



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

ЧУБ
ВЛАДИМИР ВИКТОРОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
ВЫПУСКНИЦУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
ШАПОВАЛОВУ ТАТЬЯНУ ДМИТРИЕВНУ



Оглавление

Лекция 1. Модельные объекты и геномы	7
Арабидопсис как модельный объект	7
Геномы растений	8
Межвидовая гибридизация и полиплоидия	8
Ретроэлементы в геноме растений	8
ДНК-транспозоны. Система активатор-диссоциатор	11
Другие повторяющиеся элементы генома	14
Гены и регуляторные последовательности	14
Лекция 2. Регуляция экспрессии генома	17
Регуляция транскрипции	17
Разнообразие факторов транскрипции	17
Белки с WD-40 repeat (WD, WDR)	21
Синтез антоцианов, гены MYB семейства	23
Ремоделинг хроматина	25
Лекция 3. Трансформация растений	28
Агробактериальные опухоли. Биохимическая специфика опухолей	28
Гормон-независимый рост опухолей	29
Семейство Rhizobiaceae. Виды Agrobacterium	29
Генетические функции Ti-плазмид	30
Узнавание метаболитов растения. Адгезия агробактерий	31
Транспорт оц-ДНК и белков. Взаимодействие с хозяином	32
Синтез гормонов в опухоли	33
Гены rol. Практическое использование Ri-плазмид	35
Агробактериальная трансформация растений	36
Биобаллистика («генная пушка»)	38
Лекция 4. Использование трансгенных растений в исследованиях	39
Инсерционный мутагенез	39
Гиперэкспрессия	39
Анализ структуры промотора	39
Анализ паттернов экспрессии промоторов (репортёр)	40
Поиск промоторов	42
Эктопическая экспрессия	43
Индукцибельная экспрессия	43
Антисенс-косупрессия	45
Сайленсинг	45

Дегроны. HACR-система контроля экспрессии. Нокаутирование генов	46
Патентование достижений селекции. Технология Seed terminator	47
Генетическая хирургия (genetic ablation)	47
Редактирование генома. CRISPR/Cas	48
Лекция 5. Позиционный контроль развития	51
Позиционная информация	51
Регуляторы роста и морфогенеза у растений	53
Короткие пептиды	53
Рецепторные киназы с лейцин-обогащённым доменом	54
Семейство генов WOX. Взаимодействие WOX-CLE	54
Модель активатора/ингибитора	55
Математическое моделирование филлотаксиса	56
Математическое моделирование цветка	58
Проверка устойчивости моделей и прогноз структуры аномальных цветков	61
Области применения теории разметки	62
Лекция 6. Эмбриональное развитие	63
Открытие двойного оплодотворения. Роль оплодотворения	63
Апомиксис	64
Целлюляризация эндосперма	64
Ранние этапы развития	65
Дальнейшее развитие двудольных. Морфогенез	66
Транспорт ауксина	67
Доменная структура зародыша	67
Радиальная дифференцировка. Развитие семядолей	69
ВВМ фактор транскрипции. LAFL-гены	71
Семенная кожура	72
Лекция 7. Функционирование апикальных меристем	73
Меристема побега проростка	73
Моделирование при помощи L-систем	74
Анатомический и физиологический подход	74
Механические свойства меристем. KNOX-гены	76
Гены семейства WOX. Короткие пептиды и их рецепторы	78
Фасциация	80
Генетический подход	83
Лекция 8. Морфогенез листа	86
Полярный транспорт ауксина. Этапы развития листа	86
Разметка и инициация листа. Границы примордия. Форма листа	87

Полярность листа. miRNA и tasiRNA	89
Адаксиально-абаксиальная полярность	90
Латерально-медиальная полярность.....	92
Проксимально-дистальная полярность	93
Разметка проводящей системы	95
Сложный лист. Фасциация	97
Лекция 9. Дифференцировка клеток эпидермиса	98
Проксимально-дистальная полярность	98
Развитие трихом	98
Первые "голые" мутанты (glabra)	99
Кластеры волосков	100
Инициация волоска	101
Автополиплоидизация	102
Мутанты ветвления	103
Корневые волоски	105
Устьичный аппарат	107
Лекция 10. Морфогенез цветка	110
Иерархия программ развития.....	110
Фотопериодизм.....	110
Флориген. Мутанты по регуляции цветения	112
Сеть контроля флоригена	113
Комплекс активации цветения (FAC)	114
Семейство генов FT-TFL	115
Тубериген	116
Гиббереллины.....	117
Интеграторы цветения. MADS-белки	117
Лекция 11. Морфогенез цветка (часть 2).....	120
Представления о структуре и происхождении цветка.....	120
Строение и развитие цветка арабидопсиса.....	120
Иерархия программ развития. ABC-модель	122
Эволюция ABCD-системы. Повторное использование ABC-генов.....	126
Кадастральные гены.....	128
Регуляция и эволюция зигоморфности	128
Физиологическая регуляция.....	130
Лекция 12. Эволюция пола у растений.....	132
Классификация самонесовместимости	132
Гетероморфная самонесовместимость	132

Происхождение гетеростилии.....	136
Происхождение пола.....	137
Половые хромосомы. Пол и внешние условия.....	138
Гомоморфная самонесовместимость.....	139
Спорофитный контроль.....	140
Основные события опыления.....	141
Гаметофитный контроль. Стилярная самонесовместимость.....	142
Семязачаточная самонесовместимость.....	146
Преодоление самонесовместимости.....	146
Лекция 13. Регуляция развития плодов.....	147
Эволюционное преобразование геницея.....	147
Развитие и доменная структура геницея.....	148
Гормональная регуляция. Транскриптомика.....	149
Базальный, центральный и апикальный домен.....	150
Медианный и латеральный домен.....	152
Варианты вскрывания.....	153
Абаксиальный и адаксиальный домен.....	154
Семязачаток: классификация, доменная структура и развитие.....	155

Лекция 1. Модельные объекты и геномы

Арабидопсис как модельный объект

История открытия:

- 1577 г. – найдено в горах Харца и описано врачом Иоганном Талем как *Pilosella siliquosa* (растение с опушёнными листьями и стручками)
- 1753 г. – Карл Линней дал новое название – *Arabis thaliana* L. (Резуховидка Таля)
- 1842 г. – Густав Гейнхольд перенёс растение в новый род – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Систематическое положение:

- Отдел Покрытосеменные, или Цветковые (Angiospermae, Magnoliophyta)
- Двудольные (Eudicots) Eurosids II
- Порядок Капустоцветные (Brassicales) – 15 семейств
- Семейство Крестоцветные, или Капустные (Cruciferae, Brassicaceae) – 372 рода
- Род Арабидопсис, или Резуховидка (*Arabidopsis*) – 11 видов
- Вид Резуховидка Таля – *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Это **растения-эфемеры** – травянистые однолетние растения с коротким вегетационным периодом. За очень непродолжительное время (месяц-полтора) проходят полный цикл своего развития до семян. Встречается в местах обитания, где есть нарушения травяного покрова. Такие растения интенсивно развиваются, цветут и дают плоды во влажный период (ранней весной или поздней осенью) и полностью отмирают в период летней засухи.

Николай Иванович Вавилов выделил основные признаки, которыми должны обладать растения для генетических исследований:

- короткий период вегетации
- семена без периода покоя (в условиях лаборатории)
- растут в обычных условиях
- хорошо заметные признаки
- возможность длительного скрещивания (лучше – крупные цветки)
- малое число хромосом
- большое разнообразие рас

Для поиска «ботанической дрозофилы» Вавилов отправил экспедицию, в отчёте которой арабидопсис впервые упоминается как один из перспективных объектов для генетики растений. Венгерский исследователь Георг Редей первым стал использовать арабидопсис как модельный объект. Мартин Корнеф продолжил работу с арабидопсисом, построил генетическую карту с 76 генами, что положило основу для выведения новых линий.

Удачные мутации бывает сложно сохранить вегетативным размножением (далеко не все мутанты фертильны). После короткого сезона вегетации у арабидопсиса наступает запрограммированная гибель растения. Поэтому для сравнения используют растения из близких родов:

- *Arabis* – многолетник. Изучение генов, отвечающих за многолетность и сохранение в течение зимы.
- *Thelungiella halophila* – галофит, способен переносить высокие уровни засоления почвы. Изучение генов, которые обеспечивают солеустойчивость

Результаты, полученные на арабидопсисе, можно экстраполировать на промышленные крестоцветные (рапс, капуста) для получения генетически модифицированных растений с новыми хозяйственно важными свойствами.

Геномы растений

- **Ядерный** (линейные хромосомы) – самый крупный. Размер ядерного генома не зависит от образа жизни растения и сильно варьирует даже в пределах одного семейства. У арабидопсиса небольшой размер ядерного генома 135 Мб – около 25 000 генов.
- **Пластидный** (кольцевой) – стандартный, устроен по прокариотическому принципу, локализован в хлоропластах. В зелёных частях растения он преобладает.
- **Митохондриальный** (кольцевой) – широко варьируется по размеру растёт

Межвидовая гибридизация и полиплоидия

Межвидовая гибридизация очень широко распространена. Многие культурные растения не встречаются в природе (слива домашняя происходит от скрещивания тёрна и алычи; земляника ананасная; пшеница). Но не только культурные растения могут образовывать межвидовые гибриды (например, пастушья сумка).

Межвидовая гибридизация позволяет резко увеличить объём генома. Далее происходит эволюция, ненужные последовательности постепенно теряются.

Полиплоидизация – это увеличение числа хромосом и количества ДНК. Она особенно важна для растений, которые размножаются вегетативно (например, бессемянные бананы, лилейник рыжий). Полиплоидные растения могут сохранять свои признаки в течение многих лет.

Ретроэлементы в геноме растений

Значительную часть генома растений занимают ретроэлементы (рис. 1.1). У некоторых растений вдобавок есть **ретротранспозоны** – участки ДНК, способные перемещаться по геному. При этом они делают это не сами, а через промежуточные молекулы.

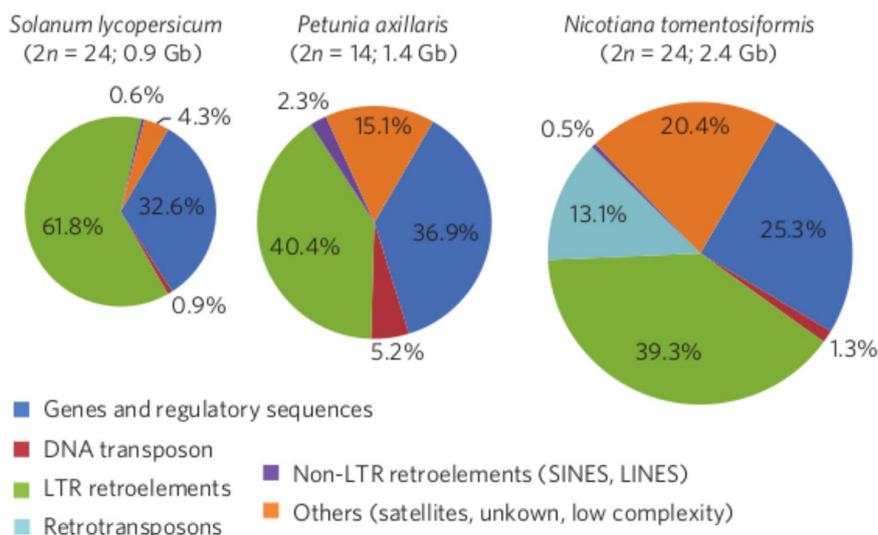


Рис. 1.1. Ретроэлементы в составе генома растений

Ретротранспозоны функционируют по механизму «copy/paste». Сначала с них считывается мРНК, а затем в ходе обратной транскрипции по ее «шаблону» образуются фрагменты ДНК, идентичные изначальным ретротранспозонам, которые затем вставляются в новое место генома. То есть эти элементы сами себя размножают и обеспечивают наибольшую вариабельность генома (рис. 1.2).

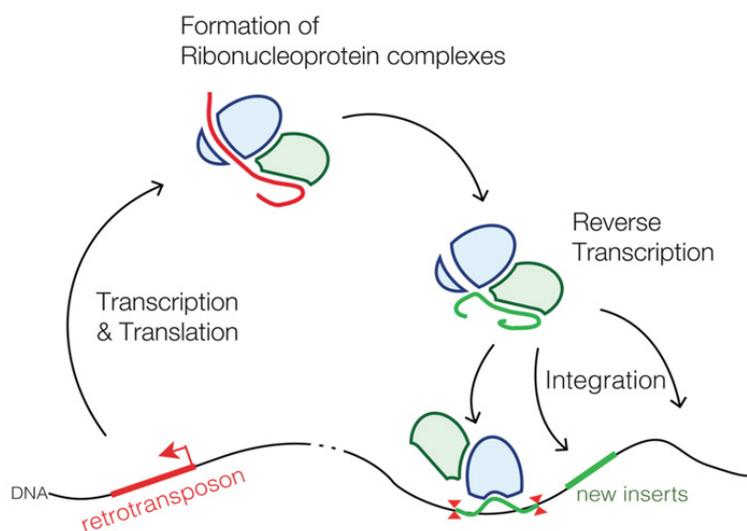


Рис. 1.2. Жизненный цикл ретротранспозона

Ретроэлементы синтезируют белок, который имеет домены с четырьмя разными функциями (активностями):

- ДНК-связывающая (Gag)
- протеолитическая (Prot)
- эндонуклеазная (Endo)
- РНКазная, или функция обратной транскрипции (RTRNaseH)

Для того, чтобы не потерять генетическую информацию, ретроэлементы окружены прямыми концевыми повторами. В зависимости от их длины различают несколько типов ретротранспозонов:

- LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) – длинные, с концевыми повторами, автономные (около 7000 пар оснований, т.е. 7kb)
- SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) – короткие, неавтономные (50-500 bp). Белок сами не кодируют, а используют его от активных ретроэлементов.

По мере обратной транскрипции в ДНК возникают ошибки. Большая удача, если в процессе репликации и распространения в новые места ДНК попадётся новая активная копия ретротранспозона. Таким образом, большая часть генома засорена неактивными копиями, которые не могут сделать полноценный белок из-за мутаций.

Ретротранспозоны могут составлять до 40% генома петунии и насчитывать до 4,5 тысячи штук на геном. В зависимости от положения интегративного домена (рис. 1.3) выделяют два типа:

- Ty3/Gypsy
- Ty1/Copia

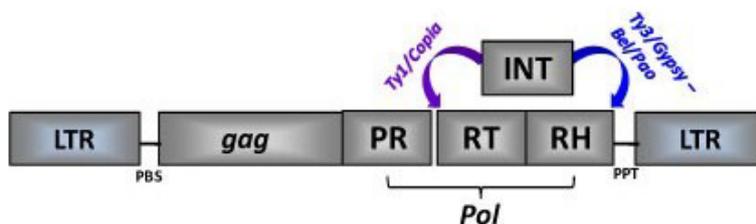


Рис. 1.3. Ty3/Gypsy и Ty1/Copia элементы в геноме петунии

Ретроэлементы распределены по всему геному петунии, часто сосредоточены в определенных участках, включая центромеры хромосом. Для визуализации их распределения в геноме используют флуоресцентные зонды.

Петуния также содержит копии вставленных вирусов, относящихся к параретровирусам (вирус мозаики цветной капусты и вирус просветления жилок петунии). Они добавляют в геном новые функции. Например, есть белок, отвечающий за перемещение из клетки в клетку (рис. 1.4, синий), и белок оболочки (рис. 1.4, зелёный). У петунии достаточно много этих вирусов, они захватывают разные части генома и располагаются также в перицентромерных участках хромосом. К счастью для петунии, активных копий вирусов тоже достаточно мало.

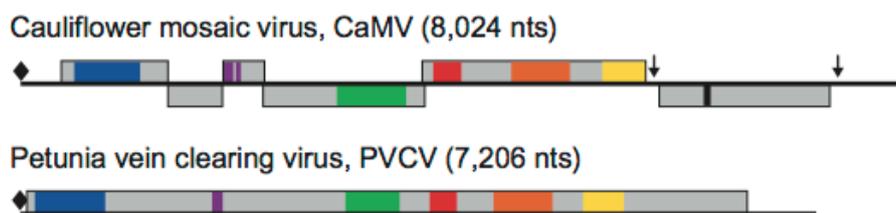


Рис. 1.4. Геном параретровирусов

Дикие виды петунии не содержат этих вирусов совсем. В процессе культивирования человечество размножало петунии как теплолюбивый многолетник. В результате такого вегетативного размножения в петунии стали накапливаться вирусы и её геном стал гибридным: около 50 участков, содержащих вирусные последовательности, на 1n геном. К счастью, только несколько из них являются полноценными копиями.

Жить на вирусном фоне очень тяжело, поэтому петуния разработала механизмы сайленсинга. **Сайленсинг** (замалчивание) генов петунии активируется вирусами, чтобы контролировать их активность.

В молодом возрасте сайленсинг работает хорошо. В процессе старения растения эта система ослабевает, вирусы активируются, вызывая симптомы поражения. Кроме того, вирусы могут быть активированы стрессами: засуха, тепло, механическое повреждение и т.д. Так, при регулярной обрезке или при ведении в культуре *in vitro* через 3 месяца симптомы появились у 30% растений, а если выращивать в горшке, то лишь у 2-3%.

За период XIX века в геноме петунии появилось множество следов других параретровирусных инвазий из других объектов (риса, бананов, розы, винограда и т.д.), однако их полноразмерных функциональных копий не обнаружено. Это означает, что петунии черенковали грязными инструментами, вирусы попали в растение и засели в геноме и передаются из поколения в поколение.

ДНК-транспозоны. Система активатор-диссоциатор

Разнообразие признаков петунии обусловлено наличием не только репликативных, но и нерепликативных транспозонов, или ДНК-транспозонов. Они функционируют по механизму «cut/paste», то есть копия вырезается из старого места и перемещается в новое. Таких элементов сравнительно немного, однако от их активности зависит множество разных признаков. Нерепликативные транспозоны не перемещаются, но могут активировать или подавлять активность других генов.

В 1946 году Барбара МакКлинток обнаружила места, в которых хромосомы кукурузы часто разламываются. Этот локус получил название диссоциатор. Оказалось, что для его работы нужен активатор. Благодаря этому механизму возникает пёстрая окраска зерновки кукурузы. В составе отламывающегося плеча имеется аллель, обеспечивающая красный окрас зерна. Если хромосома обломилась, то эта окраска утрачивается и какая-то часть ткани зерновки становится белой. Так как это гетерозигота, то вторая хромосома несёт мутантную аллель окраски, благодаря чему возникает такая полосатость. Таким образом было обнаружено, что геном кукурузы, а также некоторых других объектов содержит подвижные (мобильные) элементы. Активатор и диссоциатор – элементы генома, которые вызывают перемещение транспозонов.

Активатор окружён короткими инвертированными повторами, которые нужны для того, чтобы ДНК могла сделать из них петлю, пригодную для дальнейшей транспозиции. Внутри закодирован один белок – транспозаза, которая узнаёт концевые повторы, обрезает и вставляет новую копию в ту же самую цепочку ДНК.

Диссоциатор не несёт рабочую транспозазу. Он обрамлён терминальными повторами. Если присутствует активатор, то в клетке появляется транспозаза и происходит перемещение всех элементов, находящихся между двумя терминальными повторами определённого типа. Если активатора нет, то система транспозиции не работает, все мобильные элементы остаются на своих местах.

Терминальные повторы имеют гомологию с границами интронов. Когда считывается РНК-копия, участок, содержащий транспозон, надрезается, и это никак не отражается на дальнейшем функционировании РНК-продукта.

В геноме кукурузы содержится 2-4 активатора (а может и вообще не быть) и до 50 диссоциаторов. В зависимости от положения данных элементов меняется фенотипическое проявление. Транспозоны могут располагаться:

- между промотором и кодирующей частью генов. Расстояние между промотором и кодирующей частью очень сильно увеличено, что приводит к нарушению функционирования генов, которые вставлены в транспозон. Из-за этого может не образовываться полноценный продукт.
- внутри экзона. РНК-продукт будет прочитан, из него вырежется транспозон, РНК будет хорошо функционировать, образуется нормальный белковый продукт.
- внутри интрона. Последовательность будет удалена, белок будет функционировать нормально.

Разные последствия для функционирования гена будут возникать при перемещении транспозона на новое место. Транспозон захватывает с собой 1-2 нуклеотида с каждого конца, таким образом ДНК гена немного укорачивается.

- Если такая небольшая делеция случилась между промотором и кодирующей частью, то происходит восстановление функции гена – на мутантном фоне возникнут пятна дикого типа.
- Если транспозон вырезается из экзона, то происходит сдвиг рамки считывания и возникает мутация, которая приводит к нарушению функционирования белкового продукта.
- Удаление транспозона из интрона более-менее безопасно для работы генов

Таким образом, транспозоны в зависимости от их расположения могут вызывать различные фенотипические проявления:

- в кодирующей части – окрашенный фон, белые штрихи и пятна
- между промотором и кодирующей частью – белый фон, окрашенные штрихи и пятна.

Пятна различной окраски могут возникать на листьях, лепестках и семенной коже. В зависимости от того, в какой момент произошёл перенос, окраска может появляться на разных группах клеток (рис. 1.5). Если это произошло достаточно поздно, то на основном фоне будет совсем мало штрихов. Если пораньше, то появляются более крупные пятна. Поскольку процесс спонтанный и стохастический, то паттерн окраски не будет повторяться

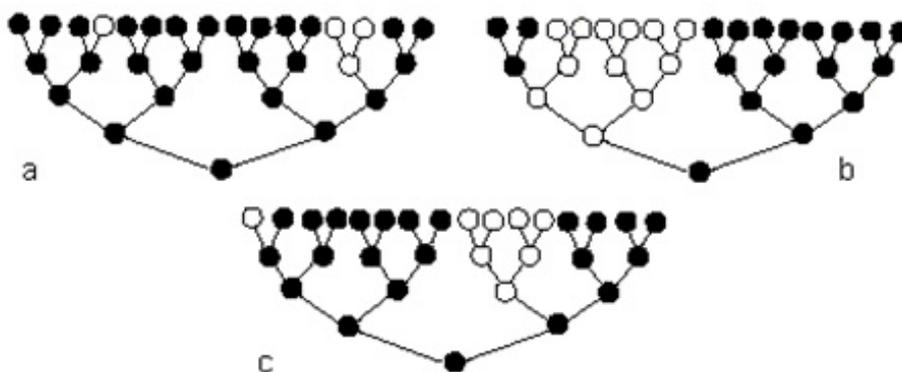


Рис. 1.5. Формирование различных пятен окраски

Активность транспозонов зависит от состояния гена, в который они встроены. Пока ген окраски не востребован, то и транспозон неактивен. Неактивное состояние характеризуется определённым уровнем метилирования, кроме того модифицируется хроматин. Из неактивного транспозон может перейти в криптическое состояние, если он находится в участке генома, который редко используется, находится в составе гетерохроматина. Чтобы перейти в активное состояние, нужно, чтобы эта часть оказалась востребованной – ДНК переходит в форму эухроматина, понижается уровень метилирования и других модификаций, а затем, когда участок заработает в полную силу, вместе с ним активируется и транспозон. Это означает, что при транспозиции наиболее подвержены мутациям активно работающие участки, а неработающие участки, напротив, более стабильны.

Термочувствительные транспозоны могут использоваться для изучения генов. Их транспозаза перестаёт работать при повышенной температуре, что позволяет определить, встроился ли транспозон в какой-либо ген или нет. Так можно программировать не только окраску, но и судьбу органов в цветке.

До изобретения полимеразной цепной реакции транспозоны были основным инструментом для клонирования генов. Львиный зев, обладающий большим количеством транспозонов, оказался очень удобным объектом молекулярной биологии. Арабидопсис, несмотря на наличие собственных ДНК-транспозонов, не обладает такой активностью, как другие объекты, например, петуния, львиный зев и кукуруза. Кроме того, в отличие от других объектов, у арабидопсиса слабо представлены повторы в геноме.

Другие повторяющиеся элементы генома

Помимо ретроэлементов и транспозонов в геноме растений встречаются сателлиты, ДНК низкой сложности и не до конца изученные последовательности.

В геноме всегда существуют повторы.

В теломерах (концевых участках хромосом) обязательно должны находиться повторяющиеся терминальные последовательности, поскольку при копировании хромосомы она немного не дочитывается и может немного укорачиваться. Для того, чтобы не пропал какой-то важный ген, в этих участках нет кодирующих последовательностей. Повторы предохраняют концы хромосом от деградации

При расхождении хромосом к ним необходимо прикреплять множество микротрубочек. Это называется кинетохорный участок. Чтобы его организовать, необходимо обеспечить однородную ДНК, состоящую из повторов.

Гены и регуляторные последовательности

От трети до четверти генома составляют гены и регуляторные последовательности. Сходные по функции гены объединяют в **мультигенные семейства**. Гены в семействе могут слегка варьировать по структуре. Иногда семейство разбивают на отдельные классы. Большое число сходных генов может быть связано с производством массового продукта (например, гены рРНК) либо с производством сходных продуктов для разных целей в разных клетках.

Гены состоят из промоторного участка, с которого начинается транскрипция, кодирующей части и терминатора транскрипции. Транскрипция начинается с 5'-конца. Кодирующая часть пре-мРНК представляет собой экзон-интронную структуру. **Интроны** – это части, которые будут удалены, а **экзоны** войдут в состав зрелой мРНК. По ходу синтеза на 3'-конце у ядерных генов прикрепляется **поли-аденилатный хвост**. Эта последовательность не записана непосредственно в ДНК. Она возникает благодаря поступающему сигналу о терминации транскрипции. У прокариот на 3'-конце появляется шпилька, которую клетка воспринимает как постороннюю информацию и такие РНК в клетке быстро деградируют. В этом плане последовательности с поли-А хвостом стабильнее. Также для эукариот характерна модификация 5'-конца – появление кэпа (**cap**).

Кодирующая часть гена начинается со старт-кодона и заканчивается стоп-кодоном. Происходит **трансляция** – перевод информации с уровня РНК на уровень белка. Он может синтезироваться в неокончателном виде. На N-конце обычно есть **лидерная последовательность**, которая направляет белок в тот или иной компартмент, если белок нужен для цитозоля, то такая последовательность может отсутствовать.

Пре-белок подвергается пост-трансляционной модификации: какие-то части урезаются, какие-то фрагменты присоединяются (например, гликозилирование). Наконец, происходит **фолдинг** (сворачивание) и **сортинг** белка, формируется зрелый продукт.

Гены могут быть обозначены по функциям (*UFO* – Unusual Flower Organs) или по мутациям (функция гена может быть как бы «противоположна» названию). Ген эукариот обозначается комбинацией не более, чем из трёх букв. Если буквенных сочетаний не хватает, используются цифры. Аллель дикого типа обозначается заглавными буквами, курсивом (*AG* – *AGAMOUS*). Мутантные аллели обозначаются прописными буквами, курсивом. Чтобы различать аллели, добавляют цифры через дефис (*ag-1*). В особых случаях указывают замену какой-то определённой аминокислоты в белке (*clv1-Arg204Phe*).

Если ген сначала был выделен из одного растения, а потом его по гомологии обнаружили у другого растения, то к названию гена впереди добавляется сокращённое название нового растения. Заглавная буква – название рода, прописная – название вида (*ZmAG*). Разные растения могут обозначаться одинаковыми буквами, поэтому важно смотреть по контексту.

Бокс-последовательности – это консервативные последовательности нуклеотидов внутри ДНК, которые могут указывать на родство генов или их функциональность.

Примеры:

- TATA-box – последовательность в промоторном участке эукариот, маркирующая начало транскрипции за 30 нуклеотидов до начала).
- G-box – последовательность в промоторе для связывания RHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3.
- F-box – последовательность в кодирующей части, характерная для убиквитин-лигаз, кодирующая около 50 аминокислот (белок-белковое взаимодействие).
- MADS-box – последовательность нуклеотидов в кодирующей части, характерная для некоторых факторов транскрипции, кодирующая 56 аминокислот (взаимодействие белок-РНК)

РНК-продукты генов обозначаются так же, как и сами гены, но контекст статьи позволяет определить, что имеется в виду – последовательность ДНК или РНК. РНК с мутантных аллелей не получили специального названия, если необходимо, это указывают отдельно.

В белке выделяют **домены** – некие консервативные последовательности аминокислот. это фрагменты белка, консервативные и определяющие его структуру, взаимодействие с другими белками и функциональные особенности.

Примеры доменов:

- Гомеодомен – последовательность из 60 аминокислот, обеспечивающая связывание некоторых транскрипционных факторов с ДНК. Гомеобокс – это соответствующая часть внутри гена на уровне ДНК.
- CHASE-домен – последовательность из 200-230 аминокислот, характерная для рецепторных киназ (например, рецепторов цитокинина).

- АБК-связывающий домен – часть белка, которая взаимодействует с абсцизовой кислотой.

Белковые продукты генов обозначаются прямым шрифтом (в отличие от генов, обозначаемых курсивом). Например, AG – белковый продукт гена AGAMOUS.

Это были правила для ядерного генома. В пластидном и митохондриальном геноме действуют обозначения как для прокариот. Ген прокариот обозначается комбинацией не более, чем из трёх прописных букв, курсивом. Если буквенных сочетаний не хватает, используются заглавные буквы, реже – цифры. Мутантные аллели специального обозначения не имеют. Белок обозначается прямым шрифтом с заглавной буквы. Например, *psa A* – ген белка А фотосистемы I; белок – Psa A.

Лекция 2. Регуляция экспрессии генома

Регуляция транскрипции

На уровень экспрессии гена влияют:

1. **Цис-факторы** – последовательности ДНК, непосредственно окружающие ген или входящие в его состав. Очень много цис-факторов располагаются в промоторных участках. Это регуляторные боксы, которые могут связываться с факторами транскрипции

2. Транс-факторы (**факторы транскрипции**) – белки, связывающиеся с цис-факторами. Одни из них могут активировать транскрипцию, а другие, наоборот, ингибировать.

3. **Факторы ремоделинга хроматина**. Если хроматин более рыхлый, то ген и его окружение становятся более активными. А при конденсации ДНК активность генов снижается.

Обычно факторы транскрипции содержат определённые домены, которые обеспечивают либо специфичность узнавания определённых регуляторных последовательностей ДНК, либо важны для белок-белкового взаимодействия. Часто в состав транскрипционного фактора входит не один, а несколько доменов с разными функциями.

Разнообразие факторов транскрипции

Гены семейства **Zn-Finger/ZF** («цинковые пальцы») содержат атом цинка, ассоциированный с двумя гистидинами и двумя цистеинами. С одной стороны есть α -спираль, с другой β -укладка белка. α -Спираль и частично β -слой взаимодействуют с большой бороздкой ДНК и узнают определённые последовательности (рис. 2.1). Такие «цинковые пальцы» содержат, например, гены CO-like (отвечают за индукцию цветения) и YABBY (отвечают за развитие цветка и листьев).

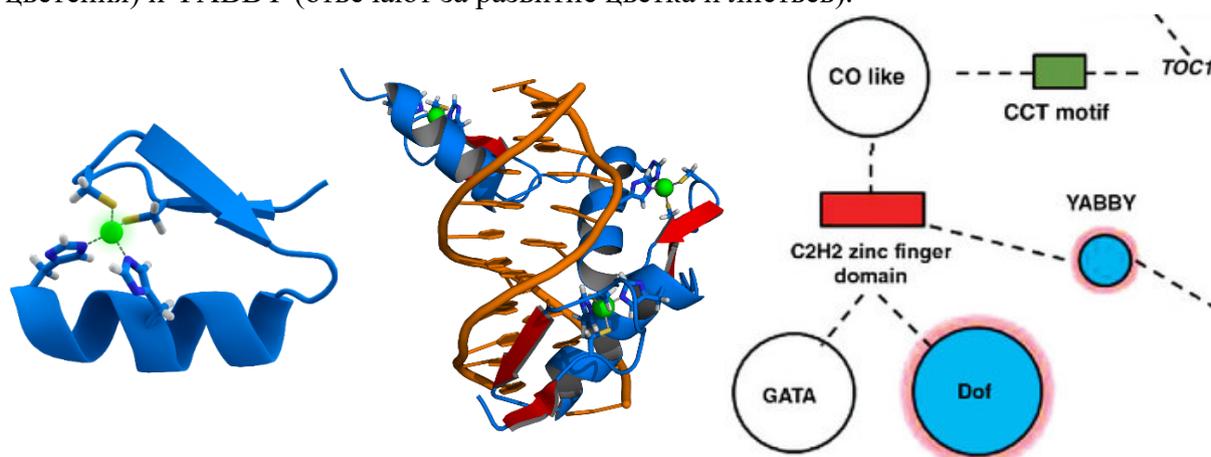


Рис. 2.1. Структура «цинковых пальцев»

Многие факторы транскрипции связаны с гормональными сигналами. Один из важнейших гормонов – ауксин. Факторы первичного ответа **Auxin Response Factors (ARFs)** содержат специфический **ARF1-B3 домен**, узнающий определённые последовательности в генах первичного ответа на ауксин (рис. 2.2). Это достаточно большой домен (около 300 аминокислот), содержащий обширную β-укладку и немного α-спиралей. Родственный ему фактор **Aux/IAA** является ингибитором транскрипции. Вместе с ARF они входят в единый комплекс и до определённого момента экспрессия генов не работает. Как только фактор Aux/IAA уничтожается системами убиквитинирования, включается ответ на ауксин и появляются продукты генов первичного ответа.

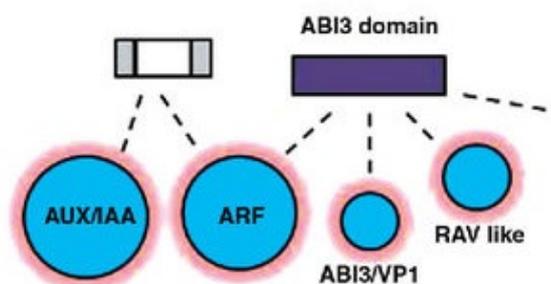


Рис. 2.2. Факторы транскрипции, контролирующие ответ на ауксин и АБК

Оказалось, что ARF фактор используется в разных факторах транскрипции – не только для узнавания ауксина, но и, например, для взаимодействия с абсцизовой кислотой (рис. 2.2). Эту функцию выполняет **ABI3-B3 домен (Abscisic acid insensitive3 - B3 domain)**

Homeodomain/HD (гомеодомен) был назван так, потому что вызывал гомеозисные изменения в строении организма животных. Гомеодомен кодируется гомеобоксом и нужен также для узнавания определённой последовательности ДНК.

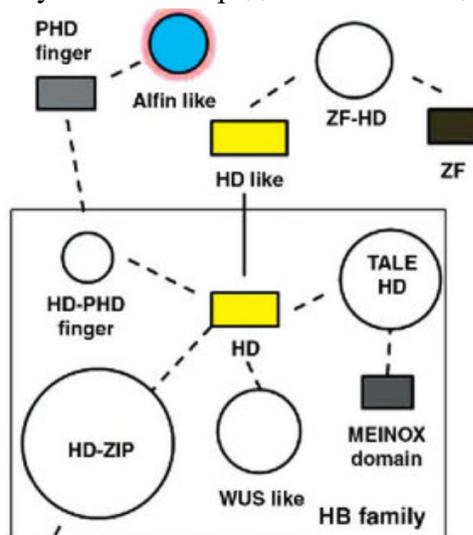


Рис. 2.3. HD и HD-like факторы транскрипции

Впервые он был выделен у дрозофилы, а у растений его достаточно долго не могли открыть (хотя гомеозисные мутации у растений известны). В дальнейшем оказалось, что гомология касается только гомеобокса и гомеодомена, а остальные части белков очень непохожи. Одними из первых в этом семействе были открыты гены **Knotted-like homeobox (KNOX)**, управляющие меристематической активностью в побеге. При нарушении эта активность была зафиксирована в листьях.

HD-Zip (гомеодомен с «застёжкой-молнией») управляет программой развития листа. **WUS-like** контролирует объём меристемы корня, побега, а также многие другие пролиферативные процессы и дифференцировку. На рис. 2.3 представлены также другие семейства, которые содержат гомеодомен или HD-like участки. Бывают семейства генов, которые используют одновременно и цинковые пальцы, и HD-like последовательности (например, ZF-HD).

Семейство транскрипционных факторов **AP2/EREBP (APETALA2/Ethylene-Responsive Element-Binding Protein)** впервые было открыто на растениях. Один из них AP2 контролирует развитие органов цветка (при мутации исчезают лепестки). В его структуре есть α -спиральный домен, но взаимодействие с ДНК осуществляется посредством β -укладки (рис. 2.4).

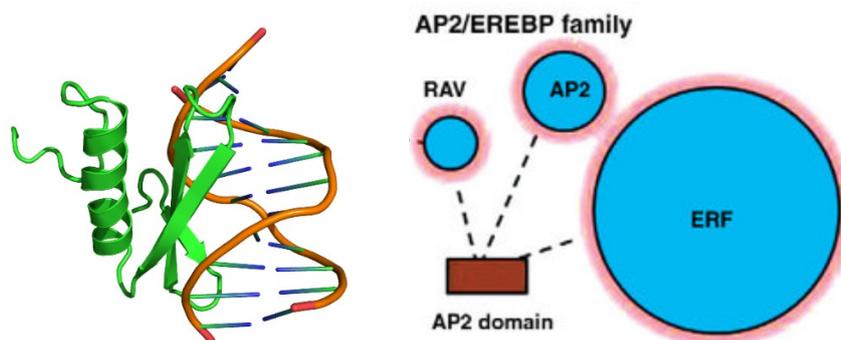


Рис. 2.4. Структура транскрипционных факторов семейства AP2/EREBP

Большая часть гомеозисных мутантов у растений оказалась связана со специфическим типом регуляторов – **MADS**. Эти гены были обнаружены сначала у арабидопсиса (мутант **agamous**), потом у львиного зева (мутант **deficiens**). На момент их исследования в базах данных оказалось 4 гена, которые имеют MADS домен для связи с ДНК. Это фактор поддержания минихромосом у дрожжей (**minichromosome maintenance**) и у человека это фактор ответа на сыворотку (**serum response factor**). Общий домен из 56 аминокислот был назван по первым буквам обнаруженных генов.

Обычно эти комплексы состоят из 4-х факторов транскрипции и работают как тетрамеры (рис. 2.5). MADS гены контролируют идентичность органов цветка. В частности, **agamous** – это мутация, которая вызывает махровость. То есть тычинки и пестик не развиваются, вместо этого в середине цветка образуются новые лепестки и чашелистики.

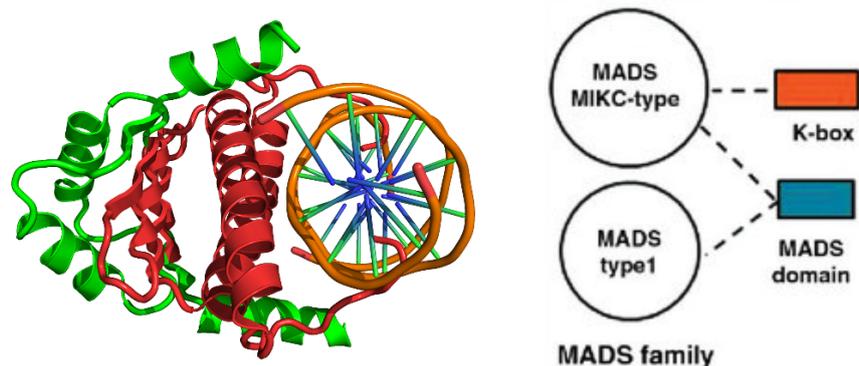


Рис. 2.5. Структура транскрипционных факторов семейства MADS

MYB (MYeloBlastoma) факторы транскрипции были впервые обнаружены в вирусе миелобластомы птиц **AMV (Avian Myeloblastosis Virus)**. Он вызывает лейкоз: меняется структура лимфоцитов, они начинают неорганизованно делиться, в конце концов процесс затрагивает весь организм и птица погибает. Этот вирус состоит из 3-х тандемных повторов (около 50 аминокислот), в каждом из которых есть по 3 α -спирали. Не все факторы из этого семейства содержат все 3 повтора (может быть, например, только 2 и 3 или только 1). Данные факторы транскрипции могут выполнять различные функции в зависимости от дополнительных частей, которые в них содержатся. У человека и других позвоночных гены MYB представлены сравнительно скромно: только 3 гена (А-MYB, В-MYB и С-MYB) содержат в своём составе все три повтора (их называют R1R2R3-MYB genes). Эти гены контролируют пролиферацию и дифференцировку.

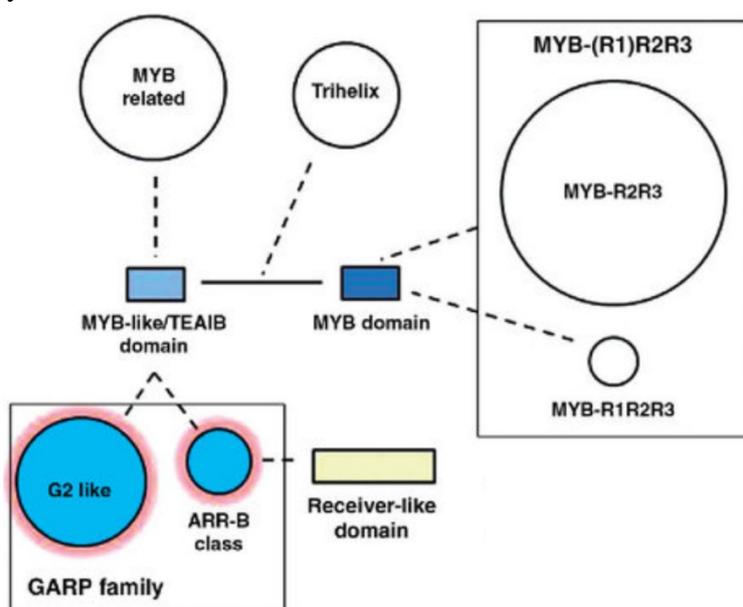


Рис. 2.6. Взаимодействие факторов транскрипции с ДНК

У растений семейство MYB и MYB-like генов достаточно широко представлено и составляет целое суперсемейство (рис. 2.6). У арабидопсиса это около 200-300 генов: 5 R1R2R3-MYB, 126 R2R3-MYB, остальные – MYB-like и атипичные MYB гены.

MYB факторы транскрипции обычно действуют не в одиночку. Они сочетаются с факторами транскрипции типа **bHLH** (**b**asic **H**elix-**L**oop-**H**elix – «спираль-петля-спираль»). Это щелочной домен с положительными зарядами, который взаимодействует с отрицательно заряженной ДНК. Факторы транскрипции этого типа обычно работают в форме димеров, которые словно щипцы "держат" ДНК (рис. 2.7). Помимо доменов, узнающих ДНК, есть также и регуляторные последовательности.

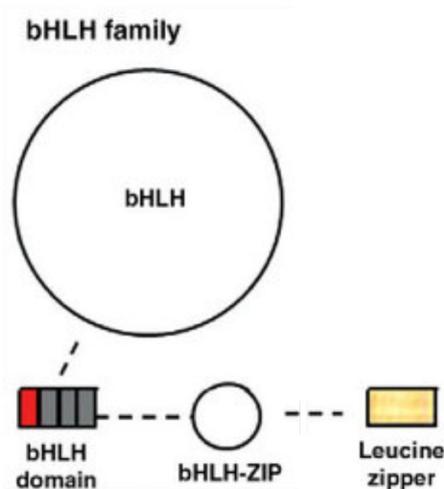


Рис. 2.7. Факторы транскрипции семейства *bHLH*

Семейство достаточно широко представлено, иногда факторы транскрипции этого типа сочетаются с лейциновой «застёжкой-молнией», которая способствует димеризации факторов транскрипции. Лейцин – гидрофобная аминокислота. Две α -спирали, обогащённые лейцинами, стараются взаимодействовать друг с другом.

Белки с WD-40 repeat (WD, WDR)

Есть белки, которые не взаимодействуют с ДНК, то есть в широком смысле не являются факторами транскрипции. Однако они очень важны для сборки транскрипционных комплексов. Белки могут состоять из самых разных аминокислот, поэтому показать их родство удалось не сразу. Тем не менее, есть одно сходство – повторы из 40 аминокислот, заканчивающиеся на триптофан (**W**) и аспарагиновую кислоту (**D**). Такие белки получили название **WD40** (=WDF, WDR). В пространстве они формируют структуру β -пропеллера с различным числом лопастей, к которому могут быть присоединены какие-то другие домены.

Такие белки служат матрицей, на которую «наклеиваются» факторы транскрипции, образуя комплекс. Например, MYB + bHLH + WD40 = **MHW-комплекс**.

Кроме того, эти белки участвуют:

- в сигнальных комплексах с G-белками (мембранные процессы передачи сигнала, не связанные непосредственно с транскрипцией)
- в убиквитинлигазных комплексах (контролируют разрушение белков-мишеней)
- в построении клеточной стенки

Важный центральный ген из этого семейства – TTG1. В зависимости от компонентов, с которыми он собирается, возникает регуляция определённого процесса (рис. 2.8).

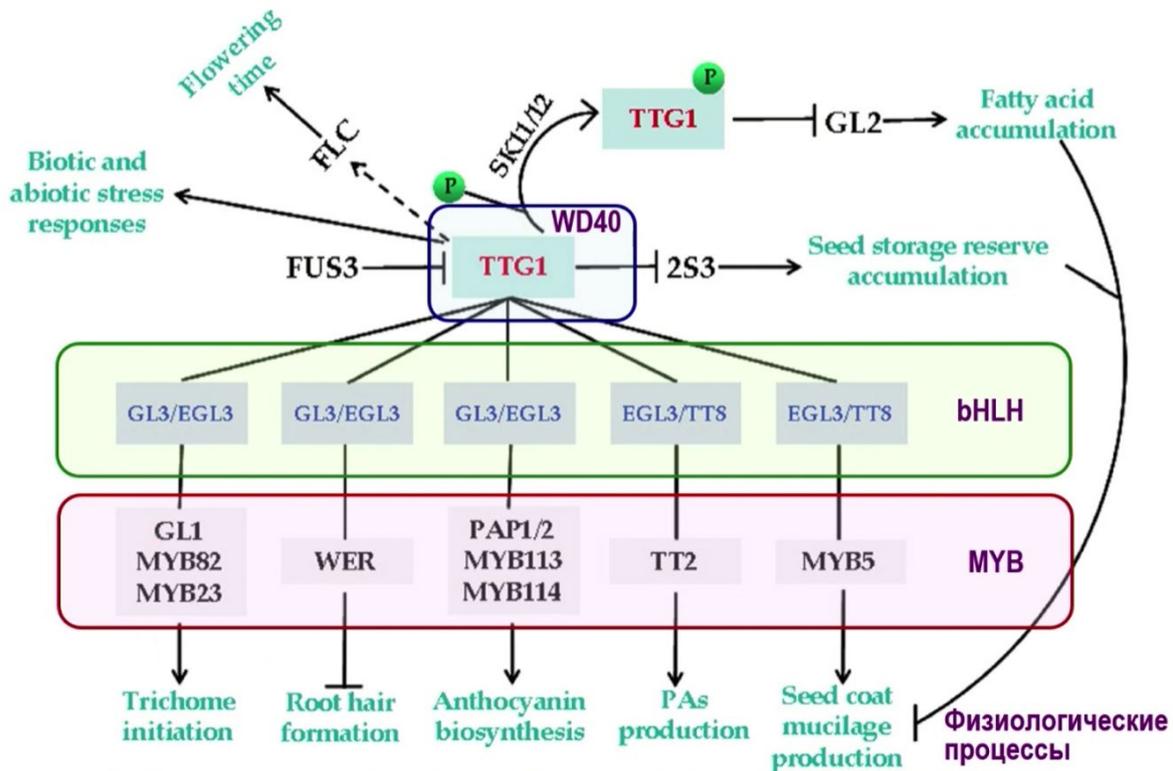


Рис. 2.8. Многообразие транскрипционных комплексов с геном TTG1 и их функции

Большое разнообразие ответов и регуляций возможно благодаря следующему принципу. Гены WD40 представлены в небольшом количестве копий на геном. Они экспрессируются во многих тканях и при различных обстоятельствах. bHLH представлены умеренным числом генов. У них есть некоторая специализации экспрессии, то есть они экспрессируются не во всех тканях и не во всех обстоятельствах. Факторы транскрипции суперсемейства MYB представлены большим числом генов. Их функции часто противоположны (как усиление экспрессии, так и ингибирование). Экспрессия этих генов высоко специализирована.

От аллели фактора транскрипции может зависеть, как распределяется синтез различных веществ (например, антоцианов) по растению. Лocus **Booster (B)** кодирует bHLH, гомологичный R, отвечает за окраску листьев и зерновок. Он имеет две аллели:

1. Аллель **Booster-leaves (B-l)**, отвечающий за окраску листьев
2. Аллель **Booster-Peru (B-Peru)**, отвечающий за окраску и листьев, и зерновок.

Если в геноме представлена только аллель В-1, то окраска антоцианов возникает исключительно в листьях. В момент созревания урожая этот фактор активируется в покровках початка, однако в самих зерновках он неактивен, следовательно, они не окрашены. Если бы присутствовала аллель В-Peru, то и зерновки были бы ярко окрашены.

Синтез антоцианов, гены MYB семейства

Гораздо чаще встречаются факторы транскрипции из семейства MYB:

- **ANTHOCYANIN 2 (AN2)** – активатор синтеза антоцианов в отгибе (limb)
- **ANTHOCYANIN 4 (AN4)** – активатор синтеза антоцианов в трубке венчика и пыльниках
- **DEEP PURPLE (DPL)** – активатор синтеза антоцианов в жилках трубки
- **PURPLE HAZE (PHZ)** – активатор синтеза антоцианов в бутонах = MYBb

AN2, AN4, DPL и PHZ частично заменимы. Мутанты an1 an2 могут синтезировать антоцианы.

Кроме стимуляторов транскрипции в геноме также представлены ингибиторы:

- **R2R3-MYB: Phmyb27** содержит ERF-repression motif (EAR)
- **MYB-like (R3MYB)**
- **PhMYBx (гомолог CPC1)** – конкурентный ингибитор синтеза антоцианов (включены в negative feedback на свету)

Таким образом MYB факторы транскрипции контролируют экспрессию генов, связанных с биосинтезом антоцианов, в зависимости от условий освещения и других факторов.

Биосинтез антоцианов важен для растений, которые находятся на ультрафиолетовом освещении. При искусственном освещении или в тени синтез антоцианов не требуется и растение зелёное. На ярком солнце под действием ультрафиолета растение «загорает», бронзовеет, появляется красноватая окраска за счёт синтеза антоцианов. Они синтезируются благодаря увеличенной экспрессии генов из MYB семейства (в основном PHZ). В темноте экспрессируется фактор MYB27, который в транскрипционных комплексах играет роль ингибитора, поэтому уровень антоцианов в клетке снижается.

При сильном увеличении уровня белка DPL будет усилена экспрессия практически всех генов, которые отвечают за биосинтез антоцианов. То есть благодаря сборке транскрипционного комплекса, состоящего из WD40, bHLH и MYB, запускается целый физиологический процесс.

MYB факторы работают в разных частях растения (рис. 2.9). Например, AN2 работает по краям лепестков. Если остальные гены не работают, то лимб цветка окрашен за счёт антоцианов, а зев (сердцевина) белый. AN4, наоборот, работает в трубке цветка. Есть факторы транскрипции, которые привязаны к определённым дифференцировкам. DPL привязан к жилкам, а PHZ работает на обратной стороне

лепестков, в чашелистиках и зелёных частях. Он обеспечивает защиту от ультрафиолета.

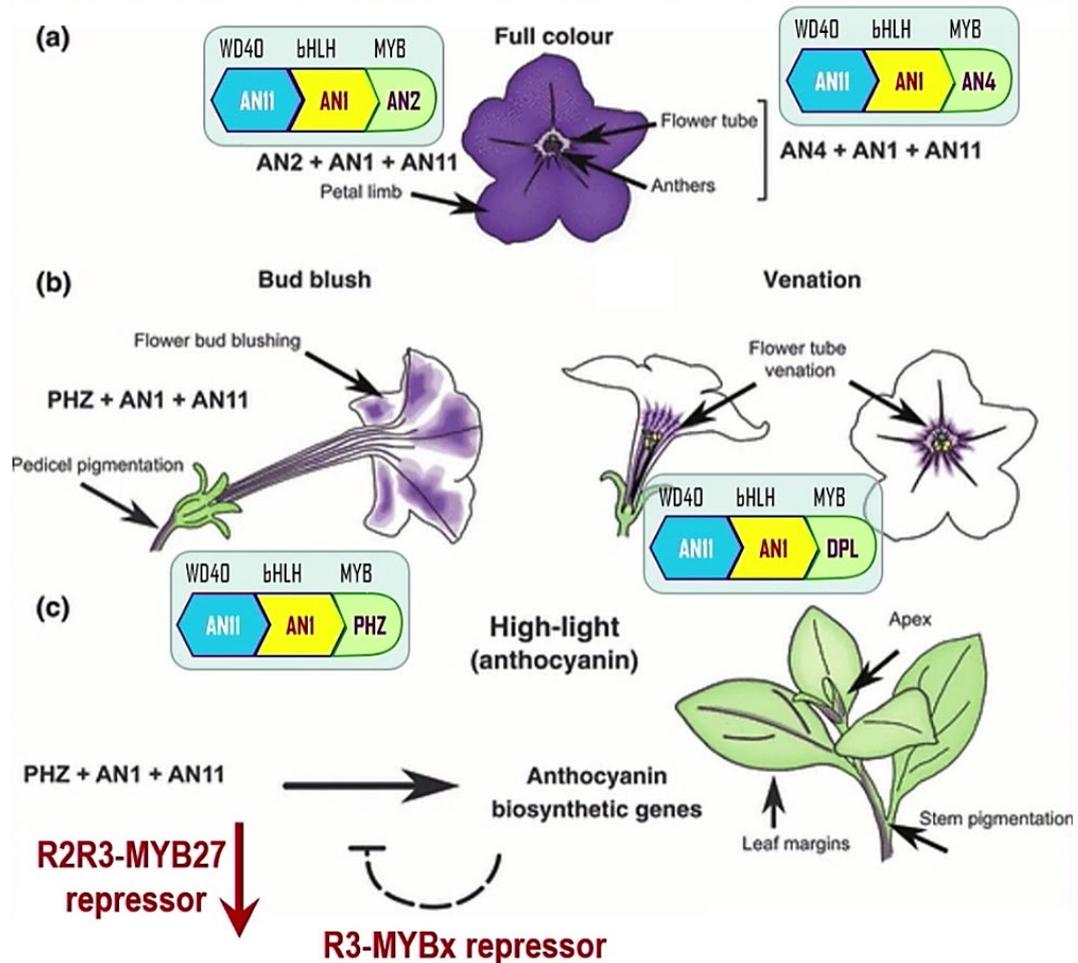


Рис. 2.9. Влияние MYB генов на синтез антоцианов и окраску цветков

Таким образом, для окраски цветка используется как минимум 4 разных гена из MYB семейства, при этом основа транскрипционного комплекса общая (белок WD40 и bHLH).

Те же самые гены влияют и на накопление антоцианов в вакуолях. Этот процесс невозможен без подкисления вакуолей, за что отвечают гены:

- PH1 – H⁺-АТФаза, P_{3В}-типа, похожая на Mg-АТФазу бактерий
- PH3 – WRKY-FT
- PH4 – R2R3-MYB участвует в создании транскрипционных комплексов вместе с WD40 и bHLH, регулирует процессы, связанные с вакуолью. После сборки комплекса он включает гены вторичного ответа (PH3), а затем гены-эффекторы, которые отвечают за закисление вакуоли (PH1 и PH5)
- PH5 – H⁺-АТФаза P_{3А}-типа
- PH6 – аллель гена AN1 (bHLH)

Сборка транскрипционного комплекса запускает не отдельные процессы, а выполняет физиологическую задачу (окрашивание венчика) целиком:

- синтез антоцианов (начиная с PAL) – мишени: ферменты фенилпропаноидного и флавоноидного путей
- регуляция pH вакуоли (ацидификация). pH6 – аллель гена AN1. Мишени: PH5 и PH1. Благодаря закислению вакуолей происходит накопление антоцианов в большом количестве и регулируется оттенок цвета.
- транспорт антоцианов в вакуоль – мишень: AN9 – глутатион-S-трансфераза
- стабильность антоцианов к выцветанию

Если растение опыляется ночными насекомыми, то у него работает транскрипционный комплекс с другими факторами транскрипции: **ODORANT1 (ODO1)** и **EMISSION OF BENZENOIDS I и II (EOBI и EOBI)**, которые переключают фенольный метаболизм с биосинтеза антоцианов (т.е. окрашивания лепестков) на биосинтез летучих соединений, создающих приятный аромат петунии (ванилин, бензилбензоат, метилбензоат, изоэвгенол, эвгенол и т.д.). Также данные факторы транскрипции активируют один из ABC транспортёров плазмолеммы, что способствует выведению этих летучих веществ на поверхность лепестков и усилению запаха.

WRKY motif protein (Trp-Arg-Lys-Tyr): формируют Zn-связывающий домен. Часто включаются *после* формирования Myb-bHLH-WD40. Предполагают либо совместное участие с этим комплексом в дальнейшей регуляции процессов, либо самостоятельное включение генов-мишеней (targets).

Ремоделинг хроматина

Далеко не все факторы транскрипционного комплекса непосредственно связаны с ДНК. Транскрипционные кофакторы связываются через белок-белковые взаимодействия. За счёт таких кофакторов могут привлекаться и рекрутироваться дополнительные белки, которые участвуют в изменении конформации хроматина. Если ген нужно включить, то изменения идут в одну сторону, а если выключить – в другую.

- **Метилирование ДНК.** Метильная метка означает, что данная последовательность должна снизить свою активность (гены в метилированном состоянии менее активны, чем в деметилированном)
- **Ацилирование гистонов** влияет на степень упаковки нуклеосом и на их взаимодействие с ДНК
- **Некодирующие РНК.** Узнавание ДНК последовательности по участку гомологии с некодирующей РНК, хроматин ремоделируется, участок ДНК уплотняется и перестаёт использоваться.
- **АТФ-зависимый ремоделинг ДНК.**
 - сборка нуклеосом – появляются новые гистоны, вокруг которых оборачиваются свободные участки ДНК и собираются новые нуклеосомы

- слайдинг – скольжение нуклеосомы относительно двух других нуклеосом без потери связи с ДНК
- выселение – нуклеосомы могут разбираться, гистоны выбрасываются, участки ДНК расплетаются и становятся более активными
- раскручивание – ослабление связи ДНК с гистонами, образуются участки ДНК, способные взаимодействовать с другими белками
- модификация самих нуклеосом – 2 из 4 гистонов могут выбрасываться или заменяться, что влияет на конформацию ДНК

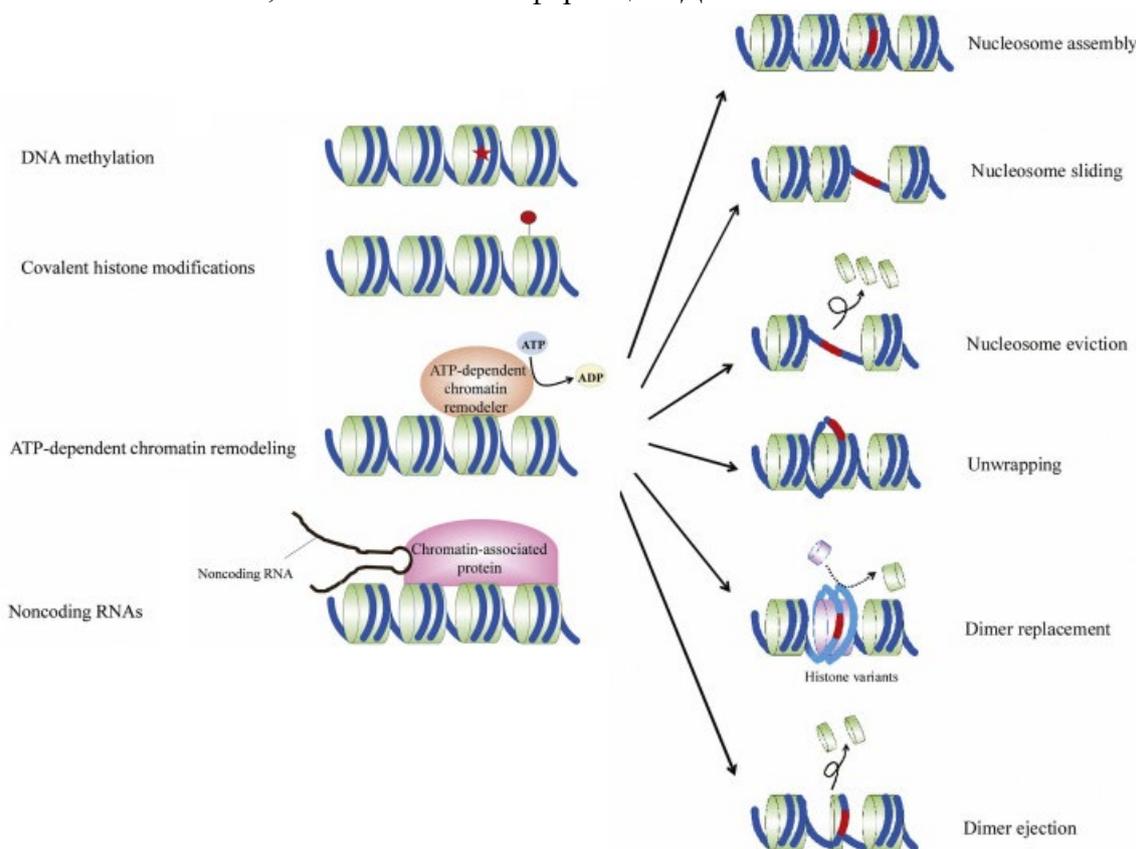


Рис. 2.10. Ремоделинг хроматина

В ДНК есть контекст. Он только начинает изучаться, хотя отдельные явления были открыты достаточно давно. Заплетается и расплетается не вся ДНК сразу, а некоторый участок, который ограничивают **инсуляторы** – участки ДНК, которые разделяют хроматин на функциональные области. Между двумя инсуляторами могут находиться гены, выполняющие сходную функцию. Чтобы активировать эти гены, нужно распрямить петлю, сделать её более рыхлой (рис.), а если гены временно не нужны, то петлю нужно наоборот компактизировать. Существуют факторы ремоделинга хроматина, которые узнают инсуляторы и изменяют конформацию петли. То, что находится за инсулятором – предмет регуляции следующего домена ДНК, там будет уже другой контекст.

