</i> (с нарушениями в развитии)	0,25	216	207,25	-8,75	76,56	0,37

$\chi^2_{\text{факт.}} = 4,55$, $\chi^2_{\text{теор (0,05)}} = 5,99$. Гипотеза принимается.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что плейотропное действие мутации *Lanceolata* зависит от гомозиготного состояния гена, а выделенные образцы с нарушениями формирования семядолей побеговых апикальных меристем действительно являются гомозиготами по гену *Lanceolata*.

Для проверки предположения о плейотропном действии гена *Lanceolata* выполнен статистический анализ расщепления, который показал, что выделенные аномалии следует считать гомозиготами.

Секвенирование фрагмента гена *Lanceolata* показало, что выделенные формы с аномалиями действительно являются гомозиготами (рисунок 5).

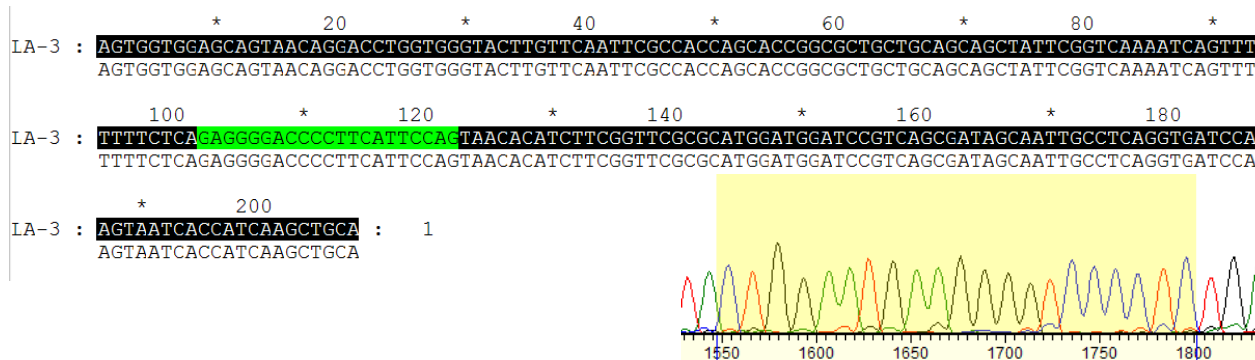


Рисунок 5 – Сиквенс фрагмента гена *Lanceolata* у гомозиготного растения.

Наследование типа листа в комбинации Мо 319 (*La*) × LA 0784 (*e*). Данная комбинация скрещивания растений с нерассеченными листьями характеризовалась проявлением в F₁ ланцетного типа листа и листа дикого типа. При анализе F₂ растения с аномалиями в развитии генотипы *LaLa* выделялись в отдельный фенотипический класс. Также были выделены растения с листом дикого типа, нерассеченным листом с искривленной центральной жилкой (*entire*) и ланцетным листом (*Lanceolata*). Статистический

анализ расщепления F₂ (таблица 2) показал соответствие фактически полученного расщепления теоретическому 8:4:3:1, что указывает на то, что гены взаимодействуют типу доминантного эпистаза с подавлением доминантного аллеля гена *entire* геном *Lanceolata*, то есть в формировании листа у гибрида принимает участие только *Lanceolata*, у гибридов краевые меристемы не функционируют.

Таблица 2 – Анализ наследования формы листа в комбинации Мо 319 (*La*) × LA 0784 (*e*) (расщепление F₂ 8:4:3:1)

Фенотипические классы	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение p-q (d)	d ²	d ² /q
		Фактическая (p)	Ожидаемая (q)			
Ланцетный лист (норма)	0,500	332	316,0	16,00	256	0,81
Ланцетный лист (с нарушениями в развитии)	0,250	129	158,0	-29,00	841	5,32
Нерассеченный лист с искривленной центральной жилкой (<i>entire</i>)	0,063	44	39,5	4,50	20,25	0,51
Дикий тип	0,188	127	118,5	8,50	72,2	0,61

$\chi^2_{\text{факт.}} = 7,26$, $\chi^2_{\text{теор.}(0,05)} = 7,81$. Гипотеза не отвергается.

