

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА  
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи

**Синюшин Андрей Андреевич**

**Изучение генетического контроля активности  
апикальных меристем у гороха посевного  
(*Pisum sativum* L.)**

Специальность 03.02.07 - генетика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
**Гостимский Сергей Александрович**

Москва, 2010

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Список использованных сокращений</b> .....	5
<b>Обозначения на осевых схемах</b> .....	6
<b>Введение</b> .....	7
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	11
1.1. Горох посевной ( <i>Pisum sativum</i> L.) как модельный объект в генетике развития растений.....	-
1.1.1. Генетический контроль развития цветка.....	12
1.1.2. Генетический контроль развития корня.....	14
1.1.3. Генетический контроль развития листа.....	15
1.1.4. Современное состояние проблемы идентификации генов у <i>Pisum sativum</i> L.....	18
1.2. Структура апикальной меристемы побега у высших растений.....	24
1.3. Генетический контроль активности апикальной меристемы побега у резуховидки Таля ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.).....	26
1.3.1. Инициация ПАМ.....	27
1.3.2. Поддержание пролиферативной активности ПАМ.....	28
1.3.3. Поддержание постоянного объема ПАМ.....	29
1.3.3.1. Негативная регуляция активности гена <i>WUSCHEL</i> .....	-
1.3.3.2. Позитивная регуляция активности гена <i>WUSCHEL</i> .....	35
1.3.4. Формирование латеральных производных.....	36
1.4. Генетический контроль активности апикальной меристемы побега у гороха ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	38
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	45
2.1. Линии, использованные в работе, и условия культивирования.....	-
2.2. Выделение ДНК.....	48
2.3. Полимеразная цепная реакция.....	49
2.4. Обработка ПЦР-фрагментов эндонуклеазами рестрикции.....	50
2.5. Фракционирование фрагментов ДНК.....	51
2.6. Изучение анатомии и микроструктуры клеток.....	-

2.7. Сканирующая электронная микроскопия.....	52
2.8. Локализация на генетической карте.....	53
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>54</b>
3.1. Негативная регуляция размеров ПАМ у гороха.....	-
3.1.1. Фенотипическая характеристика фасциированных форм.....	-
3.1.1.1. Морфология мутантов.....	-
3.1.1.2. Анатомия фасциированных мутантов.....	58
3.1.1.3. Различия в проявлении фасциации у изучаемых линий.....	60
3.1.1.4. Фасциация цветка.....	61
3.1.1.5. Продуктивность фасциированных форм.....	65
3.1.2. Тесты на аллелизм между изучаемыми линиями.....	67
3.1.3. Гибридологический анализ наследования фасциации.....	69
3.1.4. Определение положения генов на генетической карте.....	71
3.1.4.1. Локализация гена, ответственного за развитие фасциации у мутанта «Штамбовый».....	-
3.1.4.2. Локализация гена <i>NOD4</i> .....	74
3.1.4.3. Уточнение положения гена <i>FA</i> .....	-
3.1.5. Изучение меж- и внутривидового полиморфизма предполагаемых гомологов генов <i>CLV2</i> и <i>FAS2</i> .....	-
3.1.6. Участие генов, регулирующих размер ПАМ, в контроле процесса нодуляции.....	75
3.2. Сохранение недифференцированного состояния ПАМ.....	78
3.2.1. Фенотипическая характеристика мутанта <i>det</i> .....	79
3.2.2. Гибридологический анализ наследования гена <i>DET</i> .....	81
3.2.3. Определение положения гена <i>DET</i> на генетической карте.....	82
3.2.4. Взаимодействие с другими генами, контролирующими активность ПАМ.....	83
3.3. Поддержание пролиферативной активности ПАМ.....	85
3.3.1. Анализ фенотипа мутантов <i>deh</i> в сравнении с нормой.....	85
3.3.2. Гибридологический анализ наследования признака детерминантного типа роста.....	90
3.3.3. Определение положения гена <i>DEH</i> на генетической карте.....	92
3.3.4. Взаимодействие гена <i>DEH</i> с другими генами, регулирующими активность ПАМ.....	93
3.4. Регуляция активности апикальной меристемы пазушного цветоноса	97

3.4.1. Фенотипическая характеристика мутантов с нарушениями формирования пазушного цветonoса.....	-
3.4.1.1. Морфология пазушного цветonoса у различных линий.....	-
3.4.1.2. Симметрия цветка, терминирующего пазушный цветonoс.....	100
3.4.2. Возможное сочетание генетического контроля развития ПАМ и пазушного цветonoса.....	102
3.5. Взаимодействие генов, участвующих в генетическом контроле активности ПАМ у гороха.....	105
<b>Заключение.....</b>	<b>108</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>112</b>
<b>Список публикаций по результатам диссертации.....</b>	<b>113</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>116</b>

## Список использованных сокращений

ГС, LG - группа сцепления (Linkage Group)

дНТФ - дезоксинуклеозид трифосфат

Д.т. - дикий тип

ДТР - детерминантный тип роста

кДа - килодальтон

ККФ - круглый коэффициент формы

ПАМ - побеговая апикальная меристема

ПЦР - полимеразная цепная реакция

сМ - сантиморган

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ВАС - Bacterial Artificial Chromosome (бактериальная искусственная хромосома)

BSA - Bovine Serum Albumin (бычий сывороточный альбумин)

CAPS - Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности)

СТАВ - cetyltrimethylammonium bromide (цетилтриметиламмония бромид)

EDTA, ЭДТА - этилендиаминтетраацетат

ISSR - Inter Simple Sequence Repeat (межмикросателлитные фрагменты)

Kb - kilobase, тысяча пар оснований

LOD - Logarithm of Odds

NFI - Node of Flowering Initiation (узел инициации цветения)

RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA (произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК)

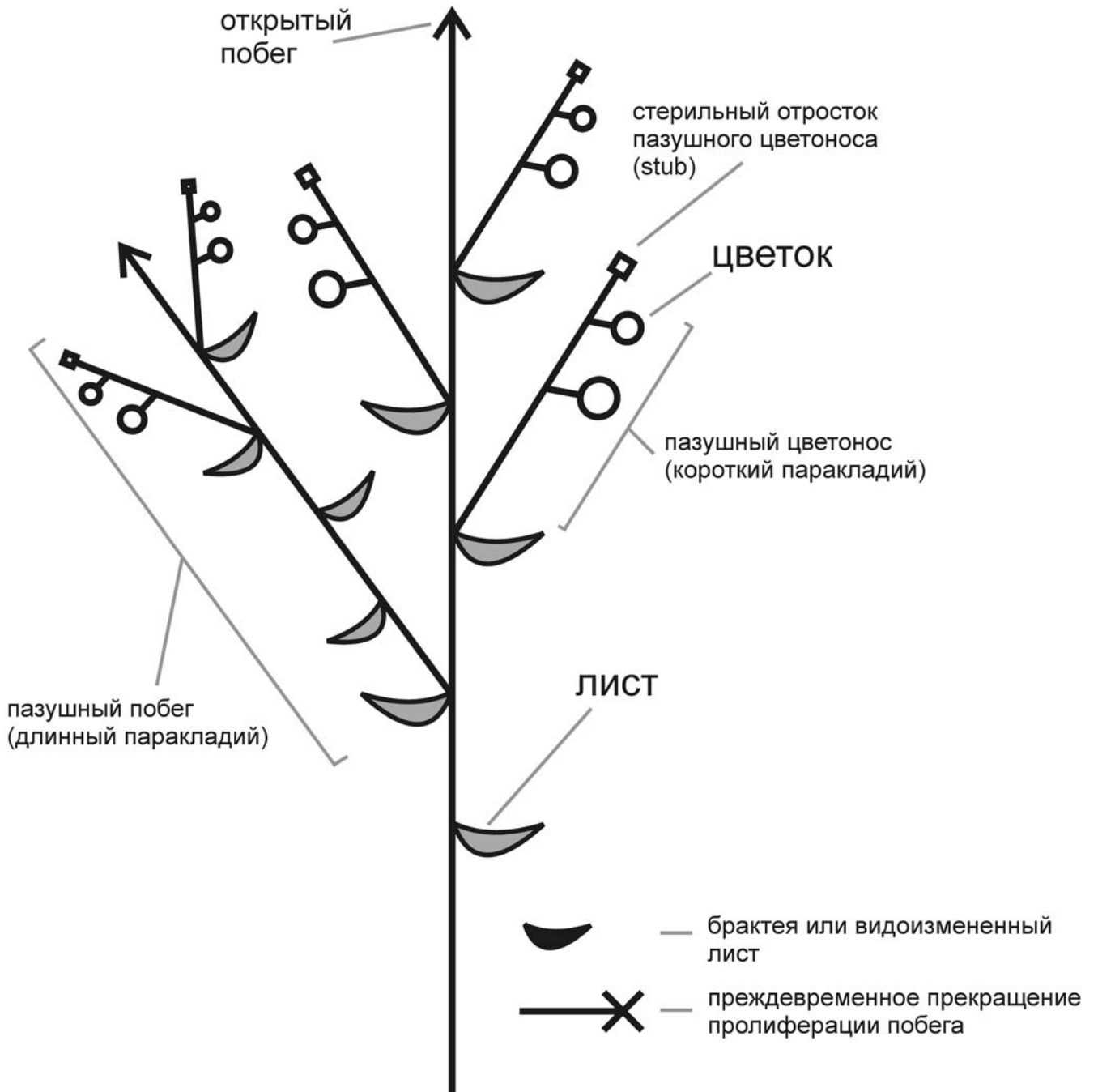
RLK - Receptor-Like Kinases (рецептор-подобные киназы)

SSR - Simple Sequence Repeats (повторы простых последовательностей)

TBE - *tris*-EDTA-borate Buffer (*трис*-ЭДТА-боратный буфер)

T<sub>m</sub> - Temperature of Melting (температура отжига)

# Обозначения на осевых схемах



## **Введение**

### **Актуальность проблемы**

Изучение разнообразия и динамики развития живых организмов показывает, что на всех уровнях организации жизни наблюдается изменение тех или иных форм и структур во времени. Применительно к таксономическому уровню этот процесс принято называть филогенезом. В отношении индивидуального организма под этой динамикой понимают индивидуальное развитие, то есть онтогенез.

В ходе жизни организма происходит образование новых и преобразование уже имеющихся форм и структур - от внутриклеточных до макроскопических. Изучение онтогенеза и, в частности, морфогенеза представляется одной из центральных задач биологии в целом. Существуют разные взгляды на роль наследственной информации в ходе этих процессов. Преобладающим в современной биологии является положение, согласно которому развитие организма является результатом реализации некоторой программы, носителем которой являются матрицы нуклеиновых кислот. Таким образом, можно говорить о наследственности и изменчивости в процессах развития, являющихся предметом изучения генетики развития.

Такая точка зрения не является единственно возможной. Так, известно авторитетное (при всей парадоксальности) мнение, что «генетические факторы при всей своей важности вовсе не содержат в себе сколько-нибудь однозначной информации о развитии» [Белоусов, 2009: 30]. Хотя это заключение было сформулировано на основании наблюдений за онтогенезом животных, в развитии растений также известны процессы, имеющие, как кажется, лишь косвенную генетическую регуляцию (например, определение положения органов цветка и филломов побега находится в зависимости от размера флоральной меристемы [Callos, Medford, 1994]). Тем не менее, роль наследственных факторов в развитии организмов не подлежит сомнению и требует детального изучения.

Изучение основных закономерностей развития тех или иных признаков целесообразно проводить с использованием модельных организмов - видов, которые по ряду причин (удобство культивирования, плодовитость, короткий жизненный цикл, наличие большого числа признаков с контрастным проявлением) удобны в экспериментальной работе. В биологии развития растений такими

моделями стали резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Brassicaceae), львиный зев (*Antirrhinum majus* L.: Scrophulariaceae) и рис (*Oryza sativa* L.: Poaceae). Очевидно, что результаты, полученные при работе с этими видами, зачастую не могут быть напрямую аппроксимированы на все покрытосеменные растения. Это связано в первую очередь с однотипным строением соцветия и листа (простые) у *A. thaliana* и *A. majus*, что затрудняет моделирование процессов морфогенеза у видов со сложным соцветием или сложным листом. Кроме того, резуховидка и львиный зев принадлежат к двум подклассам<sup>1</sup> из пяти в составе покрытосеменных (Rosidae и Asteridae соответственно), а рис относится к очень специализированному семейству; таким образом, во многом малоизученной остается значительная часть современного разнообразия покрытосеменных растений. С другой стороны, в свете концепции гомологических рядов в наследственной изменчивости [Вавилов, 1935], использование модельных объектов делает возможным распространение полученных выводов на определенное число родственных форм.

Это обстоятельство убеждает в необходимости по возможности детального исследования других, немодельных, видов, руководствуясь в первую очередь их систематическим положением (определенный интерес вызывают базальные таксоны и группы в «узлах» системы) или особенностями строения. Дополнительной стратегией может стать интеграция знаний, получаемых специалистами (генетиками, физиологами) при работе с модельными объектами, и информации, имеющейся в отношении немодельных видов, их морфологии, анатомии и др. [Volker, 1995].

Изучение изменчивости морфологических признаков и особенностей наследования тех или иных их проявлений преследует и очевидную практическую цель. Так, селекция растений традиционно вовлекает в процесс создания новых высокопродуктивных сортов и линий формы, несущие морфологические мутации. В ряде работ было убедительно показано, что закрепление в генотипе сорта некоторых морфологических мутаций не приводит к достоверному снижению продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам (например, [Яковлев, 1992]), что сделало возможным работу с измененными морфотипами. Основным вектором культурной эволюции ряда видов стал отбор высокопродуктивных форм с необычным габитусом (карликовых, фасциированных, с ограниченным ростом) или иными наследственно

---

<sup>1</sup> Ранг этих таксонов остается дискуссионным [Зитте и др., 2007].



закрепленными аномалиями развития (например, измененной структурой листа или цветка). Своеобразной особенностью культурной эволюции бобовых является ее направление, противоположное естественной эволюции. Так, если эволюция семейства в целом представляется связанной с редукцией (обеднение соцветий, упрощение структуры листа, уменьшение числа семязачатков и т.д.), то культурная эволюция направлена на закрепление проявлений признаков скорее анцестрального характера [Зеленов, 1994]. Таким образом, информация о наследовании и особенностях проявления морфологических признаков имеет большое практическое значение. Типичной для большинства бобовых особенностью следует считать способность к симбиотической фиксации атмосферного азота (нодуляции), которая представляет собой сложный многокомпонентный процесс с самостоятельной генетической регуляцией [Тихонович, Проворов, 2003]. Эволюционные аспекты формирования способности к нодуляции могут быть моделированы исключительно на представителях семейства Fabaceae, среди которых горох посевной (*Pisum sativum* L.) является одним из наиболее изученных и широко используемых в экспериментальной работе. Дополнительным аргументом может служить тот факт, что именно горох был первым объектом генетических исследований в классических опытах Г. Менделя [Mendel, 1866] Кроме того, закрепление в генотипе сортов хозяйственно ценных культур высокой активности симбиотической азотфиксации является одним из приоритетных практических направлений.

Идентификация ключевых генов, вовлеченных в регуляцию процессов морфогенеза у видов, имеющих хозяйственную ценность, также может создавать основу для существенного расширения спектра исходного материала в селекции этих культур методами генетической инженерии. В этой связи выявление и анализ основных морфогенетических регуляторов (в первую очередь генетических и в том числе путем поиска гомологии между различными видами) представляется чрезвычайно важной и востребованной задачей частной генетики растений.

В отношении гороха посевного получены многие данные относительно генетического контроля сложных процессов - таких, например, как нодуляция [Тихонович, Проворов, 2003; Vorisov et al., 2004], морфогенез сложного листа [Hofer et al., 2009] и зигоморфного цветка [Wang et al., 2008]. В то же время некоторые аспекты, среди которых - генетический контроль активности апикальной меристемы побега или морфогенеза соцветия, изучены фрагментарно [Singer et al., 1999] или не исследованы вовсе. Изучение числа, характера

наследования, фенотипического проявления и взаимодействия генов, участвующих в регуляции этих процессов, является актуальной и востребованной задачей современной генетики развития.

**Цель настоящей работы** - изучение генетического контроля активности апикальной меристемы побега (ПАМ) у гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение фенотипического проявления мутаций, нарушающих различные аспекты функционирования ПАМ.
2. Определение числа, особенностей наследования и характера взаимодействия генов, регулирующих активность ПАМ.
3. Исследование влияния генов, осуществляющих негативную регуляцию размеров ПАМ, на формирование симбиотических клубеньков на корнях.
4. Локализация генов, вовлеченных в контроль активности ПАМ, на генетической карте.
5. Построение схемы генетической регуляции активности ПАМ у гороха.

## Обзор литературы

### 1.1. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) как модельный объект в генетике развития растений

Горох посевной (*Pisum sativum* L., сем. Fabaceae) – растение, с которым исторически связано возникновение генетики в качестве самостоятельной научной дисциплины. Именно в результате экспериментов с горохом Грегором Менделем были сформулированы закономерности наследования, которые легли в основание новой науки [Mendel, 1866].

В настоящее время в составе рода *Pisum* выделяют два вида - горох посевной (*P. sativum* L.) и горох красно-желтый (*P. fulvum* Sibth. & Sm.). Прочие внутривидовые таксоны, ранее выделенные как виды, сейчас имеют статус подвидов или разновидностей. Спорное положение до настоящего момента остается у вавиловии красивой (гороха красивого - *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. или *P. formosum* (Stev.) Alef.).

Родиной культурного гороха считаются Юго-Западная Азия, Эфиопия и Закавказье. Наиболее древние археологические находки гороха (территория Курдистана и Турции) могут быть датированы VII-VI тысячелетиями до н.э. (см. обзор [Макашева, 1979]). Современные представители рода - однолетние (кроме *P. formosum*) травянистые растения. Горох посевной с древних времен вовлечен в селекционный процесс и относится к числу наиболее хозяйственно-важных культур в мире и России. Так, в мировом земледелии посевы гороха в 2001-2005 гг. занимали от 2.32 до 6.57 млн. га. В России эта культура занимает до 85% от всех площадей, отведенных под зернобобовые культуры. В 2005 г. площадь посева гороха составила около 730 тыс. га (по сравнению с примерно 3.3 млн. га до 1991 г. на всей территории СССР, по [Кондыков и др., 2006]). Кроме того, горох посевной (типовой подвид) является традиционным объектом исследований в области физиологии и биохимии растений и генетики. Хотя этот вид обладает рядом недостатков в работе (крупные размеры, сравнительно длительный жизненный цикл, отсутствие данных о полной нуклеотидной последовательности генома), он обладает целым рядом преимуществ. Так, в современной биологии и генетике развития горох остается единственной моделью для изучения генетического контроля развития сложного листа, сложного соцветия, зигоморфного цветка (наряду с *Antirrhinum majus*) и симбиотической

азотфиксации.

Ниже кратко рассмотрены основные достижения современной генетики развития, полученные с использованием гороха в качестве модельного объекта. Изучению генетического контроля активности апикальной меристемы побега уделено большее внимание.

### **1.1.1. Генетический контроль развития цветка**

Необычной чертой генетического контроля развития цветка у гороха следует считать одновременную вовлеченность многих генов в регуляцию морфогенеза цветка и листа. Сходство генетического контроля развития листа и цветка может служить аргументом в пользу необходимости изучения частных особенностей биологии развития у различных видов в силу невозможности экстраполяции данных, полученных в отношении *Arabidopsis* и *Antirrhinum*. По всей видимости, в отношении *Pisum* имеет место система регуляции морфогенеза, существенно отличающаяся от таковой у более хорошо изученных объектов. Интерес к гороху как модельному объекту генетики развития во многом выходит, таким образом, за рамки частной генетики и имеет непосредственное значение для понимания принципов биологии развития растений в целом.

Наряду с львиным зевом (*Antirrhinum majus* L., сем. Scrophulariaceae) горох представляется чрезвычайно интересным объектом с точки зрения изучения формирования симметрии цветка. Считается, что переход от актино- к зигоморфии происходил в различных группах покрытосеменных независимо и многократно [см. Davies et al., 2006]. Поэтому можно предположить, что черты генетического контроля развития этого признака сходны у *Pisum* и *Antirrhinum* (представителей классов Rosidae и Asteridae соответственно) лишь отчасти. Степень этого сходства призваны определить детальные молекулярно-генетические исследования.

У растений дикого типа формируется цветок с двойным околоцветником, двумя кругами тычинок, срастающихся в трубку (противолежащая адаксиальному лепестку тычинка, называемая вексиллярной, свободна), и одного плодолистика, дающего начало плоду – бобу. Наиболее типично для семейства бобовых развитие пяти лепестков с характерными расположением и морфологией. Строение и динамика развития цветка были подробно охарактеризованы в ряде работ [например, Tucker, 1989]. До недавнего времени у гороха были известны несколько генов, мутации в которых приводят к нарушениям симметрии цветка

[см. обзорную работу: Синюшин, Гостимский, 2008], однако структура и особенности экспрессии этих генов оставались неизвестными. Первые данные о структуре конкретных генов, участвующих в процессах формирования зигоморфного венчика, были получены в работе [Wang et al., 2008b]. Так, были охарактеризованы последовательности, профили экспрессии и характер взаимодействия генов *LOBED STANDARD 1 (LST1)*, *KEELED WINGS (K)* и *SYMMETRIC PETALS 1 (SYP1)*, мутации в которых приводят к нарушениям формирования зигоморфного венчика. В частности, обнаружено, что гены *LST1* и *K* кодируют транскрипционные факторы TCP типа [Wang et al., 2008b].

На основе обобщения материала, полученного при исследовании *A. thaliana* и *A. majus*, сформулирована так называемая ABC-модель развития цветка. Согласно основным положениям этой модели, определение типа органа происходит в результате экспрессии генов трех классов, условно называемых А, В и С [Haughn, Somerville, 1988; Coen, Meyerowitz, 1991]. Экспрессия генов класса А определяет формирование чашелистиков (I круг), С – плодолистиков (IV круг); одновременная экспрессия А и В приводит к развитию лепестков (II круг), а В и С – элементов андрцея (III круг). Эктопическая экспрессия генов описанных классов приводит к формированию органов цветка с нехарактерным положением или промежуточного строения. Ряд авторов определяют аномалии подобного рода как гомеозисные замены, в то время как другие исследователи склонны трактовать возникающие у мутантов структурные преобразования, используя иные термины [Чуб, Пенин, 2004].

У гороха посевного получены мутанты, фенотип которых сходен с фенотипом мутантов *A. thaliana* по генам классов А, В и С [Ferrandiz et al., 1999]. Так, ген *CALYX CARPELLARIS (CC)* относится к классу А. У мутантов *cc* лепестки не развиваются, а чашелистики превращены в плодолистки, сохраняющие характерное для элементов I круга число и положение. Эктопическая рыльцевая поверхность обнаруживается и на листочках и усиках сложного листа, подтверждая гипотезу о сходстве (или частичной общности) путей развития листа и цветка у гороха [Ferrandiz et al., 1999].

Ген *STAMINA PISTILLOIDA (STP)* у гороха является гомологом генов *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* *Arabidopsis* и *FIMBRIATA (FIM)* *Antirrhinum* [Taylor et al., 2001]. Все 3 гена участвуют в регуляции экспрессии генов класса В (и отчасти С у львиного зева и резуховидки). У гороха ген *STP* участвует также в контроле морфогенеза соцветия, определении пути развития флоральной

меристемы (у мутантов *stp-2* в цветке закладываются вторичные флоральные меристемы) и листа. Последнее обстоятельство следует считать достаточно характерным именно для гороха. Мутанты *stp-2* обладают более выраженным фенотипом: лепестки превращены в чашелистики, а тычинки – в плодолистики. У гомозигот по аллелю *stp-1* происходит превращение 2 тычинок наружного круга, граничащих со свободной (вексиллярной) тычинкой внутреннего круга, в плодолистики. Остальные тычинки при этом сохраняют свою структуру. Наряду с гомеозисной заменой, характерной для мутанта по гену класса В, наблюдается, таким образом, свойственная зигоморфному цветку асимметрия в экспрессии гена.

Ген *PETALOSUS (PE)* принадлежит к классу С и регулирует развитие III и IV кругов. У мутантов *pe* развивается «махровый» цветок с многочисленными лепестками, частично петализованными тычинками и нарушениями в развитии плодолистика [Ferrandiz et al., 1999].

### **1.1.2. Генетический контроль развития корня**

Особенности генетического контроля ризогенеза изучены у гороха явно недостаточно. Известны лишь несколько генов, мутации в которых нарушают структуру корня. Одним из первых был описан ген, который ответственен за формирование нормального геотропизма – *AGEOTROPUM (AGE)*. У мутантов *age* рост корня под землей происходит с отрицательным геотропизмом, а над землей при условии освещения – параллельно грунту [Blixt, 1970]. Кроме того, было установлено существование генов *BRANCHED ROOTS (BRT)* и *LONG ROOTS (LRT)*, рецессивные аллели которых в гомозиготе вызывают формирование избыточно ветвящегося (*brt*) и аномально длинного (*lrt*) корня, соответственно [Sidorova et al., 2002]. Показано резкое снижение способности к образованию симбиотических клубеньков на корнях мутантов *lrt*.

Ген *CURLY ROOTS (CRT)* также связан с морфогенезом корня, изменяя чувствительность к экзогенному ауксину [Tsyganov et al., 2000]. У мутантов *crt* на плотной агаризованной среде культивирования формируется компактная корневая система небольших размеров, корни извиты и укорочены, в то время как на средах невысокой плотности отличий по сравнению с диким типом практически нет. Предполагается, что ген *CRT* участвует в метаболизме или рецепции ауксина в растении, однако конкретные детали механизмов действия неизвестны.

Отчасти в регуляции развития корня участвуют гены, связанные с

метаболизмом гиббереллинов. Вообще у растений, карликовость которых связана с метаболизмом гиббереллинов, развивается довольно характерный габитус: междоузлия и корни укорочены, листья обычно темнее нормы. Последнее обстоятельство связано с участием гиббереллинов в регуляции путей синтеза хлорофиллов.

Наиболее интенсивные исследования ведутся в отношении генетического контроля процесса взаимодействия растений гороха с симбиотическими азотфиксирующими бактериями, т.е. нодуляции [Borisov et al., 2004]. Изучение такого симбиоза возможно только на примере бобовых, и горох остается основным модельным объектом в этом направлении. Хотя нодуляция напрямую не связана с морфогенезом корня, она представляет огромный интерес как с точки зрения фундаментальной проблемы растительно-бактериальных взаимодействий, так и с практических позиций. Описано множество генов, так или иначе нарушающих нормальное протекание этого взаимодействия – как снижающих способность растений к симбиогенезу, так и приводящих к гипернодуляции.

Некоторые аспекты процесса нодуляции - в частности, сопряжение его с контролем активности ПАМ, - частично рассмотрены ниже. Достаточно подробные сведения о генетическом контроле симбиогенеза у гороха представлены в специальных обзорных работах [Тихонович, Проворов, 2003; Borisov et al., 2004].

### **1.1.3. Генетический контроль развития листа**

В настоящее время горох является основным модельным объектом для изучения биологии развития сложного листа. В норме развивается парноперистосложный лист с крупными стеблеобъемлющими прилистниками, 2-3 парами листочков и 2-3 парами усиков. Рахис также оканчивается усиком. У различных подвидов гороха посевного число листочков сложного листа может варьировать, структура листа также изменяется в ходе онтогенеза (можно выделить низовые, срединные и верховые листья). У *Pisum formosum* лист несет одну пару листочков и заканчивается шипиком.

К настоящему моменту в каталоге John Innes Collection (Великобритания, <http://data.jic.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/pgene/default.asp>) описано более 50 генов, участвующих в развитии листа. Практически ежегодно в литературе появляются описания новых - или взаимодействий уже известных – генов, оказывающих влияние на анатомическое или морфологическое строение листа в целом или

отдельных структур в его составе – прилистников, рахиса, листочков.

Одним из основных генов гороха, участвующих в формировании листа, цветка и архитектуры соцветия в целом, является ген *UNIFOLIATA (UNI)*. У гомозиготных по «жесткому» мутантному аллелю растений *uni* развивается простой лист, отмечаются нарушения в строении цветка, мутант стерилен [Hofer et al., 1997]. У гомозигот по аллелям с более «мягким» действием проявление всех аномалий ослаблено. Например, у гомозигот по аллелю *uni<sup>fac</sup>* рахис оканчивается не усиком, а листочком, отклонения в структуре цветка не наблюдаются.

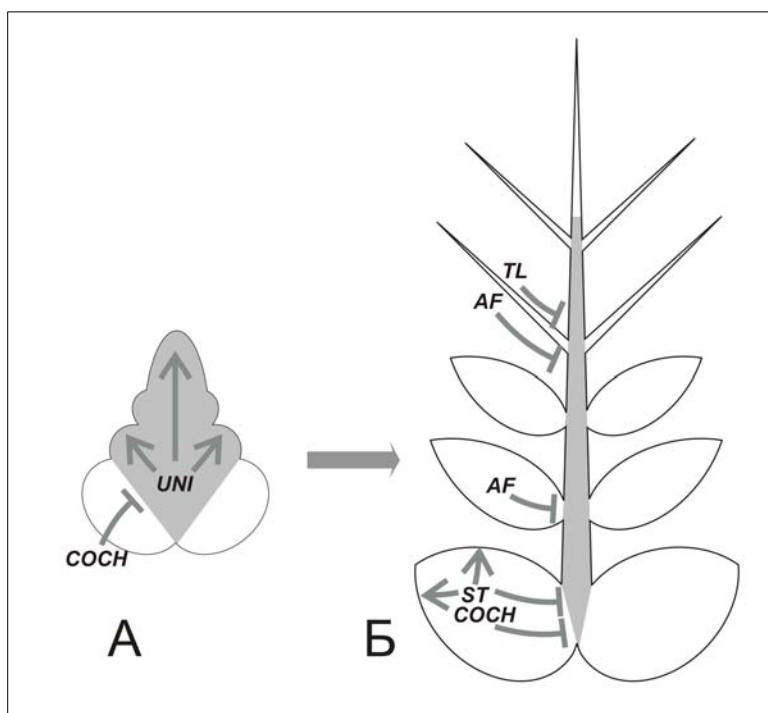
Обобщение результатов изучения генетического контроля формирования сложного листа у гороха нашло отражение в различных моделях. Наиболее простая из них была основана на формировании архитектуры листа как баланса противоположных тенденций – формирования пар усиков на дистальной части оси (рахиса) листа и пар листочков – на проксимальной; при этом исходно закладываются примордии, способные дать начало как листочку, так и усика [Ingensiep, Lenz, 1987]. Согласно предложенной этими авторами схеме, у мутантов *afila (af)* сохраняется только зона формирования усиков (фенотип «*afila*»), а у мутантов *tendrill-less (tl)* – зона формирования листочков (фенотип «*acacia*»). Каждый примордий у мутантов *af* утрачивает (или сокращает) индивидуальную зону подавления, в пределах которой закладка последующего примордия невозможна, что приводит к повышению порядка ветвления оси листа у этих мутантов. У двойных мутантов *af tl* развивается лист с многократным «ветвлением» рахиса, и каждая ось заканчивается листочком (фенотип «*pleiofila*» или «*parsley-leaf*»). Таким образом, основа структуры сложного листа объяснялась результатом совместного действия всего 2 генов.

Несколько более сложная схема взаимодействия генов, ответственных за развитие листа, была предложена в работе J. Young [1983]. В математизированной форме автор исходил из предположений о том, что три основных типа структур в составе сложного листа (рахис, листочек и усик) развиваются из различных примордиев, и направление дифференцировки примордия каждого типа зависит от его размера. Из самого крупного зачатка развивается рахис, из меньших по размеру – листочки, из самых маленьких – усики. Роль генов *AF* и *TL* сводится к определению пороговых значений для размеров («размер» в данном случае – условная величина) зачатков различных типов структур. Любопытно, что в работе при характеристике мутантных фенотипов использован термин «гомеозис». J. Young [1983] обсуждает



возможность объяснения с помощью этой модели возникновения иных типов листа, характерных для бобовых – например, тройчато- (*Trifolium*) или пальчатосложного (*Lupinus*). Несмотря на определенную прогностическую ценность этой модели, к настоящему моменту накоплен материал, свидетельствующий в пользу большей сложности регуляции морфогенеза листа у бобовых.

В настоящее время в результате изучения фенотипа мутантов, уровней и областей экспрессии соответствующих генов, создана значительно более сложная модель [Gourlay et al., 2000]. Ключевым геном, регулирующим морфогенез сложного листа, является *UNI*, экспрессия которого приурочена к областям закладки и дифференциации листа в целом, листочков и усиков (в оригинале для обозначения таких областей использован термин «бластозона»). В ходе специализации этих органов уровень экспрессии *UNI* снижается вплоть до полного исчезновения в дифференцированных структурах. Таким образом, у мутантов *uni* сложный лист в принципе не формируется (см. выше). Негативную регуляцию (подавление экспрессии) гена *UNI* осуществляют гены *AF* (в примордиях листочков в проксимальной части листа и усиков – в дистальной) и *TL* (в зачатках усиков). Наконец, ген *COCH* (*COCHLEATA*) подавляет экспрессию гена *UNI* в прилистниках: у мутантов *coch* наблюдается эктопическая экспрессия *UNI* в



**Рис. 1.** Схема генетического контроля развития листа у гороха на стадиях закладки (А) и дифференциации примордиев (по [Синюшин, Гостимский, 2008], пояснения в тексте). Серым цветом обозначена область экспрессии гена *UNI*; ➔, позитивная регуляция; ⊥, негативная регуляция.

примордиях прилистников, и последние приобретают сходство со сложными листьями. Характерно, что у двойных мутантов *coch uni* «сложные прилистники» не формируются [Gourlay et al., 2000]. Еще одним предполагаемым негативным

регулятором *UNI* является ген *STIPULES REDUCED (ST)* [там же], основная функция которого связана с активностью маргинальных меристем прилистников. Схематически взаимодействие ключевых генов при развитии листа представлено на Рис 1.

Тонкая структура гена *TL* охарактеризована в работе J. Hofer с соавторами [2009]. Показано, что его продуктом является гомеодомен-содержащий белок с мотивом типа «лейциновая застежка-молния» (HDZIP).

Структура листа у растений в норме является результатом согласованных морфогенетических процессов в трех направлениях: дистально-проксимальном, дорзовентральном и медиально-латеральном. Большинство известных мутаций в генах, ответственных за формирование листа у гороха, нарушают морфогенез дистально-проксимального направления. Генетический контроль определения дорзовентральной полярной структуры, разграничения абаксиальной и адаксиальной сторон формирующегося листового примордия впервые был изучен у *Antirrhinum majus*. У этого модельного объекта описан ген *PHANTASTICA (PHAN)*, продуктом которого является фактор транскрипции MYB [Waites et al., 1998]. Гомологи этого гена охарактеризованы у многих растений, в том числе и у гороха, для которого описан гомологичный *PHAN* ген *CRISPA (CRI)*. У мутантов *cri* отмечаются нарушения структуры листа, проявляющиеся в первую очередь в формировании на верхней поверхности листа секторов, идентичных нижней поверхности [Tattersall et al., 2005]. Как и у многих других мутантов по генам, участвующим в формировании листа, у растений *cri* наблюдаются некоторые отклонения в развитии цветка, фертильность зачастую понижена.

#### **1.1.4. Современное состояние проблемы идентификации генов у *Pisum sativum***

Как уже было упомянуто выше, собственно факториальная теория наследственности была сформулирована в результате экспериментов с горохом в работе Г. Менделя [Mendel, 1866]. Таким образом, первые данные по наследованию признаков у *Pisum* и выявлению генов, контролирующих развитие этих признаков, появились одновременно с самой генетикой.

Первые результаты построения генетической карты гороха были получены в результате многолетних экспериментов Г. Лампрехта. Этим исследователем были описаны многие из известных в настоящее время генов, охарактеризованы взаимодействия между ними, определено взаиморасположение в пределах групп

сцепления, которых в обобщающей работе [Lamprecht, 1948] им было описано семь. Ранее в работах отечественных и зарубежных исследователей был детально охарактеризован кариотип гороха [Левитский, 1931]. Достоверно соотнести хромосомы и группы сцепления удалось значительно позднее при изучении сцепленного наследования морфологических маркеров и хромосомных перестроек [Lamm, 1987; Ellis, Poyser, 2002].

В течение всей второй половины XX века продолжалась работа по совершенствованию генетической карты гороха посевного и насыщению ее маркерами различных типов. Исходная карта Г. Лампрехта, построенная исключительно на морфологических маркерах, была дополнена при изучении наследования изозимных локусов и ДНК-маркеров различных типов: RAPD, ISSR, CAPS [Ellis et al., 1992; Weeden et al. 1998; Чегамирза, 2004, и др.]. Особое значение приобрело использование в картировании линий, несущих реципрокные транслокации: точка разрыва может служить надежным маркером в картировании. Коллекция различных форм гороха, несущих перестроенные по сравнению со стандартом (обычно в таком качестве выступает сорт Roi de Gourmanes) хромосомы, получена на кафедре генетики МГУ им. М.В. Ломоносова. Локализация точек разрыва была успешно осуществлена как при изучении сцепления с морфологическими маркерами [Фучжун, Гостимский, 1998], так и методами дифференциального окрашивания хромосом [Саматадзе и др., 2005]. С другой стороны, существование среди разнообразия вида многочисленных форм с хромосомными абберациями может существенно затруднять работу по картированию. Именно такими причинами, например, объясняют расхождения обнаруженной в ходе эксперимента локализации генов с общепринятой авторами одной из генетических карт гороха [Ellis et al., 1992]. Линии, несущие транслокации по известным хромосомам, также были использованы при сопоставлении генетической и хромосомной карт гороха [Lamm, 1987].

Наиболее значимой для оригинальных исследований представляется опубликованная в 1998 г. карта объединенного (консенсусного) типа, включающая 465 морфологических, изозимных и ДНК-маркеров [Weeden et al., 1998]. При этом в состав карты вошли не только маркеры, сегрегирующие в картирующей популяции, но и значительное число ранее известных маркеров, положение которых по отношению к имеющимся представлялось достоверным.

Значительный успех был достигнут при использовании ДНК-маркеров, основанных на уникальных последовательностях, полиморфизм которых

выявляется по наличию/отсутствию сайта узнавания эндонуклеазы рестрикции (CAPS - cleaved amplified polymorphic sequences). 36 маркеров такого типа были локализованы в работе S. Brauner с коллегами [2002]. В этой работе была показана принципиальная возможность использования таких маркеров в работе с другими родственными видами в силу высокой консервативности целевых последовательностей. Подобная работа была проведена на кафедре генетики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Результатом ее стала генетическая карта всех групп сцепления гороха, включающая в себя 40 полиморфных CAPS-маркеров, 16 из которых были локализованы впервые [Konovalov et al., 2005; Коновалов, 2006].