Таким образом, единая ДНК образует петли, в основании которых находятся комплексы ремоделинга хроматина. Петли регулируются по отдельности: одна может сгруппироваться, другая стать более рыхлой. Так осуществляется контроль активности генома на уровне контекста. Поэтому большую роль играет генное окружение и расположение инсуляторов.

Сборка факторов ремоделинга хроматина важна для переключения крупных программ развития растений. Например, если репрессировать функции генов семейства PolyComb, то вырастают изуродованные растения (нарушается дифференцировка, возникает смесь из разных тканей). Часто такие изменения оказываются летальны для растений. Если убирать какие-то отдельные компоненты комплекса, то нарушаются переходы из одной фазы развития в другую (рис. 2.11).

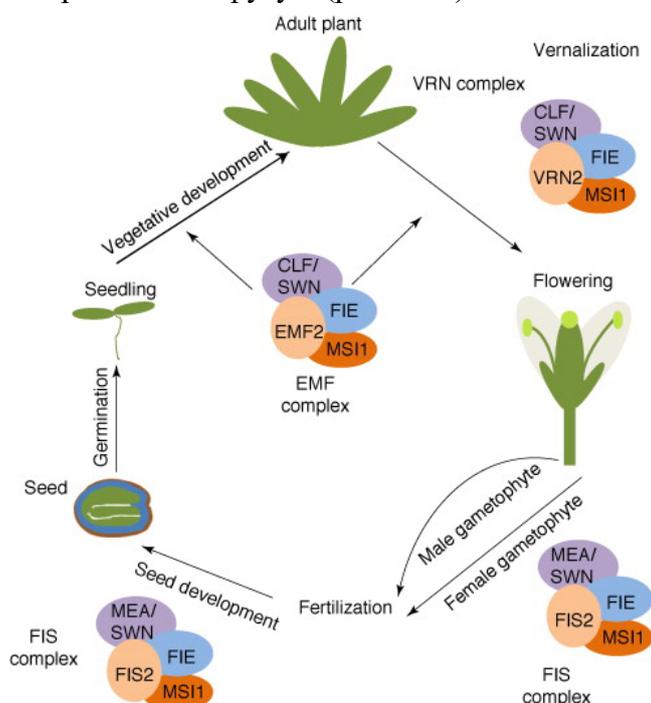


Рис. 2.11. Работа комплекса на разных стадиях жизненного цикла арабидопсиса

Например, для правильного развития зародыша необходимо синхронное развитие эндосперма и семян. Повреждение гена **FIE** (**FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM**) вызывает развитие эндосперма без опыления. Фактор ремоделинга хроматина **FIS2** (**FERTILISATION INDEPENDENT SEED2**) контролирует развитие зародыша после оплодотворения. При его повреждении зародыш развивается без оплодотворения. Для вегетативного развития важен фактор **EMF2** (**EMBRYONIC FLOWER2**). Если он повреждён, то после семядолей сразу развивается цветок. Контроль физиологического перехода от зимнего состояния к весеннему (вернализация, яровизация, а также стратификация семян) с последующим прорастанием либо цветением тоже осуществляется за счёт укладки хроматина. Важную роль в этом играет фактор **VRN2** (**VERNALIZATION2**).

Лекция 3. Трансформация растений

Агробактериальные опухоли. Биохимическая специфика опухолей

Трансформация растений – это стандартный метод для получения генетически модифицированных растений. Наиболее разработан метод агробактериальной трансформации.

Бактерии могут вызывать раковые опухоли у растений.

- *Agrobacterium tumefaciens* вызывает болезнь корончатого галла (crown gall), которая возникает обычно в корневой системе, но в дальнейшем бактерии могут распространяться по растению и образовывать галлы в новом месте. Опухоли являются злокачественными. Даже если удалить бактерии с помощью антибиотика, рост опухоли всё равно продолжается.

- *Agrobacterium rubi* – возбудитель корневого рака малины.

- *Agrobacterium rhizogenes* – возбудитель болезни «косматого» или «бородатого» корня. В таких корнях нарушен геотропизм (растут в разные стороны) и развивается очень много корневых волосков. Заболевание может проявляться мягко, иногда из повреждённого корня могут возникать побеги, и растение нормализуется.

- *Agrobacterium vitis* – возбудитель болезни корончатого галла на винограде.

Агробактерии относятся к грамм-отрицательным почвенным сапротрофным бактериям из семейства Rhizobiaceae. Патогенные свойства начинают проявляться, только если рядом появляется повреждённое потенциальное растение-хозяин, обычно двудольное. При повреждении клеточной стенки (механическое повреждение корневой системы при пересадке, вредителями, сильным ветром), появляется свободная глюконовая кислота, глюкоза, арабиноза и ацетосирингон (фенольное соединение). Эти вещества служат хемоаттрактантами для бактерий.

Опухоли содержат специфические вещества – **опины**. Это продукт конденсации двух молекул (в самом простом варианте аминокислот и кетокислот). Каждый вид и даже штамм агробактерий обладает собственным опином, например:

- нопалин = аргинин + кетоглутарат (*Agrobacterium tumefaciens*);
- октопин = аргинин + пируват (*Agrobacterium rhizogenes*). Октопин сначала был выделен из мышц осьминога, он обнаружен также в морских гребешках. Он возникает в условиях гипоксии, играет роль молочной кислоты.
- кукумолин – на основе аденина (опухоль винограда)
- агроцинопин А = сахароза + L-арабиноза
- агроцинопин В = фруктоза + L-арабиноза
- маннопин = манноза + глутамин

Типов опинов сравнительно немного, но в опухоли одновременно разные типы обычно не встречаются. Поэтому между агробактериями существует конкуренция (если растение поражено одним штаммом, то другой уже не может его повторно заразить).

Опины не разлагаются в организме растения. Это приводит к тому, что из метаболизма растений выводятся определённые элементы питания: продукты фотосинтеза (аминокислоты, кетокислоты, сахара), элементы минерального питания (азот, фосфор). Растение начинает бороться с дефицитом, направляет в опухоль новые порции питательных веществ, но клетки снова переводят их в опины.

Каждый тип опинов может разрушаться только внутри клеток соответствующих агробактерий. Небольшая способность переваривать опины обнаружена у некоторых грибов. Они дают вторичную инфекцию, поселяясь в трещинах опухоли, которая в результате этого начинает загнивать. Никаким другим организмам опины не доступны.

Гормон-независимый рост опухолей

Агробактерии вызывают гормон-независимый рост. Опухоль могут расти автономно, без добавления ауксинов и цитокининов (она продуцирует их самостоятельно). Опухоль пронизывается проводящими тканями (ксилемой и флоэмой), благодаря чему растущие участки опухоли обильно снабжаются элементами минерального питания и продуктами фотосинтеза.

Способность агробактерий вызывать злокачественный рост обусловлена тем, что у них имеется достаточно крупная **Ti-плазмида** (**Tumor inducing**). Для проявления вирулентных свойств необходимы гены из **Vir-области**. **T-район** плазмиды (**Transfer**) – это фрагмент ДНК, содержащий онкогены, который под воздействием продуктов Vir-области копируется, перемещается в клетку хозяина и интегрируется в её геном (именно поэтому удаление самой бактерии не останавливает рост опухоли).

Свойства Ti-плазмиды:

- Размер около 200 kb. Она достаточно крупная и не отделяема от основного генома агробактерий, что усложняет генно-инженерные манипуляции с ней.
- Низкая копияность (обеспечивается и контролируется ориджином репликации **ori R**) также осложняет препаративное выделение. Более того, Ti-плазмида имеется примерно у 5% бактерий в популяции, так как по мере деления клеток она часто теряется.
- Трансмиссивная (есть механизм переноса). Она кодирует F-пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой копия плазмидной ДНК передаётся из одной клетки в другую (горизонтальный перенос генов). В результате такого конъюгативного переноса клетка-реципиент получает донорские свойства. Ti-плазмида начинает этот процесс, если рядом есть повреждённый потенциальный хозяин. В результате процент вирулентных клеток в популяции начинает резко возрастать.
- Селективное преимущество для развития внутри образованных опухолей

Семейство Rhizobiaceae. Виды Agrobacterium

Тип плазмиды определяет круг потенциальных хозяев.

Патогенные:

- *Agrobacterium tumefaciens* – широкий круг хозяев среди двудольных, вызывает болезнь корончатого галла (Ti плаزمид: T-район)
- *A. rhizogenes* – широкий круг хозяев среди двудольных, вызывает болезнь «бородатого» или «косматого» корня (Ri-плазмид: T_L + T_R районы)
- *A. rubi* – поражает малину (*Rubus idaeus*), корневой рак (Ti-плазмид: T_A + T_B + T_C районы)
- *A. vitus* – поражает виноград (*Vitis vinifera*)

Непатогенный вид:

- *A. radiobacter* – обитатель ризосферы растений, не содержит плазмид

Симбионтные:

Rhizobium leguminosarum (с горохом), *Rhizobium phaseoli* (с фасолью), *Rhizobium meliloti* (с донником), *Rhizobium trifolii* (с клевером), *Bradyrhizobium japonicum* (с соей) и др. – несут pSym плазмиды.

Способы борьбы с агробактериями:

1. лабораторный – обработка антибиотиками цефалоспоринового ряда: клафоран, цефomezин, цефазолин – до 500 мг/л. Эти антибиотики нарушают сборку пептидогликанов клеточной стенки бактерий. Пенициллины для этих целей не используются, поскольку они содержатся в составе генно-инженерных конструкций, и у агробактерий есть к ним устойчивость. Метод не годится для массового производства (из-за высоких концентраций и низкой устойчивости антибиотика в среде).

2. конкурентный – обработка корневой системы непатогенными штаммами агробактерий перед посадкой. Способ предложен давно, но не даёт устойчивых результатов

3. бактериофаги – это специализированные вирусы бактерий. В 1975 г. было обнаружено 4 умеренных фага, паразитирующих на агробактериях: PB2A, PB6(omega), PV-1(LV1) и PS8. Позже обнаружены и другие. В 2003 г. в полевом опыте (США) после 7 месяцев культивирования в 2 из 3 вариантов число корончатых галлов заметно уменьшилось (в каждом варианте – по 70 саженцев лесного ореха). Это один из наиболее перспективных способов

Генетические функции Ti-плазмид

Основные гены Ti-плазмиды представлена на рис. 3.1.

- Ориджин репликации необходим, чтобы плазмида могла реплицироваться. Он не очень активный, что поддерживает низкую копияность.
- Vir-гены собраны в Vir-регион. Большинство из них «молчат». Всё время экспрессируются VirA и VirG.
- T-район обрамлён двумя прямыми повторами (левым и правым). Они позволяют вырезать ДНК, создать её копию и транспортировать в клетку хозяина.

- В T-районе сосредоточены гены синтеза опинов, а также онкогены, которые контролируют биосинтез ауксинов и цитокининов в опухоли, обеспечивают гормон-независимый рост.
- Конъюгативный транспорт обеспечивается определённой последовательностью в Ti-плазмиде. Он отвечает за перенос и распространение Ti-плазмид среди других клеток агробактерий.
- Ген опинового катаболизма соответствует гену опинового синтеза так, чтобы синтезированное в клетках растений вещество могло впоследствии переработаться.

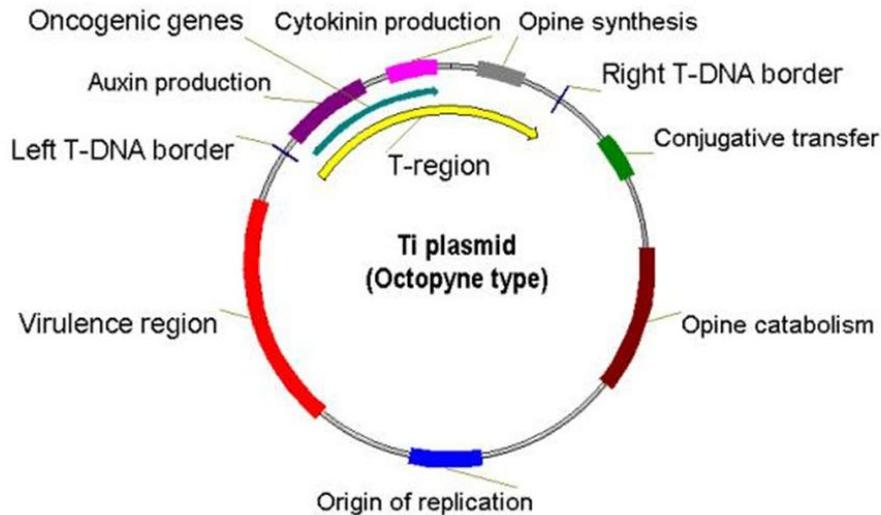


Рис. 3.1. Ti-плазида

Узнавание метаболитов растения. Адгезия агробактерий

Ацетосирингон узнаётся с помощью белкового продукта гена *Vir A* (рис. 3.2).

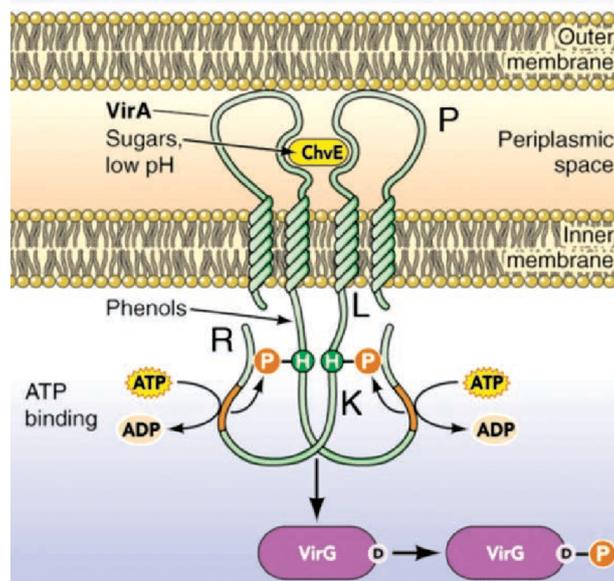


Рис. 3.2. Двухкомпонентная система *VirA/VirG*

VirA расположен на внутренней клеточной мембране, где он существует в виде димера. **ChvE** (нуклеотид) связывает галактуроновую кислоту, глюкозу и арабинозу, повышая чувствительность VirA. Это ко-рецептор. **VirA** (Ti-плазмида) узнаёт ацетосирингон и другие фенольные соединения. Это гистидин-киназа. **VirG** (Ti-плазмида) переносит фосфор на остатке аспарагиновой кислоты. Это фактор транскрипции и фосфотрансмиттер.

Справа и слева от T-района расположены консервативные последовательности из 25 нуклеотидов, которые узнаются и разрезаются комплексом из двух нуклеаз **VirD1/VirD2**. Брешки достраиваются, цепочка замыкается и процесс повторяется. То есть с одной плазмиды можно сделать множество копий ДНК T-района.

Два механизма адгезии агробактерий:

1. Unipolar Polysaccharide (UPP) – на поверхности клеточной стенки агробактерий неравномерно распределён униполярный полисахарид. Агробактерии принимают вертикальное положение, UPP локализован в месте контакта с хозяином.
2. Неполярное прикрепление (в том числе боком) характерно для мутантов по UPP

Транспорт оц-ДНК и белков. Взаимодействие с хозяином

ДНК пересекает несколько границ:

1. Внутренняя мембрана бактерии
2. Периплазматическое пространство (с пептидогликаном)
3. Внешняя мембрана бактерии
4. Клеточная стенка растения
5. Плазмалемма
6. Цитозоль
7. Ядерная мембрана

Транспортный комплекс содержит белки, которые обеспечивают преодоление барьеров и проникновение в цитоплазму растения-хозяина (**VirB1 – VirB11, VirD4**):

- **VirB26 VirB5** – внешняя пиля
- **VirB7, VirB9** – образуют пору во внешней мембране
- **VirB1** – гидролиз пептидогликана
- **VirB8, VirB10** – канал в периплазматической части
- **VirB3, VirB6** – белки внутренней мембраны
- **VirB4, VirB11, VirD4** – АТФазы (в виде гексамеров)

Иммунный ответ растения:

- узнавание патогена расположенными на плазмалемме рецепторами к флагеллину и фактору элонгации Tu.
- передача сигнала через MAP-киназный каскад
- фосфорилирование белка-мишени **VIP1** (фактор транскрипции)
- передача сигнала в ядро и включение генов иммунного ответа

- иммунная реакция

Что транспортируется в растение:

- VirD2+Т-ДНК – интеграция в геном, несёт Nuclear Location Signal
- VirE2 – защита ДНК от нуклеаз + Nuclear Location Signal (как и VirD2)
- VirE3 – помогает транспорту Т-ДНК в ядро
- VirF – компонент убиквитинлигазного комплекса (деградация белков иммунного ответа растений)
- VirD5 – стабилизирует VirF

Т-ДНК встраивается в геном растения и становится его частью. Некоторые копии Т-ДНК могут не встроиться в геном, но проявлять генетическую активность в течение нескольких дней – транзистентная трансформация. При делении Т-ДНК будет утрачена, если она не интегрирована в геном

Гены в Т-районе находятся под эукариотическими промоторами и начинают экспрессироваться только после встраивания в растение. Основными являются гены биосинтеза ауксина, цитокинина и опинов.

Синтез гормонов в опухоли

Большинство генов Т-ДНК активируются только после её встраивания в геном растения. Их продукты и вызывают образование корончатого галла.

Синтез индолилуксусной кислоты (ИУК) из триптофана у растений происходит в 3 этапа: декарбоксилирование, дезаминирование и окисление. Бактерия может сделать это в 2 этапа. Гены **iaaM** и **iaaN**, известные также как **tms1** и **tms2** соответственно, кодируют ферменты, принимающие участие в синтезе растительного гормона ауксина (индолилуксусной кислоты). Ген **iaaM** кодирует фермент триптофан-2-монооксигеназу, которая катализирует окислительное декарбоксилирование – превращение триптофана в индолил-3-ацетамид. Ген **iaaN** кодирует фермент индолил-3-ацетамидгидролазу, катализирующую образование индолилуксусной кислоты из индолил-3-ацетамида путём дезаминирования (рис. 3.3, А).

Гены **iaaM/iaaN** часто встречаются у бактерий RGPB-группы: *Rhizobium*, *Pseudomonas savastanol*, *Erwina herbicola* и др. Эти бактерии взаимодействуют с растениями и модифицируют их рост с помощью ауксина. Опухоль внешне похожа на корончатый галл. Пока жива бактерия, она производит ауксин, под воздействием которого клетки делятся. Однако лечение антибиотиками останавливает рост такой опухоли, то есть она доброкачественная.

Кроме того, Т-ДНК несет ген **tmr** (известный также как ген **iptZ**), кодирующий изопентилтрансферазу – фермент, который катализирует присоединение к 5'-АМР изопреноидной боковой цепи с образованием цитокининов изопентениладенина и изопентениладенозинмонофосфата (рис. 3.3, Б). При гидроксировании этих соединений растительными ферментами образуются цитокинины трансзеатин и трансрибозилзеатин соответственно. Есть гомолог этого гена – *транс-зеатинсинтаза*

(*tzs*), который расположен на T_i плазмиде рядом с Vir-областью. Это означает, что помимо синтеза в опухоли, агробактерия ещё и сама продуцирует часть трансзеатина.

Гены *iptZ* часто встречаются у бактерий RGPB-группы: *Pseudomonas savastanol*, *Xanthomonas oryzae* и др.

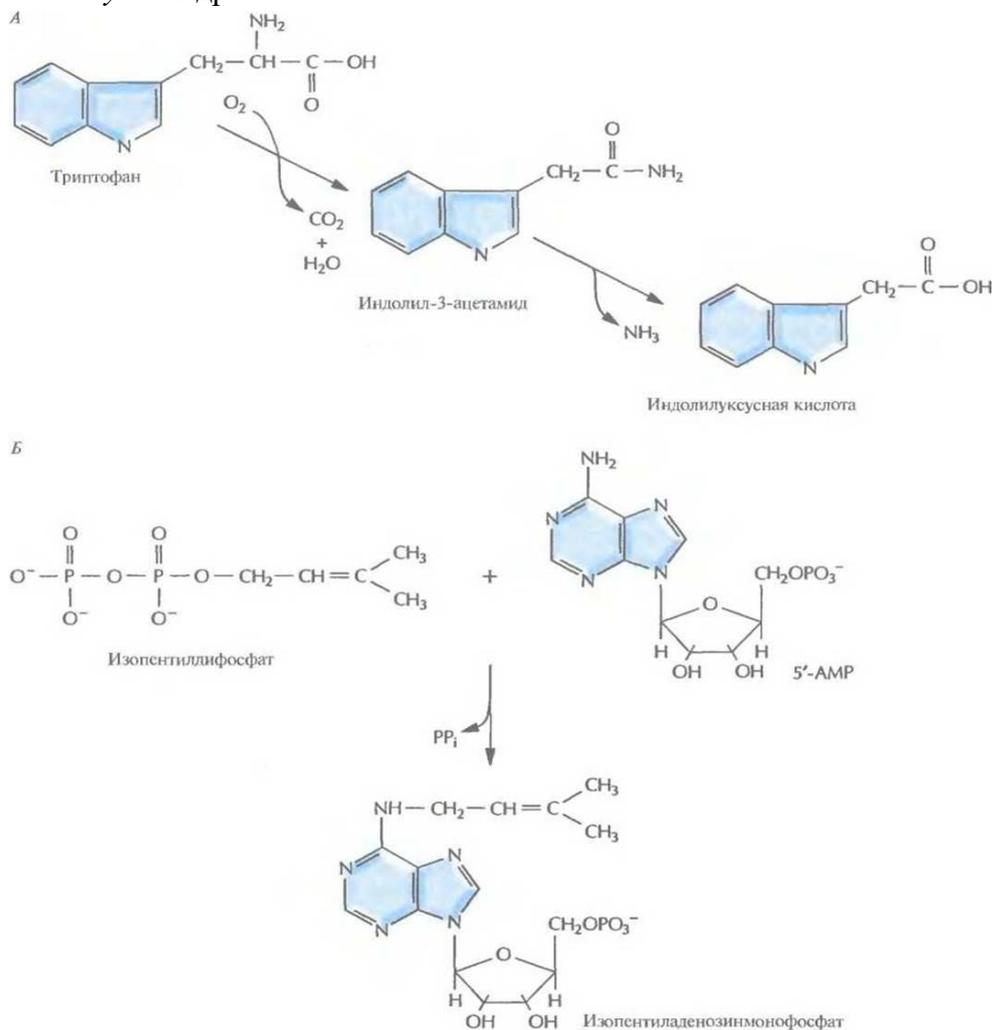


Рис. 3.3. Биосинтез ауксина (А) и цитокинина (Б).

И ауксин, и цитокинины регулируют рост и развитие растительной клетки, но, присутствуя в избытке, могут вызывать у растений образование опухолей, таких как корончатый галл.

Кроме генов ауксина и цитокинина, T-ДНК каждой специфической T_i-плазмиды содержит локус **tml**, детерминирующий синтез соединения из класса опинов. Опины – это уникальные продукты конденсации amino- и кетокислот или аминокислот и сахаров. Они синтезируются в корончатом галле, а затем секретируются. Чтобы опин пересёк клеточную мембрану и оказался во внешней среде, необходим ген *ba* из локуса *tml* (опин-пермеаза). Ген *6b* из этого же локуса оказался онкогеном, который способен перемещаться по растению и вызывать симптомы в новых местах.

Опины могут использоваться как источник углерода (а иногда и как источник азота) любой *A. tumefaciens*, которая несет в Ti-плазмиде гены катаболизма соответствующего опина, локализованные вне T-ДНК. Большинство других исследованных почвенных микроорганизмов не способны использовать опины как источник углерода. Таким образом, в процессе эволюции выработался уникальный набор механизмов, посредством которых каждый штамм *A. tumefaciens* генетически трансформирует растительные клетки в «биологические фабрики» по производству соединений углерода, использовать которые могут только сами эти бактерии.

Гены *rol*. Практическое использование Ri-плазмид

Рассмотренные выше механизмы характерны для *A. tumefaciens*, у других более специализированных бактерий всё гораздо сложнее.

У Ri-плазмиды агропинового типа (рис. 3.4) T-район разделён на 2 участка: левый (TL-DNA) и правый (TR-DNA). Биосинтез ауксина и цитокинина сосредоточен в правом участке. Если сделать крупную делецию и удалить практически весь правый район, агробактерия всё равно сохранит свои патогенные свойства за счёт левого участка. В нём нет генов биосинтеза гормонов, зато содержатся гены **root locus** (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*), вызывающие ризогенез, а также несколько генов неизвестного назначения (*orf8*, *orf12*, *orf14*, *orf18*). Существуют кукумопиновые и манопиновые Ri-плазмиды, которые вообще не содержат T-район (то есть нет генов, отвечающих за биосинтез ауксинов и цитокининов).

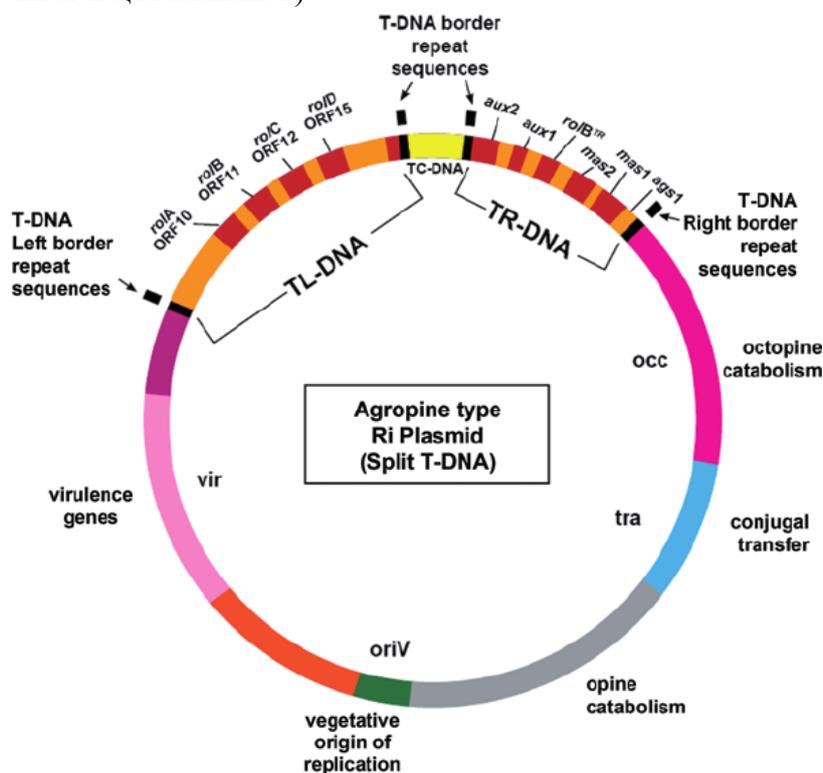


Рис. 3.4. Ri-плазмида агропинового типа

- **rolA** – сильно снижает уровень многих гормонов (ИУК, цитокининов, гиббереллина, АБК). Но при этом растёт чувствительность к ауксинам.
- **rolB** – увеличивает чувствительность к ауксину
+**orf13** – ризогенез почти такой же, как от всего TL
- **rolB_{TR}** – более слабый гомолог из «правой» T-ДНК
- **rolC** – функция дискуссионна. Предполагали, что это гликозидаза цитокинин-гликозидов, которая повышает уровень свободных цитокининов. Понижает чувствительность к ауксину, гиббереллину, АБК, но повышает чувствительность к цитокининам. На экспрессию влияет сахароза.
- **rolD** – уменьшает ризогенез. Предполагаемая функция – биосинтез пролина из орнитина

Применение Ri-плазмид:

1. Культура неограниченно растущих корней (для получения ценных вторичных метаболитов)
2. Исследование взаимодействия микоризных грибов с корнями
3. «Разоружение» Ti-плазмид: исключение из T-района онкогенов *iaaH*, *iaaM*, *ipt*; включение генов интереса, маркерных и репортерных генов.

Агробактериальная трансформация растений

Исследователи из Бельгии Марк ван Монтагю и Джеф Шелл предложили использовать агробактериальную трансформацию для клонирования генов белка бразильского ореха, которые затем можно вставить в геном сои с целью улучшения свойств соевого белка с точки зрения применения его в пищевой промышленности. Ещё одна перспектива применения агробактериальной трансформации – это создание устойчивых к гербицидам растений, что позволит снизить затраты на борьбу с сорняками.

В настоящее время агробактериальная трансформация широко используется в сельском хозяйстве и генной инженерии растений.

Поскольку клонирующие векторы не содержат генов *vir*, они сами не способны обеспечивать транспорт и интеграцию T-ДНК в клетки растения-хозяина. Чтобы решить эту проблему, было разработано два подхода.

Первый подход основан на гомологичной рекомбинации (рис. 3.5, А). В кишечной палочке нарабатывают вектор, имеющий гомологию с Ti-плазмидой и содержащий гены интереса. Векторная ДНК рекомбинирует в *A. tumefaciens* с «разоруженной» Ti-плазмидой, T-ДНК которой не несет опухолеродных генов. Таким образом, весь клонирующий вектор встраивается в неонкогенную Ti-плазмиду (рис. 17.6, Б). Неонкогенная Ti-плазида содержит *vir*-гены, необходимые для переноса T-ДНК в растительную хозяйскую клетку. Таким образом генетически сконструированный участок T-ДНК может быть перенесён в растительные клетки.

Однако это достаточно случайный и слабо контролируемый процесс, поэтому данный метод сейчас имеет историческое значение.

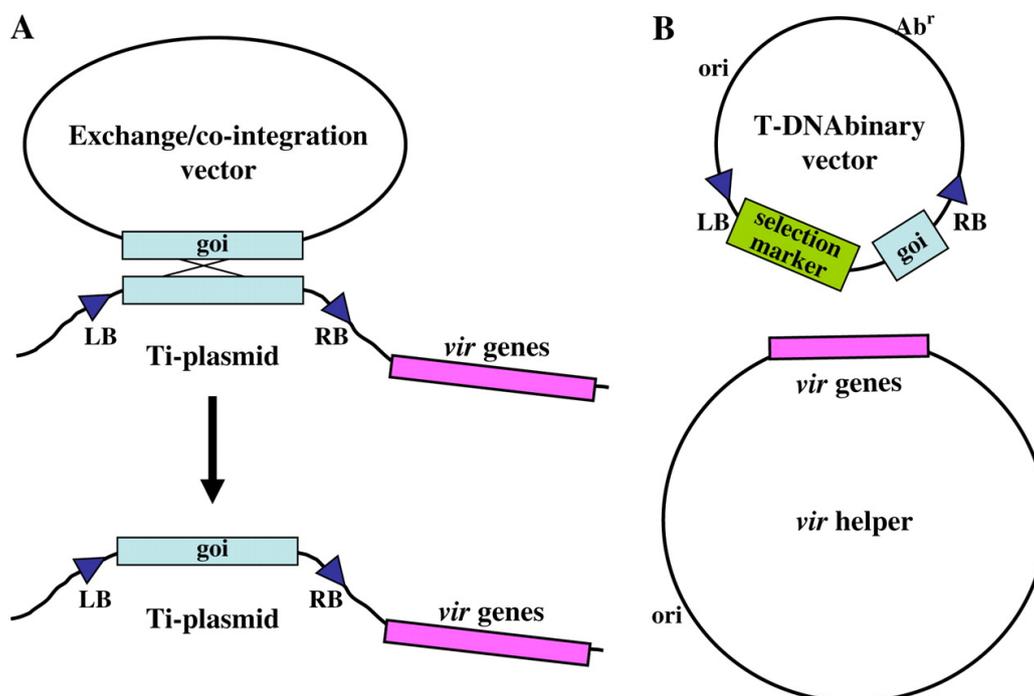


Рис. 3.5. Векторные системы на основе Ti-плазмид

Сейчас Ti-плазмиды делят на 2 компонента: плаزمид хелпер, содержащая *vir*-область, и вектор, содержащий гены интереса (рис. 3.5, В). Неонкогенная Ti-плазмид-хелпер продуцирует белки, кодируемые *vir*-генами, и выступает в роли помощника, способствуя встраиванию Т-ДНК из вектора в хромосомную ДНК растения. Чтобы опознать эту плазмиду, её маркируют геном устойчивости к антибиотику рифампицину. Бактерию содержат на среде с антибиотиком, чтобы она сохраняла свои вирулентные свойства. Отдельно создаётся небольшая кольцевая молекула – бинарный вектор. Все стадии клонирования проводят в *E. coli*, а затем вектор вводят в *A. tumefaciens*. Продукты *vir*-генов плазмиды-хелпера будут взаимодействовать с правой и левой границами Т-района в векторе. Таким образом Т-район будет переноситься в растение. Чтобы гарантировать интеграцию всей конструкции и повысить эффективность трансформации, селективный маркер располагают ближе к левой границе, а гены интереса ближе к правой. Это связано с тем, что 5'-конец (правый) хорошо защищён от нуклеарных атак, а левый конец часто утрачивается.

В качестве **маркерных (селективных) генов** используют гены устойчивости к хлорамфениколу, канамицину (*npt III*, для двудольных), гигромицину (для риса), фосфинотрицину (для кукурузы), глифосату.

Сильные промоторы: 35SCaMV (35S) из вируса мозаики цветной капусты, гена нопалинсинтазы (*nos*) из *Agrobacterium*, гена убиквитина из кукурузы, гена актина из риса.

В качестве **репортерных генов** – ген глюкуронидазы (GUS или Uid), ген зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Биобаллистика («генная пушка»)

Системы переноса генов с помощью *A. tumefaciens* эффективно работают только в случае некоторых видов растений. В частности, однодольные растения, включая основные зерновые культуры (рис, пшеницу и кукурузу), практически не трансформируются *A. tumefaciens*. Поэтому были разработаны другие методы переноса генов в растительные клетки.

Бомбардировка микрочастицами, или биобаллистика – наиболее многообещающий метод введения ДНК в растительные клетки. Золотые или вольфрамовые сферические микрочастицы диаметром 0,4-1,2 мкм покрывают ДНК, осажденной CaCl_2 , спермидином или полиэтиленгликолем, и «выстреливают» ими в клетки из специального «ружья», приводимого в действие газами, образующимися при сгорании пороха, сжатым воздухом или гелием. Частицы разгоняются до скорости 300-600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны растительной клетки. При этом часто повреждается вакуоль. Если она разрывается, то клетка гибнет, поэтому обстреливать нужно мягко. Бомбардировку микрочастицами можно использовать также для введения чужеродной ДНК в хлоропласты и митохондрии. Попав в клетку, ДНК, покрывавшая частицы, интегрируется в растительную ДНК.

Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов, в том числе однодольные и хвойные, в которые не удаётся ввести ДНК с помощью *Agrobacterium*.

Метод используется не только для получения генно-инженерных растений. Существуют портативные генные пушки. Они используются, когда необходимо получить транзистентную экспрессию, а интеграция в геном не важна.

Как интеграция, так и экспрессия чужеродных генов может зависеть от конфигурации вектора, используемого для их введения. Например, частота трансформации повышается, если используется линейная, а не кольцевая ДНК. Кроме того, при бомбардировке микрочастицами высокомолекулярные плазмиды (>10 т. п. н.) могут фрагментироваться, поэтому уровень экспрессии чужеродных генов окажется ниже, чем в случае плазмид меньшего размера.

Один из дешёвых, но низкоэффективных методов – физический надрез ДНК с помощью очень тонких острых волокон. Именно поэтому асбестовая пыль является потенциальным мутагеном. Один из таких материалов, способных вносить разрезы в ДНК – карбид кремния. В раствор чужеродной ДНК добавляют суспензию карбида кремния до определённой концентрации, затем добавляют трансформируемые клетки и резко взбалтывают. При этом происходит прокалывание клеток, разрез ДНК, и с некоторой вероятностью чужеродная ДНК будет встраиваться в эти клетки. В последнее время карбид кремния чаще заменяют углеродными наноматериалами.

Лекция 4. Использование трансгенных растений в исследованиях

Инсерционный мутагенез

Инсерция (вставка) фрагмента ДНК в геном приводит к мутации. Инсерционный мутагенез – это введение в целевой ген нуклеотидных последовательностей мобильных генетических элементов и Т-ДНК с целью получения линий с изменённой экспрессией целевого гена. Эта стратегия получила широкое применение для создания растений с изменённым метаболизмом и невосприимчивых к стрессовым воздействиям.

Транспозоны – это подвижные элементы генома, способные перемещаться внутри одной хромосомы. При встраивании транспозона в кодирующую последовательность гена, наблюдается мутантный фенотип. При вырезании фенотип восстанавливается. При удалении транспозазы конструкция будет стабилизирована в новом месте.

Гиперэкспрессия

Гиперэкспрессия (оверэкспрессия) – это экспрессия с сильных промоторов во всех тканях растения. Самые используемые промоторы: **p35S_{CaMV}** (из вируса мозаики цветной капусты), **pFMV** (вирус мозаики норичника), **pCmYLCV** (вирус жёлтого скручивания листьев цестровых).

Эти промоторы хорошо работают в двудольных объектах, идеально в паслёновых. Для других объектов они могут быть недостаточно активными, поэтому используют промоторы генов домашнего хозяйства (house-keeping): **pAtACT 2** (промотор гена актина из *Arabidopsis thaliana*), **pUBI 10** (промотор гена убиквитина), **pRBCS 3A** (промотор гена малой субъединицы RubisCO, для фотосинтезирующих тканей), **pLHCA 3** (промотор гена светособирающего комплекса, для фотосинтезирующих тканей). Два последних гена работают не постоянно, а имеют суточную динамику – активируются на свету, а в тёмное время суток неактивны.

Биоинформатический подход используется для анализа последовательностей промоторов, поиска консенсусных регуляторных боксов (RE), дизайна синтетических промоторов (ауксин-зависимый **pDR5**, группа конститутивных **pMinSyn**).

Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа (RubisCO) – самый главный фермент на планете Земля, который нарабатывается в хлоропластах. Поэтому при трансгенезе пластид используется промотор большой субъединицы RubisCO – **rbcl**.

Анализ структуры промотора

Ботаник Нам-Хай Чуа предложил метод анализа промоторов с помощью генной инженерии. Он взял ядерный промотор малой субъединицы RubisCO (RBC S), прикрепил к нему ген устойчивости NPT II, а затем стал укорачивать промотор. Таким образом был получен ряд трансгенных растений с промоторами разной длины (то есть

серия делеций в промоторном участке + кодирующая часть репортерного гена). Учёный исследовал, в каких из них будет проявляться неомицин-фосфотрансферазная активность. В результате в 33 bp от ТАТА-бокса был обнаружен регуляторный цис-элемент, отвечающий за световую активацию гена RBC S. Если эта последовательность удалена, то ген перестаёт реагировать на свет.

Анализ паттернов экспрессии промоторов (репортёр)

В качестве репортерного гена часто используется глюкуронидаза (GUS или Uid) из *E.coli*, которая способна расщеплять глюкуроновые кислоты и их эфиры. Для выявления ферментативной активности синтезируют искусственный гликозид (5-бromo-4-хлоро-3-индолилглюкуронид – X-Gluc). Если глюкуронидаза активна, то глюкуроновая кислота отщепляется, bromo-хлоро-производное димеризуется и выпадает в осадок, образуя синее окрашивание, по которому можно судить об экспрессии разных промоторов в различных частях растения. Недостаток этого метода в том, что растение нужно фиксировать, то есть повторно использовать его в экспериментах уже нельзя.

Кроме того паттерны экспрессии можно изучать в зависимости от какого-то воздействия. Табак трансформировали конструкцией, в которой глюкуронидаза поставлена под промотор фенилаланин-аммиак-лиазы. Фенилаланин-аммиак-лиаза стоит в начале фенилпропаноидного пути, который приводит к салицилатам, которые контролируют иммунный ответ растения на биотрофные инфекции. Этот путь запускается, когда растение борется с инфекцией. Если растение устойчиво к инфекции, то оно развивает мощную иммунную реакцию: на месте заражения включается ген фенилаланин-аммиак-лиазы и инфекция останавливается. Если растение не устойчиво, то инфекция успевает пройти через барьеры и иммунная реакция не запускается (растение «не видит» патоген).

Использование флуоресцентных белков в качестве репортёров позволяет следить за экспрессией в процессе развития, не убивая объект. Зелёный флуоресцентный белок **GFP** был впервые обнаружен у глубоководной медузы *Aequorea victoria*. Данный белок ставят под изучаемый промотор и через некоторое время наблюдают свечение под действием синего света в тех частях растения, где экспрессируется данный промотор. Недостаток метода состоит в том, что слишком сильное и частое облучение возбуждающим светом может быть токсичным и приводить к гибели клеток. Тем не менее, это гораздо более мягкий репортёр, чем глюкуронидаза.

В процессе созревания GFP происходит объединение 3-х аминокислот: серин, тирозин и глицин. При замене аминокислот спектр излучения меняется. Например, если тирозин заменить на гистидин, получится синий флуоресцентный белок **BFP**, а если на триптофан – **CFP**. Можно менять белковое окружение: если добавить дополнительную электронную плотность в виде тирозина, получается жёлтый

флуоресцентный белок **YFP**. Таким образом, использование модификаций GFP позволяет одновременно следить за несколькими разными процессами в клетке.

В структуре красного флуоресцентного белка **DsRED** есть глутамин, тирозин и глицин. Находясь под сильным промотором **p35S**, DsRED маркирует трансформированные ткани.

В настоящее время существует множество флуоресцентных белков с различным спектром возбуждения и эмиссии. Можно создавать бинарные системы, в которых спектр эмиссии одного флуоресцентного белка пересекается со спектром возбуждения другого (рис. 4.1). Такая FRET технология используется для определения расстояния между двумя флуорофорами по интенсивности свечения.

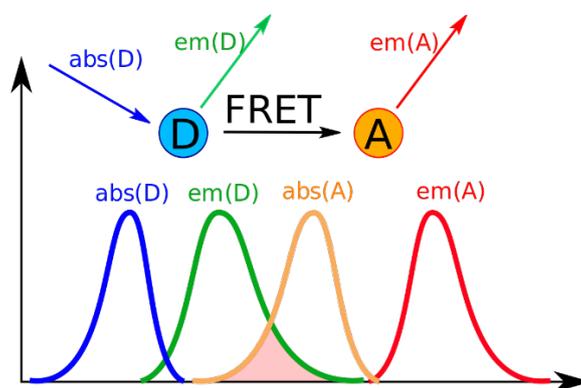


Рис. 4.1. FRET

Существуют белки, которые при определённых условиях способны осуществлять реакции с выделением света (без воздействия возбуждающего света). Один из самых известных – **ген люциферазы светлячков**. При использовании люциферазы в качестве репортёра растение пропитывают светлячковым люциферин, который окисляется с помощью люциферазы с появлением зелёного свечения. Недостаток методики в том, что светлячковый люциферин в больших концентрациях токсичен для растения. Ещё одно перспективное направление – использование люциферазы грибов. Удобство в том, что она работает с производными фенилпропаноидов (в частности с гиспидином), которые могут быть синтезированы из нормальных метаболитов растения (в частности из кофейной кислоты). Кофейная кислота есть и у растений, и у грибов. При переносе генов биолуминесцентной системы из грибов получатся светящиеся растения. При механическом повреждении синтез фенольных соединений усиливается, что можно наблюдать в реальном времени. Свечение неравномерно во времени: есть циркадный ритм и зависимость от стадии жизненного цикла.

Легко визуализируется накопление пигментированных веществ, например, бетацианинов. Беталаин, синтезированный из тирозина (рис. 4.2, а), отправляется в вакуоли и даёт яркую свекольную окраску. Впервые эти вещества были выделены из свеклы, но также они синтезируются у многих центросеменных растений.

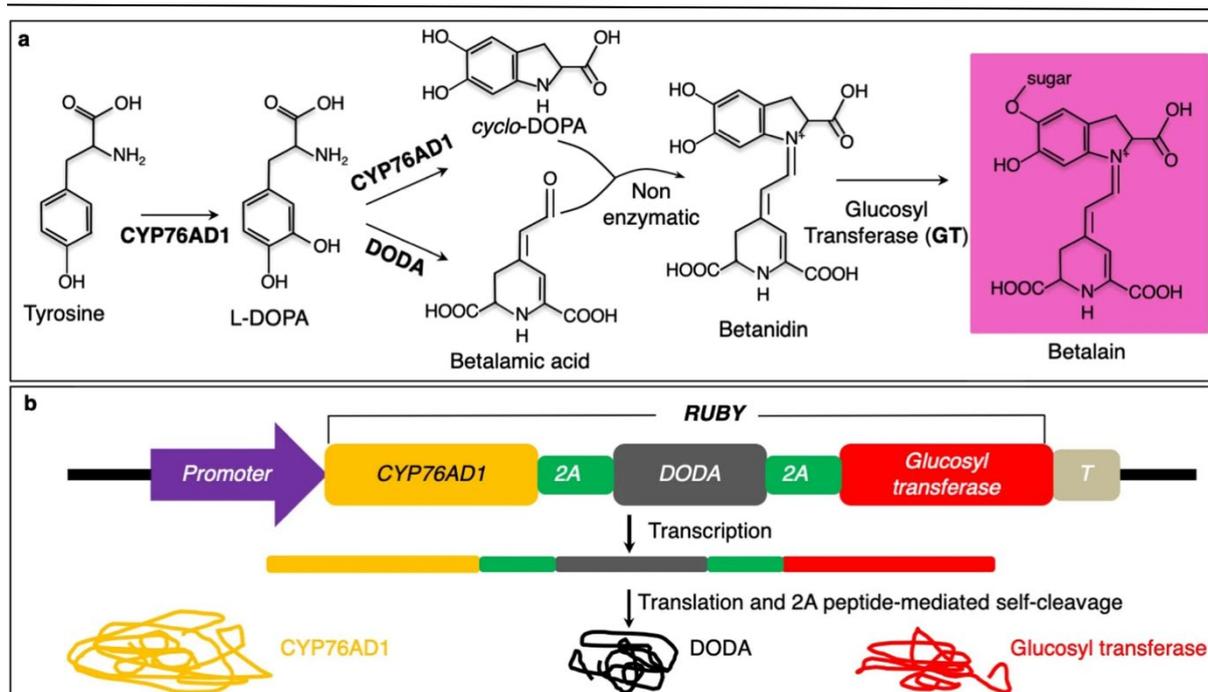


Рис. 4.2. Синтез беталаина из тирозина

Три гена биосинтеза беталаина были объединены в единую открытую рамку считывания, которая может экспрессироваться с использованием единственного промотора и терминатора (рис. 4.2, b). Между генами были вставлены спейсеры, кодирующие пептиды 2A, которые подвергаются саморасщеплению, высвобождая таким образом отдельные ферменты для биосинтеза беталаина. Блок синтеза беталаина может быть передан под контроль исследуемого промотора. Такая открытая рамка считывания генов биосинтеза беталаина, связанных с 2A, называется **RUBY**. Преимущество этого метода в том, что он не требует дополнительных химических агентов, а также специального оборудования для освещения и регистрации свечения. Недостаток конструкции в том, что она реагирует только на включение гена, поскольку бетацианины необратимо аккумулируются в вакуолях, то есть невозможно рассмотреть весь процесс в динамике.

Генетически модифицированные растения, содержащие RUBY, становятся более устойчивыми к серой гнили и стрессам, что перспективно для сельского хозяйства. Кроме того, бетацианины являются полезными для человека антиоксидантами.

Поиск промоторов

С помощью репортёров можно искать новые промоторы. Репортерный ген устойчивости к гигромицину помещали под сильным промотором. Промоторная часть была отделена от кодирующей части вставкой, содержащей ген глюкуронидазы с инвертированными концевыми повторами по краям. Под ещё одним промотором был внедрён ген транспозазы. При успешной транспозиции репортерного гена появлялась

устойчивость к гигромицину. Если конструкция случайным образом встраивается сразу за промоторным участком, то проявляется ещё и глюкуронидазное окрашивание. Таким образом можно «поймать» промоторы, которые экспрессируются в тех или иных частях растения. Так был найден промотор AtML 1 (маркёр поверхностных клеток растения).

Эктопическая экспрессия

Эктопическая экспрессия – это экспрессия гена в других органах и тканях (там, где в норме экспрессии нет). Впервые такое явление наблюдали у кукурузы с мутацией в промоторе гена KNOTTED 1. В норме этот промотор работает только в меристеме, а в случае мутации он не выключался и работал в листьях, где появлялись очаги пролиферации, напоминающие узелки.

Сейчас для ectopic экспрессии используют конструкции, содержащие промотор от одного гена и кодирующую часть от другого гена.

Иногда промотор изучаемого гена может быть достаточно слабым, потому что с него в норме синтезируется небольшое количество продукта. Чтобы зарегистрировать результат активности такого промотора, используют систему из двух линий. Линия-драйвер содержит исследуемый промотор и генно-инженерную конструкцию: разоружённый *lac*-репрессор, который хорошо узнаёт последовательность *lac*-оператора + GAL4-активатор, который активирует транскрипцию у эукариот. Целевая линия содержит несколько повторов *lac*-оператора и кодирующую часть другого гена. Часто эти линии создают отдельно, а затем скрещивают и объединяют в один геном. Если напрямую соединить промотор одного гена и кодирующую часть другого, эффект может быть слабо выражен. Удобство данного метода состоит в том, что последовательность *lac*-оператора в геноме растений отсутствует, то есть получившийся химерный белок будет реагировать только на эту генно-инженерную конструкцию.

Индукцибельная экспрессия

Индукцибельная экспрессия запускается по воле экспериментатора при каком-то воздействии. Для этого используют собственные промоторы растений – промоторы белков теплового шока HSP: HSP18.2 (*Arabidopsis thaliana*), HSP6871 (*Soya hispida*), промоторы белков холодового стресса. Эти промоторы запускают экспрессию под действием определённой температуры. Кроме того используют чужеродные индуцибельные промоторы: алкогольдегидрогеназная система *Aspergillus*, глюкокортикоидная система мыши, эстроген-зависимая система человека, тетрациклиновый оперон, галактозные промоторы дрожжей.

Ответ на повышение температуры (**Heat Shoke**) – усиление функций фолдинга: многочисленные Heat Shoke Proteins (HSP). Их классифицируют по молекулярной массе: HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100. Факторы транскрипции Heat Shoke Factors (HSF) на N-конце несут ДНК-связывающий мотив типа спираль-поворот-

спираль (helix-turn-helix). Они регулируют большинство генов ответа на тепловой шок, в том числе HSPs: А-тип HSF – активаторы транскрипции; В-тип HSF – репрессоры транскрипции; С-тип HSF – функция слабо изучена. В промоторах HSPs есть Heat Shoke Response Elements, HSE: 5'-nGAAnnTTCn-3' или 5'-nTTCnnGAAn-3'. Недостаток в том, что даже при пониженной температуре нужно небольшое количество HSPs, поэтому фактор транскрипции продолжает работать (эффект «подтекания»).

Пример использования индуцибельной экспрессии – цветение эвкалипта. Эвкалипт развивается быстро, но зацветает поздно, что неудобно для селекции. Под промотор белка теплового шока поставлен florigen (запускает образование цветков). После внедрения такой конструкции достаточно нагреть растение в течение нескольких часов, и через 9 недель после такой индукции начинается цветение.

Ответ на понижение температуры (**Cold Stress**) – усиление функций фолдинга, борьба с образованием кристаллов (DEHYDRINs): гены COR 15A, COR 47, COR 78 и т.д. (cold regulated). Частично перекрывается с ответом на засуху (Drought) и засоление. Факторы транскрипции C-repeat/dehydration-responsive element binding factors (CBF/DREB) относятся к AP2/EREBP типу транскрипционных факторов (содержат консервативный ДНК-связывающий AP2-домен из 68 аминокислот). Большое семейство факторов транскрипции CBF1, CBF2 и CBF3 связаны с холодом. В промоторах есть C-repeat/dehydration-responsive element: 5'-CCGAC-3' (C-repeat) и 5'-TACCGACAT-3' (DRE).

Для того, чтобы прекратить эффект «подтекания» используется чужеродная **глюкокортикоидная система**. Линия-драйвер: разоружённый Lac Repressor high affinity DNA-binding (mutant), который хорошо узнаёт последовательность lac-оператора + GR рецептор глюкокортикоидов мыши + GAL4 ДНК-связывающий домен фактора транскрипции дрожжей, который запускает эукариотическую экспрессию. Репортерная линия: несколько повторов lac-оператора + минимальный 35S промотор + кодирующая часть гена интереса. У драйверной линии нарабатывается гибридный белок, который в цитозоле связывается с HSP90, из-за чего он не может пройти в ядро (это нормальная ситуация для рецепции глюкокортикоидов у мышей). Когда приходит глюкокортикоид (дексаметазон), сродство к HSP падает, а конструкция, состоящая из химерного белка с глюкокортикоидом, попадает в ядро и активирует экспрессию гена интереса. Такая система не «подтекает», поскольку без глюкокортикоида она не запустится. Это позволяет обойти летальность растения на ранних этапах развития и исследовать ген путём обработки дексаметазоном, когда растение уже взрослое.

Для диффузии животных гормонов необходимо некоторое время. У растения могут быть барьеры, реакция может охватывать не весь объект одновременно. В качестве альтернативы используется **система индукции этанолом**. Линия-драйвер содержит AlcR – фактор транскрипции из *Aspergillus*, который запускает экспрессию гена алкогольдегидрогеназы. Данный белок реагирует на ацетальдегид (продукт метаболизма этанола) и запускает транскрипцию промотора AlcA, под которым стоит

кодирующая часть гена интереса. Для того, чтобы система сработала, достаточно обработать объект парами спирта. При высокой концентрации этанола наблюдается токсический эффект и экспрессия снижается.

Существует **система тетрациклинового оперона**. Линия-драйвер: TetR (рецептор тетрациклина) + позитивный фактор транскрипции или репрессор транскрипции. В присутствии тетрациклина у репортерной линии возникает ответ и изменяется активность промотора.

Антисенс-косупрессия

Под промотор ставится кодирующая часть гена интереса, направленная в противоположную сторону. С этого промотора будет считываться комплементарная антисмысловая РНК (anti-sense). В клетке также есть ген интереса со своим промотором, который экспрессируется и образует смысловую РНК. Если в клетке одновременно присутствует смысловая РНК, с которой идёт чтение белка, и антисмысловая, то возникает двойная спираль РНК, которая уничтожается клеткой. Таким образом смысловая РНК выходит из строя и конечный продукт не синтезируется. Для работы антисенс-косупрессии достаточно небольшого участка гена интереса (13-25 bp). Целесообразно использовать небольшие фрагменты инвертированного гена интереса, поскольку выключается не только один конкретный ген интереса, но и гены, имеющие участки гомологии с антисмысловой РНК.

Сайленсинг

Сайленсинг – это «замалчивание» гена, то есть посттранскрипционное подавление его экспрессии. Растения используют механизм сайленсинга для контроля вирусов, присутствующих в их геноме.

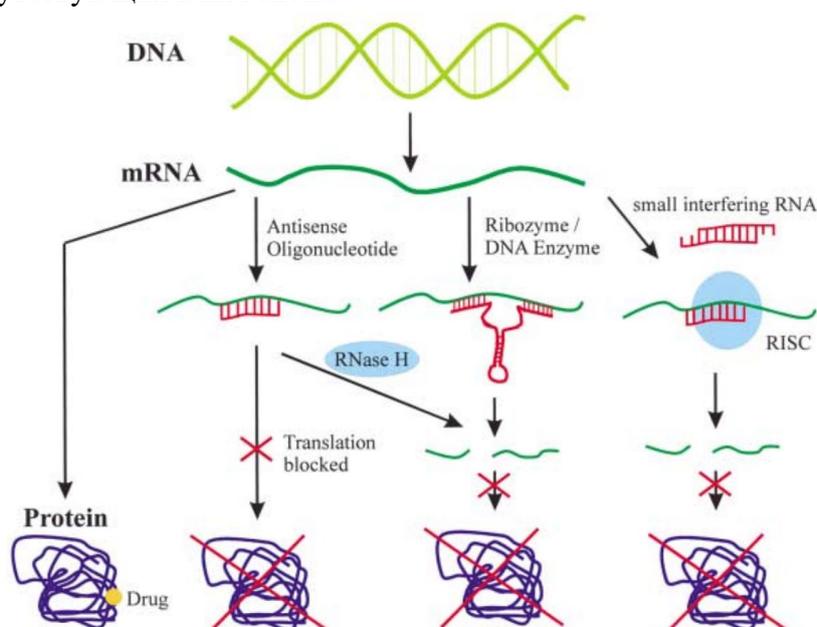


Рис. 4.3. Механизмы сайленсинга

Если РНК представлена в слишком большом количестве, её можно блокировать разными методами (рис. 4.3). Антисмысловые олигонуклеотиды блокируют трансляцию мРНК или индуцируют её деградацию РНКазой H. Рибозимы и ДНК-ферменты обладают каталитической активностью и расщепляют свою РНК-мишень. Малые интерферирующие РНК (siRNA) и микро-РНК (miRNA) связываются с RISC-комплексом и индуцируют деградацию мРНК-мишени, выступая в качестве эталона для сравнения. RISC-комплекс блокирует транскрипцию и запускает деградацию мРНК. Получившиеся при деградации siRNA по плазмодесмам транспортируются в соседние клетки. Таким образом целый орган или даже всё растение может заняться сайленсингом определённого гена. siRNA также могут останавливать экспрессию путём метилирования ДНК и гистонов.

Разрабатываются таргетные пестициды на основе siRNA, поскольку сайленсинг существует не только у растений, то и у животных, в том числе у насекомых. Для этого ищут гены, специфичные для конкретных организмов, например, ген актина насекомых, ген тубулина, специфические гены развития насекомых (гены линьки) и т.д.

Дегроны. NACR-система контроля экспрессии. Нокаутирование генов

Дегрон – это часть молекулы белка, которая регулирует скорость его разрушения (протеолиза). При низких концентрациях ауксина, транскрипция ауксин-регулируемых генов с AuxRE участков ДНК, активирующихся ARF-белками, блокирована репрессорами транскрипции – факторами Aux/IAA. При высоких концентрациях ауксин связывается с белком TIR1 или с другими AFB белками, которые входят в SCF^{TIR1/AFB} комплекс убиквитинирования. Связывание ауксина стимулирует взаимодействие дегрома DII (домен белка Aux/IAA) с SCF^{TIR1/AFB}, что ведёт к убиквитинированию Aux/IAA белков и их разрушению в 26S протеасоме. Это снимает ингибирование ARF и запускает транскрипцию (рис. 4.4).

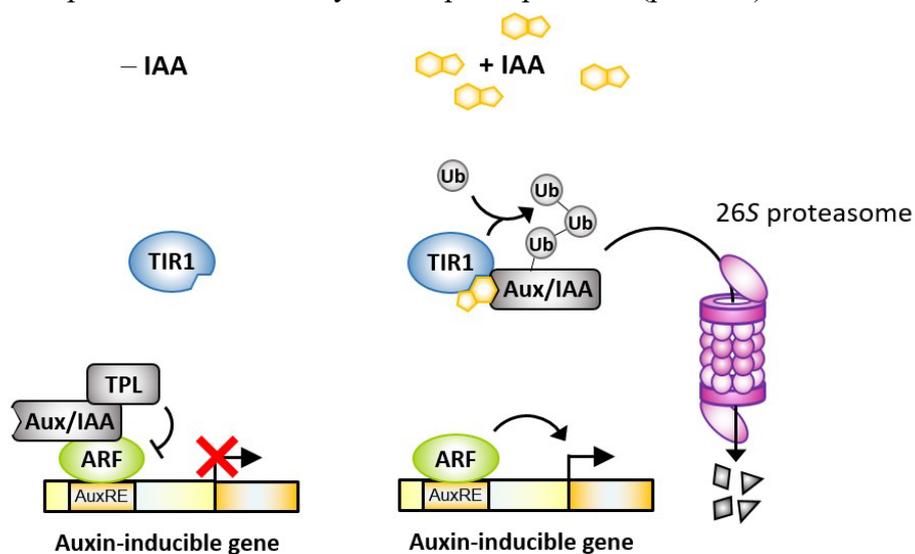


Рис. 4.4. Рецепция ауксина

Таким образом, можно «пришить» домен DII к какому-то другому целевому белку (например, флуоресцентному) и использовать систему взаимодействия с ауксином, чтобы этот белок деградировал. Для повышения специфичности используется модифицированный TIR1, который узнаёт не сам ауксин (ИУК), а модифицированную молекулу – фенил-индолилуксусную кислоту. Он работает в цитозоле, а не в ядре.