Наследование типа листа в комбинации Мо 319 (*La*) × LA 1786 (*c*). У гибридных растений F₁ в данной комбинации скрещивания проявились дикий и ланцетный типы листа. С помощью статистического анализа (таблица 3) доказано соответствие полученного расщепления теоретическому 12:3:1 (без учета растений с нарушением в развитии – 8:3:1), то есть взаимодействие генов *Lanceolata* и *potato leaf* происходит, как и в случае комбинации скрещивания с участием мутации *entire*, по типу доминантного эпистаза. Доминантный аллель *C* гена *potato leaf* также не принимает участия в определении рассеченной формы листовой пластинки.

Таблица 3 – Анализ наследования типа листа в комбинации Мо 319 (*La*) × LA 1786 (*c*) (расщепление 8:3:1)

Фенотипические классы	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение p-q(d)	d ²	d ² /q
		Фактическая (p)	Ожидаемая (q)			
Ланцетный тип листа (норма)	0,667	148	155,3	-7,3	53,29	0,34
Дикий тип	0,25	70	58,3	11,7	136,89	2,35
Картофельный тип листа	0,083	15	19,4	-4,4	19,36	1,0

$\chi^2_{\text{факт.}} = 3,69$, $\chi^2_{\text{теор.}(0,05)} = 5,99$ Гипотеза не отвергается.

Наследование типа листа в комбинации Мо 319 (*La*) × LA 0715 (*Me*). В поколении F₁ от скрещивания выявлены растения четырех фенотипических классов:

- 1) растения с листом дикого типа;
- 2) растения с ланцетным листом;
- 3) растения с листом типа мышинные уши;
- 4) растения промежуточного фенотипа, лист которого изначально развивается как ланцетный, а позже у него формируются булавовидные доли.

Наследование формы листа в данной комбинации представлено на рисунке 6.



Рисунок 6 – Проявление типа листа у родительских форм и гибрида F₁ в комбинации скрещивания Мо 319 × LA 0715:

а – лист формы Мо 319, б – лист формы LA 0715, в – гибрид F₁.

Генотипы исходных форм и полученных гибридов будут следующими:

P: *Lalameme* (ланцетный лист) × *lalaMeme* (мышинные уши)

F₁:

MemeLala – растения с листьями промежуточного фенотипа;

temeLala – растения без нарушений в развитии с ланцетным листом;

Memelala – растения с листом мышинные уши;

temelala – растения с листом дикого типа.

Полученные результаты говорят о том, что в скрещивания были взяты гетерозиготы как по гену *Lanceolata*, так и по гену *Mouse ears*. Для исследования были использованы все фенотипы. Результаты расщепления каждого из них соответствовали предполагаемым генотипам.

Фенотип с листьями промежуточного типа свидетельствует, что формирование листовой пластинки обусловлено влиянием обоих генов, эффекты которых проявляются в различной степени у листьев разных периодов онтогенеза. Возможно, что сначала ген *Lanceolata* (влияет на закладку меристем и семядолей еще на стадии зародыша) начинает формировать

крупную центральную долю, а ген *Mouse ears* включается позднее, образуя булавовидные сегменты листа гибрида F₁ (1-2 пары).

Фенотип гибридов F₁ предполагает характер взаимодействия генов *Lanceolata* и *Mouse ears* по типу комплементарности. Следовательно, в F₂ следует ожидать проявление одного из расщеплений по фенотипу 9:3:3:1, 9:3:4, 9:6:1.

Описание фенотипических классов, полученных в F₂ комбинации Мо 319 × LA 0715:

- растения, имеющие различные нарушения развития, описанные в разделе 3.2.1.
- растения с типичным ланцетным листом без нарушений в развитии;
- растения, имеющие лист как у гибрида F₁;
- листовая пластинка сильнорассеченная типа мышинные уши (различие в проявлении гомо- и гетерозиготы по гену *Mouse ears* приводит к появлению сильнорассеченной листовой пластинки двух типов);
- лист дикого типа.