Интересно отметить, что насыщенность разных групп сцепления маркерами всех известных типов неодинакова. Так, при сопоставлении карт, полученных разными авторами, примечательной оказывается наибольшая протяженность и плотность маркеров III группы сцепления (ГCIII), в то время как ГCIV неизменно остается одной из наиболее бедных маркерами.

Эффективным инструментом для создания генетических карт с высоким разрешением стали ДНК-маркеры на основе микросателлитных районов (SSR, simple sequences repeats). Из-за высоких темпов мутирования такие маркеры представляются чрезвычайно перспективными в оценке полиморфизма, популяционно-генетических исследованиях, картировании новых генов. Протяженная насыщенная карта всех семи групп сцепления гороха, построенная на основе SSR-маркеров, была представлена в работе С. Loidon с соавторами [2005]. В то же время сравнительное картирование для родственных видов с использованием маркеров такого типа едва ли возможно именно в силу высокой изменчивости.

Таким образом, очевидной стратегией (или, по крайней мере, важным этапом) при идентификации новых генов у гороха является картирование. Существование насыщенных генетических карт в сочетании с разнообразием пригодных для использования маркеров делает решение этой задачи вполне доступным. Полученное к настоящему времени разрешение существующих карт позволяет рассчитывать на достоверную локализацию новых генов в любой группе сцепления.

Одним из возможных и достаточно перспективных подходов к проблеме идентификации новых генов у гороха (и в принципе у объектов с малоизученной структурой генома) является поиск генов-кандидатов. Так, сходство фенотипов

мутантов у более детально изученного вида (например, *A. thaliana*) и у гороха может служить указанием на возможное функциональное (и, вероятно, структурное) сходство ключевых генов. Если у хорошо изученного объекта последовательность искомого гена известна, то становится возможным выделение и изучение особенностей экспрессии его гомолога у вида с неизвестной последовательностью генома. Таким образом, реализуется последовательность действий, характерная для «прямой генетики» (от признака к гену). Так, например, был охарактеризован ген *CRISPA (CRI)* у гороха [Tattersall et al., 2005], мутации в котором приводят к развитию очень характерного фенотипа: нарушено формирование абаксиально-адаксиальной структуры листа (см. выше). Фенотипически сходный мутант (*phantastica*) известен у львиного зева; это заключение позволило авторам процитированной работы успешно соотнести ген, ответственный за абаксиально-адаксиальную поляризацию листа у *Pisum*, с гомологом гена *PHAN A. majus*.

Подобный подход сопряжен, по крайней мере, с одной сложностью, касающейся идентификации фенотипически сходных мутантов. Так, например, изучение генетического контроля активности ПАМ у *Arabidopsis* (см. ниже) показывает, что число генов, мутации в которых могут приводить к фасциации побега, может быть значительным. Аналогично, известны несколько фасцированных мутантов гороха, что делает процесс возможного сопоставления затруднительным, особенно с учетом противоречивых данных о числе и характере взаимодействия ключевых «генов фасциации» (см. ниже). Именно трудности такого рода привели к отрицательному результату при попытке идентифицировать ген, мутация в котором приводит к фасциации у сои [Yamamoto et al., 2000]. Два выделенных структурных гомолога гена *CLV1* не обнаружили значимых различий в нуклеотидной последовательности аллелей дикого типа и мутанта.

В некоторых случаях выделение предполагаемого гомолога на основании сходства нуклеотидных последовательностей (например, используя вырожденные праймеры в ПЦР) может представлять самостоятельную задачу; следующим шагом становится сопоставление вновь открытой последовательности с уже известными генами путем картирования, изучения особенностей экспрессии и прочими подходами «обратной генетики» (от гена к признаку). Например, именно так была изучена структура генов *DET* и *LF* у гороха [Foucher et al., 2003]. С помощью вырожденных праймеров в геноме гороха были выделены три

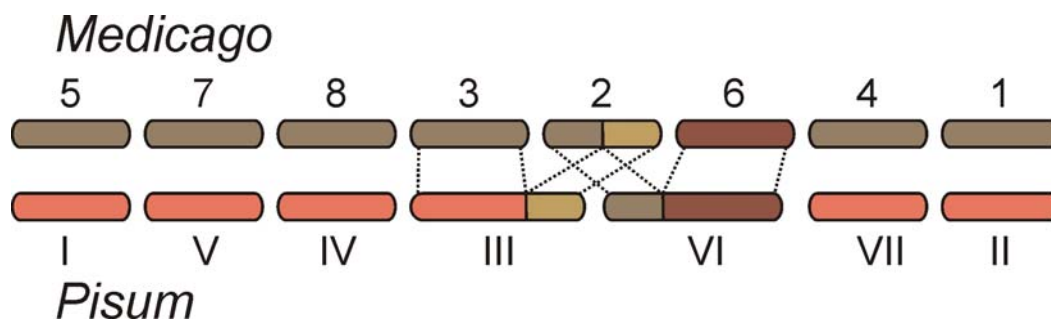
структурных гомолога гена *TFL1 A. thaliana*; с помощью их локализации на генетической карте была выдвинута гипотеза о соответствии двух из них уже известным генам *DET* и *LF*. Определение нуклеотидной последовательности аллелей и изучение уровня экспрессии этих генов у мутантов по сравнению с нормальными растениями подтвердило первоначальную гипотезу.

Целая группа предполагаемых гомологов генов *Arabidopsis*, связанных с цветением, была выделена у гороха, сои, люцерны и лядвенца путем прямой амплификации с вырожденными праймерами [Hecht et al., 2005]. При этом даже картирование некоторых из вновь описанных последовательностей у гороха не привело к определению их функции (или установлению структуры уже известных генов). Исключение составил фрагмент *PsSEP1/2*, локализованный рядом с геном *VEG1*.

Несколько более сложный подход «прямой генетики» был использован в работе при идентификации гена *PIM* (функция этого гена связана с регуляцией морфогенеза соцветия) [Taylor et al., 2002]. Авторами было высказано предположение о сходстве фенотипа мутантов *pim* гороха и *squa* (*squamosa*) львиного зева. Последовательность гена была определена при клонировании и секвенировании фрагмента, выявленного при блот-гибридизации РНК гороха с зондом - геном *SQUA*. Было обнаружено 99% сходство с ранее охарактеризованной последовательностью гена гороха *PEAM4*, что свидетельствовало об их идентичности. Анализ структуры нормального и мутантного аллелей и особенностей экспрессии также подтвердили успешность идентификации этого гена. По всей видимости, использование блот-гибридизации для скрининга библиотек РНК - несколько более надежный (несмотря на технические сложности) способ выделения кодирующих последовательностей, чем амплификация с вырожденными праймерами. Именно этим способом была выделена последовательность гена *CRISPA* (см. выше) [Tattersall et al., 2005].

Нуклеотидная последовательность генома гороха до настоящего времени остается неизвестной, как, впрочем, нет данных и о достаточно протяженных фрагментах хромосом. При выборе объекта для определения последовательности (секвенирования) в пределах семейства Fabaceae были избраны два вида - лядвенец японский (*Lotus japonicus* L.) и люцерна усеченная (*Medicago truncatula* Gaertn.) [VandenBosch, Stacey, 2003]. Очевидно, что в основу был положен принцип практической значимости этих объектов со сравнительно небольшим размером генома, а также различия в механизмах нодуляции. Так, у

*Lotus* формируются симбиотические клубеньки с ограниченным ростом, в то время как у *Medicago* они сохраняют меристематическую активность [Udvardi et al., 2005]. В то же время не может не обратить на себя внимания близкое систематическое положение лядвенца и люцерны (трибы *Loteae* и *Trifolieae* соответственно). При этом родство этих групп с трибой *Vicieae* (включающей в современном понимании роды *Lathyrus*, *Vicia*, *Pisum*, *Lens* и *Vavilovia*) также представляется чрезвычайно важным.



**Рис. 2.** Соответствие групп сцепления гороха и люцерны, [Kalo et al., 2004].

Весьма значимо для решения проблемы изучения структуры генома и идентификации новых генов у гороха и родственных бобовых явление макросинтезии. Так, показана высокая степень соответствия геномов гороха и люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) [Kalo et al., 2004]. Фактически хромосомы этих двух видов полностью коллинеарны с сохранением в целом порядка расположения маркеров, за исключением двух районов транслокаций (рис. 2). Высокая степень макросинтезии геномов различных видов семейства *Fabaceae* была показана в работе Н.К. Choi с соавторами [2004]. Справедливости ради стоит отметить, что выбранные в рамках упомянутого исследования виды принадлежат к трем трибам, по современным представлениям связанным достаточно близким родством [Wojciechowski et al., 2004], что затрудняет осуществление эволюционных реконструкций по отношению ко всему объему семейства [Young et al., 2003]. Необходимо признать, что изученность объекта в значительной степени определяется его хозяйственным значением, а не интересом к его филогенетическому положению.

## 1.2. Структура апикальной меристемы побега у высших растений

Онтогенез растений обладает целым рядом особенностей по сравнению с куда более полно изученным (по крайней мере, в ряде групп) онтогенезом животных. К числу таких специфических черт следует отнести открытый рост и существенно меньшую степень интеграции, допускающую большую степень автономности морфогенеза отдельных органов и их частей [Лодкина, 1977]. У большинства растений на протяжении практически всей индивидуальной жизни существуют постоянно действующие очаги роста - меристемы. Их наличие приводит к тому, что формирование органов происходит в течение всей жизни. Кроме того, такая черта приводит к формированию множества однотипных органов, между которыми возможно определенное варьирование.

Выделяют несколько типов меристем - преимущественно по их локализации (например, [Имс, 1964]): апикальные, флоральные, интеркалярные, маргинальные, раневые и т.д. Предметом изучения настоящей работы является генетический контроль активности именно побеговой апикальной меристемы (ПАМ), и ее структура будет рассмотрена ниже (рис. 3).

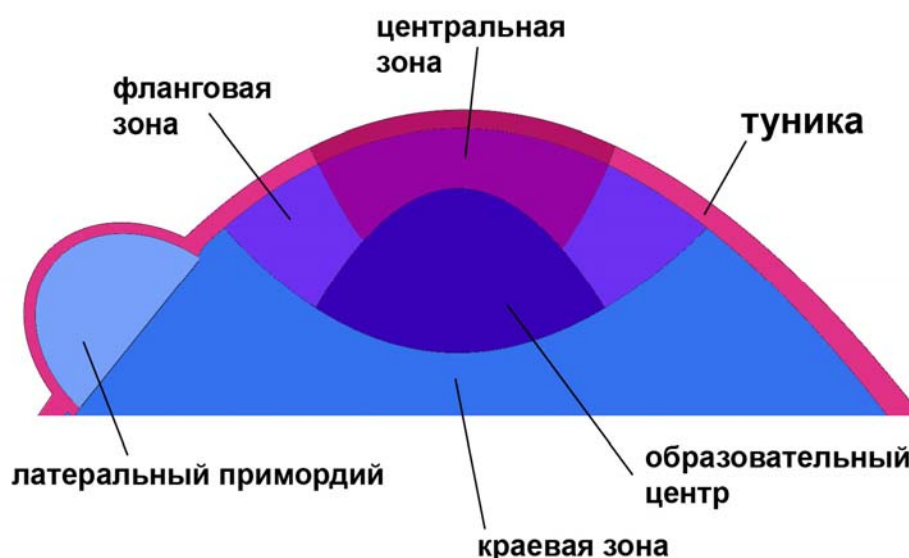
Хотя апексы различных растений могут значительно различаться по размеру, форме, особенностям заложения латеральных производных, их анатомическая структура во многом сходна. По особенностям расположения клеток, их структуре, ритму и направлению делений ПАМ обычно подразделяют на несколько зон [Gifford, Corson, 1971; Kerstetter, Nake, 1997], границы между которыми могут быть нечеткими. Так, выделяют центральную зону (ЦЗ, или образовательный центр, ОЦ), состоящую из крупных клеток с достаточно крупными вакуолями, которые делятся реже, чем прочие клетки ПАМ. Основным назначением этой области считают поддержание массива недетерминированных клеток по мере вовлечения последних в морфогенез листовых примордиев или побега.

Морфогенетическая (фланговая или, чаще, периферическая, ПЗ) зона состоит из более мелких клеток, для которых характерны меньшая вакуоляризованность и более интенсивные деления. В этой зоне происходят первые деления, приводящие к формированию латеральных органов - в первую очередь, листьев.

В основании ПАМ расположены клетки так называемой краевой зоны (rib zone), для которых характерны достаточно быстрые деления. Еще ниже



(базипетальнее) выделяют так называемую зону созревания, в которой происходит дифференцировка тканей побега и активное деление примордиев латеральных органов.



**Рис. 3.** Зональная структура ПАМ у высших растений.

Еще одной особенностью ПАМ у высших растений следует считать высоко консервативную структуру, состоящую из набора клеточных слоев. Непосредственно на поверхности ПАМ выделяют несколько (до 5, в некоторых таксонах больше) слоев так называемой туники, клетки которой делятся преимущественно антиклинально. В частной генетике развития *A. thaliana*, для которого характерны 3 слоя туники, эти слои обозначают L1, L2 и L3 (от англ. «layer» - слой), начиная нумерацию от поверхности. Под туникой расположен корпус, клетки которого делятся в основном периклинально. Отмеченная уже в классических анатомических работах зональность ПАМ имеет определенный функциональный характер. Так, в разных слоях и зонах активность тех или иных ключевых генов неодинакова, разные области ПАМ имеют различные профили экспрессии, и в целом существует скоординированная система, функционирование которой определяет морфогенез растения в целом.

Существенная консервативность структуры и функционирования ПАМ в различных группах растений сочетается с существованием определенного числа таксоноспецифичных модификаций базовой схемы. Такие модификации приводят к значительному разнообразию соцветий, структуры и метаморфозов побега. Изучению особенностей генетического контроля активности ПАМ у гороха - модельного объекта со сложным соцветием - посвящена настоящая работа.

### 1.3. Генетический контроль активности апикальной меристемы побега у резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Особенности генетического контроля функционирования побеговой апикальной меристемы (ПАМ) наиболее полно изучены у модельного объекта современной биологии развития - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) [например, Medford et al., 1992; Sharma et al., 2003; Williams, Fletcher, 2005]. Активность ПАМ у высших растений может быть представлена в виде набора основных функций или модусов:

- Инициация
- Пролиферация
- Сохранение недифференцированного состояния
- Поддержание постоянного объема и соотношения между зонами
- Формирование латеральных производных

Каждый из этих модусов находится под контролем значительного числа факторов: активности и взаимодействия генов, гормонального фона, влияния внешних условий. Генетический контроль активности образовательных тканей у высших растений осуществляют в основном гены, кодирующие транскрипционные факторы. Эти гены, как правило, имеют высокое иерархическое положение в системе контроля развития того или иного признака, а мутации в них приводят к нарушениям в развитии, зачастую плейотропным.

У всех высших эукариот особое значение имеют так называемые гомеодомен-содержащие факторы транскрипции. Эти белки кодируются гомеобокс-содержащими генами; собственно гомеобокс состоит приблизительно из 180 пар нуклеотидов, он кодирует белковый домен длиной в 60 аминокислот, который может связывать ДНК. Гомеодомен содержит структуру «спираль-петля-спираль» (helix-loop-helix), в которой три  $\alpha$ -спирали соединены короткими неспиральными участками. Две более короткие  $\alpha$ -спирали, расположенные ближе к N-концу, антипараллельны, а третья  $\alpha$ -спираль, более длинная и распложенная ближе к C-концу, примерно перпендикулярна осям двух первых; именно она непосредственно связывается с ДНК.

Активность образовательных тканей растений преимущественно находится под контролем транскрипционных факторов обширного семейства TALE (Three

Amino acid Loop Extension), представители которого содержат три дополнительные аминокислоты между двумя спиральями канонической структуры гомеодомена [Burglin, 1997]. В свою очередь, это семейство включает в себя четыре подсемейства: KNOX, WOX, HD-ZIP и BELL [Scofield, Murray, 2006]. Ниже будут рассмотрены ключевые гены, кодирующие входящие в эти группы белки, применительно к их участию в контроле вышеупомянутых компонентов активности ПАМ у *A. thaliana*.

### 1.3.1. Инициация апикальной меристемы побега

Одним из наиболее важных для закладки и дальнейшего функционирования ПАМ генов является *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. Этот ген входит в подсемейство KNOX; его экспрессия отмечается у эмбрионов еще до формирования семядолей. Нарушения в активности этого гена приводят к тому, что ПАМ не формируется [Barton, Poethig, 1993]. Как следствие, семядоли проростков оказываются сросшимися краями - такие проростки хорошо известны в тератологической литературе под названием «асцидиальных» [Атабекова, 1957]. Тем не менее, у мутантов с более «мягким» проявлением развиваются листья и, в некоторых случаях, сильно обедненные цветоносы. Цветки развиваются со значительными нарушениями: число органов уменьшено, плодолистики обычно не закладываются.

Группу генов, участвующих в зонировании ПАМ, представляет собой семейство *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1, 2 и 3)* [Aida et al., 1997; Takada et al., 2001]. Изучение структуры этих генов показывает, что они кодируют так называемые NAC-домен-содержащие транскрипционные факторы. У двойных мутантов *cuc1 cuc2* ПАМ не формируется, а семядоли полностью слиты. У одиночных мутантов семядоли, как правило, слиты лишь отчасти; слияние органов наблюдается и в цветке. Гомолог генов *CUC*-семейства описан у львиного зева и получил название *CUPULIFORMIS (CUP)* [Weir et al., 2004]. У мутантов *cup* также происходит «асцидиальное» срастание семядолей, АМ главного побега не формируется, и рост возможен за счет боковых побегов. Последние оказываются сильно фасцированными; тенденция к срастанию наблюдается у листьев, органов цветка и даже семязачатков.

Дальнейшее функционирование ПАМ прекращается практически сразу после инициации у мутантов по гену *PINHEAD (PNH, синоним ZWILLE)* [Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999]. Хотя в эмбриогенезе у мутантов *pnh* отмечается

экспрессия *STM*, вместо побега у проростков развивается шиловидный отросток с ограниченным ростом. Как правило, отсутствуют пазушные почки; иногда, если цветонос развивается, отмечается фасциация и увеличение числа плодolistиков в цветке. Пенетрантность по всем аномальным проявлениям признаков составляет менее 100%. Продуктом гена является транскрипционный фактор. Экспрессия гена *PNH* отмечается во всех органах и в целом приурочена к эмбриональным тканям и местам заложения проводящей системы, в листьях маркирует адаксиальную поверхность. Так, К. Lynn с соавторами [1999] постулируют значительную роль этого гена в инициации ПАМ; В. Moussian с соавторами [1998] связывают активность этого гена с переходом от эмбрионального морфогенеза к формированию латеральных органов.

### **1.3.2. Поддержание пролиферативной активности апикальной меристемы**

Одним из ключевых аспектов морфогенеза является поддержание ПАМ в активном состоянии (без образования терминальных органов) на протяжении определенного периода и/или переход к дифференцировке на определенной стадии. У *Arabidopsis thaliana* ПАМ остается неспециализированной в течение всего жизненного цикла и не формирует терминальных структур.

Сохранение меристематического состояния контролируется тремя известными генами - *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* [Shannon, Meeks-Wagner, 1993], *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)* [Larsson et al., 1998] и *BRACTEA (BRA)* [Ежова, Пенин, 2001; Пенин и др., 2005]. ПАМ мутантов по этим генам трансформируется в флоральную меристему, давая начало терминальному цветку, т.е. развивается закрытое соцветие. У мутантов с нарушением этой функции также формируются брактей [Пенин, Будаев, 2006].

Гомолог гена *TFL1* описан также у другого модельного объекта - львиного зева (*Antirrhinum majus* L., сем. Scrophulariaceae) и назван *CENTRORADIALIS (CEN)*. У мутантов *cen* развивается терминальный радиально-симметричный цветок [Bradley et al., 1996].

### 1.3.3. Поддержание постоянного объема апикальной меристемы побега

#### 1.3.3.1. Негативная регуляция активности гена *WUSCHEL*

Постоянные размеры ПАМ, необходимые для осуществления нормального (типичного для данного таксона или для данной онтогенетической стадии) органогенеза, поддерживаются за счет целого ряда регуляторных механизмов. Хотя нарушения этой системы (например, фасциация) возникают у форм, несущих мутации по различным генам, цельной картины генетического контроля этого модуля активности ПАМ нет. Наиболее хорошо изучена отрицательная обратная связь между геном *WUSCHEL* (*WUS*) и многочисленными негативными регуляторами его экспрессии, среди которых первоочередная роль принадлежит группе генов *CLAVATA* (*CLV*).

Ген *WUS* связан с сохранением меристематического состояния определенной области ПАМ. Мутанты *wus* характеризуются отсутствием нормального роста: формирование побегов происходит из латеральных меристем, в то время как АМ главного побега остается неактивной [Laux et al., 1996]. Цветки развиваются с меньшим числом органов, чем у растений дикого типа, гинецей часто не формируется. В процитированной работе, посвященной описанию фенотипа мутанта *wus* и двойных мутантов по ряду генов флорального морфогенеза, было выдвинуто предположение, что основная функция гена *WUS* заключается в формировании и поддержании в активном состоянии центральной области меристемы осевых органов.

Более детально роль гена *WUS* была определена Mayer с соавт. [1998]. Установленная последовательность гена *WUS* предположительно кодирует гомеодомен-содержащий белок с общей длиной 291 АК. Наибольшая активность промотора *WUS*, выявленная с использованием репортерной конструкции, была отмечена в ядре, что свидетельствует в пользу гипотезы о функции этого белка в составе транскрипционного комплекса. Любопытно, что экспрессия гена *WUS* отмечается в эмбрионах мутантов *stm* (хотя и исчезает у проростков); таким образом, активность генов *WUS* и *STM* осуществляется независимо [Mayer et al., 1998].

Группа *CLAVATA* (*CLV*, *clavata* - лат. «булавовидный») образована тремя генами - соответственно *CLV1*, *CLV2* и *CLV3*. У мутантов *clv* происходит неконтролируемое разрастание ПАМ в одной плоскости (линейная фасциация) и отмечаются нарушения в структуре цветка. Так, происходит увеличение числа органов в пределах кругов. Наиболее значительным изменениям подвергается

гинецей, в результате чего формируется характерный «булавовидный» плод с увеличенным числом плодолистиков, что и дало название семейству генов. В большинстве случаев закладывается дополнительный круг плодолистиков, как бы вложенный в уже существующий [Clark et al., 1993]. В центральной части цветка сохраняются недифференцированные клетки.

Белковый продукт гена *CLV3* представляет собой небольшой полипептид, наибольшее количество которого обнаруживается в межклеточном пространстве. Этот белок является лигандом для рецепторной системы *CLV1-CLV2*. Его синтез происходит в поверхностных слоях ПАМ; мигрируя к образовательному центру, он необратимо связывается с рецепторами, в результате чего запускается киназный каскад, а дальнейшее продвижение движение *CLV3* блокируется рецептором [Lenhard, Laux, 2003]. Избыточная экспрессия (в процитированной работе был использован конститутивный промотор) *CLV3* приводит к уменьшению уровня экспрессии *WUS*, что приводит к развитию фенотипа, сходного с мутантами *wus* [там же].

В целом фенотип мутантов *clv2* схож с фенотипом мутантов по остальным генам группы *CLAVATA*, но в целом более «мягкий», фасциация побега обычно не выражена [Kayes, Clark, 1998]. Белковый продукт гена *CLV2* представляет собой трансмембранный рецептор-подобный белок (receptor-like protein, RLP), структурно достаточно схожий с *CLV1* [Jeong et al., 1999]. В его состав также входят трансмембранный и внеклеточный домены; последний состоит из лейцин-обогащенных повторов (leucine-rich repeat, LRR), что может свидетельствовать о его рецепторной функции. В то же время внутриклеточный домен *CLV2* очень мал и едва ли может иметь самостоятельную киназную активность, присущую, например, *CLV1*. Некоторые результаты анализа структуры белка, проведенные S. Jeong с соавторами [1999] (наличие в определенных районах пептидной цепи способного к образованию дисульфидных мостиков цистеина, разница рН предполагаемых областей контакта), дают основания предположить, что белки *CLV1* и *CLV2* формируют в клетке гетеродимерный комплекс. В пользу этой гипотезы свидетельствует очень низкое содержание белка *CLV1* в тканях мутантов *clv2* хотя уровень экспрессии *CLV1* в них не изменен. Такие изменения могут означать преждевременную деградацию *CLV1* в отсутствие второго важного компонента активного белкового комплекса. Любопытно, что белок *CLV1* у мутантов *clv2* сохраняется в составе нетипичного комплекса с молекулярной массой около 600 кДа, что, вероятно, указывает на наличие альтернативных

(CLV2-независимых) регуляторных путей с участием CLV1. Это могло бы объяснить более «мягкий» фенотип мутантов *clv2* по сравнению с *clv1* и *clv3* [Jeong et al., 1999].

В ходе экспериментов, описанных S.E. Clark с соавторами [1996], показано, что гены *CLV* выполняют противоположную по отношению к *STM* функцию, т.е. *STM* инициирует формирование меристемы, а *CLV* подавляют ее пролиферацию. У двойных мутантов *clv1 stm* и *clv3 stm* отмечалось частичное восстановление функции ПАМ: меристема закладывалась на более поздних стадиях, чем у нормальных растений, и пролиферировала нормально, в некоторых случаях становясь фасцированной. Отчасти восстанавливалась и структура цветка: закладывались плодолистки, которые в норме для растений *stm* нехарактерны [Clark et al., 1996].

Ген *CLV3* участвует также в альтернативном (*CLV1*-независимом) пути подавления активности *WUS*. Рецептор-подобная киназа CORYNE (CRN) может служить рецептором *CLV3* и образует комплекс с *CLV2* [Müller et al., 2008]. Структура белка CRN сходна с таковой прочих рецептор-подобных белков, но внеклеточный (собственно рецепторный) домен отсутствует; у *CLV2*, напротив, отсутствует цитоплазматический киназный домен (см. выше). Мутант *crn* фенотипически схож с мутантами *clv*, отмечаются фасциация побега, увеличение числа органов в цветке. Структура гена и его продукта, как и особенности экспрессии и последствия сверхэкспрессии у трансгенных растений, изучены достаточно детально [Müller et al., 2008].

Ортологи генов семейства *CLV* были описаны у целого ряда растений, включая бобовые: соя [Yamamoto et al., 2000; Searle et al., 2003], горох [Коновалов, 2006], кукуруза [Taguchi-Shiobara et al., 2001] и некоторые культурные формы крестоцветных [Мартынов и др., 2004]. Необходимо отметить, что функциональная гомология (сохранение роли в регуляции активности АМ) была подтверждена не для всех перечисленных объектов. Как уже было отмечено выше, рецептор-подобные киназы (RLK) представляют собой очень распространенный компонент сигнальных систем растений и принимают участие в самых различных процессах - например, в формировании репродуктивных органов, как гены семейства *BARELY ANY MERISTEM (BAM)* [Hord et al., 2006].

Супрессором мутаций *clv1*, *clv2* и *clv3* является ген *POLTERGEIST (POL)* [Yu et al., 2000], не имеющий самостоятельного фенотипического проявления. У двойных мутантов *clv pol* происходит ограничение разрастания меристем побега и

цветка; при этом влияние оказывается специфическим. Так, у мутантов *pol ag* (у мутантов *agamous* также развиваются цветки с избыточным числом органов) восстановления дикого типа не происходит. Таким образом, *POL* является синергистом *WUS*, что также подтверждается анализом фенотипа двойных мутантов. В то же время *POL* и *STM*, вероятно, функционируют в независимых путях генетического контроля активности ПАМ. Структура и предполагаемый белковый продукт *POL* неизвестны [Yu et al., 2000].

Важными для негативной регуляции экспрессии *WUS* также представляются гены семейства *FASCIATA* (*FAS1*, *FAS2*) [Kaya et al., 2001]. У мутантов *fas* нарушения происходят при развитии и побега (фасциация, утрата четкой границы зон), и корня (укорочение, нарушения дифференцировки), что свидетельствует об участии *FAS*-генов в регуляции морфогенеза апикальных меристем обоих типов осевых органов. Подобное заключение подтверждается и анализом экспрессии у мутантов двух ключевых маркерных генов апикальных меристем побега и корня - *WUS* и *SCR* (*SCARECROW*, также см. ниже) соответственно. Так, в ПАМ мутантов *fas* происходит повышения уровня экспрессии *WUS*, а в АМ корня отмечаются разнообразные нарушения области экспрессии *SCR*, т.е. эктопическая экспрессия. Эмбриогенез у мутантов протекает без видимых нарушений. Белки *FAS1* и *FAS2* представляют собой две субъединицы (из трех) фактора организации хроматина (*Chromatin Assembly Factor-1*, *CAF-1*), уже известного для человека и дрозофилы. Предсказанные аминокислотные последовательности белков *FAS1* и *FAS2* (протяженностью 815 и 487 аминокислотных остатков соответственно) содержат характерные функциональные элементы (например, так называемый *KER*-домен у *FAS1*) и достаточно консервативны. Н. Кауа с соавторами [2001] предполагают, что регуляторная роль генов *FAS* связана с пространственной организацией и компактизацией ДНК после трансляции, в результате чего обеспечивается нормальный эпигенетический статус ключевых генов - факторов контроля морфогенеза.

Необычный для *A. thaliana* тип фасциации отмечается у мутантов *mgoun1* и *mgoun2* (*mgo1*, *mgo2*; от названия горного массива). Одновременно с гребневидным разрастанием ПАМ наблюдается уменьшение числа листьев и органов цветка [Laufs et al., 1998]. Показано, что нарушения в структуре ПАМ у мутантов *mgoun1* происходят уже в ходе эмбриогенезе, в то время как у *mgoun2* - на более поздних стадиях. Область экспрессии *STM* у мутантов значительно увеличена. По мнению Р. Laufs с соавторами [1998], гены *MGOUN* играют



ключевую роль в негативной регуляции размеров ПАМ и закладке латеральных примордиев.

Еще одним негативным регулятором размеров апикальной меристемы является ген *TONSOKU* (*TSK*; синонимы *BRU1*, *MGOUN3*) [Suzuki et al., 2004]. Характерной особенностью этого гена является его участие в процессах регуляции как побеговой, так и корневой апикальных меристем. У мутантов *tsk* наблюдается фасциация побега, укорочение и раздвоение главного корня (отсюда название мутации: *tonsoku* - яп. «копыто»), уменьшенным числом органов в цветке. Показано, что экспрессия гена *WUS* у мутантов *tsk* приурочена к нескольким центрам в пределах увеличенной ПАМ, а экспрессия *CLV3* уменьшена. В то же время, экспрессия маркера *SCARECROW* (*SCR*), характерного для покоящегося центра корня (ПЦ, quiescent centre, QC), у мутантов отсутствует. Анализ структуры гена *TSK* показал, что он кодирует белок, состоящий из 1311 аминокислот. В составе предполагаемого продукта *TSK* выявлены лейцин-обогащенные повторы (LRR) и четыре так называемых лейцин-глицин-аспарагиновых повтора (LGN). Такая структура предположительно может быть связана с белок-белковыми взаимодействиями. Экспрессия гена *TSK* у проростков отмечается в корнях и обширной области между семядолями, включающей их основания. Белок *TSK* локализуется исключительно в ядре и, согласно исходному предположению [Suzuki et al., 2004], связан со специфической укладкой белков. В более поздней работе [Guyomarç'h et al., 2004] обсуждается сходство белка *MGO3* с известными *LGN*-белками, которые у животных участвуют в определении положения веретена деления. Вероятно, если функция *MGO3* сходна, нарушения упорядоченности клеточных делений могут служить объяснением плеiotропного проявления мутации.

Определенную роль в ограничении размеров апикальной и флоральной меристем играет ген *PLURIPETALA* (*PLP*) [Running et al., 2004]. Мутанты *plp* характеризуются выраженной фасциацией побега, увеличением числа органов цветка, аномальной формой и размерами эпидермальных клеток, замедленным ростом. Мутанты также обладают пониженной чувствительностью к экзогенной абсцизовой кислоте. Картирование и анализ структуры гена *PLP* показали, что его продуктом является  $\alpha$ -субъединица фермента фарнезилтрансферазы, которая также входит в состав ферментного комплекса геранилгеранилтрансферазы I (белок PFT/PGGT-I $\alpha$ ). Отсутствие этого белка у мутантов было также подтверждено иммунофлуоресцентными методами. Оба фермента участвуют в

важном клеточном процессе пренилирования: ковалентном присоединении пренильного радикала (фарнезила или геранилгеранила) к С-концу белковых молекул. Такая модификация приводит к ассоциации белков с внутренней или внешней поверхностью мембраны и/или внеклеточной локализации большого числа белков и достаточно консервативна для всех эукариот. К белкам, подверженным такому преобразованию, относится, например, обширное семейство Ras, включающее в себя ГТФ-связывающие белки различной функциональной принадлежности (липопротеиновые феромоны, ламины и др.) [Ziegelhoffer et al., 2000]. Любопытно, что M.P. Running с соавторами [2004] рассматривают мутант *p/p* как перспективную модель для изучения процесса пренилирования, который представляется чрезвычайно важным в понимании закономерностей процесса малигнизации.

Пренилирование белков важно для нормального протекания некоторых морфогенетических процессов у гороха. Так, развитие плода после оплодотворения связано с активностью двух генов, *GIC4* и *GIC19*, продукты которых вовлечены в метаболизм гиббереллинов и нуждаются в пренилировании для активации [Rodríguez-Concepción et al., 2001].

Нарушение того же процесса наблюдается и у мутантов *A. thaliana* по гену *ENHANCED RESPONSE TO ABSCISIC ACID1* (*ERA1*, синоним *WIGGUM*, *WIG*) [Ziegelhoffer et al., 2000]. Ген *ERA1* кодирует  $\beta$ -субъединицу фарнезилтрансферазы. Мутанты *era1* имеют характерный фенотип: фасцированный побег, дополнительные органы в цветке (зачастую неправильного строения), замедленное развитие, низкую всхожесть [там же]. Примечательна также гиперчувствительность к экзогенной абсцизовой кислоте, давшая название мутации. Изучение экспрессии этого гена методом гибридизации *in situ* показало, что мРНК *ERA1* обнаруживается практически во всех органах на различных стадиях развития, что, вероятно, может служить дополнительным свидетельством в пользу важности процесса пренилирования для нормального протекания онтогенеза.

Участие малых РНК, которым придается большое значение в процессах регуляции у растений, в контроле активности ПАМ также было показано при изучении целого ряда форм, среди которых интерес в рамках настоящей работы представляет фасцированный мутант *jabba-1D* (*jba-1D*) [Williams et al., 2005]. Помимо фасциации побега у растений *jba-1D* отмечается формирование радиально-симметричных листьев и аномального гинцея; мутация доминантна.

Экспрессия *WUS* у мутантов выше, чем у растений дикого типа, иногда приурочена к нескольким центрам. Постулировано, что весь комплекс нарушений у мутанта связан с увеличением уровня экспрессии гена *miR166g*, который кодирует малую регуляторную РНК.

Таким образом, возможны несколько механизмов регуляции уровня экспрессии гена *WUS*: путем ограничения числа клеток, в которых экспрессируется этот ген (*CLV*-зависимый путь) или как следствие изменения активности транскрипции (опосредованно через малые РНК). Альтернативный (или, точнее, дополнительный) путь осуществления негативной регуляции связан с белками, вовлеченными в организацию хроматина и фолдинг (семейство *FAS*, *TSK*). Фенотипы мутантов с нарушениями негативной регуляции экспрессии *WUS*, однако, схожи вне зависимости от типа механизма.

Сравнительно недавно описан ген *AtFAS4*, избыточная экспрессия которого в составе генноинженерной конструкции приводит к выраженной фасциации побега [Pogorelko et al., 2008]. Белок, кодируемый этим геном, предположительно обладает хеликазной активностью. Особенности взаимодействия этого гена с ранее известными генами, контролирующими активность ПАМ, в настоящее время не охарактеризованы.

Потеря негативного контроля увеличения ПАМ, приводящая в конечном итоге к фасциации побега, представляется очень частым нарушением развития у *A. thaliana*. Классические тератологические сводки описывают фасциацию у огромного числа растений [Worsdell, 1915; Binggeli, 1990]. Столь сложная система контроля этого компонента активности ПАМ, безусловно, является подверженной внешним и внутренним воздействиям, что приводит к частым случаям фасциации в лабораторных и естественных условиях.

### **1.3.3.2. Позитивная регуляция активности гена *WUSCHEL***

К настоящему времени описаны несколько генов, осуществляющих позитивную регуляцию экспрессии *WUS*. Одним из таких регуляторов является ген *STIMPY* (*STIP*), кодирующий гомеодомен-содержащий белок, отчасти сходный по структуре с *WUS* [Wu et al., 2005]. У мутантов *stip* отсутствует экспрессия генов *WUS* и, как следствие, *CLV3*. Авторы упомянутой работы предполагают, что ген *STIP* в норме стимулирует переход клеток ПАМ к делению. Любопытно, что восстановление нормального фенотипа отмечалось при экзогенной обработке мутантов *stip* сахарозой, которая, вероятно, способна стимулировать деления

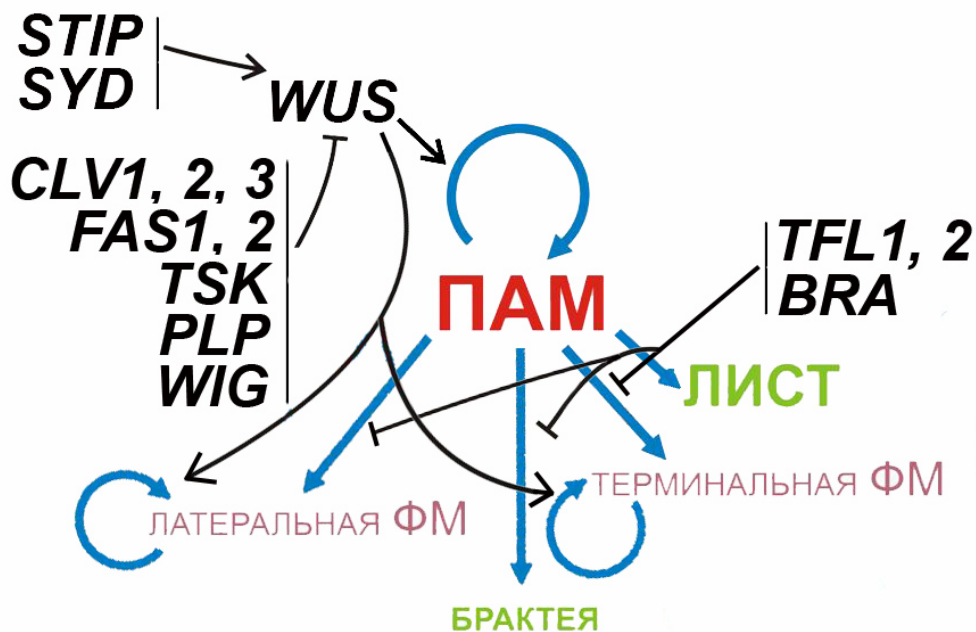
клеток. Полученные X. Wu с соавторами [2005] результаты впервые показали связь меристематической активности с питанием растения.