Можно использовать дегроны для отслеживания концентрации не только ауксина. Есть дегроны, которые реагируют на жасмонаты, гибберелины. Химерный белок включает неактивную Cas9, дегрон (может быть из любой системы) и фактор ремоделинга хроматина, который останавливает транскрипцию (TPL). Это называется **HACR-система контроля экспрессии** (синтетические **Hormone Activated Cas9-based Repressors**).

Все рассмотренные варианты гасят активность гена, не убирая её окончательно. Иногда проводится **нокаутирование генов (Knock-out)** – полное удаление последовательности гена из ДНК. Для этого используются рекомбиназы под конститутивным или индуцибельным промотором (например, промотор HSP). Есть аналогичная система рекомбинации у дрожжей: рекомбиназа FLIPASE (FLP), сайт её узнавания – FRT. Данный метод используется для удаления «генетического мусора» – лишних генов, которые были вставлены в геном путём генной инженерии (репортёры, факторы устойчивости к антибиотикам и т.д.).

Патентование достижений селекции. Технология Seed terminator

Технология Seed terminator гарантирует, что фермеры не смогут сохранить семена прошлых урожаев и им придётся каждый год покупать новые. Семена содержат генно-инженерную вставку – тетрациклин-индуцибельную систему, где рецептор к тетрациклину привязан к положительному фактору транскрипции, который активирует экспрессию генов. Производитель обрабатывает семена тетрациклином перед продажей фермеру. При обработке тетрациклином происходит включение гена рекомбиназы (FLP из дрожжей). Рекомбиназа вырезает спейсер из другой конструкции, в которой есть промотор генов позднего эмбриогенеза и токсичный для клеток белок. Таким образом, фермер получает урожай, но зародыши погибают на последних стадиях эмбриогенеза.

Генетическая хирургия (genetic ablation)

Одна из задач генной инженерии – уничтожение определённой группы клеток. Генетическая абляция (хирургия) подразумевает, что орган закладывается в эмбриогенезе, но очень рано отмирает и далее не участвует в построении растения. Используются системы, содержащие токсины, которые ставятся под промотор, экспрессирующийся в определённой группе клеток:

1. Токсин дифтерии (DT-A) – работает необратимо

2. BARNASE/BARSTAR. Бактерия *Bacillus amyloliquefaciens* выделяет в окружающую среду РНКазу (BARNASE), от которой сама она защищена с помощью белкового фактора **BARNASE Starvation**. Молекулярное взаимодействие BARNASE и BARSTAR очень прочное, при этом закрывается реакционный центр РНКазы, в результате чего она становится неактивна. Таким образом, ген BARNASE используется для генетической хирургии, а BARSTAR для отмены результата деятельности BARNASE.

Редактирование генома. CRISPR/Cas

CRISPR/Cas – система адаптивного иммунитета бактерий и архей. Она состоит из двух основных блоков: CRISPR-кассеты (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) и прилегающего к ней кластера генов Cas (CRISPR-associated protein). Кассета – это блок прямых почти палиндромных («зеркальных», способных складываться в шпильки) повторов размером 24-48 пар нуклеотидов. Эти повторы перемежаются спейсерами – уникальными вставками примерно такой же длины. Спейсеры идентичны различным участкам фагов и других мобильных элементов, когда-либо проникавших в эту клетку или ее предков.

Таким образом, CRISPR можно считать коллекцией разделённых повторами «фотографий» нарушителей клеточных границ. Гены Cas кодируют белки, необходимые для встраивания спейсеров и уничтожения агентов с идентичными последовательностями (протоспейсерами), а также помогающие процессировать CRISPR-транскрипт: разделять «фото-гирлянду» на отдельные «портреты». Функцию уничтожения выполняют Cas-белки, называемые эффекторными. В зависимости от типа эффекторов все CRISPR-системы разделяют на два класса: у I класса мишень уничтожается мультибелковым комплексом, а у II – одним крупным белком. Для решения инженерных задач больше всего подходит система, относящаяся ко II классу, так как она самая простая. Её эффекторный белок называется Cas9.

Для редактирования генома необходимо разместить на векторах ген белка Cas9 и CRISPR-кассету, где спейсеры сделать идентичными местам генома, которые нужно изменить. Ген Cas9 и CRISPR-кассета транскрибируются в клеточном ядре выбранного организма, CRISPR-транскрипт нарезается на отдельные РНК, которые объединяются с белками Cas9 и ищут цель. Когда РНК находит комплементарный участок в геноме организма, Cas9 разрезает обе цепи ДНК. Далее репарационные системы организма решают, как лучше залатать разрез: просто сшить куски (негомологичное соединение концов), или, если есть подходящая матрица с флангами, комплементарными участкам ДНК с двух сторон от разрыва, поставить «заплатку» (гомологичная рекомбинация). Первый вариант выгоден, если нужно что-то вырезать, второй – если нужно что-то вставить или заменить дефектный участок ДНК на нормальный, который просто вводят на подходящем векторе.

Кроме CRISPR/Cas для редактирования генома разработаны и другие системы:

1. Zinc Finger Nucleases (ZFNs). Каждый цинковый «палец» состоит из 30 аминокислот и узнаёт определённый триплет нуклеотидов. Искусственно собирают набор из разных «пальцев» и пришивают сайт-неспецифичную нуклеазу Fok I. Система вносит двуцепочечные разрывы, создавая прецедент для репарации ДНК. Неудобства: сложная система, трудно создавать/тестировать «пальцы», побочные эффекты, токсичность. Система не получила широкого распространения.

2. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs). TALE-повторы состоят из 34 аминокислот, причём 12-я и 13-я гипервариабельны и обеспечивают узнавание нуклеотидов. Искусственно собирают набор TALE-повторов и пришивают сайт-неспецифичную нуклеазу Fok I. Система вносит двуцепочечные разрывы, создавая прецедент для репарации ДНК. Неудобства: трудно создавать/тестировать TALE, времязёмко и дорого.

Преобладающий вариант репарации в растениях – негомологичное сшивание концов. После разрыва часты потери нескольких нуклеотидов, что создаёт сдвиги рамки считывания, возникновение стоп-кодонов и др. Случается knock-OUT. Гомологичная репарация в растениях идёт с очень низкой вероятностью. Тогда может возникать knock-IN. Чтобы её повысить, стараются привнести ген интереса в очень большой копииности: используют неинфекционный репликон геминивируса.

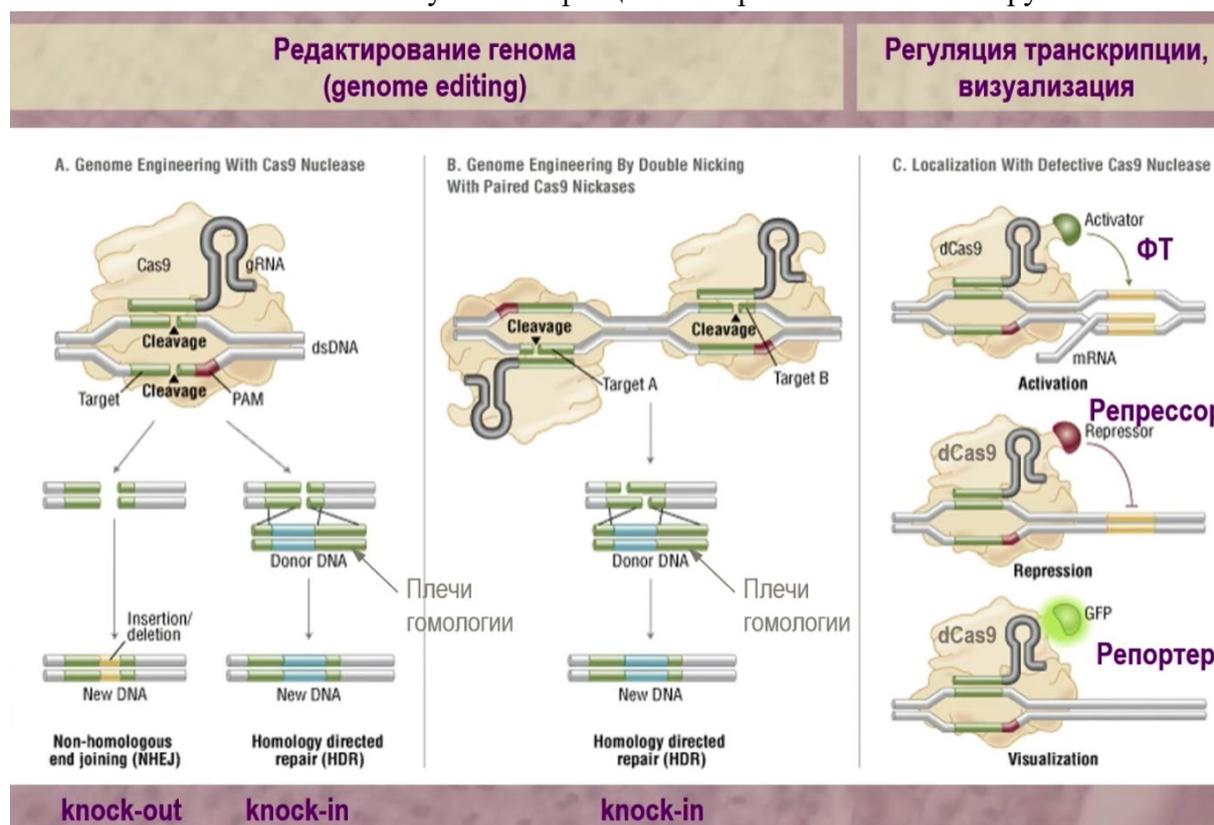


Рис. 4.5. CRISPR/Cas: knock-out и knock-in

Рис. 4.5 иллюстрирует использование системы CRISPR/Cas для редактирования генома и визуализации разных процессов.

Knock-out и knock-in используются для конструирования новых метаболических путей. Например, для изменения каротиноидного состава томатов, цитрусовых, моркови и китайской капусты целевыми генами являются гены биосинтеза каротиноидов и антоцианов.

Система CRISPR/Cas может быть использована и для более тонкой работы с геномом. Можно прицельно работать с последовательностью и заменять нуклеотиды. Для этого к дефектной Cas9 пришивают, например, цитидиндеаминазный либо адениндеаминазный домен, который узнаёт цитидин или аденин соответственно и дезаминирует, из-за чего нарушается комплементарное узнавание нуклеотидов в последовательности. После репликации происходит замена одной нуклеотидной пары на другую (рис. 4.6).

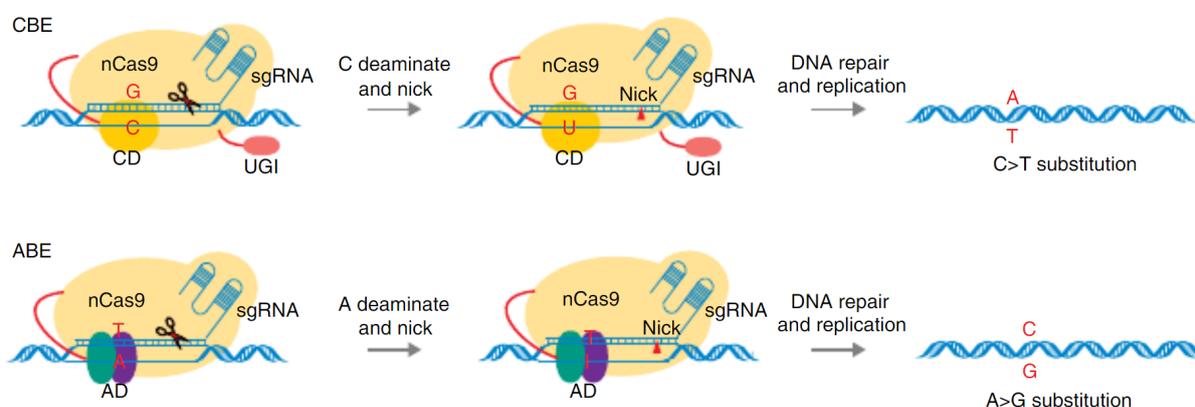


Рис. 4.6. Замена нуклеотидов с помощью системы CRISPR/Cas

Лекция 5. Позиционный контроль развития

Позиционная информация

Согласно концепции позиционной информации, клетка «знает» своё местоположение в координатной системе зачатка органа и дифференцируется в соответствии с этим положением. Позиционную информацию клетка получает от других клеток. Зона, в пределах которой эффективно действуют сигналы позиционной информации, называется морфогенетическим полем. Морфоген – это сигнальная молекула, которая формирует паттерн в морфогенетическом поле, несёт позиционную информацию и оказывает влияние на клетки по концентрационному градиенту. Обычно это белок, который действует как транскрипционный фактор. В зависимости от полученных сигналов клетка реализует ту или иную программу развития. Клетки морфогенетического поля в течение ряда последующих делений «помнят» о своём исходном назначении.

Льюис Вольперт предложил модель «французского флага», согласно которой клетки потенциально могут стать синими, белыми и красными, диффундируя от места синтеза морфогена ("источник") до места его разрушения ("сток") по морфогенетическому полю с двумя пороговыми значениями (рис. 5.1).

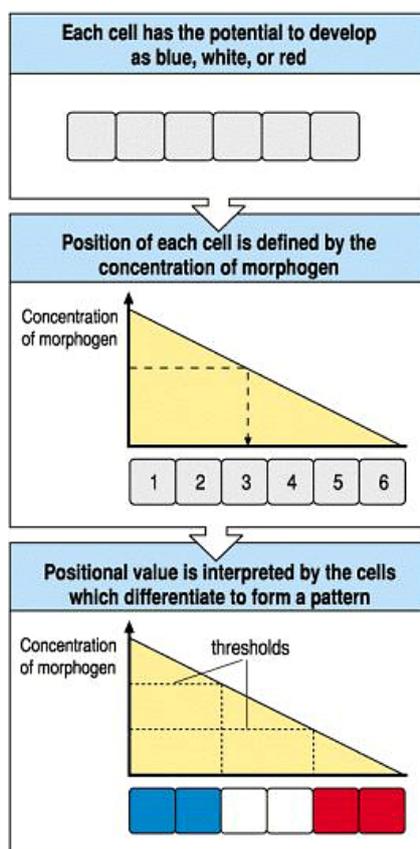


Рис. 5.1. Модель трёхцветного флага Вольперта

Конечности позвоночных развиваются из скопления мезенхимных клеток – почки конечности. Первоначально все клетки почки и некоторой окружающей области (поля конечности) способны сформировать все её элементы. Если поле конечности искусственно разделить перегородкой, развивается добавочная конечность. Затем происходит детерминация клеток, и они дают уже только определённые части конечности.

В области кисти крыла у куриного зародыша в норме закладывается три пальца (со второго по четвертый). Выяснилось, что у заднего края почки конечности есть небольшая группа клеток – **зона поляризующей активности (ЗПА)**. При её удалении пальцы не закладываются. Если удалить ЗПА и пересадить её на передний край почки конечности, то пальцы образуются в обратном порядке (на переднем крае оказывается четвертый палец, а на заднем – второй). Если же на передний край почки пересадить дополнительную ЗПА, то образуется вдвое большее число пальцев (рис. 5.2, А).

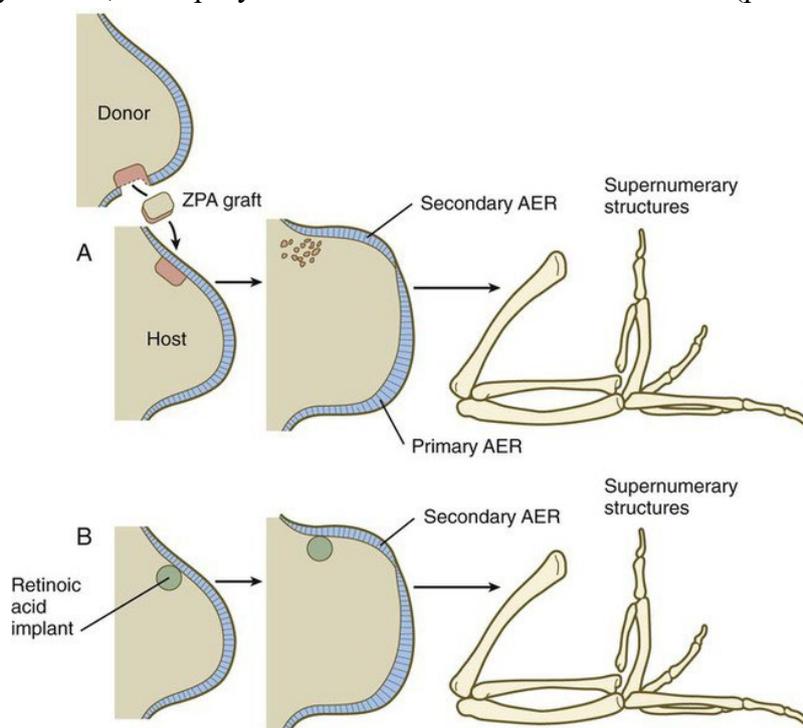


Рис. 5.2. Зона поляризующей активности и формирование конечности

Возникла гипотеза, что клетки ЗПА выделяют вещество-морфоген, которое при высокой концентрации индуцирует развитие четвертого пальца, при более низкой – третьего, при ещё более низкой – второго. Эта модель позволяет предсказывать результаты пересадки основной или дополнительной ЗПА на различные участки почки конечности.

Удалось установить, что веществом-морфогеном в данном случае служит ретиноевая кислота. Если пластиковые бусинки, пропитанные ей, вживить на передний край почки, то это вызывает такое же удвоение пальцев, как при пересадке

дополнительной ЗПА (рис. 5.2, В). Ретиновая кислота проникает внутрь клеток и связывается с белками-рецепторами. Ядерный рецептор ретиновой кислоты – фактор транскрипции, который может включать различные гены, определяющие ход развития. Белок-рецептор появляется на определенных стадиях развития в основном в хрящевых клетках, которые и реагируют на морфоген.

Регуляторы роста и морфогенеза у растений

- Олигосахарины
- Фитогормоны
- miRNA (перемещаются по плазмодесмам) – преимущественно выключают гены-мишени на уровне синтеза мРНК с помощью сайленсинга
- Короткие пептиды (перемещаются по апопласту)
 - цистеин-обогащённые
 - семейство CLE
 - другие семейства
- Подвижные факторы транскрипции (экспрессия и активность пространственно разобщены, перемещаются по плазмодесмам)
 - семейство WOX
 - семейство KNOX
 - семейство HD III Zip
 - другие семейства

Короткие пептиды

Семейство CLE включает более 40 генов. Гены этого семейства синтезируются в виде пре-пропептидов (рис. 5.3).

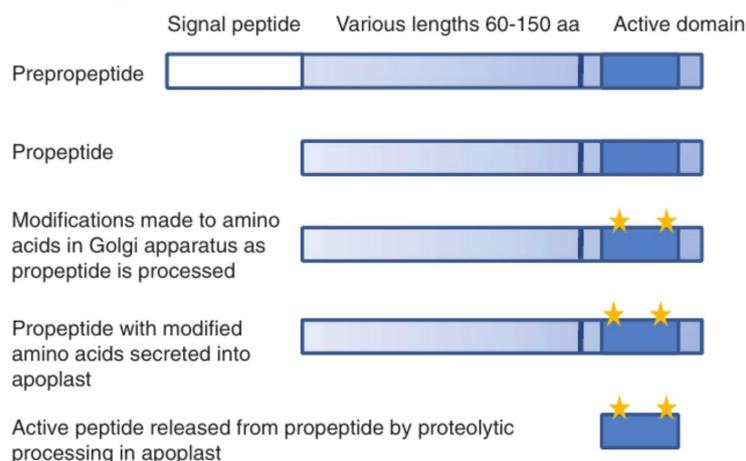


Рис. 5.3. Процессинг сигнальных коротких пептидов

После транскрипции сигнальная последовательность пре-пропептида расщепляется в эндоплазматическом ретикулуме, образуя пропептид. В аппарате

Гольджи пропептид подвергается аминокислотным модификациям (обозначены звездочками на рис. 5.3): гидроксирование (обычно пролина), гликозилирование (например, арабинозой), сульфатирование. Пропептид секретируется в апопласт, где активный пептид высвобождается путём дальнейшего протеолиза.

Сбой на любом из этапов может привести к нарушению сигналинга, что будет выражено в виде мутаций. Однако во многих случаях мутантные или нокаутированные CLE-пептиды не будут проявляться фенотипически, так как многие из них похожи и взаимозаменяемы. Очень редко действует один единственный CLE-пептид, и тогда его нокаут будет иметь фенотипическое проявление.

Рецепторные киназы с лейцин-обогащённым доменом

LRR RLK (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases) – это рецепторы коротких пептидов. Они имеют экстраклеточный лейцин-обогащённый домен. LRR-RLK димер необратимо связывается с CLE-пептидом.

Таким образом, например, у цинии формируется градиент TDIF-пептидов (Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor), благодаря которому происходит дифференцировка на флоэму (высокая концентрация), прокамбий/камбий (средняя концентрация) и ксилему (низкая концентрация). TDIF гомологичен CLE 6 / CLE 41 пептидам арабидопсиса, выделяемым протофлоэмным полюсом. Экспрессия генов CLE находится под гормональным контролем и запускается цитокининами. CLE 6 и CLE 41 взаимозаменяемы – мутация по одному из них не приводит к существенным изменениям в проводящей системе. Рецепторы TDIF-пептидов – **TDR/PXY** (TDIF Receptor / Phloem intercalated with Xylem).

После взаимодействия CLE-пептида с рецепторной киназой сигнал отправляется в ядро. Мишень – гены **WOX4 / WOX14**. WOX4 экспрессируется в зоне прокамбия, по механизму положительной обратной связи его экспрессия усиливается, что запускает механизм деления клеток – зона прокамбия приобретает пролиферативную активность и превращается в камбий.

Семейство генов WOX. Взаимодействие WOX-CLE

Часто с CLE-пептидами партнёрствуют WUS-like гены:

- древняя клада: WOX10, 13, 14 (зелёные водоросли, мхи, папоротники)
- промежуточная клада: WOX8, 9, 11, 12 (голосеменные)
- современная клада: WOX1-7, WUS (цветковые)

В клетках поверхностного слоя меристемы отсутствуют лейцин-обогащённые рецепторные киназы. В среднем и нижнем слоях экспрессируются гены рецепторных киназ, взаимодействующих с CLE-пептидами. В нижнем слое экспрессируется ген **WUSL**. Его продукт по плазмодесмам направляется в самый поверхностный слой, где попадает в ядро и запускает экспрессию **CLV3**. После процессинга и экскреции **CLV3** по системе межклетников диффундирует в более глубокие слои. Слой вторых клеток

синтезирует рецепторные киназы, однако здесь сигнал в ядро не идёт. Рецепторная система здесь настроена на то, чтобы уменьшить концентрацию пептидов CLV3. Часть CLV3 доходит до нижних клеток и связывается с рецепторами, что по механизму отрицательной обратной связи приводит к снижению экспрессии гена WUSEL.

Нарушение отрицательной обратной связи приводит к тому, что экспрессия гена WUSEL продолжается, в результате чего центральная зона разрастается. Такое разрастание меристемы называется фасциация.

Модель активатора/ингибитора

Позиционная информация работает не только между слоями клеток, но и внутри одного слоя между соседними клетками, которые должны дифференцироваться по-разному. В норме у арабидопсиса устьица не должны располагаться вплотную друг к другу. Клетки делятся так, чтобы новое устьице не возникало рядом со старым. У мутанта TMM (Too Many Mouth) устьица контактируют друг с другом. Мутация затрагивает LRR-RLK киназу, которая взаимодействует с цистеин-обогащённым пептидом EPFL9 / STOMAGEN. Сигнал выключает фактор транскрипции SPCH (SPEECHLESS) типа bHLH, который в норме переключает программу развития с обычной эпидермальной клетки на клетки устьиц. Это приводит к тому, что в ближайшем окружении новые устьица не возникают. У мутантов по SPCH эпидермис вообще без устьиц.

В соответствии с этим Майнхардт разработал модель активатора/ингибитора, которая предполагает наличие двух динамически взаимодействующих морфогенов. Активатор усиливает собственное производство (положительная обратная связь), а также производство ингибитора. Ингибитор подавляет активность или уменьшает количество активатора (отрицательная обратная связь) и самого себя. Оба вещества проникают путём диффузии из клетки в клетку, но делают это с разной скоростью. Активатор действует на коротких расстояниях и вызывает морфогенез в определённой зоне. Сигнал активатора долговременный – получив позиционную информацию, клетки долго «помнят», где активирован морфогенез. Ингибитор, напротив, хорошо диффундирует на большие расстояния, где возникает зона подавления морфогенеза. Таким образом вокруг исходного источника активатора создается область его высокой концентрации, в то время как легко диффундирующий ингибитор распространяется значительно дальше и подавляет синтез активатора везде кроме исходной зоны активации.

У растений в качестве активатора и ингибитора выступают факторы транскрипции *TTG* и *TRYPTICHON* соответственно (рис. 5.4). *TTG* и *GLABRA1* взаимно усиливают друг друга. Клетка, которая их экспрессировала, идёт по программе морфогенеза волоска. Далее *GLABRA1* активирует *TRYPTICHON*, который распространяется на окружающие клетки, ингибирует *GLABRA1* и подавляет дифференцировку волосков. Поэтому в диком типе волоски удалены друг от друга.

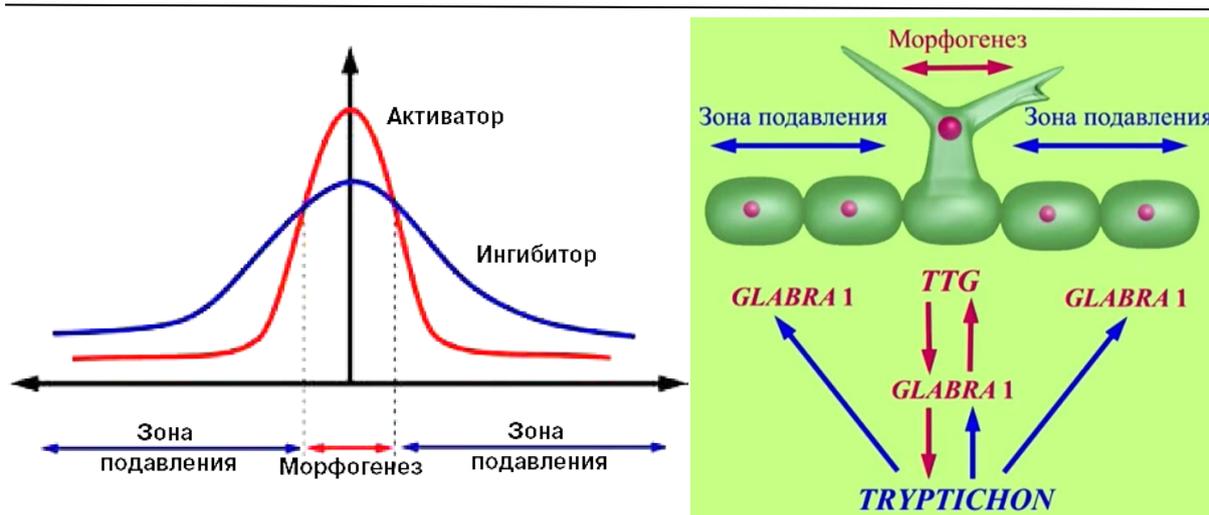


Рис. 5.4. Модель активатора/ингибитора на примере формирования волосков

Математическое моделирование филлотаксиса

Самые важные активаторы морфогенеза у растений — фитогормоны ауксины, а наиболее распространенный ауксин – индолилуксусная кислота (ИУК). В тех группах клеток, где концентрация ауксина выше, идут клеточные деления, рост растяжением. Формирование локальных максимумов ауксина является событием, предeterminирующим закладку латеральных органов в меристемах побега и корня. Потoki ауксина имеют тенденцию притягиваться друг к другу и сливаться: если клетка «чувствует» неподалеку мощный поток ауксина, она перенаправляет в ту же сторону и свой. Эти потоки размечают будущие формы растения: там, куда они стремятся, развиваются зачатки листьев или органов цветка.

Основную роль в создании локальных максимумов ауксина играет активный вынос ауксина из клетки с помощью белков-транспортёров семейства PIN. Мутанты по гену PIN1 не образуют цветков. В мутантах по гену PIN1 и генам биосинтеза ауксина YUC1 и YUC4 не образуются ни листья, ни цветки. Микрокапли ауксина, помещённые на апекс побега у pin1 мутантов, вызывают образование примордиев цветка.

Основные принципы математического моделирования филлотаксиса:

1. Побег аппроксимируется цилиндром радиуса R , а меристема – полусферой того же радиуса (рис. 5.5).
2. Возникновение примордиев идёт в периферической зоне, ограниченной R_{\min} и R_{\max} .
3. Меристема растёт со скоростью dH .
4. Минимальное доступное пространство для возникновения примордия определяется d_0 -окрестностью точки P (медиана примордия).
5. Вокруг примордия расположена зона ингибирующего влияния, определяемая D -окрестностью точки P . В этой зоне примордии не возникают.
6. Новый примордий располагается на минимальном расстоянии от предыдущего.

Тип листорасположения зависит от соотношения двух параметров – радиуса меристемы R и радиуса ингибирующей зоны D , причём разметка примордиев в компетентной зоне полностью определяет облик побега, который формируется в дальнейшем. Меняя эти параметры, можно получить известные в природе типы листорасположения, а также переходные формы между ними.

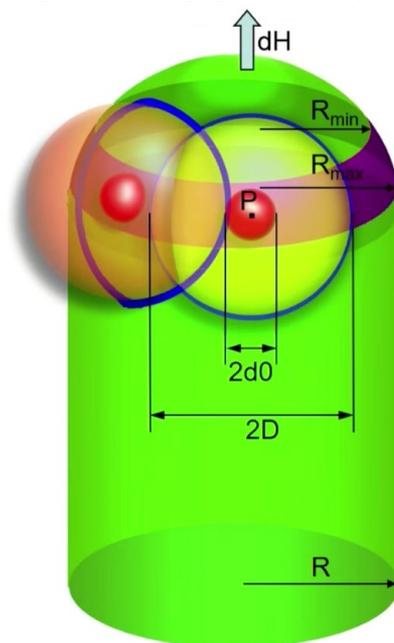


Рис. 5.5. Математическая модель филлотаксиса

Если диаметр зоны ингибирующего влияния существенно больше диаметра меристемы (более чем в два раза), то модель предсказывает двурядный филлотаксис $\frac{1}{2}$ (**строгая дистихия**). В каждом узле находится один лист, при этом каждый образует с предыдущим угол в 180° , так что ветвь с листьями выглядит плоской. Первая же зона ингибирования покрывает всю меристему, поэтому второй лист на этом уровне возникнуть не может. А возникнет он на противоположной стороне, как только зона компетентности, поднимаясь по мере роста, высвободит из зоны ингибирования окошко не меньше d_0 . Такое листорасположение наблюдается у комнатного растения дихоризандры королевской *Dichorisandra reginae*, как и у многих других традесканциевых.

При радиусе меристемы $R=1,0$ (const) уменьшение диаметра ингибирующей зоны D ведёт к искривлению ортостих. На смену строгой дистихии приходит **спиродистихия** – прямые линии листорасположения перекручиваются, листья располагаются по спиралям. Оказалось, что такая модель (две спирали, наложенные друг на друга) лучше всего описывает реально наблюдаемое листорасположение. Традиционное представление об одной спирали, подчиняющейся дробям Фибоначчи, здесь явно не подходит. Филлотаксис, предсказанный этой моделью, можно наблюдать у видов рода *Cordyline* и других объектов.

Дальнейшее уменьшение диаметра ингибирующей зоны ведёт к более сильной деформации линий, соединяющих примордии n и $n+2$ (**выраженная спиродинтия**). Зона ингибирующего влияния перестаёт перекрывать всю меристему на своем уровне, и два листа смогут возникнуть друг напротив друга. В школьных учебниках это называется супротивным листорасположением, оно наблюдается, например, у сирени. Каждая новая пара листьев повёрнута относительно предыдущей на 90° . Если ингибирующие зоны станут ещё меньше, то на одном уровне смогут возникнуть сразу три (при $D = 1,2R$) или четыре листа (при $D = R$) – реализуется мутовчатое листорасположение.

Математическое моделирование цветка

Цветки могут размещаться аналогичным образом. Этот подход позволил обратить внимание на странные цветки с нетипичным для данного вида расположением лепестков. Математическая модель предлагает хорошее объяснение – промежуточные величины диаметров зоны ингибирования, из-за чего в одном круге размещаются, например, не пять лепестков, а всего четыре. Или «четыре с половиной»: углы между четырьмя слишком велики, а пятому недостаточно свободного места. Цветок нарцисса обладает трёхлучевой симметрией (не шестилучевой, потому что его шесть листочков околоцветника расположены не в одном круге, а двумя кругами по три). Поэтому пятилисточковый нарцисс логично было назвать «2,5-мерным».

Изучение аномальных цветков интересно еще и потому, что оно даёт ключ к некоторым спорным моментам эволюции цветка. Так, математическое моделирование показывает, что пятимерные цветки едва ли могли возникнуть из шестилепестковых тримерных через потерю одного лепестка и сведение оставшихся в один круг. Скорее всего, трёхлепестковый тримерный цветок сначала стал тетрамерным, с четырьмя осями симметрии, а потом уже пентамерным.

На рис. 5.6 представлены переходы от одного вида симметрии к другому в пределах рода. Цветок традесканции в норме имеет три лепестка. Хионоксе из семейства гиацинтовых характерно наличие шести листочков околоцветника в двух кругах, как и лилейнику.

Когда в модели уменьшали радиус ингибирующей зоны D от 1,2 до 1,0, тримерный цветок через ряд последовательных «нетипичных» форм превращался в тетрамерный (восьмилепестковый или восьмилисточковый). Любопытным оказалось строение цветка гортензий. В их стерильных цветках задачу привлечения опылителей выполняют чашелистики, а не лепестки. Один из лепестков, которые в норме мельче и закладываются выше, становился в круг чашелистиков. Полный ряд форм удалось отыскать в природе у гортензии древовидной *Hydrangea cinerea* (на рис. 5.6 справа).

Можно не только увеличивать число лепестков в круге, но и увеличивать число самих кругов – «тянуть за макушку» цветок, заставляя его расти и надстраивать новые ярусы органов, вводя скорость роста dH , не равную нулю. Так можно получить

некоторые махровые цветки. В предельном случае цветок растёт вверх до исчерпания клеточного материала, который весь превращается в лепестки. У такого цветка не будет генеративных органов – пестиков и тычинок.



Рис. 5.6. Полиморфизм строения цветков

Недоразвитие отдельных органов при сохранении общих геометрических особенностей в органотаксисе цветка, можно считать изменением полноты цветка. Полным условно обозначают типичный для данного таксона цветок, тогда отклоняющиеся структуры можно считать избыточными (или обедненными) по полноте. К примеру, у Polygonaceae полный цветок с мерностью n имеет формулу $P2nA3nGn$. В рамках предложенной концепции всё разнообразие структуры цветков можно получить путём изменения нескольких параметров (рис. 5.7), среди которых можно выделить два основных:

- **мерность** – определяет число членов околоцветника, андроцея и гинецея в круге
- **полнота** – выражается в обогащении или обеднении структуры цветка, прежде всего, в связи с изменением числа тычинок в каждом сайте разметки и реже – с изменением числа кругов околоцветника

Дополнения, внесённые для моделирования разметки цветка:

1. Введена возможность разметки органов в апикальной части меристемы. При этом постулируем, что скорость роста вверх $dH=0$.
2. Радиус новой верхушечной зоны разметки органов обозначен как R_3 .
3. В цветке появилась возможность к интеркалярному росту за счёт увеличения диаметра меристемы со скоростью dR .
4. Границы зон разметки органов можно перемещать, задавая параметры dR_3 (возможность расширения) и dR_{\min} (возможность смещения верхней границы разметки органов вверх), отличные от 0.

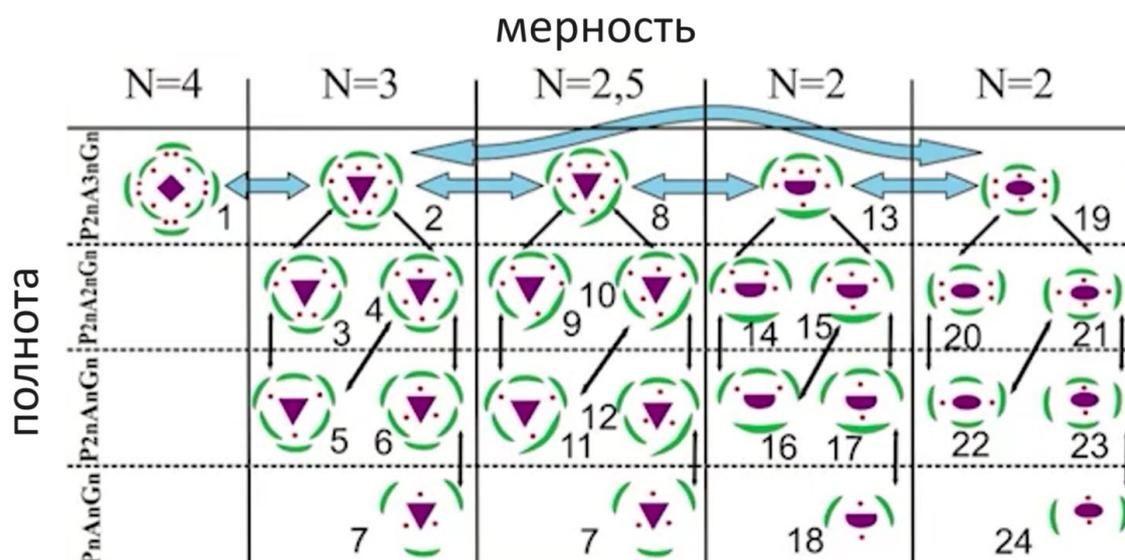


Рис. 5.7. Концепция мерности/полноты на примере сем. Polygonaceae

Типичный цветок арабидопсиса имеет формулу, достаточно типичную для крестоцветных: $K_4 C_4 A_{4+2} G_2$. Буквы обозначают соответственно чашелистики, лепестки, тычинки и пестики, а «4+2» – что четыре тычинки длинные, а две короткие. Но попадаются цветки арабидопсиса без одной короткой тычинки ($K_4 C_4 A_{4+1} G_2$), реже без обеих коротких тычинок ($K_4 C_4 A_4 G_2$) или даже с одной дополнительной длинной и без коротких ($K_4 C_4 A_5 G_2$). Среднее число тычинок в цветках арабидопсиса дикого типа всегда меньше шести.

У *Cruciferae* наиболее стабильными являются регионы гинецея (из него вырастет пестик), адаксиального и абакисального чашелистиков. Самым вариабельным является регион коротких тычинок, менее вариабельны положения длинных тычинок, лепестков и латеральных чашелистиков.

Можно предположить, что стабильные участки (одинаковые в большинстве цветков) размечаются первыми, а вариабельные – последними, «по остаточному принципу», отчего, они и оказываются вариабельными. Тогда введение базипетальной зоны, расширяющейся навстречу акропетальной, выглядит вполне логичным. А между ними попадают тычинки, размечаемые в последнюю очередь. Участки меристемы, не занятые лепестками и пестиками, размечаются «как получится». Такая вариабельность для цветка не катастрофична: лучше уж пусть не хватает какой-то тычинки, чем пестика.

Действительно, математическая модель с такими исходными данными позволяла создавать как типичные, так и «аномальные» цветки арабидопсиса. Сначала размечалась одна пара чашелистиков, а сверху плодолистки (будущий пестик), затем вторые два чашелистика, четыре лепестка, длинные тычинки и, наконец, короткие. Короткие тычинки, размечаемые последними, утрачивались чаще всего.

Проверка устойчивости моделей и прогноз структуры аномальных цветков

Модель проверили на цветках обыкновенного ревеня *Rheum* из семейства гречишных. Ревень в данном случае хорош обилием материала – у него огромное множество мелких цветочков. На этот раз исследователи не придумывали модель, наиболее похожую на реальный цветок (что всегда немного напоминает подгонку), а пошли от противоположного: построили все возможные модели разметки меристемы, чтобы проверить, какая из них ближе к реальности.

Моделей получилось четыре (рис. 5.8). Первая (ботаническая) модель, обозначенная буквой А (акропетальная), предполагала разметку органов снизу вверх, в порядке наблюдаемого их формирования, от чашелистиков к плодолистикам. Модель Б2 (генетическая) соответствовала данным об активности генов меристемы: в ней чашелистики и лепестки размечались снизу, а плодолистки и тычинки – сверху. Модели Б1 (тычинки размечаются вместе с околоцветником) и Б3 (часть тычинок размечается сверху, часть снизу) представляли остальные теоретически возможные варианты.

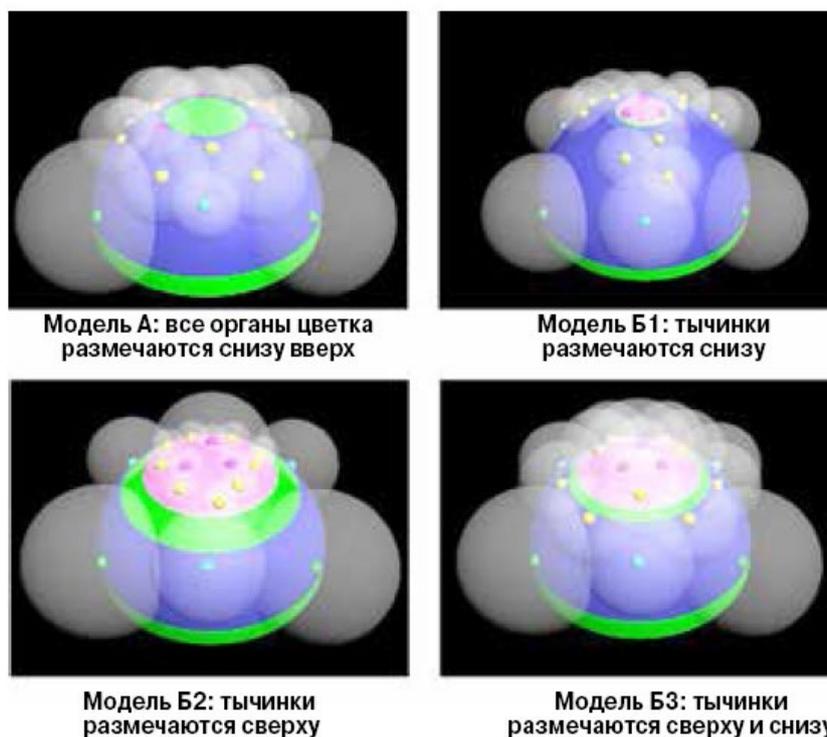


Рис. 5.8. Конкурирующие гипотезы о разметке цветка у *Rheum*

Все компьютерные модели цветков, кроме Б1, дали хорошие решения для «правильного» цветка ревеня. Но лучшей оказалась модель Б3, где андроцей размечается в двух направлениях. Она обладает наибольшей стабильностью по

отношению к изменению параметров, а также наибольшей прогностической силой. То есть даже когда появлялись отклонения, они соответствовали нетипичным вариантам цветков, наблюдаемым в природе. Другие же модели даже при меньших отклонениях очень сильно меняли положения тычинок.

Области применения теории разметки

1. Физиологические исследования процессов морфогенеза.
2. Молекулярная генетика развития – описание мутантных растений с нарушенными программами развития.
3. Тератология – описание аномального строения растений, вызванного физиологическими нарушениями.
4. Поиск редуцированных (абортированных или абластированных) органов, влияющих на органотаксис с применением формализованных методов анализа.
5. Биоинформационный подход – создание моделей, обладающих предсказательной силой.
6. Эволюционный подход - новые гипотезы о морфологических преобразованиях листовых серий, структуры соцветий и цветков, основанные на консервативных физиологических принципах.
7. Теоретическая морфология растений – аксиоматизация базовых принципов строения растений.

Лекция 6. Эмбриональное развитие

Открытие двойного оплодотворения. Роль оплодотворения

Сергей Гаврилович Навашин – первооткрыватель двойного оплодотворения. Наблюдал оплодотворение на рябчике, так как у него много ДНК в геноме, а гаметы с крупными ядрами.

Пуск программы развития обеспечивают факторы ремоделинга хроматина MEDEA (MEA) из семейства PolyComb: FIE (Fertilization Independent Endosperm), FIS2 (Fertilization Independent Seed2), MSI1 (Multicopy Suppressor of IRA1, ген дрожжей). Начало развития возможно без оплодотворения, но оно не бывает успешным.

PHERES 1 – фактор транскрипции MADS, мишень для PolyComb. Ингибирование PHE1 приводит к остановке развития зародыша и эндосперма.

В женском гаметофите PHE1 репрессируется комплексом PolyComb путём метилирования гистонов (рис. 6.1, 1). При формировании спермиев гистоны деметилируются (рис. 6.1, 2), отцовский аллель PHE1 переходит в активное состояние и обеспечивает начало развития зародыша и эндосперма (рис. 6.1, 3).

При формировании зародышевого мешка ДНК из материнской аллели отцовского импринтированного гена MEA деметилируется (рис. 6.1, 4), что приводит к инактивации PHE1 в женской линии. Для активации PHE1 необходимо подавить активность факторов ремоделинга хроматина (MEA). Аллель MEA по отцовской линии метилируется (рис. 6.1, 5). Репрессия отцовского аллеля MEA в эндосперме поддерживается комплексом FIS (рис. 6.1, 6).

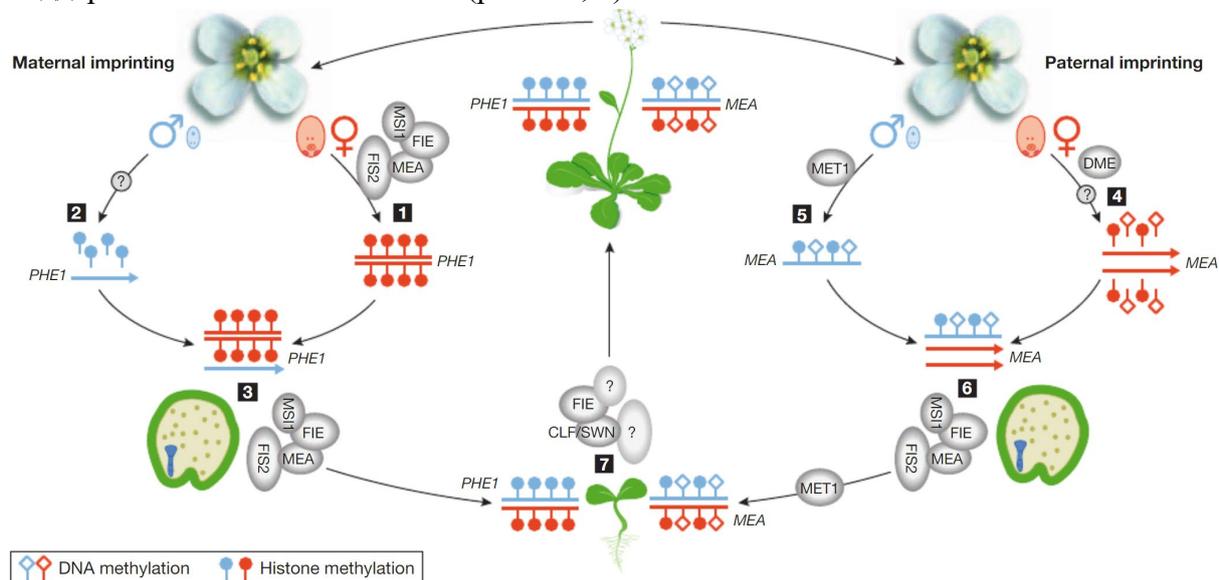


Рис. 6.1. Молекулярный импринтинг у арабидопсиса

Таким образом, в вегетативных тканях поддерживается инактивированное состояние генов PHE1 и MEA (рис. 6.1, 7). При формировании гамет происходит

молекулярный импринтинг: по мужской линии активируется РНЕ1, а по женской – факторы ремоделинга хроматина МЕА.

Апомиксис

Проводя эксперименты на ястребинках, Мендель не получил классические расщепления признаков как на горохе. Это связано с тем, что для ястребинок характерен **апомиксис** – развитие семян с жизнеспособными зародышами без оплодотворения. Существуют виды с триплоидным геномом, для которых характерен только апомиктический способ размножения. Для ряда видов характерно двойное оплодотворение перекрёстным опылением – **амфимиксис**. В этом случае зародыш семени развивается из оплодотворённой яйцеклетки. Есть виды, у которых часть семян образуется за счёт перекрёстного опыления, а часть – за счёт апомиксиса, что сильно искажает картину наследования признаков у ястребинок.

ГЕ экспрессируется одинаково у апомиктических и амфимиктических видов. При подавлении экспрессии ГЕ за счёт РНК-интерференции развитие зародыша начинается, но достаточно рано останавливается.

Двойное оплодотворение существует не у всех цветковых растений. У орхидных центральная клетка не оплодотворяется, поэтому семена без эндосперма, а зародыш останавливается в развитии на стадии глобулы. Это не позволяет семенам орхидеи прорасти без посторонней помощи, в природе они нуждаются в симбиотических грибах.

Для паразитических растений нужно много семян, то есть они должны быть очень мелкими. У таких видов зародыш слабо развитый, на стадии глобулы, с маленьким запасом питательных веществ.

Целлюляризация эндосперма

Эндосперм исходно развивается в виде многоядерного синцития. Затем ядра распределяются по эндосперму, после чего происходит целлюляризация начиная с периферии. Внутренняя часть эндосперма остаётся жидкой (в ней продолжается наработка ядер), а оставшиеся клетки приобретают клеточную стенку и «затвердевают». В последствии весь внутренний объём заполняется клетками эндосперма. У кукурузы примерно через 18 дней после опыления клетки эндосперма подвергается запрограммированной гибели клеток. Зародыш арабидопсиса потребляет большую часть клеток эндосперма до созревания семян.

У арабидопсиса есть 2 полюса целлюляризации эндосперма – в микропиллярной и халазальной части семени. Остальное пространство заполнено жидким эндоспермом с большим количеством ядер. Для правильного питания зародыш должен постепенно перемещаться в нецеллюляризованную область за счёт удлинения суспензора.

Ранние этапы развития

В результате оплодотворения формируется вытянутая зигота, которая делится асимметрично с образованием апикальной и базальной клеток. Апикальная клетка делится меридионально, формируя проэмбрион. Базальная клетка делится в экваториальном направлении, формируя суспензор. На восьмиклеточной стадии вдоль апико-базальной оси можно выделить четыре области: апикальный домен, центральный домен, гипофиза и суспензор. Последующие тангенциальные деления формируют зачаток эпидермиса, или протодерму.

Неоднородные динамические паттерны экспрессии генов тесно связаны с анатомическими паттернами клеточных делений (рис. 6.2). Экспрессия *WOX* начинается ещё в зиготе. Распределение *WOX* определяет судьбу клеток. В нижней части накапливаются продукты гена *WOX8/ WOX9*, а в верхней – *WOX2*. На стадии октанта в центральном домене экспрессируется *WOX9*. *WUS* организует меристему побега, а *WOX5* организует меристему корня. На более позднем этапе для формирования прокамбия подключается *WOX4* и *WOX3* (работает в семядолях).

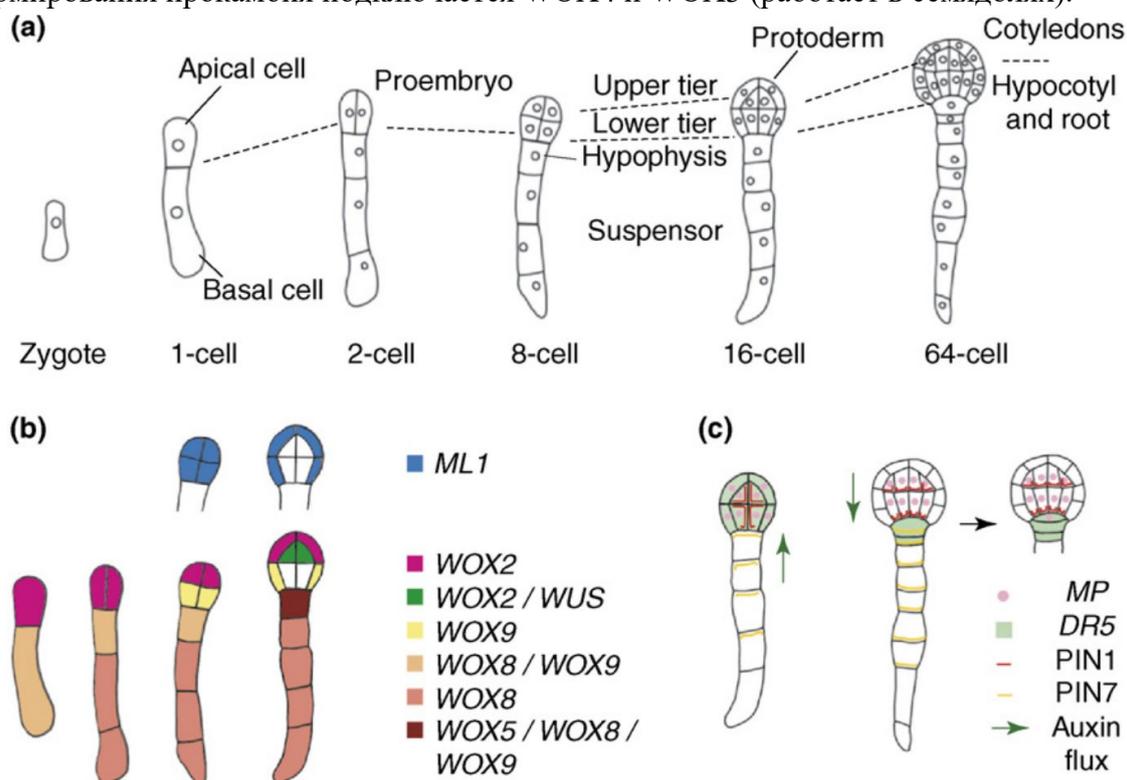


Рис. 6.2. Раннее развитие и паттерны экспрессии генов в зародыше арабидопсиса

Поток ауксинов состоит из двух фаз. На ранних этапах переносчик ауксина PIN-FORMED7 (PIN7), локализованный на апикальных мембранах клеток суспензора, обеспечивает транспорт ауксина вверх. На более поздних этапах происходит перераспределение потоков ауксина в других направлениях.

Функции суспензора:

1. Физическая ориентация зародыша
2. Продвижение в питательный (жидкий) эндосперм
3. Гипофиза, формирующаяся из верхней клетки суспензора, даёт начало покоящемуся центру меристемы корня
4. Обеспечивает полярность зародыша
5. Источник фитогормонов (в частности ауксина) и других регуляторов роста и развития
6. «Запас» клеток на случай повреждения проэмбриона
7. Синтез специфических аквапоринов и пермеаз – гаусториальная (питательная, всасывающая) функция. Если суспензор короткий, зародыш отстаёт в развитии.
8. Программируемая клеточная смерть

Функция продвижения связана с растяжением клеток. Для этого необходимо изменить ядерно-плазменное отношение. У арабидопсиса происходит эндополиплоидизация эндосперма, ploidy может достигать 8C. Максимальная ploidy 8196C обнаружена в семенах *Phaseolus coccineus*. Политенные хромосомы в суспензоре растений не обнаружены.

Если нарушена идентичность клеток суспензора, может формироваться дополнительный зародыш из разросшихся клеток суспензора. Существует техника «спасения» эмбриональных летелей в культуре *in vitro*.

Дальнейшее развитие двудольных. Морфогенез

Возникают два полюса клеточных делений, которые будут формировать две семядоли. Глобула переходит на стадию сердечка, разделённого на домены (рис. 6.3). Продолжается рост гипокотилия, зародыш переходит на стадию торпеды. У некоторых растений (например, у фасоли, арахиса) происходит развитие почки с несколькими настоящими листьями. Таким образом, остановка развития семени в разных группах растений может происходить на разных этапах.

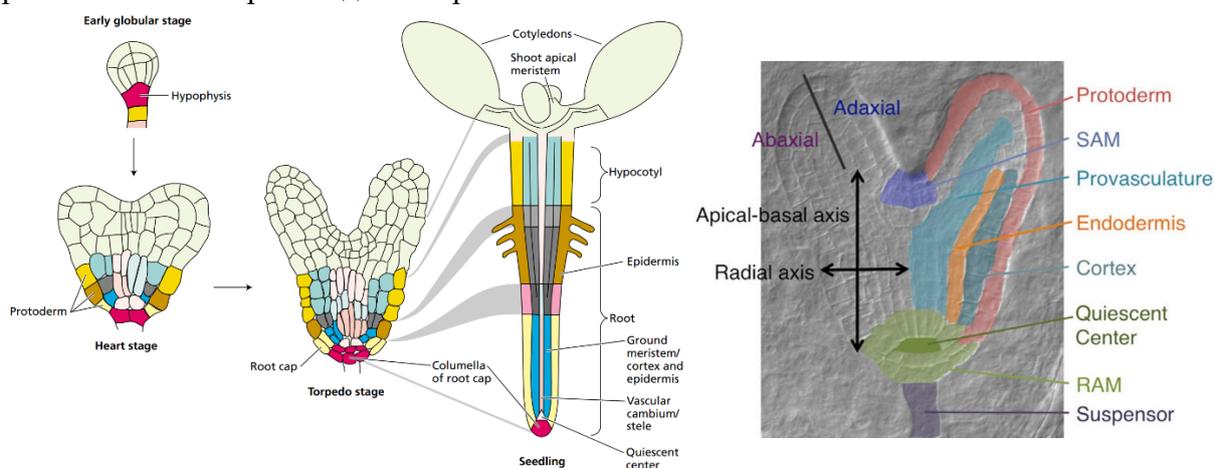


Рис. 6.3. Морфогенез у арабидопсиса

Зародыш должен получить позиционную информацию в трёх направлениях:

- Уже на этапе сердечка формируются домены вдоль апико-базальной оси.
- Появление бокового органа предполагает дифференцировку адаксиальной (внутренней, «брюшной») и абаксиальной (наружной, «спинной») стороны семядоли. Источником позиционного сигнала служит меристема (SAM).
- Радиальная дифференцировка: поверхностные клетки – эпидерма, далее паренхима коры, специализированные слои коры и ткани центрального цилиндра.

Таким образом, на ранних этапах происходит установление полярности зародыша и границ доменов, радиальная дифференцировка, а также морфогенез семядолей (адаксиализация/абаксиализация).

Транспорт ауксина

На ранних этапах поток ауксина направлен вверх. В ранней глобуле поток перенаправляется, скопление ауксина наблюдается в гипофизе, что служит сигналом для образования корневого полюса. Дальнейший транспорт направлен по поверхности (в протодерме), а в точках их схождения формируются центральные жилки семядолей. Далее поток ауксина вдоль будущего прокамбия направляется вниз к организационному центру, возникает циркуляция ауксина с максимумом в корневом полюсе. Транспорт ауксина контролируется группой генов CUC (CUP-SHAPED COTYLEDON). Это факторы транскрипции, тормозящие транспорт ауксина. В этом месте клетки не могут растягиваться и остаются достаточно маленькими. Формируется organ boundary – место прикрепления бокового органа к стеблю.

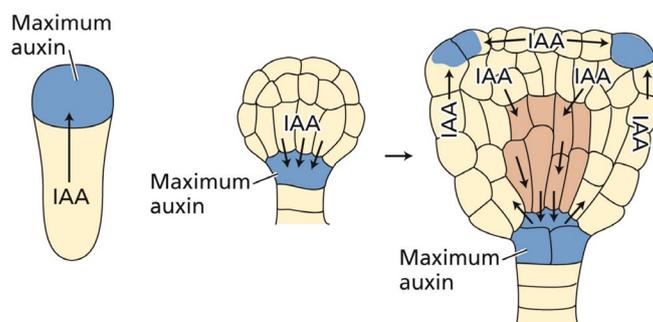


Рис. 6.4. Поток ауксина

Доменная структура зародыша

С помощью факторов транскрипции происходит разделение доменов:

- в апикальном домене семейство HD-ZIP III: PHB, PHV, REV, ATHB8, ATHB15
- в базальном домене: PLT1, PLT2, PLT3 (AINTEGUMENTA-LIKE 6), PLT4 (BABYBOOM)

Доменная структура зародыша изучена с помощью мутаций:

- норма – есть семядоли, гипокотиль, корень

- **gurke** – нет апикального домена (отсутствуют семядоли, апикальная меристема побега). GURKE (GK) – ацетилКоА-карбоксилаза (ACC1), продукт – малонилКоА. PASTICCINO3 (pas3) – аллельная форма гена gurke. А апикальной части у мутанта gurke области экспрессии генов SHOOT MERISTEMLESS (STM), AINTEGUMENTA (ANT) и CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) сильно перекрываются. Фенотип восстанавливается при добавлении малоната. Хизалофоп – ингибитор ацетилКоА-карбоксилазы. Вызывает у дикого типа нарушения эмбрионального развития. Мутации по элонгазам жирных кислот (гены ALE1 и FIDDLEHEAD) приводят к тому же фенотипу, что и gurke.