Следует отметить, что формирование листа гибридного типа у растений происходило по-разному. Так боковые доли и искривление центральной жилки (признаки действия гена *Mouse ears*) могли формироваться на более поздних стадиях развития растения, а на момент анализа расщепления (стадия 7-8 настоящих листьев) листовая пластинка была представлена одной центральной долей, но более широкой и крупной, чем у типичного ланцетного листа.

Таблица 4 – Анализ наследования формы листа в комбинации Мо 319 × LA 0715 (расщепление 9:3:2:1:1)

Фенотипические классы	Ожидаемая доля	Численность		Отклонение p-q (d)	d ²	d ² /q
		Фактическая (p)	Теоретическая (q)			
Гибрид <i>La/Me</i>	0,56	504	516,38	-12,38	153,1406	0,30
<i>La</i> (норма)	0,13	143	114,75	28,25	798,0625	6,95
<i>Me</i> (норма)	0,19	155	172,13	-17,13	293,2656	1,70
<i>La</i> (с нарушением в развитии)	0,06	61	57,38	3,63	13,14063	0,23
Дикий тип	0,06	55	57,38	-2,38	5,640625	0,10

$\chi^2_{\text{факт}}=9,28$, $\chi^2_{\text{теор}(0,05)}=9,49$. Гипотеза принимается.

Статистический анализ показал соответствие полученного расщепления теоретически возможному 9:3:3:1 (или 9:3:2:1:1 при выделении в отдельный класс растений с нарушениями развития).

Исходя из вышесказанного, предполагаем генотипы растений F₂ (таблица 5).

Таблица 5 – Возможные генотипы растений F₂ от самоопыления растений промежуточного фенотипа (*LalaMeme*)

	<i>LaMe</i>	<i>Lame</i>	<i>laMe</i>	<i>lame</i>
<i>LaMe</i>	<i>LaLaMeMe</i>	<i>LaLaMeme</i>	<i>LalaMeMe</i>	<i>LalaMeme</i>
<i>Lame</i>	<i>LaLaMeme</i>	<i>LaLameme</i>	<i>LalaMeme</i>	<i>Lalameme</i>
<i>laMe</i>	<i>LalaMeMe</i>	<i>LalaMeme</i>	<i>lalaMeMe</i>	<i>lalaMeme</i>
<i>lame</i>	<i>LalaMeme</i>	<i>Lalameme</i>	<i>lalaMeme</i>	<i>lalameme</i>

	Лист промежуточного типа <i>La/Me</i> (как у гибрида F ₁)
	Ланцетный лист без нарушений в развитии
	Лист типа <i>Mouse ears</i>
	Ланцетный лист с аномалиями развития
	Лист дикого типа