Уже задействованный в пути негативной регуляции экспрессии *WUS* регуляторный механизм, связанный с организацией структуры хроматина, оказался действенным и в позитивной регуляции активности этого ключевого гена. Ген *SPLAYED* (*SYD*) кодирует фактор организации хроматина с АТФазной активностью, который специфически и позитивно регулирует уровень транскрипции *WUS* [Kwon et al., 2005].

В целом позитивная регуляция экспрессии *WUSCHEL* изучена слабее, чем негативная - возможно, это отражает в целом больший вклад последней в процессы регуляции активности ПАМ.

#### **1.3.4. Формирование латеральных производных**

Обсуждая этот аспект генетического контроля морфогенеза у *A. thaliana*, необходимо отметить, что речь идет именно об инициации (а не дифференциации) латеральных органов - в первую очередь, филломов. Формирование осей более высокого порядка (цветки, параклади и др.) происходит за счет пролиферации меристем в пазухах этих филломов и имеет независимый от ПАМ генетический контроль.



**Рис. 4.** Схема регуляции генетического контроля активности ПАМ у *Arabidopsis thaliana*, пояснения в тексте.

→ - позитивная регуляция; ⊥ - негативная регуляция; ∞ - пролиферация; ФМ - флоральная меристема.

Несколько генов участвуют в подавлении инициации и развития кроющих филломов соцветия - брактеей. В норме для *A. thaliana* характерно абрактеозное соцветие, однако более или менее развитые листовидные структуры развиваются на цветоносах целого ряда мутантов: *bractea* [Ежова, Пенин, 2001], *terminal flower1* [Shannon, Meeks-Wagner, 1993] и некоторых других [Пенин, Будаев, 2006]. Характерно, таким образом, сопряжение негативной регуляции формирования терминального цветка и кроющих филломов.

Первым описанным мутантом *Arabidopsis*, у которого не формируются цветки, является *pin-formed1 (pin1)* [Okada et al., 1991; цит. по: Bennett et al., 1995]. Главный побег дает начало розеточным и стеблевым листьям, но соцветие фактически не развивается: ось завершается коротким стерильным отростком и не несет цветков.

Цветки не формируются также у мутантов по гену *PINOID (PID)*. Ось соцветия формирует несколько латеральных цветков и затем завершается стерильным отростком. Цветок также развивается с меньшим числом органов, чем это характерно для нормальных растений, зачастую формируется гинофор [Bennett et al., 1995]. Сходные наблюдения получены и в работах отечественных специалистов по изучению мутанта *abruptus (abr)*, аллельного *pid* [Ежова и др.,

1997]. Любопытно отметить, что ген *TFL1*, также поддерживающий пролиферативную активность ПАМ (см. выше), проявляет эпистатическое действие по отношению к *PID*: у двойных мутантов *tf11 pid* формируется терминальный цветок [Bennett et al., 1995].

Было показано, что белковые продукты генов *PID* и *PIN1* связаны с полярным транспортом ауксина в побеге, определяющим инициацию латеральных производных и их пространственное расположение. Именно этим обстоятельством объясняются, например, нарушения в расположении и числе семядолей у проростков описанных мутантов [Furutani et al., 2004].

Основные аспекты генетического контроля активности ПАМ у *Arabidopsis thaliana* приведены на рис 4.

Таким образом, к настоящему моменту у *A. thaliana* известно значительное число регуляторов активности апикальной меристемы. Однако даже классическая модель негативной регуляции размеров ПАМ (отрицательная обратная связь между группой *CLV* и геном *WUS*), основные черты которой были известны еще в начале 1990х гг., в последние годы претерпевает уточнения и дополнения [Müller et al., 2008; Rogorelko et al., 2008, и др.]. Таким образом, сложность регуляторных механизмов различных аспектов функционирования ПАМ требует дальнейшего детального изучения даже на модельных объектах. Морфогенез немодельных форм, помимо консервативных для всех растений аспектов, содержит целый ряд таксоноспецифических особенностей (связанных, в частности, со строением соцветия и архитектурой побега в целом в каждой отдельно взятой группе), изучение которых имеет большое практическое и теоретическое значение. Горох посевной представляется в этой связи одним из наиболее удобных в работе и хозяйственно важных объектов.

#### **1.4. Генетический контроль активности апикальной меристемы побега у гороха (*Pisum sativum* L.)**

Особенности генетического контроля активности ПАМ у гороха изучены в значительно меньшей степени, чем у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Если представить активность ПАМ в течение жизни растения в виде набора основных функций, то набор этот сходен с таковым у резуховидки: инициация, сохранение пролиферативной активности и недифференцированного состояния, поддержание константного объема, закладка латеральных органов. В отличие от резуховидки, у

гороха в пазухах листьев развиваются не цветки, а пазушные соцветия, т.е. все соцветие в целом сложное. Основные эволюционные и структурные тенденции развития соцветий Бобовых подробно проанализированы в работе [Weberling, 1989]. Немаловажно, что горох является единственным модельным объектом для изучения морфогенеза сложного соцветия.

Как уже было отмечено, с нарушениями поддержания постоянного объема ПАМ связаны случаи фасциации побега. У гороха посевного мутации, приводящие к фасциации, известны очень давно (первое документированное упоминание в 1597 г., см. [Blixt, 1972: 180]), а особенности их наследования были впервые изучены одновременно с появлением генетики - в классической работе Г. Менделя [Mendel, 1866]. При скрещивании фасцированных растений с нормальными в первом поколении наблюдалось единообразие (все растения были нефасцированными), а в  $F_2$  отмечено расщепление с соотношением фенотипических классов 3:1, т.е. фасциация наследуется как монофакторный рецессивный признак. Позднее ген, ответственный за развитие фасциации в этой линии, был назван *FASCIATA (FA)* [White, 1917] или, как предложено авторами работы [Swiecicki, Gawlowska, 2004], *FA1*.

Г. Лампрехт [Lamprecht, 1952] приводит данные о том, что расщепление в аналогичном скрещивании ближе к 15:1, делая на основании этого вывод о наличии второго гена (*FAS*), взаимодействующего с *FA* по типу некумулятивной полимерии: для проявления фасциации необходимо рецессивное состояние по обоим генам. Гипотеза о моногенной природе фасциации была повторно предложена позднее [Marx, Hagedorn, 1962]; признак был вновь охарактеризован как монофакторный с неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью. В настоящее время гипотеза о двух полимерных генах является основной [Catalogue...]; также описан ген *FA2*, локализованный в V группе сцепления и способный в мутантном состоянии вызывать фасциацию [Swiecicki, 2001; Swiecicki, Gawlowska, 2004]. Ген *FA* локализован в IV группе сцепления [Lamprecht, 1952], ген *FAS* - в III [Blixt, 1976].

Общее число генов, участвующих в развитии фасциации у гороха, по мнению К.К. Сидоровой [1970], составляет не менее 2-3. Учитывая, что число уже известных негативных и позитивных регуляторов размеров ПАМ у *Arabidopsis* значительно больше (см. выше), логично предположить, что и у гороха этот контроль весьма сложен.

К настоящему времени известны фасциированные мутанты и у ряда других бобовых - люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) [Коновалов и др., 1989], сои (*Glycine max* Merr.) [Albertsen et al., 1983], нута (*Cicer arietinum* L.) [Knights, 1993]. У описанных аномальных форм отмечаются сходные проявления фасциации - уплощение побега, нарушения филлотаксиса, сближение верхних узлов. В отличие от фасциированных мутантов *Arabidopsis*, ни у одной из известных фасциированных форм Бобовых не описаны изменения в структуре цветка, что может быть связано с различиями в архитектуре соцветия у Бобовых и Крестоцветных.

Кроме упомянутых, были описаны 2 мутанта гороха, у которых фасциация побега сочеталась с увеличением способности к образованию симбиотических клубеньков на корнях - нодуляции. Первый мутант был получен в России и назван *nod4* [Сидорова, Ужинцева, 1992, 1994; Sidorova, Uzhintseva, 1995]; установлено сцепление мутации с морфологическими маркерами V группы сцепления. Второй мутант был получен путем индуцированного мутагенеза (этилметансульфонат) во Франции и назван *sym28* [Sagan, Duc, 1996]. Данных о локализации гена *SYM28* на генетической карте нет. Мутанты *nod4* и *sym28* представляют особый интерес, поскольку процесс нодуляции характерен для бобовых и имеет несомненное хозяйственное значение. Генетический контроль нодуляции у гороха изучен достаточно хорошо, и к настоящему моменту известно достаточно много мутантов с нарушениями этого процесса [Borisov et al., 2004]. В то же время накоплены определенные наблюдения, свидетельствующие о чертах общности генетического контроля нодуляции и активности ПАМ. Так, *CLV1*-подобный ген *GmNARK* участвует в формировании симбиотических клубеньков на корнях сои *Glycine max* Merr. [Searle et al., 2003]. Немаловажно, что семейство рецептор-подобных киназ (receptor-like kinases, RLK), к которому относятся белки *CLV1* и *CLV2*, является одной из наиболее распространенных компонентов систем регуляции у растений. Именно поэтому не исключена возможность вовлечения одних и тех же киназных белков в различные процессы [Szczyglowski, Amiot, 2003].

Ни один из упомянутых выше генов не был у гороха охарактеризован с молекулярной точки зрения, данные о нуклеотидных последовательностях и особенностях экспрессии отсутствуют. Структурные гомологи генов *Arabidopsis thaliana* *CLV2*, *FAS1* и *FAS2* были охарактеризованы Ф.А. Коноваловым [2006], определено положение сходного с *FAS1* фрагмента на генетической карте (группа



сцепления V). Однако поиск соответствия между изученными фрагментами и описанными генами гороха не проводился.

Исторически фасцированные формы послужили исходным материалом при создании ряда сортов в различных странах [Swiecicki, 2001], но в целом характеризуются повышенной склонностью к полеганию [Паришкура, 1968] и чувствительностью к водному дефициту. Вероятно, поэтому фасцированные сорта не получили широкого распространения; в настоящее время в Российской Федерации нет районированных сортов, маркированных признаком фасциации [например: Коммерческие сорта..., 2003]. В то же время у ряда культур фасциацию оценивают как в целом перспективный признак - например, у гречихи [Петелина, Кадырова, 1998], хотя в отношении этого объекта существуют и альтернативная точка зрения [Сахаров, 1986].

Сохранение пролиферативной активности ПАМ связано с экспрессией гена *DETERMINATE (DET)*. У мутантов *det* ПАМ трансформируется (в работе [Singer et al., 1999] использован термин «гомеозисная замена») в меристему пазушного соцветия [Makasheva, Drozd, 1987; Swiecicki, 1987]. Строго говоря, с морфологической точки зрения соцветие у этого мутанта не является детерминантным, так как терминальный цветок не развивается [Singer et al., 1990] или развивается крайне редко. Показано, что ген *DET*, наряду с геном *LF (LATE FLOWERING)*, является функциональным гомологом гена *TFL1 Arabidopsis* [Foucher et al., 2003]. Сходство фенотипов мутантов *tfl1* резуховидки и *sen* львиного зева (и, в то же время, отличие от мутанта *det* гороха) связано, вероятно, с тем, что у последнего в норме развивается сложное соцветие - двойная кисть. У львиного зева и резуховидки соцветие простое. В настоящее время горох представляет собой единственный модельный объект для изучения морфогенеза сложного соцветия.

Формы с терминализованной пазушной кистью представляются весьма перспективными в селекции скороспелых сортов с практически одновременным созреванием бобов [Кондыков и др., 2006]. Ген *DET* локализован в VII группе сцепления и тесно сцеплен с другим хозяйственно важным геном *R (RUGOSUS)*, мутации в котором приводят к развитию морщинистых семян и закреплены в генотипе овощных сортов гороха. Формы *det r* и *det R* получены независимо и использованы в селекции скороспелых овощных и зерновых сортов соответственно.

В сохранении пролиферативной активности ПАМ участвует также ген

*UNIFOLIATA (UNI)* - один из ключевых генов морфогенеза гороха. Как уже было упомянуто выше, этот ген является ортологом гена *LEAFY (LFY)* резуховидки и играет важную роль в формировании цветка и сложного листа [Gourlay et al., 2000]. Соцветия мутантов *uni* сходны с таковыми у мутантов *det* - главная ось завершается цветоносом, сходным с пазушным, т.е. *UNI* позитивно регулирует экспрессию гена *DET*, и функции этих генов частично взаимозаменяемы [Singer et al., 1999]. Взаимодействие *UNI* и *DET* воспроизводит взаимодействия их гомологов у *A. majus* – генов *FLORICAULA (FLO)* и *CENTRORADIALIS (CEN)* соответственно. Так, показано, что *FLO* позитивно регулирует экспрессию гена *CEN* у *Antirrhinum* [Bradley et al., 1996]. Взаимодействие гомологичных генов у различных видов имеет, таким образом, определенные черты сходства, но во многом различно – в частности, в силу принципиально иной архитектуры соцветия у гороха.

Еще один тип детерминантности связан с мутациями в гене *DETERMINATE HABIT (DEH)* [Яковлев, 1992]. У форм *deh* происходит преждевременное отмирание апекса, сопровождающееся недоразвитием листьев или их прилистников в верхней части побега: происходит редукция листа вплоть до чешуевидной структуры. По мнению И.В. Кондыкова с соавторами [2006], редукция апекса «определяется недостатком пластических веществ, вызванным уменьшением площади фотоассимилирующей поверхности в этой зоне растения». В то же время в процитированной работе отмечено, что в определенных условиях подавление развития прилистников не происходит или после закладки нескольких узлов с редуцированными листьями продолжается рост (израстание) без отклонений от нормы.

Противоречивые данные получены и в отношении генетического контроля такого типа детерминантности. Так, в работе Т.А. Бабайцевой [1996] описаны отклонения от расщепления 3:1 (как в сторону дефицита форм дикого типа, так и в сторону дефицита форм *deh*) в  $F_2$  от скрещивания детерминированных форм с нормальными. Также отмечено появление фенотипического класса детерминированных форм (9.6-36.8%) уже в  $F_1$ . Первое обстоятельство может быть связано с климатическими условиями региона, в котором проводили исследования, а последнее - с неоднородностью использованного материала [А.Н. Зеленов, личное сообщение]. При изучении взаимодействия мутаций *det* и *deh* И.В. Кондыков с соавторами [2006] описывают аддитивное проявление признака «тип роста» у двойных мутантов *det deh*. В то же время В.А. Шевченко и

И.А. Шевченко [1990] вообще не обнаружили двойных мутантов в очень больших выборках гибридов второго поколения, выдвинув гипотезу о летальности такой комбинации рецессивных аллелей. Таким образом, особенности проявления и наследования гена *deh* требуют дополнительного изучения.

Рядом авторов обнаружено сцепление гена *DEH* с морфологическими [Зубов, Князькова, 1989] и молекулярными [Чегамирза, 2004] маркерами III группы сцепления. Многие современные сорта гороха обладают детерминированным типом роста, связанным с мутацией *deh* (например, серия сортов Флагман Самарского НИИСХ им. Н.М. Тулайкова).

Еще одним аспектом функционирования ПАМ является формирование латеральных производных - листьев и побегов низшего порядка. Особый интерес вызывает генетический контроль формирования пазушных соцветий («коротких паракладиев» в терминах, использованных в работе [Weberling, 1989]). Первый узел, в котором развивается пазушное (у гороха обычно двухцветковое) соцветие, носит название узла инициации цветения (node of flowering initiation, NFI). Очевидно, что смещение этого узла в базальном направлении приводит к более раннему зацветанию. Как уже упоминалось выше, у резуховидки функцию регуляции времени зацветания отчасти выполняет ген *TFL1*. У гороха две его функции разделены между его двумя гомологами - *DET* (поддержание пролиферативной активности ПАМ) и *LF* (задержка инициации цветения) [Foucher et al., 2003]. У мутантов *lf* узел инициации цветения имеет меньший порядковый номер, чем у растений дикого типа. Описаны несколько аллелей с различной степенью экспрессивности:  $Lf-d > Lf > lf > lf^a$  [Murfet, 1975]. У гомозигот по наиболее «жесткому» аллелю *lf<sup>a</sup>* цветение начинается с 5 узла. Более подробная информация о генах, контролирующих переход к цветению у гороха, приведена в обзорной работе J. Weller [2007].

Антагонистами гена *LF* являются гены семейства *VEGETATIVE* (*VEG1* и *VEG2*). Мутант *veg1* никогда не цветет и в коллекциях может быть сохранен только в гетерозиготном состоянии [Singer et al., 1999]. Этот ген локализован у гороха и люцерны рядом с гомологами генов *A. thaliana FRUITFULL* и *SEPALLATA1* [Hecht et al., 2005], которые у резуховидки играют важную роль в морфогенезе, хотя детальный анализ его структуры в авторами процитированной работы не был проведен. Второй ген, *VEG2*, отчасти дублирует функцию *VEG1*. Мутанты по «жесткому» аллелю *veg2-1* также не формируют пазушных соцветий, в то время как у гомозигот *veg2-2* наблюдается значительная изменчивость

структуры осей второго порядка на протяжении онтогенеза. Формируются как типичные пазушные вегетативные побеги, так и практически нормальные пазушные соцветия со всеми переходами между этими крайними типами [Weller, 2007].

У двойных мутантов *det veg1* формируется единственный цветок неправильного строения, занимающий терминальное положение на главной оси и, по-видимому, являющийся результатом объединения истинно терминального и приближенного к нему латерального цветков [Singer et al., 1999]. Кроме того, цветок аномального строения завершает главную ось у мутантов *stp* [Taylor et al., 2001]. В настоящее время известно всего два вида бобовых, у которых главная ось в норме терминируется цветком - *Gleditsia triacanthos* L. и *Gymnocladus dioica* (L.) K. Koch. [Weberling, 1989]. Не исключено, что гену *DET* принадлежит важная роль в эволюционной линии редукции терминального цветка, а затем и терминального соцветия (пути терминального усечения соцветия).

Очевидно, что изучение генетического контроля активности апикальной меристемы у гороха посевного представляет значительный теоретический и практический интерес. Особенности регуляции морфогенеза у объекта со сложным соцветием остаются в целом малоизученными, а изучение характера фенотипического проявления и наследования различных генетически обусловленных вариантов строения побега перспективно для создания исходного материала в селекции этой ценной культуры. Представленная работа обобщает результаты исследований мутантов гороха с измененной активностью апикальных меристем осей разных порядков.

## Материалы и методы

### 2.1. Линии гороха, использованные в работе, и условия культивирования

В работе использованы сорта, мутанты и маркерные линии *Pisum sativum* из коллекции кафедры генетики. Происхождение и краткое описание использованных форм дано в табл. 1-3. Растения выращивали в полевых условиях на опытном участке Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского МГУ в период с мая по август 2006-2009 гг. Кроме того, для культивирования использовали теплицу-бокс биологического факультета МГУ.

**Таблица 1.** Характеристика форм с нарушенной активностью ПАМ, использованных в работе.

Название	Характеристика	Морфологические маркеры	Происхождение	Примечание, ссылки
Rosacrone	Фуражный сорт	Розовая окраска венчика ( <i>b</i> ); фасциация ( <i>fa</i> )	Германия	
«Штамбовый»	Индукцированный мутант, полученный из сорта Немчиновский-766 (ЭМС)	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); фасциация ( <i>fas</i> )	Кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова	[Рехматулла, Гостимский, 1976]
J15	Маркерная линия	Розовая окраска венчика ( <i>b</i> ); фасциация ( <i>fa fas</i> )*	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
J12671	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); фасциация ( <i>fas</i> )*	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
J12771	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); фасциация ( <i>fas-2</i> )*	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
P64	Индукцированный мутант, полученный из сорта Frisson (ЭМС)	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); гипернодуляция и фасциация ( <i>sym28</i> )	Франция	[Sagan, Duc, 1996]
«Люпиноид»	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a, b</i> ); детерминантный тип роста ( <i>def</i> ); фасциация ( <i>fa</i> ),	ВНИИЗБК, Орел, Россия	

		зеленые семядоли ( <i>i</i> )		
K301	Индукцированный мутант, полученный из сорта Рамонский 77 при обработке N-нитрозо-N-этилмочевинной	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); гипернодуляция и фасциация ( <i>nod4</i> )	ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия	[Сидорова, Ужинцева, 1994; Sidorova, Uzhintseva, 1995]
ДТР	Овощной сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); детерминантный тип роста ( <i>det</i> ); семена морщинистые ( <i>r</i> )	ВНИИССОК, Лесной Городок, Россия	[Попова, 1972]
ДТР-м	Маркерная линия	Розовая окраска венчика ( <i>b</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); редуцированные прилистники ( <i>st</i> ); детерминантный тип роста ( <i>det</i> ); семена морщинистые ( <i>r</i> ), сцепленные ( <i>s</i> )	Кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова	

\* - генотип форм из Центра Джона Иннеса приведен в соответствии с [Catalogue...] и находится в противоречии с полученными результатами, см. раздел «Результаты и обсуждение».

**Таблица 2.** Характеристика маркерных линий, использованных в работе.

Название	Характеристика	Морфологические маркеры	Происхождение	Примечание, ссылки
WL 1238	Маркерная линия	Розовая окраска венчика ( <i>b</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); редуцированные прилистники ( <i>st</i> ); редуцированный венчик ( <i>k</i> ); желтая окраска незрелых бобов ( <i>gp</i> ); семена морщинистые ( <i>r</i> ), сцепленные ( <i>s</i> ); боб узкий ( <i>te</i> ), изогнутый ( <i>cp</i> ); безусиковый лист ( <i>tl</i> ); отсутствие воскового налета ( <i>wb</i> ); стебель ветвящийся ( <i>fru</i> )	Институт генетики сельскохозяйственных растений, Швеция	

WL 1132	Маркерная линия	Розовая окраска венчика ( <i>b</i> ); желтая окраска незрелых бобов ( <i>gp</i> ); семена морщинистые ( <i>r</i> )	Институт генетики сельскохозяйственных растений, Швеция	
WL 102	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); безусиковый лист ( <i>tl</i> ); ускоренное зацветание ( <i>lf<sup>a</sup></i> )	Институт генетики сельскохозяйственных растений, Швеция	
«Хамелеон»	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); измененная морфология листа ( <i>af uni<sup>fac</sup></i> )	ВНИИЗБК, Орел, Россия	[Зеленов и др., 2000]
«Новая форма 42»	Маркерная линия	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); дефект пигментации ( <i>chi42</i> ); листовой фенотип «pleiofila» ( <i>af tl</i> )	Кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова	

**Таблица 3.** Характеристика образцов, сортов и линий, использованных в работе в качестве контроля.

Название	Характеристика	Морфологические маркеры	Происхождение	Примечание, ссылки
Флагман	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); детерминантный тип роста ( <i>deh</i> )	НИИСХ им. Н.М. Тулайкова, Самара, Россия	
Filby	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> ); безлисточковый лист ( <i>af</i> ); редуцированные прилистники ( <i>st</i> )	Великобритания	
Немчиновский-766	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> )	НИИСХ ЦРНЗ, Москва, Россия	
Frisson	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ); карликовость ( <i>le</i> )	Франция	
Cao lan	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> )	Китай	
Wasta	Зерновой сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> ), безлисточковый лист ( <i>af</i> )	Польша	
Alaska	Овощной сорт	Отсутствие антоциана ( <i>a</i> )	США	

J11794	" <i>P. humile</i> Boiss. & Noe"	Д.т.	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	Более корректно <i>Pisum sativum</i> L. subsp. <i>elatius</i> (Steven ex M. Bieb.) Asch. & Graebn. var. <i>pumilio</i> Meikle
J12	<i>P. sativum</i> subsp. <i>abyssinicum</i> (A. Braun) Berger	Д.т.	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
J164	<i>P. sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (Steven. ex M. Bieb.) Asch. & Graebn.	Д.т.	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
J12423	<i>P. sativum</i> L. subsp. <i>arvense</i> (L.) Tzvelev	Д.т.	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
J11392	<i>P. fulvum</i> Sibth. & Sm.	Д.т.	Центр Джона Иннеса, Норвич, Великобритания	
<i>Vavilovia formosa</i> (Stev.) Fed.	Гербарный образец	Д.т.	Гербарий Московского Университета им. Д.П. Сырейщикова (MW!)	Синоним <i>Pisum formosum</i> (Stev.) Alef.; см. [Макашева и др., 1973; Sinjushin et al., 2009]

## 2.2. Выделение ДНК

ДНК выделяли из свежесобранного материала (листья) с использованием СТАВ-метода [Torres et al., 1993] с некоторыми модификациями. Проверку качества выделения ДНК осуществляли при электрофорезе в агарозном геле (см. ниже). Препарат геномной ДНК разбавляли деионизированной водой в 10-20 раз и использовали в дальнейшей работе. Хранение выделенной ДНК осуществляли при температуре -20°C.



### 2.3. Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию проводили в приборе MC2+ (ДНК-Технология). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал по 0.5 мкМ прямого и обратного праймера (Евроген, Россия; последовательности праймеров приведены в Табл. 4), 2.5 мкл 10× стандартного ПЦР-буфера (Силекс М., Россия), 2.5 единицы активности термостабильной Taq-полимеразы (Силекс М.), по 250 мкМ каждого дНТФ (Силекс М.), раствор геномной ДНК до 25 мкл. Для предотвращения испарения амплификата на поверхность жидкости наслаивали минеральное масло (Sigma). Амплификацию проводили по следующей программе:

1. Начальная денатурация – 2 мин 30 сек при 94°C
2. 5 циклов  
30 сек при 24°C  
30 сек при  $T_m + 2^\circ\text{C}$   
1 мин 30 сек при 70°C
3. 35 циклов  
20 сек при 93°C  
30 сек при  $T_m$   
1 мин при 71.5°C
4. Конечная элонгация – 3 мин при 72°C

Температуру отжига ( $T_m$ ) определяли для каждой пары праймеров с использованием программы Sigma-Genosys DNA Calculator (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNAcalc.asp>) и оптимизировали в ходе эксперимента.

**Таблица 4.** Параметры ПЦР и последовательности праймеров, использованных в работе.

Маркер	Тип	Последовательность (прямой и обратный)	$T_m$ , °C	Источник
<i>Adh1</i>	CAPS	5'-CACCTCCSTTTGCCACACTG 5'-CGGTACATTCAACAGCTCGATC	65	[Коновалов, 2006]
<i>CipPor</i>		5'-ACTGCTAAGGCTTTGGCTGA 5'-AGATTTTGTTAGGCTTGGATCACT	65	[Brauner et al., 2002]
<i>Egl1</i>		5'-TGGTCTCTCTGATGGTCTTC 5'-GCACCAGCATATTTGTTGTC	58	[Коновалов, 2006]
<i>Fbpp</i>		5'-CCTTACTCTCSTTCACGTCT 5'-CTTTTCAACSTTCTCCACCT	60	То же
<i>GprAll</i>		5'-TAGCAGAAATCGGCGTTATC 5'-CAGTCTGTTCTTGCTTTCATCC	60	То же

<i>Pepcn</i>		5'-GCAAAAGTGAGTGAAGATG 5'-GCTTGGAAAACATTAAGGGTTG	60	[Brauner et al., 2002]
<i>PhLypC</i>		5'-CACAGAGAATGAAGCACAATC 5'-GCAACCAACTATCCTCTACTGT	60	[Коновалов, 2006]
<i>PK4</i>		5'-CATCAAAAGAAGTCATAGGAAG 5'-CTATACTTTTCATCAATGGAATCAC	58	То же
<i>PsFAS1</i>		5'-CGTTGTCKAAGCTTGTWGAGT 5'-AGCTTCWCWTCTATTTYTMTCC	55	[Коновалов, 2006; Sinjushin et al., 2008]
<i>PsFAS2</i>		5'-GATACCCATGCACACTATGTTC 5'-CAAGTAGAAATGAACCATCWGGAG	60	[Коновалов, 2006]
<i>PsCLV2</i>		5'-CCTGAGAGTTTRCTKTATTTGAAGTC 5'-GAGAAAGATACYTGAGGTTKGWCC	58	[Коновалов, 2006; Sinjushin et al., 2008]
<i>Rnp33</i>		5'-ATGTCTGTAACCTCCACCACT 5'-CTGTCTTCAGCAACACTTACT	56	[Коновалов, 2006]
<i>Sodmt</i>		5'-ACTGCTAAGGCTTTGGCTGA 5'-AGATTTTGTTAGGCTTGGATCACT	65	То же
<i>TubAl</i>		5'-GGAAACGCCTGCTGGGAG 5'-AACAGTTGGAGGCTGATAAT	63	[Brauner et al., 2002]
<i>AA122</i>	SSR	5'-GGGTCTGCATAAGTAGAAGCCA 5'-AAGGTGTTCCCTAGACATCA	58	[Loridon et al., 2005]
<i>AA349</i>		5'-ACCATGAATCCCATATAGAGAG 5'-GTTTGATCCCAATATCTTACCA	58	То же
<i>AA355</i>		5'-AGAAAAATTCTAGCATGATACTG 5'-GGAAATATAACCTCAATAACACA	58	То же
<i>AA430942</i>		5'-CTGGAATTCTTGCGGTTTAAC 5'-CGTTTTGGTTACGATCGAGCTA	58	То же
<i>AB30</i>		5'-GATTCTTGAACATCGTGCAGTG 5'-CATTTGAGCTTTCTGGATGACG	58	То же
<i>AB45</i>		5'-ATTACACCAACAATCTCCCACT 5'-TGTAGAAGCATTTGGGTAGTTG	58	То же
<i>AD79</i>		5'-ACAAGACTTCCAGAAATTTTGCAT 5'-AGGACTGATGACGGAGACAAAG	58	То же
<i>AD175</i>		5'-CTTGTGCAGAAGCATTTGATTA 5'-AGAGACAATGGATGCTCATAGT	58	То же

Примечание: R = A/G, K = G/T, W = A/T, Y = C/T.

#### 2.4. Обработка ПЦР-фрагментов эндонуклеазами рестрикции

Для выявления полиморфизма в последовательностях уникальных фрагментов (CAPS-маркеры) использовали эндонуклеазы рестрикции *Tru9I*, *AluI*, *TaqI*, *RsaI*, *HaeIII*, *AspI*, *HpaI*, *HinfI*, *PspN4I*, *BstDEI*, *Bst4CI* и *BstFNI* (производство СибЭнзим, Россия). Сайты узнавания всех перечисленных ферментов состоят из 4 п.о. (или эквивалентны по своей специфичности 4 п.о. с учетом вырожденных нуклеотидов) (табл. 5).

При постановке расщепления ПЦР-продуктов эндонуклеазами рестрикции полученный в результате ПЦР амплификат наносили на агарозный гель и подвергали электрофорезу (см. ниже) для определения количества ДНК в образце. В зависимости от концентрации изучаемого фрагмента в амплификате последний разбавляли деионизированной водой в 2 раза или не разбавляли (в

случае невысокой концентрации ДНК). Также добавляли рекомендованный фирмой-производителем буфер до конечной концентрации 1×. При обработке эндонуклеазой *TaqI* добавляли также раствор BSA (10 мг/мл). Реакцию проводили при рекомендованной производителем температуре (табл. 5)

**Таблица 5.** Параметры эндонуклеаз рестрикции, использованных в работе.

Название	Сайт узнавания	Температура, °С	Буфер
<i>AluI</i>	AG <sup>^</sup> CT	37	Y
<i>AspLEI</i>	GCG <sup>^</sup> C	37	O
<i>Bst4CI</i>	ACN <sup>^</sup> GT	65	Y
<i>BstDEI</i>	C <sup>^</sup> TNAG	60	G
<i>BstFNI</i>	CG <sup>^</sup> CG	60	Y
<i>HaeIII</i>	GG <sup>^</sup> CC	37	G
<i>HinPI</i>	G <sup>^</sup> ANTC	37	O
<i>HpaII</i>	C <sup>^</sup> CGG	37	B
<i>PspN4I</i>	GGN <sup>^</sup> NCC	37	Y
<i>RsaI</i>	GT <sup>^</sup> AC	37	B
<i>TaqI</i>	T <sup>^</sup> CGA	65	Y+BSA
<i>Tru9I</i>	T <sup>^</sup> TAA	65	W

### **2.5. Фракционирование фрагментов ДНК**

Фракционирование фрагментов ДНК после амплификации или рестрикции проводили путем электрофореза в агарозном геле. Агарозу разбавляли до конечной концентрации 1.5-2% трис-ЭДТА-боратным буфером (TBE), нагревали до полного растворения и добавляли в раствор бромистый этидий до конечной концентрации 0.003%. Перед нанесением на гель к амплификату добавляли 10 мкл раствора глицерина (50%). Электрофореграммы визуализировали в ультрафиолетовом излучении с использованием трансиллюминатора ECX-20.M (Vilber Lourmat) и фотографировали с помощью цифровой фотокамеры. Размер фрагментов определяли, сравнивая электрофореграмму с маркером молекулярной массы (100bp + 1.5kb DNA Ladder, 100bp + 1.5kb + 3 kb DNA Ladder, производство СибЭнзим, Россия).

### **2.6. Изучение анатомии и микроструктуры клеток**

Материал для анатомического анализа (апексы, междоузлия) фиксировали в водном растворе этанола (70%). Структуру изучали на срезах, выполненных от руки или с помощью ротационного микротомы. В последнем случае проводили подготовку материала, проводя через серию спиртов повышающейся концентрации согласно стандартной методике [Барыкина и др., 2000]. После

обезвоживания образцы заключали в парафин или смесь парафина с пчелиным воском (4:1) и выполняли срезы на микротоме. Полученные срезы монтировали на предметных стеклах, отмывали ксилолом и окрашивали гематоксилином по Делафильду [Барыкина и др., 2000]. Срезы, выполненные от руки, окрашивали кислым флороглюцином [Барыкина и др., 2000]. Срезы просматривали с использованием светового микроскопа Laboval 4 (Carl Zeiss, Jena).

Для изучения строения клеток эпидермиса листа использовали метод реплик. Для этого наносили на поверхность листа прозрачный лак для ногтей; образовавшуюся пленку аккуратно переносили на предметное стекло и микроскопировали без предварительного смачивания или окраски с использованием светового микроскопа (см. выше). Все измерения проводили не менее чем на 50 клетках. Измерения площади клеток проводили на контрастированных микрофотографиях (обработка в Adobe Photoshop® CS2) с использованием программного обеспечения ImageScope M (FEI Electron Optics B.V.). Учитывали следующие параметры: общая площадь, периметр, круглый коэффициент формы (ККФ). ККФ рассчитан с использованием статистических возможностей программы как отношение периметра клетки к длине окружности, заключающей круг той же площади, по формуле:

$$K_r = \frac{P}{2\sqrt{\pi S}},$$

где P и S - периметр и площадь клетки соответственно.

Линейные промеры клеток выполняли с использованием программы AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH). Коэффициент асимметрии прилистников рассчитывали по формуле:

$$k_a = \frac{|S_L - S_R|}{S_L + S_R},$$

где  $S_L$  и  $S_R$  - площади соответственно правого и левого прилистников.

Подсчет числа симбиотических клубеньков проводили на пяти индивидуальных растениях, все остальные измерения проводили не менее чем на 10 растениях.

## **2.7. Сканирующая электронная микроскопия**

Материал для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) фиксировали в 4% растворе глутарового альдегида в 0.025M фосфатном буфере (pH 7.0) и хранили до полугода. Фиксированный материал переносили в 2% раствор OsO<sub>4</sub> в

фосфатном буфере. Через сутки 3 раза промывали фосфатным буфером и проводили через серию спиртов повышающейся концентрации с конечным обезвоживанием в ацетоне. Затем материал сушили в жидком CO<sub>2</sub> и монтировали на металлических цилиндрах (столиках). Перед микроскопированием на образцы напыляли сплав золота и палладия в ионно-распылительной установке Eiko IB-3. Использовали электронный микроскоп CamScan-S2 (Cambridge Instruments, Великобритания) в режиме «Secondary electron image» (SEI) с ускоряющим напряжением 20 кВ.

### ***2.8. Локализация на генетической карте***

Подсчет расстояния между маркерами проводили с использованием программы Mapmaker/EXP 3.0 с применением картирующей функции Косамби и пороговым значением LOD-балла (logarithm of odds) 3.00 [Lander et al., 1987]. Пару маркеров, для которой значение LOD-балла превышало пороговое, считали достоверно сцепленной.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Негативная регуляция размеров ПАМ у гороха

Одной из основных функций ПАМ при нормальном морфогенезе побега является сохранение постоянных размеров. Следствием стабильности основных параметров ПАМ является формирование нормального органотаксиса и в конечном итоге - нормальная архитектура осевой системы растения.

Как было отмечено выше (см. «Обзор литературы»), для *Arabidopsis thaliana* показано, что эта функция осуществляется за счет негативной регуляции экспрессии гена *WUS* продуктами генов групп *CLV*, *FAS* и ряда других. Следствием нарушения отрицательной обратной связи является аномальное увеличение размеров ПАМ, приводящее к фасциации. Ниже рассмотрены основные закономерности морфогенеза у фасцированных форм в сравнении с нормой и особенности генетического контроля этой функции ПАМ у гороха.

##### 3.1.1. Фенотипическая характеристика фасцированных форм

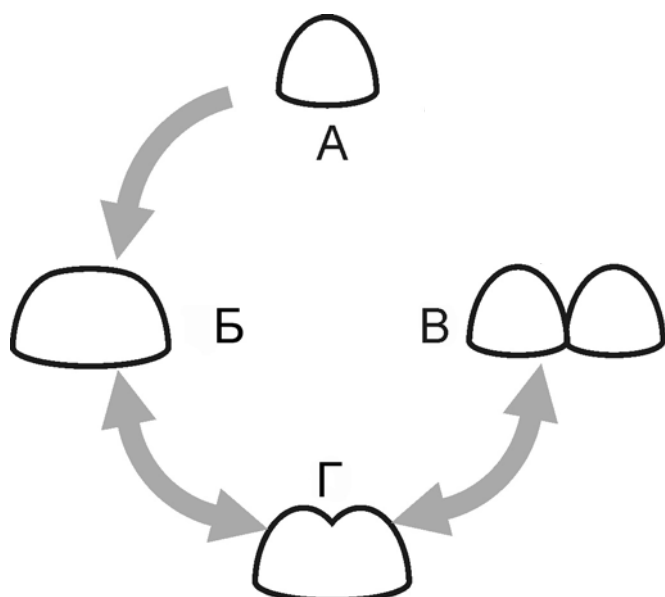
###### 3.1.1.1. Морфология мутантов

Как и у большинства известных фасцированных форм растений, у изученных мутантов *fa*, *fas*, *sym28* и *nod4* (см. «Материалы и методы») отмечается значительное увеличение ширины побега в одной плоскости, приводящее к формированию линейно уплощенного ребристого стебля. Развитие такого побега представляет собой результат деформации формы ПАМ с полусферической у форм дикого типа на гребневидную у мутантов (рис. 7). В некоторых случаях происходит изгибание увеличенной меристемы, приводящее к формированию побега с подковообразным сечением. Изредка меристема приобретает вид замкнутого кольца, нарастающего краями (рис. 7Е) и дающего начало побегу с двумя кругами проводящих элементов (см. ниже), который можно идентифицировать как фасцированный по кольцевому типу.