- **fackel** – нет центрального домена (отсутствует гипокотиль, семядоли прикреплены непосредственно к корневому полюсу). Это C-14-стеролредуктаза, контролирующая частичное восстановление углеродного скелета. Фенотипически похожие мутанты serphalopod и hydra 1. Мембрана обеднена стероидными соединениями, нарушается биосинтез brassinosteroidов.

- **bodenlos** – нет центрального домена. Транскрипционный фактор из семейства Aux/IAA.

- **topless** – при температурах около 16 °C выделяется побеговый и корневой полюс, семядоли отсутствуют. При высоких температурах у мутантов topless возникает 2 корневых полюса, апикальная меристема побега отсутствует. Это фактор ремоделинга хроматина, корепрессор, компонент HDAC (гистон-деацетилазного комплекса).

- **monopteros** – нет базального домена (отсутствует корень). Транскрипционный фактор из семейства ARF

- **gnom** – нет никаких доменов. Доменная структура зародыша возникает за счёт транспорта ауксина. Ген GNOM кодирует ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor (ARF-GEF). При мутации блокирована подвижность везикул и нет асимметричного распределения PIN. Фенотипически похожие мутанты knolle и keule – компоненты «Docking complex» плазмалеммы.

- **pickle** – меристема достаточно рано отмирает, а корень сохраняет эмбриональные характеристики и может регенерировать целое растение. Это фактор ремоделинга хроматина.

Кутикула покрывает апикальный домен, ограничивает зародыш от жидкого эндосперма и создаёт диффузионный барьер. Мутант gassho (от японского «две пальмы вместе») – семядоли часто срастаются в местах контакта. Это рецепторные киназы, экспрессируются в семядольных листьях. Лиганд – короткий пептид Twisted seed 1 (TWS1). Он сульфатируется по тирозину, пролин гидроксимируется в нескольких положениях. Важен для образования кутикулы зародыша, которая происходит в 2 этапа (рис. 6.5).

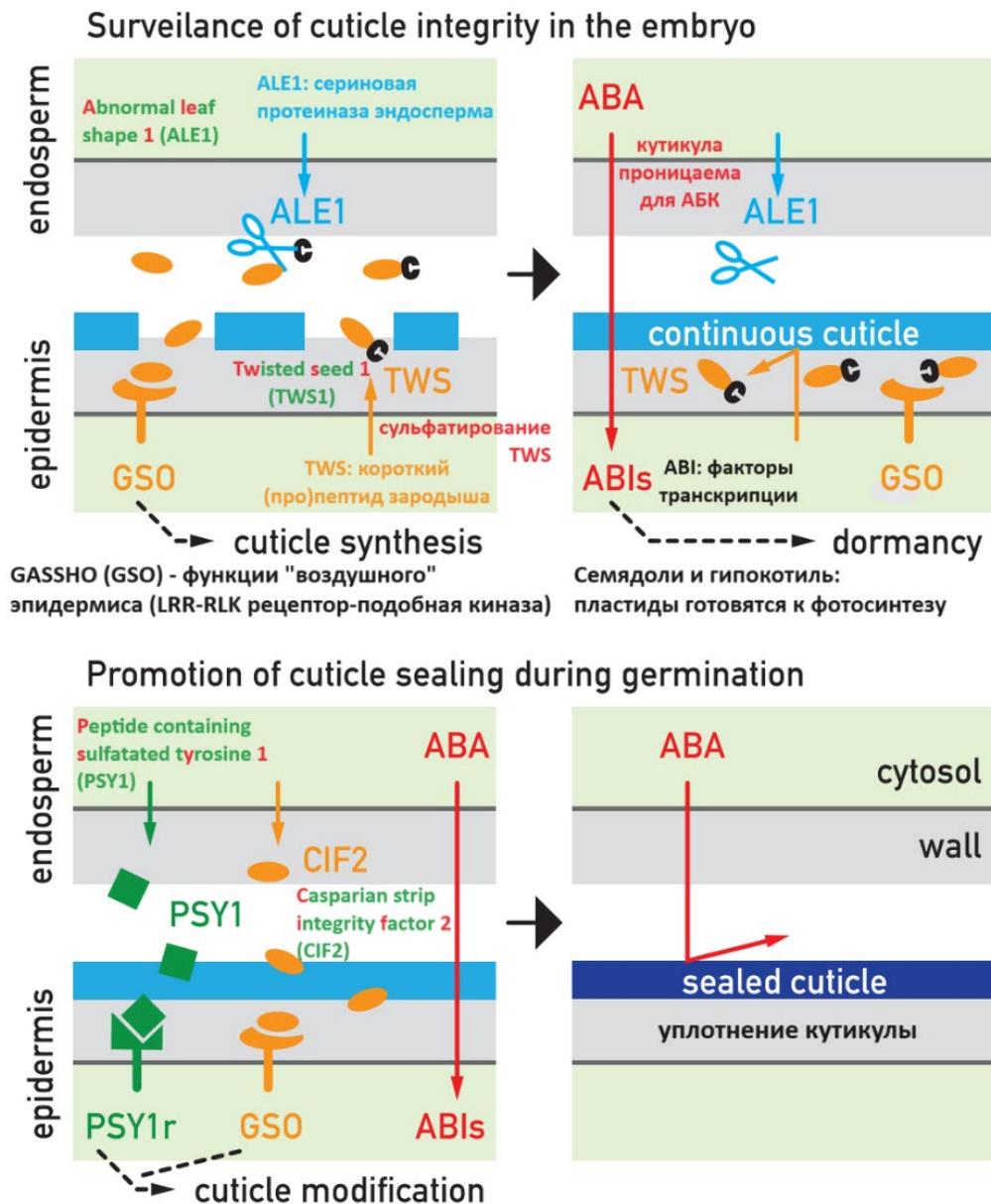


Рис. 6.5. Формирование кутикулы

Радиальная дифференцировка. Развитие семядолей

У мутантов **raspberry** нарушена радиальная дифференцировка. Они характеризуются крупными вакуолизированными клетками, которые замещают протодерму и паренхиму.

Клетки покоящегося центра делятся очень редко – они замещают утраченные меристематические клетки. Инициали центрального цилиндра, коры, ризодермы и корневого чехлика делятся в определённых направлениях и в диком типе образуют корневой чехлик, эпидермис, 2 слоя клеток коры, клетки перицикла и центрального цилиндра (рис. 6.6).

wol (wooden-leg) – рецептор цитокинина в корневой части. У мутанта не происходит индукция развития флоэмы.

scr (scarecrow) – транскрипционный фактор из семейства GRAS. У мутанта нарушен геотропизм побега, возникают клетки с промежуточными характеристиками паренхимы коры и эндодермы.

shr (short-root) – транскрипционный фактор из семейства GRAS. У мутанта не закладывается эндодерма, есть только клетки паренхимы

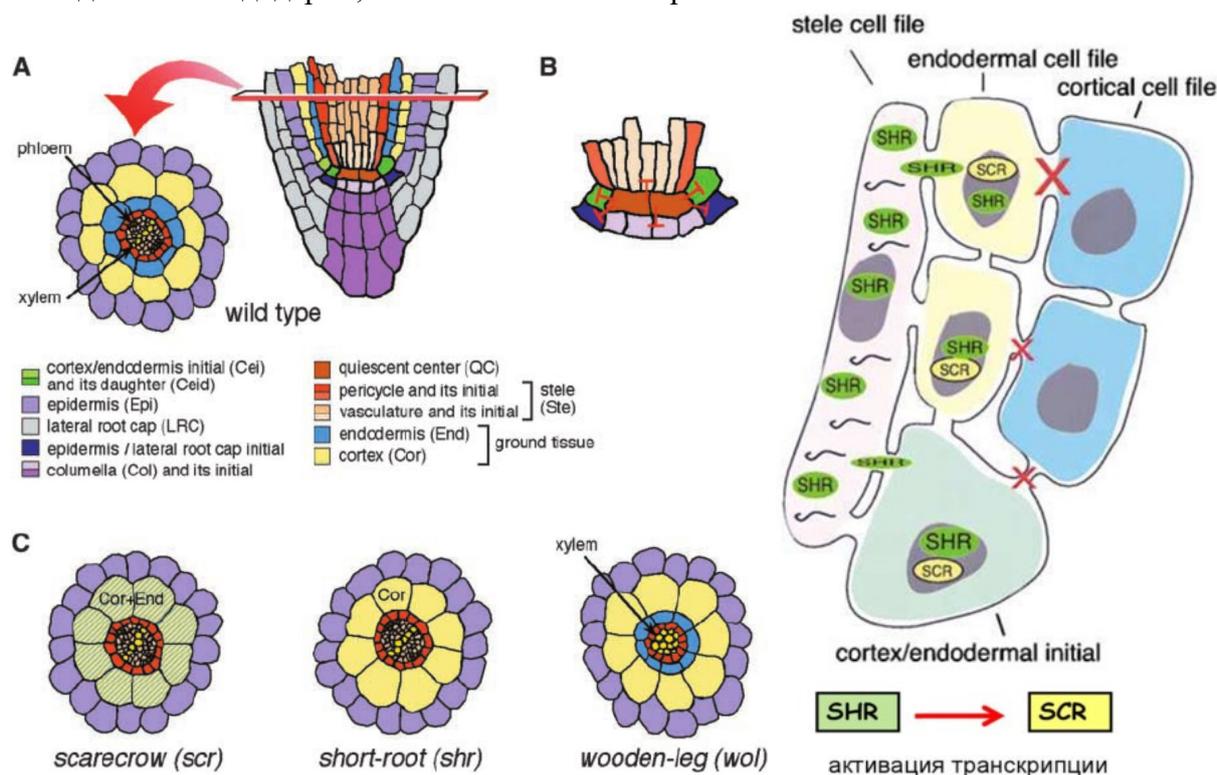


Рис. 6.6. Строение корня арабидопсиса у мутантов и дикого типа. Транспорт SHR

Белок SHR из центрального цилиндра по плазмодесмам перемещается в клетку будущей эндодермы, проникает в ядро и активирует фактор SCR. Под действием SCR плазмодесмы между эндодермой и кортикальными клетками коровой паренхимы перекрываются (рис. 6.6). Эктопическая экспрессия SHR в клетках эндодермы приводит к увеличению числа их слоёв.

Система взаимодействия гомологов SHR и SCR используется для дифференцировки клеток обкладки сосудистого пучка, эндодермы и крахмалоносного влагалища.

Мутанты с нарушенными поясками Каспари особенно чувствительны к дефициту калия, а также плохо переносят избыток железа.

Микро РНК – репрессоры работы определённых генов:

- miR164 ограничивает экспрессию CUC1 (коррелирует с активностью генов WUS). В центре меристемы не будет границ между органом и стеблем.

- miR165/166 ограничивает экспрессию транскрипционных факторов Homeodomain-Leucine zipper (HD-ZIP), маркирующих верхний домен.

BBM фактор транскрипции. LAFL-гены

Готтлиб Хаберланд постулировал **тотипотентность** растительных клеток: любая клетка может дать целый организм. При трансформации важно получить целое растение из трансформированной клетки. Не для всех растений удалось подобрать условия для регенерации. Проблемные растения: однодольные, голосеменные, двудольные (особенно с активным вторичным метаболизмом). У них к регенерации из одной клетки способны только очень ранние ткани.

При температурах выше +25°C пыльцевые зёрна рапса переходят к эмбриогенезу. При этом повышается транскрипция гена BABYBOOM (BBM), который активирует соматический эмбриогенез. Гиперэкспрессия фактора транскрипции BBM приводит к нарушениям развития. Чтобы этого избежать, применяют индуцибельные системы. Транзистентная экспрессия BBM приводит к развитию полноценных соматических эмбрионов без генно-инженерной вставки.

Для увеличения эффективности получения трансгенных растений разрабатываются протоколы, повышающие регенерацию у «неподатливых» видов растений (кукуруза, табак, какао, яблоня, сладкий перец и т.д.).

BBM запускает каскад LAFL-генов. Это факторы транскрипции, которые в норме управляют эмбриональным развитием:

- LEC1 (LEAFY COTYLEDON1) – у мутантов на семядольных листьях появляются волоски (трихомы), а также нарушаются процессы покоя зародыша и накопления питательных веществ. Зародыш плохо хранится, становится неустойчив к высыханию.
- ABI3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE3). У кукурузы VP1 (VIVIPAROUS1) – у мутантов зародыш прорастает без периода покоя непосредственно на материнском организме. Мутантные зародыши можно спасти, высаживая в грунт, но полученные растения неустойчивы к засухе. Всех мутантов ABI3, кроме VP1, можно лечить, добавляя абсцизовую кислоту. VP1 отвечает за трансдукцию сигнала от АБК и синтез антоцианов.
- FUS3 (FUSCA3) – у мутантов нарушен процесс накопления питательных веществ, из-за чего при подсыхании семенная кожура сморщивается. Тёмно-бурая семенная кожура у мутантов связана с нарушением биосинтеза фенольных соединений. Как и у LEC1, у мутантов на семядольных листьях появляются трихомы.
- LEC2 (LEAFY COTYLEDON2) – при гиперэкспрессии более выраженная пролиферативная активность по сравнению с LEC1. Его часто используют чтобы повысить эмбриогенный потенциал

На фоне мутаций по LAFL гиперэкспрессия BBM не эффективна.

LAFЛ-гены занимают центральное место в регуляторных каскадах (рис. 6.7).

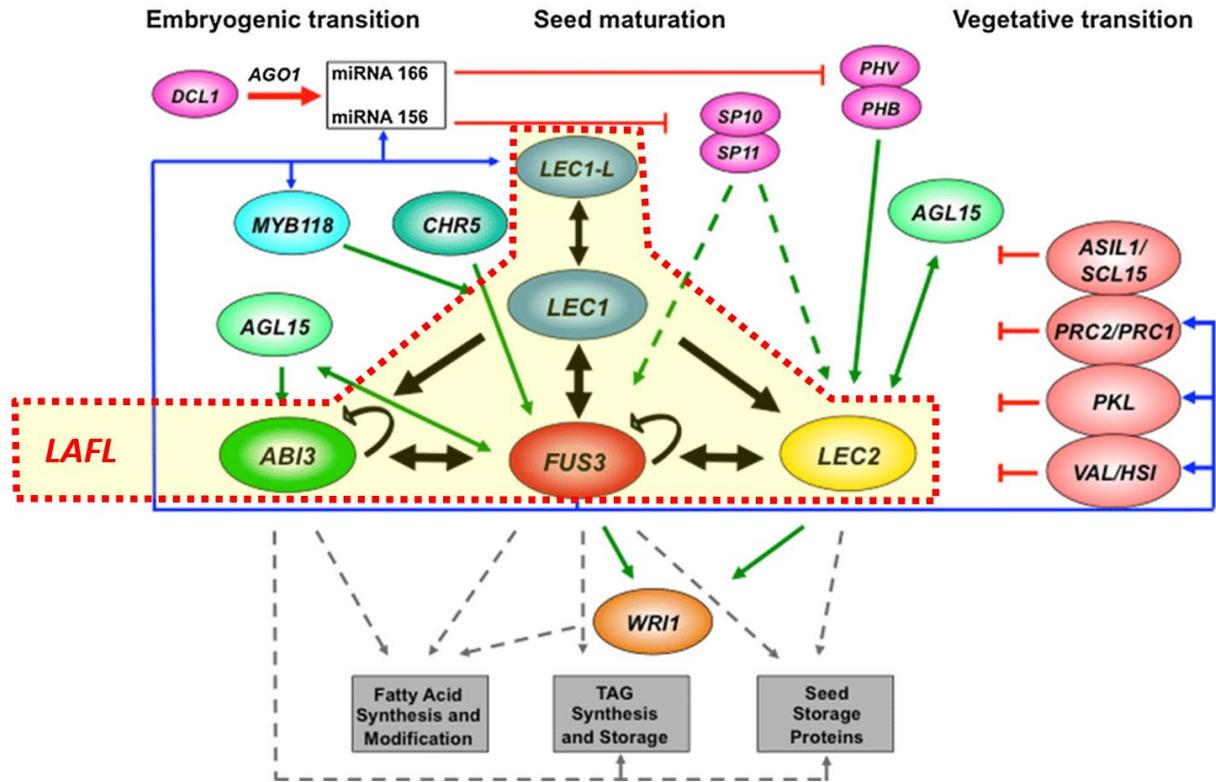


Рис. 6.7. Созревание семени: LAFЛ-гены

Семенная кожура

Семенная кожура возникает из тканей материнского растения. У многих растений она имеет тёмную окраску, которая возникает из-за окисления фенольных соединений – проантоцианидинов. Это защищает прорастающее растение от грибов и патогенных бактерий. Получены мутанты ТТ (TRANSPARENT TESTA) с нарушением накопления окрашенных веществ в семенной кожуре, в результате чего она оказывается прозрачной. ТТG (TRANSPARENT TESTA GLABRA) – мутант с двойным выражением. Помимо прозрачной семенной кожуры у него ещё и нет волосков в надземной части.

Чтобы семенная кожура прокрасилась, необходимо собрать комплекс из WD40 белка и двух факторов транскрипции из семейства bHLH и MYB. Он запускает комплекс процессов:

- синтез проантоцианидинов
- формирование слизистых клеток семенной кожуры (защита от высыхания и патогенов)
- транспорт в вакуоль ТТ12 – Vacuolar H⁺/Flavonoid antiporter
- закисление вакуоли (P_{3A}-H⁺-АТФаза)

Лекция 7. Функционирование апикальных меристем

Меристема побега проростка

Развитие меристемы зародыша семени арабидопсиса:

- 0 дней:** маленькая плоская меристема из 2-4 слоёв клеток. Всего около 110 клеток, нет зонирования
- 2 дня:** возникают примордии настоящих листьев. Около 130 клеток
- 4 дня:** уплощение примордиев, появление прилистников и трихом. Около 150 клеток
- 5-6 день:** трапецевидная меристема. Асинхронная и асимметричная закладка примордиев 3 и 4. Около 170 клеток.
- 7 дней:** прилистники 1 и 2 отмирают, возникают примордии 5, 6 и 7. Меристема выпуклая, приобретает свой окончательный вид. Полная дифференцировка на слои (туника, организационный центр меристемы, инициали корпуса). Около 450 клеток.

Возникновение третьего листа на 5-6 день сдвинуто вправо или влево относительно меристемы, что определяет дальнейшее направление спирального листорасположения. У арабидопсиса это направление определяется случайным образом, и этот признак не передаётся по наследству. Но существуют виды со стабильным направлением спиральности.

FOREVER YOUNG (FEY) – NAD-зависимая оксидоредуктаза, контролирует образование активных форм кислорода. При её повреждении меристема не может перейти в выпуклое состояние и продолжает быть плоской. Весь материал расходуется на формирование маленьких листьев, расположенных в случайном порядке.

disrupted (dip) – нарушено зонирование меристемы (нет чёткого деления на слои, не образуется организационный центр меристемы). Листья часто теряют дорзивентральность, то есть трихомы и устьица могут располагаться как на верхней, так и на нижней стороне листа. Материал меристемы расходуется на листья.

schizoid (shz) – отмирание *rib*-зоны меристемы, возобновление из пазушных почек. В результате возникает много боковых точек роста вместо одной центральной.

rootmeristemless 1 (rml 1) – кодирует γ -глутамилцистеинсинтазу. Нарушено развитие постэмбрионального корня. Есть эффект на побеге: арест развития КАМ. Можно «спасти» готовым глутатионом или вызывать ингибитором L-бутионинсульфоксииминном.

bypass 1 (bps 1) – кодирует подвижный сигнал неизвестной природы. Поступает из корня. У мутантов – арест развития ПАМ. Снижены ответы на цитокинин. Негативно регулируется геном WUS. Похоже по фенотипу на *rml 1*, но не «спасается» глутатионом.

fully fasciated (fuf) – лентовидная фасциация с нарушением филлотаксиса.

fasciated (fas) – фактор сборки хроматина (Chromatin assembly factor). Действует через WUS. При повреждении происходит арест развития ПАМ, меристема увеличена в размерах, нарушено её зонирование.

Факторы ремоделинга хроматина из семейства PolyComb регулируют переход к вегетативному росту или к цветению:

EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2) – после семядольных листьев меристема формирует не вегетативную часть, а цветок (чашелистики и лепестки). В норме гены развития цветка должны быть репрессированы.

CURLY LEAF (CLF)

FERTILIZATION- INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE);

MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) – ген дрожжей

Моделирование при помощи L-систем

Задаются правила деления и замены клеток (рис. 7.1):

- нитчатые водоросли, протонема мхов, начальные стадии прорастания спор, суспензор семенных растений (создание ровного ряда клеток)
- лист мхов, ранние этапы формирования заростка (создание плоскости)
- ПАМ у споровых растений (создание объёма)

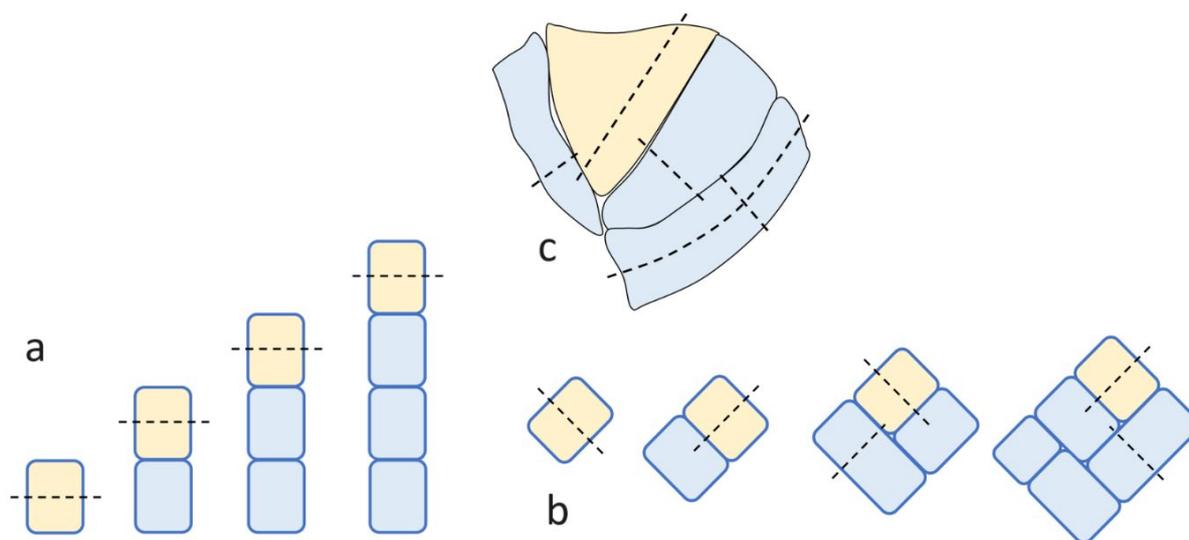


Рис. 7.1. Моделирование морфогенетических процессов при помощи L-систем

Клетки делятся, порождают друг друга, наследуют клеточные границы и дорастивают новые. Утолщённые не растущие межклеточные стенки играют решающую роль в образовании формы и размеров клеточного пласта.

Анатомический и физиологический подход

У голосеменных растений происходит эволюционный ароморфоз – вместо одной апикальной клетки (рис. 7.2 a, b) возникает группа клеток (рис. 7.2, c). Они делятся, дают производные вглубь тела растения (корпус) и вбок (мантия). Эпидермальные

клетки делятся упорядоченно, а клетки второго слоя уже могут делиться в поперечном направлении (рис. 7.2 d). В отличие от споровых, если погибнет одна инициальная клетка, то её функции возьмут на себя окружающие клетки и меристема достаточно быстро восстановится. У цветковых растений клетки лежат слоями (рис. 7.2 e, f). Вместо мантии здесь возникает туника.

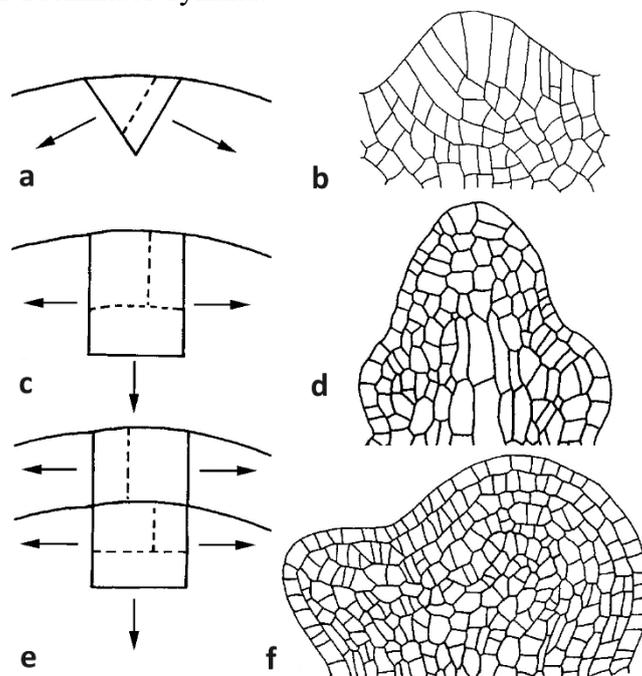


Рис. 7.2. Схемы деления инициальных клеток побеговой апикальной меристемы

У однодольных меристема секторального строения, можно отследить потомков одной группы клеток. У двудольных меристема может быть слабо зонирована, тогда в ней нет выраженных функциональных доменов (например, у *Xanthium*). У *Aesculus* же в центре вокруг организационного центра находятся слабо вакуолизированные клетки с плотным содержимым. В периферической зоне вакуолизация нарастает, рост клеток усиливается. Из инициалей корпуса возникает медуллярная зона меристемы.

У арабидопсиса клеток меньше. Верхушку покрывают несколько слоев клеток, которые называют туникой, под ними – не так строго ориентированные клетки корпуса. Первый (L1) и второй (L2) слои туники выделяются хорошо, третий (L3) выделяется не всегда, так как в нём уже могут происходить неупорядоченные деления.

В меристеме выделяют функциональные симпластические домены – центральную и периферическую зоны (рис. 7.3). В пределах одной зоны плазмодесмы открыты, а между этими зонами – закрыты, то есть они не обмениваются сигнальными веществами. Чтобы пополнить периферическую зону, в какой-то момент плазмодесмы открываются, появляется поле симпластического домена, которое временно объединяет клетки периферической и центральной зоны. А после выхода клеток в периферическую зону, плазмодесмы снова закрываются. Благодаря этому в растении есть запас клеток, к

которым не могут добраться вирусы (большинство из них перемещаются по плазмодесмам). **Метод культуры апикальных меристем** (механическое выделение центральной части и пересадка её на среду) помогает оздоравливать растения от вирусов.

Организационный центр (ОС) контролирует развитие меристемы, его клетки делятся очень медленно. Если какие-то клетки меристемы повреждены, организационный центр может пополнить их запас. **Центральная зона (CZ)** – это недифференцированные редко делящиеся клетки туники. Дочерние клетки CZ составляют **периферическую зону (PZ)**. Они делятся в разных направлениях с непостоянной скоростью, а также способны к дифференцировке. **Риб-зона (RZ)** – это зона закладки проводящей системы (медуллярная зона). Её составляют растущие и делящиеся клетки корпуса на разных стадиях дифференцировки.

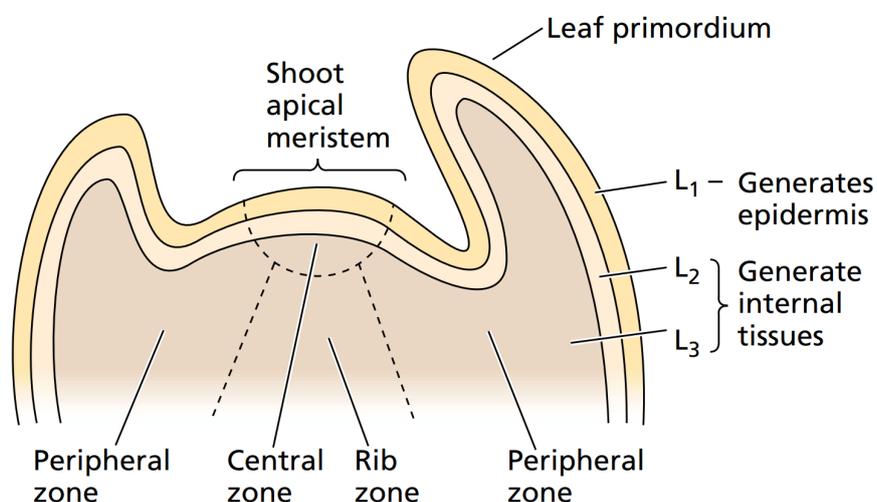


Рис. 7.3. Строение апикальной меристемы вегетативного побега у двудольных

Механические свойства меристем. KNOX-гены

Механические свойства меристематических тканей исследуют при помощи кантилевера на основе того, как клетки реагируют на воздействие частиц-зондов разного размера. Такое «ощупывание» меристемы показывает, что поверхностный слой равномерен по механическим свойствам. Но в субэпидермальных слоях в области инициации примордия листа происходит уменьшение жёсткости. Это сопровождается неоднородностью работы генома – прекращают работать KNOX-гены, в том числе **SHOOT MERISTEMLESS (STM)**. В листе очень важно прекратить неорганизованную пролиферацию, в противном случае получается изрезанный лист с многочисленными очагами роста (мутация *knotted 1* в листе кукурузы и сверхэкспрессия KNOX генов в листьях арабидопсиса и табака).

Существует 2 класса: **KNOX I** (поддержание меристемы) и **KNOX II**, а также родственные гены класса **BELL**. На ранних этапах эволюции они контролировали цикл развития гамет и зигот. У хламидомонады, например, в гаметах одного пола это BELL,

а другого – KNOX, соответственно в зиготе они работают совместно. У мхов программа развития диплоидного спорофита контролируется BELL и KNOX I, а BELL и KNOX II негативно регулируют программу развития гаметофита. У сложноорганизованных растений BELL и KNOX I занимаются пролиферацией и поддержанием работы и меристемы, а развитием листьев и дифференцировкой тканей – BELL и KNOX II.

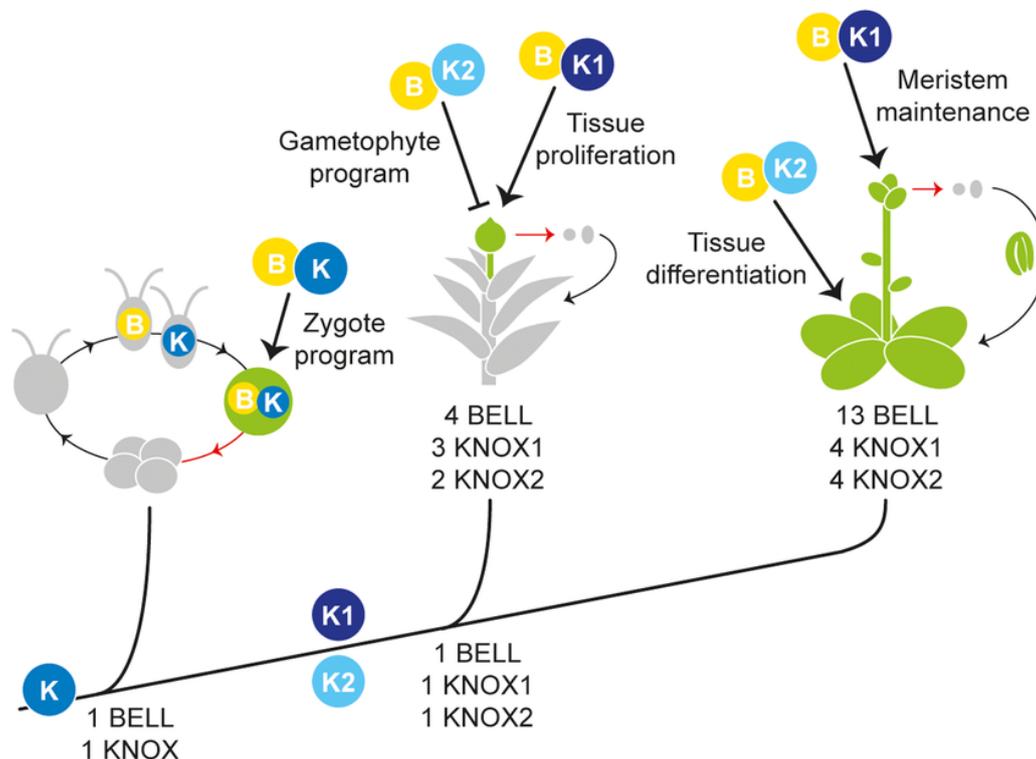


Рис. 7.4. Функциональная специализация генов BELL и KNOX

Клеточные деления у высших растений контролируются ауксинами и цитокининами. В любой меристеме цитокинины производятся в виде изопентениладенина (iP) и используются для регуляции на месте. KNOX-гены класса I (*STM*, *KNAT1*, *KNAT6*) «включают» гены изопентенилтрансферазы (*IPT*), что приводит к синтезу цитокининов. Там, где эти гены выключены, цитокининов становится меньше, клетки переключаются с программы деления и приступают к растяжению. *STM* из семейства KNOX выключает гены *AS1* и *AS2*, которые работают в листьях (рис. 7.5). Поэтому в центре меристемы никогда не возникают новые листья.

Также KNOX I негативно регулируют синтез гиббереллинов: выключают *GA20ox* (отвечает за биосинтез гиббереллинов) и активируют *GA2ox* (переводит гиббереллины в неактивное состояние). На месте будущего примордия листа скапливается ауксин (IAA), что служит триггером для генов *AS*, которые выключают KNOX (рис. 7.5). Это ведёт к активации *GA20ox* и синтезу гиббереллинов (GA), которые преобладают в листьях.

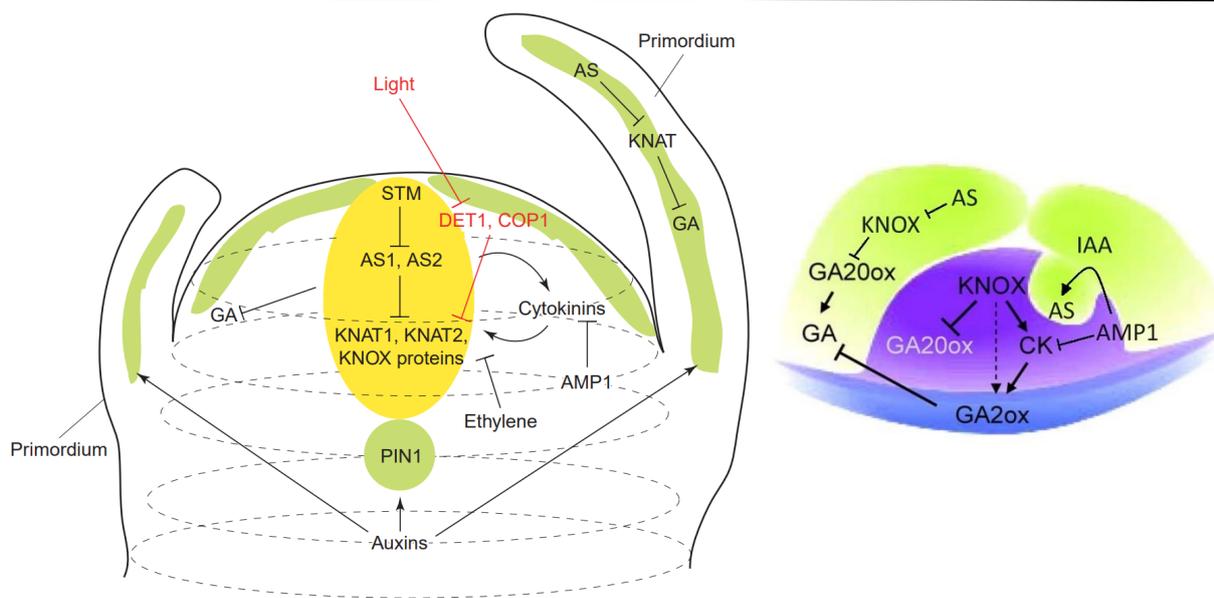


Рис. 7.5. KNOX-гены и гормональный контроль

Гены семейства WOX. Короткие пептиды и их рецепторы

WUS-бокс кодирует гомеодомен, который может располагаться в разных частях кодирующей области. У арабидопсиса обнаружено 15 генов из семейства WUS-related homeobox (WOX).

Три клады:

- древняя клада: WOX10, 13, 14 (зелёные водоросли, мхи, папоротники)
- промежуточная клада: WOX8, 9, 11, 12 (голосеменные)
- современная клада: WOX1-7, WUS (цветковые)

У арабидопсиса в норме WUS экспрессируется в организационном центре меристемы. Его активность важна для низкой пролиферации этих клеток. В случае фасциации (у мутантов *clv3*) WUS экспрессируется по всему объёму меристемы, кроме поверхностных слоёв клеток, при этом размер меристемы увеличен. Это означает, что для экспрессии WUS важен позиционный сигнал. При гиперэкспрессии по гену *CLV3* WUS не включается, меристема уменьшена и рано отмирает.

Возникает регуляторный контур, в котором клетки слоя L1 производят короткий пептид CLV3, который воспринимается рецепторами CLV1 и CLV2. Это репрессирует ген WUS, который положительно регулирует активность гена *CLAVATA3*. Помимо CLV3 есть и другие короткие пептиды.

Исходно продукт белка CLV3 образуется как очень крупный пре-пропептид. (рис. 5.3). После транскрипции сигнальная последовательность пре-пропептида расщепляется в эндоплазматическом ретикулуме, образуя пропептид. В аппарате Гольджи пропептид подвергается аминокислотным модификациям (обозначены звёздочками на рис. 5.3): гидроксилирование (обычно пролина), гликозилирование

(например, арабинозой), сульфатирование. Пропептид секретируется в апопласт, где активный пептид высвобождается путём дальнейшего протеолиза.

Ген *CLV3* не активен в эмбриональной меристеме. Он экспрессируется в стволовых клетках, а *CLV1* и *2* – в более глубоких слоях (там же, где и *WUS*).

LRR RLK (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases) – это рецепторы коротких пептидов. Они имеют экстраклеточный лейцин-обогащённый протяжённый гидрофобный домен, а также трансмембранный и киназный домены. У арабидопсиса эта функция задублирована: *CLV1*, *VAM3*, *VAM2* и *VAM1* могут создавать рецепторные комплексы, которые будут воспринимать короткий пептид *CLV3*.

Развитие *SAM* регулируется по типу отрицательной обратной связи (рис. 7.6). *WUSCHEL* (*WUS*) – кодирует трансфактор с гомеодоменом, активизирует деление клеток *SAM*. *CLAVATA* (*CLV*) 1,2,3 – функционально связанные гены. *CLV1* – LRR киназа, *CLV2* – LRR-белок, *CLV3* – небольшой (11 kDa) водорастворимый белок. *KAPP* – фосфатаза.

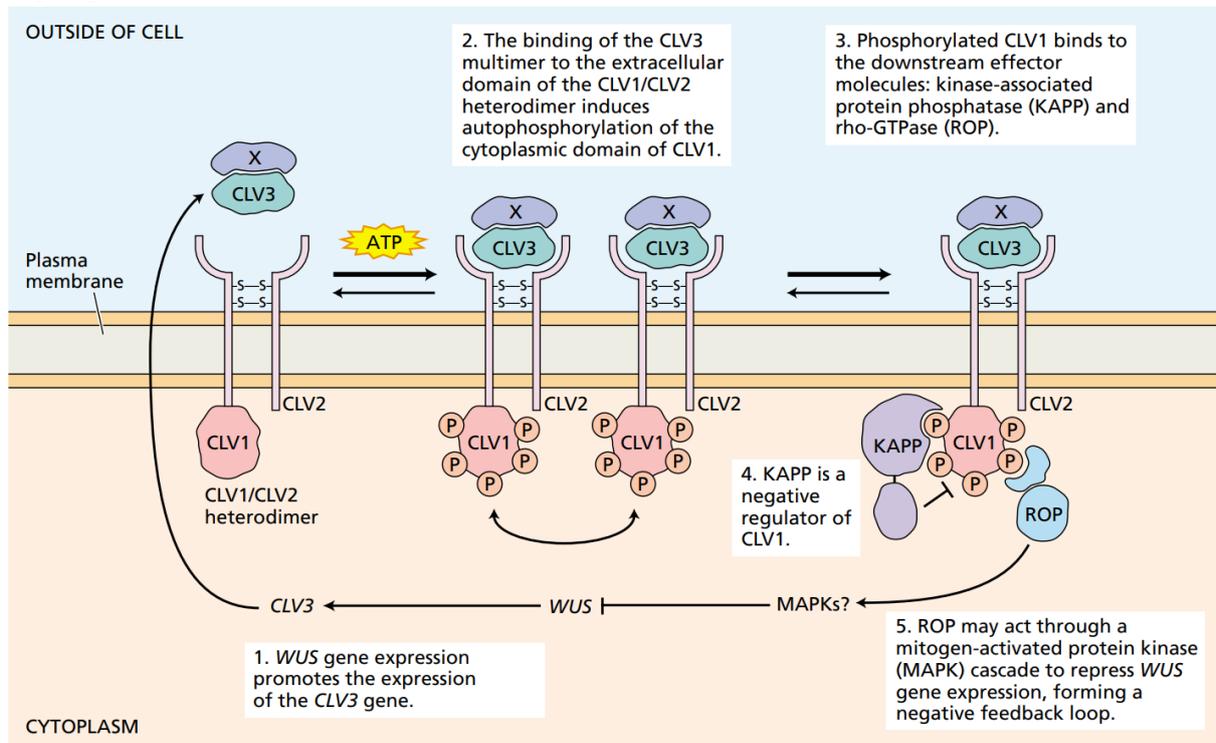


Рис. 7.6. Сигнальный каскад *CLV1/CLV2* и петля обратной связи с геном *WUS*

Рецепторная киназа *CLV1* димеризуется с корецептором *CLV2*, образуя гетеродимер. Трансфактор, кодируемый геном *WUS*, активизирует деление клеток апекса стебля. Увеличение числа клеток апекса стебля увеличивает транскрипцию *CLV3*. Модифицированный короткий пептид *CLV3* связывается с рецептором, что приводит к автофосфорилированию *CLV1* и подавляет экспрессию гена *WUS*, который необходим для поддержания клеток апекса стебля. В результате число клеток апекса стебля

уменьшается, что приводит к снижению уровня *CLV3*. Это вызывает увеличение экспрессии *WUS*, что активизирует деление клеток апекса стебля (рис. 7.7).

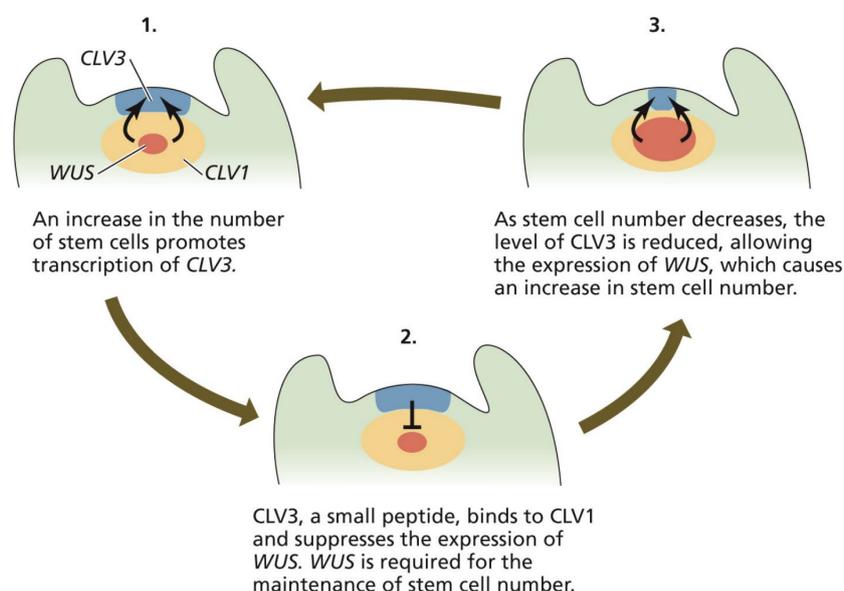


Рис. 7.7. Петля отрицательной обратной связи в регуляции развития SAM

Ген *CORYNE* (*CRN*) кодирует рецептор-подобную киназу, которая схожа с *CLV1*, и образует гетеродимер с *CLV2*. Короткий пептид *CLV3* ничем не задублирован. Если происходит мутация, приводящая к отсутствию *CLV3*, меристема увеличивается в сотни раз. Повреждение *CLV1* приводит к увеличению меристемы примерно в 10 раз, повреждение *CLV2* – в 2-5 раз, поскольку функции этих генов задублированы.

В клетках поверхностного слоя меристемы отсутствуют лейцин-обогащённые рецепторные киназы. В среднем и нижнем слоях экспрессируются гены рецепторных киназ, взаимодействующих с CLE-пептидами. В нижнем слое экспрессируется ген *WUSSEL*. Его продукт по плазмодесмам направляется в самый поверхностный слой, где попадает в ядро и запускает экспрессию *CLV3*. После процессинга и экскреции *CLV3* по системе межклеточников диффундирует в более глубокие слои. Слой вторых клеток синтезирует рецепторные киназы, однако здесь сигнал в ядро не идёт. Рецепторная система здесь настроена на то, чтобы уменьшить концентрацию пептидов *CLV3*. Часть *CLV3* доходит до нижних клеток и связывается с рецепторами, что по механизму отрицательной обратной связи приводит к снижению экспрессии гена *WUSSEL*.

Нарушение отрицательной обратной связи приводит к тому, что экспрессия гена *WUSSEL* продолжается, в результате чего центральная зона разрастается. Такое увеличение объёма меристемы называется фасциация.

Фасциация

Термин «фасциация» (от лат. *fascia* – пучок) иногда носит интерпретационный характер: увеличение меристемы, изменение формы стеблей и числа образуемых

листьев считали результатом срастания нескольких побегов. Лучше считать результатом увеличения размеров ПАМ.

Причины:

1. Вирусные, грибные и бактериальные инфекции
2. Температурный режим (охлаждение)
3. Мутации (повреждение системы регуляции объёма ПАМ)
4. Физиологические нарушения (транспорт ауксинов)

При различных типах фасциации происходит преобразование нормальной анатомической структуры побега (рис. 7.8, а). При гребневидном разрастании ПАМ наблюдается плоская фасциация (рис. 7.8, b); ПАМ может искривляться (рис. 7.8, c); в некоторых случаях замыкаясь в кольцо (кольцевая фасциация, рис. 7.8, d). Увеличение ПАМ с сохранением ее геометрии приводит к радиальной фасциации (рис. 7.8, e). Радиально фасцированный побег может стабилизироваться за счет закладки дополнительных проводящих пучков (рис. 7.8, f), или разрушения плохо иннервируемой центральной зоны (рис. 7.8, g). В некоторых случаях увеличенная ПАМ приобретает неправильную форму (рис. 7.8, h) и склонна к дефасциации (рис. 7.8, i).

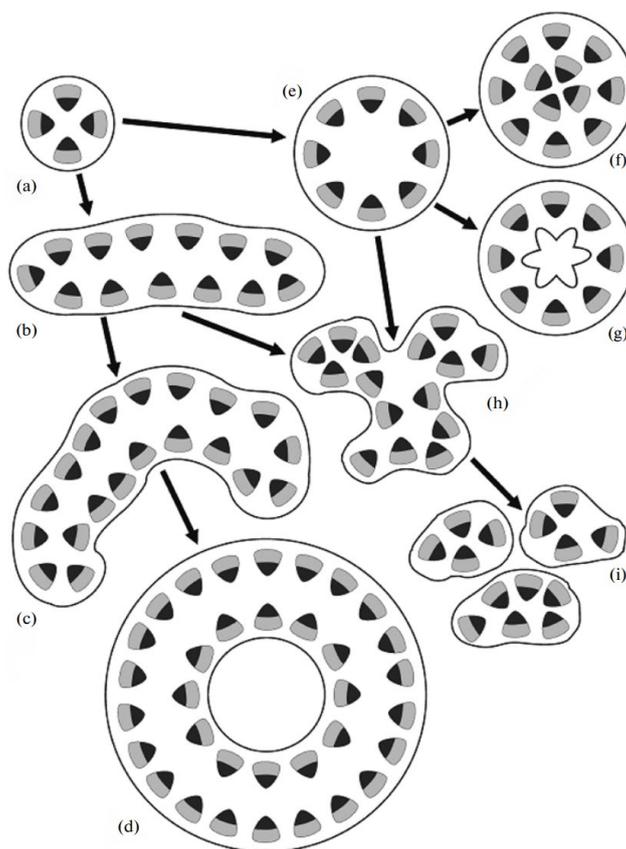


Рис. 7.8. Типы фасциации

Основные элементы контроля объёма меристемы представлены на рис. 7.9.

	<i>Arabidopsis</i>	Rice	Maize	Tomato
Homeodomain TF HD WUS box EAR	WUS	TAB1	-	LC?
LRR-RLK	CLV1	FON1	TD1	FAB
LRR-RLP	CLV2	-	FEA2	-
Pseudokinase	CRN	-	-	-
LRR-RLK	BAM1, 2	-	-	-
LRR-RLK	RPK2	-	-	-
CLE peptide CLE	CLV3	FON2, FOS1, FCP1	-	FAS
Arabinosyltransferase HPAT	-	-	-	FIN
Arabinosyltransferase GT77	-	-	-	FAB2
GRAS TF GRAS	HAM 1, 2, 3	-	-	-
Heterotrimeric G proteins Gα/β subunit	ABG1 (β)	-	CT2 (α)	-

Рис. 7.9. Элементы контроля объёма меристемы у разных видов растений

Фасциация должна приводить к изменениям в филлотаксисе. У фасцированного мутанта кукурузы *ABPH1* листья и пазушные почки переходят от очерёдного листорасположения к накреступротивному. *ABPH1* (*aberrant phyllotaxis1*) индуцируется цитокинином. Это гомолог двухкомпонентных киназ, негативный регулятор клеточных делений. При мутации клеточные деления меристемы усиливаются, в следствие чего она увеличивается в объёме.

Мутант *ABPH2* похож по фенотипу. Однако *ABPH2* – глутаредоксин, возможно, восстанавливающий дисульфидные связи в bZIP-факторах транскрипции. У кукурузы экспрессия этого гена локализована в периферической зоне меристемы (примерно там, где должны закладываться листья). Если на раннем этапе развития рассечь такую удлинённую меристему, то образуются два островка клеток, каждый из которых функционирует как отдельная меристема. В этом случае объём меристемы уменьшается, восстанавливается исходный очерёдный филлотаксис.

Похожий мутант у риса – *decussata* (*dec*). Молекулярные основы не выяснены.

Мутанты с увеличенной меристемой, как правило, плодовиты. *POLTERGEIST* – супрессор мутаций *clv*. *POLTERGEIST* проявляется только на фоне мутаций *clv*, а на

фоне дикого типа не проявляется, поскольку имеет дублирующий ген – *POLTERGEIST LIKE1 (PLL1)*. *POLTERGEIST (POL)* и *POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1)* – протеинфосфатазы 2С, которые регулируют программу развития меристемы и активность *WUS*. Двойной мутант *pol* и *pll1* имеет фенотипическое проявление, характеризующееся нехваткой органов цветка, уменьшенным объёмом меристемы, недоразвитием пестика. Мутантный фенотип не исправляется на фоне *clv3*. Гиперэкспрессия *pll1* характеризуется увеличением объёма меристемы.

Генетический подход

Таким образом, общая схема генетической регуляции развития меристемы представлена на рис. 7.10.

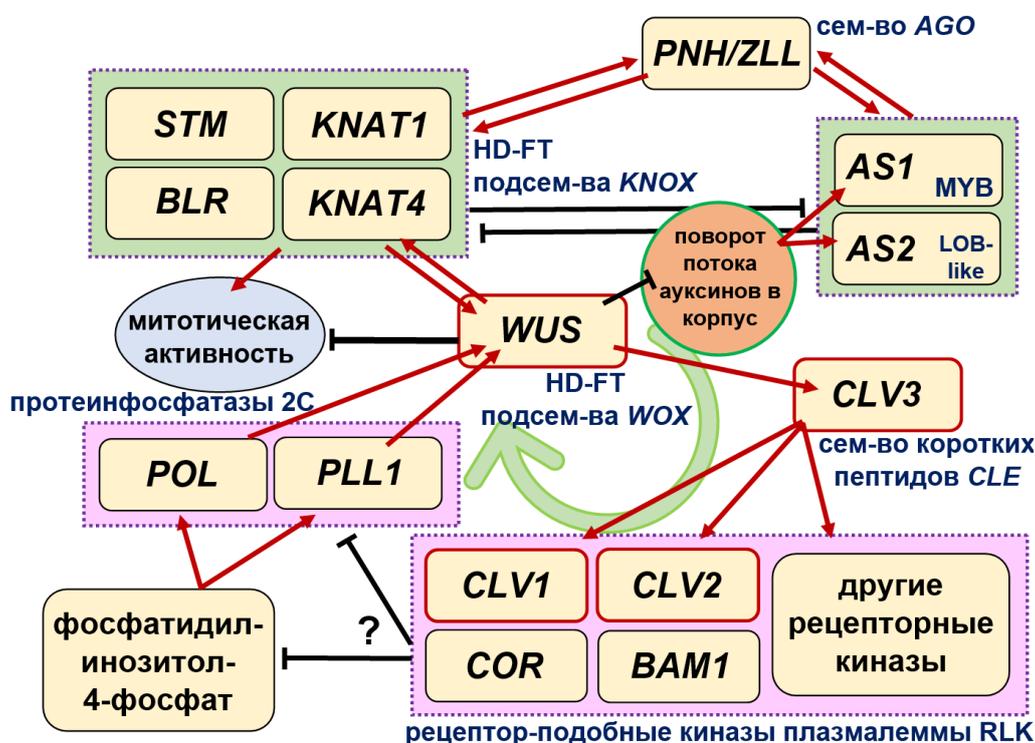


Рис. 7.10. Генетический подход

При ослаблении потоков ауксина область активности *WUS* возрастает, увеличивается центральная зона меристемы, что приводит к фенокопии мутации *CLV* (увеличенная меристема и попытка фасциации).

Пазушная меристема изначально возникает как небольшая группа клеток, в которых сначала активируются гены *WUS*, а затем *CLV3*. Экспрессия *WUS* сосредотачивается в ядрах клеток организационного центра пазушной меристемы, которая ещё не дифференцирована морфологически. В процессе роста *WUS* перемещается от поверхности вглубь на 2-3 слоя клеток, и меристема принимает функционирующий вид. Активность *CLV3* сначала совпадает с *WUS*, а затем смещается к поверхностным клеткам (рис. 7.11).

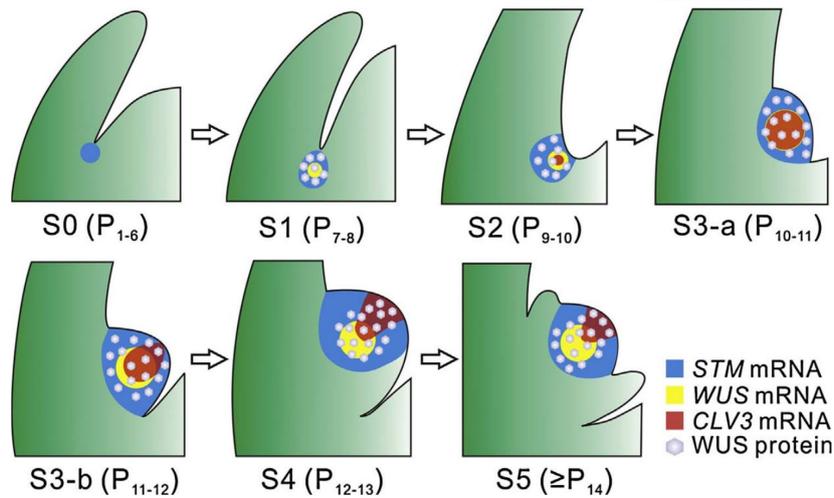


Рис. 7.11. Пазушные меристемы

Побеговая и корневая апикальные меристемы имеют сходную генетическую регуляцию (рис. 7.13). Если в организационном центре побеговой меристемы работает *WUS*, а в покое центре корня работает ген *WOX5* из того же семейства. Но в отличие от *WUS*, ген *WOX5* работает под большой нагрузкой ауксина, который стекается из центрального цилиндра и мощным потоком проходит через покоящийся центр и отправляется в корневой чехлик. *WUS* и *WOX5* восстанавливают нормальные фенотипы у мутантов, восполняя функции друг друга.

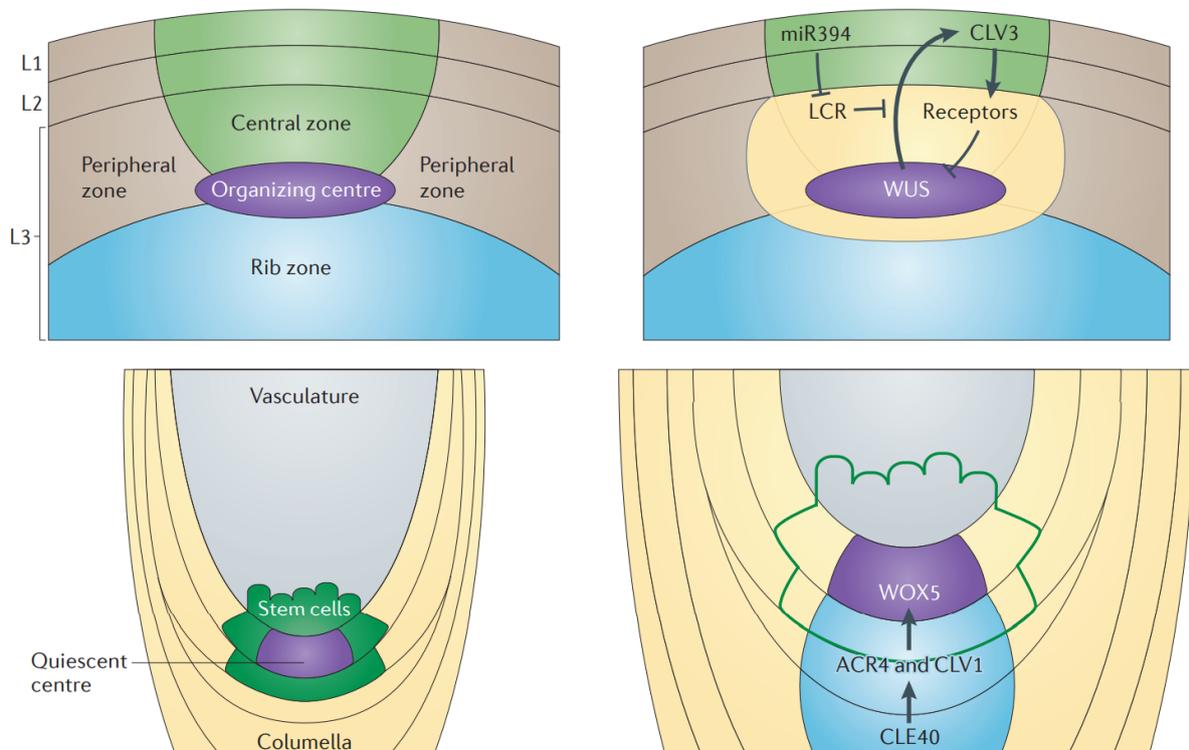


Рис. 7.13. Генетическая регуляция и сигналинг в апикальной меристеме побега и корня

В корневой апикальной меристеме методом обратной генетики выявлена экспрессия *CLV3*-подобных генов: *CLE19* и *CLE40*. *CLV3* и *CLE40* также взаимозаменяемы.

Таким образом, в покоящемся центре корневой меристемы работает *WOX5*. В клетках колумеллы экспрессируется короткий пептид *CLE40*, который взаимодействует с разнообразными рецепторными комплексами (в частности *ACR4*). Принимают участие те же рецепторные компоненты: корецептор *CLV2*, киназа *CRN*, рецепторная киназа *CLV1*. Сигнал, полученный от *CLE*-пептидов, по механизму отрицательной обратной связи подавляет экспрессию *WOX5*.

У мутантов *mgoun1 (mgo1)* и *mgoun2 (mgo2)* увеличивается размер периферической зоны ПАМ. Это также приводит к фасциациям. *mgoun1* – топоизомераза IB-типа. У мутантов *amp1 (altered meristem program 1)* размер периферической зоны ПАМ увеличивается изодиаметрически, что влияет на филлотаксис. Появляются новые клеточные ниши в периферической зоне, может закладываться больше листьев, органов в цветке и т.д. Мутация связана с повышением уровня эндогенного цитокинина. *AMP1* и *LAMP1 (like-altered meristem program 1)* возможно кодируют глутаматкарбоксипептидазу. У животных она участвует в синтезе нейротрансмиттеров. У растений эти гены негативно регулируют уровень цитокининов и пролиферативную активность клеток.