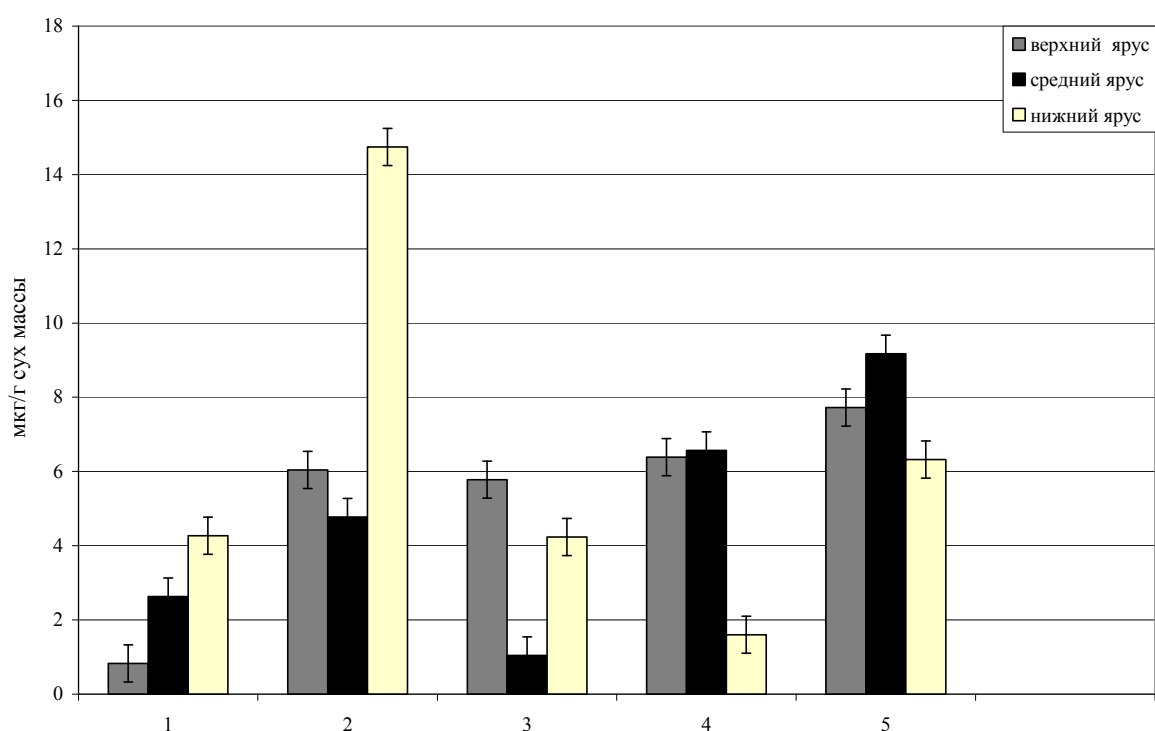
Таким образом, гены *Lanceolata* и *Mouse ears*, определяющие разные типы листа, взаимодействуют по типу комплементарности, осуществляя равный вклад в формирование листовой пластинки гибридного листа. Особенность этого взаимодействия состоит в том, что оба гена могут начинать действовать на разных этапах формирования листа. Этим и объясняется различие гибридных растений по степени искривления центральной жилки, количеству и времени появления дополнительных долей, размеру долей.

Причем, очевидно, что эффект гена *La* в гомозиготном состоянии значительно снижается в присутствии в генотипе доминантного аллеля *Me*. Генотипы *LaLaMe-*, не имеют значительных нарушений в формировании меристем и семядолей, хотя, возможно, их развитие происходит медленнее. Таким образом, гены *Lanceolata* и *Mouse ears*, определяющие разные типы листа, осуществляют равный вклад в формирование листовой пластинки гибридного листа. Особенность этого взаимодействия состоит в том, что оба гена могут начинать действовать на разных этапах формирования листа. Этим и объясняется различие растений F₂ по морфологии листовой пластинки.

Для дальнейшей проверки гипотезы о дигенном наследовании формы листа гибрида *La/Me* было проведено самоопыление растений F₂ с типичным ланцетным, гибридным и сильнорассеченным листом, выделенных из F₂. Полученное расщепление поколения F₃ и его статистический анализ подтвердил высказанные ранее предположения.

Изучение содержания гормонов в листьях томата различного типа рассеченности. В результате исследования было выяснено, что содержание в листьях ауксинов и абсцизовой кислоты ниже порога чувствительности прибора. Низкое содержание АБК может быть объяснено тем фактом, что на растениях для исследования отбирали молодые и функционально активные листья. Содержание ауксина не удалось определить, возможно, из-за малого объема имеющегося растительного материала. Содержанием в листьях сухого вещества достаточно мало, поэтому необходимо иметь большее количество растений для отбора проб.

Результаты определения гиббереллинов и цитокининов приведены на рисунках 7, 8.



1 – нерассеченный лист (*Lanceolata*), 2 – сильнорассеченный лист (*Mouse ears*), 3 – слаборассеченный лист (*potato leaf*), 4 – лист дикого типа, 5 – лист гибрида F1 Мо 319×LA 0715 (*La/Me*)

Рисунок 7 – Содержание гиббереллинов в листьях томата разной степени рассеченности.