Зачастую единый меристематический массив распадается на отдельные конусы нарастания (иногда неотличимые от нормальных), в результате чего каждый из вторичных конусов функционирует как независимая ПАМ. Характерно, что подобное увеличение числа осей, как правило, внепазушное и представляет собой результат дефасциации, т.е. разделение некогда единой фасцированной меристемы на автономные элементы. Автономизация осевых структур, вероятно,

становится возможной по достижении некоторой критической величины размера ПАМ. Формирование увеличенной, т.е. фасцированной меристемы может, как кажется, происходить двумя путями: в результате слияния нескольких меристем или разрастания единственной, как в изучаемом примере. В любом случае меристема может формировать (или сохранять) несколько более или менее самостоятельных центров, которые могут быть разделены в результате дефасциации (рис. 5). Уменьшение размеров фасцированной меристемы за счет процесса, обратного разрастанию (постепенного «угасания») едва ли возможно - по крайней мере, подобные явления не описаны в доступной литературе.

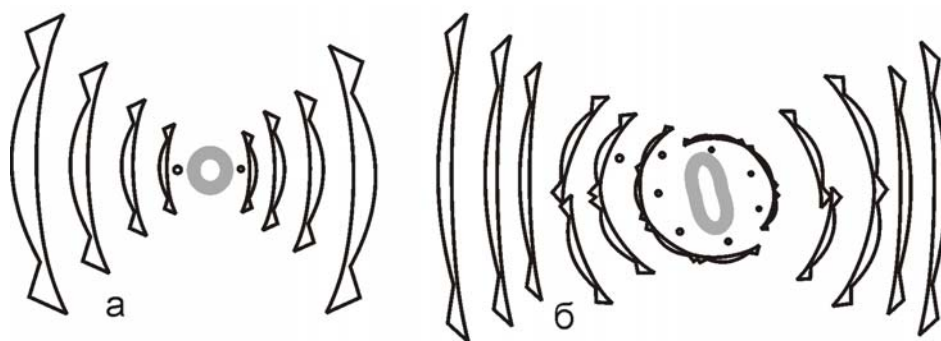
Значительный интерес представляет листорасположение (филлотаксис) у фасцированных форм. В норме для *Pisum sativum*, как и для многих травянистых бобовых, характерно двурядный филлотаксис (рис. 6А). У фасцированных форм наблюдается увеличение числа листьев в узле до двух-трех (в редких случаях - до пяти). Именно нарушения филлотаксиса являются надежным признаком, позволяющим надежно идентифицировать аномальные растения в расщепляющихся популяциях гибридов или при выращивании в условиях теплицы, когда проявления фасциации могут быть значительно ослабленными. В пределах формирующегося узла иногда наблюдается образование листьев аномального строения - от объединения прилистников до слияния рахисов на всем протяжении. Наиболее примечателен тот факт, что образующиеся группы листьев сохраняют двурядное расположение на оси побега (рис. 6Б). Только в верхней части побега отмечается нарушение этой закономерности с уменьшением угла поворота примерно до 120°. Мутовки обычно располагаются на плоской стороне фасцированного стебля, хотя в верхней части побега может наблюдаться отклонение.







**Рис. 5.** Возможные механизмы возникновения увеличенной (фасцированной) меристемы.

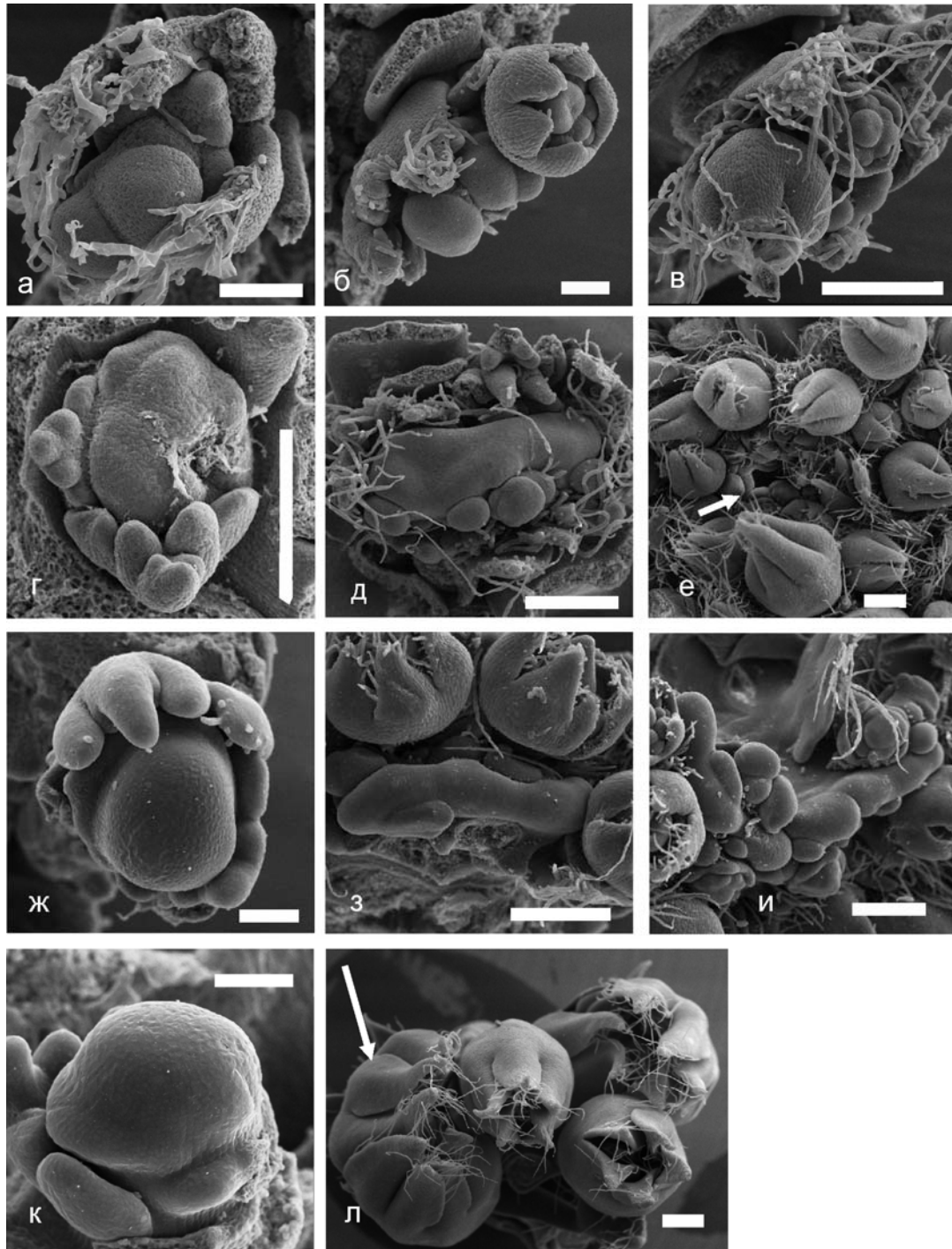
Нормальная меристема (А) способна увеличиваться, давая начало фасцированной меристеме (Б), которая в результате дефасциации может частично разделяться (Г). Состояние Г может быть также результатом неполного слияния нескольких нормальных примордиев (В).

Согласно современным представлениям о формировании филлотаксиса, при закладке листового примордия формируется зона ингибирования, в пределах которой закладка последующих примордиев невозможна [Reinhardt, Kuhlheimer, 2002; Reinhardt et al., 2003]. Сохранение двурядности для групп листьев позволяет предположить, что все листья в составе группы исходно закладываются в пределах единой области разметки (бластозоны, термин С. Gourlay с соавторами [2000], см. «Обзор литературы»). Таким образом, при фасциации увеличение размеров бластозоны происходит пропорционально увеличению размеров ПАМ. Увеличенная бластозона может дать начало нескольким листьям, но двурядный филлотаксис для бластозон сохраняется (это можно видеть с применением методов электронной микроскопии, рис. 7Г). Листья способны в той или иной степени срастаться (или расщепляться - в зависимости от направления прочтения ряда) или изменять взаиморасположение, распределяясь по вертикали за счет процессов растяжения. В пользу последнего обстоятельства свидетельствует тот факт, что зачастую наблюдается срастание прилистников листьев, расположенных на разной высоте, но вместе вписывающихся в одну бластозону. У фасциированных растений также может наблюдаться срастание нескольких пазушных цветоносов одного узла. В отдельных случаях отмечается срастание цветков в различной степени - от продольного срастания цветоножек с сохранением независимости цветков до непосредственного объединения органов нескольких цветков на одном цветоносе (см. также раздел «Фасциация цветка»).



**Рис. 6.** Диаграммы побегов растений дикого типа (сорт Немчиновский-766, а) и фасциированных мутантов («Штамбовый», б). Условные обозначения:  - лист,  - прилистник,  - основание пазушной кисти,  - ось побега.





**Рис. 7.** Структура апикальной меристемы растений сорта Немчиновский-766 (а-в), мутанта «Штамбовый» (г-е), сорта Rosacrone (ж-и) и линии «Люпиноид» (к, л) на различных стадиях. Стрелкой показаны: входное отверстие центральной полости фасцированного побега (е), аномальный цветок (л). Масштабная линейка: а, б, ж, к – 100 мкм; в, д, е, з, и, л – 300 мкм.

Нарушение двурядного листорасположения в верхней части побега может быть объяснено тем, что диаметр зоны подавления вокруг каждого новообразующегося листового примордия (в данном случае дающего начало нескольким листьям узла) остается константным, в то время как ПАМ постоянно увеличивается в размерах. Таким образом, на определенной стадии развития становится возможным заложение последующего листового примордия не напротив предыдущего, а в ином положении. Эти данные могут служить дополнительным доказательством неизменности диаметра ингибирующей зоны примордия в ходе жизни растения.

### **3.1.1.2. Анатомия фасцированных мутантов**

В результате проведенных исследований показано, что уже в эпикотиле фасцированных форм по сравнению с диким типом увеличено число проводящих пучков (рис. 8Б). В дальнейшем за счет закладки дополнительных тяжей прокамбия число пучков значительно увеличивается, достигая 60-80 (реже более); для нефасцированных растений характерно развитие 15-20 пучков в средней части побега.

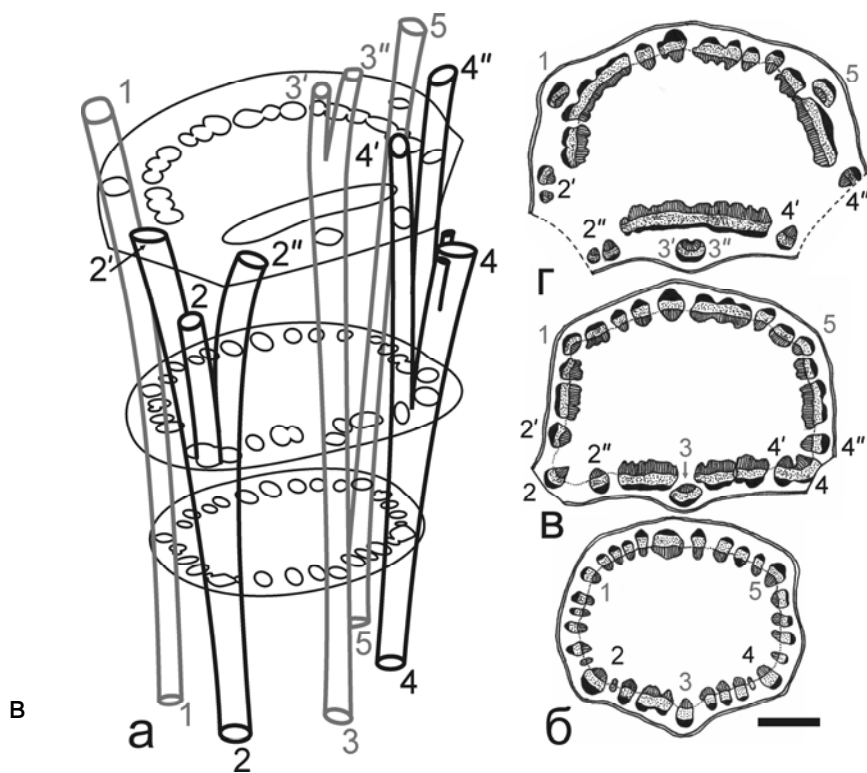
Комптон [Compton, 1911] уделил значительное внимание анатомическому строению верхних междоузлий фасцированного побега, для которых в ряде случаев характерно наличие двух концентрических кругов проводящих пучков; при этом коллатеральные пучки внутреннего круга инвертированы: ксилема обращена наружу, а флоэма внутрь. При вскрытии стебля неоднократно отмечалось наличие конусообразной структуры, «вложенной» в основной побег и в апикальной части прирастающей к нему.

Предположительно, подобное явление может быть связано с особенностями функционирования ПАМ фасцированных растений. На ранних стадиях ПАМ мутантов имеет вид валика, сохраняющего свою целостность. В период цветения и плодоношения меристема значительно разрастается и может изгибаться, приобретая подковообразную или, при полном замыкании, кольцевидную форму (рис. 7И). Увеличенная меристема, как и в случае с гребневидным разрастанием, функционально способна к разделению путем дефасциации. Нарастание кольцевидной меристемы определяет в целом рост побега. Внутренняя поверхность «внутренней» структуры оказывается гомологичной наружной поверхности нормального (нефасцированного) стебля, что отражается в ее анатомической структуре - развиваются эпидермис, устьица и т.д. Гомология,

очевидно, неполна - например, развития филломов на этой поверхности не происходит. Полость между двумя кругами проводящих пучков формируется таким же путем, как и воздушная полость нормального побега, т.е. при разрушении сердцевинной паренхимы.

Изучение анатомической структуры мутантов в сравнении с растениями дикого типа вносит определенный вклад и в понимание проблемы формирования филлотаксиса у фасциированных форм. Для последних характерно наличие четырех крупных проводящих пучков листового следа в склеренхимной обкладке, придающих всему стеблю в сечении неясно-четырёхгранную, местами переходящую в округлую, форму [Макашева, 1979]. Для фасциированных форм характерно значительное увеличение числа проводящих пучков, в результате чего стебель становится уплощенным (рис. 8), с грубо-ребристой поверхностью. Часть избыточных проводящих пучков функционирует в качестве дополнительных пучков листового следа, что отчетливо видно при изучении нодальной анатомии

фасциированных растений (рис. 8).



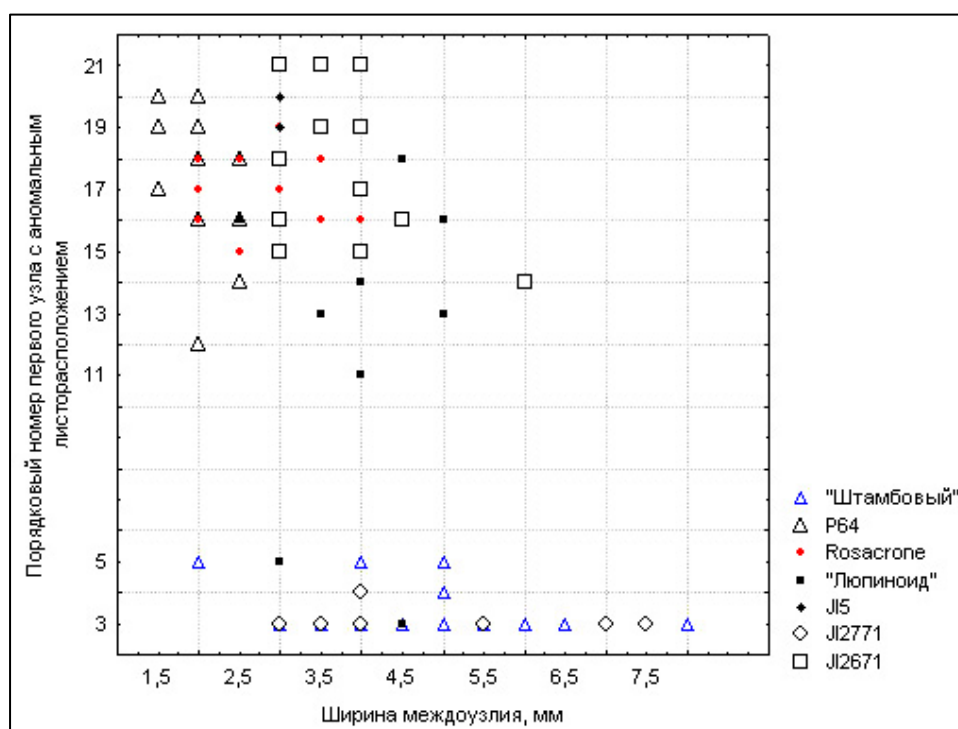
**Рис. 8.**  
Трёхмерная реконструкция прохождения проводящих элементов узле фасциированного растения (а) на

основании структуры срезов на трех уровнях (б, в, г). Черным цветом выделены пучки, иннервирующие листья, серым – прилистники. Одинаковыми цифрами обозначены срезы одних и тех же элементов на разных уровнях. Масштабная линейка 1 мм.

На схеме срезов двойная линия - эпидермис, черная заливка - колленхима, штриховка - ксилема, отточие - флоэма.

### 3.1.1.3. Различия в проявлении фасциации у изучаемых линий

Хотя основные особенности фасцированных растений (уплощенный стебель, нарушения листорасположения, укорочение междоузлий в верхней части побега) сходны у всех изученных линий, отмечаются определенные различия в степени выраженности этих черт. Изучение проявления количественных признаков (ширина междоузлия, предшествующего первому репродуктивному узлу; порядковый номер первого узла с нарушениями листорасположения) показывает, что изучаемые формы распределяются в две группы (рис. 9). Линии, маркированные мутацией *fas*, характеризуются сильно уплощенным стеблем и нарушениями филлотаксиса. Фактически односторонние группы листьев формируются, начиная с первого узла, т.е. одновременно с появлением нормальных листьев. У форм, несущих мутации *fa* или *sym28*, все проявления фасциации значительно ослаблены и становятся отчетливо заметными только на верхних междоузлиях. Исключение составляет линия «Люпиноид» (*det fas*, см. ниже), у растений которой нарушения листорасположения наблюдаются, как правило, на одном из первых и затем на верхних узлах, в средней части побега филлотаксис без отклонений. Отмеченные различия в проявлении фасциации сохраняются даже в неблагоприятных условиях (например, в очень сухое лето 2007 года, при недостатке света или этиоляции).



**Рис. 9.** Распределение изученных фасцированных форм по количественным признакам. Пояснения в тексте.

Немаловажно отметить, что ген *FA* в значительной степени подвержен модифицирующему влиянию среды и, вероятно, других генов. Так, в популяциях  $F_2$  от скрещивания сорта Rosacrone с различными нефасцированными сортами и линиями гомозиготные по мутации *fa* растения, как правило, представляют собой широкий спектр форм от типично фасцированных до форм со значительно ослабленным проявлением признака (например, с округлым стеблем, но измененным числом листьев в узлах). В большинстве случаев удается однозначно определить фенотип гибридов, часть которых, однако, может быть идентифицирована неверно. Именно этим обстоятельством предположительно объясняются отклонения от расщепления 3/4:1/4 в гибридных популяциях, полученных при скрещивании фасцированных и нормальных форм в ряде работ, - например, [Lamprecht, 1952].

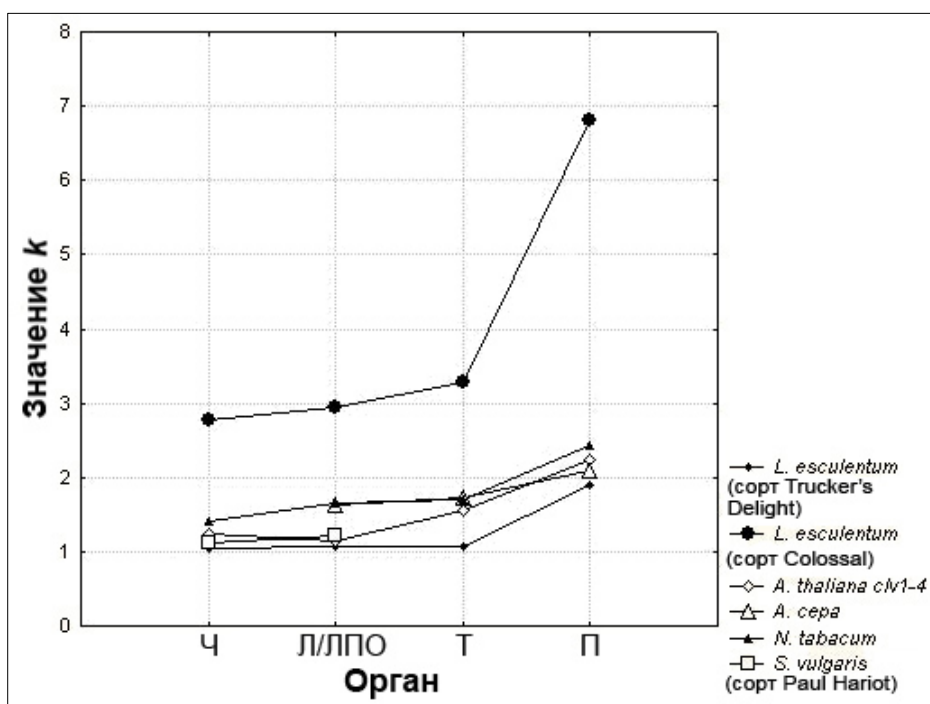
#### **3.1.1.4. Фасциация цветка**

Для того чтобы классифицировать наблюдающиеся у фасцированных форм гороха нарушения строения цветка, было проведено обобщение данных доступной литературы и результатов оригинальных наблюдений, касающихся фасциации цветка у различных покрытосеменных.

Показано, что в большинстве известных случаев, интерпретируемых как фасциация цветка, число кругов и их положение сохраняются неизменными по сравнению с диким типом. Одним из исключений можно считать появление дополнительного внутреннего круга плодолистиков в цветках мутантов *c/v* арабидопсис [Shannon, Meeks-Wagner, 1993; Clark et al., 1993], т.е. пролиферация оси цветка. В отдельных случаях пролиферация оси при фасциации может носить значительный характер: ось цветка продолжается вегетативным побегом [Clark et al., 1993]. В целом при фасциации число, последовательность и положение кругов органов не изменяются в сравнении с нормальными цветками, что можно считать достаточно надежным отличием от иных аномалий (например, гомеозисных мутаций).

Несколько большую сложность представляет разграничение процессов увеличения числа органов в цветке в результате изменения мерности и вследствие фасциации. Практически невозможным оказывается определить, в каких случаях увеличение флоральной меристемы приводит к изменениям мерности, а в каких - к фасциации. По всей видимости, это становится более понятным при изучении полиморфизма структуры цветка на выборках. Случаи,

когда число органов цветка увеличивается, превосходя характерный для нормы диапазон, могут быть интерпретированы как фасциация (хотя очевидно, что у фасцированных растений, помимо аномальных цветков, могут встречаться нормальные или почти нормальные). Кроме того, для фасцированных органов в целом характерны прогрессирующие изменения (за счет постепенного увеличения размеров меристемы). При количественной обработке литературных и оригинальных данных был подсчитан индекс  $k$  по формуле:  $k = N_f/N_{wt}$ , где  $N_f$  - число органов одного типа в фасцированных цветках, а  $N_{wt}$  - то же в цветках растений дикого типа. На приведенном графике (рис. 10) видно, что изменения носят прогрессирующий характер, и наиболее подверженным фасциации оказывается гинецей. В цветках же с измененной мерностью увеличение (или, напротив, уменьшение) числа органов обычно происходит во всех кругах согласованно (возможны исключения, как, например, у *Physocarpus opulifolius* L. [Синюшин, 2010]).



**Рис. 10.** Значения  $k$  в цветках различных видов по оригинальным и литературным данным [Zielinski, 1948; White, 1948; Kayes, Clark, 1998].

Так как цветки *Syringa vulgaris* cv. Paul Hariot обладают петалоидным андроцеом, при подсчете учтены только число чашелистиков и лепестков наружного круга. Ч, чашелистики; Л, лепестки; ЛПО, лепестки простого околоцветника (у *Allium cepa*); Т, тычинки; П, плодолистики.

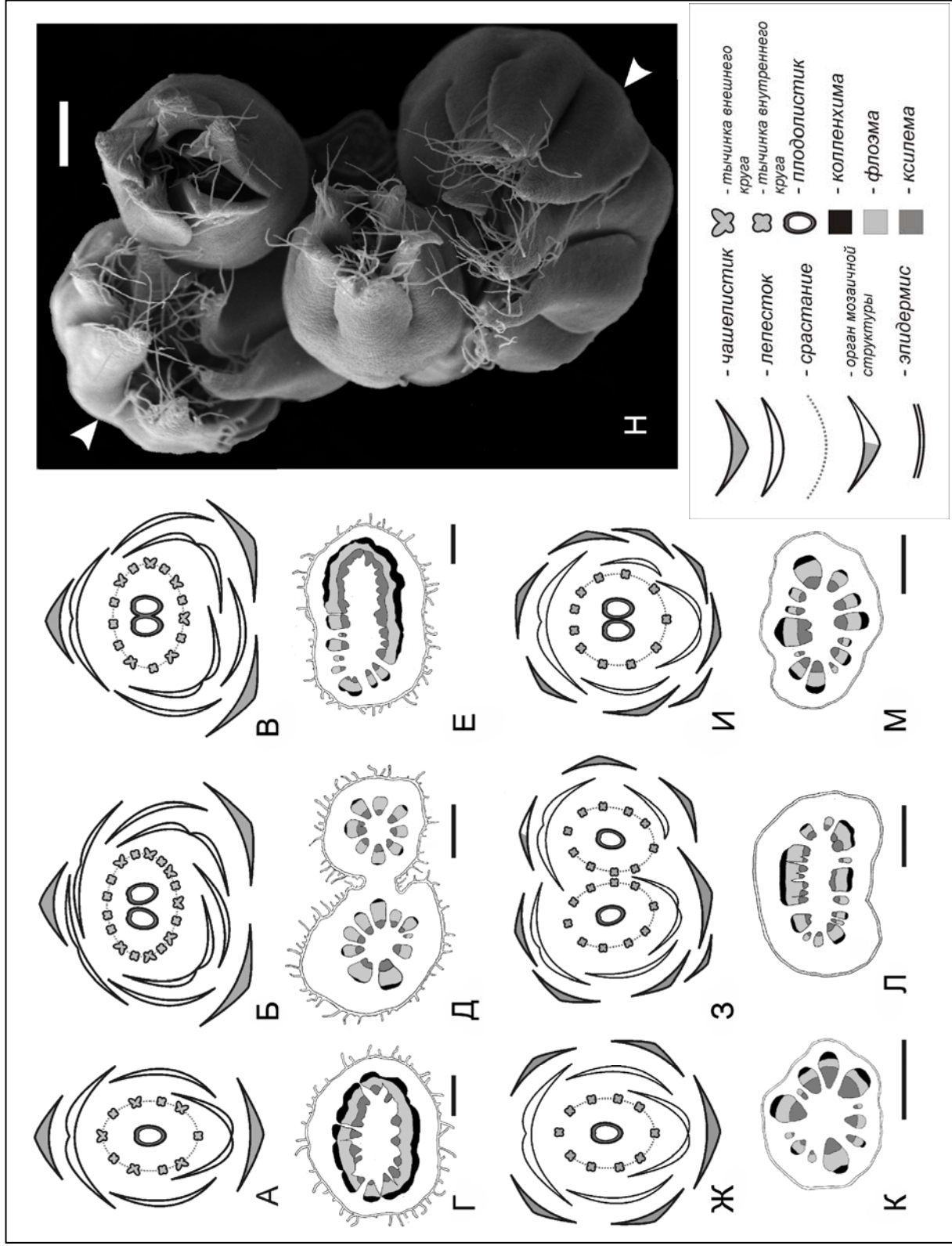
Наибольшую сложность при интерпретации аномальных структур вызывает разграничение истинной фасциации (разрастания единственного апекса) и срастания нескольких апексов в единый массив. Сама идея подобного

разграничения, впрочем, подвергалась критике, как искусственная [Clark et al., 1993]. Слияния цветков представляют собой достаточно распространенное явление и особенно характерны для многоцветковых соцветий с плотным расположением цветков. К ним должны быть отнесены некоторые типы псевдантиев - как, например, описанные Соколовым с соавторами [Sokoloff et al., 2006] у различных видов *Potamogeton* L. В ряде случаев срастания могут быть отличены от истинной фасциации цветка при изучении анатомии цветоножки, которая в таких ситуациях чаще всего уплощена или отчетливо составлена из нескольких.

Как уже было упомянуто, цветки известных фасциированных мутантов бобовых нормальны. Случаи срастания («connation») цветков в этом семействе также практически не описаны. Изменения зигоморфных цветков представляют определенный интерес, и изучение их структуры показывает, что степень срастания цветков в составе псевдантия может быть различной (рис. 11). «Усложненные» цветки у различных видов *Lupinus* были описаны в работе А.И. Атабековой [1959]. Из них формируются плоды из нескольких плодолистиков, часто развитых в различной степени. По всей видимости, именно о срастаниях идет речь в случае сдвоенных бобов у фасциированного мутанта сои [Albertsen et al., 1983].

Сходные с описанными у люпинов структуры иногда образуются в соцветиях фасциированных мутантов гороха (рис. 11) - например, наиболее часто они встречаются у двойных мутантов *det fas* (линия «Люпиноид»). У этих форм фасциация побега сочетается с терминализацией пазушного соцветия (более подробно морфология таких форм описана в разделе «Сохранение недифференцированного состояния ПАМ»). В отдельных случаях их интерпретация также неочевидна из-за нормального строения цветоножки (рис. 11М).

**Рис. 11.** Срастания в цветках бобовых. *Lupinus rourhullus*: диаграммы нормального (А) и аномальных (Б, В) цветков; Г, Д, Е - анатомическое строение цветоножек цветков А, Б, В соответственно. *Pisum sativum*: диаграммы нормального (Ж) и аномальных (З, И) цветков; К, Л, М - анатомическое строение цветоножек цветков Ж, З, И соответственно. Н - СЭМ-микротография верхней части соцветия линии «Люпиноид», стрелками указаны аномальные цветки. Масштабные линейки: 0,5 мм (Г, Д, Е, К, Л, М), 0,3 мм (Н).

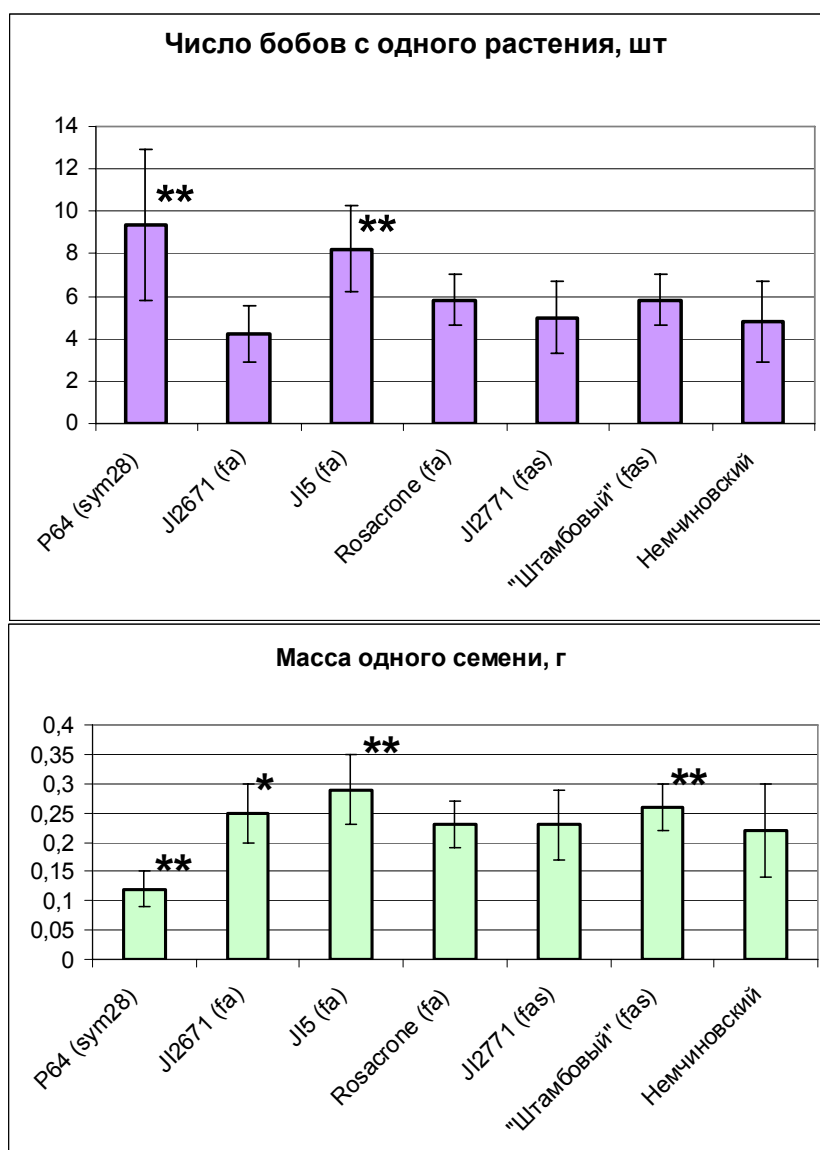




### 3.1.1.5. Продуктивность фасцированных форм

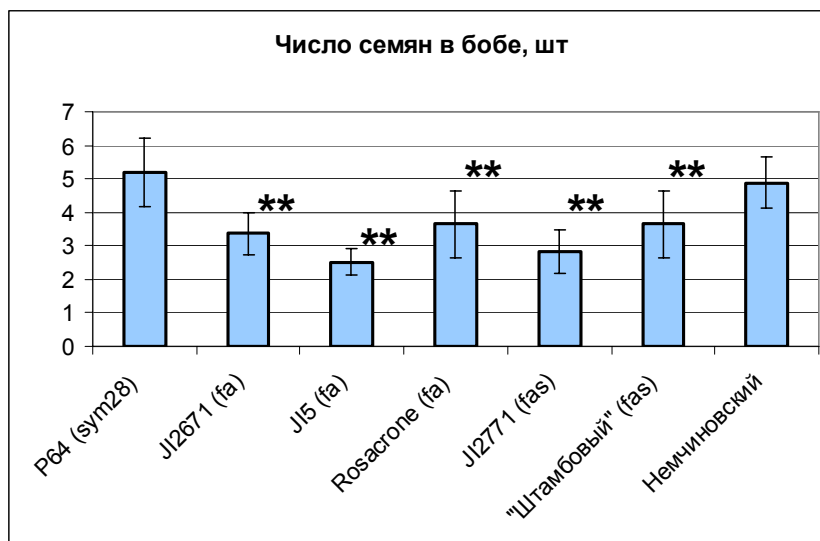
Хозяйственная ценность фасциации у различных культур неодинакова. Так, наследственные формы фасциации цветка закреплены у сортов киви (*Actinidia sinensis* Planch.), томатов (*Lycopersicon esculentum* L.), как декоративный признак - у сирени (*Syringa vulgaris* L.). Фасциацию побега рассматривают как ценный признак у гречихи [Петелина, Кадырова, 1998], хотя в настоящее время нет районированных сортов, маркированных этим признаком. У гороха в разные периоды времени были созданы немногочисленные фасцированные сорта (Bulawa в Польше, Ornaments, Rosacrone и Golf в Германии, Novella в США, Штамбовый 2 в СССР), но распространение их ограничено. Часть настоящего исследования посвящена оценке продуктивности фасцированных линий в сравнении с контролем. В качестве контроля был выбран сорт Немчиновский-766,

являющийся исходной формой для мутанта «Штамбовый». Результаты подсчетов (данные для сезона 2006 г.) приведены на Рис 12.

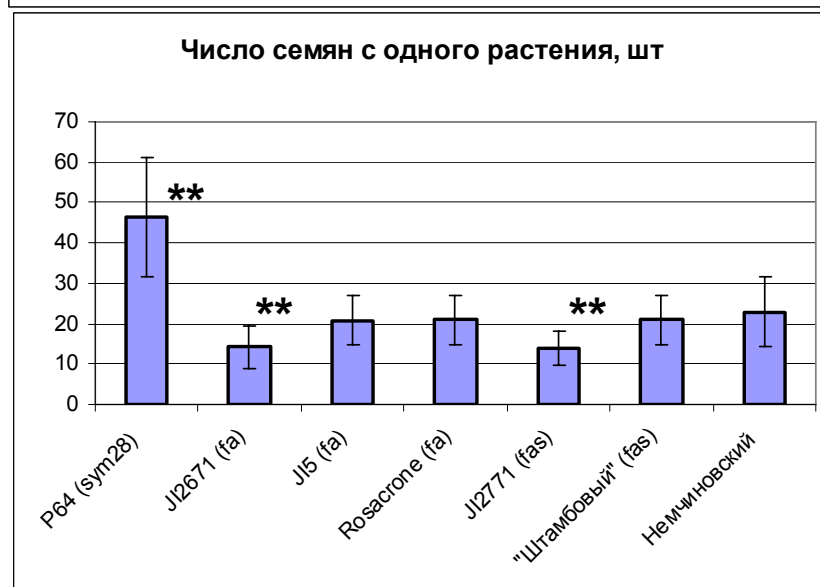


**Рис. 12.** Значения признаков продуктивности у фасцированных линий. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. \* - достоверные отклонения от контроля (сорт Немчиновский-766) при  $p < 0.05$ , \*\* - при  $p < 0.01$ .

**Рис. 12.** Значения признаков продуктивности у фасцированных линий (продолжение).



Вероятно, наиболее целесообразно проводить сравнение мутантов с исходными формами (в данном эксперименте это пара «Штамбовый» - Немчиновский-766). Анализ полученных для этой комбинации данных показывает, что различия



по числу семян с одного растения (наиболее значимый компонент при оценке урожайности) недостоверны, несмотря на значимо большее число бобов с растения у мутанта. Это преимущество компенсируется меньшим числом семян в бобе у фасцированной формы - эта особенность присуща всем изученным линиям, маркированным признаком фасциации, вне зависимости от генотипа.