Лекция 8. Морфогенез листа

Полярный транспорт ауксина. Этапы развития листа

Лист – универсальный орган, который путём метаморфоза может превращаться в разные структуры. Разметка листьев начинается с экспрессии гена *ANT* в месте, где конвергирует поток ауксина и создаётся его локальный максимум. При этом здесь отключаются *SML* и *NAD1* (гены из семейства *NOX1*), которые контролировали пролиферацию.

Этапы развития листа (рис. 8.1):

1. Разметка в периферической зоне ПАМ (локальные максимумы ауксина)
2. Инициация примордия (изменение направления деления клеток в слоях L2 и L3)
3. Адаксиализация/абаксиализация
4. Деление клеток, эндоредупликация, вакуолизация
5. Фаза перехода (transition)
6. Рост (expansion)
7. Клеточная дифференцировка
8. Зрелый лист
9. Старение и опадание

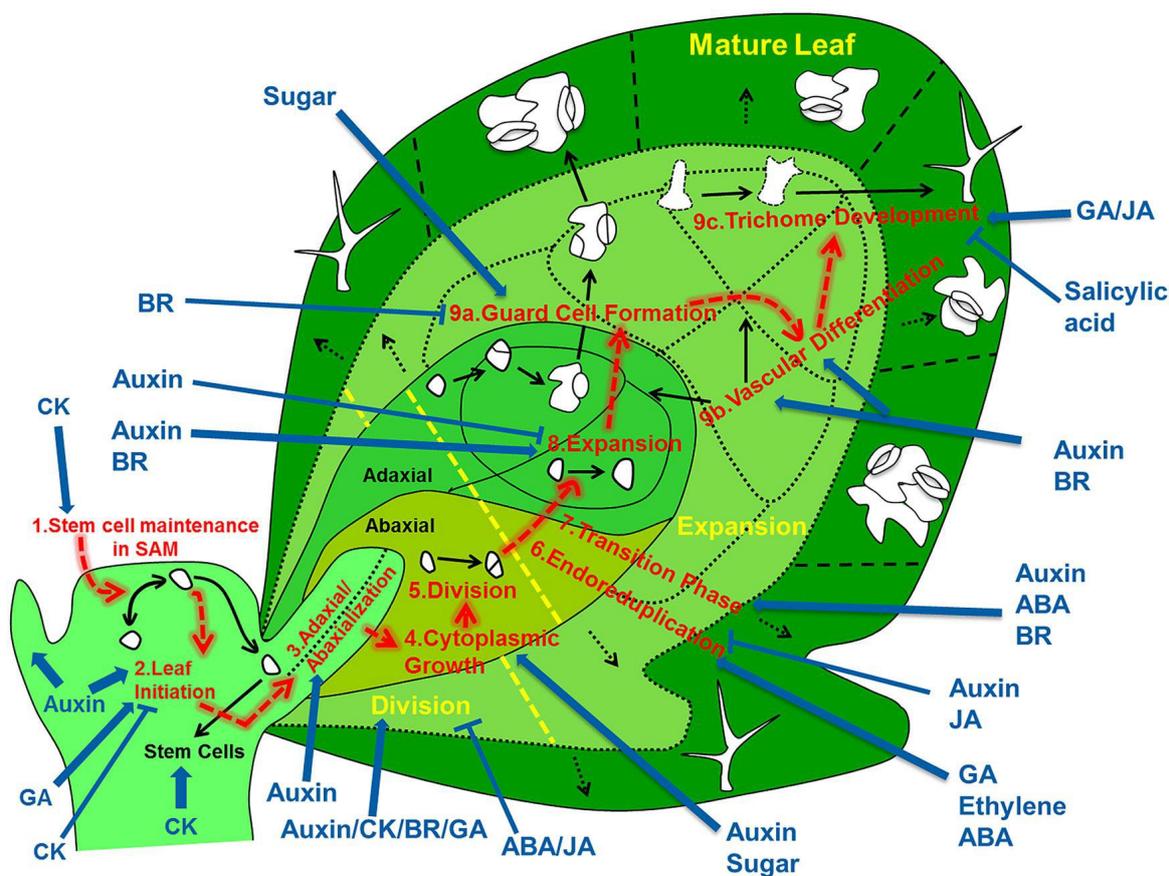


Рис. 8.1. Регуляторные процессы в развитии листа

Разметка и инициация листа. Границы примордия. Форма листа

Инициация примордиев листьев:

1. Экспрессия факторов транскрипции MYB-family: *ASYMMETRIC LEAF 1 (AS1)*, *ROUGH SHEATH 2 (RS2)*, *PHANTASTICA (PHAN)* – *ARP*
2. Экспрессия генов факторов транскрипции LOB-family: *ASYMMETRIC LEAF 2 (AS2)*, NAC-domain family
3. При участии факторов ремоделинга хроматина (HIRA) происходит «выключение» факторов транскрипции *KNOX*

Фактор транскрипции AP2-family *AINTEGUMENTA (ANT)* отвечает за пролиферацию клеток примордия. У мутантов листья более узкие, с более крупными клетками и низким митотическим индексом.

Роль генов меристемы в развитии листа изучали с помощью *ANT*. *WUS* запрещает развитие листьев, при этом семядольные листья есть, так как они контролируются на более ранних этапах другими генами. *STM* не подавляет инициацию листа, но сильно влияет на его форму, листья редуцированы до лопастных пальцевидных структур.

Факторы транскрипции NAC-domain family *CUP-SHAPED COTYLEDONS (CUC1, CUC2, CUC3)* экспрессируются на границе органа, ингибируют транспорт ауксина и замедляют рост клеток. Это мишень для *miR164*.

Ген *UNUSUAL FLOWER ORGANS (UFO)* экспрессируется на границе органа вместе с *CUC*, но не влияет на вегетативной фазе.

Факторы транскрипции LOB-domain family *LATERAL ORGAN BOUNDARY (LOB)* экспрессируются на границе органа, ингибируют транспорт brassinosteroidов и замедляют рост клеток. Другие гены со сходными функциями (*LBD, JLO*) участвуют в перераспределении PIN и репрессии *KNOX1*.

Гены, участвующие в инициации листьев из меристемы побега, также изменяют форму листовой пластинки. По краю развивающихся листьев арабидопсиса возникают периодические максимумы ауксина, обрамлённые границами экспрессии гена *CUC* (рис. 8.2). В таких местах формируются зубчики листьев. Белок *PINI* способствует образованию пика ауксина. *PINI* положительно регулируется ауксином и *CUC2*. Высокий уровень ауксина, в свою очередь, подавляет *CUC2*.

Форма листа также зависит от экспрессии генов из семейства *KNAT*. У паслёновых гиперэкспрессия *KNOX*-генов приводит к сильным эффектам. Возникают не просто дополнительные лопасти, как у арабидопсиса, а даже новые очаги роста: некоторые участки листа чувствуют себя как побеговая меристема, на них возникают новые эктопические почки, из которых развиваются листья.

Для листьев сложной формы характерно сохранение активности *KNOX*-генов (возможно повторное использование в развитии). Гены *CUC* экспрессируются на границах между зубцами, лопастями или листочками сложного листа.

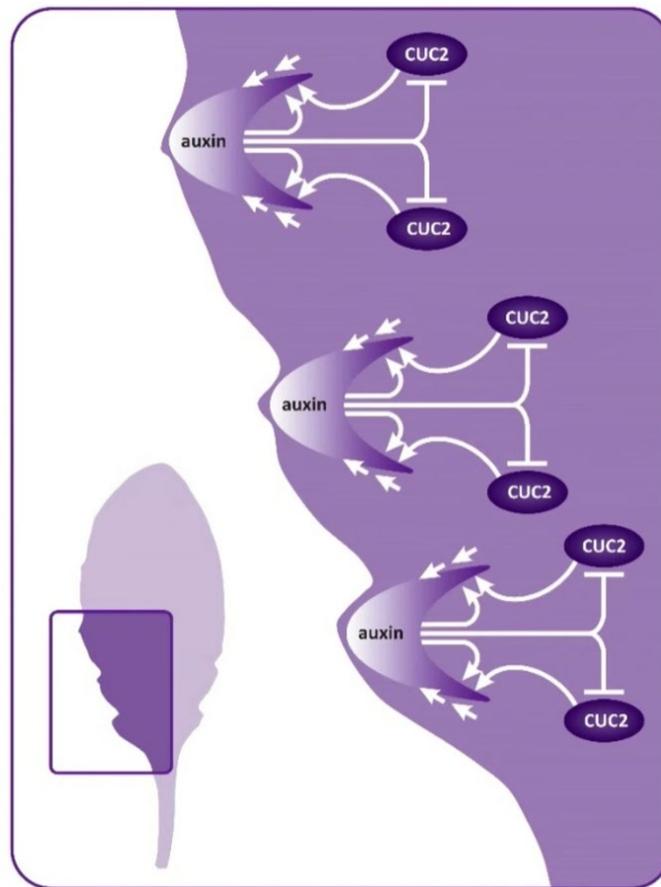


Рис. 8.2. Регуляция формирования зубчиков листа у арабидопсиса

Активность генов KNOX позволяет модулировать соотношение между фазами морфогенеза листа (рис. 8.3).

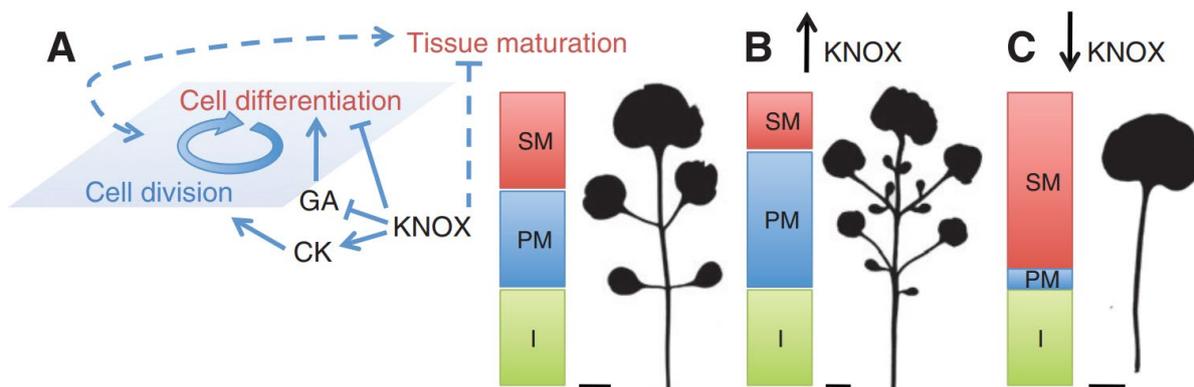


Рис. 8.3. Модель развития сложного листа, регуляция белками KNOX

Развитие сложных листьев происходит в три стадии: инициация (I), первичный морфогенез (PM), вторичный морфогенез и созревание (SM). Активность KNOX регулирует переход от первичного ко вторичному морфогенезу, так что созревание

ткани подавляется до соответствующего времени развития (пунктирная синяя линия). Во время первичного морфогенеза белки KNOX активируют уровни цитокинина (СК) и подавляют активность гиббереллина (GA), активируя клеточное деление и подавляя клеточную дифференцировку, чтобы обеспечить образование листьев (рис. 8.3, А). Баланс между клеточным делением и дифференцировкой также влияет на созревание тканей и наоборот (пунктирная синяя стрелка). Повышение активности KNOX удлиняет фазу первичного морфогенеза, позволяя повторять программу инициации листовок, что приводит к формированию более сложного листа (рис. 8.3, В). Снижение активности KNOX приводит к сокращению фазы первичного морфогенеза и преждевременному наступлению фазы вторичного морфогенеза, в результате чего формируется более простой лист.

Полярность листа. miRNA и tasiRNA

Дифференцировка листа происходит в трёх направлениях: адаксиально-абаксиальном, проксимально-дистальном и медиально-латеральном (рис. 8.4).

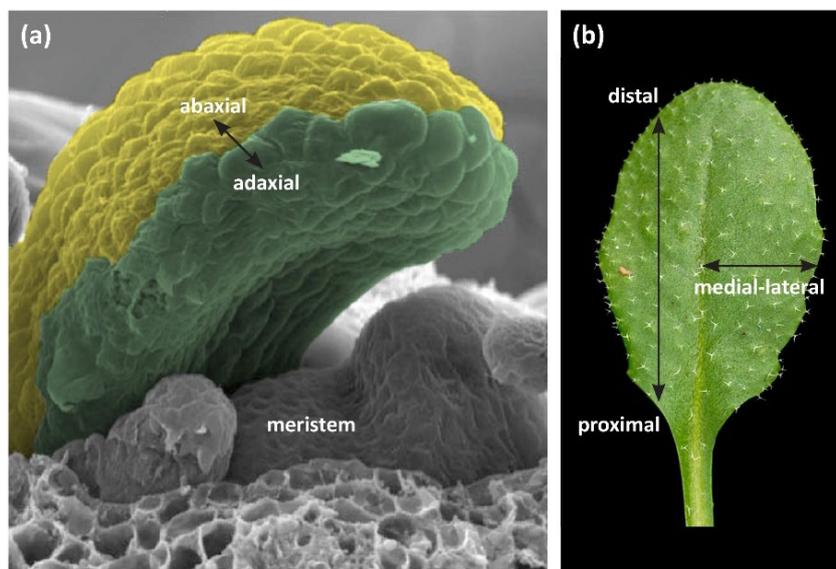


Рис. 8.4. Полярность листа

Важную роль в программах развития листа играют микро-РНК (miRNA) и транс-действующие малые интерферирующие РНК (ta-siRNA) – рис. 8.5. Они позволяют контролировать гены. В местах, где есть активность определённых микро-РНК, не возникают белковые продукты соответствующих генов.

Одна и та же микро-РНК может образоваться из продуктов различных генов. Это позволяет включать определённую микро-РНК в зависимости от разных стимулов, в разных участках и на разных этапах развития. Промоторы генов различаются, то есть можно использовать одну и ту же микро-РНК для регуляции нескольких процессов, разобщённых во времени и пространстве. При доминантных мутациях, когда ген-мишень не чувствителен к miRNA/tasiRNA, наблюдается его эктопическая экспрессия.

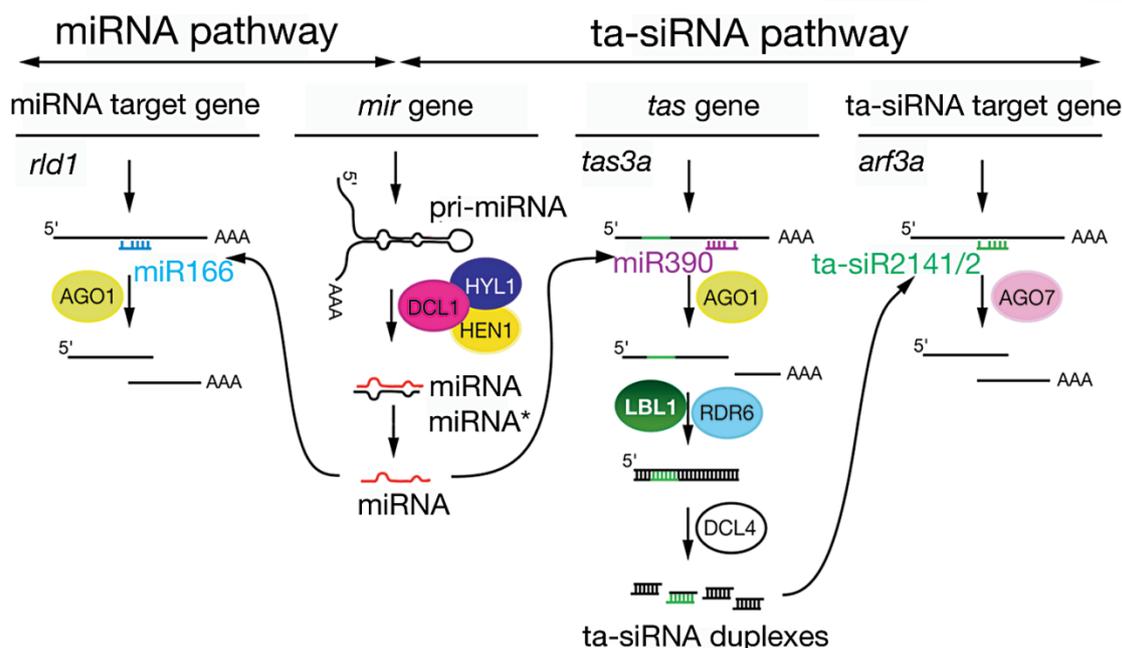


Рис. 8.5. Сигнальные пути miRNA и ta-siRNA в развитии листа

Микро-РНК важны на разных этапах развития листа (рис. 8.6).

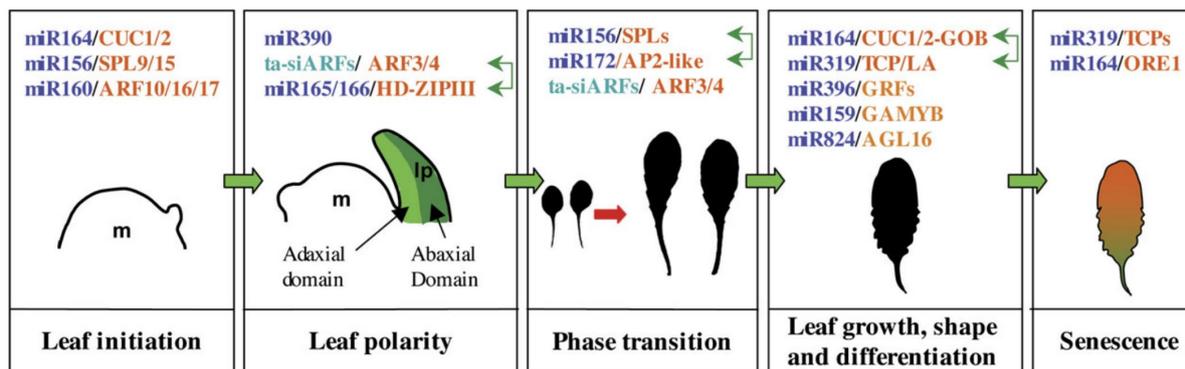


Рис. 8.6. Малые РНК и их мишени регулируют различные стадии развития листьев

Адаксиально-абаксиальная полярность

Лист условно разделяется на верхнюю (адаксиальную) и нижнюю (абаксиальную), между которыми находится маргинальная меристема («средний», латеральный домен листа). Гены *WOX3/PRESSED FLOWER (PRS)* и *WOX1* позволяют организовать маргинальный рост листовой пластинки, отграничивают адаксиальную и абаксиальную сторону (рис. 8.7).

Мутанты:

- *phantastica* – лист радиально симметричный, вся поверхность нижняя, нет дифференцировки мезофилла, центральный пучок почти полностью состоит из флоэмы, с небольшим количеством ксилемы в центре.

- *phabulosa-1d* – утрачена чувствительность к микро-РНК, вся поверхность листа верхняя, усеяна трихомами, сосудистый пучок окружён ксилемой, внутри немного флоэмы.
- *leafbladeless 1* – лист радиально симметричный, вся поверхность нижняя, в сосудистом пучке нарушено распределение флоэмы и ксилемы, вокруг образуется пояс клеток обкладки.

Адаксиальное развитие (верх)

Факторы транскрипции Homeodomain leucine zipper (HD-ZIPIII):

PHABULOSA (PHB)

PHAVOLUTA (PHV)

REVOLUTA (REV)

LITTLE ZIPPER 1, 2, 3, 4

miR390 → *TAS3* → *tasiR2141/2142*

Программы развития:

1. Трихомы (*Arabidopsis*)
2. Пузыревидные клетки (*Zea*)
3. Столбчатый мезофилл
4. Ксилемный полюс сосудистого пучка

Отрицательная обратная связь:

1. Экспрессия ZPR под действием HD-ZIPIII
2. Гетеродимеризация ZPR + HD-ZIPIII
3. Снижение связывания с целевыми промоторами

Абаксиальное развитие (низ)

Факторы транскрипции GARP family:

KANADI (KAN) – несколько генов

Факторы транскрипции YABBY family:

FILAMENTOUS FLOWER (FIL)

YAB3

AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)

ARF3/ETT

ARF4

miR165/166

Программы развития:

1. Устьица (*Arabidopsis*)
2. Губчатый мезофилл
3. Флоэмный полюс сосудистого пучка

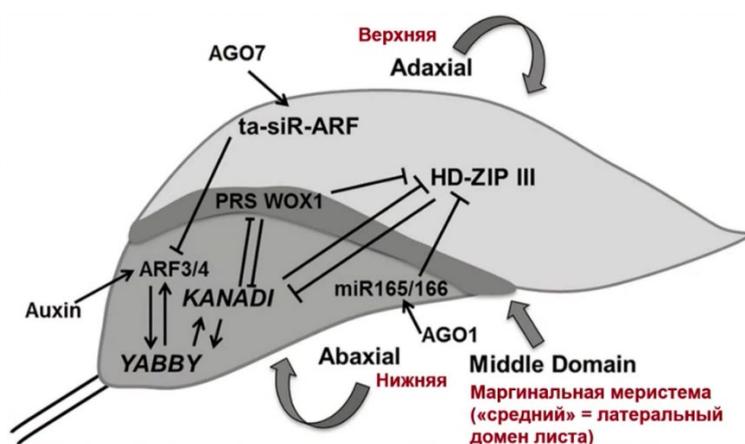


Рис. 8.7. Регуляция развития адаксиально-абаксиальной полярности

У тюльпана бифациальные листья (есть верхняя и нижняя поверхности). У ириса и лука унифациальный лист, то есть вся поверхность абаксиальная (нижняя). Адаксиальная часть такого листа расположена у основания. На рис. 8.8 представлено строение таких листьев.

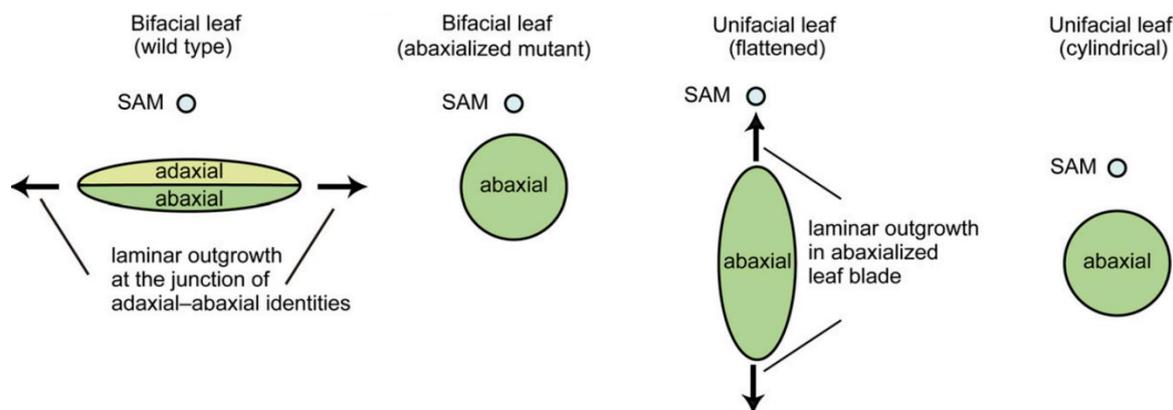


Рис. 8.8. Бифациальные и унифациальные листья

Латерально-медиальная полярность

Транскрипционные факторы *WOX*-family: *WOX3/PRESSED FLOWER (PRS)* и его гомологи у кукурузы *NARROW SHEATH 1* и *2 (NS1, NS2)*.

У мутантов *ns* маргинальный рост слабо организован, узкое основание листа и листовая пластинка (рис. 8.9). Если мутация приходится на середину листа, то особых изменений в ширине органа не происходит. Если мутация захватывает края листа, то лист оказывается уплощённым.

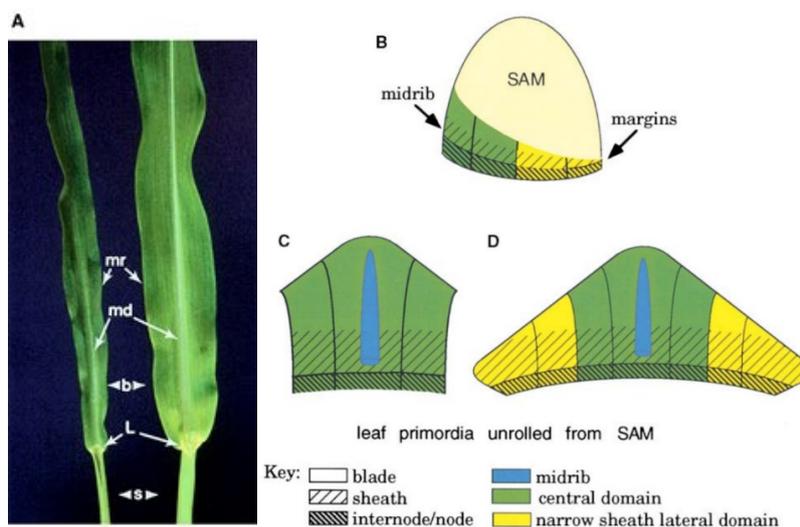


Рис. 8.9. Мутант *ns*

В унифациальных листьях экспрессия гомологов *WOX* обнаруживается в тех местах, где лист организует свой рост (перпендикулярно меристеме)

Проксимально-дистальная полярность

Проксимальное развитие

Транскрипционные ко-активаторы NPR1-family:

BLADE ON PETIOL (BOP1 и BOP2)

1. Экспрессируются у основания листа
2. Программа развития черешка и основания листа
3. Образование зоны опадения
4. Супрессия брактей (прицветников) у *Arabidopsis*

Дистальное развитие

Факторы транскрипции с Zn-пальцами

JAGGED (JAG) и JAGGED-LIKE (JGL)

1. Экспрессируются на верхушке примордия
2. Контролируют клеточные деления
3. Предполагается, что BOP и JAG/JGL негативно регулируют друг друга

У однодольных и двудольных лист растёт по разным клеточным механизмам (рис. 8.10). У однодольных клетки делятся примерно в одном и том же направлении поперечно листу. Возникает система из клеточных файлов – длинных рядов клеток, в базальной части которых происходят деления, а верхней начинается дифференцировка. Кончик листа постепенно отходит от зоны деления, при этом дифференцировка нарастает.

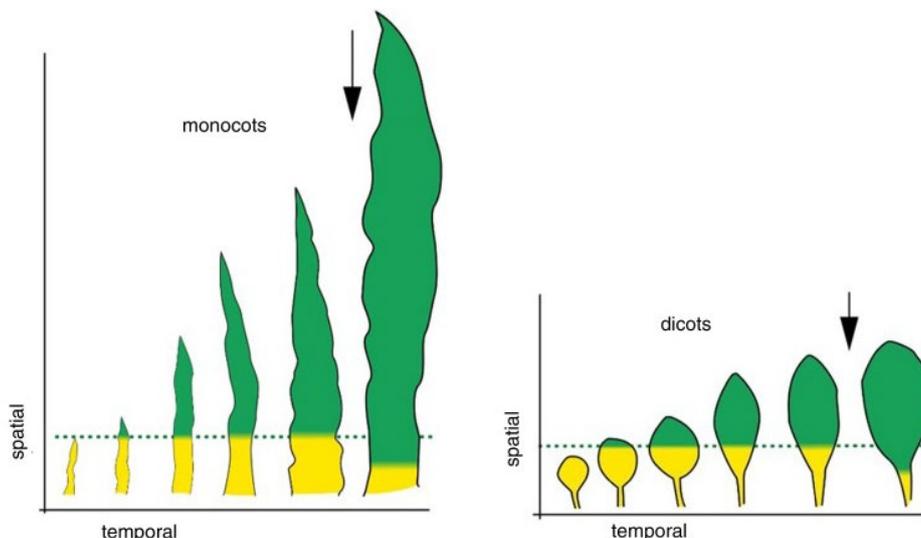


Рис. 8.10. Гомология листьев у однодольных и двудольных

У двудольных тоже есть фаза, когда заметная часть листа делится. В дальнейшем базальное нарастание постепенно сокращается и начинается разрастание верхней части. При этом также характерен маргинальный рост, который создаёт листовую пластинку. Между уже дифференцированными участками листа можно увидеть ещё не дифференцированные части эпидермиса.

Разметка проводящей системы

1. Полярный транспорт ауксина и первичная разметка (выбор клеток с образованием клеточных доменов PIN1 – акцепторов ауксина)

Поток ауксина у арабидопсиса в верхней части собирается в две точки и отправляется вглубь, чтобы влиться в прокамбий центральной жилки (рис. 8.13, В). У арабидопсиса замкнутая проводящая система. При инициации жилок дифференцировка не идёт до конца (не доходит до края листа) и появляются петли (I1, I2, I3), которые соединяются анастомозами (рис. 8.13, А). Иногда появляются дополнительные жилки, которые вливаются в общую проводящую систему. У других растений прокамбий дифференцируется вплоть до края листа, а жилки заканчиваются в зубчиках листа.

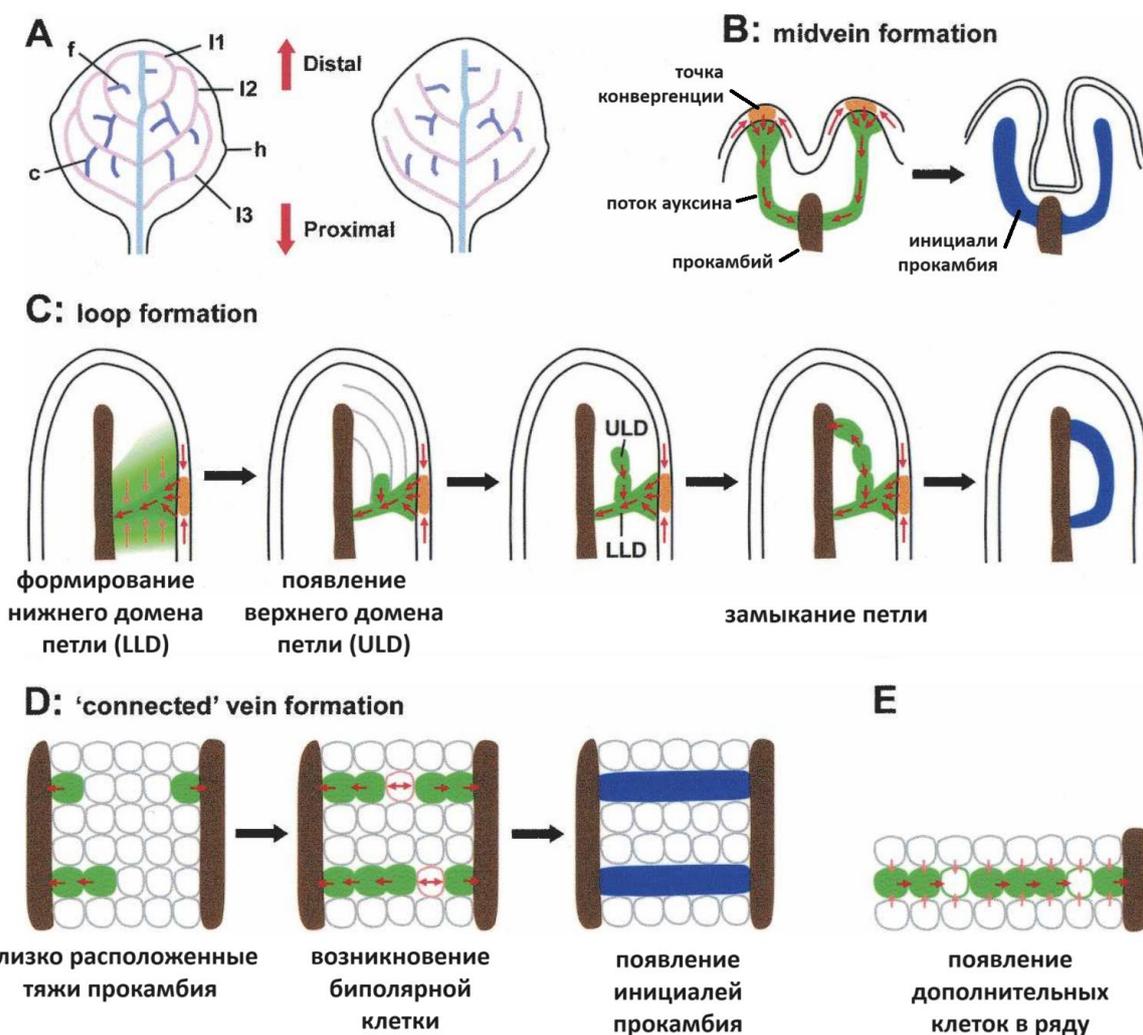


Рис. 8.13. Разметка проводящей системы в листьях

При формировании боковой петли ауксин также собирается на поверхности и отправляется вглубь по направлению к главной жилке. К нему подсоединяются потоки от соседних клеток. То есть формируются два сонаправленных сливающихся потока. В

верхнем домене петли формируется биполярная клетка, которая отправляет поток ауксина в противоположные стороны, что позволяет замкнуть петлю (рис. 8.13, С).

Аналогично формируются анастомозы между жилками (рис. 8.13, D). Клетки начинают отправлять ауксин в сторону ближайшей жилки, к ним присоединяются соседние клетки, возникает ряд. Чтобы ряды между жилками сомкнулись, необходимо формирование биполярной клетки.

2. Обретение идентичности инициалами прокамбия

Динамика формирования рисунка жилкования зависит от уровня ауксина, что показано на примере образования петли, но в целом одинаково применимо ко всем жилкам (рис. 8.14).

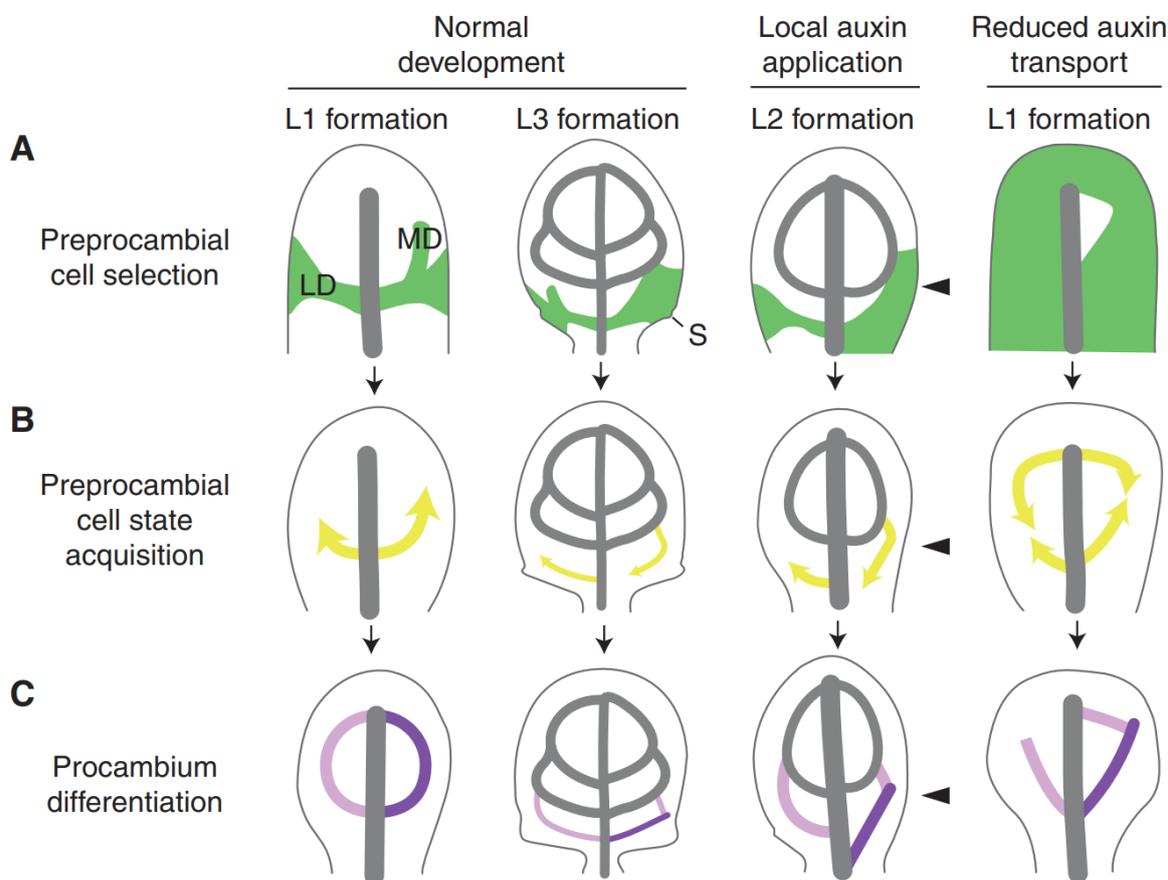


Рис. 8.14. Регуляция образования жилок за счёт полярного транспорта ауксина

В норме первая и вторая пары созревают в направлении от средней жилки, а третья – в противоположном направлении. Дополнительная обработка ауксином усиливает потоки и изменяет дифференцировку проводящей системы – образуется одна более крупная петля. При ингибировании полярного транспорта ауксина происходит слияние тяжей инициалей прокамбия.

3. Формирование прокамбия

Сложный лист. Фасциация

У арабидопсиса очень простой лист, листовая пластинка плавно сужается в черешок.

У гороха есть мутанты, которые изменяют структуру сложного листа (рис. 8.15, 8.16):

- *tendriless (tl)* – без усиков (фактор транскрипции HD-ZIP I)
- *afila (af)* – все листочки заменены на усики (функция неизвестна). Эти мутанты важны с точки зрения промышленного производства, можно не использовать опоры при полевом выращивании.
- *af tl double mutant* – сильно разветвлённый лист, вместо усиков образуется множество мелких листовых пластинок.
- *tendrilled acacia (uni-tac)* – гомолог *LFY* и *FLORICAULA*, фактор транскрипции спираль-поворот-спираль. Аллель с низкой экспрессией нормального продукта, усики иногда образуются.
- *unifoliolate (uni)* – аллель с нефункциональным продуктом, сложный лист превращается в простой или слаболопастный.

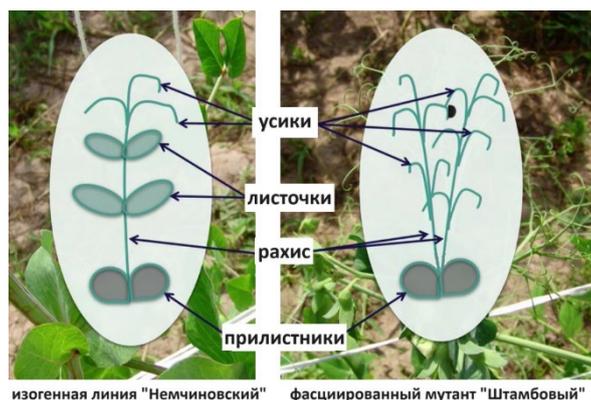


Рис. 8.15. Изменение сложного листа у мутантов гороха

Возникновение сложного листа непосредственно связано с меристемой. При фасциации у гороха специфическим образом меняется филлотаксис: листья в узлах располагаются не по одному, как в норме при дистихии, а парами (два листа возникли из единой blastozоны). В зависимости от величины blastozоны могут закладываться как просто организованные, так и сложно организованные листья (вплоть до трёх листьев в одной blastozоне). При разделении на два сложных листа центральный прилистник имеет оба гладких края, в отличие от боковых, поскольку он получает позиционную информацию сразу от двух листьев. Для бобовых при фасциации характерно изменение состава сложного листа (увеличение числа листочков). В норме у одного листа есть единственная почка, которая развивается в пазухе, а у фасциированного листа пространство пазухи увеличено, что может приводить к её заполнению несколькими боковыми побегами.

Лекция 9. Дифференцировка клеток эпидермиса

Проксимально-дистальная полярность

Типы дифференцирующихся клеток:

1. Основные клетки (pavement) – иногда дифференцированы
2. Волоски (трихомы) + окружающие их клетки. Трихомы различных типов:
 - а) простые на листе и стебле
 - б) различной степени разветвлённости
 - в) железистые (выделяют/накапливают секрет)
 - г) корневые волоски
3. Замыкающие клетки устьиц
4. Побочные клетки устьичного аппарата
5. Пузыревидные клетки (у злаков)

Проксимально-дистальная полярность помогает выстроить программу морфогенеза и легко её соблюдать. Самые зрелые структуры наблюдаются в дистальной части листа, а в проксимальной части располагаются более ранние дифференцировки. У однодольных деление клеток происходит у основания листа, далее происходит растяжение и дифференцировка. Клетки формируют файлы (ряды). У двудольных в этот процесс вмешивается латеральный рост листа (вширь). Тогда между дифференцированными структурами могут вкрапляться ещё не дифференцированные.

Развитие трихом

Функции трихом:

- клейкий секрет железистых волосков нужен для обездвиживания насекомых
- отпугивание насекомых резким запахом
- опушение из жёстких разветвлённых клеток неприятно для поедателей
- на волосках могут задерживаться пылинки, споры грибов
- волоски замедляют воздухообмен, около листа повышается влажность, что замедляет испарение
- на кончиках волосков образуются капельки росы таким образом, что фокусное расстояние никогда не придёт на ткань листа (суждение о том, что лист обжигается при поливе днём – миф)

Стадии развития трихом (рис. 9.1):

1. На листе выделяется клетка – инициаль волоска. В ней происходит эндоредупликация ДНК, клетка при этом увеличивается в объёме, но не делится.
2. Рост волоска наружу (в воздушную среду), ядро постепенно перемещается в верхнюю часть, следуя за растущим волоском.
3. Первое ветвление, появляются 2 веточки: проксимальная (направлена к основанию листа, к базальной части) и дистальная (направлена к кончику листа).
4. Второе ветвление: на дистальном конце появляется боковая веточка.

5. Рост веточек. Ядро при этом располагается в точке первого ветвления. Клетки у основания волоска образуют «подставку», приподнимают волосок.

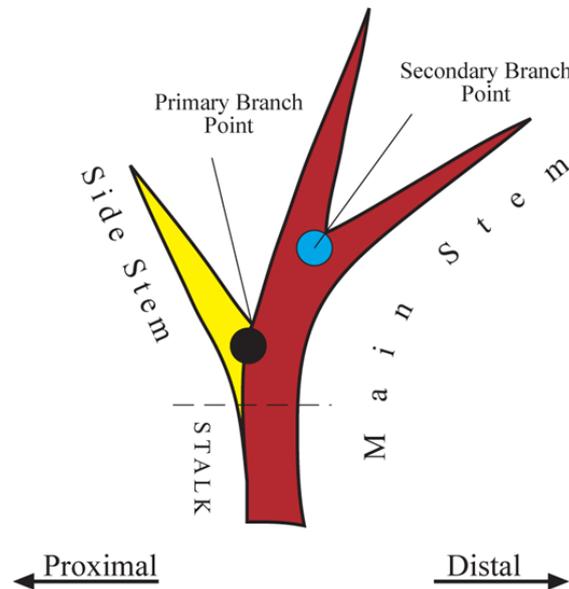


Рис. 9.1. Развитие трихом

Листья арабидопсиса опушены только сверху.

Первые "голые" мутанты (*glabra*)

Мутанты:

- *glabra1* – фактор транскрипции из MYB семейства с R2R3-повторами
- *transparent testa glabra1* – белок WD40, который участвует в сборке транскрипционных комплексов. Помимо отсутствия волосков на листьях, у мутантов также не синтезируются окисленные фенольные соединения коричневого цвета в семенной кожуре, поэтому она становится прозрачной.

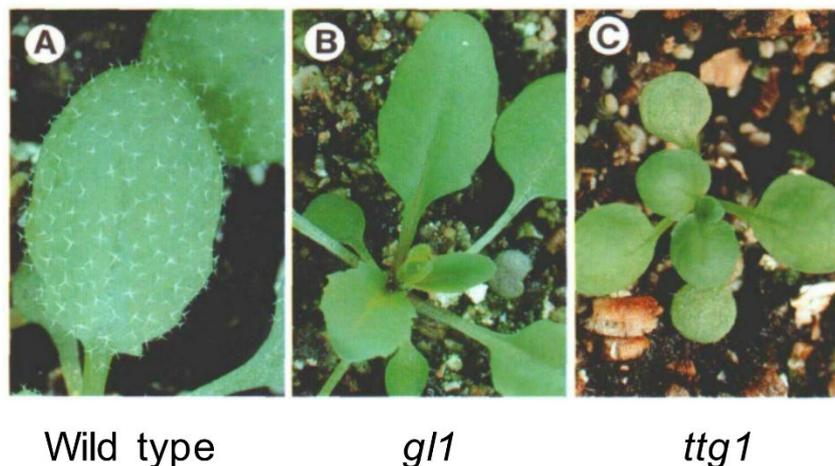


Рис. 9.2. «Голые» мутанты

На ранних этапах развития ген *GL1* экспрессируется во всём листе. На поздних этапах он локализован в прилистниках (у основания листа).

Волосок выделяет ингибиторы, которые блокируют образование новых инициалей в непосредственной близости к уже существующему волоску. При гиперэкспрессии число волосков не меняется.

Ген *TTG1* на начальных этапах локализован в ядрах всех клеток эпидермиса. Более крупные ядра – это инициали трихомов, будущие волоски. Далее экспрессия локализована в базальной части листа и растущих участках эпидермиса. На поздних этапах экспрессия *TTG1* локализована в ядрах трихомов.

- *glabra2* – фактор транскрипции из семейства HDZip Class IV, более мягкое выражение мутации: листовых волосков существенно меньше, чем в диком типе, но они всё-таки присутствуют (одиночные). При этом увеличено количество корневых волосков по сравнению с диким типом. У *GL2* более узкая локализация, он экспрессируется в трихобластах/трихомах.
- *glabra3* – фактор транскрипции из семейства bHLH. Мутант похож на *glabra2*. По сравнению с диким типом меньше ветвистость волосков, ниже степень полиплоидии, нарушен паттерн распределения волосков, ядро не поднимается в точку развилки. Как и *GL2*, локализуется в ядрах трихобластов/трихомов.
- *gl3 egl3* – двойной мутант, волоски полностью отсутствуют. *ENHANSER OF GLABRA 3* дублирует функцию *GLABRA 3*. При обработке дексаметазоном на молодых примордиях листьев появляются многочисленные волоски.

Кластеры волосков

Факторы транскрипции из MYB-семейства с R3-повтором *TRIPTYCHON (TRY)*, *TRICHOMELESS 1, 2 (TCL1, TCL2)*, *CAPRICE (CPC)*, *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1 (ETC1)*, *ETC2*, *ETC3 (CPC-LIKE3, CPL3)* играют роль подвижных ингибиторов морфогенеза трихомов. Они увеличивают количество волосков: рядом с центральным волоском вместо сопровождающих клеток возникают дополнительные волоски (более мелкие), формируется кластер. У двойных мутантов число кластеров увеличивается, у тройных – увеличивается ещё сильнее и т.д. Эти факторы движутся трансклеточно и зависят только от генотипа инициали. Факторы транскрипции из MYB-семейства, специфичные для волосков, достаточно консервативные в разных семействах.

Таким образом, функция ингибирования морфогенеза волосков задублирована множеством генов, так что повреждение одного из них не приводит к значительным результатам. При гиперэкспрессии этих ингибиторов ни одна клетка эпидермиса в волосок не превратится.

Здесь работает модель активатора/ингибитора (см. рис. 5.4). У растений в качестве активатора и ингибитора выступают факторы транскрипции *TTG* и *TRIPTYCHON* соответственно. *TTG* и *GLABRA1* взаимно усиливают друг друга. Клетка,

которая их экспрессировала, идёт по программе морфогенеза волоска. Далее *GLABRA1* активирует *TRYPTICHON*, который распространяется на окружающие клетки, ингибирует *GLABRA1* и подавляет дифференцировку волосков. Поэтому в диком типе волоски удалены друг от друга.

Инициация волоска

На рис. 9.3 регуляторы судьбы трихом окрашены в зелёный цвет, активаторы (*GL2/TTG2*) – в жёлтый, а ингибиторы (*CPC/ETC1*) – в оранжевый. Чёрные стрелки указывают на активацию транскрипции. В клетках трихом ингибиторы непосредственно активируются активирующим комплексом и перемещаются (пунктирные линии) в соседние клетки, где они и эндогенные ингибиторы блокируют активность активирующего комплекса, тем самым снижая экспрессию *GL2/TTG2* ниже требуемого порогового уровня инициирования (пунктирные стрелки). Таким образом, программа развития трихомы в соседних клетках не запускается.

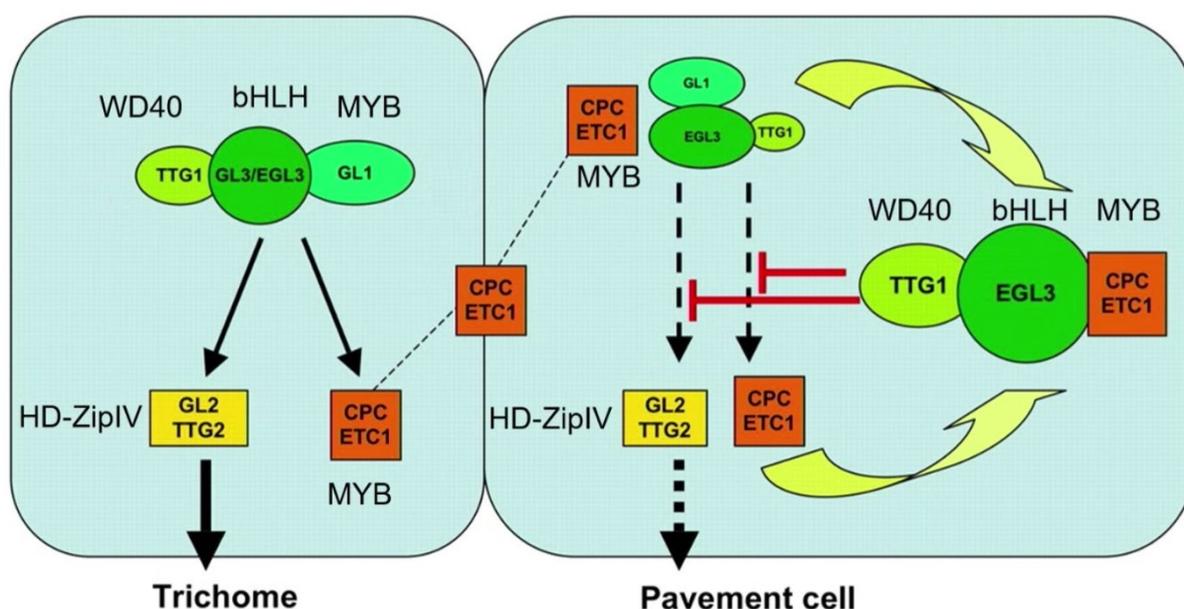


Рис. 9.3. Генетическая регуляция развития трихом

WD40 белки участвуют в транскрипционных комплексах, в убиквитинлигазных комплексах, в сигнальных комплексах с G-белками и т.д. Д

Метод FRET используется для изучения образования комплексов факторов транскрипции. Разные факторы транскрипции при этом помечаются с помощью разных флуоресцентных белков. В зависимости от расстояния, на котором они располагаются (рядом или далеко, то есть в комплексе или нет), будет происходить излучение в определённом диапазоне. С помощью данного метода было обнаружено, что *TTG* и *GLABRA1* конкурируют за связывание с *GLABRA3*. Два альтернативных комплекса с участием *GLABRA3* и *TRY/CPC* также конкурируют (рис. 9.4).

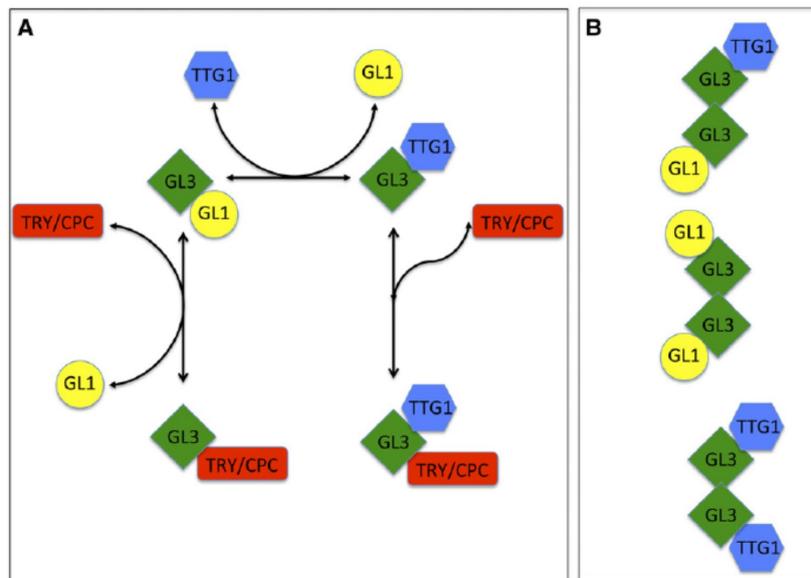


Рис. 9.4. Модель конкурентного взаимодействия транскрипционных факторов

При обработке мутантов ТТG гормонами (жасмонаты, цитокинины, гибберелины) по краю листа формируются трихомы. Это связано с тем, что в развитии краевых волосков участвует другой транскрипционный комплекс:

- ТТG1 (WD40) + ТТ8 (bHLH) + GL1 (MYB) – краевые волоски
- ТТG1 (WD40) + GL3 (bHLH) + GL1 (MYB) – центральные волоски
- ТТG1 (WD40) + ТТ8 (bHLH) + PAP (MYB) – семенная кожура

Таким образом, ТТ8 служит дублёром GL3 в процессе образования трихомов по краю листа. Край – самая уязвимая часть листа, которая в первую очередь повреждается насекомыми. Поэтому у некоторых растений центральная часть листа опушена слабо или вовсе не опушена, а опушение по краю усилено. Кроме того, при повреждении листа новые листья образуются с гораздо более густым опушением. А жасмонаты как раз являются свидетельством поранения, поэтому приводят к аналогичным последствиям.

В развитии листьев есть определённое временное окно, когда могут сформироваться трихомы. У мутантов по гену *REDUCED TRICHOME NUMBER (RTN)* это окно сокращено, в результате чего трихомы образуются в уменьшенном количестве. Это фактор транскрипции из MYB-семейства, который также называется *enhancer of try and caprice 2 (ETC2)*.

Автополиплоидизация

К моменту подъёма ядра за счёт полиплоидизации достигается уровень 16C, далее ещё раз происходит эндоредупликация, формируется стандартный трихом с набором 32C. Это характерно для диплоидного растения. У тетраплоидного арабидопсиса волоски получаются крупнее и с большим числом веточек (64C). Это

говорит о том, что растение считает акты эндоредупликации, вне зависимости от изначального уровня ДНК. Аналогичного эффекта можно добиться, обрабатывая растение гиббереллином – он способствует автополиплоидизации и увеличивает количество тетраплоидных и октоплоидных клеток. Существуют мутанты, например, *kaktus (kak)*, у которых нарушен данный процесс, и из диплоидного уровня растение создаёт ядра с большей ploидностью и более ветвистые, крупные трихомы. У мутантов *spindly-5* (система контроля действия гиббереллина) наблюдаются сильно разветвлённые волоски даже в отсутствие гиббереллина.

На уровень ploидности трихомов влияет множество генов. Чем выше достигнутый уровень ploидности, тем более разветвлён трихом.

Обычно после репликации ДНК клетка делится. Но в трихоме этого произойти не должно, что осуществляется за счёт генетического контроля. Регулятор *SIAMESE (SIM)* – ингибитор CDK, не даёт клеткам перейти в фазу митоза. Экспрессия гена *SIM* сосредоточена в прокамбиальных клетках, а также в молодых развивающихся листьях. Гиперэкспрессия приводит к уменьшенному количеству клеток и появлению крупных высокополиплоидных клеток, при этом процесс в основном захватывает эпидермальные клетки, из-за чего меняется форма листа.

Мутанты ветвления

- *stishel* (резец, колючка) – простые волоски без ветвления, ядро поднимается
- *stachel* (шпиль, жало) – пропущено первое ветвление; есть две веточки, ядро поднимается, но не достигает развилки
- *zwichel (zwi)* – ядро поднимается до места развилки, есть первое деление на проксимальную и дистальную веточки, второе деление не происходит
- *furca (frc)* – группа мутантов с отсутствием второго ветвления дистальной ветви

Инициация ветвления трихом – сложный процесс, на который влияют разные гены (рис. 9.5).

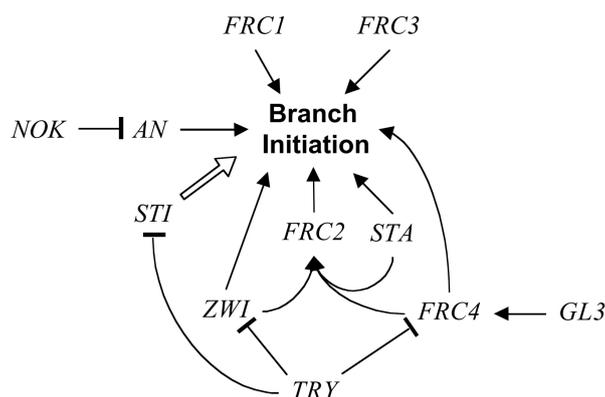


Рис. 9.5. Генетический контроль ветвления трихом у арабидопсиса

Для ветвления необходима стабилизация цитоскелета, формирование «точек опоры». В широком смысле ветвление – это направленный рост, который был

переориентирован по отношению к исходной оси растущей клетки. Изменению направления роста способствует переориентация микротрубочек. Появление даже едва заметных выпуклостей на поверхности клетки трихомы является видимым проявлением инициации точек ветвления.

Паклитаксел – химический агент, который не даёт деполимеризоваться тубулину и стабилизирует цитоскелет. На его фоне даже у мутантов с отсутствием ветвления наблюдается появление всех трёх веточек. Оризалин – мешает сборке микротрубочек. На его фоне формируются шаровидно-раздутые волоски с неравномерно отложенным клеточным материалом.

Помимо ветвления может быть нарушено направление роста – зависит от микрофиламентов (у мутантов *crooked*), равномерность укладки клеточного материала – зависит от микротрубочек (у мутантов *gnarled*). Последний этап формирования волосков – инкрустация (затвердевание за счёт отложений целлюлозы). У мутантов *glh* (**GLASSY HAIR** – факторы транскрипции из семейства HD-ZIP IV) этот процесс нарушен, наблюдаются ломкие «стекловидные» волоски с тонкой клеточной стенкой.

В норме у арабидопсиса семядольные листья и плодолистики совершенно лишены волосков. Простые волоски встречаются на «нижней» стороне чашелистиков. Тройчатые волоски в норме присутствуют на верхней поверхности листа, а вильчатые волоски встречаются как аномалии программы развития.

Развитие трихомов – сложный морфогенетический процесс, который на каждом из этапов контролируется множеством генов (рис. 9.6).

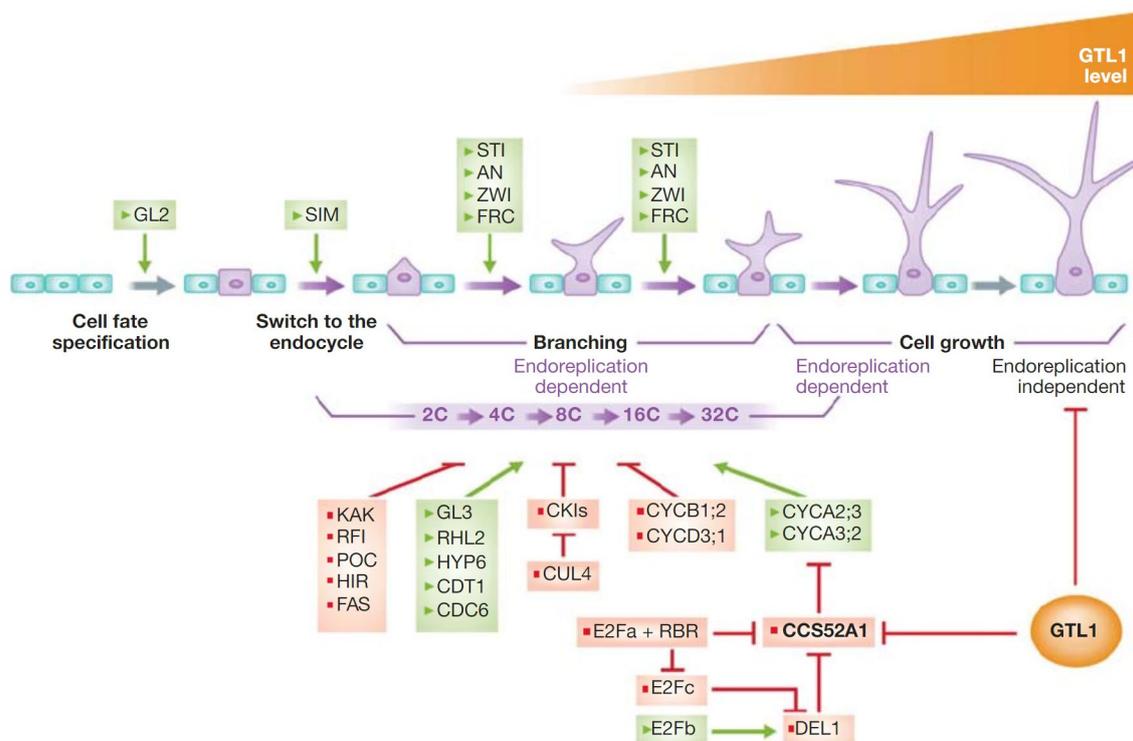


Рис. 9.6. Генетическая регуляция процесса развития трихом

Корневые волоски

Корневые волоски не обязательны для поглощения элементов минерального питания. Корень может вовсе не иметь коневых волосков (например, лук). У некоторых растений все клетки эпидермиса корня превращаются в корневые волоски (например, фасоль). У арабидопсиса часть клеток не формируют корневые волоски – **атрихобласты**, а из оставшихся формируются корневые волоски (**трихобласты**). Как и у листьев однодольных, клетки в корне лежат клеточными файлами. у арабидопсиса примерно 19-20 файлов участвует в построении эпидермы корня. То есть волоски либо есть во всём файле, либо нет.

