

УДК 66.047

СОВМЕСТНАЯ ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ХРИЗАНТЕМЫ CDM86, CDM115 И CDM37 ИЗМЕНЯЕТ ИДЕНТИЧНОСТЬ ВСЕХ ОРГАНОВ ЦВЕТКА И СНИЖАЕТ ФЕРТИЛЬНОСТЬ ТАБАКА**А.В. Нежданова^{1,2}, А.М. Камионская¹, А.В. Щенникова¹**¹ Институт Биотехнологии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Переход растения к репродуктивной стадии развития происходит под влиянием как автономного генетического пути, так и сигналов окружающей среды (Fornara et al., 2010). Апикальная меристема побега становится меристемой соцветия, отдельная группа клеток которой дифференцируется в цветковую меристему, каждая клетка которой становится впоследствии частью одного из органов цветка (Krizek, Fletcher, 2005). Молекулярно-генетические механизмы, с помощью которых клетки устанавливают свои позиции и дифференцируются, являются объектом исследования уже несколько десятилетий (Coen, Meyerowitz, 1991; Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2016). Одними из ключевых регуляторов данных процессов являются MADS-доменные факторы транскрипции (Parenikova et al., 2003; Smaczniak et al., 2012). Помимо определения идентичности органов цветка, MADS-box гены участвуют в инициации цветения, развитии плодов и семян, ответе на стрессы, а также во многих других жизненно важных процессах (Fornara et al., 2010; Barah et al., 2013; Dong et al., 2014). Изменение активности MADS-box генов приводит к гомеозисным мутациям в цветке, что говорит об участии данных генов в эволюции и диверсификации царства растений (Coen, Meyerowitz, 1991; Theißen et al., 2016). Многочисленные данные послужили созданию модели развития цветка ABCDE. Согласно модели, идентичность чашелистиков определяется MADS-box генами активностей A + E, лепестков – A + B + E, тычинок – B + C + E, плодолистиков – C + E, и семязачатков – C + D + E (Theißen et al., 2016).

Ключевое участие MADS-box генов в различных аспектах онтогенеза растения делает их все более популярным объектом внутри- и межвидовых исследований, как для фундаментальной науки, так и для научно обоснованной биотехнологии агрокультур. Настоящая работа сфокусирована на функциональном анализе MADS-box генов одного из самых распространенных видов декоративных растений – хризантемы *Chrysanthemum morifolium* сорт Parliament.

Обширные межвидовые исследования MADS-box генов продемонстрировали, что структурная гомология генов сопровождается функциональным сходством кодируемых ими белков (Smaczniak et al., 2012; Dong et al., 2014). Консервативность основ онтогенеза высших растений позволяет предсказывать функции еще не охарактеризованных MADS-box генов, в том числе на основе эффектов гетерологичной экспрессии данных генов в модельных растениях.

С целью изучения функций MADS-box генов хризантемы нами были получены трансгенные модельные растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт Samsun), которые одновременно эктопически экспрессировали три гена: В- (*CDM86* и *CDM115*) и С-активности (*CDM37*). Для этого была проведена агробактериальная трансформация *N. tabacum* тремя генетическими конструкциями, результатом которой стали три вида трансгенных растений с индивидуальной конститутивной экспрессией каждого из трех генов (Щенникова и др., 2011, 2018). Регенеранты T_0 отбирали на селективной среде с канамицином и тестировали с помощью ПЦР на присутствие трансгена в геноме. У растений поколений T_1 и T_2 определяли количество и гомо / гетерозиготность геномных вставок, а также наличие экспрессии трансгенов. Растения, имеющие одну вставку и значительный уровень транскрипции трансгена, использовали для двухэтапного скрещивания. Полученные растения были проверены (ПЦР) на присутствие в геноме каскад экспрессии *CDM37*, *CDM86* и *CDM115*. Среди потомков от скрещивания (C_0 линии 13–2–3 и 13–2–7) были выявлены растения C_1 , в геноме которых присутствовали все три гена *CDM37*, *CDM86* и *CDM115*. Данные растения сравнивали с контролем (нетрансгенный табак) с учетом: (1) периода вегетации (от высадки в теплицу до визуально определяемого соцветия); (2) высоты побега и числа листьев (на завершающей стадии формирования семенных коробочек); (3) архитектуры полностью сформированного соцветия; (4) строения цветка (антезис); (5) фертильности (количество образовавшихся при самоопылении семенных коробочек; вес семян). Полученные результаты обрабатывали с помощью методов математической статистики.

Было обнаружено, что в сравнении с контролем потомки обеих линий 13–2–3 и 13–2–7 зацветали значительно раньше, были короче и формировали меньше цветков, при этом вес семян сокращался значительно (рис. 1). Между собой растения двух линий достоверно отличались только количеством цветков и коробочек (рис. 1). Строение соцветий растений «86 x 115 x 37» не имело отклонений от нормы. Как и у контроля, соцветия состояли из терминального цветка и 2–3х терминальных соцветий. Фенотипический анализ цветка «86 x 115 x 37» обнаружил, что первый круг (чашечка) внешне напоминает венчик, лепестки второго круга приобрели признаки тычинок, тычинки укорочены, пыльники плохо открываются и производят визуально меньше пыльцы, исчезли нектарники, преобразовалась завязь пестика, но семязачатки внешне не отличаются от контроля (рис. 2). Цветки характеризовались пониженной фертильностью, и самоопыления часто не происходило.