Линия P64 достоверно превышает контроль по числу семян с растения и незначимо - по числу семян в бобе, однако характеризуется очень мелкими семенами. Размер семян является признаком со сложным генетическим и средовым контролем, однако тенденция к обратной зависимости массы семян от их количества на растение прослеживается отчетливо. Высокая продуктивность в сочетании с гипернодуляцией может быть расценена как перспективное свойство

у мутантов *sym28*. Очевидно, что для однозначного заключения о практической значимости того или иного генотипа необходимы наблюдения в более широком диапазоне условий.

Основным недостатком фасцированных форм в качестве исходного материала в селекции гороха считают низкую устойчивость к полеганию [Паришкура, 1968]. Полевые наблюдения показывают, что при однорядном посеве все изученные формы склонны к полеганию примерно в равной степени вне зависимости от наличия или отсутствия фасциации. Проблема получения сортов гороха, устойчивых к полеганию, является одной из основных на протяжении всей истории селекции этой культуры. Возможно, выбранное в течение нескольких последних лет направление создания сортов на основе карликового морфотипа (*le*) с измененной структурой листа («хамелеон»<sup>2</sup>, «усатый» (*af*) и др.) будет перспективным для закрепления фасциации у культурных форм гороха. Сам признак фасциации по итогам представленных наблюдений можно оценить как не влияющий на продуктивность, хотя его проявление подвержено существенному варьированию в зависимости от климатических условий (в первую очередь, влажности) посевного сезона.

### 3.1.2. Тесты на аллелизм между изучаемыми линиями

Число генов, мутации в которых приводят к фасциации, остается предметом дискуссии (см. «Обзор литературы»). В различных мировых коллекциях находятся образцы фасцированных линий, мутантов и рекомбинантов гороха, происхождение и генотип которых во многих случаях остаются неясными. С целью определения генотипа изучаемых фасцированных форм были проведены тесты на аллелизм между ними. Гибридную природу полученных растений определяли по комплементации между морфологическими маркерами. Например, гибриды от скрещивания белоцветковых форм (*a B* - «Штамбовый», «Люпиноид», JI2671, JI2771, P64, K301) с розовоцветковыми (*A b* - Rosacrone, JI5) имеют пурпурную окраску венчика (*A B*). В тех случаях, когда гибридная природа растений  $F_1$  представлялась спорной, проводили подтверждение гетерозиготности с помощью анализа молекулярных маркеров (SSR) (рис. 13). Полученные результаты (табл.

---

<sup>2</sup> Форма «хамелеон» (генотип *af uni<sup>fac</sup>*) характеризуется выраженной гетерофиллией (в нижней части побега развиваются листья с большим числом разветвленных усиков, в верхней - дваждыперистый лист, несущий усики и листочки). В настоящее время ее рассматривают как ценный исходный материал в селекции культуры [Зеленов, 1991].

6) показали, что фасциация в изученных линиях связана с нарушением активности 4 генов - *FA* (синоним *FA1*), *FAS*, *NOD4* и *SYM28*.

**Табл. 6.** Результаты тестов на аллелизм между изученными линиями.

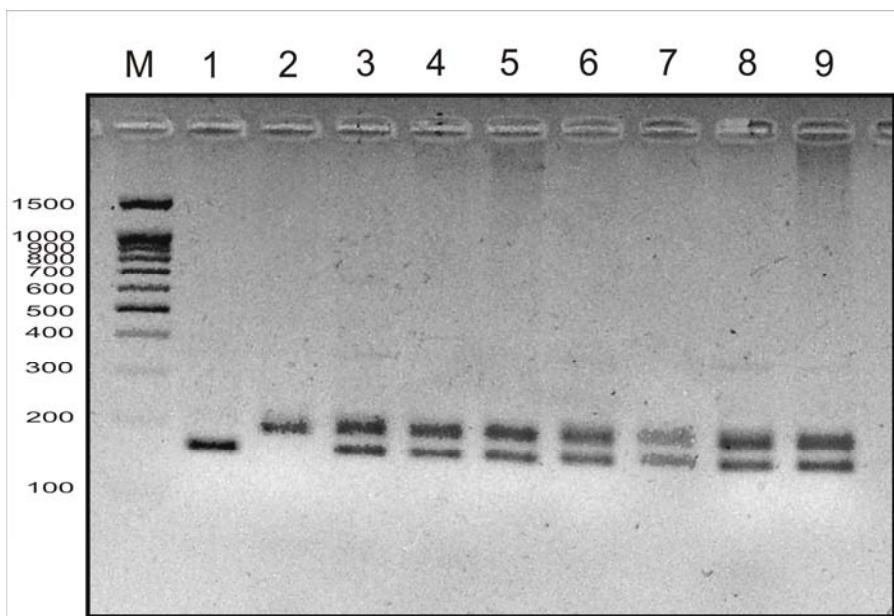
	«Штамбовый»	Rosacrone	«Люпиноид»	J15	J12671	J12771	K301
«Штамбовый»							
Rosacrone	н/а						
«Люпиноид»	н/а	а					
J15	н/а*	а	а*				
J12671	н/а*	а	а*	а*			
J12771	а	н/а	н/а*	н/а*	н/а		
P64	н/а	н/а	н/а*	н/а*	н/а*	н/а*	н/а

*Примечание:* а - аллельны, н/а - неаллельны, \* аллельны (неаллельны) теоретически, но скрещивание не выполнено.

Полученные данные отчасти противоречат существующим описаниям коллекционных линий. Так, в каталоге John Innes Collection [Catalogue...] линия J12671 описана как типовая для мутации *fas*, но по результатам скрещиваний проведенных аллельна по отношению к J15 («Mummy pea»), родословная которой восходит к фасцированным формам, использованным Г. Менделем [Lamprecht, 1952]. Генотип линии J15 описывают как *fa*. Аналогично линия J12771 описана как несущая мутацию *fa*, но результаты скрещиваний показывают, что она

аллельна мутации *fas* мутанта «Штамбовый». Вероятно, требуются некоторые изменения в обозначении генотипов типовых линий в существующих

**Рис. 13**  
Подтверждение гибридной природы растений F<sub>1</sub> от скрещивания («Штамбовый» × J12771) путем амплификации микросателлитного маркера AA122. М - маркер молекулярной массы (100 bp + 1.5 Kb, СибЭнзим, Россия), 1 - «Штамбовый», 2 - J12771, 3-9 - профили индивидуальных гибридных растений.



каталогах [Catalogue...].

### 3.1.3. Гибридологический анализ наследования фасциации

При скрещивании фасцированных линий с сортами и маркерными линиями, нормальными в отношении изучаемого признака, в F<sub>1</sub> во всех случаях отмечалось единообразие по дикому типу, а в F<sub>2</sub> практически всегда наблюдалось расщепление с соотношением фенотипических классов 3/4:1/4. Проверка методом  $\chi^2$  не отвергает гипотезы о моногенных различиях между родительскими формами (табл. 7).

**Табл. 7.** Генетический анализ F<sub>2</sub> от скрещивания фасцированных форм с сортами и линиями.

Популяция F <sub>2</sub>	Число растений		Всего	H <sub>0</sub> - гипотеза	$\Sigma\chi^2$
	Нормальные	Фасцированные			
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × WL 102	О	237	80	317	0.009
	Е	237.75	79.25		
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × WL 1238	О	122	43	165	0.099
	Е	123.75	41.25		
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × Флагман	О	35	12	47	0.125
	Е	35.25	11.75		
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × «Новая форма 42»	О	129	31	160	2.700
	Е	120	40		
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × ДТР	О	102	29	131	0.572
	Е	98.25	32.75		
«Люпиноид» ( <i>fa</i> ) × WL 1132	О	128	33	161	0.511
	Е	120.75	40.25		
«Люпиноид» ( <i>fa</i> ) × Флагман	О	136	40	176	0.485
	Е	132	44		
«Люпиноид» ( <i>fa</i> ) × Wasta	О	138	36	174	1.724
	Е	130.5	43.5		
Rosacrone ( <i>fa</i> ) × Filby	О	205	44	249	<b>7.130</b>
	Е	186.75	62.25		

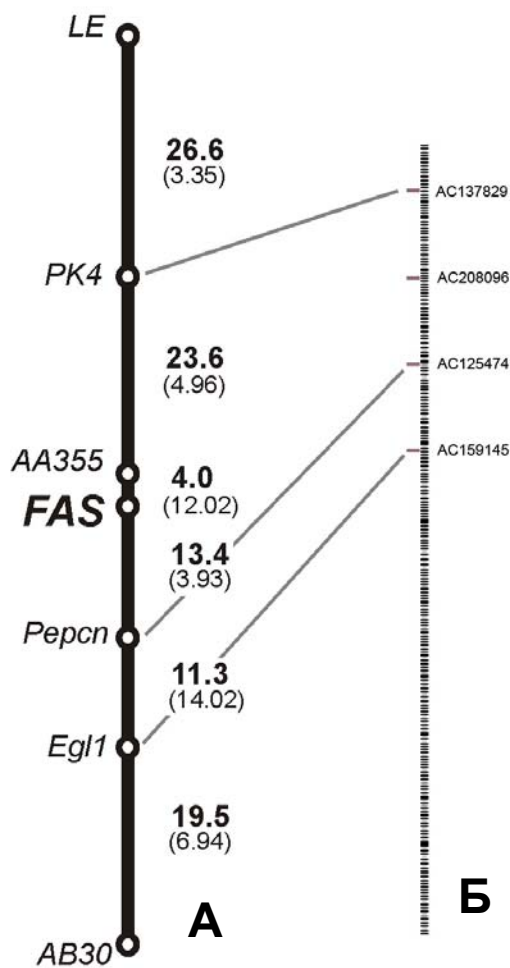
Rosacrone ( <i>fa</i> ) × WL1132	O	81	26	107	0.030
	E	80.25	26.75		
Rosacrone ( <i>fa</i> ) × Флагман	O	72	30	102	1.059
	E	76.50	25.50		
Rosacrone ( <i>fa</i> ) × «Хамелеон»	O	85	13	98	<b>7.197</b>
	E	73.50	24.50		
P64 ( <i>sym28</i> ) × WL1238	O	126	31	157	2.312
	E	117.75	39.25		

Примечание: O – наблюдаемое значение, E – ожидаемое; число степеней свободы  $d.f. = 1$ ,  $p < 0.05$ . Значения  $\chi^2$ , превышающие критические, выделены **полужирным курсивом**.

В двух случаях наблюдалось отклонение от ожидаемого расщепления при  $p < 0.05$  в популяциях  $F_2$  от скрещиваний сорта Rosacrone с растениями дикого типа (табл. 7); при этом наблюдался дефицит рецессивных гомозигот. Вероятно, существуют гены-модификаторы, не имеющие самостоятельного фенотипического проявления, но оказывающие влияние на активность «генов фасциации» в изучаемых линиях, что приводит к фенотипической неоднородности гомозигот по мутации (см. выше). Гипотеза о наличии подобного модифицирующего действия ранее выдвигалась рядом авторов (например, [Marx, Hagedorn, 1962]). Это может служить удовлетворительным объяснением отклонениям от ожидаемого расщепления без участия второго гена, взаимодействующего с основным по типу некумулятивной полимерии, существование которого было постулировано в работе [Lamprecht, 1952]<sup>3</sup> и до настоящего времени используется при описании генотипа некоторых линий (*fa fas* вместо *fa*, [Catalogue...]). Полученные в рамках данной работы результаты не дают оснований для предположений о полимерном взаимодействии генов, участвующих в регуляции активности ПАМ.

При скрещивании мутанта «Штамбовый» (*FA fas*) с сортом Rosacrone (*fa FAS*) в  $F_2$  наблюдали расщепление с соотношением классов 9:3:4 ( $\chi^2 = 0.106$ ), что дало возможность сделать вывод о комплементарном взаимодействии генов *FA* и *FAS*. Так как 1/4 потомства составляют формы, сходные с мутантом «Штамбовый»,

<sup>3</sup> Примечательно, что Г. Лампрехт описал полимерное взаимодействие целого ряда генов гороха (в том числе *FA* и *FAS*). Это дало ему основание для гипотезы о том, что вид *Pisum sativum* является полиплоидным по отношению к какой-то предковой форме, и наблюдаемое число хромосом у гороха представляет собой результат редукции и перестроек [Lamprecht, 1947]. В работах более поздних исследователей результаты работ Лампрехта подверглись некоторому пересмотру, хотя гипотезы о некоторых парах описанных им полимерных генов (*BR* и *BRA*, *FN* и *FNA*) до настоящего времени сохраняют актуальность.



можно заключить, что в пути регуляции активности ПАМ гены *FAS* и *FA* контролируют последовательные стадии, но *FAS* активен на более ранних этапах.

### 3.1.4. Определение положения генов на генетической карте

#### 3.1.4.1. Локализация гена, ответственного за развитие фасциации у мутанта «Штамбовый»

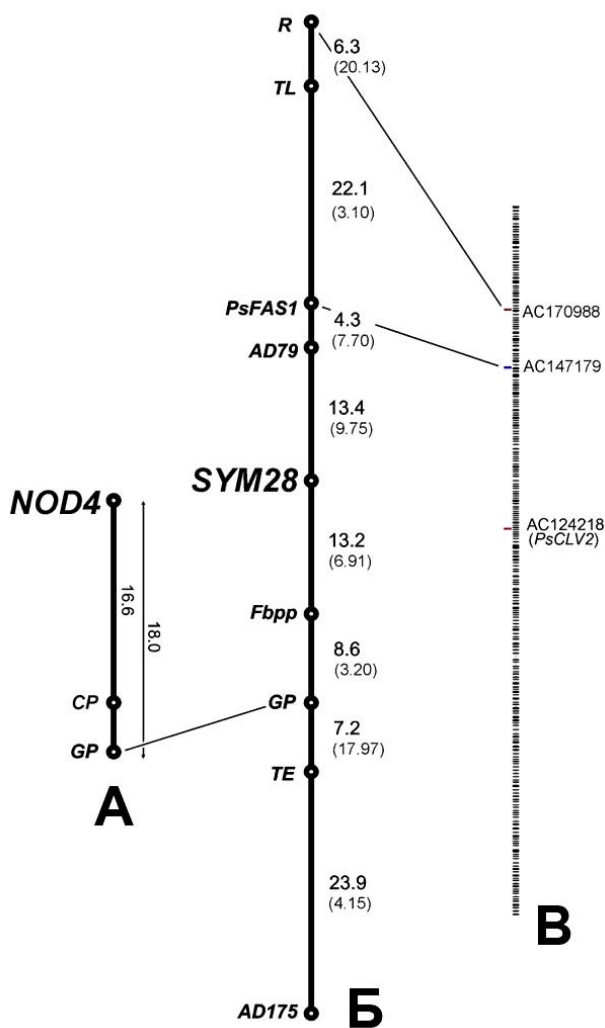
**Рис. 14.** Район генетической карты GCIII гороха, включающий ген *FAS* (А), и физическая карта синтенного района 2 хромосомы

*Medicago truncatula*, полученная с помощью инструмента CviT-BLAST ([http://www.medicago.org/genome/cvit\\_blast.php](http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php)). Приведены расстояния (сМ), в скобках - значения LOD-балла. На физической карте указаны обозначения ВАС-клонов люцерны, включающих предполагаемые ортологи генов гороха.

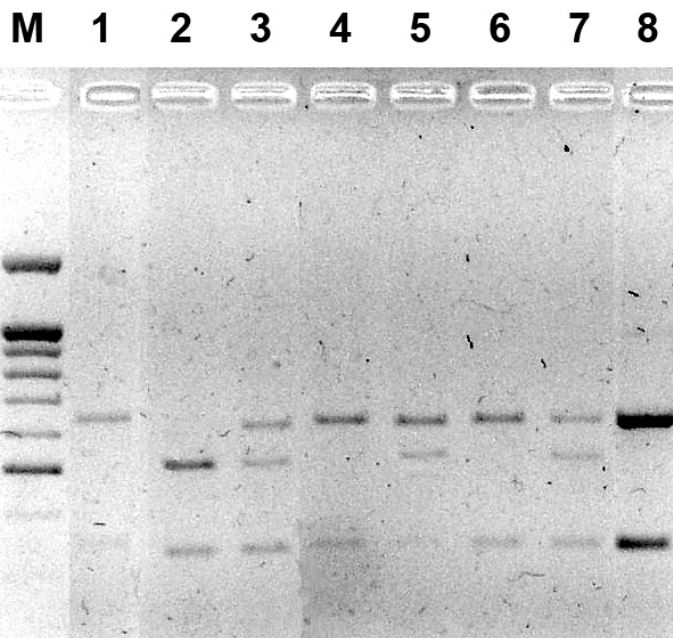
При оценке независимости наследования «генов фасциации» изучаемых линий с морфологическими маркерами в расщепляющихся популяциях F<sub>2</sub> от скрещивания мутанта «Штамбовый» (*LE*) с несущими многочисленные морфологические маркеры линиями WL 102 (*le*) и WL 1238 (*le*) было обнаружено отклонение от ожидаемого расщепления в комбинации «ген фасциации» мутанта «Штамбовый» - ген *LE*. У мутантов *le* развиваются укороченные междоузлия, т.е. наблюдался дефицит фасцированных карликов. Гипотеза H<sub>0</sub> о независимом наследовании этих генов отвергалась при проверке методом  $\chi^2$  (значение  $\chi^2$  составило 16.837 при *d.f.* = 3, *p* < 0.05), в результате чего был сделан вывод о сцепленном наследовании этих генов. Для более точной локализации гена, с которым связана фасциация у мутанта «Штамбовый», были также использованы CAPS- и SSR-маркеры (рис. 16). Для картирования использовали 120 растений популяции F<sub>2</sub> («Штамбовый» × WL1238), 114 из которых были использованы для

выделения ДНК. Объединение данных, полученных при использовании различных типов маркеров, позволило локализовать искомый ген в ГСIII между молекулярными маркерами AA355 и *Percp* (рис. 14). С этой группой связывают положение гена *FAS* - например, наиболее полная карта, включающая морфологические маркеры, из работы [Weeden et al., 1992], приводит этот ген в списке генов ГСIII с неуточненной локализацией. Так как типовая линия для

мутации *fas* отсутствует, мутант «Штамбовый» следует считать гомозиготой по рецессивному аллелю именно этого гена [Sinjushin, Gostimskii, 2007].

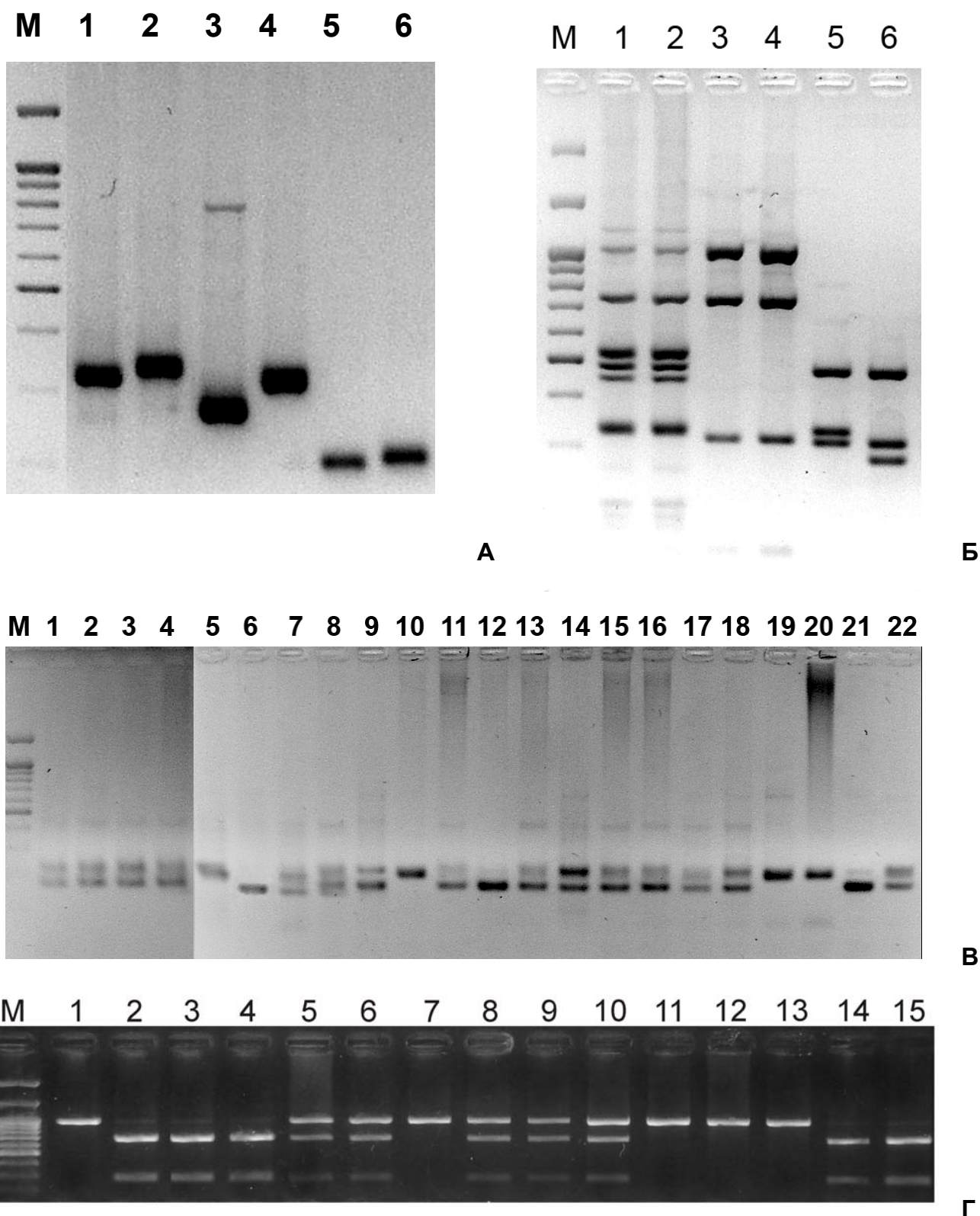


**Рис. 15.** Районы генетической карты ГCV гороха, включающие гены *NOD4* (А, по данным [Sidorova, Uzhintseva, 1995]), *SYM28* (Б, по [Sinjushin et al., 2008]), и физическая карта хромосомы 7 люцерны, полученная с помощью инструмента CviT-BLAST ([http://www.medicago.org/genome/cvit\\_blast.php](http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php)). Приведены расстояния (сМ), в скобках - значения LOD-балла. На физической карте указаны обозначения ВАС-клонов люцерны, включающих предполагаемые ортологи генов гороха. Г - спектр электрофореза продуктов рестрикции (*PsFAS1/TaqI*); 1 - линия P64, 2 - линия WL1238, 3-8 - растения F<sub>2</sub> (P64 × WL1238). М - маркер молекулярного веса (100 bp + 1,5 Kb DNA Ladder, СибЭнзим, Россия).



Г





**Рис. 16.** Примеры использования полиморфизма ДНК-маркеров для картирования. А - полиморфизм SSR-маркеров *AD79* (1, 2), *AD280* (3, 4) и *AC58* (5, 6) у линий Р64 (1, 3, 5) и WL1238 (2, 4, 6). Б - поиск полиморфизма CAPS-маркеров *Adh1*, *PK4* и *CipPor* при обработке эндонуклеазой *RsaI* у линии ДТР (1, 3, 5) и сорта Флагман (2, 4, 6); маркер *CipPor/RsaI* обнаруживает полиморфизм. В - наследование аллелей маркера *AA122* у гибридов F<sub>1</sub> (1-4) и F<sub>2</sub> (7-22) от скрещивания сорта Rosacrone (5) и линии WL108 (6). Г - спектр электрофореза продуктов рестрикции (*PecpI/HpaII*); 1 - «Штамбовый», 2 - WL1238, 3-15 – растения F<sub>2</sub> («Штамбовый» x WL1238).

М - маркер молекулярного веса (А, В - 100 bp +1,5 Kb DNA Ladder; Б, Г - 100 bp +1,5 + 3 Kb DNA Ladder, СибЭнзим, Россия).

#### **3.1.4.2. Локализация гена *NOD4***

При изучении популяции  $F_2$  ( $P64 \times WL1238$ ) (158 растений, из них 87 использованы для анализа расщепления по молекулярным маркерам) было обнаружено достоверное сцепление гена *NOD4* с морфологическими маркерами ГСV (*GP*, *TE*, *R*, *TL*). Для уточнения его положения на генетической карте был использован ряд молекулярных маркеров (CAPS- и SSR-маркеры), среди которых - предполагаемые гомологи генов резуховидки *CLV2* и *FAS1* (*PsCLV2* и *PsFAS1* соответственно). Эти гены участвуют в генетическом контроле активности ПАМ у *A. thaliana* (см. «Обзор литературы») и у люцерны локализованы в 7 хромосоме, полностью синтенной с ГСV гороха [Kalo et al., 2004; данные, полученные с применением алгоритма CviT-BLAST]. В результате получен фрагмент генетической карты ГСV, содержащий ген *SYM28* (рис. 15). Использование в работе [Сидорова, Ужинцева, 1992] при локализации гена *NOD4* того же морфологического маркера, что и в ходе оригинальных исследований (ген *GP*) позволяет сравнить положение генов *NOD4* и *SYM28* (рис. 15). Сходство в их локализации вызывает интерес и требует дополнительных исследований.

#### **3.1.4.3. Уточнение положения гена *FA***

Литературные данные связывают положение гена *FA* с IV группой сцепления [Lamprecht, 1952]. Несмотря на то, что рядом авторов результаты работ Г. Лампрехта были подвергнуты критическому пересмотру [например, Ellis et al. 1992], в ходе проделанной работы было проведено изучение совместного наследования гена *FA* и молекулярных маркеров ГСIV.

При оценке совместного наследования гена *FAS* и SSR-маркеров *A9*, *AA81*, *A174*, а также CAPS-маркера *GapC1* во всех случаях наблюдали независимое наследование. Таким образом, данные о локализации *FA* в проксимальной части ГСIV не получили по результатам проведенной работы подтверждения.

#### **3.1.5. Изучение меж- и внутривидового полиморфизма предполагаемых гомологов генов *CLV2* и *FAS2***

Для локализации на генетической карте фрагментов, предположительно гомологичных генам *CLV2* и *FAS2* (*PsCLV2* и *PsFAS2* соответственно, последовательности впервые охарактеризованы в работах [Коновалов, 2006; Коновалов, Вячеславова, 2006]), был предпринят поиск полиморфизма в их последовательностях. Для этого была проведена обработка фрагментов эндонуклеазами рестрикции (*AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaI*, *RsaI*, *TaqI*, *Tru9I*; см.

«Материалы и методы»). Для сравнения были выбраны формы, по возможности полно представляющие разнообразие рода *Pisum*: культивируемые представители типового подвида *P. sativum* subsp. *sativum* различных селекционных центров (сорта Немчиновский, Filby, Alaska, Frisson, Rosacrone, Cao lan), некоторых других подвидов (линии JI2, JI64, JI1794, JI2423) и диких видов (JI1392, *Vavilovia formosa*, см. также раздел «Материалы и методы»). Полученные данные могут быть использованы для локализации фрагментов на генетической карте и сопоставления их положения с известными «генами фасциации» гороха.

При обработке фрагмента *PsFAS2* эндонуклеазой *Hpa*II было обнаружено два аллеля, один из которых (около 370 п.н.) был обнаружен у всех проанализированных сортов и маркерных линий гороха, кроме Rosacrone. Второй аллель, около 300 п.н., характеризовал дикие подвиды гороха (кроме JI1392 - *P. sativum* ssp. *arvense*), горох красно-желтый и вавиловию; кроме того, этот же аллель был обнаружен у *Lathyrus vernus* Bernh. Обнаруженный полиморфизм может быть использован для локализации фрагмента *PsFAS2* на генетической карте.

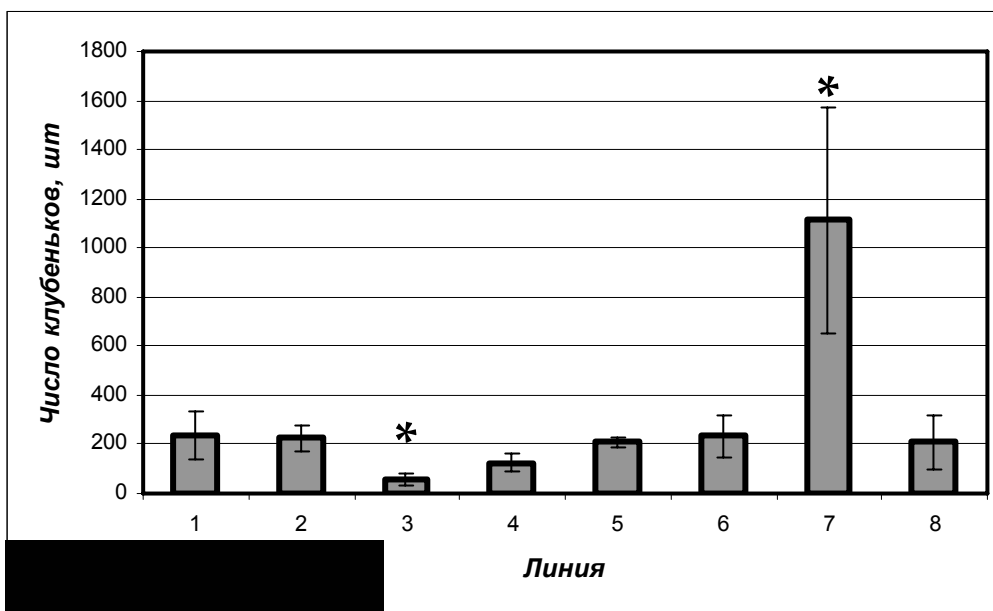
Фрагмент *PsCLV2* не обнаружил полиморфизма между изученными формами при обработке выбранными эндонуклеазами рестрикции, что может быть связано с его небольшими размерами (835 п.о.) и высокой консервативностью.

### **3.1.6. Участие генов, регулирующих размер ПАМ, в контроле процесса нодуляции**

Из данных литературы известно, что часть генов, негативно регулирующих размеры ПАМ у бобовых, вовлечена также в контроль симбиотической азотфиксации (см. «Обзор литературы»). Так, часть фасциированных мутантов бобовых характеризуется также гипернодуляцией. Примечательно, что эти мутанты (в т.ч. *sym28* и *nod4* гороха) были выделены именно при целенаправленном поиске форм с нарушениями азотфиксации. Вообще на развитие симбиотических корневых клубеньков могут оказывать гены, напрямую с развитием корня не связанные - например, ген *COCHLEATA*, вовлеченный в контроль морфогенеза листа [Zhukov et al., 2008] (см. также «Обзор литературы»). В отношении известных мутантов с нарушенной активностью ПАМ исследования такого рода ранее не были проведены.

Был проведен подсчет числа симбиотических клубеньков изучаемых фасциированных форм («Штамбовый», JI2771 (*fas*), Rosacrone, JI5, JI2671 (*fa*),

К301 (*nod4*), P64 (*sym28*) и контроля (сорт Немчиновский). Материал (5 индивидуальных растений каждой линии) был собран через 30 дней после посадки на опытном участке ЗБС им. С.Н. Скадовского. Оценка достоверности различий была проведена с использованием U-критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. На рис. 17 приведены результаты расчетов; обращает на себя внимание существенное варьирование значений признака.



**Рис. 17.** Число симбиотических клубеньков на корнях фасцированных линий гороха (приведены среднее значение и стандартное отклонение).

*Примечание:* отмечены достоверные отличия от контроля при  $p < 0.01$  (\*). 1 – Немчиновский-766, 2 – «Штамбовый», 3 – JI2771, 4 – JI2671, 5 – Rosacrone, 6 – JI5, 7 – K301, 8 – P64.

**Рис. 18.** Боковые корни сорта Немчиновский-766 (*NOD4*) (А) и линии K301 (*nod4*) (Б). Масштабная линейка 1 см.

Достоверные отличия от контроля наблюдались у линий JI2771 и K301; в ряде случаев число клубеньков у мутантов было меньшим, чем в контроле. По всей видимости, параметр «число клубеньков» находится в прямой зависимости от размеров корневой системы в

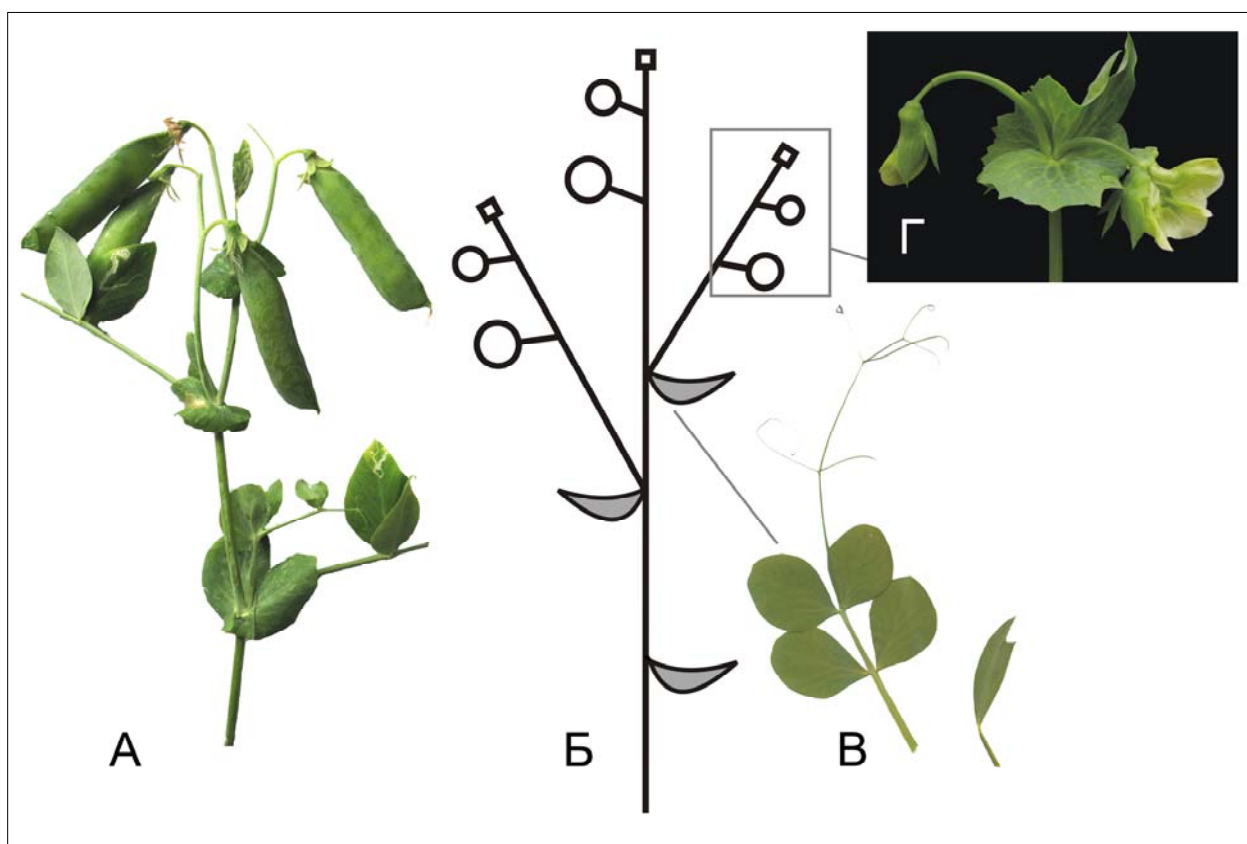
целом, и эта величина может находиться под влиянием иных генов. Так, например, у линии J12771 число клубеньков меньше, чем у мутанта «Штамбовый» (обе линии имеют генотип *fas*) - вероятно, в силу того, что J12771 является карликом (*le*) и корневая система развита слабее. Кроме того, известно, что у некоторых фасцированных форм корневая система может быть развита в меньшей степени, чем у исходных форм [Першина, Хвостова, 1977], что также может оказывать влияние на картину азотфиксации в целом. Наиболее целесообразно сравнивать мутанты и линии, из которых они были получены (в данной работе в паре Немчиновский-766 – «Штамбовый»). На то обстоятельство, что признаки корня (и нодуляции в частности) могут находиться под модифицирующим влиянием целого ряда генов, косвенно указывает и тот факт, что генетически идентичные в отношении «генов фасциации» формы весьма значительно отличаются по числу симбиотических клубеньков. Например, это можно наблюдать при сравнении мутанта «Штамбовый» и линии J12771, которые имеют генотип *fas*.

Наиболее значительные отличия от контроля проявляет линия K301 (*nod4*), характеризующаяся гипернодуляцией [Сидорова, Ужинцева, 1994] (рис. 18). Клубеньки формируются примерно с одинаковой плотностью и на главном, и на боковых корнях по всей их длине. Напротив, линия P64, выделенная по признаку гипернодуляции, не обнаруживает достоверных отличий от контроля (среднее число клубеньков оказывается даже меньшим, чем у сорта Немчиновский-766), хотя и демонстрирует значительный разброс значений.

Полученные данные подтверждают связь контроля активности ПАМ и процесса нодуляции, осуществляемых геном *NOD4*. Наблюдения за формированием симбиотических клубеньков косвенно указывают на подверженность этого процесса модифицирующему влиянию генного окружения (как это видно, например, для сорта Rosacrone и линий J15 и J12671). Ген *FAS*, по-видимому, не участвует в контроле нодуляции.

### 3.2. Сохранение недифференцированного состояния апикальной меристемы побега

Блокирование дифференцировки ПАМ в течение всей жизни составляет один из важнейших компонентов ее активности. У основных современных модельных объектов генетики развития растений, *A. thaliana*, *A. majus* и *P. sativum*, ПАМ остается недифференцированной в процессе нормального онтогенеза. Иными словами, у этих растений ПАМ формирует только органы в латеральном положении (листья, цветки, оси более высокого порядка).



**Рис. 19.** Соцветие мутанта *det* (линия ДТР) - фотография (А), осевая схема (Б), морфология последнего листа (В) и последнего латерального цветonoса (Г). Обозначения к Б см. на с. 6.

У резуховидки описаны несколько мутантов, формирующих терминальные цветки, в то время как у гороха терминальный цветок (видимо, истинный) формируется только у мутантов *stp-2* и *det veg1* (см. «Обзор литературы»). Однако для бобовых в целом определенный интерес представляет развитие терминального цветonoса, по структуре сходного с пазушными. У гороха, как и у многих травянистых *Papilionoideae*, подобная структура не развивается (см.



[Weberling, 1989]), т.е. соцветие в целом усечено. Однако цветки на главном побеге формируются у мутантов *det* (*determinate*), более подробная характеристика которых приведена в обзоре литературы. Хотя нуклеотидная последовательность и особенности экспрессии гена *DET* хорошо изучены, некоторые особенности фенотипического проявления и взаимодействия с другими ключевыми генами были рассмотрены в рамках настоящей работы.

**Рис. 20.** Морфология соцветий *Medicago lupulina* (А, Б) и *M. falcata* (В, Г) нормального строения (А, В) и с детерминантным типом роста (Б, Г). Обозначения к осевым схемам см. с. 6.