Мутации генов *TTG*, *GL*, *EGL*, *CPC* и др. также отражаются на развитии корневых волосков. Функции этих генов на листьях и в корне зеркальны. Если в листьях *TTG*, *GL*, *EGL* являются положительными регуляторами и запускают развитие волосков, то в корнях, наоборот, тормозят развитие корневых волосков. Таким образом, у мутантов *ttg* и *gl* листья «голые», а в подземной части все клетки превращены в трихобласты. *CPC* действует ровно наоборот, мутанты зеркально противоположны.

Важную роль играет позиционный контроль. Трихобласты (H-cell) находятся в местах контакта двух клеток кортекса. Клетка, лежащая над одной клеткой кортекса (N-cell), не даёт корневых волосков. В апопласте по клеточным стенкам происходит диффузия короткого пептида, который связывается с рецептором SCM в ближайшей клетке эпидермы корня, в результате чего ингибируется WER и клетка развивается в корневой волосок (рис. 9.10).

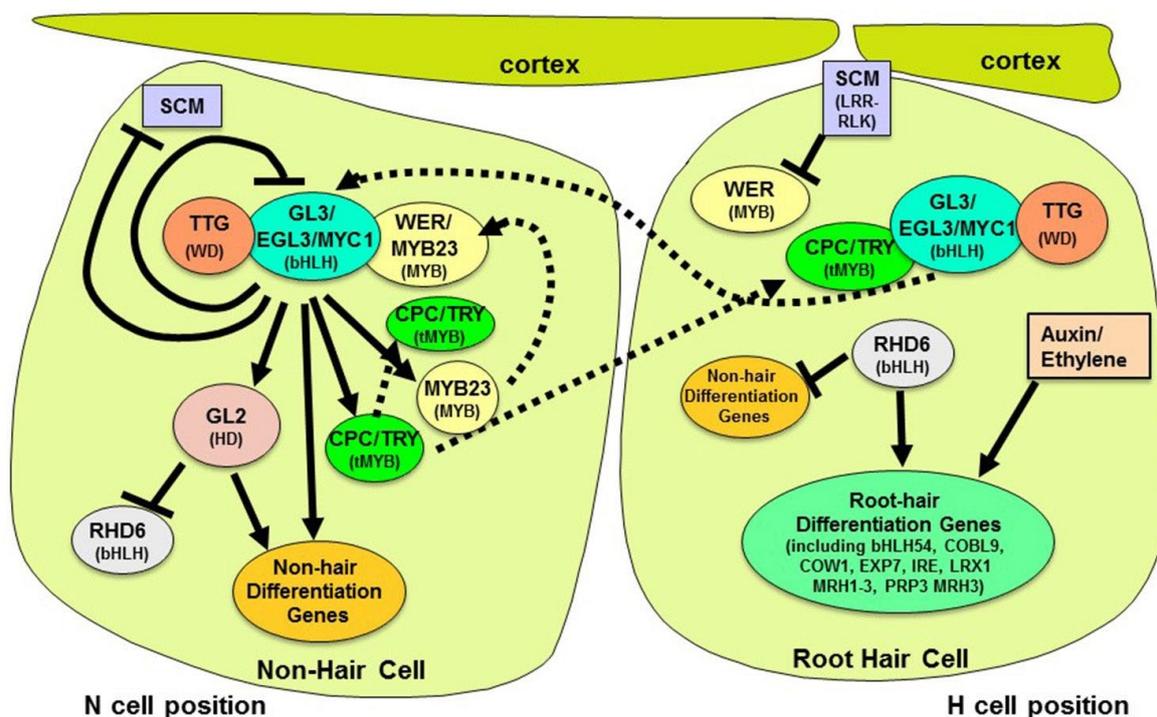


Рис. 9.10. Контроль судьбы клеток в эпидермисе корня арабидопсиса

WEREWOLF (WER) – специфический фактор транскрипции из MYB-семейства, который характерен только для корневых волосков. У мутантов *wer* развивается много трихобластов. Гиперэкспрессия приводит уменьшению числа корневых волосков. Это означает, что **WER** является супрессором волосков.

WER экспрессируется в клетках эпидермального слоя, начиная с инициалей эпидермы. **TTG** экспрессируется равномерно по всем клеткам эпидермиса. **GL2** экспрессируется в отдельных клетках кортекса коры.

Для формирования корневого волоска нужно собрать примерно такой же транскрипционный комплекс, как и для волоска на листе (рис. 9.10): **TTG1 (WD40) + GL3 (bHLH) + WER** или **CPC (MYB)**. Между **WER** и **CPC** идёт конкуренция за связывание в комплексе, т.к. один является ингибитором, а другой активатором программы развития корневых волосков.

ROOT HAIR DEVELOPMENT (RHD 1, 2, 3, 4) – гены, влияющие на развитие корневых волосков уже после инициации:

- *rhd1* – при инициации нет ограничения материала клеточной стенки, в результате чего у основания волоска лежит на «подушке»
- *rhd2* – корневой волосок иницируется, появляется маленький бугорок, но в дальнейшем мембрана клеточной стенки лопается, развитие трихобласта останавливается
- *rhd3* – нарушено направление роста (актиновый цитоскелет)
- *rhd4* – нарушена равномерность укладки клеточного материала (микротрубочки)

Двойные мутанты обладают аддитивным фенотипом. *rhd2* доминирует над остальными мутациями, развитие трихобласта останавливается. **RHD2** – **NADPH** оксидаза, генерирует активные формы кислорода (АФК), что важно для фиксации (жесткости) клеточной стенки на кончике волоска.

Огромное влияние на корневые волоски оказывают элементы минерального питания, дефицит любого из них вызывает обильное развитие длинных корневых волосков. Даже у мутантов (*cpc*, *wer*) дефицит железа и фосфора приводит к отращиванию дополнительных трихобластов.

Таким образом, программа развития волоска может включаться не только за счёт внутренних сигналов, но и под воздействием гормональных и механических факторов (рис. 9.11). Этилен выделяется при механическом стрессе. Когда корень преодолевает почву, этилен выделяется пропорционально её сопротивлению. При повышенном сопротивлении одна из задач корня – закрепиться в грунте, для чего под действием этилена вырастают длинные густые корневые волоски. Ауксин вызывает ризогенез, его воздействие часто сопряжено с синтезом дополнительных порций этилена. Стриголактоны возникают в корнях в ответ на дефицит элементов минерального питания, прежде всего фосфора. Жасмонаты выделяются при механическом повреждении (например, травоядными). В регуляции участвуют и другие гормоны.

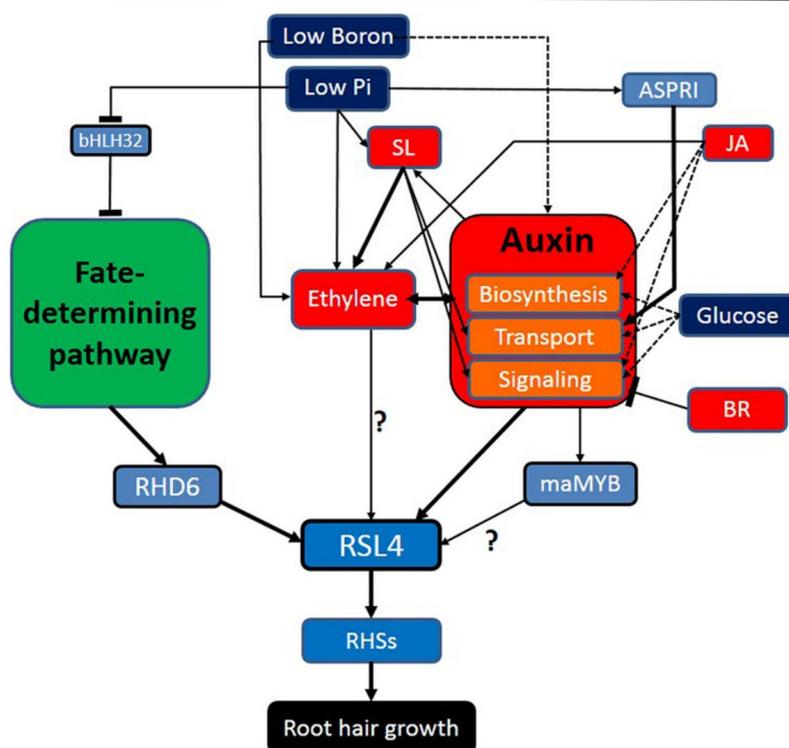


Рис. 9.11. Пути регуляции роста корневых волосков

Устьичный аппарат

Устьица нужны для регуляции испарения и газоснабжения. Устьичный аппарат состоит из двух типов клеток: замыкающие (guardian) клетки устьиц (QC) и сопровождающие (побочные) клетки (EC). Устьица могут располагаться среди обычных клеток эпидермы листа, клеточными файлами (у однодольных, злаков), а у арабидопсиса и ряда других растений возникает анизоцитный устьичный аппарат: две замыкающие клетки, между ними устьичная щель, а вокруг по спирали лежат три сопровождающие клетки разного размера.

Развитие устьичного аппарата из протодермы представлено на рис. 9.12. Инициаль меристемоида отличается от протодермальной клетки – цитоскелет и ядро смещаются к одному концу, в результате чего произойдет неравное деление клетки.

Переключение типа клетки контролируется факторами транскрипции bHLH (рис. 9.12):

- **SPEECHLESS (SPCH)** – ассиметричное деление (при мутации все клетки становятся клетками основной эпидермы, без устьиц)
- **MUTE** – переход к инициали замыкающих клеток (при мутации клетки делятся в режиме меристемоида)
- **FAMA** – симметричное деление, формирование замыкающих клеток (при мутации они не формируются)

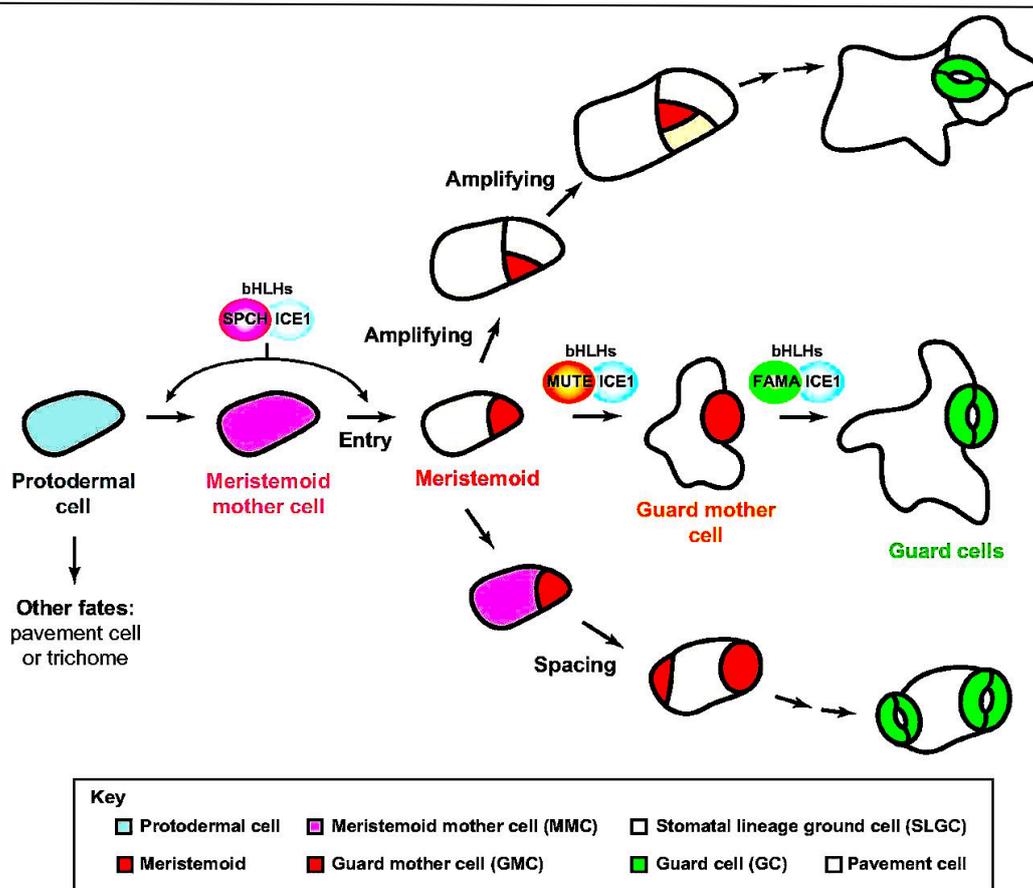


Рис. 9.12. Развитие устьичного аппарата у арабидопсиса.

Партнёры, взаимодействующие со SPCH, MUTE и FAMA – INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1) = SCREAM (SCRM1 и SCRM2). Это факторы транскрипции bHLH-LZ, при мутации практически все кс изменённой функции клетки эпидермы превращаются в замыкающие клетки устьиц. Потеря функции приводит к равномерному паркету без устьиц.

Меристемоид выделяет цистеинобогатённые короткие пептиды (около 50 аминокислот) EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE (EPFL) family. Короткие пептиды EPFL взаимодействуют с рецепторными киназами LRR-RK типа: ERECTA (ER), ERECTA-LIKE 1 (ERL1), ERECTA-LIKE 2 (ERL2), что изображено на рис. 9.13. Это приводит к ограничению асимметричных делений, что не даёт соседним клеткам превращаться в меристемоиды и образовывать новые устьица. Таким образом, вокруг меристемоида возникает зона ингибирования.

У мутантов по рецептор-подобному белку TOO MANY MOUTH (TMM) формируются кластеры из полноценных устьиц с двумя замыкающими клетками.

EPFL9 (STOMAGEN) выделяется клетками мезофилла (если они «задыхаются»), движется к эпидерме и способствует дифференцировке клеток в устьица. STOMAGEN на уровне рецепторов конкурирует с EPF1/2.

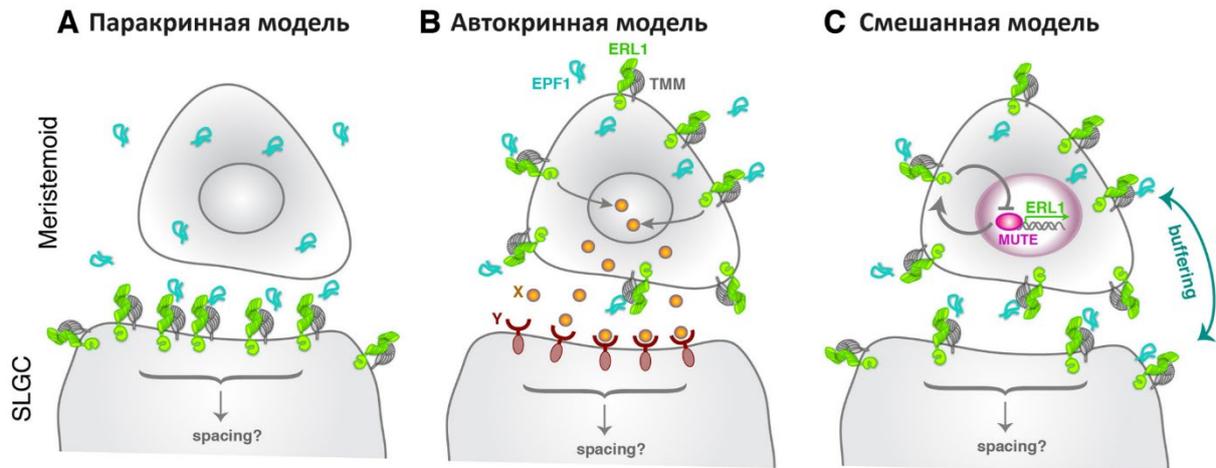


Рис. 9.13. Взаимодействие цистеинобогатых пептидов с окружающими клетками

Факторы транскрипции R2R3 MYB family **FOUR LIPS (FLP)** и **MYB88** приводят к нарушению процесса деления инициали замыкающих клеток. Клетки пытаются сформировать устьичную щель по обе стороны контакта, в результате чего формируются не функциональные устьица, которые не могут закрыться и сильно испаряют воду.

У мутантов **MUSTACHES** нарушено деление инициали замыкающих клеток, в результате чего замыкающие клетки лежат не симметрично, а со смещением, по спирали. Нарушения в АБК-сигналинге также приводят к нефункциональным устьицам с очень крупной щелью, что не позволяет устьицам замыкаться.

Лекция 10. Морфогенез цветка

Иерархия программ развития

На индукцию цветения могут воздействовать разнообразные факторы:

- фотопериод
- температура
- питание (C/N)
- внутренние стимулы (*FT* – флориген, *CO* – ключевой ген индукции флоригена, *SOC2* и *LFY* – интеграторы флорального развития)

При индукции цветения включаются гены идентичности флоральных органов (ABCDE-система). Не менее важен контроль структуры меристемы. Два эти процесса связывают кадастральные гены, которые под определённые группы идентичности отводят определённые части меристемы. Далее происходит разметка цветка и развитие его органов.

Фотопериодизм

Первооткрыватели фотопериодизма – Гарри Ардель Аллард и Уайтем Уэллс Гарнер. Был получен мутант *Nicotiana tabacum* под названием Мэрилендский Мамонт (Maryland Mammoth), которые не зацветал и достиг огромных размеров. На удивление, он зацвёл в зимние месяцы в теплице.

Чувствительность к длине дня характерна для многих растений умеренных широт. По реакции на длину дня растения классифицируют на длиннодневные (цветут, когда день превысил критическую длину), короткодневные (день стал меньше критической длины) и нейтральные.

В тридцатые годы XX века Михаил Христофорович Чайлахян предположил, что под воздействием определенной длины дня в растениях синтезируются вещества гормональной природы, сочетание которых и индуцирует цветение. Причём синтезируются эти вещества во вполне определенных «компетентных органах» – в зрелых, сформировавшихся листьях и оттуда поступают в верхушечную меристему (формирующуюся почку), определяя её дальнейшую судьбу (чем стать: листовым побегом или цветком). Молодой, только что раскрывшийся лист не способен синтезировать эти вещества. Не могут их синтезировать и молодые растения, не набравшие нужной критической биомассы. Например, в первый год после посева семян, длиннодневные растения, такие как колокольчик и наперстянка, не цветут, все их усилия направлены на «наращивание» биомассы и приобретение «компетентности» к последующему цветению.

Михаил Христофорович Чайлахян проводил опыты с хризантемой и периллой (короткодневные растения), рудбекией (длиннодневное растение), подсолнечником (нейтральное растение), табаком (сорта с разной чувствительностью к длине дня) и многими другими растениями, чтобы выяснить, какой орган растения воспринимает

длину дня. Поскольку на свету всё время находятся листья, стебли и меристемы побегов, значит, длину дня должен «регистрировать» один из этих органов. Логика эксперимента была проста: срежем с верхушки все молодые листья, чтобы они не могли посылать сигналы меристеме, а старые листья оставим. Возьмём светонепроницаемую ткань. У одного растения старые нижние листья будем закрывать этой тканью пораньше вечером, а верхушку оставим на свету. Листья окажутся на коротком дне, а меристема – на длинном. У другого растения будем вечером накрывать верхушку, а листья оставим на длинном дне.

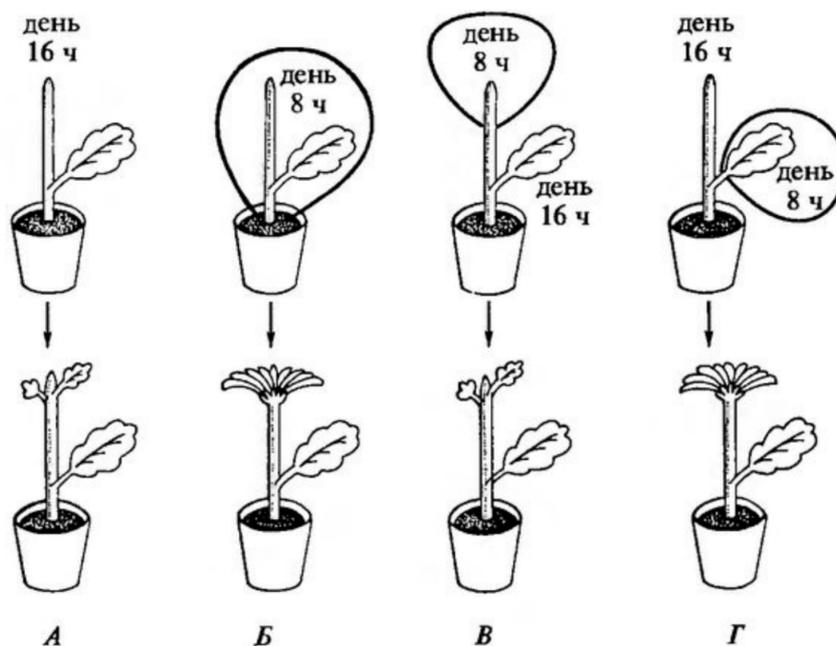


Рис. 10.1. Опыт Чайляна, показывающий роль листьев в восприятии длины дня

Оказалось, что если листья хризантемы мало «бодрствуют» и долго «спят», то растение зацветает (рис. 10.1 Б и Г). Если у листьев будет «длинный день» и «короткая ночь», то цветения не происходит (рис. 10.1 А), даже если притенять тканью меристему, создавая ей условия короткого дня (рис. 10.1 В). Именно тогда Чайляхян предположил, что в листьях при коротком дне образуются некие вещества, которые транспортируются в меристему, в результате чего она образует цветки.

Таким образом, Чайляхян поставил серию экспериментов и показал, что в растениях синтезируется подвижный фактор цветения **флориген** (от лат. «*флорео*» – цвести и «*ген*» – порождающий), а сигналом к его образованию служит длина дня.

Свойства флоригена:

1. Синтезируется в листьях
2. Действует на апикальные меристемы побега
3. Транспортируется неполярно по всему растению
4. Транспортируется по флоэме
5. Необходимы работающие плазмодесмы

Параллельно с Чайлахяном в Голландии работал **Ян Зееваарт**. Он тоже изучал подвижные факторы цветения (хоть и не называл их флоригенами) и открыл дополнительные свойства этой молекулы:

6. Передаётся через прививку
7. Универсален у разных видов
8. Родственный факторам клубнеобразования (туберигену)

В 50-е годы прошлого века ученые смогли выделить биохимическими методами один из гормонов – гиббереллин. Гиббереллины – это целый класс веществ, насчитывающий более 150 различных веществ. Чем длиннее день, тем больше гиббереллинов синтезируется в листьях. Затем они транспортируются вместе с сахарами по всему растению. Так листья «информируют» все ткани растения о том, что продолжительность дня увеличилась. Если опрыснуть раствором гиббереллина длиннодневные растения, им «покажется», что день длинный (даже если на самом деле это не так). И растения зацветут. К сожалению, до сих пор не удавалось «обмануть» короткодневные растения. Растворы гиббереллина на них не действуют.

Чайлахян предположил, что флориген – это гормональный комплекс, состоящий из двух компонентов: гиббереллин + антезин.

Флориген. Мутанты по регуляции цветения

Оказалось, что из листьев в меристему побега перемещается белок – продукт гена *FLOWERING LOCUS T (FT)*. Это гомолог белков, связывающих фосфатидилэтаноламин у животных, предположительно ко-активатор.

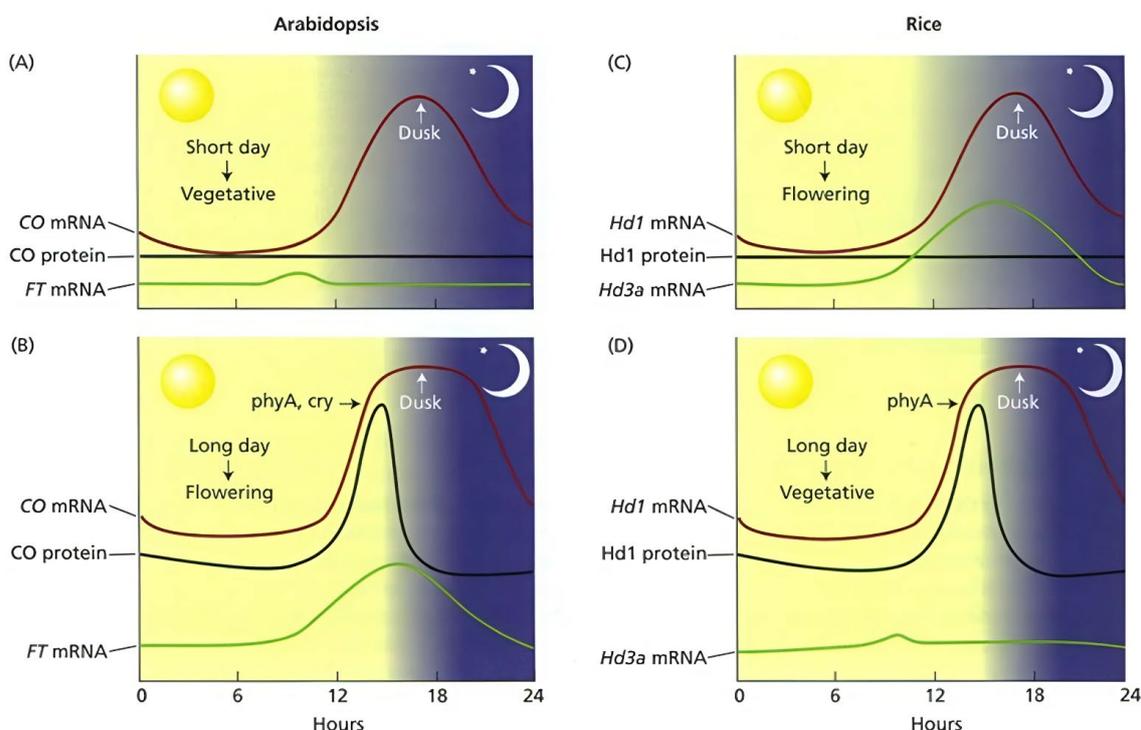


Рис. 10.2. Упрощённая модель взаимодействия генов *CO* и *FT*

Ген *FT* регулируется геном *CONSTANS* (*CO*). Это фактор транскрипции с «цинковыми пальцами» (B-V0x Zn-Finger family - BBX), который является индуктором цветения, экспрессируется в жилках листа и наиболее активен в клетках-спутницах флоэмы. При мутации *co* наблюдается постоянная вегетация, а при гиперэкспрессии цветение происходит гораздо раньше, чем в диком типе.

Белок *CO* стабилизируется на свету (рис. 10.2). Для длиннодневных растений (арабидопсис) белок *CO* – индуктор *FT*, для короткодневных (рис) – репрессор. У риса гены имеют другие названия: *Heading date* (*Hd*) (дата колошения) *Hd1* = *CO*, *Hd3a* = *FT* (флориген).

GIGANTEA (*GI*) – ген с регуляцией циркадным ритмом («часами»). Ядерный белок. Биохимическая роль не ясна, но участвует в регуляции многих процессов (цветение, накопление крахмала, хлорофилла, устойчивость к засухе, к холоду, к засолению и т.д.). *GI* экспрессируется во многих частях растения на различных этапах развития. При мутации по этому гену в условиях длинного дня арабидопсис вырастает огромных размеров по сравнению с диким типом.

Сеть контроля флоригена

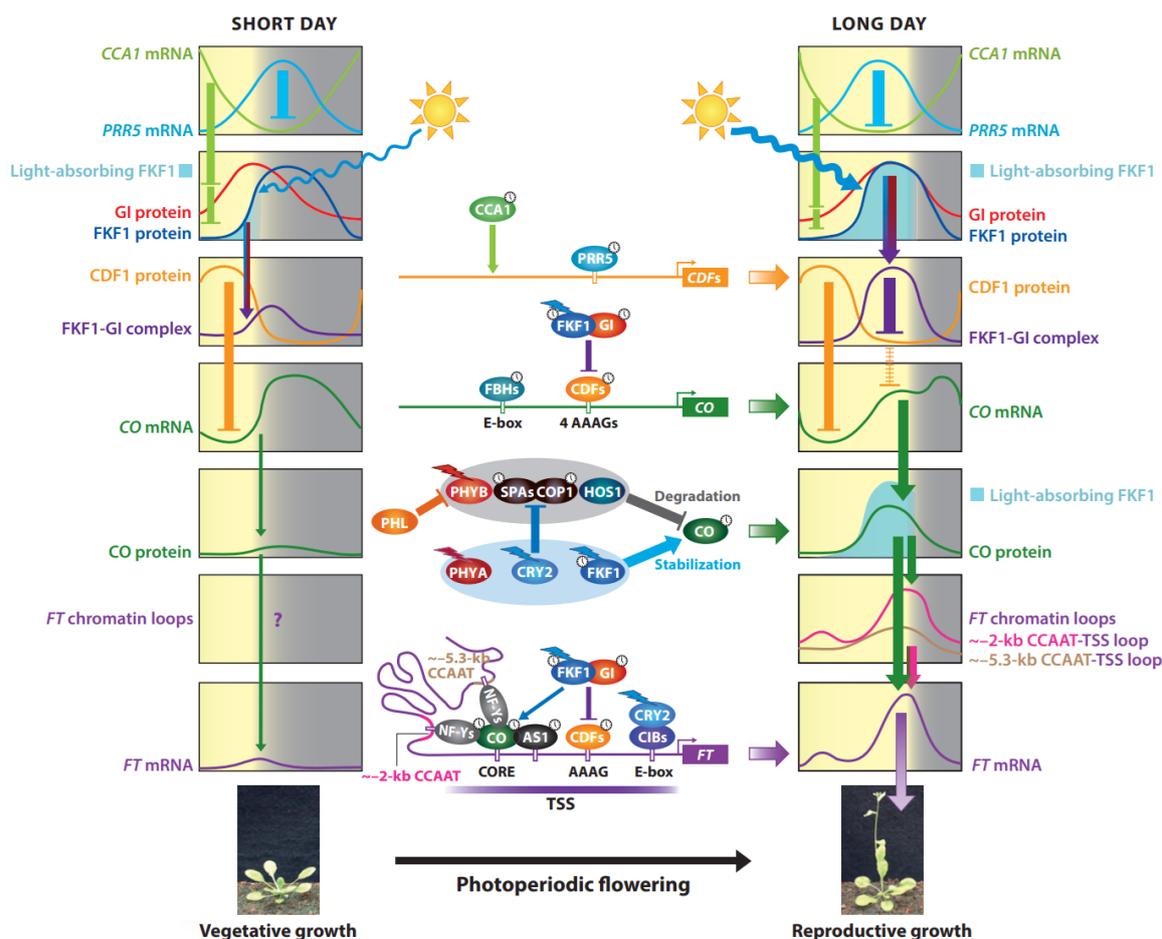


Рис. 10.3. Фотопериодическая регуляция *FT* у арабидопсиса

ZEITLUPE (ZTL), *LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2)*, *FKF1 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1)* – регуляторы цветения с ядерной локализацией, содержащие флавин-содержащие регуляторные белки (LOV-домен), F-box – убиквитинлигазные комплексы, а также кофакторы транскрипции. Они не связываются непосредственно с ДНК, но участвуют в транскрипционных комплексах как кофакторы транскрипции. F-box позволяет им связываться с убиквитинлигазами и регулирует устойчивость этих белков к протеолизу.

При освещении синим светом эти белки образуют комплекс с белком GI. FKF белки работают по часам, в то время как работа GI зависит от освещения. На коротком дне пики экспрессии этих белков не совпадают, комплекс образуется плохо, синего света в темноте нет, так что он не активен. В условиях длинного дня GI смещает пик своей активности, который теперь совпадает с FKF, образуется транскрипционный комплекс FKF+GI и активируется синим светом. Это запускает ген CO и включает FT.

Таким образом, индукция цветения – сложный процесс, который регулируется множеством факторов (рис. 10.3). Более того, флориген получает сигналы не только от фотопериода. Его также можно включить гиббереллином, он зависит от возраста (внутренний фактор, важную роль играют микроРНК) и температуры (высокая температура ускоряет развитие, низкая – замедляет).

Комплекс активации цветения (FAC)

FLOWERING LOCUS D (FD) – фактор транскрипции bZIP-family, который образует комплекс с флоригеном (FT), что способствует включению генов флорального развития (*SOC1* – интегратор флорального развития) – рис. 10.4.

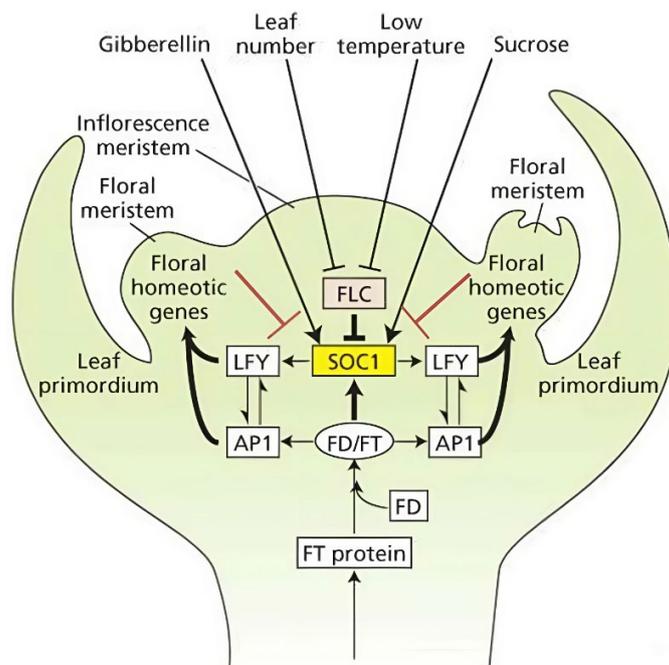


Рис. 10.4. Регуляция цветения с участием транскрипционного фактора *SOC1*

Арабидопсис – количественное длиннодневное растение. В разных обстоятельствах он даёт сигнал либо об отсрочке, либо об ускорении цветения.

Комплекс активации цветения нуждается во флоригене, который взаимодействует с другими факторами транскрипции (рис. 10.5). Эта система стабилизируется за счёт 14-3-3 белков. После сборки FАC садится на промотор SOC, в результате чего происходит индукция цветения.

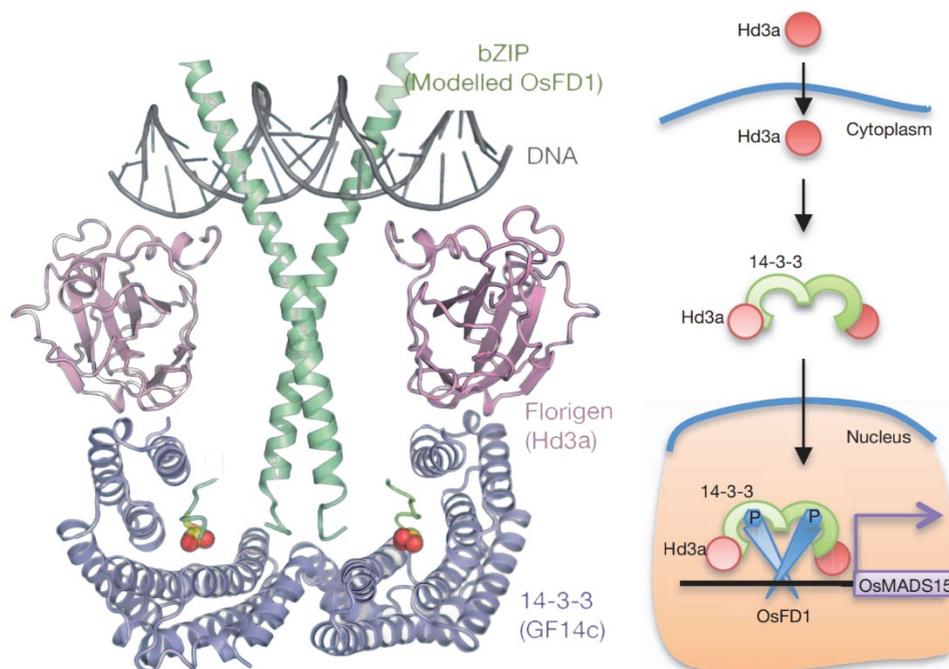


Рис. 10.5. Комплекс активации цветения FАC

Семейство генов FT-TFL

TERMINAL FLOWER 1 (TF1) – гомолог флоригена. У мутантов часто наблюдается ускоренное цветение. Это означает, что в норме TF1 является ингибитором цветения. Это позволяет сделать непрерывно растущую меристему соцветия, на которой будет множество флоральных примордиев (и в дальнейшем цветов).

TF активен в апикальной меристеме, здесь он конкурирует с флоригеном, поскольку является его гомологом. У арабидопсиса программа цветения не включается, меристема работает на то, чтобы продолжать рост вверх, терминальный цветок так и не образуется. В боковых (флоральных) примордиях доминирует флориген, формируется флоральная меристема. Гиперэкспрессия TFL1 подавляет развитие боковых цветков.

Семейство генов FT-TFL достаточно большое. Структура генов позволяет белку собраться примерно в одну и ту же конформацию, однако заряженные аминокислоты по-разному распределяются в разных белках, за счёт чего они проявляют разные свойства.

Функции:

1. Индуктор цветения (флориген)
2. Репрессор цветения (TF)
3. Тубериген (клубнеобразование)
5. Яровизация (переход к цветению после сезона низких температур)
6. Формирование луковиц
7. Поддержание непрерывного роста меристем соцветий
8. Развитие шишек и хвои
9. Закладка почек у деревьев
10. Регуляция второй волны роста
11. Непрерывное цветение (ремонтантные розы, земляника)
12. Задержка прорастания семян

У львиного зева функцию гена TFL выполняет *CENTRORADIALIS (CEN)*, у томата – *SELF-PRUNING1 (SP1)*.

Если часть листа получает хорошую длину дня, пригодную для цветения, то вторая часть, которая получает недостаточную освещённость, вырабатывает фактор, замедляющий цветение – **антифлориген**. Он занимает своё место в комплексе активации цветения, заменяя флориген. В таком случае либо продолжается вегетативный рост, либо сильно замедляется цветение.

Тубериген

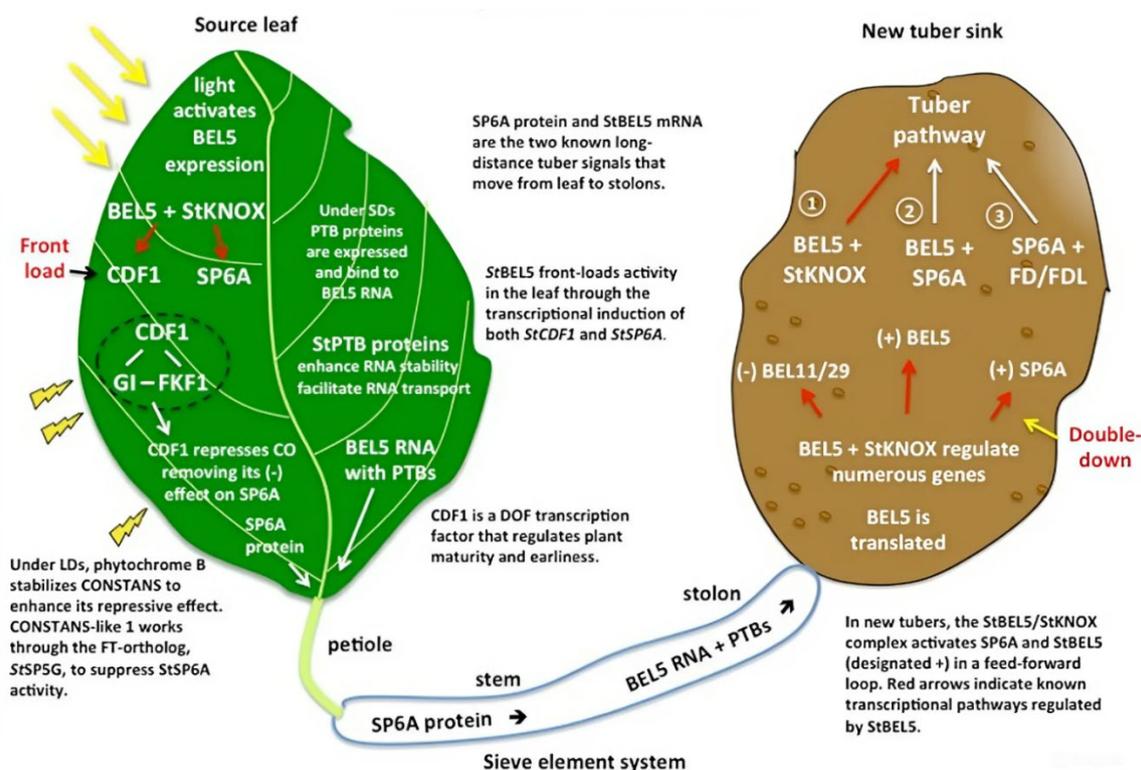


Рис. 10.6. Развитие клубней у картофеля

У картофеля есть гомологи *GI* и *FKF1*. При поддержке этих генов *CO* вызывает синтез туберигена – *SP6A* белок. По флоэме он доставляется в подземную часть, где начинается образование столонов и клубней. Помимо *SP6A* вниз также движется *BEL5* RNA. Таким образом, система устроена похожим образом, состоит из похожих элементов, но всё же имеет отличия (рис. 10.6).

Гиббереллины

Гиббереллины также находятся под контролем длинного дня. Длинный день через сложную систему молекулярных взаимодействий включает ключевой ген биосинтеза гиббереллинов – *GA 20-оксидазу*. *GA 3β-гидроксилаза* превращает *GA₂₀* в активный *GA₁*, что приводит к накоплению высокого уровня гиббереллинов. С другой стороны, длинный день выключает *GA 2β-гидроксилазу*. Этот фермент переводит *GA₁* в неактивное состояние. Это накладывается на собственную регуляцию гиббереллина по типу отрицательной обратной связи.

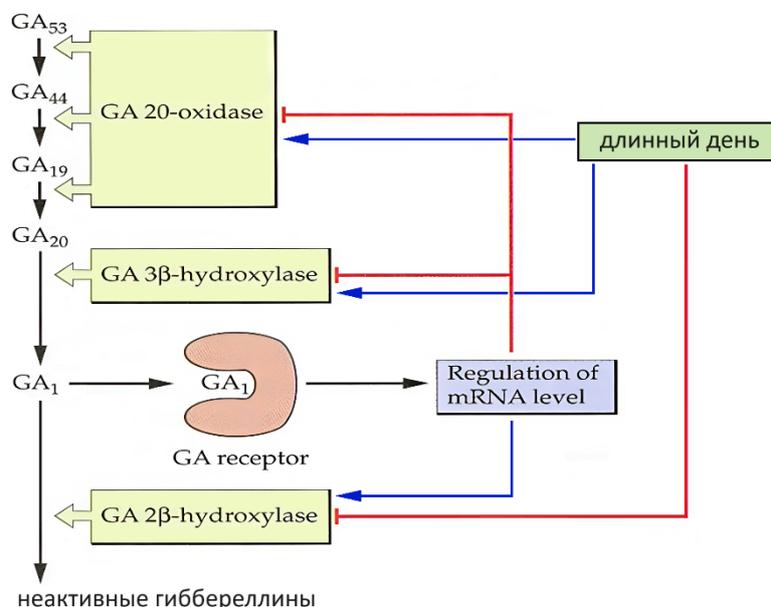


Рис. 10.7. Регуляция гиббереллинов

Таким образом, существуют флориген-зависимый и гиббереллин-зависимый путь регуляции развития цветка.

Интеграторы цветения. MADS-белки

LEAFY (LFY) – фактор транскрипции, родственник HLH, работает во флоральной меристеме. При мутации у арабидопсиса получается очень зелёный цветок. При гиперэкспрессии наблюдается скоростное зацветание, быстрое образование цветков и превращение терминальной меристемы в цветки.

У львиного зева есть похожий ген *FLORICAULA (FLO)*. Отличие состоит в том, что у арабидопсиса есть программа запасного развития цветка, а у львиного зева нет. У

мутантов *flo* наблюдаются сплошные боковые веточки без цветков. В некоторых случаях мутант выглядит совсем экзотично – вдоль оси соцветия возникает один лист со спирально намотанной листовой пластинкой, который продолжает расти вместе с меристемой.

Многие гены флорального развития являются факторами транскрипции из семейства **MADS**:

- **Minichromosome Maintenance Factor** (дрожжи)
- **Agamous** (арабидопсис)
- **Deficiens** (львиный зев)
- **Serum Response Factor** (человек)

В составе всех MADS-белков имеется специфический, состоящий из 56 аминокислот, ДНК-связывающий MADS-домен. Мишенями MADS-белков являются гены, в промоторной области которых имеется специфическая 10-нуклеотидная последовательность - CC(AT)₆GG, называемая **CArG-боксом**.

Более чем у половины MADS-белков имеется **K-домен** (от Keratin-like), который обеспечивает белок-белковые взаимодействия и возможность для димеризации. I- и C-домены также участвуют в белок-белковых взаимодействиях.

Это суперсемейство транскрипционных факторов включает более 100 белков. Они работают в «квартете» (гетерологичные), а также могут «рекрутировать» факторы транскрипции из других семейств и факторы ремоделинга хроматина (рис. 10.8).

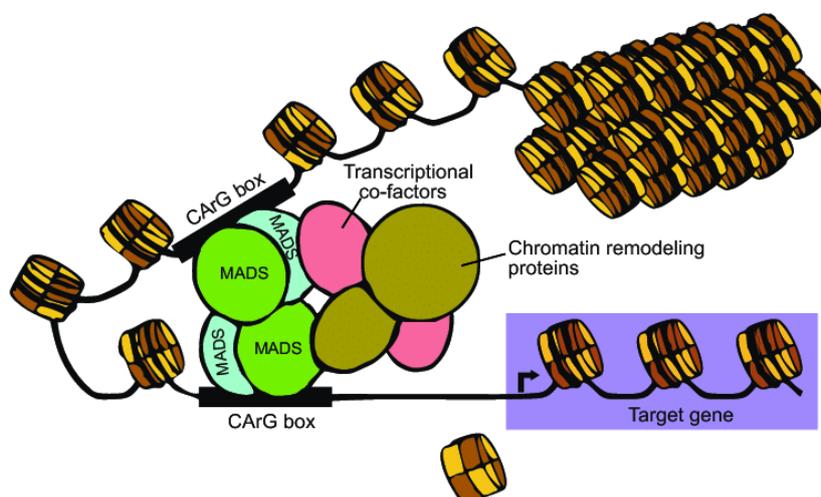


Рис. 10.8. Модель образования белкового комплекса с MADS-доменом

MADS-белки регулируют формирования цветков и плодов, принимают участие в регуляции развития корня и семян, ряд из них способны контролировать гомеозисные процессы.

Переключение развития апикальной меристемы побега на меристему соцветия, а в дальнейшем на флоральную меристему представлено на рис. 10.9. Контроль пролиферации и идентичности происходит одновременно.

Лекция 11. Морфогенез цветка (часть 2)

Представления о структуре и происхождении цветка

Иоган Вольфганг фон Гёте – родоначальник сравнительной морфологии. В труде «Метаморфоз растений» описывает идеальное растение, внутри которого происходит постепенный метаморфоз одного и того же органа (листа), который может принимать форму семядолей, зелёных листьев, чашелистиков, лепестков, тычинок, плодолистиков (рис. 11.1). Сторонник фолиарной гипотезы, согласно которой все боковые органы цветка – видоизменённые листья, а сам цветок – видоизменённый побег. Собрал морфологический ряд от семядолей к зелёным листьям.

GOETHE'S URPFLANZE

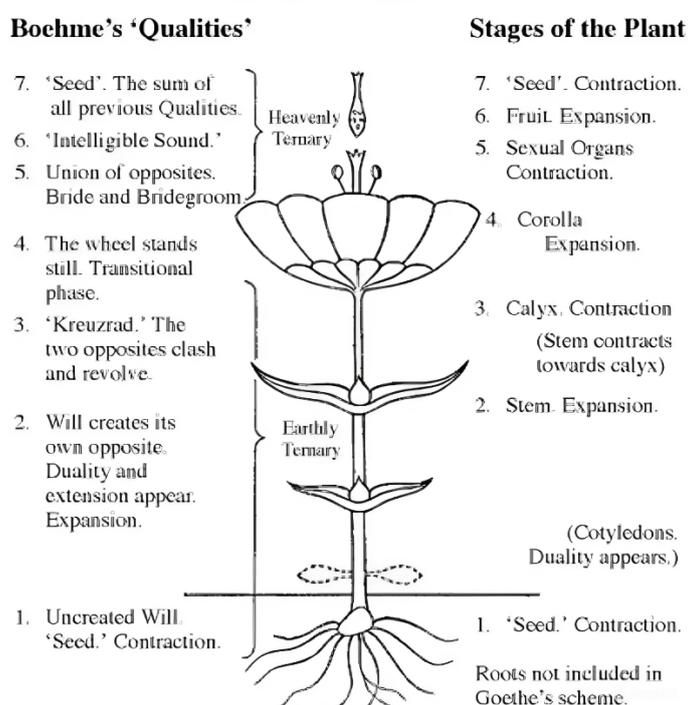


Рис. 11.1. Идеальное растение Гёте

Об идеях Гёте вспомнили в конце XIX века. **Уильям Бейтсон** ввёл понятие **гомеозис** – это такое изменение одного из членов меристического ряда, органа или сегмента, когда он утрачивает присущие ему черты и приобретает признаки другого члена этого ряда. При гомеозисе число и положение органов постоянны, орган занимает то же положение, но отличается по признакам (например, тычинка заменяется на лепесток).

Строение и развитие цветка арабидопсиса

К идее гомеозиса вернулись в 1980-х годах, когда Корнев получил серию мутантов арабидопсиса, у которых отличие от дикого типа было только в цветках. Это были гомеозисные мутанты цветка арабидопсиса.

Арабидопсис Таля – модельное растение из семейства Крестоцветные. Цветок содержит:

- четыре чашелистика (два латеральных и два медианных)
- четыре лепестка, накрест лежащих под углом 45° , которые чередуются с чашелистиками (считается, что два лепестка в процессе эволюции расщепились на четыре)
- две короткие тычинки в латеральном положении
- четыре длинные тычинки, больше сдвинутые к медианной плоскости (считается, что две тычинки в процессе эволюции расщепились на четыре)
- пестик
- от 2 до 8 плодolistиков

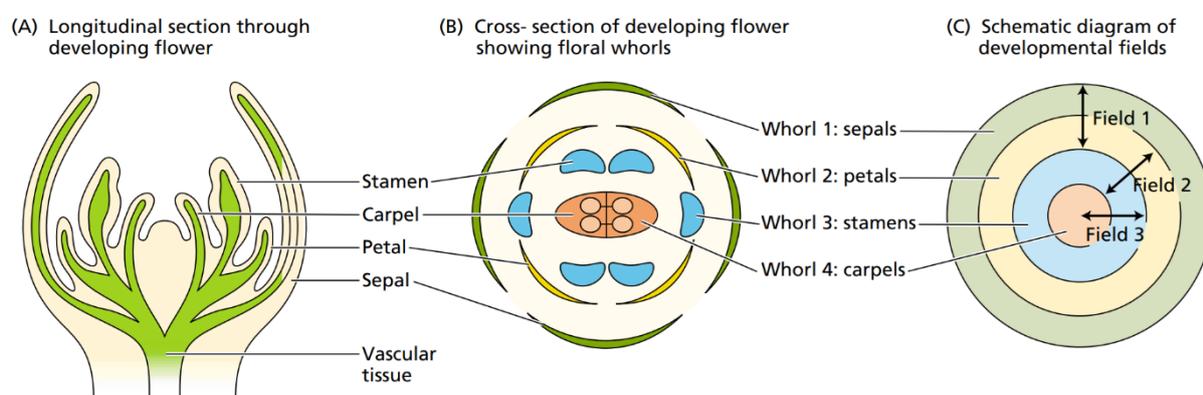


Рис. 11.2. Схема строения цветка арабидопсиса (дикий тип)

Цветок можно представить как короткий побег, на котором есть два круга чашелистиков, круг лепестков, два круга тычинок (коротких и длинных), круги плодolistиков (рис. 11.2).

На рис. 11.3 представлены стадии развития флорального примордия (в центре расположена меристема соцветия – ИМ):

1. возникновение бугорков флоральных примордиев
2. формируется зачаток цветка, возникает boundary zone (граница, отделяющая бутон от остальной меристемы)
3. появляются два медианных чашелистика
4. возникают боковые (латеральные) чашелистики
5. формируются зачатки лепестков (*)
6. появляются примордии тычинок
7. трогаются в рост лепестки и тычинки, появляется кольцевой примордий, который будет формировать геницей

На последующих стадиях растёт геницей, чашелистики закрывают цветок.

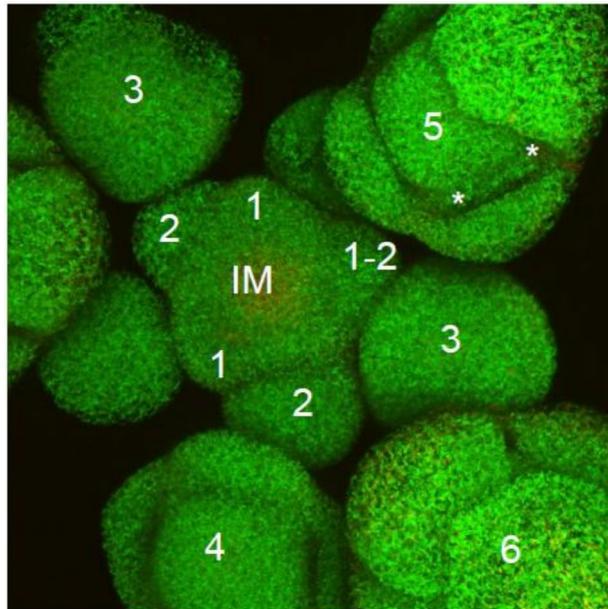


Рис. 11.3. Ранние стадии развития меристемы цветка

Такая динамика развития характерна для арабидопсиса, у других крестоцветных порядок развития органов цветка может отличаться, однако у всех представителей развитие характеризуется эквифинальностью – в итоге формируется цветок, характерный для крестоцветных. Это означает, что позиционная информация в цветках крестоцветных одинакова.

Иерархия программ развития. ABC-модель

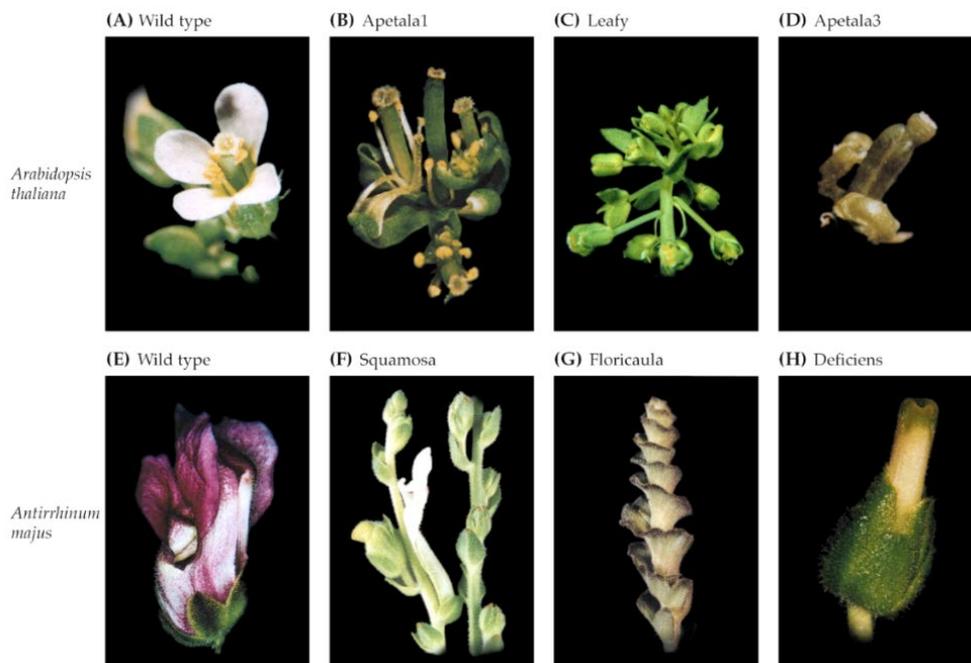


Рис. 11.4. Мутанты по ортологичным генам у Arabidopsis thaliana и Antirrhinum majus

Элиот Мейеровиц – собрал гомеозисные мутанты арабидопсиса и начал их анализировать. Энрико Коэн – исследовал многолетний львиный зев. У *Arabidopsis thaliana* и *Antirrhinum majus* были обнаружены параллельные мутации, которые характеризуются одними и теми же изменениями в цветке (рис. 11.4).

ABC модель (теория «войны позиций») предполагает, что есть три генетические функции, которые исполняют гены А, В и С (рис. 11.5). Гены, исполняющие функцию А и С никогда не включаются одновременно в одних и тех же тканях (находятся в состоянии «войны»). Если происходит мутация, ослабляющая какую-то из этих функций, то конкурирующий ген завоёвывает весь цветок. Гены класса В ни с кем не воюют, могут пересекаться с экспрессией генов А и С.

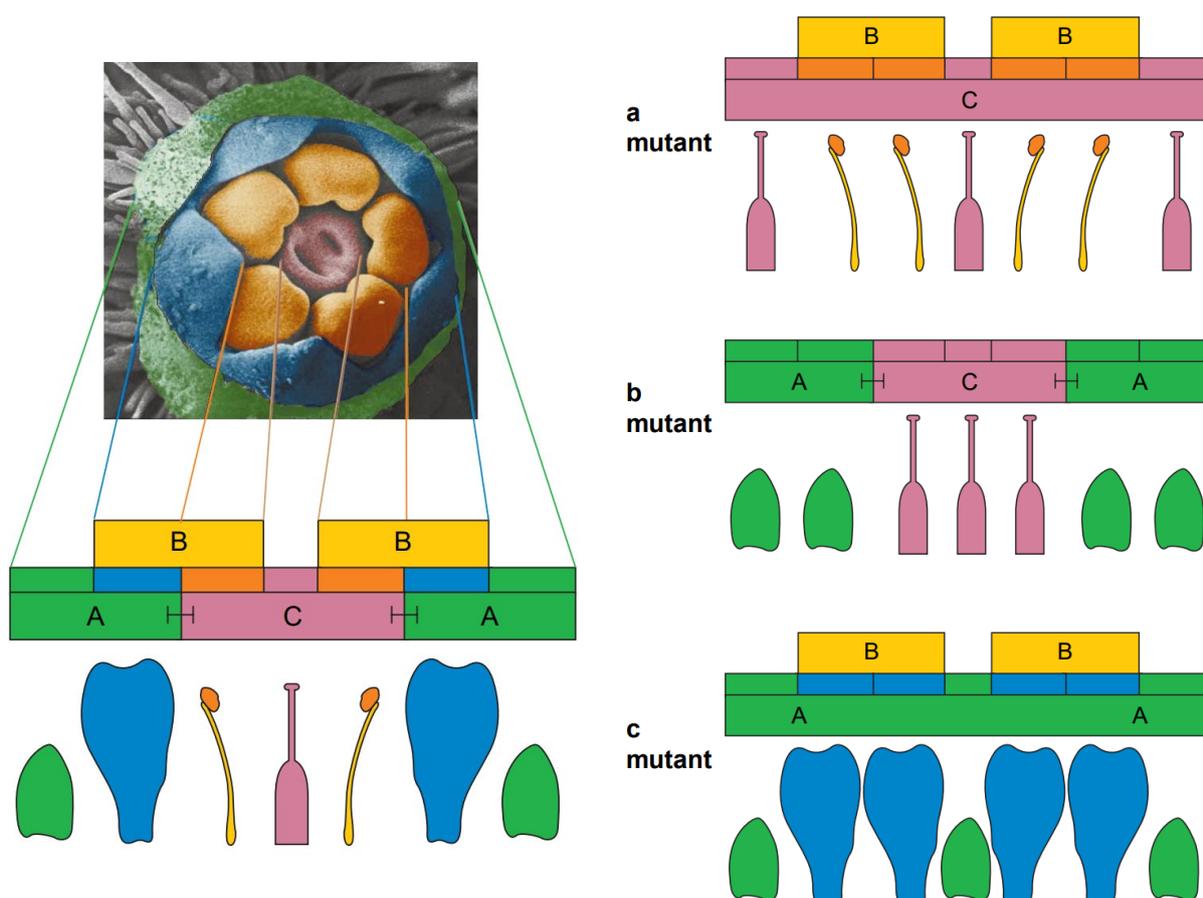


Рис. 11.5. ABC- модель

Распределение генетических активностей в примордии цветка приводит к приобретению идентичности определёнными примордиями и к включению программы развития определённого органа:

- А – чашелистики
- А+В – лепестки
- С – плодолистики
- В+С – тычинки

Мутанты:

- a mutant – AP2 (4-я хромосома): карпелы (плодолистики) вместо чашелистиков, тычинки вместо лепестков
- b mutant – AP3 (3-я хромосома), Pi (5-я хромосома): чашелистики вместо лепестков, карпелы (плодолистики) вместо тычинок
- c mutant – AG (4-я хромосома): лепестки вместо тычинок, чашелистики вместо карпел (плодолистиков)

Большинство генов, которые отвечают за идентичность органов цветка, относятся к MADS-семейству. На рис. 11.6 (a) представлена филогенетическая реконструкция генов MADS-бокс. Красным цветом обозначены гены львиного зева, синим – гены арабидопсиса. FBP2 относится к петунии, а TM5 – к томату.