По графикам видно, что растения как с менее рассеченным, так и с более рассеченным по отношению к дикому типу листом имеют отличную от контроля динамику изменения эндогенного содержания цитокининов и гиббереллинов. Это указывает на то, что в мутантных растениях реализуется несколько иная программа формирования листовой пластинки.

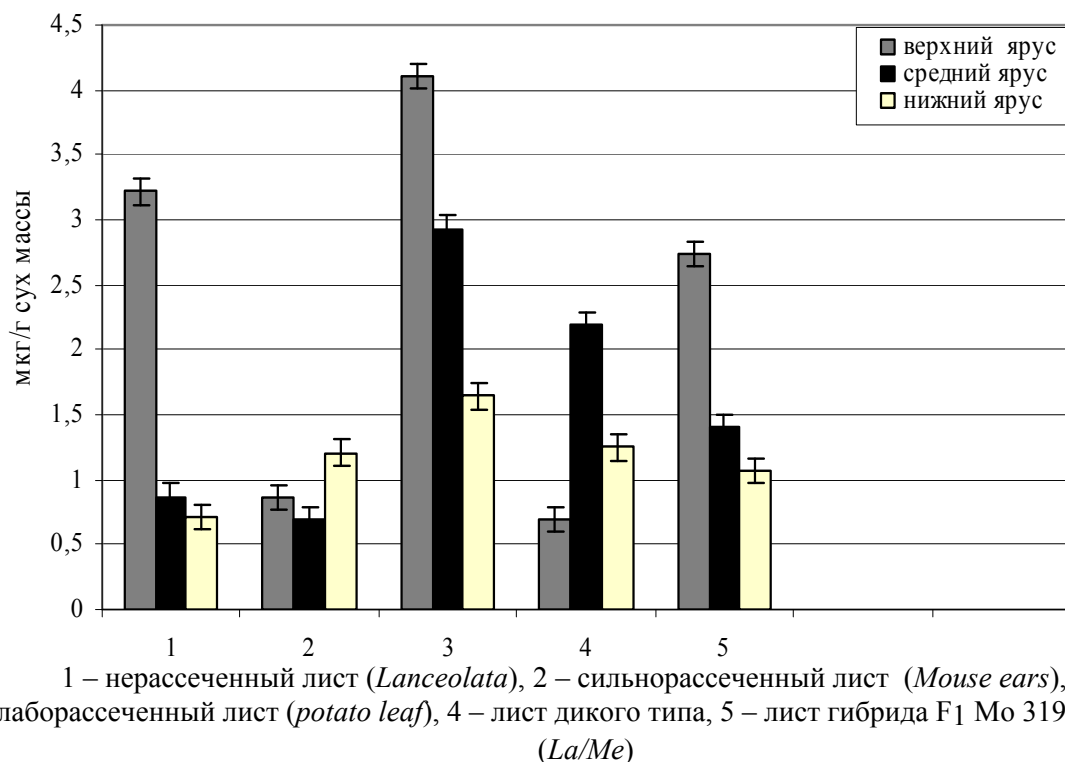


Рисунок 8 – Содержание цитокининов в листьях томата разной степени рассеченности.

Проанализируем содержание гиббереллинов. Сравнение мутаций *La* – с нерассеченным листом, и *Me* – с сильнорассеченным листом свидетельствует о разном гормональном статусе этих генотипов. Для мутации *Mouse ears* характерно высокое содержание гиббереллинов, для мутации *Lanceolata* наоборот – пониженное. В среднем и верхнем ярусах у растений с нерассеченным листом содержание гиббереллинов значительно возрастает, что вполне закономерно, т.к. продолжается равномерный рост клеток и формирование характерной ланцетной формы листа. У сильнорассеченного листа в среднем ярусе происходит некоторое снижение уровня гиббереллинов, поскольку идет формирование сегментов, а возрастание содержания гормона на более поздних этапах развития можно объяснить продолжающимся активным ростом зрелого листа. Динамика содержания гиббереллинов в листьях гибридных растений в целом отлична от таковой у форм *La* и *Me*. Возрастание содержания этого гормона в среднем ярусе может быть связано с образованием центральной крупной доли листа и образованием сегментов на более поздних этапах.