### 3.2.1. Фенотипическая характеристика мутанта *det*

Фенотип мутантов *det* описан в ряде работ отечественных и зарубежных авторов [Makasheva, Drozd, 1987; Swiecicki, 1987; Singer et al., 1990, 1999], но нуждается в некоторой детализации. При выполнении настоящей работы были использованы два источника мутации *det*, отличные от типовой линии J11358: линии ДТР (и созданная на ее основе линия ДТР(м); мутация *det* в этих линиях происходит от мутанта И.А. Поповой [1972]) и «Люпиноид» (донором мутации *det* у

этой формы является сорт Детерминантный ВСХИ, созданный на основе детерминантного мутанта А.М. Шевченко [Шевченко, 1993; Кондыков и др., 2006]). Аллельность этих форм была подтверждена при скрещивании в ходе представленной работы; гибриды  $F_1$  (ДТР × «Люпиноид») обладали детерминантным типом роста. Аллельность линии ДТР и типового носителя мутации *det* была показана в работе [Marx, 1987].

У мутантов *det* в пазухе предпоследнего листа на главной оси формируется цветонос нормальной структуры. В следующем узле зачастую развивается лист измененной структуры (однолисточковый или с крайне редуцированной листовой пластинкой, сростающейся с прилистниками, рис.19Г). Интересно отметить, что лист такой структуры развивается даже у двойных мутантов *det af*, у которых листовые пластинки в норме не развиваются. В пазухе последнего листа формируется цветонос, несущий, как правило, два цветка, которые часто срстаются (т.е. оказываются фасцированными). В терминальном положении развивается цветонос, идентичный нормальному пазушному. Таким образом, всего на главном побеге формируется до трех цветоносов (рис. 19Б); первый пазушный и терминальный цветут практически одновременно и несколько раньше, чем второй пазушный. Можно заключить, что развитие второго бокового цветоноса (предшествующего терминальному) подавлено. Вероятно, срастание цветков на нем также возникает в результате недостаточной интенсивности процессов растяжения. У многоцветковой линии ДТР среднее число цветков в первом боковом цветоносе составило  $4.40 \pm 0.06$ , во втором -  $4.13 \pm 1.13$ , в терминальном -  $2.14 \pm 0.53$ .

Кроме того, терминальный цветонос в большинстве случаев несет крупные брактей, чаще парные. У растений линии ДТР(м) брактей не формируются, что может быть объяснено ингибирующим влиянием мутации *st*, известным из литературы [Lamprecht, Mrkos, 1950].

В целом фенотип мутантов может быть объяснен, учитывая функциональную взаимосвязь генов *DET* и *UNI* (см. «Обзор литературы»). Морфология последнего стеблевого листа очень сходна с таковой у мутантов Бобовых по гомологам гена *UNI* (простой лист у *Pisum*, однолисточковый у *Medicago* [Wang et al., 2008a]), что подтверждает гипотезу С. Сингер с соавторами [Singer et al., 1999] о взаимном дублировании функций генов *DET* и *UNI*. Формирование аномального «гибридного» цветка на втором пазушном цветоносе может быть результатом объединения флоральных примордиев на ранних стадиях развития из-за



ингибирующего влияния терминального цветоноса на предпоследний латеральный.

Возможно иное объяснение необычной структуры последнего пазушного цветоноса. Его примордий оказывается в области генетической регуляции, присущей цветку (то есть пазушному органу на оси терминального цветоноса). Именно вследствие гибридизации программ развития последний лист обладает признаками редукции (сходен с брактеей), а последний пазушный цветонос - признаками цветка.

Интересно отметить, что «*det*-подобные» формы роста регулярно отмечаются у других видов бобовых. Так, детерминантный тип роста используют при селекции бобов *Vicia faba* L. [Кондыков и др., 2006]. В ходе проведенных наблюдений удалось обнаружить детерминантные формы в популяциях двух видов люцерны, *Medicago falcata* L. и *M. lupulina* L. (рис. 20) в Западном Подмосковье (Истринский и Рузский районы). У второго вида подобная изменчивость отмечена в литературе [Weberling, 1989] и, вероятно, является нормальной.

Морфология этих форм отчасти подтверждает гипотезу о гибридизации морфогенетических программ в определении строения латеральных цветоносов, непосредственно предшествующих терминальному. У люцерны несколько коротких паракладиев, предшествующих терминальной кисти, находятся в пазухах брактеей (а не листьев) и существенно обеднены.

Участие гена *DET* в контроле морфогенеза пазушных цветоносов более подробно описано в разделе «Регуляция активности апикальной меристемы пазушного цветоноса».

### **3.2.2. Гибридологический анализ наследования гена *DET***

При статистической обработке результатов наблюдений за популяциями  $F_2$  от скрещивания линий, несущих мутацию *det*, с нормальными в отношении изучаемого признака формами во всех случаях наблюдалось достоверное соответствие наблюдаемого расщепления ожидаемому (табл. 8). Таким образом, подтверждены известные из литературы данные о моногенных различиях по признаку «тип роста».

**Таблица 8.** Генетический анализ F<sub>2</sub> от скрещивания форм с ДТР с сортами и линиями.

Популяция F <sub>2</sub>	Число растений		Всего	H <sub>0</sub> -гипотеза	$\Sigma\chi^2$
	Нормальные	ДТР			
«Люпиноид» × Флагман	О	110	40	150	0.222
	Е	112.50	37.50		
«Люпиноид» × Rosacrone	О	42	14	56	0.000
	Е	42.00	14.00		
«Люпиноид» × WL1132	О	121	36	157	0.359
	Е	117.75	39.25		
«Люпиноид» × Wasta	О	139	36	174	1.847
	Е	130.50	43.50		
ДТР × Флагман	О	94	32	126	0.011
	Е	94.50	31.50		
Флагман × ДТР	О	109	36	145	0,002
	Е	108.75	36.25		
«Штамбовый» × ДТР	О	92	39	131	1.590
	Е	98.25	32.75		

Примечание: О – наблюдаемое значение, Е – ожидаемое; число степеней свободы *d.f.* = 1, *p* < 0.05.

### 3.2.3. Определение положения гена *DET* на генетической карте

Так как положение гена *DET* известно по литературным данным [Makasheva, Drozd, 1987; Swiecicki, 1987], специальные исследования по его локализации в рамках настоящей работы не были проведены. Необходимо отметить, что в популяциях F<sub>2</sub> от скрещиваний (ДТР × Флагман), (Флагман × ДТР) и («Штамбовый» × ДТР) проводили анализ совместного наследования признаков «тип роста» и «форма семян» (линия ДТР имеет морщинистые семена и генотип *det r*). Рекомбинантов *DET r* или *det R* за весь период наблюдений обнаружено не было, т.е. были подтверждены данные о тесном сцеплении этих генов, локализованных в V группе сцепления.

### 3.2.4. Взаимодействие *DET* с другими генами, контролирующими активность апикальной меристемы

Необычный тип соцветия развивается у растений, несущих мутации в гене *DET* и одном из генов, осуществляющих негативную регуляцию размеров ПАМ. По-всей видимости, увеличенная (фасциированная) меристема претерпевает превращение в терминальный цветонос, в результате чего формируется терминальная многоцветковая кисть (например, в линии «Люпиноид»). Апикальная меристема может сохранять кольцевидную форму; в таких случаях терминальный цветонос имеет воронковидное завершение (рис. 21Б). Цветоножки отдельных цветков отходят непосредственно от главной оси. При скрещивании линии «Люпиноид» с нефасциированными формами в популяции  $F_2$  наблюдали четыре фенотипических класса: 1) нормальные растения с открытым ростом и пазушным расположением кистей, 2) фасциированные растения с открытым ростом и пазушными кистями, 3) нефасциированные формы с детерминантным типом роста и 4) растения с «люпиноидным» соцветием. В популяции гибридов  $F_2$  от таких скрещиваний значение  $\chi^2$  при проверке гипотезы о дигенных различиях между родительскими формами не превысило порогового (табл. 9).

Габитуально схожие формы (двойные мутанты *det fas*) были получены и при скрещивании мутанта «Штамбовый» с линией ДТР.

**Таблица 9.** Генетический анализ  $F_2$  от скрещивания линии «Люпиноид» с нормальными формами и получение двойных мутантов *fas det* в  $F_2$  («Штамбовый» (*fas*) × ДТР (*det*)).

*Примечание:* О – наблюдаемое значение, Е – ожидаемое; число степеней свободы *d.f.* = 3,  $p < 0.05$ .

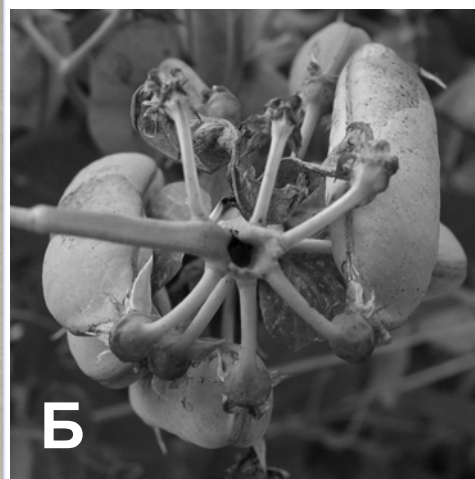
Популяция	Число растений				Всего	$H_0$ -гипотеза	$\Sigma\chi^2$
	Норма	Фасц., без ДТР	Нефасц., ДТР	Фасц., ДТР			
«Люпиноид» × <i>Rosacrone</i>	О	-	42	-	56	3:1	0.000
	Е		42.00	14.00			
«Люпиноид» ( <i>fa det</i> ) × WL1132	О	103	25	22	161	9:3:3:1	4.907
	Е	90.58	30.18	30.18			

«Люпиноид» × Флагман	О	52	15	15	4	86		0.780
	Е	48.36	16.13	16.13	5.38			
«Люпиноид» × Wasta	О	114	25	24	11	174		6.729
	Е	97.86	32.63	32.63	10.88			
«Штамбовый» ( <i>fas</i> ) × ДТР ( <i>det</i> )	О	71	21	31	8	131		2.306
	Е	73.68	24.56	24.56	8.20			

Отметим, что гибриды второго поколения с генотипом *det fa* обладали значительно менее выраженным проявлением нарушения в развитии, чем родительская форма «Люпиноид», и в ряде случаев были практически неотличимы от гибридов *det FA*. Таким образом, можно заключить, что многоцветковый терминальный цветочнос является результатом взаимодействия целой комбинации генов-модификаторов, которая легко распадается при скрещиваниях.



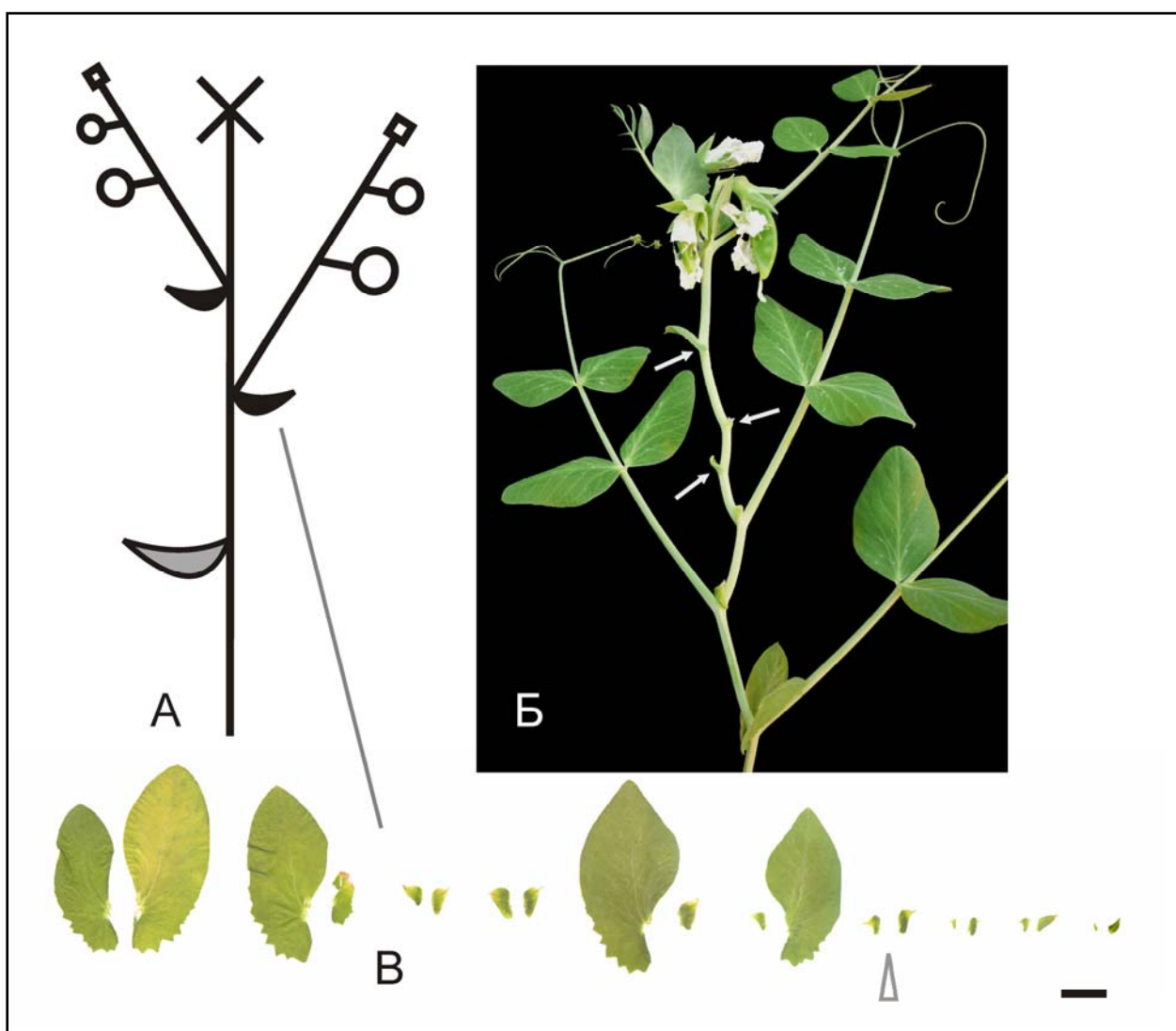
**Рис. 21.** Соцветие линии «Люпиноид» вид сбоку (А) и сверху (Б). Масштабная линейка 1 см.



### 3.3. Поддержание пролиферативной активности апикальной меристемы

Аспект функциональной активности ПАМ, связанный с продолжением пролиферации, изучен у гороха явно недостаточно. В ходе настоящей работы исследованы особенности наследования и проявления мутации *deh* (*determinate habit*), приводящей к преждевременному прекращению роста побега.

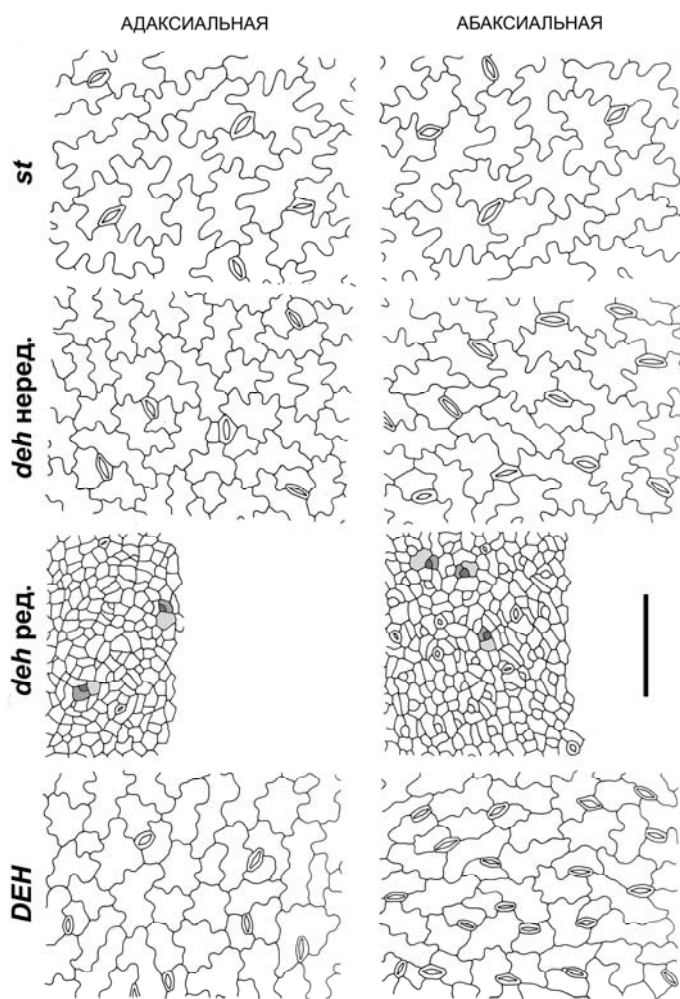
#### 3.3.1. Анализ фенотипа мутантов *deh* в сравнении с нормой



**Рис. 22.** Соцветие мутанта *deh* (сорт Флагман) - схема (А), фотография (Б) и прилистники (В). Стрелками показаны узлы с редуцированными листьями (Б) и узел инициации цветения (В). Обозначения к А см. на с. 6.

Мутанты *deh* характеризуются ранним прекращением активности ПАМ. По данным литературы (например, [Кондыков и др., 2006]), это нарушение сочетается с уменьшением площади прилистников верхних узлов. Авторы процитированной работы считают, что отмирание апекса находится в прямой зависимости от изменения площади поверхности прилистников: «сильная редукция и последующее быстрое опадание (апекса) определяется недостатком пластических веществ, вызванным уменьшением площади фотоассимилирующей поверхности в этой зоне растения» [Кондыков и др., 2006: 34].

Такая логическая посылка, очевидно, нуждается в дополнительных физиологических исследованиях и выглядит неочевидной, поскольку детерминантный тип роста не характерен, например, для форм с редуцированными прилистниками (генотип *st*). Так, у сорта Filby, растения которого имеют усатые (безлисточковые) листья и редуцированные прилистники, число репродуктивных узлов в условиях поля в 2009 г. составило  $8.000 \pm 1.000$ .



**Рис. 23.** Эпидермис прилистников растений с детерминантным типом роста и контроля. Клеточные группы, возникающие в результате асимметричных делений выделены оттенками серого. Масштабная линейка 100 мкм.

При детальном анализе фенотипа мутанта *deh* по сравнению с нормальными растениями удалось установить, что для первых действительно характерна сильная редукция прилистников. Примерно с середины побега площадь прилистников значительно

уменьшена; прилистники выглядят недоразвитыми, с полупрозрачной пластинкой,

рано засыхающей по краям (рис. 22В). Редукция носит прогрессирующий характер (рис. 22В, 26). В условиях теплицы довольно характерно неполное проявление этого признака: часть прилистников (зачастую один из двух в узле) остаются нередуцированными (рис. 22В). В ряде случаев после нескольких узлов с сильно редуцированными прилистниками рост продолжается с формированием узлов, несущих неизмененные листья. Вероятно, определяющим фактором в развитии этого явления выступает высокая влажность. Была также изучена структура клеток эпидермиса прилистников мутанта *deh* (сорт Флагман, проанализированы прилистники нормального размера и с признаками редукции) и растений дикого типа (линия ДТР) (табл. 10). Обнаружено, что эпидермальные клетки нормальных растений имеют изменчивую форму с волнообразными антиклинальными стенками, несколько отличаются по форме на абаксиальной и адаксиальной сторонах (рис. 23). Число устьиц на абаксиальной поверхности больше, чем на адаксиальной (в норме лист гороха амфистомный). У растений сорта Флагман на нередуцированных прилистниках клетки в целом нормальны и не обнаруживают значительных отличий от таковых у растений дикого типа. Однако на прилистниках верхних узлов картина иная: клетки мелкие, антиклинальные стенки практически без искривлений, во многих случаях удается определить сестринские клетки (возникшие в результате одного акта митоза). Устьица меньше по размеру, но, по всей видимости, функциональны: на репликах визуализируются и открытые, и закрытые устьичные щели (рис. 23). В целом эпидермис редуцированных прилистников представляется недоразвитым. На нем отчетливо можно распознать специфические клеточные группы, возникающие в результате последовательных асимметричных делений и служащие основой для аномоцитного устьичного аппарата (см. обзор [Nadeau, Sack, 2002]).

**Таблица 10.** Значения количественных признаков эпидермиса прилистников у сорта Флагман и форм дикого типа в условиях теплицы: В - верхняя (адаксиальная), Н - нижняя (абаксиальная) сторона.

Линия (генотип)	Паркетные клетки			Устьица	
		Площадь поверхности, мм <sup>2</sup>	Периметр, мм	Круглый коэффициент формы	Длина щели, мм
ДТР ( <i>det DEH ST</i> ), контроль	В	0,001636 ± 0,000415	0,217192 ± 0,042623	1,524454 ± 0,097042	0,015535 ± 0,001470
	Н	0,002203 ± 0,000534	0,175176 ± 0,030942	1,055573 ± 0,073607	0,017118 ± 0,001789

Флагман ( <i>DET deh ST</i> ), нередуцированные прилистники	В	0,001597 ± 0,000402	0,232728 ± 0,046238	1,642873 ± 0,141685	0,016568 ± 0,001524
	Н	0,002152 ± 0,000576	0,279780 ± 0,059279**	1,700319 ± 0,155026	0,019191 ± 0,002640
Флагман, редуцированные прилистники	В	0,000326 ± 0,000093**	0,012607 ± 0,002209**	0,201569 ± 0,041357	0,008929 ± 0,000965
	Н	0,000179 ± 0,000051	0,058025 ± 0,009887**	1,232168 ± 0,087821	0,009345 ± 0,001320
Filby ( <i>DET DEH st</i> )	В	0,003265 ± 0,000712**	0,436353 ± 0,090804**	2,135218 ± 0,210207	0,018909 ± 0,002389
	Н	0,003114 ± 0,000504**	0,424113 ± 0,056662**	2,143953 ± 0,152208	0,019823 ± 0,001638

Для сравнения проанализировали особенности эпидермиса прилистников у носителей мутации *st* (сорт Filby), которые также характеризуются редуцированными прилистниками. Показано, что паркетные клетки на обеих сторонах прилистника крупные, с сильно извитыми антиклинальными стенками, устьица нормального размера (рис. 23). По всей видимости, у мутантов *st* уменьшение размеров прилистников связано с уменьшением числа клеток, а не их размеров и степени дифференцированности.

Возможны различные гипотезы относительно происхождения фенотипа мутантов *deh* в его аспекте, касающемся прилистников. Так, например, при работе с *A. thaliana* показано, что дифференцировка паркетных клеток эпидермиса связана с увеличением их ploидности [Melaragno et al., 1993]. Для того чтобы определить связь с процессом полиплоидизации (или его нарушениями) у мутанта *st* гороха, требуются дополнительные исследования.

Кроме того, необходимо отметить сильную редукцию не только прилистников, но и части листовых пластинок в верхних узлах. В некоторых случаях лист вообще остается недоразвитым, в виде небольшого зачатка, хотя узлы с недоразвитыми листьями могут чередоваться с узлами с нормально развитыми листьями (рис. 22Б). Такая неравномерность в развитии листьев особенно отчетливо проявляется в условиях теплицы.

Репродуктивная зона мутантов *deh* значительно сокращена. Так, при анализе признака «число репродуктивных узлов» у сорта Флагман в полевых условиях в 2007 г. было зафиксировано среднее значение  $3.6596 \pm 0.9057$  (указано стандартное отклонение). В тот же период значение того же параметра у гибридов



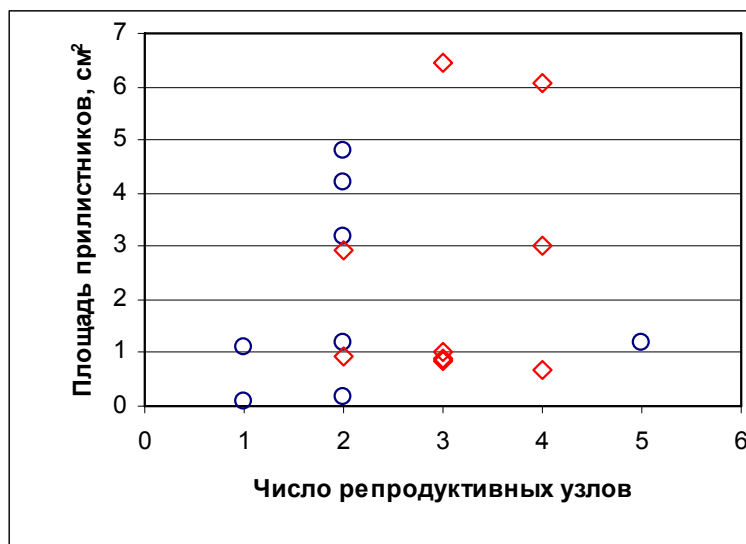
F<sub>1</sub> (Флагман × Filby) составило  $6.3333 \pm 1.9720$  (обращает на себя внимание фенотипическая неоднородность гибридной популяции, см. ниже).

Полученные при изучении фенотипа мутантов *deh* данные позволяют считать нарушения в развитии ПАМ и листьев плеiotропным проявлением мутации, не устанавливая между ними причинно-следственной связи, как это постулировано в работе [Кондыков и др., 2006]. В пользу такого заключения свидетельствуют следующие обстоятельства:

1. Редуцированные прилистники мутантов *deh* обладают функциональными устьицами и, вероятно, способны к транспирации.
2. У мутантов *st*, также характеризующихся редуцированными прилистниками во всех узлах, сокращения генеративной фазы не наблюдается (см. выше).
3. В условиях теплицы число репродуктивных узлов у мутанта *deh* ниже, чем в поле, в то время как для площади прилистников в тех же условиях наблюдается обратная зависимость (табл. 11).

Достоверной корреляции между суммарной площадью прилистников в репродуктивной зоне и числом репродуктивных узлов не отмечено (рис. 24).

Очевидно, что свой вклад в фотоассимиляцию вносят также листья, стебли, чашечки цветков и другие органы, поэтому интерпретация активности ассимиляции как функции площади прилистников является существенным упрощением. Таким образом, едва ли возможно преждевременное отмирание апекса, связанное с редукцией прилистников и отчасти листьев, хотя именно «листовой» фенотип служит надежным фенотипическим маркером растений с мутантным генотипом. В дальнейшей работе признаки листа были использованы как маркеры при определении характера наследования мутации *deh*.



**Рис. 24.** Взаимосвязь числа репродуктивных узлов и суммарной площади прилистников репродуктивной зоны у индивидуальных растений сорта ДТР в условиях поля и теплицы (показаны синим и красным соответственно).

**Таблица 11.** Зависимость размеров прилистников и величины репродуктивной зоны от условий у сорта Флагман (*deh*) в 2009 г. Площадь подсчитана для всех репродуктивных узлов. Указаны среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Условия	Суммарная площадь прилистников, см <sup>2</sup>	Число репродуктивных узлов
Поле	2.5370 $\pm$ 2.2871	3.1111 $\pm$ 0.7817
Теплица	7.5524 $\pm$ 6.9690	2.1111 $\pm$ 1.1667

### 3.3.2. Гибридологический анализ наследования признака детерминантного типа роста

При изучении нескольких гибридных популяций F<sub>2</sub> от скрещиваний с участием в качестве одной из родительских форм сорта Флагман (*deh*) были получены следующие данные (табл. 12).

**Таблица 12.** Гибридологический анализ наследования признака детерминантного типа роста.

*Примечание:* О - наблюдаемое значение, Е - ожидаемое значение, *d.f.* = 1, *p* < 0.05. Значения  $\chi^2$ , превышающие критические, выделены **полужирным курсивом**.

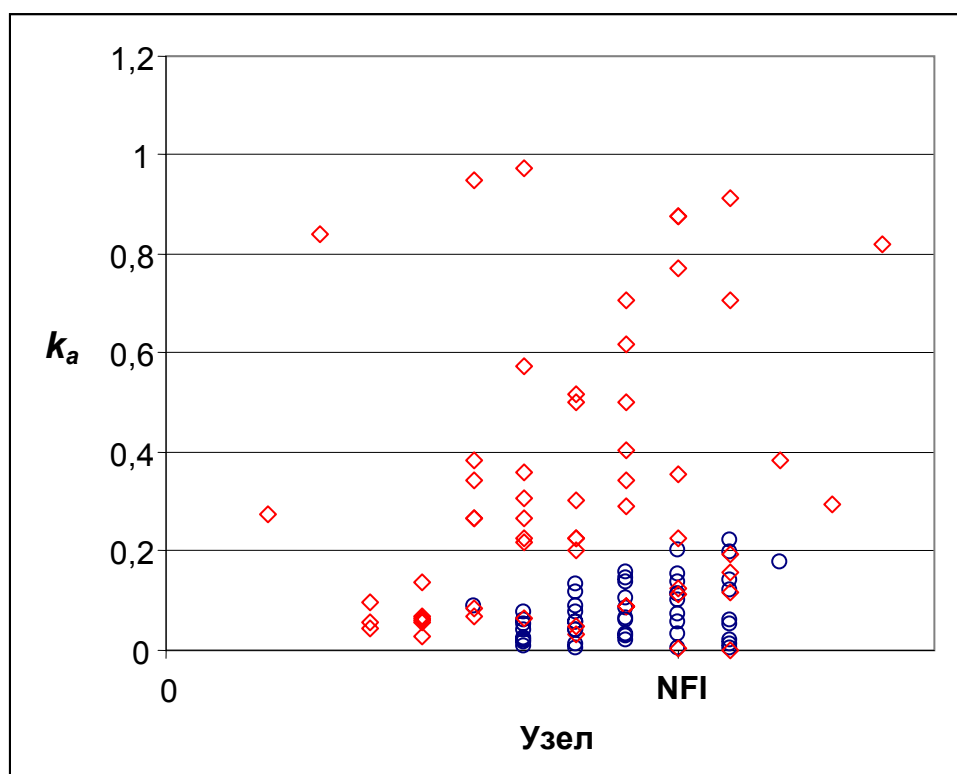
Популяция F <sub>2</sub>	Число растений		Всего	H <sub>0</sub> -гипотеза	$\Sigma\chi^2$
	Нормальные	ДТР			
Флагман ( <i>deh</i> ) × Filby	О	18	71	3:1	<b>93.338</b>
	Е	17.75			
Флагман ( <i>deh</i> ) × Rosacrone	О	62	94	3:1	<b>4.099</b>
	Е	70.50			
Флагман ( <i>deh</i> ) × «Штамбовый»	О	30	48	3:1	<b>4.000</b>
	Е	36			
Флагман ( <i>deh</i> ) × ДТР	О	67	131	3:1	<b>82.090</b>
	Е	98.25			
ДТР × Флагман ( <i>deh</i> )	О	43	104	3:1	<b>62.821</b>
	Е	26			
				1:3	<b>14.821</b>

Таким образом, в большинстве случаев наблюдаются достоверные отклонения от ожидаемого расщепления, свидетельствующие об отличных от моногенных различиях между родительскими формами. Этот факт отмечен и в литературе [Бабайцева, 1996], хотя в некоторых работах никаких отличий от моногенного типа наследования не отмечено [Зубов, Князькова, 1989].

В единственном случае ( $F_2$  Флагман  $\times$  Filby) было отмечено достоверное соответствие наблюдаемого расщепления ожидаемому в случае справедливости гипотезы о доминировании признака ДТР. Для проверки этой гипотезы было изучено проявление ряда количественных признаков прилистников гибридов  $F_1$  от скрещиваний Флагман  $\times$  ДТР и ДТР  $\times$  Флагман (максимальный коэффициент асимметрии прилистников; круглый коэффициент формы, периметр и площадь поверхности паркетных клеток<sup>4</sup>). Полученные данные были подвергнуты факторному анализу с экстракцией данных по методу главных компонент. Было показано, что гибриды  $F_1$  уклоняются в сторону сорта Флагман (*deh*), хотя и не достигают его, т.е. наблюдается неполное доминирование мутации *deh* (рис. 27). Большинство исследованных популяций  $F_2$ , однако, не обнаруживают достоверного соответствия наблюдаемого расщепления ожидаемому даже с учетом неполного доминирования. Вероятно, признак ДТР у мутанта *deh* подвержен модифицирующему влиянию среды и генного окружения.

---

<sup>4</sup> Микроморфологические признаки учитывали на абаксиальной и адаксиальной сторонах прилистников отдельно.



**Рис. 25** Значения коэффициента асимметрии прилистников у индивидуальных растений сортов ДТР и Флагман (показаны синим и красным соответственно). NFI - узел инициации цветения.

### 3.3.3. Определение положения гена *DEH* на генетической карте

Как уже было упомянуто, А.Е. Зубов и С.Р. Князькова [1989] приводят данные о дефиците форм *deh st* и *deh b* в гибридной популяции  $F_2$  от скрещивания формы с детерминантным ростом и линии, маркированной мутациями *st* и *b*. Хотя в этой работе не приведена количественная обработка первичных результатов, можно предположить сцепление *DEH* с маркерами ГСIII.

В популяции  $F_2$  от скрещивания Флагман × Filby оценивали совместное наследование *DEH* и маркеров ГСIII – *LE* и *ST*, а также молекулярных маркеров различных типов, локализованных в этой группе сцепления. Значения  $\chi^2$  при проверке гипотезы  $H_0$  о независимом наследовании приведены в табл. 13.

**Таблица 13.** Оценка независимости наследования гена *DEH* с морфологическими и молекулярными маркерами ГСIII в популяции F<sub>2</sub> (Флагман × Filby).

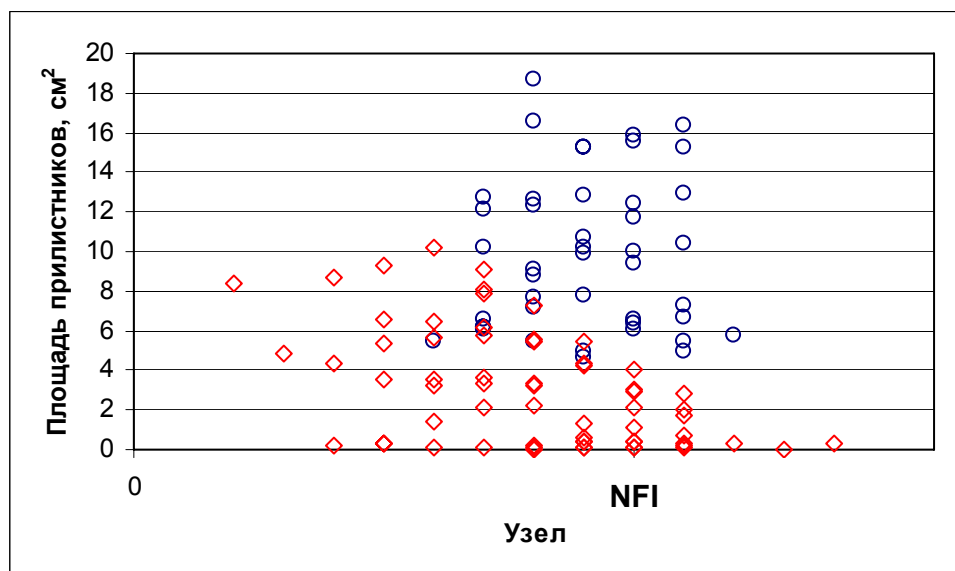
Пара маркеров	Классы в расщеплении						Число растений	H <sub>0</sub> -гипотеза	$\Sigma\chi^2$
	DA	DH	DB	AA	AH	AB			
<i>DEH - LE</i>	35		14	10		8	67	9:3:3:1	4.350
<i>DEH - ST</i>	36		12	13		4	65		0.124
<i>DEH - AB92</i>	10	23	11	3	7	4	58	6:3:3:2:1:1	0.371
<i>DEH - PSBLOX2</i>	9	18	14	4	9	4	58		2.218

Примечание: А - гомозиготы как первый родитель (Флагман), В - гомозиготы как второй родитель (Filby), D - доминантный фенотип как у первого родителя, Н - гетерозиготы, *d.f.* = 3, *p* < 0.05.

### 3.3.4. Взаимодействие гена *DEH* с другими генами, регулирующими активность побеговой апикальной меристемы

При проведении гибридологического анализа наследования гена *DEH* были получены двойные мутанты *deh fas*, *deh fa* и *deh det*, что дало возможность изучить особенности взаимодействия ключевых регуляторов активности ПАМ.

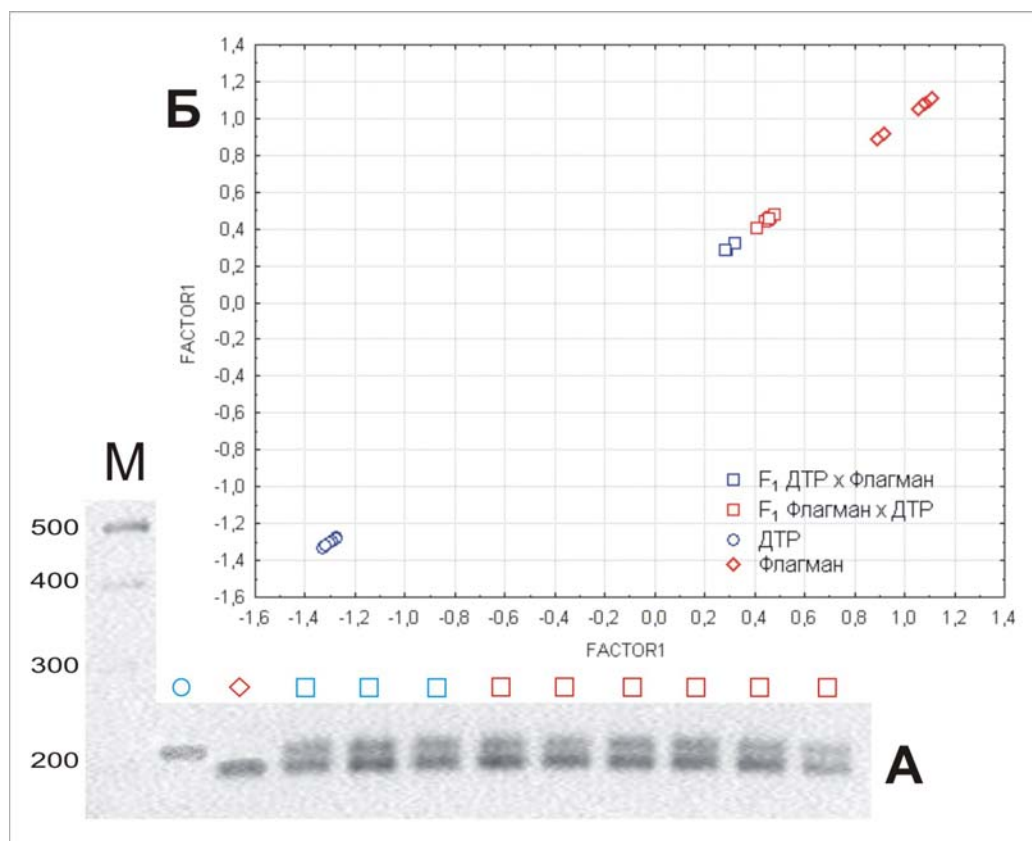
Было установлено, что ген *DEH* связан с регуляторными путями, независимыми от негативной регуляции размеров ПАМ. Фасциированные формы, гомозиготные по мутантному аллелю *deh*, обладают аддитивным фенотипом: развивается фасциированный побег с характерным соцветием, но прилистники в верхней части побега значительно редуцированы (рис. 28).