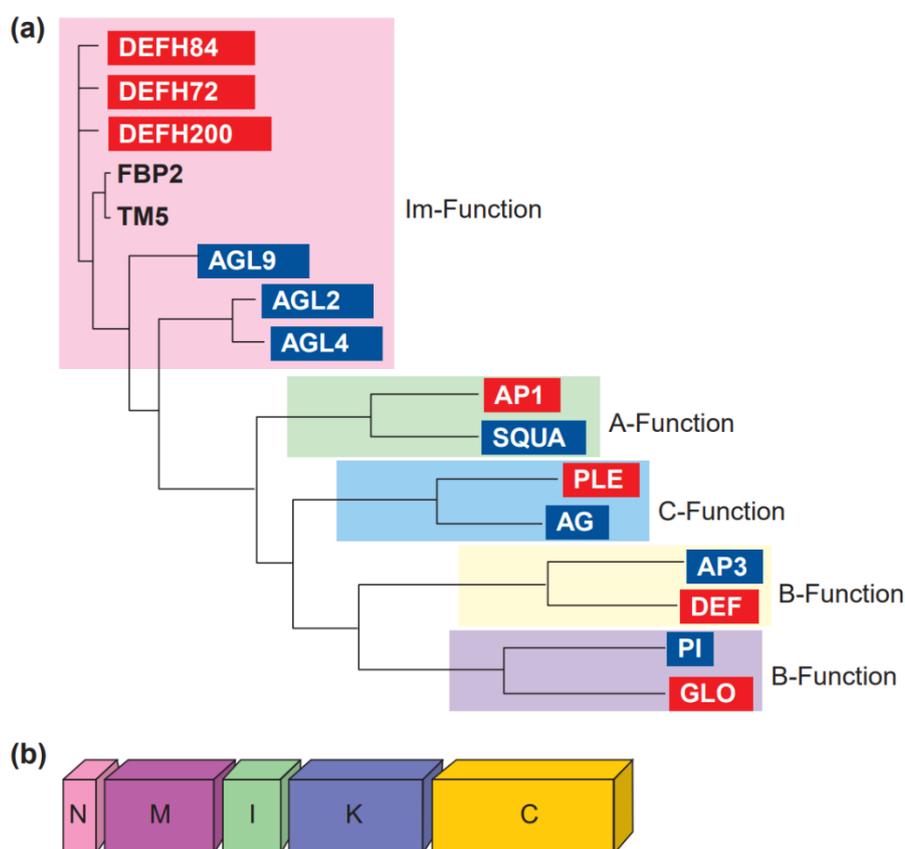


Рис. 11.6. Родственные MADS гены у разных видов

На рис. 11.6 (b) представлена доменная структура факторов MADS у растений. Все факторы MADS могут быть разделены на четыре или пять доменов. MADS-бокс (M) всегда находится на N-конце или рядом с ним и в основном участвует в связывании ДНК. I-область (I), которая имеет переменную длину и состав последовательности, и K-бокс (K), который, вероятно, образует две или три α -спирали, участвуют в белок-белковых взаимодействиях. С-концевой домен (S) сохраняется неизменным только у

представителей одного и того же подсемейства. Некоторые факторы MADS, такие как факторы с функцией C, имеют переменное количество аминокислот, расположенных на N-конце (N). Функция этого N-концевого домена неизвестна.

Мутации в генах, отвечающих за идентичной органов цветка, резко изменяют его структуру (рис. 11.7). У мутантов *apetala2* (особый, не относится к MADS генам) отсутствуют чашелистики и лепестки, у мутантов *pistillata 2* отсутствуют лепестки и тычинки, у мутантов *agamous1* отсутствуют как тычинки, так и плодолистики.

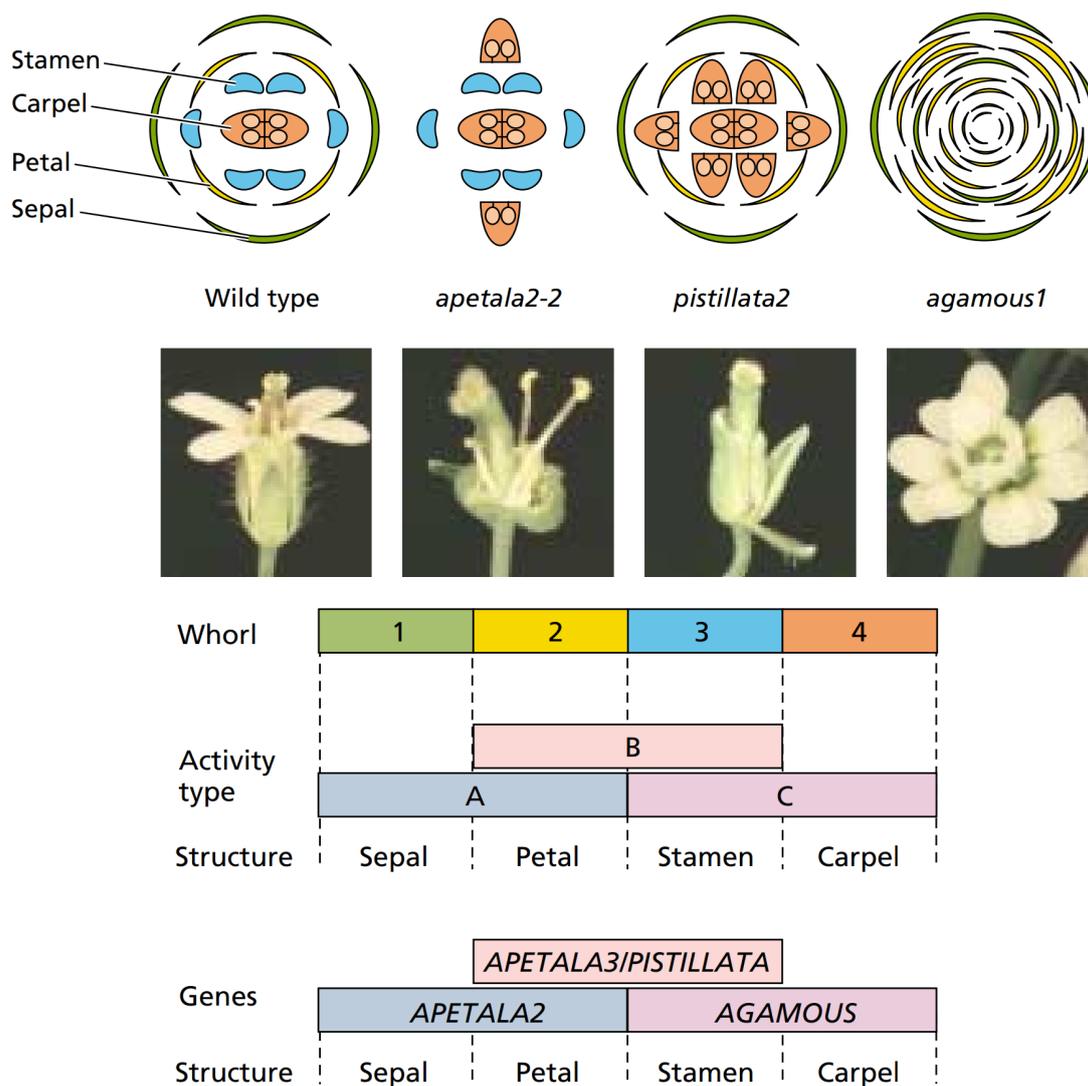


Рис. 11.7. Строение цветков у мутантов

При тройной мутации *apetala2*, *pistillata* и *agamous* цветок арабидопсиса превращается в укороченный побег с зелёными листьями.

При оверэкспрессии отдельных генов можно получить цветки, состоящие из одних и тех же органов. Например, при оверэкспрессии генов класса B и C получается цветок, состоящий исключительно из тычинок. Однако при попытке получить цветок,

состоящий только из лепестков, розеточные листья развивались как розеточные листья, не приобретают идентичности органов цветка. В дальнейшем были найдены гены, выполняющие E функцию – идентичность лепестков, тычинок и плодолистиков. Они важны при сочетании с генами ABC-модели. В ранних исследованиях буква D была занята под гены, отвечающие за развитие семязачатков у петунии. Гены E присутствуют в нескольких взаимозаменяемых копиях, поэтому мутация по одному из них не приводит к фенотипическим проявлениям. При тройных мутациях по гену *SEPALLATA* (*SEP*) центральная часть цветка полностью превращается в чашелистики.

Гены *MADS* семейства обычно работают в квартетах (рис. 11.8). Согласно такой модели, идентичность различных органов цветка (чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков) определяется четырьмя комбинациями *MADS*-box белков. Белковые квартеты, которые являются факторами транскрипции, связываются с промоторными участками генов-мишеней, а затем активируют или подавляют их. Согласно этой модели, два димера каждого тетрамера распознают два разных участка ДНК (называемых *CArG*-боксами, показанными на рис. 11.8 серым цветом) на одной и той же нити ДНК, которые сближаются в результате изгиба ДНК. Точные структуры некоторых многомерных комплексов *MADS*-белков, контролирующих идентичность цветочных органов, всё ещё остаются предположительными.

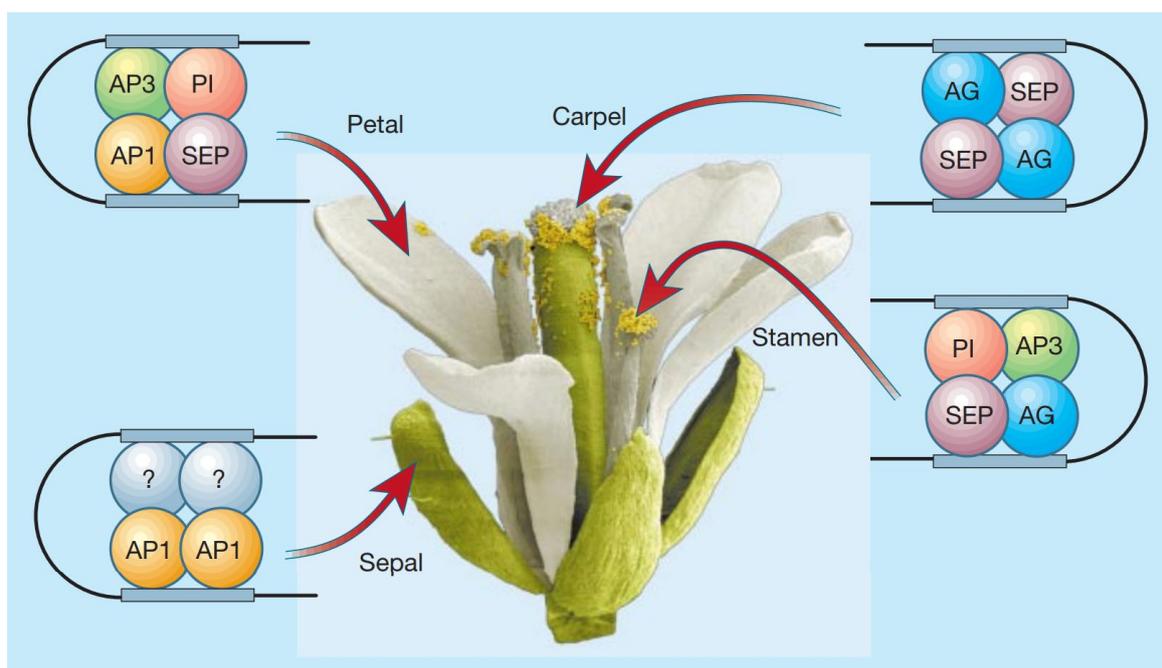


Рис. 11.8. Участие генов *SEP* в формировании органов цветка у арабидопсис

Эволюция ABCD-системы. Повторное использование ABC-генов

Подробный анализ ABCD-системы у растений показывает, что с точки зрения молекулярной филогенетики их можно разделить на клады. У разных объектов эти функции выполняются немного разными генами (рис. 11.9).

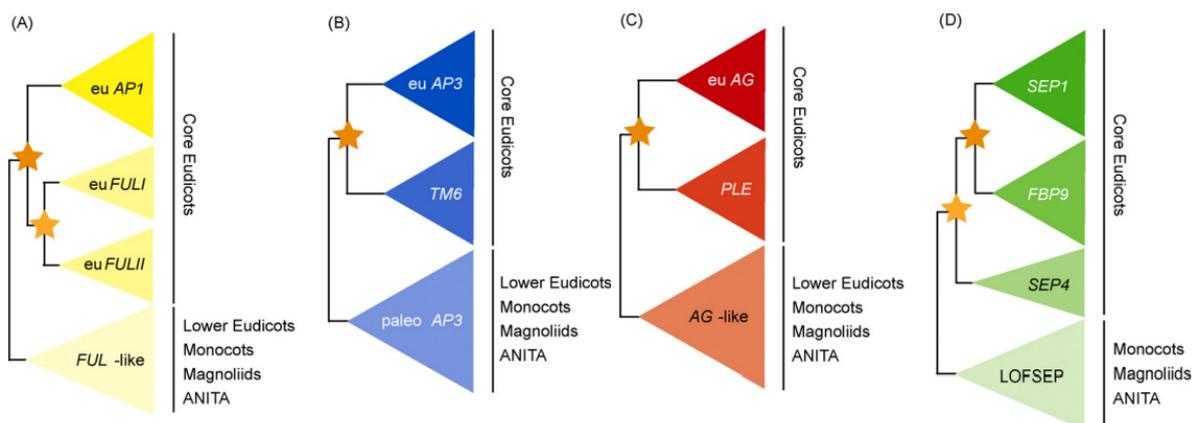


Рис. 11.9. Филогенетическое древо генов ABCD-системы у растений

Считается, что исходно за создание женских шишек отвечали функции С и D, которые сливались. Гены класса В добавлялись, чтобы сделать мужские шишки. Далее произошло разделение на функцию С (идентичность тычинок и пестиков) и D (развитие структур пестика). Появление функции А связано с появлением околоцветника. При этом происходит дупликация генов MADS-семейства. Некоторые гены класса А возникли путём эволюции MADS генов, а некоторые были рекрутированы (привлечены к выполнению этой функции).

Таким образом, под большим морфологическим разнообразием лежит взаимодействие генов ABCDE системы (рис. 11.10).

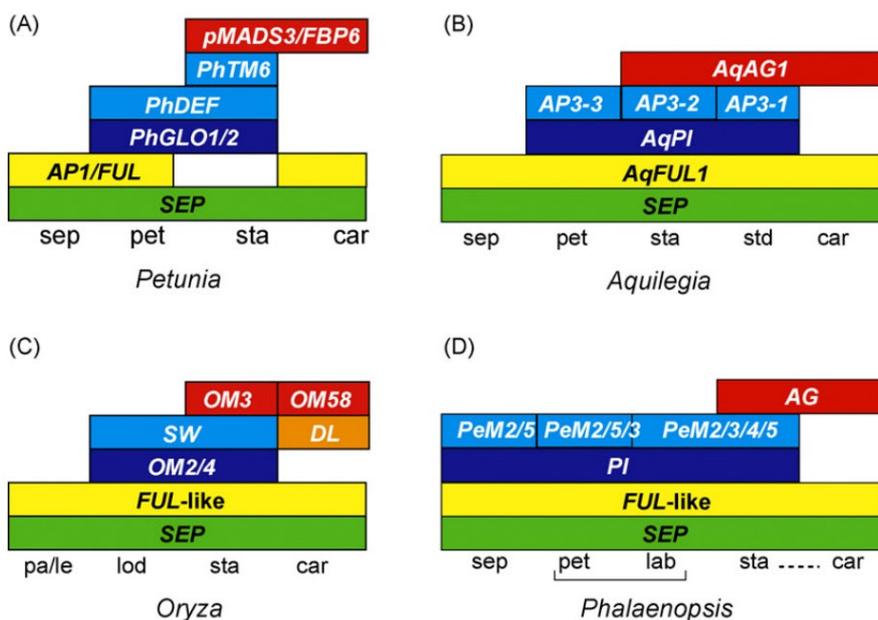


Рис. 11.10. Филогенетическое древо генов ABCD-системы у растений

ABC-гены часто повторно используются дальнейшему развитию. Например, ген AP2 влияет на судьбу семязачатка, его экспрессия обнаруживается в наружном

интегументе. *AG* экспрессируется в тканях нуцеллуса или в тканях, прилежащих к спорогенной клетке.

Кадастральные гены

Кадастральные гены проводят границы между генами ABC-системы.

SUPERNUMERARY STAMENS (SUP) ограничивает экспрессию генов класса В в центре цветка. При повреждении центр цветка занимается тычинками вместо плодолистиков. *SUP* – транскрипционный репрессор с цинковыми пальцами. В зависимости от повреждённого домена фенотип сильно варьирует.

LEUING (LUG) и *SEUSS (SEU)* ограничивают экспрессию генов класса А (*AP2*) во внутренних кругах (через *miRNA172*). Граница проходит между околоцветником и андроцеумом. Это позволяет ограничить околоцветник от генеративных органов. При повреждении лепестки начинают приобретать черты тычинок, становятся тонкими. Нет ДНК-связывающего домена, но участвует в транскрипционных комплексах.

RABBIT EARS (RBE) ограничивает экспрессию генов класса С (*AG*) на периферии цветка (возможно, через *miRNA319a*). Это транскрипционный репрессор с цинковыми пальцами, похож на *SUP*, однако действует примерно там же, где *LUG* и *SEU*. Лепестки сужены, напоминают кроличьи уши.

Регуляция и эволюция зигоморфности

Зигоморфные (билатерально симметричные) цветки никогда не занимают центральное положение. Они всегда расположены в боковом положении – в пазухах прицветников или обычных листьев. Когда по какой-либо причине цветок занимает терминальное положение, он становится актиноморфным. Мутация *centroradialis (cen)* у *Antirrhinum majus* – пелорический терминальный цветок (цветок с правильным (актиноморфным) венчиком, в отличие от прочих цветков того же растения, имеющих неправильные (зигоморфные) венчики). Мутация *terminal flower 1 (tf1)* у *Arabidopsis thaliana* – слияние нескольких боковых цветков в терминальную структуру. Это означает, что терминальная меристема (апикальная меристема соцветия) подаёт сигнал о зигоморфности в боковые цветки.

У львиного зева получено несколько мутантов, у которых нарушен процесс формирования зигоморфного цветка (рис. 11.11).



Рис. 11.11. Функция генов *CYC* и *DICH* в морфологии цветка львиного зева

Гены *CYCLOIDEA (CYC)*, *DICHOTOMA (DICH)* и *RADIALIS (RAD)* сдерживают развитие органов верхней половины цветка: редукция тычинки (стаминодий), слабый рост лепестков. С нижней стороны работает ген *DIVARICATA (DIV)*: полноценные тычинки, цветовой сигнал для посадки опылителей, мешковидные выросты. Эти две группы генов находятся в антагонизме, не включаются одновременно в одной и той же части цветка.

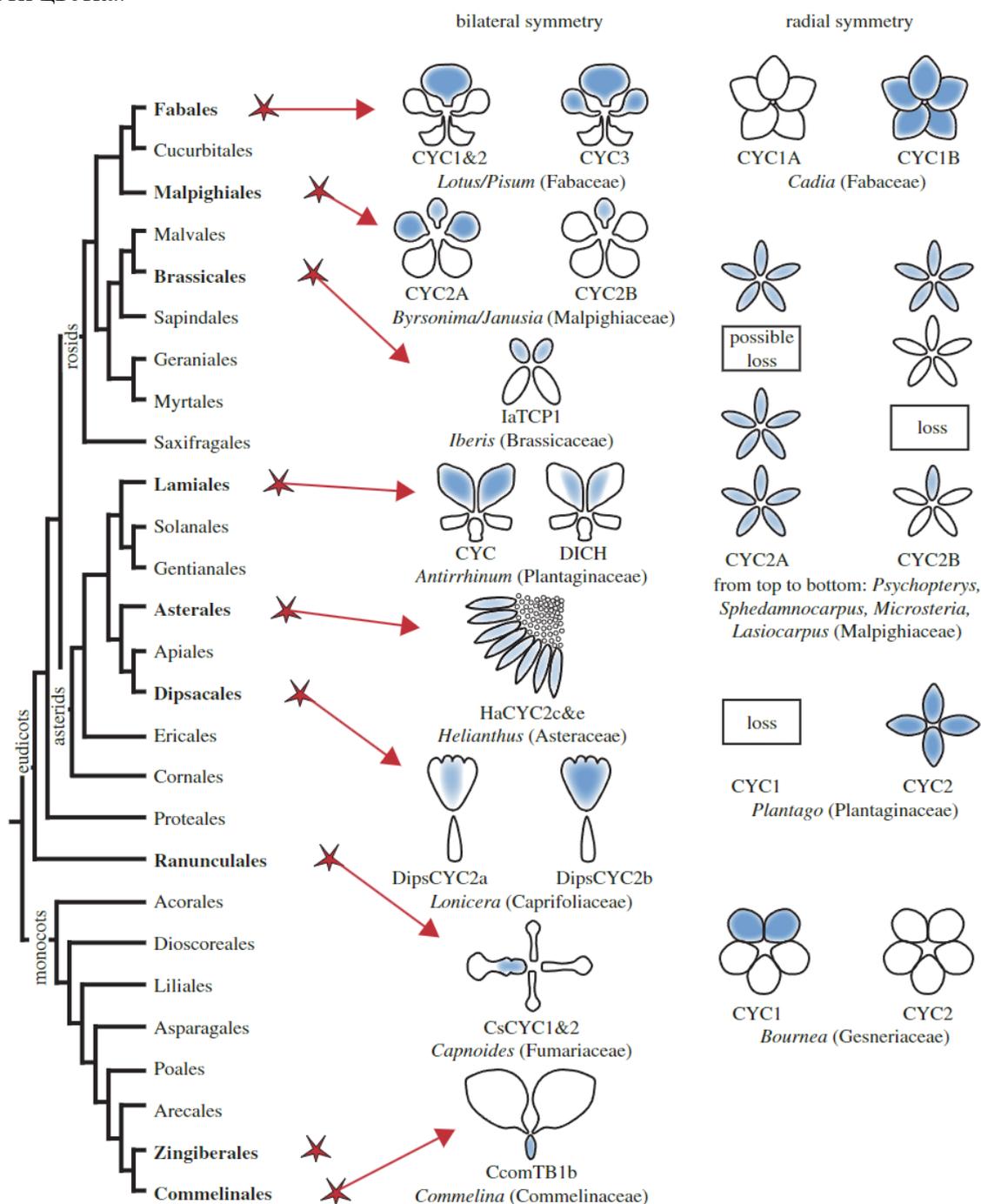


Рис. 11.12. Паттерны экспрессии CYC-like генов у разных таксонов

CYC и *DICH* – транскрипционные факторы семейства *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED1 / CYCLOIDEA / PROLIFERATING CELL FACTOR1*). *RAD* и *DIV* – факторы транскрипции, MYB-like protein. Гомологи этих генов обнаружены у многих семейств, в которых есть зигоморфные цветки (рис. 11.12).

Зигоморфные цветки характерны для семейства Сложноцветные. Например, у подсолнечника на периферии соцветия имеются краевые цветки, которые служат привлекающим аппаратом для опылителей. В центре находятся актиноморфные трубчатые цветки. У сорта Lausanne (на данный момент он не сохранился) часть соцветий обычные, а часть похожа на помпоны. Дело в том, что при мутации все цветки преобразуются в краевые зигоморфные, в результате чего формируется махровое соцветие. Такие цветки могут опыляться только пыльцой с соседних экземпляров. У подсолнечника есть гены *HaCYC2c* и *HaCYC2e* (рис. 11.12), которые активны в краевых цветках, что делает их зигоморфными. В трубчатых цветках эти гены не активны, что позволяет им развиваться как актиноморфным.

Физиологическая регуляция

У современных гладиолусов есть два варианта строения цветка, в которых плоскость зигоморфии отклоняется от медианной:

- на 60° (гандавензис) – посадочная площадка составлена из одного внутреннего и двух наружных листочков околоцветника; две тычинки находятся снизу от рыльца, одна сверху
- на 120° (эдель) – посадочная площадка составлена из одного наружного и двух внутренних листочков околоцветника; тычинки расположены строго в одну линию под рыльцем

Для диких видов характерна строгая симметрия цветка, никогда не встречаются промежуточные или альтернативные варианты (только эдель или гандавензис). У современных гибридов на одном и том же растении оказываются цветки как типа эдель, так и гандавензис, кроме того есть варианты с промежуточным строением.

В раннем развитии цветок гладиолуса актиноморфный, то есть все тычинки и листочки околоцветника одинаковые. Только в момент появления прокрашивания можно понять, какая часть цветка станет в дальнейшем нижней губой.

Был проведён эксперимент, в котором соцветие сначала росло в вертикальном положении, первые цветки успели проявить положение своей плоскости зигоморфности. В определённый момент (на рис. 11.13 обозначен жёлтой стрелкой) соцветие было наклонено таким образом, чтобы нижняя губа физически стала располагаться сверху. Сразу программа развития перестроиться не могла, образовалась промежуточная зона, где происходило сильное изменение направления плоскости симметрии. В итоге устанавливался новый паттерн, плоскость симметрии переворачивалась влево от медианы. При локальном приложении ауксина, имитирующем нижнюю поверхность соцветия, цветки перестраивают свою структуру

так, чтобы физически нижние лепестки становились нижними и морфологически. Таким образом, это редкий пример, когда ось зигоморфности регулируется не генетическими факторами, а физиологическими.

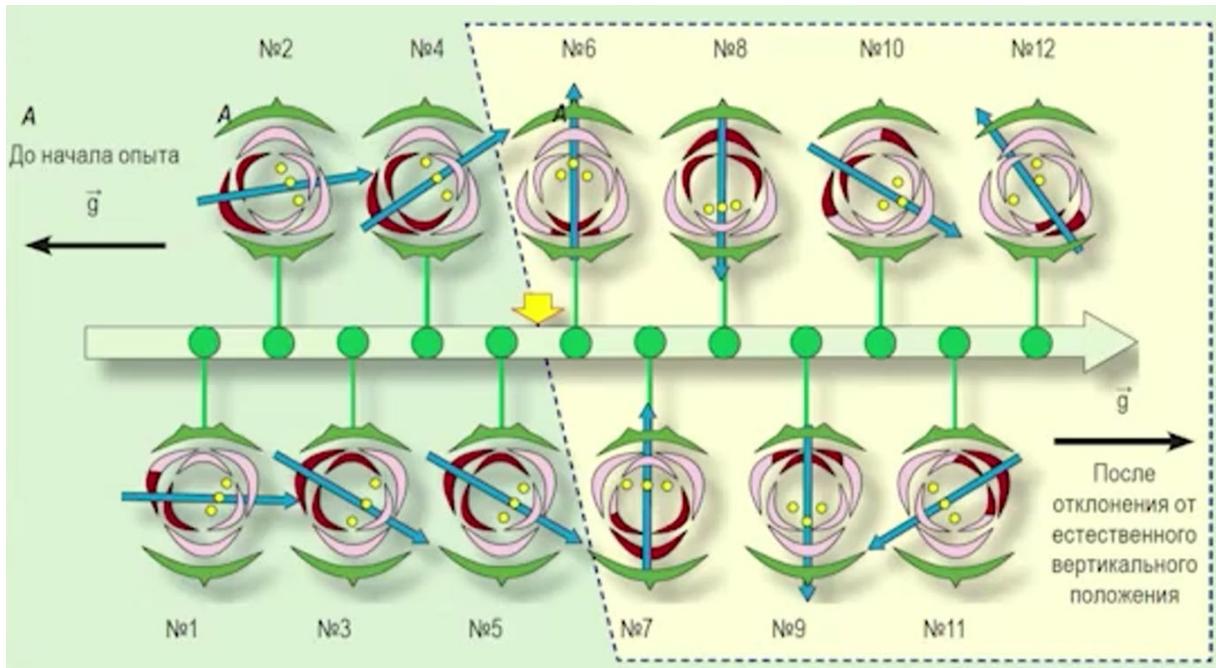


Рис. 11.13. Положение оси симметрии цветка по расположению посадочных сигналов

Лекция 12. Эволюция пола у растений

Классификация самонесовместимости

Некоторые растения обладают обоеполыми цветками (например, арабидопсис, горох, пшеница). Более того, эти цветки могут самоопыляться, что очень удобно для генетиков – это **самосовместимость**. У некоторых растений при попадании пыльцы на собственное рыльце завязывание семян не происходит – это **самонесовместимость**. В пределе образуются цветки разного пола на одном растении (огурец) или на разных (облепиха, крапива двудомная).

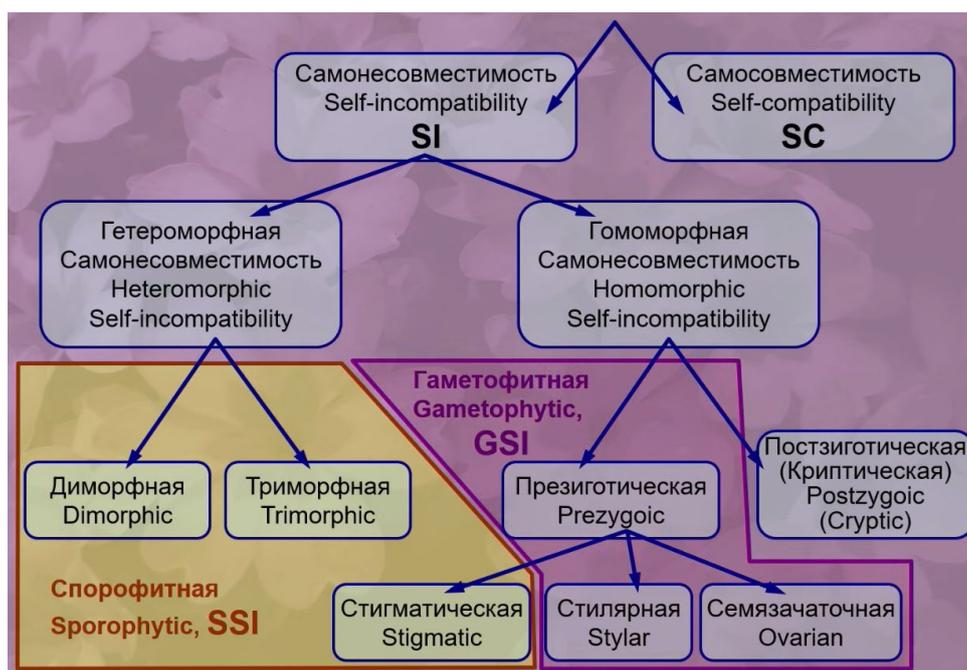


Рис. 12.1. Классификация самонесовместимости

Гетероморфная самонесовместимость

Если примула завязала семена, то она охотно даёт самосев. Обычно нужно 2–3 года, чтобы примула, выросшая из семян, зацвела. Однако если на участке растёт всего лишь одно растение (пусть даже вегетативно размноженное), семян ожидать не приходится. Это явление впервые заметил и изучил Чарльз Дарвин. В те времена примулы были на пике популярности в Великобритании, и Дарвин собрал восемь разных видов для того, чтобы провести свое исследование, а начал его с самой обычной примулы весенней.

Он разрезал цветки разных растений вдоль, и обратил внимание на расположение тычинок и пестиков. У одних цветков пестики были довольно длинными, рыльце находилось на уровне отгибающихся лепестков, тогда как тычинки были спрятаны в глубине трубки венчика. Такие цветки он условно назвал «булавками» (pin), или длинностолбиковой формой. У других растений пестик был коротким, но

зато тычинки были длинными. Дарвин назвал их «бахромками» (thrum), или короткостолбиковой формой. Все собранные в саду у Дарвина виды примул показали сходную закономерность: пестики были либо длинными, либо короткими (рис. 12.2).

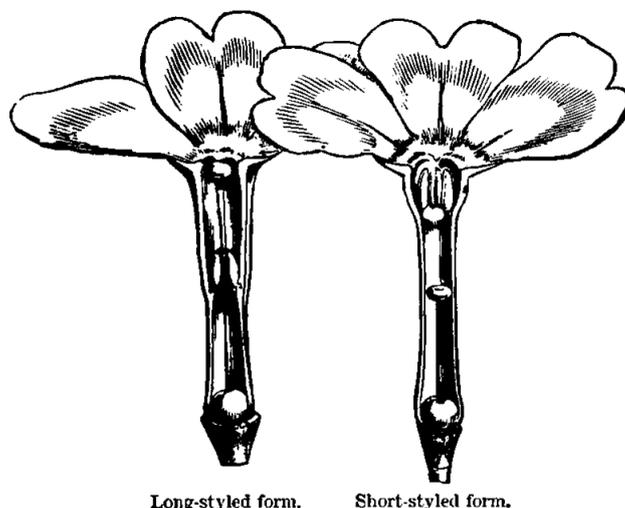


Рис. 12.2. Короткостолбиковая и длинностолбиковая морфы примулы

Это наблюдение было крайне интригующим, и Дарвин задумался, что будет, если опылять растения с длинным столбиком пыльцой от других длинностолбиковых растений (или пыльцу короткостолбиковых растений переносить на такие же цветки). Результат оказался неутешительным: Дарвин получил от таких скрещиваний лишь единичные семена. Явно, что опыление цветков одной и той же формы не давало результата. Такие скрещивания Дарвин назвал незаконными.

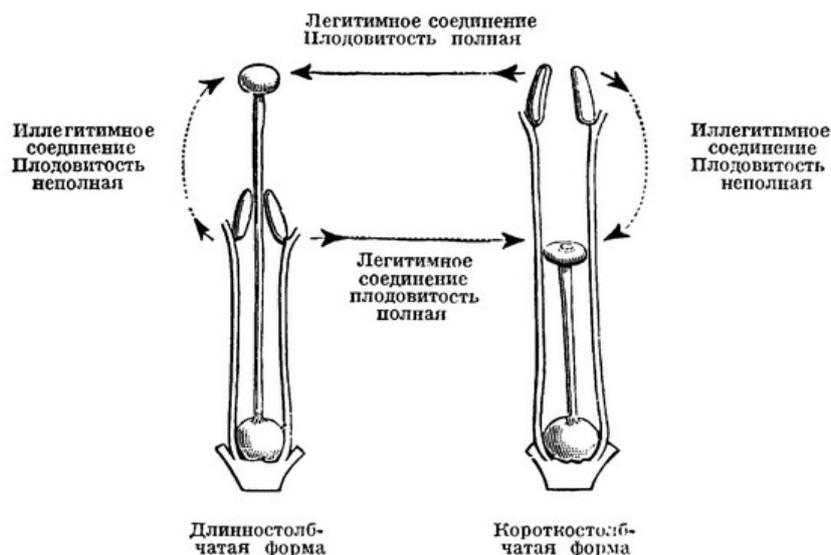


Рис. 12.3. «Законное» и «незаконное» опыление

Далее он переносил пыльцу между цветками разных типов: с длинностолбиковых растений на короткостолбиковые и наоборот. В этих случаях ему

удалось получить обильный урожай семян. Соответственно, это были «законные» скрещивания (рис. 12.3).

Дальше Дарвин изучил пыльцу у разных форм примул, и выяснил, что если тычинки короткие, то и пыльца будет мелкой (и наоборот). Если мы нанесем пыльцу с коротких тычинок на длинный столбик, то пыльцевому зерну просто не хватит сил, чтобы преодолеть всю длину столбика. Поэтому такие скрещивания оказывались неэффективными. Крупные пыльцевые зёрна, наоборот, могли долго расти и преодолевали всю длину столбика, и в результате завязывались семена.

Если же взять крупную пыльцу с длинных тычинок и поместить на короткий столбик, то пыльцевые трубки окажутся слишком толстыми, чтобы «вбуравиться» в плотные ткани короткого пестика. Мелкие пыльцевые зёрна хорошо «внедряются» в короткий столбик, длина его невелика, и пыльцевые трубки легко достигают завязи.

Таким образом, для того чтобы опыление было успешным, длина столбика и тычинок должна совпадать.

Кроме того, Чарльз Дарвин остроумно заметил, что пчела (или другой опылитель), посещая цветки разных форм, «измазывает» пыльцой разные части тела. Посещая следующий цветок, пыльца оказывается именно на том уровне, где может произойти наиболее эффективное опыление (т.е. длина тычинок и пестика снова должны совпадать).

Аналогичное явление (две морфы) наблюдается у медуницы.

Тип цветка определяется генетикой растения. Из года в год один и тот же куст будет давать цветки одинакового типа. Более того, при вегетативном размножении тип цветка не может измениться: вегетативные потомки «булавок» всегда будут «булавками», а потомки «бахромок» – «бахромками».

При самоопылении короткостолбиковой расы наблюдается расщепление 3:1. Это говорит о гетерозиготности короткостолбиковой расы. Признак «короткий столбик, длинные тычинки» (S) доминирует над признаком «длинный столбик, короткие тычинки» (s). У тетраплоидной примулы S доминирует над s при генотипе Ssss.

Концепция «супергена»: генетический локус S состоит как минимум из трёх генов, рекомбинация между которыми затруднена: G – длина столбика (геницей), P – размер пыльцы, A – положение тычинок (андроцей). Но (возможно) включает в себя и больше различных генов (насчитывают до 9 генов). По сходному механизму наследуется дистилия у следующих видов: *Primula*, *Armeria*, *Limonium*, *Hypericum* и др.

Мутант примулы P* образует два типа пыльцы в одних и тех же пыльниках: крупную и мелкую. Морфотип – как у длинностолбиковой «pin»-морфы. В дальнейшем показано, что размер пыльцы и способность к опылению могут наследоваться независимо.

У гречихи *Fagopyrum esculentum* вариант S^{LH} – длинностолбиковая гомоморфная раса (Long Homostyle = LH), вариант S^{SH} – короткостолбиковая гомоморфная раса

(Short Homostyle = SH). Отношение доминирования: $S > S^{LH} > s$. Есть самосовместимость, возможно образование гомозигот.

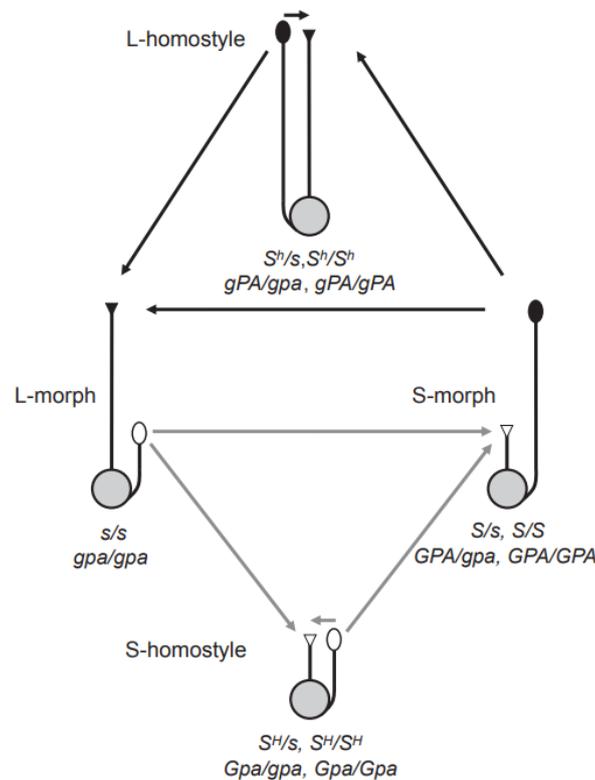


Рис. 12.4. Опыления между разными морфами цветка у примулы

Генетическое наполнение S-локуса:

- *Cyclin-like F-box (CFB)* – контроль клеточного цикла
- *Conserved Cysteine Motif (CCM)* – участие в сигналинге
- **GLOBOSA (GLO)** – MADS-фактор транскрипции (В-класс). Есть два неаллельных GLO1 и GLO2
- *Cytochrome P450 (CYP)* – гомологичен брассинолид-26-гидроксилазе. Гормональный баланс
- *Pumilio-like39 RNA-binding protein (PUM)* – регуляция сплайсинга, трансляции и др.
- *Kiss-Me-Deadly Kelch repeat F-Box (KFB)* – регуляция активности цитокининов через деградацию ARR В-типа

Гетероморфная самонесовместимость может быть реализована другим способом, как, например, у льна. Чтобы пыльцевая трубка успешно продвигалась среди клеток столбика, её осмотическое давление должно быть примерно в 4 раза выше, чем давление ткани столбика. При самоопылении может возникать недостаточное давление, в результате чего пыльцевая трубка не может раздвинуть клетки столбика, либо избыточное давление, тогда пыльцевая трубка лопается внутри ткани столбика.

Для форзиции была предложена система яд/противоядие (которая в дальнейшем не подтвердилась). В пыльцевых зёрнах одной расы накапливается рутин, а другой – кверцетин, которые в большом количестве препятствуют прорастанию пыльцевых зёрен (но в небольших количествах они необходимы). Собственные рыльца не содержат фермент, который разрушает собственный флавоноид. Таким образом, эффективным оказывается только перекрёстное опыление.

Происхождение гетеростилии

Среди диких представителей рода *Narcissus* есть виды, у которых нет гетеростилии, строение цветка одинаково у всего таксона и наблюдается самосовместимость. Тычинки расположены в два круга, что даёт предпосылку к морфологической специализации (образованию дистилии). Если один из кругов опущен вниз, то возникает несовпадение высоты столбика. Поэтому у части особей рыльце подравнивается по верхним тычинкам, а у части – по нижним.

Иногда у нарцисса возникает тристилия (соответственно, триморфная самонесовместимость). Оба круга тычинок располагаются либо над рыльцем (генотипы Ss mm, Ss Mm, Ss MM, тычинки короткие и средние), либо под рыльцем (генотип ss mm, тычинки средние и короткие). Возможен и промежуточный вариант, когда рыльце располагается между двумя кругами тычинок (генотипы ss Mm, ss MM, тычинки длинные и короткие).

Триморфная самонесовместимость также характерна для водяного гиацинта. Пыльники продуцируют разную по размерам пыльцу (рис. 12.5).

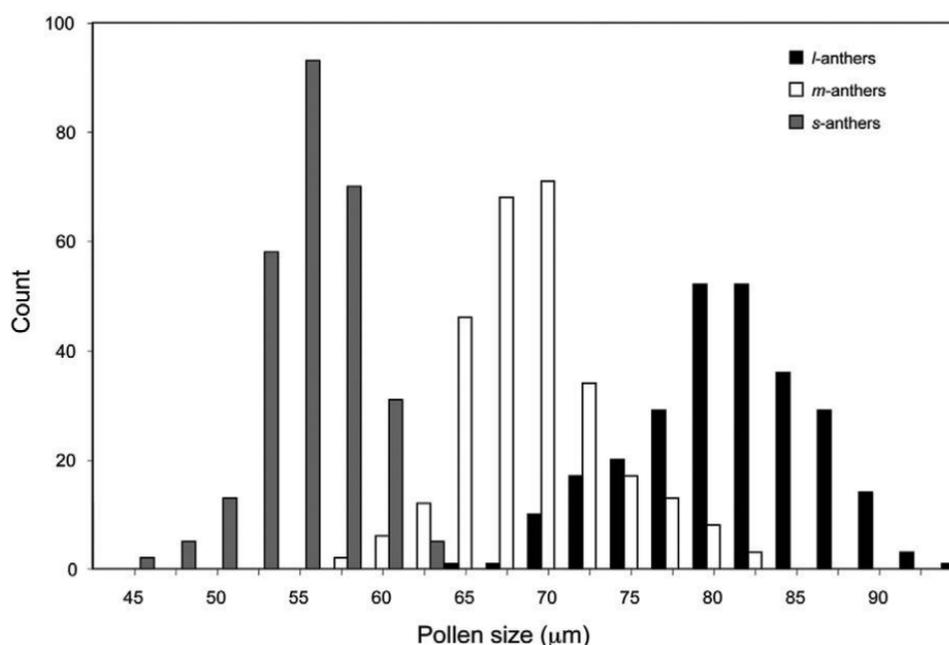


Рис. 12.5. Распределение по размеру пыльцы у триморфного *Pontederia subovata*

В ходе эволюции тристилия может превращаться в дистилию (рис. 12.6). Это пластичный процесс, эволюция позволяет двигаться как в сторону возникновения триморфных цветков, так и к диморфности (в случае «выпадения» одной из морф).

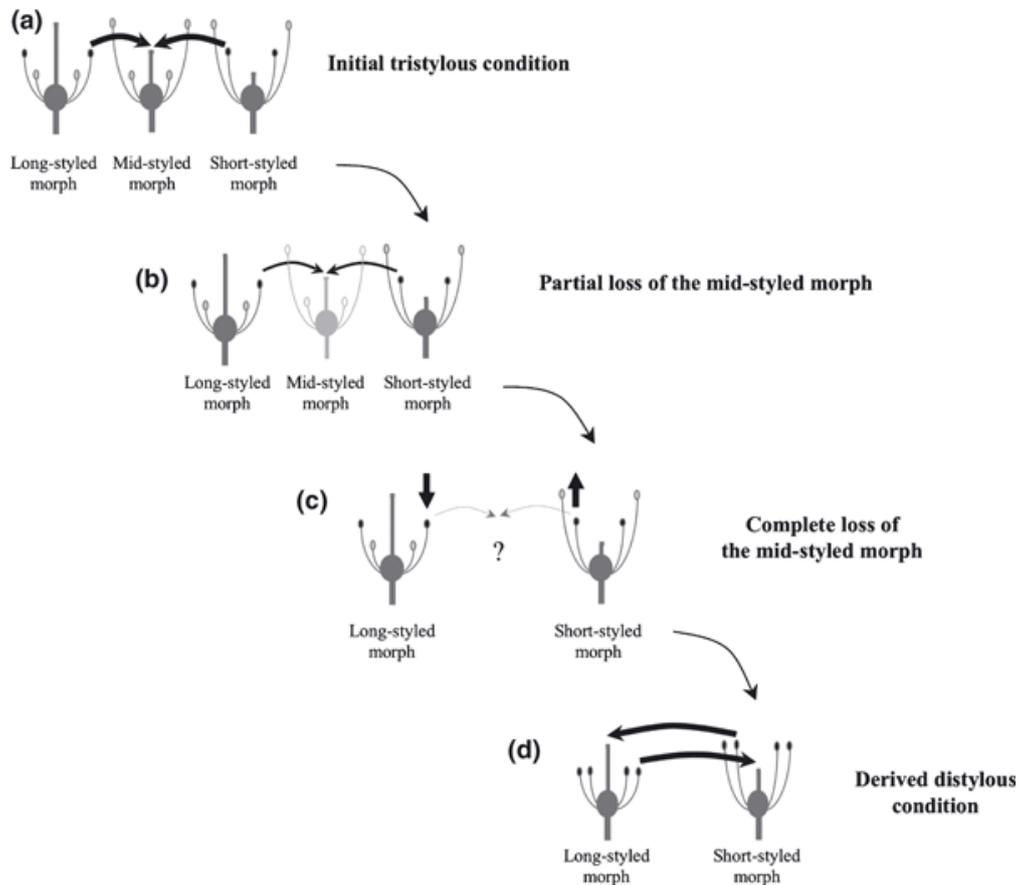


Рис. 12.6. Эволюционный переход от дистилии к тристилии у *Oxalis alpina*

Наблюдается многообразие вариантов генетического контроля:

- *Lythrum salicaria* и *Decodon verticillatus* – S- и M-локусы находятся в разных хромосомах
- *Oxalis* (большинство видов) и *Eichornia paniculata* – S- и M-локусы находятся в одной хромосоме на некотором расстоянии
- *Oxalis* (меньшинство видов) – рецессивный эпистаз + дополнительный локус для контроля гетеростилии

Происхождение пола

От диморфной самонесовместимости можно прийти к полу у растений. У смолёвки двудомной (*Silene dioica*) можно построить полный морфологический ряд от женских к мужским цветкам через диморфное состояние:

- Слабые женские растения – пестичные, но развивается немного пыльцы на низких маленьких тычинках (длинностолбиковая раса)

- Сильные женские растения – тычинки уменьшаются, становятся менее фертильными и в пределе исчезают
- Слабые мужские растения – пыльца развивается хорошо, кроме того есть пестик, в котором может развиваться некоторое количество семян (короткостолбиковая раса)
- Сильные мужские растения – редукция пестика

Это многолетнее растение, его можно размножать вегетативно, признак пола при этом сохраняется.

У большинства видов женские и мужские цветки в раннем развитии более-менее одинаковы, на последующих этапах происходит арест развития либо тычинок, либо пестика.

Половые хромосомы. Пол и внешние условия

Параллельно происходит эволюция хромосом. На рис. 12.7. представлены четыре основных шага в эволюции хромосом у растений от самых примитивных аутосом (слева) до продвинутых половых хромосом (справа).

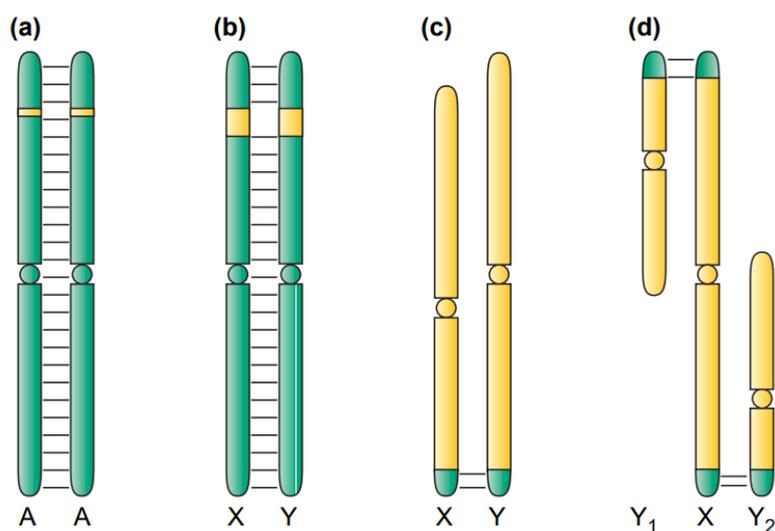


Рис. 12.7. Эволюция хромосом у растений

- Бешеный огурец (*Ecballium elaterium*) – нет дифференцировки хромосом (на двух аутосомах есть признак мужских и женских цветков, мужские при этом доминируют)
- Папайя (*Carica papaya*) – трёхдомное растение, есть мужские, женские экземпляры и гермафродиты:
 - mm – женские растения
 - M1m – мужские растения
 - M2m – гермафродиты
 - M1M2 – леталь (на ранних этапах происходит гибель зародыша)

Это означает, что хромосома, несущая локус M1 и M2, не является полноценной. Оттуда удалены жизненно важные гены, то есть у папайи началась «эрозия» Y-хромосомы.

В тропиках выгоднее выращивать гермафродитов (больше выход урожая с единицы плантации), однако в суровых климатических условиях более адаптивны мужские и женские растения.

- c) Смолёвка двудомная (*Silene dioica*) – есть хорошо развитые половые хромосомы, их можно визуальным образом отличить от аутосом.
- d) Щавель кислый (*Rumex acetosa*) – наблюдаются две Y-хромосомы. Есть механизм сочетания трёх хромосом одновременно с неравным разделением их по клеткам.

Спаржа (*Asparagus officinalis*) – на плантациях выгоднее выращивать мужские растения, поскольку они не «отвлекаются» на образование плодов (в отличие от женских растений), за счёт чего их можно длительнее эксплуатировать и в итоге собрать на 25% больше урожая побегов. Существуют YY особи, но у них нарушен мейоз, пыльца вся стерильная.

Для некоторых растений характерна XO система определения пола: XO – мужские особи, XX – женские.

В зависимости от внешних условий иногда наблюдается смена пола. Трофическая детерминация пола была установлена у ариземы трёхлистной (*Arisaema triphyllum*). Пол растения зависит от объёма клубня, накопленного в предыдущем году. Если клубень средних размеров, питательных веществ не хватает на образование плодов, поэтому растение образует мужской цветок. Если клубень большой, растение становится женским. Маленький клубень не цветёт совсем.

Гомоморфная самонесовместимость

При гомоморфной самонесовместимости строение цветка не отличается. Например, у гиппеаструма даже при нанесении собственной пыльцы на рыльце не происходит самоопыление, для этого обязательно нужна генетически другая особь. Классификация гомоморфной самонесовместимости по барьерам, которые непреодолимы для пыльцевого зерна:

1. **Стигматическая (рыльцевая)** – арест развития происходит непосредственно на рыльце
2. **Стилярная (столбиковая)** – пыльцевое зерно прорастает, пыльцевая трубка начинает рост, арест происходит в столбике, продвижение пыльцевой трубки далее невозможно
3. **Яйцеклеточная (семязачатковая)** – пыльцевое зерно прорастает, пыльцевая трубка преодолевает столбик, доходит до семязачатка, но процесс оплодотворения в этот момент нарушается

Самоопыление у диких видов капусты контролируется генным локусом S со множеством аллелей: S1, S2, S3 и т.д. В этом случае реализуется спорофитный контроль. Здесь также работает концепция супергена генетический локус S состоит из множества генов, рекомбинация между которыми затруднена:

- **S-Locus Glycoprotein (SLG)**. Класс I – без интронов, доминантные аллели, класс II – интронированные, рецессивные. Работают в рыльце и при самонесовместимости, и при самосовместимости
- **S-Locus Receptor Kinase (SRK)**. S domain – экстраклеточный, с сайтами гликозилирования, похож на SLG. Возможен альтернативный сплайсинг с образованием растворимого экстраклеточного продукта. Kinase domain – серин/треониновая киназа. Необходимы для проявления самонесовместимости.
- **S-Locus Anther (SLA)**. Экспрессия в пыльниках. Две копии: интронированная и без интронов. Продукты димеризуются. Прерванные транспозонами аллели *Brassica oleracea* также проявляли самонесовместимость.
- **S-Locus Linked (SLL1 и SLL2)**. SLL1 специфичен для каждого аллеля. Экспрессия только в пыльниках при самонесовместимости. SLL2 представлен в нескольких разных копиях. Экспрессия в пыльниках и в рыльцах как при самонесовместимости, так и при самосовместимости.
- **S-Locus Protein (SP5, SP6, SP8 и SP11)**. Экспрессия в генеративных органах.
- Группа генов **S-Locus Related (SLR1, 2 & 3)**.

Спорофитный контроль

На рис. 12.8. изображён пыльник в разрезе.

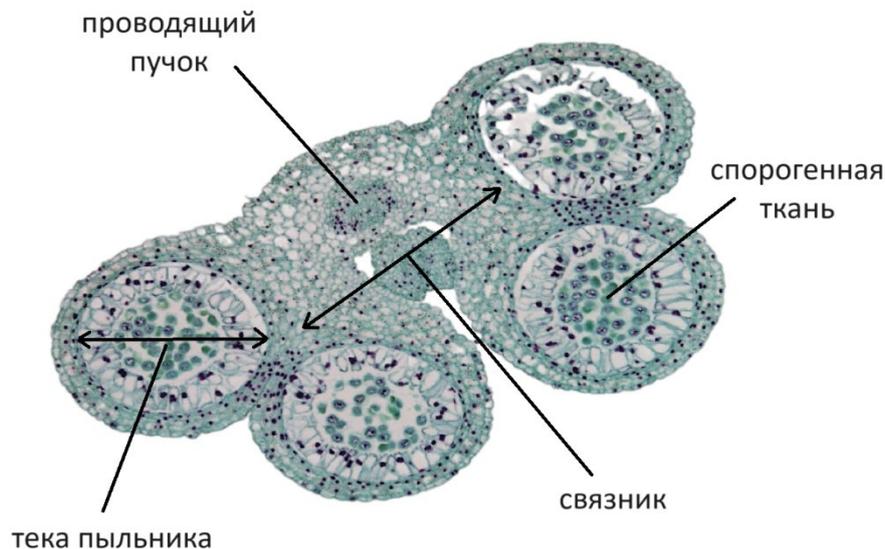


Рис. 12.8. Строение пыльника

Спорогенная ткань в дальнейшем становится гаплоидной, а всё остальное – диплоидные клетки спорофита, которые будут играть роль в детерминации

самонесовместимости. Тапетум – питающий слой. Когда приходит время кормить клетки будущей пыльцы, он лизируется. По ходу развития из тапетума на поверхность пыльцы прилипает множество разнообразных белков, упомянутых ранее. Если отмыть пыльцевое зерно от таких белков, то оно утрачивает способность к прорастанию на рыльце. Если снова обработать отмытую пыльцу этими же белками, то она восстанавливает способность к прорастанию (рис. 12.9). Среди этих белков особенно важны **Pollen Coat Protein (PCP1A)** и **S-Locus Protein 11 (SP11/SCR)**.

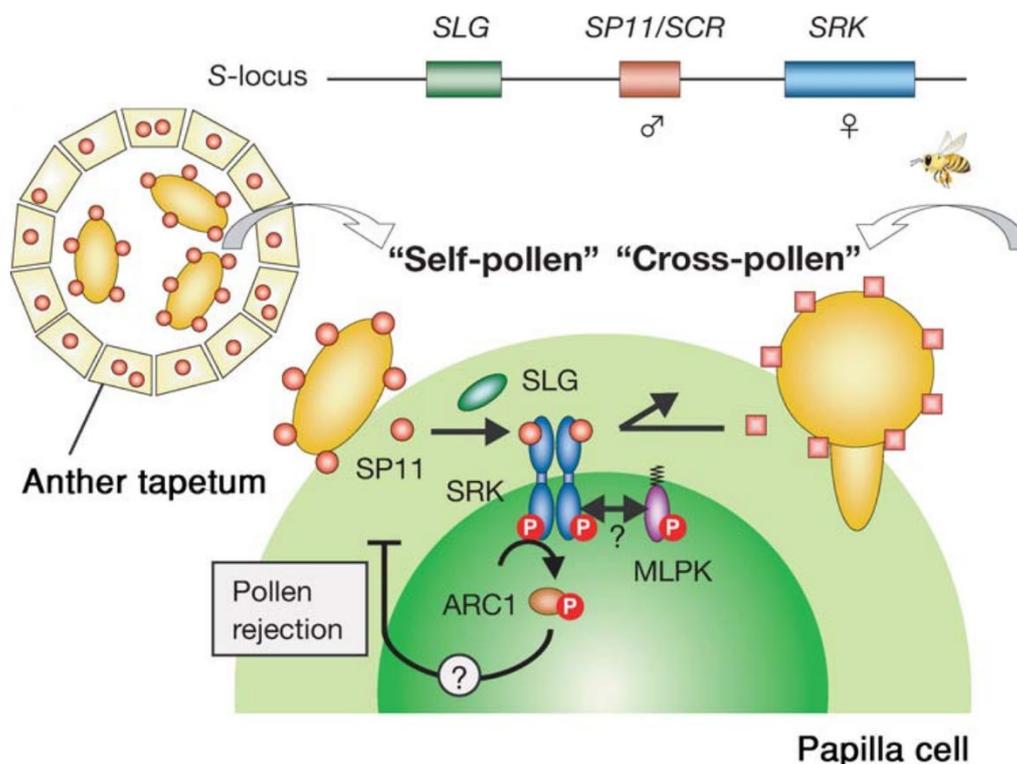


Рис. 12.9. Молекулярная модель самонесовместимости (спорофитный контроль)

Для прорастания важно, чтобы ни один из аллелей не совпадал у двух растений, участвующих в опылении (ни на рыльце, ни в пестике).

Основные события опыления

I фаза развития (10-40 мин после нанесения пыльцы):

- адгезия (прилипание пыльцы к рыльцу)
- увеличение гидравлической проводимости клеток рыльца, выделяется немного жидкости, чтобы смыть вещества, которые прилипли на поверхность пыльцы в ходе развития
- диффузия белков и низкомолекулярных веществ оболочки пыльцевого зерна

II фаза развития (40-70 мин после нанесения пыльцы):

- вторичное выделение молекул из оболочки пыльцевого зерна:

- растяжение клеточной стенки папилл на рыльце
- поступление воды в пыльцевое зерно, нарастание тургора
- прорастание пыльцевой трубки

III фаза:

- выделение кутиназы и других ферментов из интины
- пыльцевая трубка внедряется в ткань рыльца и столбика

Если же удалось опознать аллель, прямо совпадающий с аллелем материнского родителя, то на II фазе происходит снижение гидравлической проводимости, постепенное усыхание и гибель пыльцевого зерна. Так реализуется самонесовместимость.