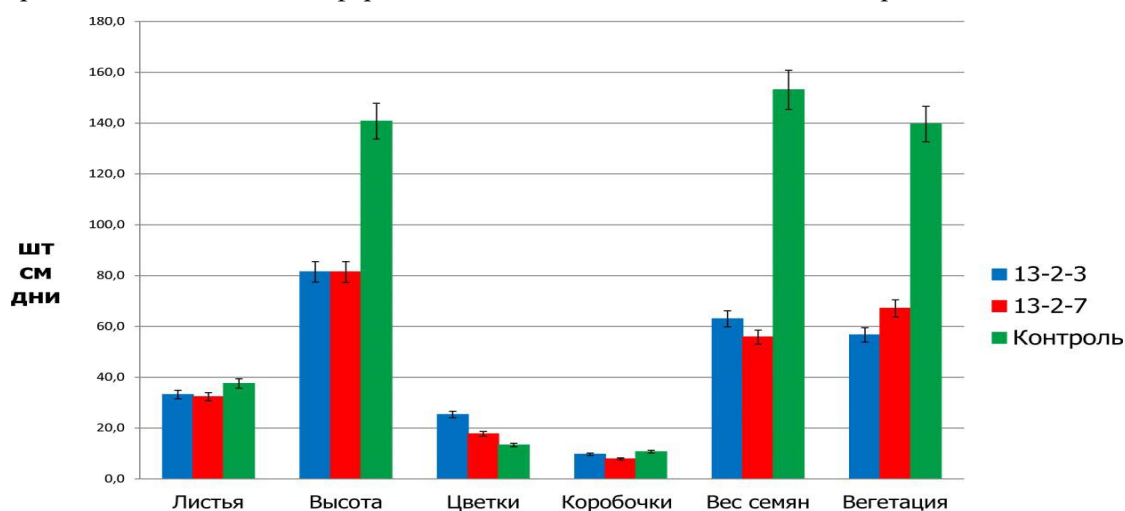


Рисунок 1. Характеристики линий трансгенных растений табака “35S:CDM37 x 35S:CDM86 x 35S:CDM115” в сравнении с контролем

На основании полученных результатов в сравнении с литературными данными мы предполагаем, что исследуемые гены не участвуют в определении архитектуры соцветия, однако при этом способны сократить период вегетации и привести к его миниатюризации растения. Гены *CDM86* и *CDM115* выполняют в хризантеме В-функцию, определяя идентичность лепестков и тычинок, а при эктопической экспрессии способны изменить количество, размер, фертильность или идентичность семязачатков. Ген *CDM37* является геном С-класса и участвует в спецификации репродуктивных органов цветка хризантемы.



Рисунок 2. Фенотип цветка трансгенных растений табака “35S:CDM37 x 35S:CDM86 x 35S:CDM115” (TP) в сравнении с контролем (WT)

В дальнейшем мы планируем провести анализ следующего поколения трансгенных растений табака с одновременной экспрессией трёх генов, определить паттерн экспрессии трансгенов и родных генов табака и, возможно, использовать их для дальнейшего скрещивания с растениями табака, экспрессирующими MADS-бок гены хризантемы других активностей.

Полученные нами данные могут быть использованы для научно обоснованной селекции сортов декоративных культур с измененным периодом вегетации и строением цветка. К примеру, выключение С-активности может привести к формированию стерильных цветков, полностью состоящих из чашелистиков и лепестков.

ЛИТЕРАТУРА

- Щенникова А.В., Шульга О.А., Сизенёва Е.С. и др. Диверсификация функциональной активности гомеозисного MADS-гена *CDM37* хризантемы // ДАН. – 2011. – Т. 436. – № 4. – С. 563–565.
- Щенникова А.В., Шульга О.А., Скрыбин К.Г. Диверсификация гомеозисных MADS-бок генов AP3-клады у астровых *Chrysanthemum morifolium* L. и *Helianthus annuus* L. // ДАН. – 2018. – Т. 483. – № 4. – С. 1–7.
- Barah P., Jayavelu N., Rasmussen S. et al. Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 722.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development // Nature. – 1991. – V. 353. – P. 31–37.
- Dong T., Chen G., Tian S. et al. A Non-Climacteric Fruit Gene CaMADS-RIN Regulates Fruit Ripening and Ethylene Biosynthesis in Climacteric Fruit // PLoS One. – 2014. – Vol.9, Iss. 4.
- Fornara F., de Montaigu A., Coupland G. SnapShot: Control of Flowering in *Arabidopsis* // Cell. – 2010. – V. 141, № 3. – P. 550.
- Krizek B.A., Fletcher J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide // Nat Rev Genet. – 2005. – Vol. 6. – P. 688–698.
- Parenicova L., Folter S. de, Kieffer M. et al. Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in *Arabidopsis*: New Openings to the MADS World // Plant Cell. – 2003. – V. 15, № 7. – P. 1538–1551.
- Smaczniak C., Immink R.G., Muiño J.M. et al. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – P. 1560–1565.
- Theißen G., Melzer R., Rümpler F. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution // Development. – 2016. – V. 143. – P. 3259–3271.