**Рис. 26.** Суммарная площадь прилистников у индивидуальных растений сортов ДТР и Флагман. Обозначения см. Рис 25.

Большое число листьев в верхней части фасцированного побега логично рассматривать как обстоятельство, в целом увеличивающее ассимилирующую поверхность по сравнению с нормальными растениями. Тот факт, что прекращение роста у мутантов *deh fas* и *deh fa* происходит так же, как и у нефасцированных мутантов *deh FAS* и *deh FA*, также косвенно указывает на отсутствие прямой зависимости прекращения пролиферации ПАМ от редукции прилистников.

Определенный интерес вызывает возможное взаимодействие генов *DET* и *DEH*, так как мутация в каждом из них приводит к детерминантному типу роста. В работе [Шевченко, Шевченко, 1990] указано, что двойные мутанты *deh det* вообще не обнаруживаются в гибридных популяциях вследствие летальности такой комбинации. В настоящей работе такие мутанты были получены. Они в целом характеризуются аддитивным фенотипом, хотя редукция прилистников в репродуктивной зоне (по крайней мере, на оси I порядка) носит куда менее выраженный характер, чем у мутантов *deh DET*. Вследствие этого выявление таких форм в гибридных популяциях составляет определенную трудность (что, вероятно, послужило основанием для процитированного выше заключения).



**Рис. 27.** Анализ главных компонент растений сорта Флагман (*deh*), линии ДТР (DEH) и гибридов первого поколения от прямого и обратного скрещиваний между ними. А - амплификация SSR-маркера AA355 для подтверждения природы гибридов (М - маркер молекулярной массы 100 bp + 1.5 kb DNA Ladder, «Сибэнзим», указаны длины фрагментов в п.о.); Б - анализ главных компонент.

Можно заключить, что ген *DET* активен на более ранних этапах морфогенеза, чем *DEH*, и трансформация ПАМ у мутантов *det* в меристему цветоноса опережает постепенное прекращение ее активности, обусловленное мутацией *deh*.

**Рис. 28.** Фенотип  
двойного мутанта *deh*  
*fas*. Масштабная линейка  
1 см.





### **3.4. Регуляция активности апикальной меристемы пазушного цветоноса**

Горох посевной в настоящее время является основным модельным объектом для изучения морфогенеза сложного соцветия. В пазухах листьев на главной оси расположены оси второго порядка двух типов: воспроизводящие по строению главную ось паракладии («длинные паракладии» в терминах Веберлинга [Weberling, 1989]) и двухцветковые абрактеозные кисти («короткие паракладии») (см. схему на с. 6). Очевидно, что в основе морфогенеза длинных паракладиев лежат в целом те же принципы, что и у главной оси. Формирование коротких паракладиев управляется рядом особых генов, основным из которых является *LF* (см. также Обзор литературы), и представляет собой практически неизученную область генетики морфогенеза растений. В этой связи горох (и бобовые в целом) представляется чрезвычайно удобным объектом для изучения биологии развития сложного соцветия.

Очевидно, что можно говорить об активности апикальной меристемы короткого паракладия (пазушного цветоноса) как о функционировании образовательной ткани очень специализированного побега. Для нее характерны следующие особенности:

- вторичный (по отношению к АМ главного побега) характер;
- поздняя (по сравнению, например, с листьями) инициация;
- кратковременное функционирование и своевременное прекращение пролиферации с образованием стерильного отростка;
- запрет (у гороха) на образование латеральных органов - брактей.

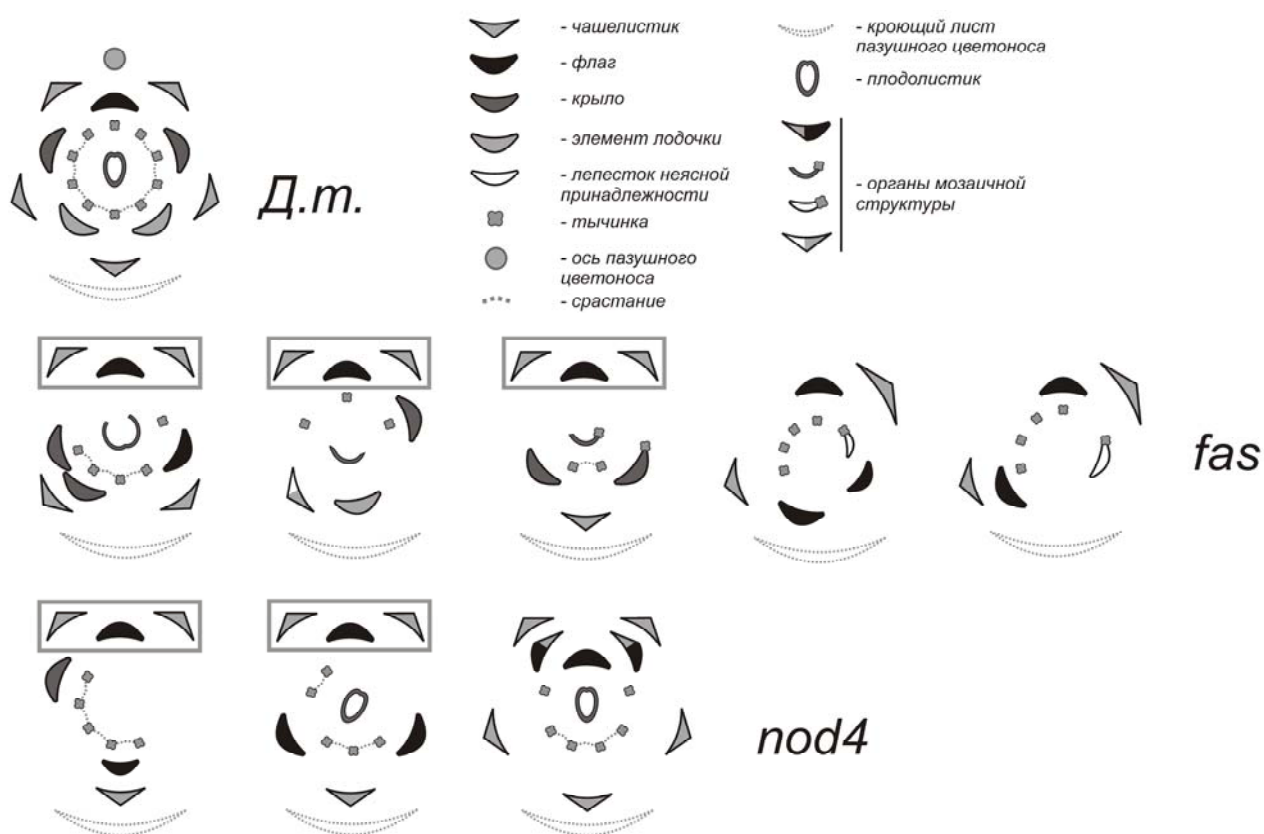
Настоящий раздел посвящен рассмотрению особенностей генетического контроля формирования специализированных осей второго порядка - пазушных цветоносов. Наибольший интерес представляют те аспекты развития этих органов, которые непосредственно связаны с активностью апикальной меристемы главной оси.

#### **3.4.1. Фенотипическая характеристика мутантов с нарушениями формирования пазушного цветоноса**

##### **3.4.1.1. Морфология пазушного цветоноса у различных линий**

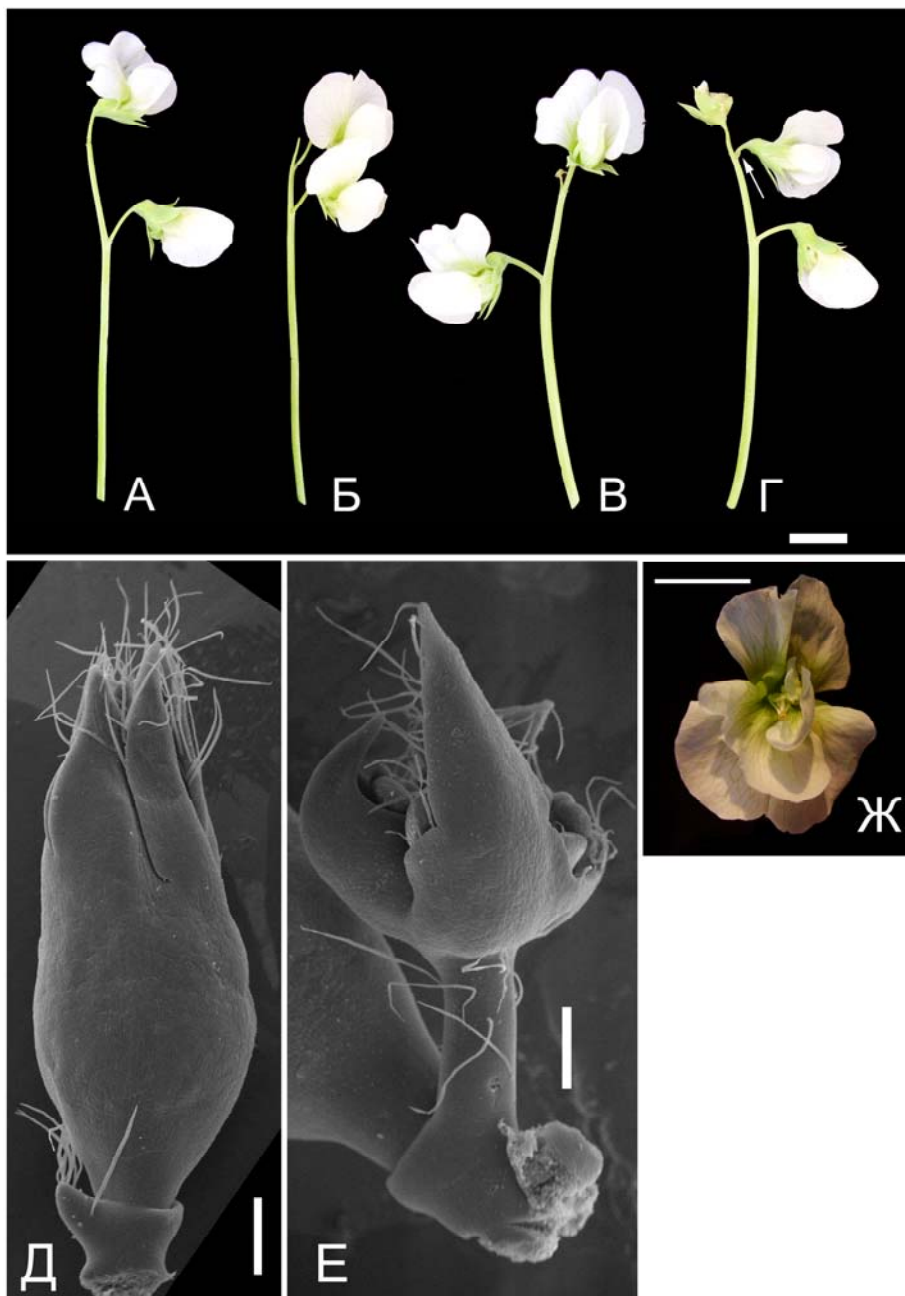
В норме в пазухах листьев флоральной зоны у гороха развиваются цветоносы (обычно двухцветковые), которые сразу после формирования второго

цветка прекращают рост и завершаются более или менее выраженным отростком оси (apical residuum, stub) (рис. 30А). У некоторых фасцированных форм вместо отростка формируются флоральные органы: цветочная почка (обычно рано отмирающая) или, реже, цветок с более или менее развитым околоцветником (рис. 30В, Г). В период наблюдения подобного рода отклонения были отмечены у мутанта «Штамбовый» и линии JI 2771 (*fas*), линий JI 2671 (*fa*) и K301 (*nod4*). Таким образом, у фасцированных растений возможны четыре варианта завершения пазушного цветоноса: короткий отросток, длинный отросток, рано отмирающая цветочная почка и хорошо развитый терминальный цветок (рис. 30). Сходные аномалии отмечены в литературе. Первое описание различных по происхождению аномалий цветка фасцированных форм гороха было дано в работе Л.Н. Костриковой [1967]. Позднее аномальные цветки были описаны у рано зацветающих (генотип *lf*) фасцированных растений [Ambrose, 1993].



**Рис. 29.** Диаграммы аномальных цветков, терминирующих пазушные цветоносы у мутанта «Штамбовый» (*fas*) и линии K301 (*nod4*).

Прямоугольником выделена наиболее стабильная область цветка.



**Рис. 30.** Разнообразие строения пазушных цветоносов у мутанта «Штамбовый»: короткий отросток (А), длинный отросток (Б), отмирающая цветочная почка (В) и терминальный цветок с развитым околоцветником (Г); Д и Е - электронные микрофотографии типов, представленных на фото А и В соответственно. Ж - увеличенное фото терминальной структуры, сходной с терминирующей цветонос Г. Стрелкой указаны брактей. Масштабная линейка 1 см (А-Г, Ж), 300 мкм (Д, Е).

В небольшом числе аномалии строения пазушного цветоноса отмечены и у линий, несущих мутацию *det* (ДТР и ДТР(м)). У линии WL102, маркированной мутацией *l<sup>р</sup>*, никаких нарушений подобного рода не наблюдали, хотя в литературе

упоминается возможность образования терминальных цветков на пазушных цветоносах таких мутантов [Weller, 2007].

Отмечено, что у двойных мутантов *fas det* и *fas lf* происходит усиление проявления аномалии: почти все эктопические цветки обладали хорошо развитым околоцветником и цвели достаточно долго. В то же время у одиночных мутантов *fas* и *fa* практически все аномальные цветки отмирали до раскрытия и выглядели недоразвитыми. У двойного мутанта *fa det* (линия «Люпиноид») никаких аномалий строения пазушной кисти не было отмечено. У мутанта *nod4* терминальные цветки обладали хорошо развитым околоцветником и были схожи с таковыми у двойных мутантов *fas det* и *fas lf*.

В ряде случаев в узлах пазушной кисти, терминированной аномальным цветком, развивались филломы (часто парные, Рис. 30Г). В работе, посвященной терминальным цветкам, А.А. Пенин с соавторами [2005] указывают, что истинно терминальный цветок с околоцветником может формироваться, только будучи предваренным филломом в предшествующем узле. Хотя это правило было сформулировано для терминальных цветков на оси первого порядка (очевидно, оно выполняется и для паракладиев, дублирующих в строении главную ось), брактей предшествуют и терминальным цветкам на пазушных цветоносах. Иными словами, развитие брактей и образование терминального цветка выглядят в целом связанными, хотя определить причину и следствие затруднительно.

Количественная характеристика распределения различных типов строения пазушного цветоноса у фасциированных линий приведена в табл. 14.

#### **3.4.1.2. Симметрия цветка, терминирующего пазушный цветонос**

Во всех случаях строение терминального цветка отличалось от нормального. Сравнение диаграмм аномальных цветков показывает, что наиболее стабильно положение абаксиальных (по отношению к главной оси и кроющему листу на ней) органов околоцветника - двух чашелистиков и флага (рис. 29). Число и положение прочих органов значительно варьирует.

Вероятно, в формирование цветка с измененной морфологией у фасциированных форм вносят вклад несколько факторов. В норме для цветка большинства изученных бобовых характерно опережение развития органов с абаксиальной стороны и, напротив, торможение развития органов с

адаксиальной<sup>5</sup> [Tucker, 2003; Prenner, 2004]. Описывая в ряде работ прямо противоположную тенденцию (торможение закладки и развития органов с адаксиальной стороны) в цветках базальных однодольных, М.В. Ремизова [см. обзор: Ремизова, 2007] предполагает ингибирующее влияние кроющего филлома - брактеи (или в некоторых случаях криптобрактеи). Однако подобное наблюдение не объясняет иного порядка закладки и развития органов у бобовых, сохраняющегося у форм как с брактеозными, так и с абрактеозными соцветиями. Вероятно, наблюдаемый в этом семействе порядок закладки органов цветка является результатом перекрывания ингибирующих влияний (крипто)брактеи, (крипто)брактеолей и апикальной меристемы соцветия.

Цветок, терминирующий пазушный цветонос у фасциированных мутантов гороха, оказывается в ином окружении ингибирующих влияний, нежели латеральные цветки. Можно предположить, что на закладку и развитие органов в нем оказывают влияние меристемы латеральных цветков и кроющий вегетативный лист. Иным распределением влияний следует объяснять наибольшую стабильность адаксиальных органов околоцветника. Кроме того, одновременно имеют место две тенденции - прекращение пролиферации АМ пазушного цветоноса с образованием стерильного отростка (на завершение пролиферации указывают трихомы, располагающиеся в основании терминального цветка и в норме отсутствующие на цветоножках латеральных цветков, рис. 30Д) и флоральный морфогенез. Не исключено, что апикальная меристема пазушного цветоноса меньше по размерам, чем нормальная флоральная, что приводит к обеднению структуры цветка (часть органов не закладывается или не развивается).

---

<sup>5</sup> Вообще в эволюционном ряду бобовых происходит переход от закладки элементов чашечки по спирали (в подсемействе *Caesalpinioideae*) к одновременной круговой закладке (некоторые *Faboideae*) через различные промежуточные стадии, которые неизменно характеризуются опережением закладки абаксиальных элементов [Prenner, 2004].

**Таблица 14.** Распределение различных типов строения пазушного цветоноса среди исследованных линий.

Линия (генотип)	Число растений	Число цветоносов	Узел инициации цветения (среднее значение $\pm$ SD)	Тип терминальной структуры, %				Брактеи, %		Порядковый номер аномального цветка, %	
				Короткий отросток	Длинный отросток	Неразвитая почка	Цветок	Одиночная	Парные	Второй	Третий
Немчиновский-766 (контроль)	10	48	14.0 $\pm$ 0.82	88.0	12.0	-	-	8.0	-	-	-
«Штамбовый» ( <i>fas</i> )	20	121	13.9 $\pm$ 0.87	11.6	7.4	60.3	20.7	31.4	26.4	52.1	13.2
J12671 ( <i>fa</i> )	10	64	15.4 $\pm$ 0.99	59.4	17.1	18.8	4.7	12.5	-	23.4	-
K301 ( <i>nod4</i> )	20	111	14.4 $\pm$ 0.69	52.3	5.4	18.0	24.3	2.7	-	42.3	-
ДТР ( <i>det</i> )	10	30	13.6 $\pm$ 1.17	59.9	26.7	6.7	6.7	30.0	3.3	10.0	3.3
ДТР(м) ( <i>det</i> )	10	20	19.1 $\pm$ 2.23	75.0	15.0	10.0	-	-	-	10.0	-
WL102 ( <i>lf</i> )	10	52	12.7 $\pm$ 2.16	20.8	79.2	-	-	2.1	-	-	-
<i>fas det</i>	10	27	13.8 $\pm$ 1.17	11.8	-	29.4	58.8	17.7	17.7	76.5	17.7
<i>fas lf</i>	10	43	12.5 $\pm$ 1.38	2.9	6.4	30.2	60.5	25.6	18.6	60.5	30.2

### 3.4.2. Возможное сочетание генетического контроля развития апикальной меристемы главного побега и пазушного цветоноса

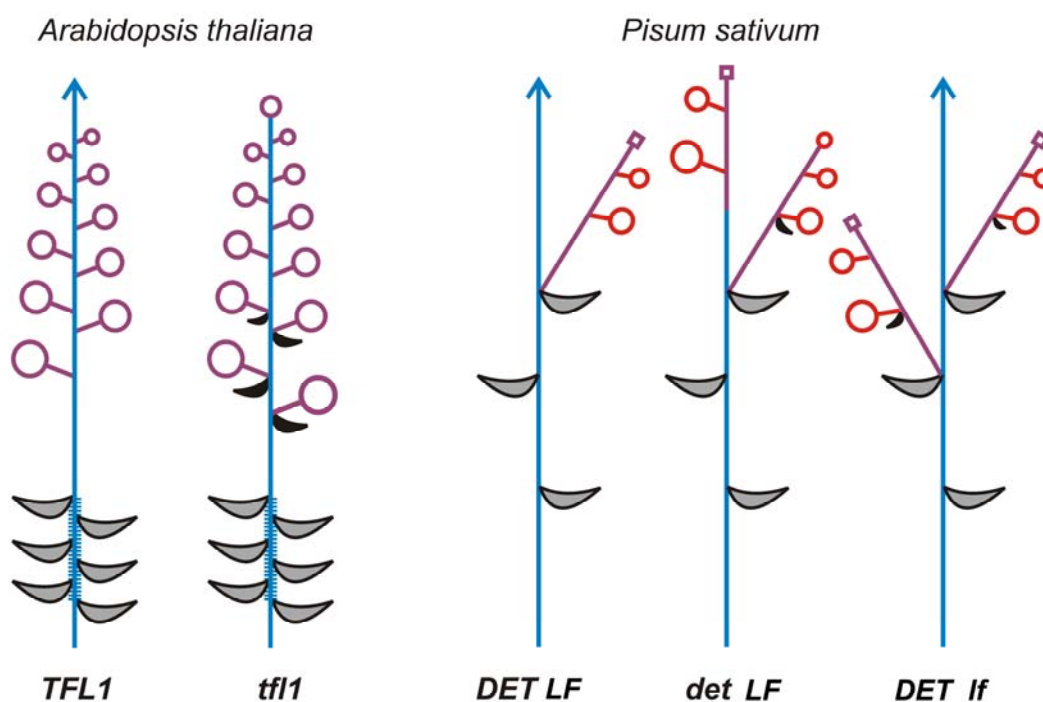
Как уже было отмечено раньше (см. «Обзор литературы»), цветки известных фасцированных мутантов Бобовых в большинстве нормальны. Кроме того, редкие аномалии строения цветка фасцированных форм гороха нельзя считать результатом фасциации цветка (прогрессирует не возрастание, а убывание числа органов в цветке в акропетальном направлении, см. раздел «Фасциация цветка»). Вероятно, гены *FA*, *FAS*, *NOD4* выполняют функцию негативной регуляции не только размеров ПАМ, но и пролиферации пазушного цветоноса. Подобное явление следует считать уникальным среди изученных растений.

Известна аномальная пролиферация иного рода, при которой происходит удлинение оси в сочетании с развитием дополнительных латеральных цветков (и, как следствие, с многоцветковостью). Подобное явление описано, например, у мутантов гороха *neptune* (*nep*) [Singer et al., 1999]. Однако у многоцветковых форм не происходит перехода апекса пазушной кисти к флоральному морфогенезу. Таким образом, прекращение роста короткого паракладия представляет собой генетически контролируемый акт. Возможно, ключевым фактором при определении судьбы меристемы паракладия является ее размер. В норме эта

меристема производит один или два латеральных цветка и затем сокращается и при завершении пролиферации производит стерильный отросток. При превышении некоторого порогового значения сохраняется способность к пролиферации этой меристемы с заложением латеральных цветков (у мутантов *ler*). Наконец, при сочетании превышения пороговой величины размеров и специфического профиля генной экспрессии возможен флоральный морфогенез, как у фасциированных мутантов.

Характерно, что у многоцветковой линии ДТР ось короткого паракладия может завершаться аномальным цветком, т.е. продолжение роста оси с заложением дополнительных латеральных цветков имеет преимущество перед формированием цветка в терминальном положении.

Вообще привлекает внимание определенное сходство в генетическом контроле положения цветка у *A. thaliana* и двухцветкового цветоноса у *P. sativum*.



**Рис. 31.** Функция *TFL1*-подобных генов у *Arabidopsis* и гороха (схема; пояснения в тексте). Ось первого порядка обозначена синим, второго - фиолетовым, третьего - красным. Прочие обозначения см. на с. 6.

Апикальная меристема побега мутанта *tfl1* (*A. thaliana*) трансформируется в флоральную, в то время как у мутантов гороха по гену *DET* (гомологу *TFL1*) апикальная меристема дает начало терминализованному паракладью (рис. 31). Вторым нарушением у мутантов *tfl1* является более раннее заложение цветков на

оси главного побега. У мутантов гороха по гену *LF* (второму гомологу *TFL1*) происходит более раннее заложение коротких паракладиев (рис. 31). Мутации по генам *CLV* у *A. thaliana* приводят к пролиферации оси фасцированного цветка [Clark et al., 1993]. Аналогично, у фасцированных мутантов гороха происходит пролиферация пазушного цветоноса.

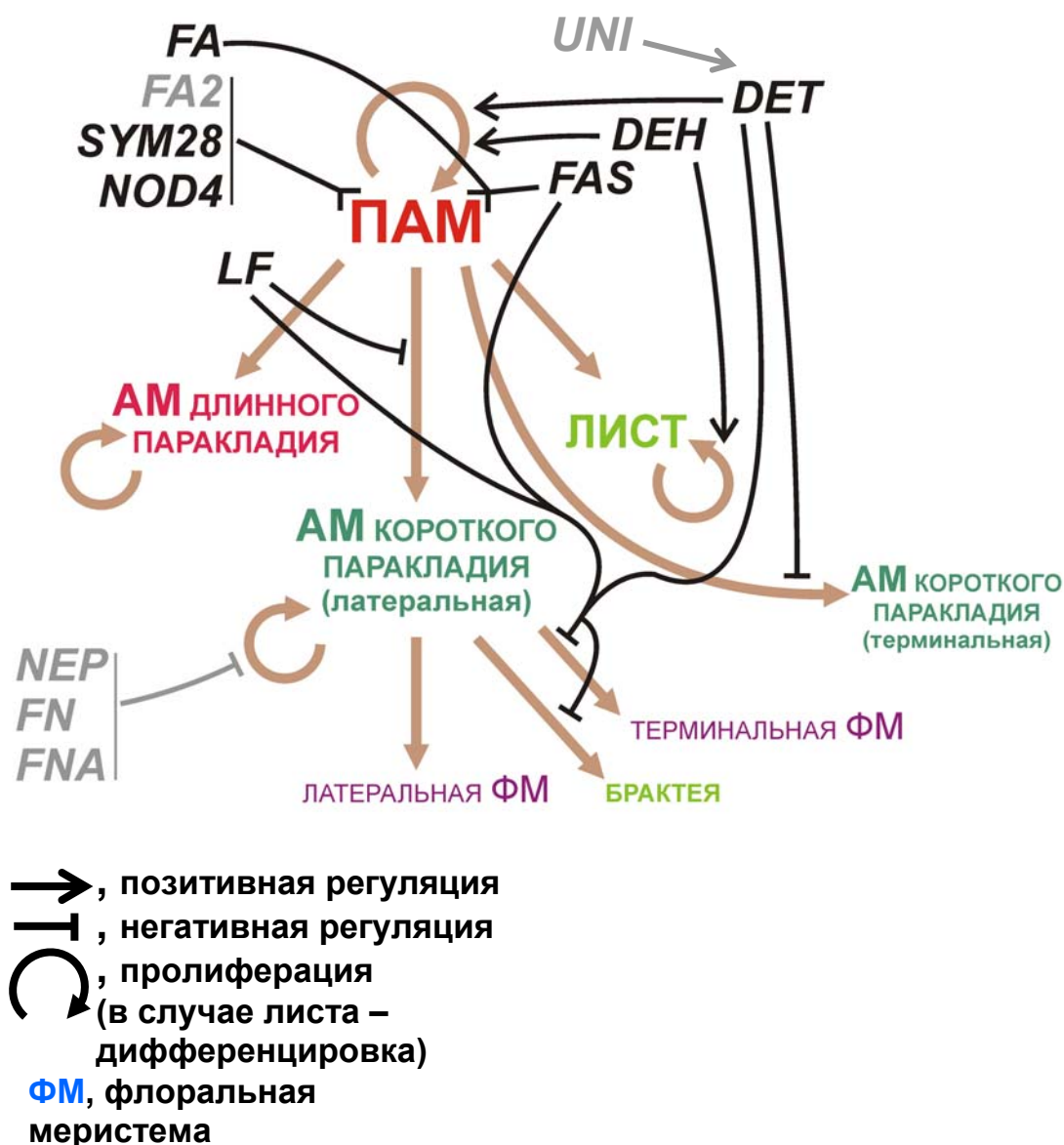
Суммируя имеющиеся данные относительно гена *TFL1 Arabidopsis* и его гомолога *DET* у гороха, можно сделать следующий вывод: функция *TFL1*-подобных генов заключается в сохранении недифференцированного состояния меристемы оси порядка  $n$  и предотвращении ее дифференцировки по типу оси порядка  $n+1$ . Для главной оси (первый порядок) у *A. thaliana* нарушение в работе гена *TFL1* приводит к формированию меристемы цветка (ось второго порядка) в терминальном положении. Аналогично, у *P. sativum* мутации в гене *DET* вызывают превращение меристемы главного побега (первый порядок) в цветонос, идентичный пазушному (второй порядок), а ось второго порядка терминируется флоральной меристемой (третий порядок) (рис. 31). Для дальнейшей проверки выдвинутой гипотезы требуется изучение форм с детерминантным типом роста у других растений – например, такие мутанты известны у гречихи (обзор в работе [Кондыков и др., 2006]).

Значительный интерес представляет усиление проявления аномалии у двойных мутантов *fas det* и *fas lf* (иные сочетания мутаций не были изучены; у линии «Люпиноид» с генотипом *fa det* нарушений развития пазушных кистей не отмечается). Как уже было отмечено, у этих двойных мутантов цветков с нехарактерным положением развит более значительно, чем у одиночного мутанта *fas*. Можно предположить, что гены *FA*, *FAS* и *NOD4* у гороха осуществляют негативную регуляцию размеров меристемы главного побега, пазушного цветоноса и даже (в случае *NOD4*) симбиотических клубеньков на корнях. Не исключено, впрочем, что последняя функция носит опосредованный характер (например, мутация может снижать способность к азотфиксации; избыточное число клубеньков носит в таком случае компенсаторный характер). Нарушения активности этих генов приводят к фасциации побега, пролиферации оси паракладия и (у *nod4* [Sidorova, Uzhintseva, 1995]) гипернодуляции. Гены *DET* и *LF* препятствуют дифференцировке апикальной и пазушной (соответственно) меристем в детерминированные цветоносы. Кроме того, они сохраняют функцию поддержания недифференцированного состояния меристем, частично дублируя функции гена *FAS*.



### 3.5. Взаимодействие генов, участвующих в генетическом контроле активности ПАМ у гороха

В основной части работы рассмотрены закономерности генетического контроля каждого из элементов активности ПАМ у гороха: поддержания постоянного объема и недифференцированного состояния, пролиферации и формирования латеральных производных. Ниже резюмированы основные изученные аспекты регуляции активности ПАМ (рис. 32)



**Рис. 32.** Генетическая регуляция активности ПАМ у гороха (схема, пояснения в тексте). Серым обозначены связи, известные по литературным данным, черным - полученные в ходе представленной работы результаты.

Осуществляемое под контролем гена *DEH* поддержание пролиферативной активности не связано с прочими аспектами регуляции активности ПАМ. Двойные мутанты по гену *deh* и другим регуляторам имеют аддитивный фенотип. Литературные данные указывают, что прекращение пролиферации ПАМ у мутантов отчасти опосредовано «листовым фенотипом» (выше рассмотрены аргументы против этой гипотезы) и не пересекается с действием прочих генов морфогенеза ПАМ.

В ходе работы были изучены несколько генов, негативно регулирующих объем ПАМ - *FA*, *FAS*, *SYM28*, *NOD4*. Мутации в этих генах приводят к фасциации побега.

Ген *NOD4* контролирует три аспекта морфогенеза: поддержание постоянного объема ПАМ, сохранение недифференцированного состояния апикальной меристемы коротких паракладиев и подавление формирования симбиотических клубеньков на корнях (возможно, опосредованно). Таким образом, этот ген является негативным регулятором ряда морфогенетических преобразований, а сочетание у одного фактора таких различных функций можно считать особенностью, присущей исключительно бобовым. Дальнейшее изучение мутантов с нарушениями активности ПАМ у других представителей этого семейства может уточнить механизм такого контроля.

Поддержание недифференцированного состояния осей различных порядков и типов также осуществляется единственным геном, *DET*, гомологичным гену *TFL1 A. thaliana* [Foucher et al., 2003]. Однако, если у *A. thaliana* мутация *tfl1* на фоне фасциации имеет аддитивное действие (у двойных мутантов *tfl1 clv1* развивается фасциированный терминальный цветок, [Clark et al., 1993]), у гороха наблюдается усиление одного из аномальных проявлений мутации *det* - формируются хорошо развитые цветки, терминирующие пазушные цветоносы. Таким образом, часть негативных регуляторов размеров ПАМ (*FA*, *FAS*, *NOD4*) участвует в поддержании недифференцированного состояния АМ пазушных цветоносов (коротких паракладиев), выступая синергистами гомологов *TFL1 - DET* и *LF*.

Сравнение основных аспектов регуляции активности ПАМ у *Pisum sativum* и *Arabidopsis thaliana* показывает ряд сходных черт: существование большого числа негативных регуляторов размеров АМ (хотя вопрос об их гомологии у различных видов остается открытым), поддержание недифференцированного состояния ПАМ гомологичными генами (*TFL1* и *DET/LF*). Значительный интерес вызывает

сопряжения негативной регуляции дифференцировки АМ и формирования брактей у сравниваемых видов.

Особенностью, характерной для семейства Fabaceae, можно считать сочетание генетического контроля активности АМ и симбиотической фиксации атмосферного азота. Часть связей, регулирующих развитие специализированных пазушных фертильных побегов, специфична для гороха как объекта со сложным соцветием и не может быть моделирована на *A. thaliana*. Проблема сходства путей генетической детерминации развития сложного соцветия в разных таксонах требует самостоятельного изучения.

## Заключение

Изучение регуляции активности побеговой апикальной меристемы (ПАМ) представляет собой чрезвычайно актуальное направление генетических исследований. Разнообразие жизненных форм растений чрезвычайно велико и не может быть полностью моделировано с использованием небольшого числа объектов. Таким образом, значительный интерес представляет в этой связи изучение генетического контроля морфогенеза у видов с различной архитектурой побега, среди которых горох посевной (*Pisum sativum* L.) представляется одним из самых удобных для работы. Кроме того, известная хозяйственная значимость этого вида позволяет оценить исследования его морфогенеза как практически значимые и востребованные.

Проведенная работа посвящена изучению генетического контроля активности апикальной меристемы побега у гороха посевного. При этом был проведен отдельный анализ активности меристемы главного побега и специализированных побегов второго порядка - пазушных цветоносов. Именно этот аспект морфогенеза составляет особый теоретический интерес и не может быть изучен на традиционных модельных объектах, обладающих простым соцветием - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) и *Antirrhinum majus* L. (Scrophulariaceae). Кроме того, было предложено анализировать активность апикальной меристемы как совокупность нескольких параллельных процессов, или модусов (в норме не разделяющихся во времени): инициации, пролиферации, поддержания постоянного объема и недифференцированного состояния, формирования латеральных органов.

На первом этапе работы были изучены 8 форм гороха различного происхождения, маркированных признаком фасциации побега. Было показано, что эти формы несут мутации в одном из четырех генов (*FA*, *FAS*, *SYM28*, *NOD4*); при этом аллели, определяющие аномалии развития побега, рецессивны по отношению к аллелям, контролирующим развитие нормального стебля. Гены *FA* и *FAS* взаимодействуют по типу комплементарности. Изучение фенотипа фасциированных форм в сравнении с контролем показало, что все они характеризуются увеличением апикальной меристемы уже на стадии проростков. Меристема из полусферической, характерной для нормальных растений, становится гребневидной или, реже, кольцевидной; ее увеличение сопровождается нарушениями филлотаксиса. Таким образом, было сделано

заклучение, что в норме гены *FA*, *FAS*, *SYM28* и *NOD4* осуществляют негативную регуляцию размеров ПАМ и опосредованно участвуют в формировании нормального листорасположения. Данные литературы указывают на возможность участия негативных регуляторов размеров ПАМ у Бобовых в контроле симбиотической азотфиксации (нодуляции). Проведенные наблюдения за числом симбиотических клубеньков на корнях фасциированных форм показали, что достоверное превышение контроля наблюдаются только у мутанта *nod4*.

Изучение ряда количественных признаков, определяющих продуктивность растений гороха, у фасциированных и нормальных форм показало, что суммарная продуктивность растений с нарушениями морфогенеза побега не отличается от таковой у нефасциированных форм, и признак фасциации может быть оценен как не влияющий на продуктивность.

С помощью анализа независимости наследования генов, мутации в которых приводят к фасциации, морфологических и молекулярных (CAPS, SSR) маркеров, удалось определить положение двух негативных регуляторов размеров ПАМ на генетической карте. Так, ген *FAS* сцеплен с маркерами ДНК-маркерами *Percpn* и *AA355 III* группы сцепления. Явление выраженной макросинтезии хромосом гороха и родственного бобового, люцерны *Medicago truncatula*, позволило провести поиск предполагаемых ортологов в синтенном районе физической карты люцерны. Было показано, что в этой области генома *M. truncatula* локализован фрагмент, сходный по последовательности с геном *CLAVATA3 A. thaliana*, известным как негативный регулятор активности ПАМ. Вопрос об идентичности этих факторов требует дополнительного изучения.

Ген *SYM28* обнаружил сцепление с ДНК-маркерами *AD79* и *Fbpp V* группы и близок по положению к гену *NOD4*. В синтенном районе генома люцерны расположены последовательности, сходные с генами *CLAVATA2* и *FASCIATA1 A. thaliana*. Использование последовательности, сходной с геном *FAS1*, в качестве молекулярного маркера при картировании гена *SYM28*, показало отсутствие косегрегации (и, следовательно, идентичности) этих маркеров.

Следующий этап работы был связан с изучением мутанта *determinate (det)*, для которого характерно превращение ПАМ в цветонос, сходный с пазушным. Изучение фенотипа этого мутанта показало, что для него в ряде случаев характерна гибридизация программ развития цветоноса и вегетативного побега на границе этих органов: последний латеральный побег приобретает черты цветка, а кроющий лист зачастую редуцирован, т.е. обладает признаками брактеи.

Пазушные цветоносы этого мутанта в ряде случаев завершаются редуцированной цветочной почкой, что указывает на сложную функцию гена *DET* в морфогенезе: его роль заключается в поддержании недифференцированного состояния АМ оси порядка  $n$  путем предотвращения ее дифференцировки по типу оси порядка  $n+1$ .

Также в ходе работы был исследован мутант *determinate habit (deh)*. При детальном изучении его фенотипа было показано, что раннее отмирание точки роста сочетается с нарушениями развития прилистников (реже листьев): они имеют малую площадь, часто асимметричны, клетки эпидермиса недоразвиты. Между суммарной площадью прилистников и числом репродуктивных узлов (т.е. временем пролиферации ПАМ) зависимости обнаружено не было; таким образом, редукцию прилистников и прекращение пролиферации ПАМ логичнее рассматривать как элементы плейотропного проявления мутации, а не как причину и следствие.