Дополнительным механическим барьером к прорастанию может быть синтез каллозы на папиллах рыльца.

Гаметофитный контроль. Стилиарная самонесовместимость

Многие растения обладают гомоморфной самонесовместимостью с гаметофитным контролем. Это означает, что пыльцевые зёрна прорастают в зависимости от их личного генотипа, а не от пыльника, в котором они развивались. Количество локусов при этом может сильно варьировать: у маслины только 2 аллеля S локуса, в то время как у клевера найдено более 100 аллелей.

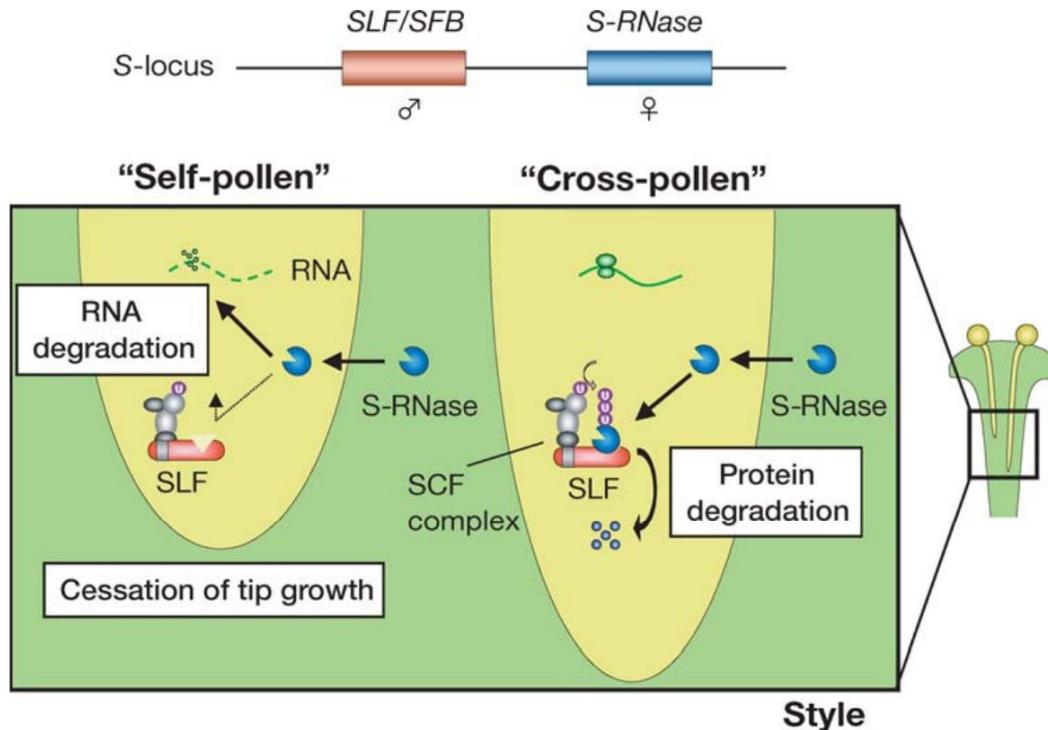


Рис. 12.10. Молекулярная модель самонесовместимости (гаметофитный контроль)

Наиболее исследована самонесовместимость гаметофитного типа у диких видов табака. Самоопыление у них контролируется генным локусом S со множеством аллелей (около 20): S₁, S₂, S₃, и т.д. У самосовместимых и самонесовместимых табаков очень сильно отличается РНК-зная активность рылец. В принципе у самонесовместимых растений активность РНК в рыльцах и столбиках выше, чем у самосовместимых. Специфические S-РНКазы – **S-Locus RNase (SRN)** – обнаружены у многих паслёновых, розоцветных, бобовых, норичниковых и др. По мере роста пыльцевой трубки S-РНКазы проникают внутрь и стараются порезать РНК (рис. 12.10). При перекрёстном опылении происходит разрушение S-РНКаз убиквитинлигазными комплексами. После кипячения S-РНКазы меняют конформацию, теряют специфичность и могут ингибировать не только свою, но и чужую пыльцу. SLF/SFB белки являются компонентами убиквитинлигазного комплекса.

Существует множество S-РНКаз и SLF белков (рис. 12.11). Возникает сложная система взаимного доминирования и подавления.

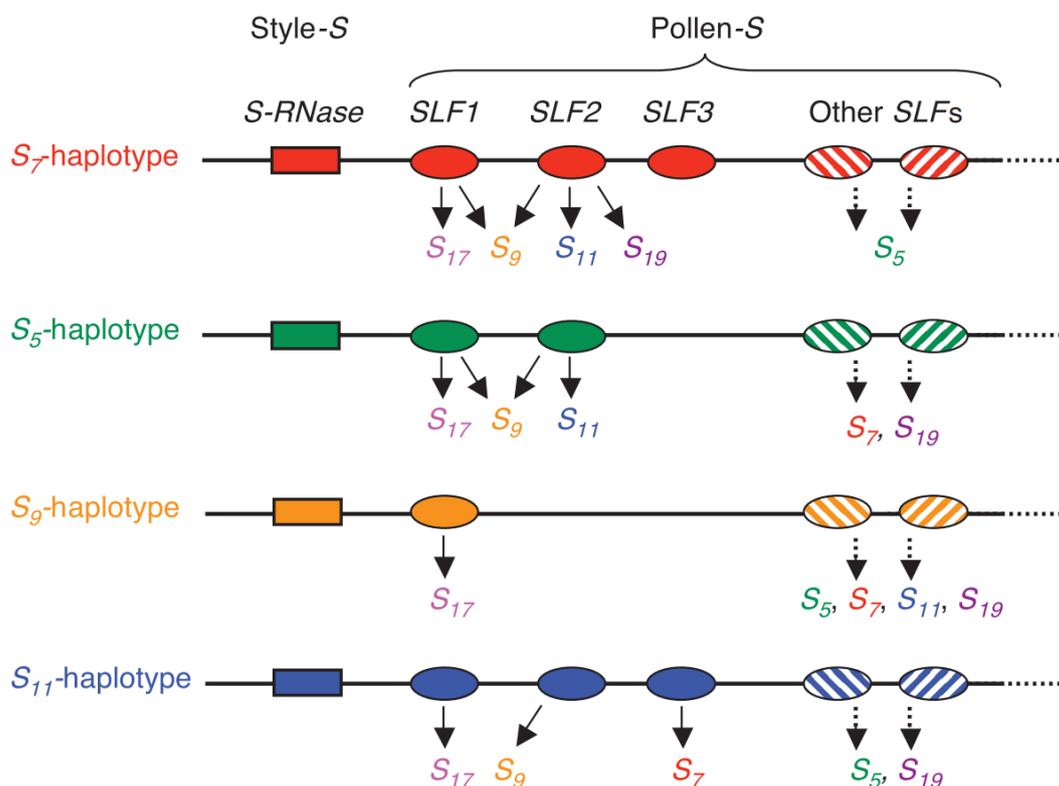


Рис. 12.11. Модель множественных SLF/SFB

Дополнительная защита от S-РНКаз – компонент убиквитинлигазного комплекса **SKP1-like protein (SSK1)**, а также **S-ribonuclease binding protein (SBP)** с аллельными формами. Также выявлены белки рыльца, без которых самонесовместимость не проявляется. TTS, 120K и PELPIII специфично связываются с S-РНКазой. **High Top-Band (HT-B)** важен для накопления S-РНКаз в вакуолях (рис. 12.12).

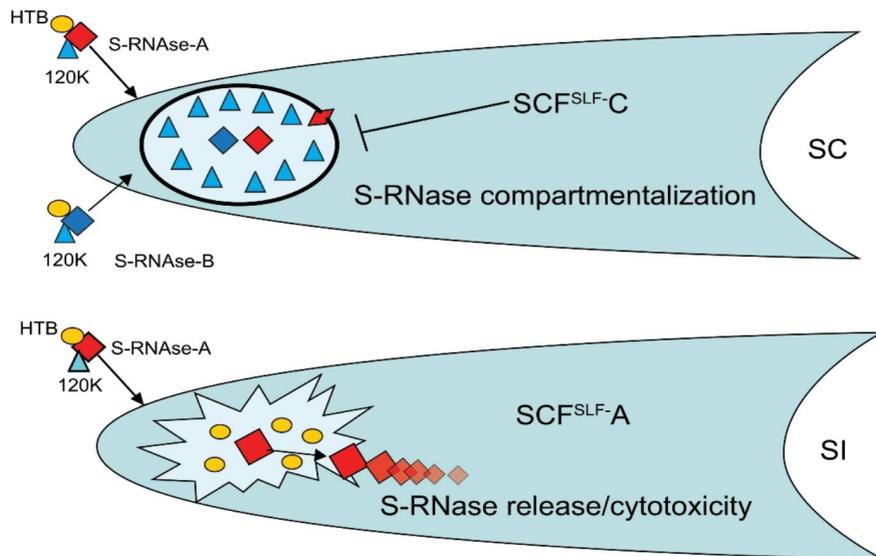


Рис. 12.12. Влияние HTB на накопление S-РНКаз в вакуолях

На рис. 12.13 показаны различные типы опыления, при которых столбик и пыльца экспрессируют разные гаплотипы в S-локусе. Полное совпадение (при самоопылении) приводит к полной самонесовместимости. Отсутствие совпадения приводит к полной совместимости. Если один из аллелей совпадает, а второй нет, то наблюдается частичная совместимость. В этом случае прорастают только “подходящие” пыльцевые трубки.

У тетраплоидных растений из-за перекрёстного уничтожения РНК-азы наблюдается самосовместимость, диплоидная пыльца прорастает. Это объясняет, почему многие культурные растения, являющиеся полиплоидами (в том числе табак), от самонесовместимости перешли к самосовместимости



Рис. 12.13. Генетическая основа гаметофитной самонесовместимости

У мака (*Papaver rhoeas*) столбика практически нет, механизм самонесовместимости реализуется путём изменения работы актинового цитоскелета и программируемой клеточной гибели (рис. 12.14).

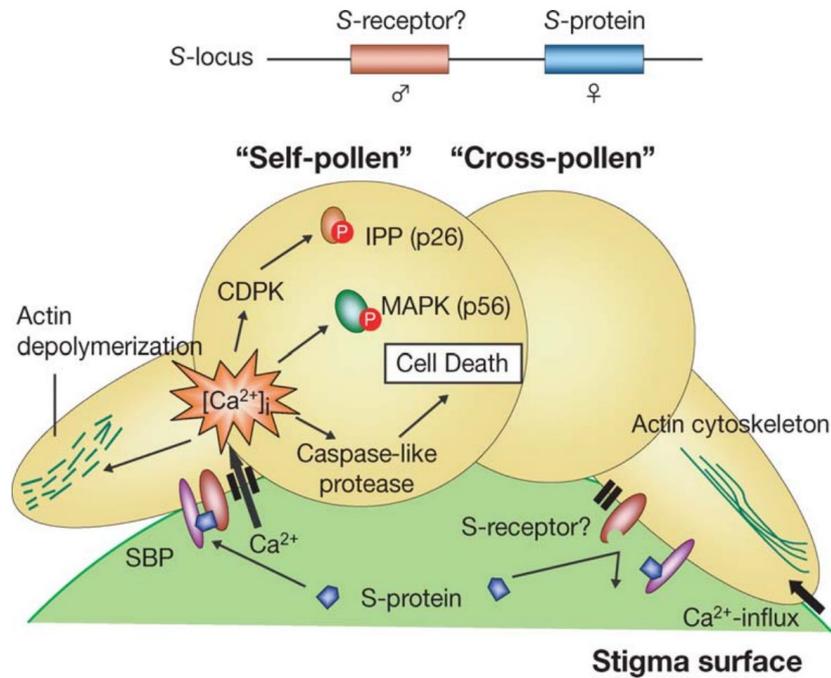


Рис. 12.14. Молекулярная модель самонесовместимости у *Papaveraceae*

Для многих злаков характерна двухлокусная система контроля (S + Z). В данном случае прорастает та пыльца, в которой хотя бы один из локусов отличается (рис. 12.15). Большинство генов с неизвестной функцией, есть гены с экспрессией в рыльцах/пыльце.

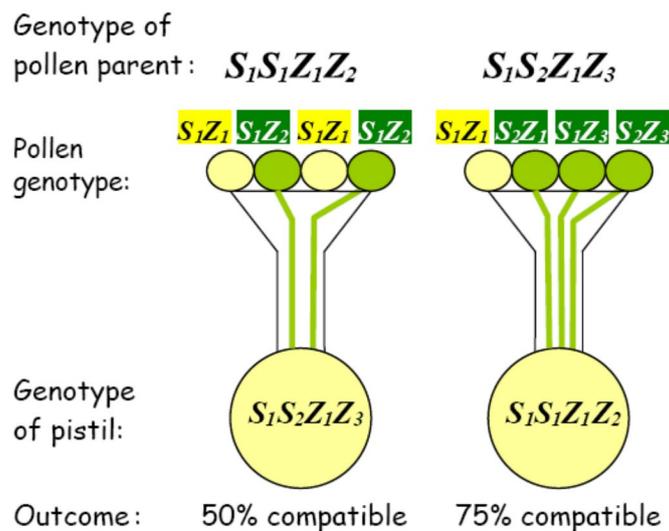


Рис. 12.15. Механизм самонесовместимости у злаков

Семязачаточная самонесовместимость

Пыльцевая трубка хорошо прорастает до семязачатка, а далее происходит арест, слияние ядер яйцеклетки и спермия не происходит. То есть контроль на уровне достижения семязачатка, что достаточно сложно исследовать. У какао очень сложная система, при опылении:

1. Уровень этилена не зависит от происхождения пыльцы
2. Уровень АБК повышается при иллегитимном опылении
3. Уровень ИУК повышается при легитимном опылении

Для какао характерна двухлокусная система контроля (CH_2+CH_4) и сложная система доминирования аллелей на 4 хромосоме. Дополнительно за самонесовместимость отвечает и 1 хромосома.

Существует также постзиготическая/криптическая самонесовместимость (после оплодотворения), когда происходит абортывание зародыша. Такие механизмы самоопыления реализуются в конце периода цветения, когда шансы на перекрёстное самоопыление исчерпаны.

Преодоление самонесовместимости

Самонесовместимость – серьёзная сельскохозяйственная проблема. Существует несколько вариантов её преодоления:

1. Опыление бутона (Bud pollination)
2. Метод пыльцы-ментора (Mentor pollen): смесь пыльцы (совместимая пыльца + своя пыльца). Можно предварительно совместимую пыльцу обработать γ -радиацией
3. Позднее опыление (Delayed pollination)
4. Хирургические методы: опыление «пенька» (Stub pollination) или удаление рыльца
5. Внесение суспензии пыльцы в завязь (Intra-ovarian pollination)
6. Оплодотворение *in vitro* (In Vitro pollination)
7. Температурный шок рыльца и столбика (Elevated temperature) $+50^{\circ}C$
8. Мутагенез S-локуса
9. Химическая обработка пестиков: циклогексимид, гексан, ГК₃, ИМК, НУК и др.
10. Слияние протопластов (Protoplast fusion). Обычно используют соматические клетки

Лекция 13. Регуляция развития плодов

Эволюционное преобразование гинцея

Модель кондупликатного плодолистика (карпеллы) – считается, что исходно семена развивались на открытом листе. В ходе эволюции с целью защитить семязачатки происходило кондупликатное сворачивание листа вдоль главной жилки и дальнейшее срастание его краёв. Таким образом плодолистик содержал рыльце (воспринимающая ткань), столбик (проводниковая ткань) и завязь с семязачатками внутри.

Генрих Август Рудольф Гризбах в 1854 г. предложил термины для описания гинцея/плода:

- **Апокарпный** – из свободных плодолистиков (карпелл). Предельный вариант, когда плодолистик один – **мономерно-апокарпный**
- **Синкарпный** – из сросшихся плодолистиков (карпелл), образующих отдельные камеры плода
- **Паракарпный** – из сросшихся плодолистиков (карпелл), образующих общую камеру плода

Армен Леонович Тахтаджян наложил эту идею на эволюционное дерево тогдашней эпохи (рис. 13.1).

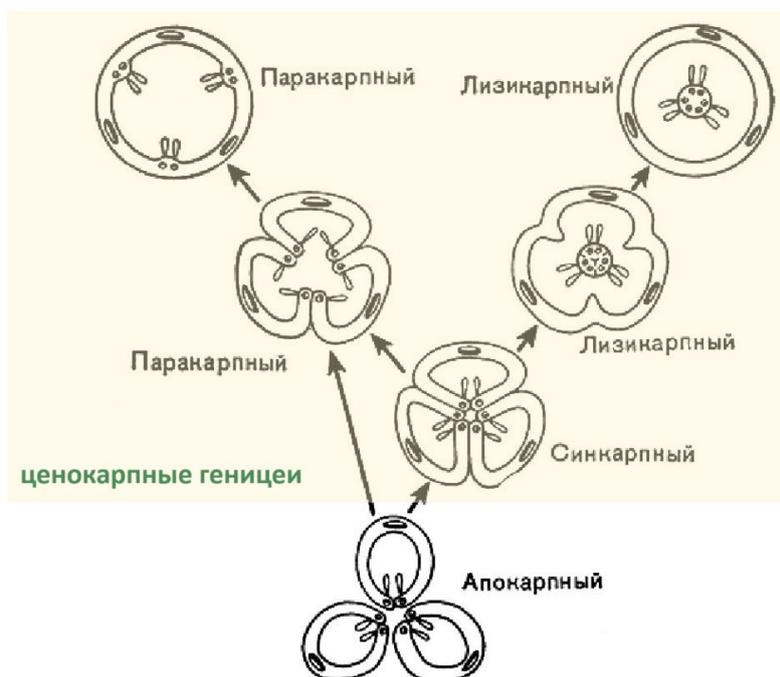


Рис. 13.1. Эволюционное преобразование гинцея

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. – модельное растение из семейства Крестоцветные (Brassicaceae, Cruciferae). Характерные плоды для Крестоцветных: стручок и стручочек. Паракарпный плод из двух плодолистиков, перегородка ложная.

Эволюция плодов:

коробочка (сем. Маковые, Мачёк жёлтый, Эшшольция калифорнийская) – длинная, состоит из двух частей, вскрывается двумя швами

(сем. Маковые, Чистотел большой) – при разрыве отделительного слоя две створки удаляются, остаются семена на рамке

стручок – плод сравнительно узкий и длинный, с ложной перегородкой между рамками.

стручочек – длина и ширина сопоставимы (уплощение вдоль рамки или наоборот резкое сжатие рамки и выросты на створках)

Развитие и доменная структура геницея

Начиная со стадии 7 возникает кольцевой валик геницея. На стадии 8 и 9 продолжается рост (неравномерный) в виде цилиндра. На стадии 11 отверстие зарастивается, появляется будущая рыльцевая ткань. На стадии 12 – зрелая рыльцевая ткань, целиком замкнутый геницей, характерный для покрытосеменных. Плодолистики срастаются конгенетально, при закладке не видно границ между ними.

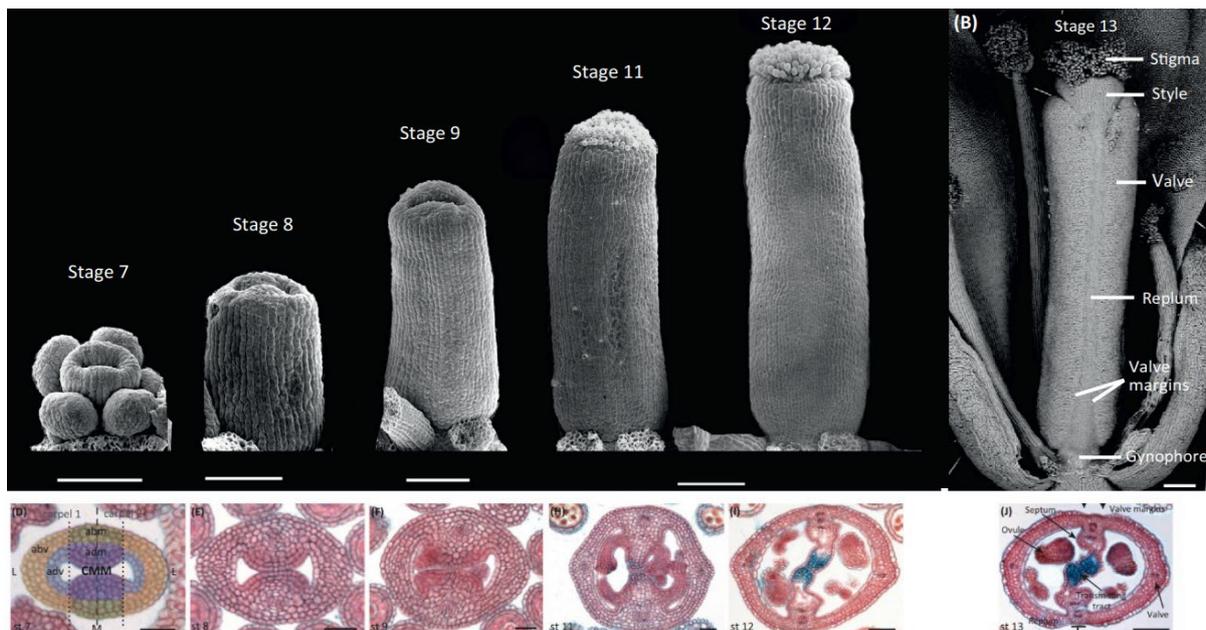


Рис. 13.2. Развитие геницея у *Arabidopsis thaliana*

На стадии 13 – сформированный геницей, имеющий сложную доменную структуру (рис. 13.2):

- верхний (апикальный) домен – у арабидопсиса стерилен, состоит из короткого столбика, рыльцевой и проводниковой ткани
- средний домен – две створки, прилегающие к рамке с септой (перегородкой) внутри. Между рамкой и створками есть шов, по которому вскрывается плод
- нижний (базальный) домен – гинофор

Три направления дифференцировки доменов (рис. 13.3):

1. латеральный/медиальный домен
2. абаксиальный/адаксиальный домен
3. базальный/центральный/апикальный домен

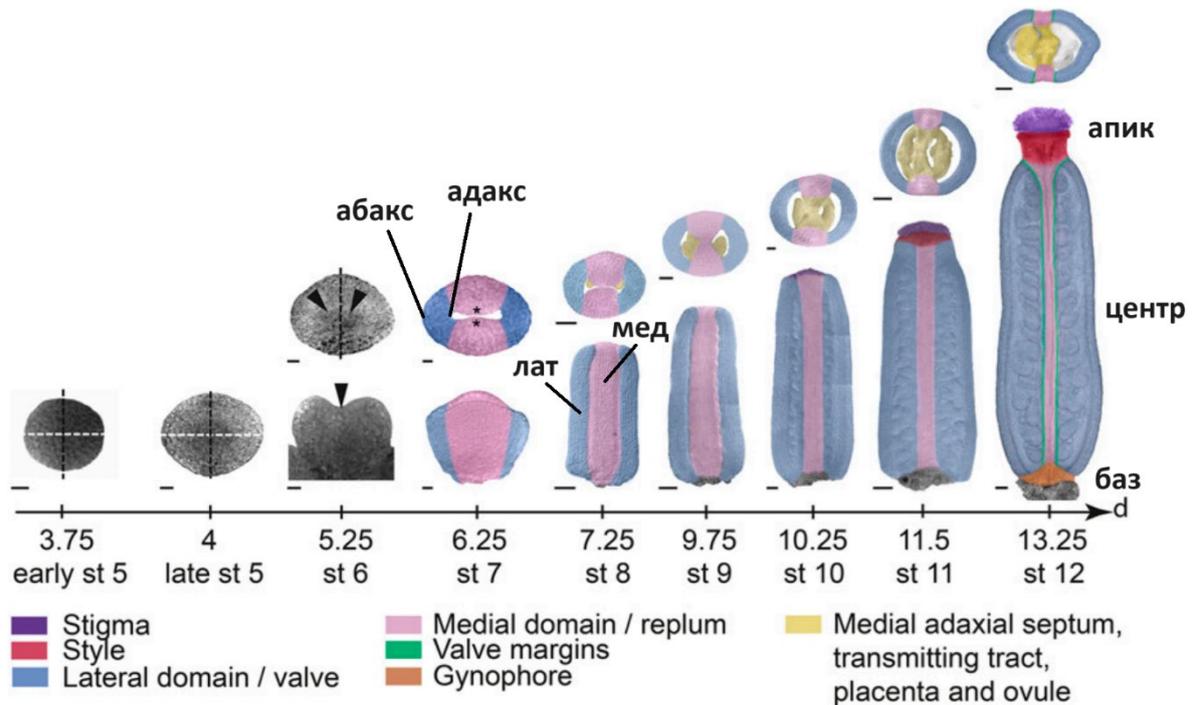


Рис. 13.3. Развитие и доменная структура геницы у арабидопсиса

Гормональная регуляция. Транскриптомика

Для того, чтобы сформировать разные домены и типы ткани, по ходу развития происходит переключение порядка 260 генов.

Проводящая система контролируется потоками ауксинов (рис. 13.4).

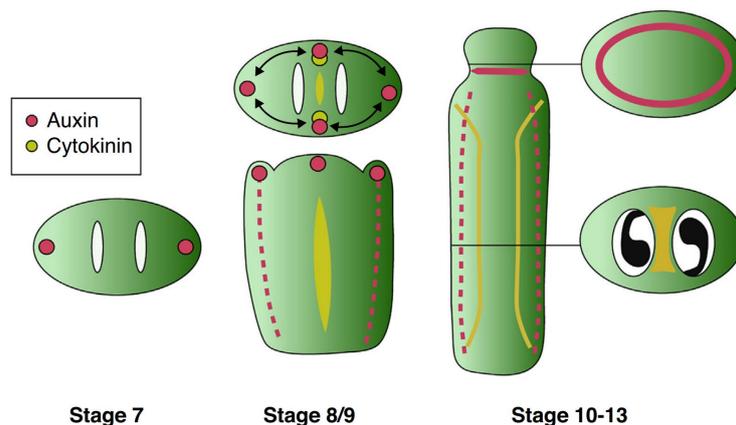


Рис. 13.4. Распределение ауксина и цитокинина на разных этапах развития геницы

Необходимо включить гены идентичности геницея. **ABCDE-система:** AGAMOUS+SEP3 (MADS-box family, квартет: классы C & E) APETALA2 (AP2/EREBP-family: класс A). **Управление морфогенезом листа:** факторы транскрипции Homeodomain leucine zipper (HD-ZIPIII): PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV) – адаксиальное развитие. Вправе ожидать: miRNA.

Базальный, центральный и апикальный домен

Определение границ доменов: регуляция ауксином – ETTIN (ETT) = ARF3 вместе с ARF4. Уменьшается центральный домен, увеличивается базальный домен, менее четкие границы между доменами (рис. 13.5-13.6).

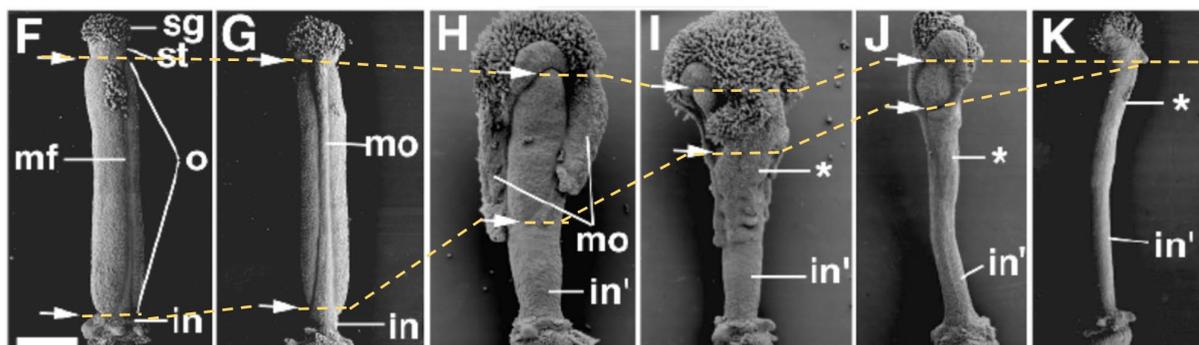


Рис. 13.5. Увеличение степени проявления мутации *ett*

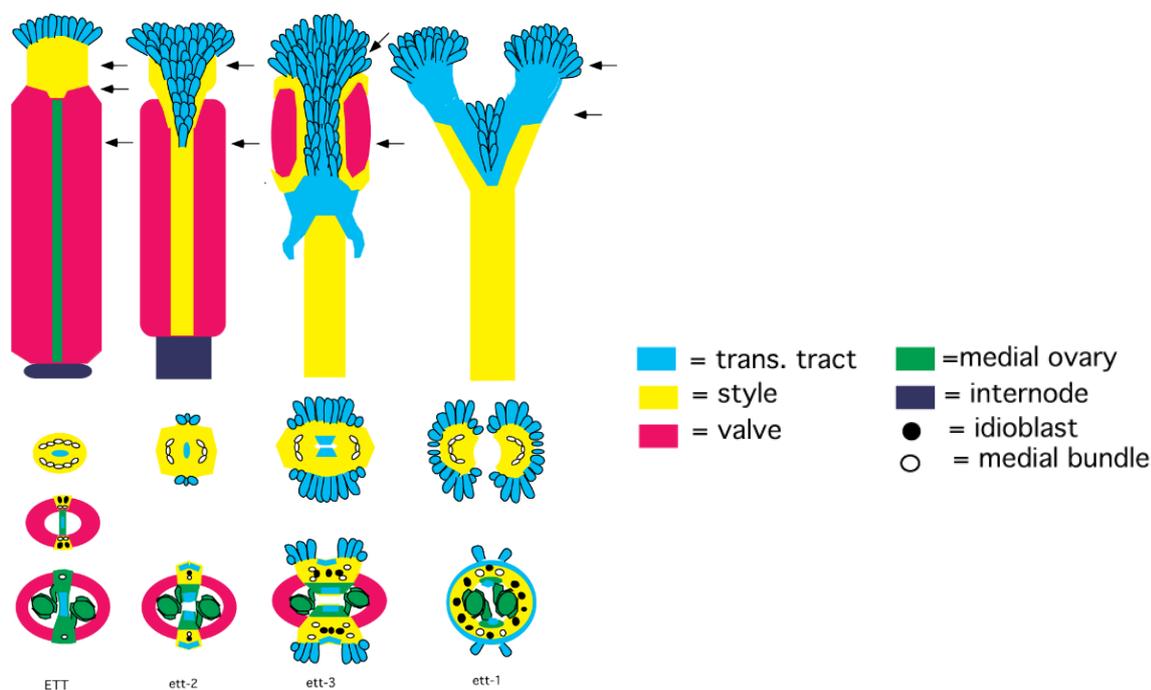


Рис. 13.6. Распределение тканей различных типов у серии мутантов *ett*

У двойных мутантов *ett tsl (tousled)* карпеллы не могут срастись, плаценты голые, но закладываются семязачатки.

Контроль апикального домена – развитие рыльца и проводниковой ткани.
Факторы транскрипции bHLH-family:

SPATULA (SPT) (в начале развития). Мутанты *spt* частично фертильны.

HECATE (HEC1, HEC2, HEC3) (позже в развитии). Негативно контролируются через ETTIN (ARF3). Мутанты *hec1* и *hec3* на фоне *HEC2-RNAi* полностью стерильны

Могут образовывать гетеродимеры. Экспрессия *HEC* не зависит от *SPT*.

У мутантов *hec* наблюдается уменьшение проводниковой ткани / скорости роста пыльцевых трубок. При гиперэкспрессии *35S:HEC* наблюдается увеличение рыльцевой ткани (как у *ettin*).

HALF FILLED (HAF) – программированная клеточная гибель в проводниковой ткани. Положительно регулируется ARF6 и 8.

Брассиностероидный контроль фертильности **BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION 1 и 3 (BEE1, BEE3)**

Экспрессия в проводниковой ткани. В регуляции: позже *SPT* и *HEC*.

Рост пыльцевых трубок у тройного мутанта *haf bee1 bee3* ниже, чем в контроле, а при гиперэкспрессии *AtML>>HAF* – выше.

Фактор транскрипции *Zn-finger family*:

NO TRANSMITTING TRACT (NTT) – мутант *ntt* не формирует проводниковой ткани. Влияет на экспрессию *BREVIPEDICELLUS*. Также увеличивается медианный домен (*replum*).

Таким образом, при развитии центрального и апикального домена происходит многоуровневая регуляция. Один из первых уровней – регуляция ауксином, который действует на свои факторы ответа (*ARF 3* и *4*). Они являются негативными регуляторами факторами генов *SPT* и *HEC*, которые отвечают за развитие апикального домена. Это позволяет установить границы между апикальным и центральным доменом. Далее эти гены включают факторы транскрипции *BEE* и *HAF*, которые в дальнейшем будут участвовать в программируемой клеточной гибели и продукции внеклеточного матрикса. Также к регуляции подключаются брассиностероиды, факторы *NTT* и *BP* (контроль пролиферации клеток).

В апикальном домене на последнем этапе очень важно сделать срастание геницея. У мутантов **CRAB CLAW (CRC)** (фактор транскрипции *HD-Zip III*, *YABBY family*) и **SPATULA (SPT)** (фактор транскрипции *bHLH family*) нарушено срастание карпелл. У двойного мутанта срастание нарушается уже на более ранних этапах. Эти гены контролируются и взаимодействуют с *ABCDE*-системой. Нарушается радиальный рост карпелл, при этом продольный рост сохраняется.

Факторы транскрипции *AP2-family*:

AINTEGUMENTA (ANT) – контроль развития листа и семязачатка.

APETALA 2 (AP2) – ген класса *A*, контроль развития чашелистиков и лепестков

Транскрипционные репрессоры **LEUNIG (LUG) + SEUSS (SEU)**: кадастральные гены, ограничивают активность *AP2* в центре цветка.

Медианный и латеральный домен

У мутантов *ap2* увеличен регион рамки, усилена лигнификация створки.

Контроль медианного домена: факторы транскрипции WUSCHEL-related homeobox family – WOX13. При гиперэкспрессии WOX13 увеличен регион рамки (*replum*). Предполагают участие WOX13 в позиционном сигналинге вдоль медио-латеральной оси.

Короткие пептиды CLE специфично экспрессируются в определённых частях геницы.

Идентичность створки (*valve*): фактор транскрипции MADS-box **FRUITFUL / AGAMOUS- LIKE 8** (FUL / AGL8) Негативный контроль медианного домена, развитие латерального домена.

Идентичность рамки (*replum*): факторы транскрипции с гомеодоменом

- **REPLUMLESS** (RPL) (homeodomain, BELL1-class) – контроль развития листа и семязачатка
- **BREVIPEDICELLUS** (BP/KNAT1) (homeodomain, KNOX I-class)
- **WUSCHEL-LIKE HOMEOBOX 13** (WOX13) Ancient clade

«Невскрывающийся» фенотип (*indehiscent*) может вызываться различными анатомическими причинами:

- Формирование лигнифицированного и отделительного слоя (**INDEHISCENT** (IND) – фактор транскрипции bHLH- family)
- Отграничение медиального и латерального доменов (створки и рамки) **SHATTERPROOF 1 и 2** (SHP1, SHP2), MADS-box, AGL, у некоторых таксонов выполняет функции класса C (ABCDE-система)

Таким образом, на границе между створками и рамкой наблюдается сложная взаимная регуляция факторов транскрипции. С одной стороны, в рамке работает ген RPL, который запрещает экспрессию FUL. Аналогично FUL экспрессируется в створках, запрещая в этой зоне экспрессию RPL. Программа развития листа (FIL, YAB3, JAG) репрессируется геном RPL, но активирует экспрессию гена FUL. В зоне контакта (на границе латерального и медиального домена) экспрессируются гены SHP, они включают ген IND, который запускает сеть регуляции гиббереллинами. Гиббереллин включает ген ALC (экспрессируется исключительно в отделительном слое).

Фактор транскрипции WOX13 работает через систему SHATTERPROOF / FRUITFUL. Контроль медианного домена: WOX13 усиливает экспрессию SHP и ослабляет экспрессию FUL. Следствие: при гиперэкспрессии WOX13 увеличивается медианный домен (*Replum*).

Гормональный контроль экспрессии: ингибитор транспорта ауксина (NPA) нарушает паттерны экспрессии генов FIL, SHP2 и KNAT1.

Варианты вскрывания

Плоды у крестоцветных не всегда вскрываются. Например, стручок редиса посевного просто отламывается от растения. *Eucaria erucarioides* использует две стратегии вскрывания (рис. 13.7). Происходит отделение фертильного апикального домена, при этом проксимальный домен остаётся плотно прикреплённым к материнскому растению, которое образуется перекасти-поле, отрывается от корня и по мере перекачивания от него отламываются отдельные стручки (а точнее оставшиеся от них части). Аналогичная система вскрывания плодов наблюдается у *Sakile lanceolata*.

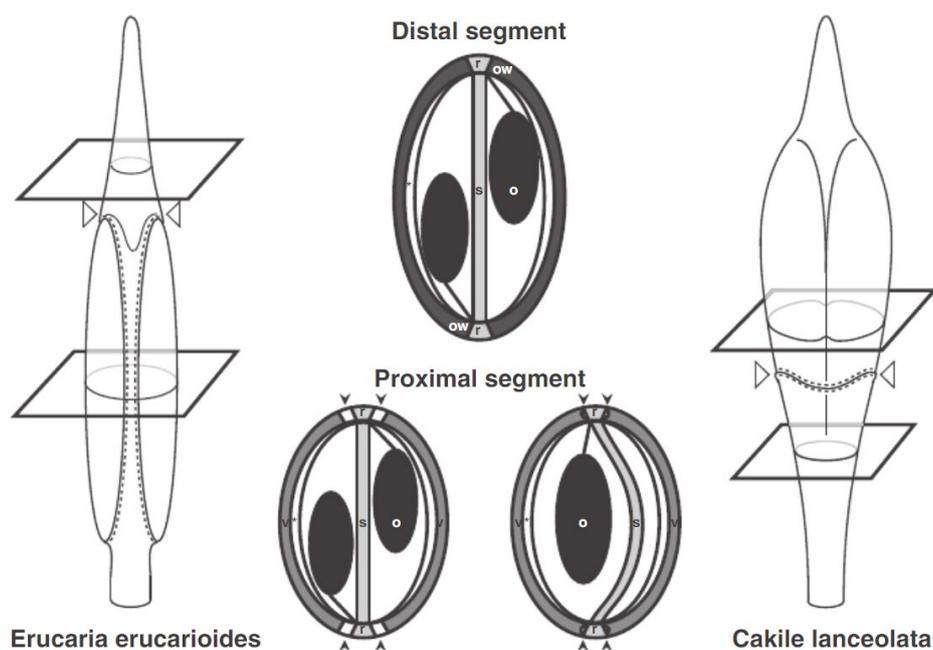


Рис. 13.7. Схема вскрывания плода у разных видов

В районе растрескивания экспрессируются гены *SHP* и *ALC*, что способствует возникновению зоны отделения в новой области. Таким образом, способ вскрытия зависит главным образом от активности генов *SHP* и *ALC*, и практически не зависит от экспрессии *FUL* и *RPL*.

Варианты вскрывания зависят от лигнификации и создания отделительного слоя, что может происходить в морфологически разных частях плода. Классический вариант вскрывания – начиная с верхушки вдоль швов, соединяющих плодолисточки. У мака вскрытие происходит только в верхней части коробочки, весь шов не трескается. Плод мальвы растрескивается по местам перегородок, вычленяются односемянные части геницея. У представителей колокольчиков вскрывание коробочки происходит у её основания.

Абаксиальный и адаксиальный домен

Факторы транскрипции PHB, PHV, REV контролируют верхнюю (адаксиальную) программу развития листа (и, следовательно, плодолистиков). Факторы ARF, YABBY, KANADI контролируют нижнюю (абаксиальную) часть. Граница определяется генами класса WOX.

Абаксиально-адаксиальная дифференцировка очень важна для сочных плодов. Самая наружная (абаксиальная) ткань – экзокарп (эпидермис), служит для привлечения, выделяет пахучие вещества. Мезокарп формирует мякоть плода. Каменистый, сильно лигнифицированный эндокарп защищает семена от переваривания. У бобовых в абаксиально-адаксиальном направлении выделяют до 5и слоёв.

SHATTERPROOF и SEEDSTIC (STK) – запускают экспрессию NST1

SHATTERPROOF + SEEDSTICK – идентичность эндокарпа

FRUITFUL – идентичность мезокарпа + экзокарпа

Роль ALCATRAZ и INDEHISCENT в развитии костянки пока не выяснена

NO SECONDARY WALL THICKENING запускает лигнификацию



Рис. 13.8. Гены, регулирующие абаксиально-адаксиальную дифференцировку

На достаточно ранних этапах развития растение должно выбрать: включать гены, ответственные за лигнификацию, утолщение клеточной стенки и формирование эндокарпа (рис. 13.9, зелёным), или идти по пути биосинтеза антоцианов и флавоноидов, характерных для ткани экзокарпа и мезокарпа (рис. 13.9, красным).

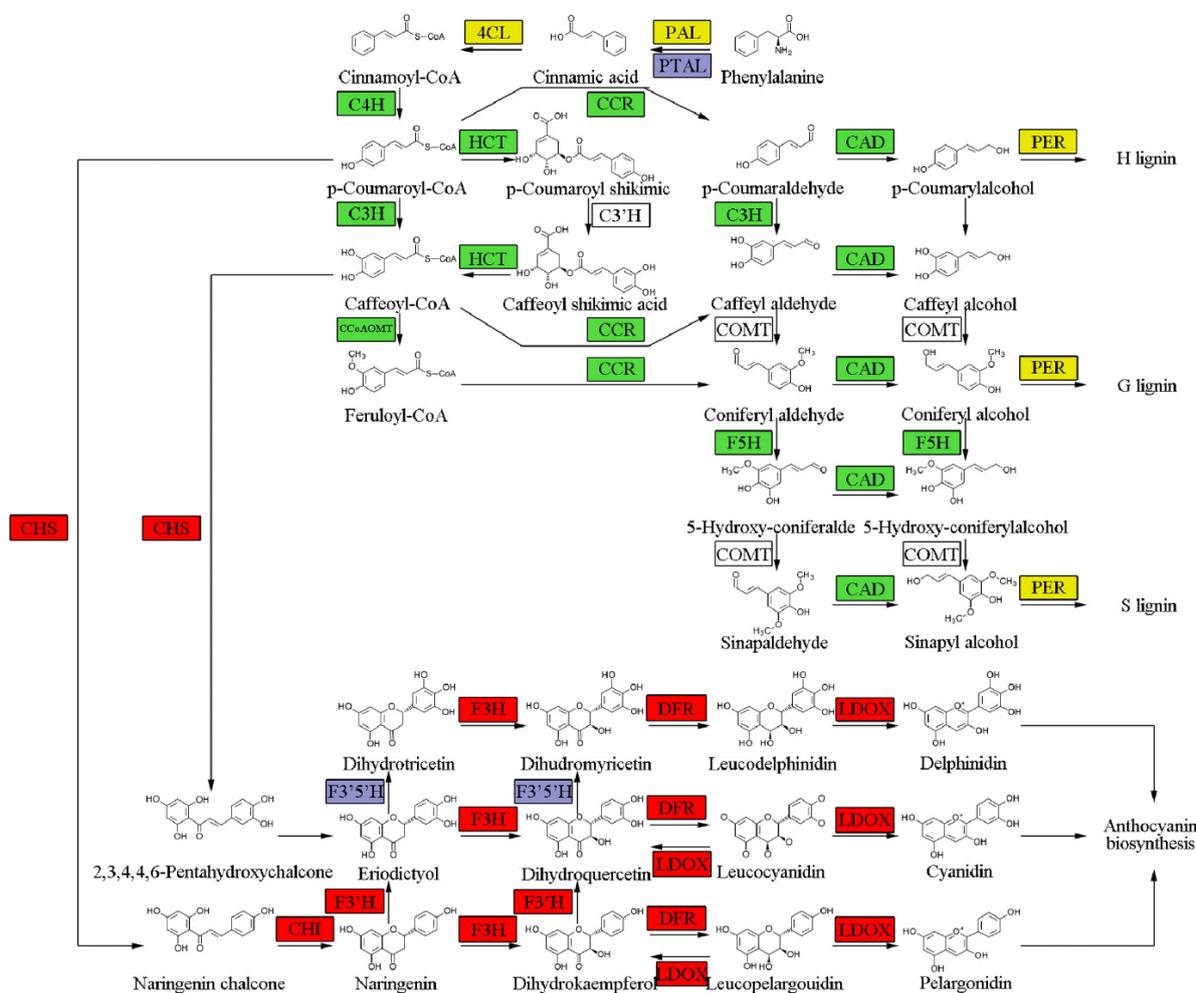


Рис. 13.9. Гены биосинтеза лигнина и флавоноидов

Семязачаток: классификация, доменная структура и развитие

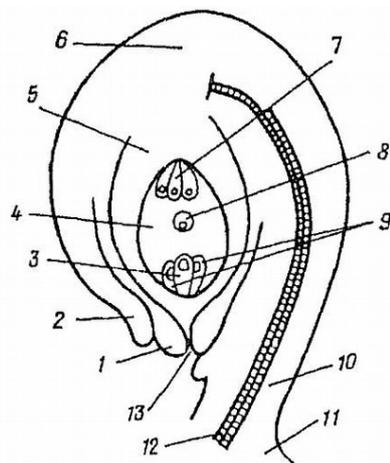
400 млн лет назад возникают первые семенные растения – семенные папоротники (*Pteridospermae*).

На рис. 13.10 представлено строение типичного семязачатка двудольного растения. Семязачатки у цветковых растений отличаются по степени изогнутости: ортотропный (рис. 13.11 А), анатропный (рис. 13.11 В) и кампилотропный (рис. 13.11 С).

По числу интегументов различают:

- битегмический (два интегумента) – у большинства базальных двудольных, у однодольных, у клалды Rosids

- унитегмический (один интегумент) – у базальных групп (потеря внешнего интегумента), у Asterids, у Impatiens (отдельные виды, «гибридизация» программ развития)
- атегмический (нет интегументов) – у микотрофных Santalales, у Gentianaceae (нет дифференцировки на интегументы и нуцеллус)



Строение семязачатка:

1, 2 — внутренний и наружный интегументы; 3 — яйцеклетка; 4 — зародышевый мешок; 5 — нуцеллус; 6 — халаза; 7 — антиподы; 8 — вторичное ядро; 9 — синергиды; 10 — фуникулус; 11 — плацента; 12 — проводящий пучок; 13 — пылцевход (микропиле)

Рис. 13.10. Семязачаток двудольного растения

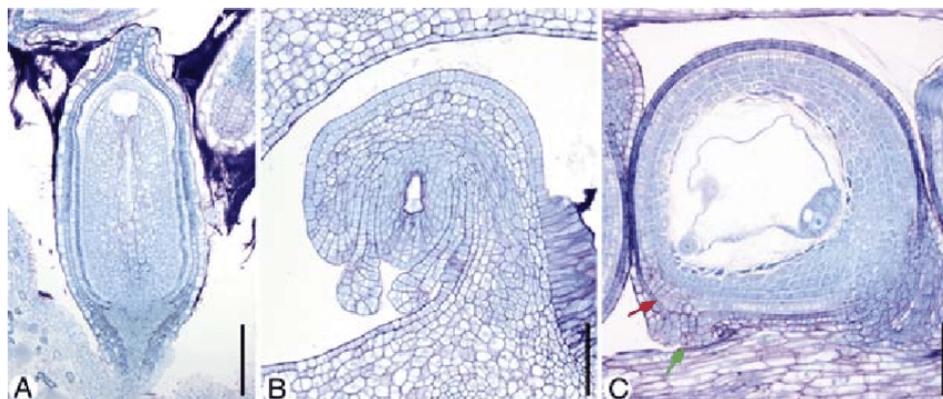


Рис. 13.11. Разновидности семязачатков по степени изогнутости

Развитие семязачатка у арабидопсиса:

- закладка примордиев
- радиально-симметричный рост
- радиально-симметричный примордий внутреннего интегумента
- полулунный примордий внешнего интегумента

- анизотропный рост
- зрелый семязачаток

MADS-гены, участвующие в закладке примордиев семязачатков: *AGAMOUS*, *SHATTERPROOF1*, *SHATTERPROOF2*.

Для одиночных мутантов *ag*, *shp1* и *shp2* не выявлено аномалий в развитии семязачатков. Отличается лишь числом семязачатков в стручке

AGAMOUS-LIKE11 = SEEDSTICK (STK)

Для мутантов *stk* показано увеличение фуникулуса, не могут образовать отделительную зону и, как следствие, семена не опадают.

Направления дифференцировки доменов (рис. 13.12):

Для семязачатка в целом:

1. Проксимальный / дистальный домен
 - Фуникулус (F)
 - Халаза (C)
 - Нуцеллус (N)
2. Абаксиальный (гинобазальный) / адаксиальный (гиноапикальный) домен

Для каждого интегумента:

3. Адаксиальный / абаксиальный

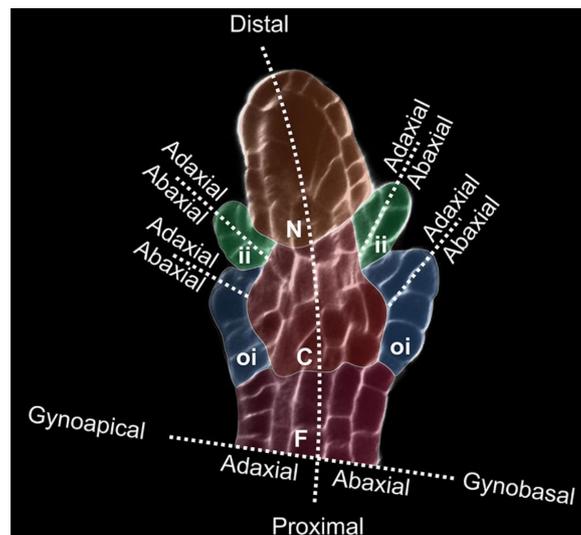


Рис. 13.12. Доменная структура семязачатка

Развитие семязачатка (рис. 13.13):

Нуцеллярный домен:

- нуцеллус → перисперм
- археспориальная клетка → мегаспора → зародышевый мешок

Халазальный домен:

- внутренний интегумент (двухслойный)
- наружный интегумент (двух- многослойный)

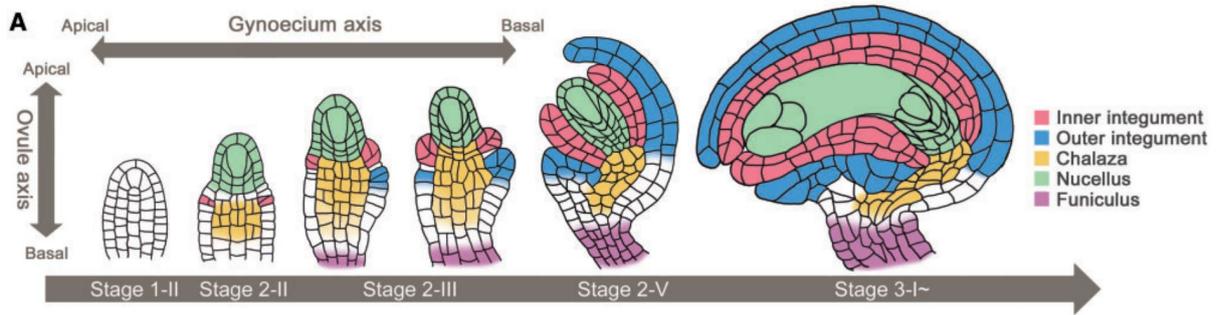


Рис. 13.13. Стадии развития семязачатка

Гормональный контроль (рис. 13.14):

- Ауксин участвует в разметке семязачатков
- Гены CUC1 и CUC2 отвечают за границы семязачатка
- Контроль ARF (MONOPTEROS)
- Пролиферация зависит от цитокинина
- Ген ANT регулируется brassinosterоидами и ауксинами
- CUC используются повторно для отграничения примордиев интегументов

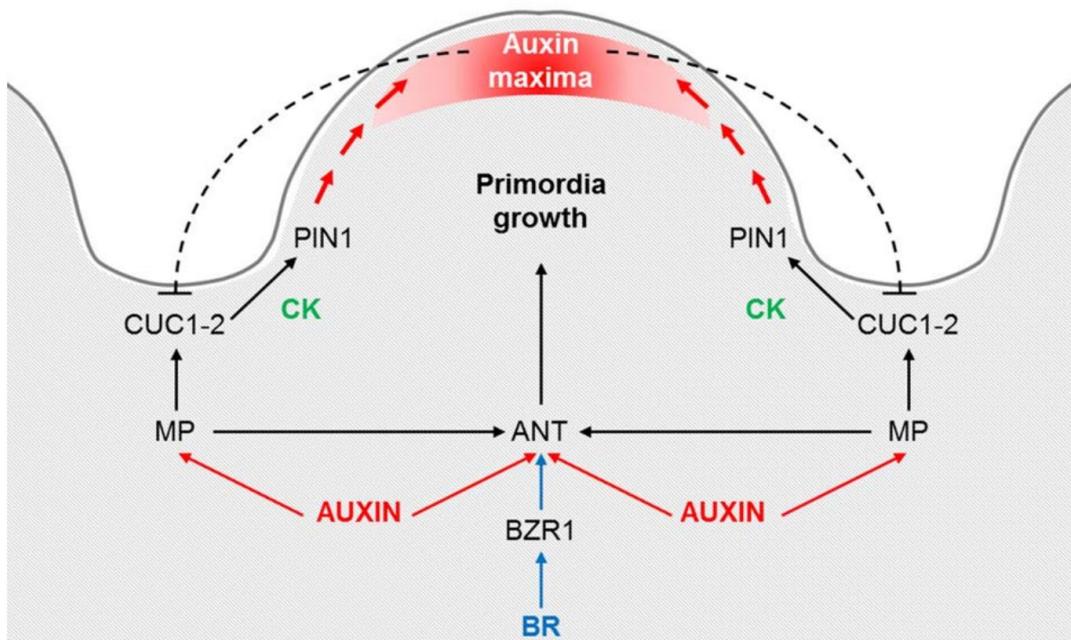


Рис. 13.14. Модель гормонального контроля развития семязачатка

Мутанты развития семязачатка (рис. 13.15):

- *SPOROCYTELESS = NOZZLE (SPL = NZZ)*. Белок взаимодействует с фактором транскрипции INO (YABBY-family) и корепрессорами TOPLESS / TOPLESS-RELATED (TPL / TPR). Контролирует спорогенез (как в семязачатках, так и в пыльниках). Дополнительно: индукция развития интегументов. У мутантов *spl/nzz* вместо

зародышевого мешка – не поделившаяся археспориальная клетка. Мутанты *spl/nzz* и *tpl* похожи по фенотипу. Много абортированных семязачтков.

- *WUSEL (WUS)* – фактор транскрипции *WOX-family*. Контроль *SPL/NZZ*. Экспрессируется на самых ранних стадиях в нуцеллярном домене семязачтка. У мутантов *wus* (на фоне *CLV1::WUS*) нарушен мегагаметогенез. У мутантов *wus* нет нуцеллярного/халазального домена. *WUS* подвижен, влияет на развитие интегументов в районе халазы. Система *CLV1, 2* и *3* не активна в семязачтках.

- *AINTEGUMENTA (ANT)* – фактор транскрипции *AP2-family*. Регулирует закладку всех аппендикулярных органов: листьев, органов цветка, интегументов. У мутантов на месте интегументов возникают нерегулярные складки, интегументы не образуются. Такие мутанты – эмбриональные летали.

- *HUELENLOSS (HLL)* – белок, входящий в состав митохондриальных рибосом. У мутантов *hll* укороченные семязачтки с недоразвитыми интегументами. Остановка развития интегументов происходит сразу после закладки. В иерархии программ регуляции *HLL* стоит ниже, чем *SPL/NZZ, WUS* и *ANT*.

- *INNER NO OUTER (INO)* – фактор транскрипции *YABBY-family*. У мутантов *ino* нет внешнего интегумента, но есть наружный. Непосредственно взаимодействует с кадастральными генами *LUG, SEU*. *INNER NO OUTER (INO)* похож на *CRABS CLAW (CRC)* – паралоги.

- *BELL 1 (BEL1)* – фактор транскрипции *Homeo Domain-family*. У мутантов *bell* в халазальном домене рост есть только в зоне внешнего интегумента. Образуются широкие выросты неправильной формы, часто лопастные.

- *SUPERNUMERARY STAMENS (SUP)* – транскрипционный репрессор с *Zn-пальцами*. Контролирует асимметричный рост интегументов. У мутантов *sup* семязачтки менее изогнуты из-за более сильного роста внутренней стороны интегументов.

- *SHORT INTEGUMENT 1 (SIN1) = SUSPENSOR 1 (SUS1) = CARPEL FACTORY (CAF) = DICER-LIKE 1 (DCL1)*. *Dicer-like protein* – фактор сайленсинга. Он связывается с двуцепочечной РНК и лизирует её до 20-нуклеотидных фрагментов.

- *SHORT INTEGUMENT 2 (SIN2)* – *DAR-GTP*аза митохондрий. У мутантов *sin2* укорочены оба интегумента.

- *ABERRANT TESTA SHAPE (ATS)* – фактор транскрипции *KANADY-family*. У мутантов *ats* оба интегумента конгенетально срastaются, аномальная семенная кожа. Непосредственно взаимодействует с *ETTIN/ARF3*.

- *UNICORN (UCN)* – протеинкиназа *AGC VIII-family*. У мутантов *unc* нарушается гладкий рост, возникают выросты (не только на семязачтках, но и на других органах цветка). Непосредственно взаимодействует с белком *ATS* (*KANADI*-фактор транскрипции), снижает его активность.

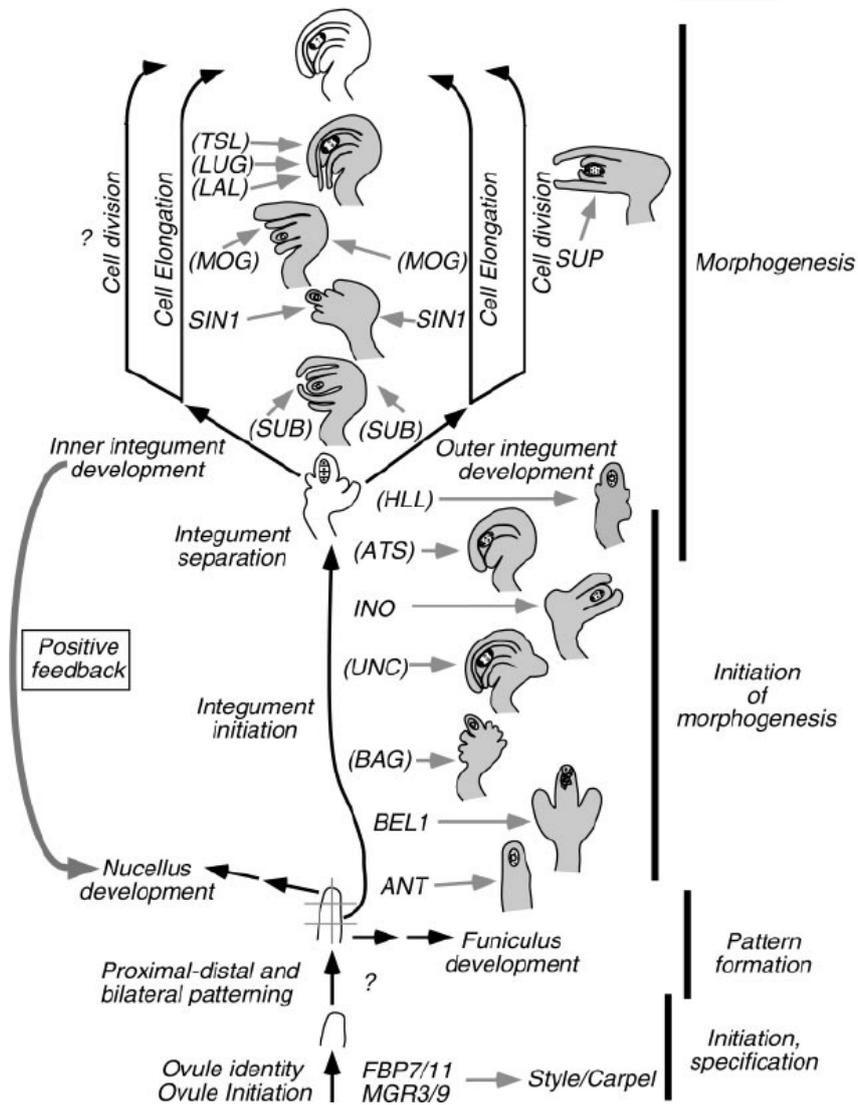


Рис. 13.15. Комплексная модель генетической регуляции развития семязачатки



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