Начальное содержание цитокининов в *La*-листе выше, чем у гибридного и сильнорассеченного листа, но снижение их содержания происходит в большей степени, чем у гибридного, что опять же связано с неразвитием боковых долей. Тогда как у гибридного листа в среднем ярусе содержание цитокининов остается на достаточно высоком уровне, предполагая возможность образования

сегментов. Для сильнорассеченных листьев характерно некоторое повышение уровня цитокининов в нижней части растения. В данном случае образование сегментов листа происходит с самых ранних этапов органогенеза и до конца развития.

ВЫВОДЫ

1. Ген *Lanceolata* в гомозиготном состоянии обладает плеiotропным эффектом на закладку побеговой апикальной меристемы и формирование семядолей, что проявляется в морфологических аномалиях меристем, семядолей и листьев.
2. Анализ последовательности фрагмента гена *Lanceolata* подтвердил гомозиготное состояние по данному локусу растений с нарушением формирования меристем, которые являются гомозиготами по данному гену. Растения с ланцетным листом по изучаемому локусу являются гетерозиготами.
3. При взаимодействии с генами, вызывающими слабую рассеченность листа, ген *Lanceolata* является определяющим, подавляя проявление доминантных аллелей других генов.
4. Проявление гена *Lanceolata* модифицируется при объединении его в одном генотипе с другим доминантным геном *Mouse ears*, отвечающим за формирование сильнорассеченного листа. Формирование листовой пластинки обусловлено влиянием обоих генов, эффекты которых проявляются в различной степени у листьев разных периодов онтогенеза.
5. Слабая рассеченность листа обусловлена особым гормональным статусом. Растения со слабой и сильной степенью рассеченности листа отличаются по содержанию гормонов, что тесно связано с закладкой и формированием сегментов листа в процессе морфогенеза.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Милюкова Н.А.**, Скоробогатова И.В., Чикало А.О., Соловьев А.А. Роль мутации *Lanceolata* в формировании листа томата. // **Известия ТСХА**, №3. – Москва, 2008. – С. 72-80.
2. Чикало А.О., **Милюкова Н.А.** Изучение проявления мутации томата *Lanceolata* // Материалы I (IX) Международной конференции молодых ботаников. – Санкт-Петербург, 2006. С. 218.
3. **Милюкова Н.А.**, Скоробогатова И.В. Некоторые генетические и морфофизиологические эффекты мутации томата *Lanceolata* // Материалы Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства». – Москва, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2007. – С. 143-145.
4. **Милюкова Н.А.**, Скоробогатова И.В., Соловьев А.А. Оценка генетических и физиологических эффектов мутации томата *Lanceolata* // Материалы V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». – Минск, 2007. – С. 141.
5. **Милюкова Н.А.** Мутация томата *Lanceolata*: генетические и физиологические особенности проявления, эффекты взаимодействия с другими генами, контролирующими тип листа// Том «Структурная биология». – Петрозаводск, 2008. – С. 281-283.
6. Соловьев А.А., **Милюкова Н.А.** Коллекция мутантов томата в изучении генетики развития листа// Материалы Международной научно-практической конференции «Экспериментальный мутагенез в биологии и селекции растений». – Киров, 2008. – С. 56-57.
7. **Milyukova N.A.**, Soloviev A.A. The role of *Lanceolata* gene in tomato leaf form development // XVI EUCARPIA Meeting Working Group Tomato – Wageningen, The Netherlands. – P. 68.

Отпечатано с готового оригинал-макета

Объем п.л.

Зак. _____

Тираж 100 экз.

Центр оперативной полиграфии
ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 44