Гибридологический анализ наследования мутации *deh* показал во всех случаях достоверное отклонение наблюдаемого расщепления от ожидаемого в случае моногенных различий между родительскими формами и взаимодействием аллелей по типу полного доминирования нормы. Факторный анализ ряда количественных признаков гибридов первого поколения от скрещивания мутанта с нормальными растениями выявил полудоминантный характер наследования мутации *deh*.

Особый интерес представляет регуляция активности АМ специализированных осей второго порядка - пазушных цветоносов. В норме их АМ пролиферирует недолго, производит два цветка и прекращает рост, образуя стерильный отросток. У ряда мутантов (*det*, *fa*, *fas*, *nod4*) были обнаружены нарушения этого процесса: ось цветоноса завершалась цветочной почкой или цветком аномального строения с хорошо развитым околоцветником, часто формировались брактеи. Усиление проявления этой аномалии наблюдали у двойных мутантов *det fas* и *lf fas*; известно, что гены *DET* и *LF* являются ортологами гена *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* *A. thaliana*, предотвращающего образование терминального цветка. Таким образом, гены *FA*, *FAS* и *NOD4* регулируют активность меристемы не только главного побега, но и пазушного цветоноса. Ортологи гена *TFL1* отчасти сохраняют свои функции и у гороха.

Изучение фенотипа двойных мутантов показало, что рецессивный аллель *deh* в комбинации с мутациями в негативных регуляторах размеров ПАМ демонстрирует аддитивное действие. Двойные мутанты *det fa* и *det fas* формируют

многоцветковый терминальный цветонос, т.е. имеют особый фенотип, отличный от родительских форм.

Сопоставление данных, полученных в ходе оригинальной работы для гороха и известных из литературы для *A. thaliana*, показывает, что некоторые аспекты регуляции у этих видов сходны (например, необычным выглядит сохраняющееся сопряжение генетического контроля подавления образования терминального цветка и бракт). Уникальной для гороха (и семейства Fabaceae в целом) особенностью следует считать регуляцию активности АМ вегетативного и специализированного генеративного побегов одними и теми же генами. Ген *NOD4* в этой связи представляет собой уникальный регулятор, который - единственный из известных - осуществляет негативный контроль размеров ПАМ главного побега, поддержания недифференцированного состояния АМ пазушного цветоноса и подавления формирования симбиотических клубеньков на корнях. Кроме того, ген *DET* имеет у объекта со сложным соцветием ряд особенностей активности, которые отличают его от ортологичного гена у растения с простым соцветием.

Настоящая работа, таким образом, представляет результат изучения активности апикальных меристем побега у гороха посевного с применением различных подходов в исследовании характера наследования, проявления и взаимодействия основных генов, вовлеченных в этот ключевой аспект морфогенеза.

## Выводы

1. Гены *FA*, *FAS*, *NOD4* и *SYM28* участвуют в негативной регуляции размеров апикальной меристемы главного побега у *P. sativum* и опосредованно - в формировании нормального филлотаксиса. Гены *FA* и *FAS* взаимодействуют по типу комплементарности.
2. Ген *FAS* локализован в III группе сцепления между ДНК-маркерами *Percp* и *AA355*. Ген *SYM28* локализован в V группе сцепления между ДНК-маркерами *AD79* и *Fbpr*.
3. Ограничение размеров пула стволовых клеток и поддержание недифференцированного состояния апикальной меристемы пазушного цветonoса осуществляют гены *FAS*, *FA* и *NOD4*. Ген *FAS* не обнаруживает влияния на нодуляцию.
4. Функция гена *DET* у *P. sativum* заключается в сохранении недифференцированного состояния меристемы оси порядка  $n$  и предотвращении ее дифференцировки по типу оси порядка  $n+1$ .
5. Ген *DEH* выполняет функцию поддержания пролиферативной активности апикальной меристемы побега. Мутация в этом гене имеет плейотропное проявление на АМ и листьях верхних междоузлий и характеризуется неполным доминированием. Признак детерминантного типа роста, обусловленный геном *DEH*, обладает варьирующей экспрессивностью.



## Список публикаций по материалам диссертации

1. Синюшин А.А. Изучение наследования фасциации у посевного гороха (*Pisum sativum* L.) // Тез. докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». Секция Биология. Москва, 12-15 апреля 2005 г. М.: Макс-Пресс, 2005. С. 197-198.
2. Синюшин А.А., Орлов А.В., Мосиевская М.В. Изучение генетического контроля и фенотипического проявления фасциации у гороха // Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». Секция Биология. Москва, 12-15 апреля 2006 г. М.: Макс-Пресс, 2006. С. 208-209.
3. Синюшин А.А. Особенности морфогенеза у фасцированных форм гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Материалы I(IX) Международной Конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге. 21-26 мая 2006 г. СПб., 2006. С. 197.
4. Синюшин А.А., Гостимский С.А. Фасциация у гороха посевного (*Pisum sativum* L.): основные закономерности морфогенеза // Онтогенез. 2006. Т. 37. №6. С. 449-456. Рез. англ.
5. Sinjushin A.A., Konovalov F.A., Gostimskii S.A. A gene for stem fasciation is localized on linkage group III // *Pisum Genet.* 2006. V. 38. P. 19-20.
6. Синюшин А.А. Определение аллельных отношений между различными фасцированными линиями гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Тезисы докладов XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». Секция Биология. Москва, 11-14 апреля 2007 г. М.: Макс-Пресс, 2007. С. 60-61.
7. Синюшин А.А. Участие гена *FAS* в генетическом контроле морфогенеза побега и соцветия у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза. Симпозиум с международным участием. Москва, 9-11 октября 2007 г. М.: Т-во научных изданий КМК, 2007. С. 144-145.
8. Гостимский С.А., Дрибноходова О.П., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А., Кузнецова О.И., Синюшин А.А., Хартина Г.А. Исследование генома культурных растений и их сородичей применительно к генетической теории селекции: анализ молекулярно-генетического полиморфизма генома гороха и идентификация новых генов, кодирующих хозяйственно-ценных признаки

- // Материалы «Биоразнообразии и динамика генофондов». Подпрограмма II «Динамика генофондов». М.: ФИАН, 2007. С. 110.
9. *Sinjushin A.A., Gostimskii S.A.* Relationship between different fasciated lines of pea // *Pisum Genet.* 2007. V. 39. P. 16-18.
  10. *Синюшин А.А., Гостимский С.А.* Генетический контроль признака фасциации у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // *Генетика.* 2008. Т. 44. №6. С. 807-814. Рез. англ. (*Sinjushin A.A., Gostimskii S.A.* Genetic control of fasciation in pea // *Rus. J. Genet.* 2008. V. 44. № 6. P. 702-708.)
  11. *Sinjushin A., Dribnokhodova O., Kokaeva Z., Gostimskii S.* Usage of molecular markers in studies of intraspecific polymorphism and gene mapping. Abstracts of International Conference «Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants». Vienna, Austria, 3-6 February 2008. P. 71.
  12. *Sinjushin A.A.* Features of similarity of genetic control of stem apical meristem activity in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and *Pisum sativum* L. Abstracts of 2<sup>nd</sup> Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology “Euro EvoDevo”. Gent, Belgium, 29 July - 1 August 2008. P. 279-280.
  13. *Синюшин А.А., Гостимский С.А.* Достижения и перспективы использования гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в качестве модельного объекта в генетике развития растений // *Успехи современной биологии.* 2008. Т. 128. №6. С. 531-541. Рез. англ.
  14. *Синюшин А.А.* Генетический контроль активности апикальной меристемы побега у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // *Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях.* Звенигород, 7-12 декабря 2008 г. М.: ИОГен, 2008. С. 65.
  15. *Sinjushin A.A., Konovalov F.A., Gostimskii S.A.* *Sym28*, a gene controlling stem architecture and nodule number, is localized on linkage group V // *Pisum Genet.* 2008. V. 40. P.15-18.
  16. *Синюшин А.А.* Изучение генетического контроля активности апикальной меристемы побега у гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Тезисы V Съезда Вавиловского Общества генетиков и селекционеров. Ч. 1. Москва, 21-28 июня 2009 г. М., 2009. С. 157.
  17. *Синюшин А.А.* Эволюция соцветий в Inverted Repeat Lacking Clade (Fabaceae): терминализация или усечение? // Материалы XII Московского Собрания по филогении растений. Москва, 2-7 февраля 2010 г. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. С. 297-299.

## Благодарности

В заключение, выполняя приятный долг, автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю профессору Гостимскому Сергею Александровичу за обсуждение основных положений, легших в основу настоящей работы.

Автор выражает безмерную и сердечную благодарность родным и близким, в первую очередь Синюшиной Ольге Викторовне, Каманиной Зое Алексеевне, Синюшину Михаилу Андреевичу и Беяковой Александре Сергеевне за помощь на всех этапах подготовки и проведения научной работы, а также неоценимую поддержку во всем.

Автор благодарит к.б.н. н.с. Коновалова Федора Андреевича. за длительное и плодотворное сотрудничество и помощь при освоении ряда методик; н.с. Аш Ольгу Александровну и н.с. Хартину Галину Александровну за помощь при проведении полевых и тепличных работ; всех сотрудников, аспирантов и студентов кафедры генетики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, способствовавших проведению настоящей работы.

За время подготовки настоящей работы ряд ее положений автор обсуждал с сотрудниками кафедры высших растений Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова - д.б.н. проф. Соколовым Дмитрием Дмитриевичем, д.б.н., проф. Лотовой Людмилой Ивановной, к.б.н. ст. преп. Федоровой Татьяной Анатольевной, к.б.н. асс. Краминой Татьяной Евгеньевной, которым автор также выражает глубокую признательность.

Отдельную благодарность автор выражает коллегам, предоставившим ценный материал для работы: д.б.н. в.н.с. Зеленову Анатолию Николаевичу (ВНИИЗБК РАСХН), д.б.н. в.н.с. Сидоровой Клавдии Кузьминичне (ИЦиГ СО РАН), д.б.н. с.н.с. Борисову Алексею Юрьевичу (ВНИИСХМ РАСХН) , Dr Mike Ambrose (John Innes Centre).

## Литература

1. Атабекова А.И. Полиэмбриония, многосемядность и фасциация бобовых // Бюлл. главн. бот. сада. 1957. Т. 28. С. 65-70.
2. Атабекова А.И. Структурные изменения плода люпина // Бюлл. главн. бот. сада. 1959. Т. 35. С. 58-61.
3. Бабайцева Т.А. Создание исходного материала для селекции технологичных сортов гороха в условиях Волго-Вятской зоны России. Автореф. ... канд. с.-х. наук. Киров, 1996. 20 с.
4. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Основы микротехнических исследований в ботанике. М.: Издательство кафедры высших растений МГУ, 2000. 128 с.
5. Белоусов Л.В. Морфогенез, морфомеханика и геном // Информационный вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 1. С. 29-36.
6. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.-Л.: Сельхозгиз, 1935. 56 с.
7. Ежова Т.А., Ондар У.Н., Солдатова О.П., Кузнецова Т.В. Изучение рол гена *ABRUPTUS* в дифференцировке цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // ДАН. 1997. Т. 354. № 6. С. 839–842.
8. Ежова Т.А., Пенин А.А. Новый ген *BRACTEA* (*BRA*), контролирующий формирование открытого абрактеозного соцветия у *Arabidopsis thaliana* // Генетика. 2001. Т. 37. № 10. С. 935-938.
9. Зеленов А.Н. Оригинальный мутант гороха // Селекция и семеноводство. 1991. № 2. С. 33-34.
10. Зеленов А.Н. Культурная эволюция гороха посевного // Генетика. 1994. Т. 30. Приложение. С. 55.
11. Зеленое А.Н., Амелин А.В., Новикова Н.Е. Перспективы использования новой селекционной формы гороха хамелеон // Доклады РАСХН. 2000. № 4. С. 15-17.
12. Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезински А., Кернер К. Ботаника (учебник для вузов). Т. 3. М.: ИЦ Академия, 2007. С. 416-508.
13. Зубов А.Е., Князькова С.Р. Хозяйственное значение и селекционная ценность новой формы зернового гороха с детерминантным типом роста // Доклады ВАСХНИЛ. 1989. № 12. С. 16-19.

14. *Имс А.* Морфология цветковых растений. М.: Мир, 1964. 500 с.
15. *Коммерческие сорта* полевых культур Российской Федерации (ред. А.С. Семин). М.: ИКАР, 2003. С. 143-158.
16. *Кондыков И.В., Зотиков В.И., Зеленов А.Н., Кондыкова Н.Н., Уваров В.Н.* Биология и селекция детерминантных форм гороха. Орел: Картуш, 2006. 120 с.
17. *Коновалов Ф.А.* Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (*Pisum sativum* L.). Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: МАКС-Пресс, 2006. 24 с.
18. *Коновалов Ф.А., Вячеславова А.О.* Клонирование и локализация фрагментов генома гороха посевного, сходных с генами *FAS1* и *FAS2 Arabidopsis thaliana*. Материалы XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». М.: МАКС Пресс, 2006. С. 119.
19. *Коновалов Ю.Б., Ключко Н.А., Аникеева Н.Ф.* Индуцированный мутант люпина узколистного // Известия ТСХА. 1989. Т. 5. С. 185-188.
20. *Кострикова Л.Н.* Случаи аномального строения цветка гибридных форм гороха // Вестник МГУ. Серия Биология. 1967. №1. С. 46-51.
21. *Левитский Г.А.* Морфология хромосом // Тр. прикл. бот., генет. и сел. 1931. Т. 27. № 1. С. 50-52.
22. *Лодкина М.М.* Черты морфологической эволюции растений, обусловленные спецификой их онтогенеза // Журн. общ. биол. 1983. Т. 44. № 2. С. 239-253.
23. *Макашева Р.Х.* Зерновые бобовые культуры: горох // Культурная флора СССР. Т. 4. Л.: Колос, 1979. 324 с.
24. *Макашева Р.Х., Дрозд А.М., Адамова О.П., Голубев А.А.* Многолетний горох // Тр. прикл. бот., генет. и сел. 1973. Т. 51. Вып. 1. С. 44-56.
25. *Мартынов В.В., Цветков И.Л., Хавкин Э.Е.* Ортологи гена арабидопсиса *CLAVATA1* у культурных форм *Brassicaceae* // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 1. С. 41-46.
26. *Паришкура И.С.* О штамбовости у гороха и селекции на неполегаемость // Вестник с.-х. науки. 1968. № 9. С. 43-45.
27. *Пенин А.А., Чуб В.В., Ежова Т.А.* Правила формирования терминального цветка // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 2. С. 90-95.

28. *Пенин А.А., Будаев Р.А.* Редукция брактей в семействе *Cruciferae*: генетический контроль и эволюция // Экологическая генетика. 2006. Т. 4. № 3. С. 29-35.
29. *Першина Л.А., Хвостова В.В.* Феногенетика мутантов гороха с измененной структурой стебля // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа (ред. Хвостова В.В.). Новосибирск: Наука (Сибирское отделение), 1977. С. 167-181.
30. *Петелина Н.Н., Кадырова Ф.З.* О роли фасциаций в селекции гречихи посевной на примере сорта Казанка // Селекция и семеноводство. 1998. № 1. С. 7-8.
31. *Попова И.А.* Характеристика некоторых мутантных линий овощного гороха // Химический мутагенез и создание селекционного материала. М.: Наука, 1972. С. 261-264.
32. *Ремизова М.В.* Строение, развитие и эволюция цветка у некоторых примитивных однодольных. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: Соцветие красок, 2007. 16 с.
33. *Рехматулла А., Гостимский С.А.* Цитогенетический анализ морфологических мутантов гороха // Биол. науки. 1976. № 5. С. 107-112.
34. *Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Болшева Н.Л., Амосова А.В., Гостимский С.А., Зеленин А.В.* Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI- дифференциального окрашивания // Генетика. 2005. Т. 41. № 12. С. 1665-1673.
35. *Сахаров В.В.* Многогранные семена и фасциация у тетраплоидной посевной гречихи // Генетические механизмы селекции и эволюции (ред. Шевченко В.А.). М.: Наука, 1986. С. 17-33.
36. *Сидорова К.К.* Изучение аллелизма у фенотипически сходных мутантов гороха в связи с законом гомологических рядов в наследственной изменчивости // Генетика. 1970. Т. 6. С. 23-35.
37. *Сидорова К.К., Ужинцева Л.П.* Использование мутантов для выявления генов, контролирующих симбиотические признаки у гороха // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 144-151.

38. Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена *pod<sub>4</sub>*, контролирующего супернодуляцию у гороха // ДАН. 1994. Т. 336. № 6. С. 847-849.
39. Синюшин А.А. Фасциация цветка. I. Происхождение увеличенной меристемы // Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология. 2010. В печати.
40. Синюшин А.А., Гостимский С.А. Достижения и перспективы использования гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в качестве модельного объекта в генетике развития растений // Успехи современной биологии. 2008. Т. 128. №6. С. 531-541.
41. Синюшин А.А., Гостимский С.А. Фасциация у гороха посевного: основные закономерности морфогенеза // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 449-456.
42. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экологическая генетика. 2003. Т. 1. С. 36-46.
43. Фучжун Л., Гостимский С.А. Исследование транслокаций у гороха // Генетика. 1998. Т. 34. № 9. С. 1269-1276.
44. Чегамирза К. Молекулярно-генетическое картирование локусов качественных и количественных признаков у гороха. Дисс. ... канд. биол. наук. М., 2004. 139 с.
45. Чуб В.В., Пенин А.А. Структура цветка *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: разметка положения органов // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 280-284.
46. Шевченко В.А. Детерминантный неосыпающийся мутант гороха // НТБ ВНИИЗБК. 1993. № 37. С. 8-9.
47. Шевченко В.А., Шевченко И.А. Генетические особенности двух типов детерминантности растений гороха / Методы интенсификации селекционного процесса. Одесса: ВАСХНИЛ (Южное отделение), Всесоюзн. сел.-ген. инст-т, 1990. С. 52-53.
48. Яковлев В.Л. Интродукция генов *af*, *det* и *deh* в генотип высокоурожайного сорта гороха Смарагд / Совершенствование селекции и технологии возделывания зерновых бобовых и крупяных культур. Орел: ВНИИЗБК, 1992. С. 27-34.
49. Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of *cup-shaped cotyledons* mutant // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 841-857.

50. *Albertsen M.C., Curry T.M., Palmer R.G., Lamotte C.E.* Genetics and comparative growth morphology of fasciation in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) // *Bot. Gaz.* 1983. V. 144. № 2. P. 263-275.
51. *Ambrose M.J.* Floral abnormalities in the fasciated line G38E // *Pisum Genet.* 1993. V. 25. P. 15-16.
52. *Barton M.K., Poethig R.S.* Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild-type and *shoot meristemless* mutant // *Development.* 1993. V. 119. P. 823-831.
53. *Bennett S.R.M., Alvarez J., Bossinger B., Smyth D.R.* Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1995. V. 8. № 4. P. 505-520.
54. *Binggeli P.* Occurrence and causes of fasciation // *Cecidology.* 1990. V. 5. P. 57-62.
55. *Blixt S.* The *ageotropum* mutant // *Pisum Newslett.* 1970. V. 2. P. 11-12.
56. *Blixt S.* Mutation genetics in *Pisum* // *Agri Hortique Genetica.* 1972. V. 30. P. 1-293.
57. *Blixt S.* Linkage studies in *Pisum*. XV Establishing the *rms*-gene and the linkage of *rms* and *fas* in chromosome 3 // *Agri Hortique Genetica.* 1976. V. 34. P. 83-87.
58. *Bolker J.A.* Model systems in developmental biology // *BioEssays.* 1995. V. 17. № 5. P. 451-455.
59. *Borisov A.Y., Danilova T.D., Koroleva T.A., Naumkina T.S., Pavlova Z.B., Pinaev A.G., Shtark O.Y., Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A.* Pea (*Pisum sativum* L.) regulatory genes controlling development of nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza: fundamentals and application // *Biologia.* 2004. V. 59. № 13. P. 137-144.
60. *Bradley D., Carpenter R., Copsey L., Vincent C., Rothstein S., Coen E.* Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum* // *Nature.* 1996. V. 379. P. 791-797.
61. *Brauner S., Murphy R.L., Walling J.G., Przyborowski J., Weeden N.F.* STS markers for comparative mapping in legumes // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2002. V. 127. № 4. P. 616-622.



62. *Burglin T.R.* Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals // *Nucl. Ac. Res.* 1997. V. 25. № 21. P. 4173-4180.
63. *Callos J.D., Medford J.I.* Organ positions and pattern formation in the shoot apex // *Plant J.* 1994. V. 6. P. 1-7.
64. *Catalogue of Pisum genetic stock in John Innes Centre*, <http://www.jic.ac.uk/germplas/pisum/pgs2.txt>.
65. *Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M., Mudge J., Roe B., Ellis N., Doyle J., Kiss G.B., Young N.D., Cook D.R.* Estimating genome conservation between crop and model legume species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 43. P. 15289-15294.
66. *Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M.* *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis* // *Development.* 1993. V. 119. P. 397-418.
67. *Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin J.Z., Meyerowitz E.M.* The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis* // *Development.* 1996. V. 122. P. 1567-1575.
68. *Coen E., Meyerowitz E.* The war of the whorls: genetic interactions flower development // *Nature.* 1991. V. 353. P. 31-37.
69. *Compton R.H.* The anatomy of the Mummy Pea // *New Phytol.* 1911. V. 10. P. 249-255.
70. *Cooper L.D., Doss R.P., Price R., Peterson K., Oliver J.E.* Application of Bruchin B to pea pods results in the up-regulation of CYP93C18, a putative isoflavone synthase gene, and an increase in the level of pisatin, an isoflavone phytoalexin // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. № 414. P. 1229-1237.
71. *Davies B., Cartolano M., Schwarz-Sommer Z.* Flower development: the *Antirrhinum* perspective // *Adv. Bot. Res.* 2006. V. 44. P. 279-323.
72. *Ellis T.H.N., Poyser S.J.* An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps // *New Phytol.* 2002. V. 153. P. 17-25.
73. *Ellis T.H., Turner L., Hellens R.P., Lee D., Harker C.L., Enard C., Domoney C., Daves D.R.* Linkage maps in pea // *Genetics.* 1992. V. 130. № 3. P. 649-663.
74. *Ferrandiz C., Navarro C., Gomez M.D., Canas L.A., Beltran J.P.* Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia // *Dev. Genet.* 1999. V. 25. № 3. P. 280-290.

75. Foucher F., Morin J., Courtiade J., Cadioux S., Ellis N., Banfield M.J., Rameau C. *DETERMINATE* and *LATE FLOWERING* are two *TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS* homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 2742-2754.
76. Furutani M., Vernoux T., Traas J., Kato T., Tasaka M., Aida M. *PINFORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis // *Development*. 2004. V. 131. № 20. P. 5021-5030.
77. Gifford E.M., Corson G.E. The shoot apex in seed plants // *Bot. Rev.* 1971. V. 37. P. 143-221.
78. Gourlay C.W., Hofer J.M.I., Ellis T.H.N. Pea compound leaf architecture is regulated by interactions among the genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESS* // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1279–1294.
79. Guyomarc'h S., Vernoux T., Traas J., Zhou D.-X., Delarue M. *MGOUN3*, an *Arabidopsis* gene with TetraTricoPeptide-Repeat related motifs, regulates meristem cellular organization // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 397. p. 673-684.
80. Haughn G.W., Somerville C.R. Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis* // *Devel. Genet.* 1988. V. 9. P. 73-89.
81. Hecht V., Foucher F., Ferrandiz C., Macknight R., Navarro C., Morin J., Vardy M.E., Ellis N., Beltran J.P., Rameau C., Weller J.L. Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes // *Plant Physiol.* 2005. V. 137. P. 1420-1434.
82. Hofer J., Turner L., Hellens R., Ambrose M., Matthews P., Michael A., Ellis N. *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. P. 581-587.
83. Hofer J., Turner L., Moreau C., Ambrose M., Isaac P., Butcher S., Weller J., Dupin A., Dalmais M., Le Signor C., Bendahmane A., Ellis N. *Tendrill-less* regulates tendril formation in pea leaves // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 420-428.
84. Hord C.L.H., Chen C., DeYoung B.J., Clark S.E., Ma H. The *BAM1/BAM2* receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1667-1680.

85. *Ingensiep H.W., Lenz J.* The mutations *afila* and *acacia* in connection with a model for the early phyllomorphogenesis of *Pisum sativum* // *Pisum Newslett.* 1987. V. 19. P. 15-16.
86. *Jeong S., Trotochaud A.E., Clark S.E.* The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1925-1933.
87. *Kalo P., Seres A., Taylor S.A., Jakab J., Kevei Z., Kereszt A., Endre G., Ellis T.H., Kiss G.B.* Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum* // *Mol. Genet. Genomics.* 2004. V. 272. № 3. P. 235-246.
88. *Kaya H., Shibahara K., Taoka K., Iwabuchi M., Stillman B., Araki T.* FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems // *Cell.* 2001. V. 104. P. 131-142.
89. *Kayes J.M., Clark S.E.* CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis* // *Development.* 1998. V. 125. P. 3843-3851.
90. *Kerstetter R.A., Hake S.* Shoot meristem formation in vegetative development // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 1001-1010.
91. *Knights E.J.* Fasciation in chickpea: genetics and evaluation // *Euphytica.* 1993. V. 69. P. 163-166.
92. *Konovalov F., Toshchakova E., Gostimsky S.* A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005. V. 10. № 1. P. 163-171.
93. *Kwon C.S., Chen C., Wagner D.* WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis* // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 992-1003.
94. *Lamm R.* Comments on the chromosome maps of *Pisum sativum* // *Pisum Newslett.* 1987. V. 19. P. 20-24.
95. *Lamprecht H.* The inheritance of the number of flower per inflorescence and the origin of *Pisum*, illustrated by polymeric genes // *Agri Hortique Genetica.* 1947. V. 5. P. 16-25.
96. *Lamprecht H.* The variation of linkage and the course of crossing-over // *Agri Hortique Genetica.* 1948. V. 6. P. 10-48.
97. *Lamprecht H.* Polymere Gene und Chromosomenstruktur bei *Pisum* // *Agri Hortique Genetica.* 1952. V. 10. P. 158-167.

98. *Lamprecht H., Mrkos H.* Die Vererbung des Vorblattes bei *Pisum* sowie die Koppelung des Gens *Br* // *Agri Hortique Genetica*. 1950. V. 8. P. 153-162.
99. *Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L.* MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // *Genomics*. 1987. V. 1. P. 174-181.
100. *Larsson A.S., Landberg K., Meeks-Wagner D.R.* The *TERMINAL FLOWER2* (*TFL2*) gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana* // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 597-605.
101. *Laufs P., Dockx J., Kronenberger J., Traas J.* *MGOUN1* and *MGOUN2*: two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana* // *Development*. 1998. V. 125. P. 1253-1260.
102. *Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jurgens B.* The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* // *Development*. 1996. V. 122. P. 87-96.
103. *Lenhard M., Laux T.* Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1* // *Development*. 2003. V. 130. P. 3163-3173.
104. *Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Henaut I., Burstin J.* Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 1022-1031.
105. *Lynn K., Fernandez A., Aida M., Sedbrook J., Tasaka M., Masson P., Barton M.K.* The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene // *Development*. 1999. V. 126. P. 469-481.
106. *Makasheva R.K., Drozd A.M.* Determinate growth habit (*det*) in peas: isolation, symbolization and linkage // *Pisum Newslett.* 1987. V. 19. P. 31-32.
107. *Marx G.A.* Supplemental linkage data for chromosome 1 and 7 // *Pisum Newslett.* 1987. V. 19. P. 35-37.
108. *Marx G.A., Hagedorn D.J.* Fasciation in *Pisum* // *Heredity*. 1962. V. 53. P. 31-43.

109. Mayer K.F.X., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G., Laux T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem // Cell. 1998. V. 95. P. 805-815.
110. Medford J.I., Behringer F.J., Callos J.D., Felmann K.A. Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 631-643.
111. Melaragno J.E., Mehrotra B.M., Coleman A.W. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis* // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1661-1668.
112. Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden // Verh. Naturf. Ver. Brunn. 1866. V. 4. P. 3-47.
113. Moussian B., Shoof H., Haecker A., Jurgens G., Laux T. Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem fate during *Arabidopsis* embryogenesis // EMBO J. 1998. V. 17. № 6. P. 1799-1809.
114. Müller R., Bleckmann A., Simon R. The receptor kinase *CORYNE* of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1* // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 934-946.
115. Murfet I.C. Flowering in *Pisum*: Multiple alleles at the *If* locus // Heredity. 1975. V. 35. P. 85-98.
116. Nadeau J.A., Sack F.D. Stomatal development in *Arabidopsis* // The *Arabidopsis* Book (ed. Somerville, C.R., Meyerowitz, E.M.). 2002. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
117. Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J., Shimura Y. Requirement of auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation // Plant Cell. 1991. V. 3. P. 677-684.
118. Pogorelko G., Fursova O., Klimov E. Identification and analysis of the *Arabidopsis thaliana AtFas4* gene whose overexpression results in the development of a fasciated stem // J. Proteomics Bioinform. 2008. V. 1. P. 329-335.
119. Prenner G. New aspects in floral development of Papilionoideae: initiated but suppressed bracteoles and variable initiation of sepals // Ann. Bot. 2004. V. 93. P. 537-545.
120. Reinhardt D., Kuhlheimer C. Plant architecture // EMBO Reports. 2002. V. 3. № 9. P. 846-851.

121. Reinhardt D., Pesce E.-R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier K. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport // *Nature*. 2003. V. 426. P. 255-260.
122. Rodriguez-Concepcion M., Perez-Garcia A., Beltran J.P. Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea // *Plant Mol. Biol.* 2001. V. 46. P. 373-382.
123. Running M.P., Lavy M., Sternberg H., Galichet A., Gruissem W., Hake S., Ori N., Yalovsky S. Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants result from lack of CaaX prenyltransferases // *PNAS*. 2004. V. 101. № 20. P. 7815-7820.
124. Sagan M., Duc G. *Sym28* and *Sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.) // *Symbiosis*. 1996. V. 20. P. 229 – 245.
125. Scofield S., Murray J.A.H. *KNOX* Gene Function in Plant Stem Cell Niches // *Plant Mol Biol.* 2006. V. 60. № 6. P. 929-946.
126. Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S., Buzas D.M., Iturbe-Ormaetxe I., Carroll B.J., Gresshoff P.M. Long distance signaling in nodulation directed by CLAVATA1-like receptor kinase // *Science*. 2003. V. 299. P. 109-112.
127. Shannon S., Meeks-Wagner D.R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 1993. V. 5. P. 639-655.
128. Sharma V.K., Carles C., Fletcher J.C. Maintenance of stem cell populations in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. V. 100. Suppl. 1. P. 11823-11829.
129. Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu., Glianenko M.N., Mishchenko T.M. The *Brt* (branched roots) and *Lrt* (long roots) genes control the development of roots in peas (*Pisum sativum* L.) // *Pisum Genet.* 2002. V. 34. P. 23-24.
130. Sidorova K.K., Uzhintseva L.P. Mapping of *nod4*, a new hypernodulating mutant of pea // *Pisum Genet.* 1995. V. 27. P. 21.
131. Singer S., Sollinger J., Maki S., Fishbach J., Short B., Reinke C., Fick J., Cox L., McCall A., Mullen H. Inflorescence architecture: a developmental approach // *Bot. Rev.* 1999. V. 65. № 4. P. 385-410.
132. Singer S.R., Hsiung L.P., Huber S.C. Determinate (*det*) mutant of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae) exhibits an indeterminate growth pattern // *Am. J. Bot.* 1990. V. 77. № 10. P. 1330-1335.

133. *Sinjushin A.A., Demidenko N.V., Gostimskii S.A.* Preliminary report on taxonomical position of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. evidenced from morphological and molecular data // *Pisum Genet.* 2009. V. 41. P. 15-20.
134. *Sinjushin A.A., Gostimskii S.A.* Relationship between different fasciated lines of pea // *Pisum Genet.* 2007. V. 39. P. 16-18.
135. *Sokoloff D.D., Rudall P.J., Remizowa M.* Flower-like terminal structures in racemose inflorescences: a tool in morphogenetic and evolutionary research // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. № 13. P. 3517-3530.
136. *Suzuki T., Inagaki S., Nakajima S., Akashi T., Ohto M., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Nakamura K., Morikami A.* A novel *Arabidopsis* gene *TONSOKU* is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 673-684.
137. *Swiecicki W.K.* Determinate growth (*det*) in *Pisum*: a new mutant gene on chromosome 7 // *Pisum Newslett.* 1987. V. 19. P. 72-74.
138. *Swiecicki W.K.* Supplemental data on *fasciata* genes in *Pisum* resources // *Pisum Genet.* 2001. V. 33. P. 19-20.
139. *Swiecicki W.K., Gawłowska M.* Linkages for a new *fasciata* gene // *Pisum Genet.* 2004. V. 36. P. 22-23.
140. *Szczyglowski K., Amyot L.* Symbiosis, inventiveness by recruitment? // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 935-940.
141. *Taguchi-Shiobara F., Yuan Z., Hake S., Jackson D.* The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize // *Genes & Development.* 2001. V. 15. P. 2755-2766.
142. *Takada S., Hibara K., Ishida T., Tasaka M.* The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation // *Development.* 2001. V. 128. P. 1127-1135.
143. *Tattersall A.D., Turner L., Knox M.R., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Hofer J.M.I.* The mutant *crispa* reveals multiple roles for *PHANTASTICA* in pea compound leaf development // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 1046–1060.
144. *Taylor S., Hofer J., Murfet I.* *Stamina pistilloida*, the pea ortholog of *Fim* and *UFO*, is required for normal development of flowers, inflorescences and leaves // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 31-46.
145. *Taylor S.A., Hofer J.M.I., Murfet I.C., Sollinger J.D., Singer S.R., Knox M.R., Ellis T.H.N.* *PROLIFERATING INFLORESCENCE MERISTEM*, a MADS-

- box gene that regulates floral meristem identity in pea // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1150-1159.
146. *Torres A.M., Weeden N.F., Martin A.* Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // *Theor. Appl. Genet.* 1993. V. 85. P. 937-945.
147. *Tsyganov V.E., Pavlova Z.B., Kravchenko L.V., Rozov S.M., Borisov A.Y., Lutova L.A., Tikhonovich I.A.* New gene *Crt* (*Curly Roots*) controlling pea (*Pisum sativum* L.) root development // *Ann. Bot.* 2000. V. 86. P. 975-981.
148. *Tucker S.C.* Floral development in legumes // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 911-926.
149. *Tucker S.C.* Overlapping of organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoideae) // *Amer. J. Bot.* 1989. V. 76. P. 714-729.
150. *Udvardi M.K., Tabata S., Parniske M., Stougaard J.* *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane // *Trends .Pl. Sci.* 2005. V. 10. №5. P. 222-228.
151. *VandenBosch K.A., Stacey G.* (eds.). Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 840-865.
152. *Waites R., Selvadurai H.R.N., Oliver I.R., Hudson A.* The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum* // *Cell.* 1998. V. 93 (5). P. 779-789.
153. *Wang H., Chen J., Wen J., Tadege M., Li G., Liu Y., Mysore K.S., Ratet P., Chen R.* Control of compound leaf development by *FLORICAULA/LEAFY* ortholog *SINGLE LEAFLET1* in *Medicago truncatula* // *Pl. Physiol.* 2008a. V. 146. P. 1759–1772.
154. *Wang Z., Luo Y., Li X., Wan L., Xu S., Yang J., Weng L., Sato S., Tabata S., Ambrose M., Rameau C., Feng X., Hu X., Luo D.* Genetic control of flower zygomorphy in pea (*Pisum sativum* L.) // *PNAS.* 2008b. V. 105. № 30. P. 10414-10419.
155. *Weberling F.* Structure and evolutionary tendencies of inflorescences in the Leguminosae / *Advances in Legume Biology* (eds. Stirton C.H., Zarucchi J.L.) // *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 1989. V. 29. P. 35-58.
156. *Weeden N.F., Ellis T.H.N., Timmerman-Vaughan G.M., Swiecicki W.K., Rozov S.M., Berdnikov V.A.* A consensus linkage map for *Pisum sativum* // *Pisum Genet.* 1998. V. 30. P. 1-4.



157. *Weller J.* Update on the genetics of flowering // *Pisum Genet.* 2007. V. 39. P. 1-7.
158. *Weir I., Lu J., Cook H., Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B.* CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum* // *Development.* 2003. V. 131. №4. P. 915-922.
159. *White O.E.* Studies of inheritance in *Pisum* II. The present state of knowledge of heredity and variation in peas // *Proc. Am. Phil. Soc.* 1917. V. 56. P. 487-588.
160. *White O.E.* Fasciation // *Bot. Rev.* 1948. V. 14. № 6. P. 319-358.
161. *Williams L., Fletcher J.C.* Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 582-586.
162. *Williams L., Grigg S.P., Xie M., Christensen S., Fletcher J.C.* Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes // *Development.* 2005. V. 132. P. 3657-3668.
163. *Wojciechowski M.F., Lavin M., Sanderson M.J.* A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family // *Am. J. Bot.* 2004. V. 91. № 11. P. 1846-1862.
164. *Worsdell W.D.* The principles of plant teratology. London: Ray Society, 1915.
165. *Wu X., Dabi T., Weigel D.* Requirement of homeobox gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. P. 436-440.
166. *Yamamoto E., Karakaya H.C., Knap H.T.* Molecular characterization of two soybean homologs of *Arabidopsis thaliana* *CLAVATA1* from the wild type and fasciation mutant // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000. V. 1491. P. 333-340.
167. *Young J.P.W.* Pea leaf morphogenesis: a simple model // *Ann. Bot.* 1983. V. 52. P. 311-316.
168. *Young N.D., Mudge J., Ellis T.H.* Legume genomes: more than peas in a pod // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. V. 6. № 2. P. 199-204.
169. *Yu L.P., Simon E.J., Trotochaud A.E., Clark S.E.* POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci // *Development.* 2000. V. 127. V. 1661-1670.

170. Ziegelhoffer E.C., Medrano L.J., Meyerowitz E.M. Cloning of the Arabidopsis *WIGGUM* gene identifies a role for farnesylation in meristem development // PNAS. 2000. V. 97. № 13. P. 7633-7638.
171. Zielinski Q.B. Fasciation in *Lycopersicon*. I. Genetic analysis of dominance modification // Genetics. 1948. V. 33. P. 405-428.
172. Zhukov V.A., Kuznetsova E.V., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Titov V.S., Pinaev A.G., Borisov A.Y., Moffet M., Domoney C., Ellis T.H.N., Ratet P., Weeden N.F., Tikhonovich I.A. Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses // Pisum Genet. 2008. V. 39. P. 19-25.