

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему: *Анализ наследования типа листа у некоторых
мутантных форм томата*

Исполнитель: студентка 507 группы
плодоовощного факультета
Новикова Людмила Анатольевна
Руководитель: доцент Соловьев А.А.

Москва 2004

<http://yadyra.ru>

ЧАСТЬ I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУРНОГО ТОМАТА *Lycopersicon esculentum*

1.1. Происхождение и классификация томата

Родина томата - тропические районы Центральной и Южной Америки. Большинство исследователей полагают, что родиной культурного томата являются Галапагосские острова и узкая полоса (около 160 км) вдоль тихоокеанского побережья Южной Америки, захватывающая территории Перу, Эквадора, Чили. По вопросу о родоначальной форме культурного томата мнения исследователей расходятся. Одни исследователи считают родоначальной формой культурного томата *L. esculentum* var. *cerasiforme* (вишневидный томат), тогда как другие в качестве таковой рассматривают *L. pimpinellifolium* (смородиновидный томат) [13].

Томат принадлежит к семейству Пасленовые – *Solanaceae*. Существует несколько ботанических классификаций томата. По предложенной Д.Д. Брежневым классификации род *Lycopersicon* включает три вида, различающихся по морфологическим, биологическим и физиологическим признакам и не скрещивающихся между собой в обычных условиях. К ним относятся [7, 10, 12, 13]:

- 1) томат перуанский (*L. peruvianum* Brezh.)
- 2) томат волосистый (*L. hirsutum* Humb. et Venp.)
- 3) томат обыкновенный (*L. esculentum* Mill.)

Внутри вида *L. esculentum* Mill. выделены три подвида.

Дикий – subsp. *pimpinellifolium* - имеет две разновидности: смородиновидный и кистевидный.

Полукультурный - subsp. *subsportaneum* – имеет пять разновидностей: сливовидный, грушевидный, вишневидный, удлиненный и многогнездный.

Культурный - subsp. *cultum*. В пределах этого подвида выделены три разновидности: обыкновенный, штамбовый и крупнолистный [7, 10, 12].

Обыкновенный – var. *vulgare* – растения слабо- и среднеоблиственные, стебель полегающий различной длины. Листья непарноперисторассеченные, обычного типа строения, с большим количеством долей, долек и долек. Плоды красные, желтые и, редко, белые. Разновидность объединяет до 75% мирового сортимента сортов.

Штамбовый – var. *validum* – растения небольшого и среднего размера, сильно облиственные. Стебли прямостоячие, слабоветвистые, с укороченными междоузлиями. Листья средней величины, с короткими черешками и близко расположенными темно-зелеными гофрированными долями, с небольшим числом долек и долек. Плоды красные, розовые и желтые.

Крупнолистный – var. *grandiflorum* – растения средне- и слабооблиственные. Стебли полегающие, листья крупные, похожи на листья картофеля, состоят из нескольких цельнокрайних долей и долек. Плоды розовые и красные.

1.2. Морфологические особенности томата

Жизненный цикл развития томата при выращивании их в открытом грунте заканчивается в один вегетационный период, в закрытом грунте растения могут расти больше года [1].

Семена культурных форм томата плоские, почковидные, желтовато-серые, опушенные. Имеются сорта с темно-коричневыми опушенными семенами. Масса 1000 семян от 3 до 4 грамм; в 1 грамме содержится 250-300 семян крупноплодных сортов и гибридов, а мелкоплодных (вишневидных) - 400-500. Зародыш имеет изогнутую форму и состоит из длинных семядолей и короткого зачатка корешка. Эндосперм сохраняется до полного созревания семени [1, 13].

Корневая система томата хорошо развита. В зависимости от типа растений, способа выращивания, структуры и плодородия почвы корневая система сильно различается. Так, у высокорослых (индетерминантных) сортов при выращивании в безрассадной культуре главный корень стержневой, затем развиваются боковые, которые быстро сравниваются по толщине и диаметру с главным и проникают на хороших почвах на глубину до 2 метров, а в горизонтальном направлении распространяются на 1,5-2,5 метра. При культуре методом рассады корневая система распределяется преимущественно в верхних слоях почвы и подпочвы и имеет большое количество ответвлений. На полегающих на землю ветвях и при

окучивании стеблей легко образуются придаточные корни. У растений штамбовых сортов корневая система более компактная, очень сильно разветвленная, но радиус ее меньше, чем у нештамбовых сортов. Если рассаду выращивают в питательных кубиках, горшочках, то корневая система также бывает очень сильно разветвленной, мочковатой и более компактной [1, 7, 13].

Стебель томата обеспечивает рост растений в высоту. Рост стебля сопровождается его ветвлением. В первый период жизни томатного растения ветвление происходит моноподиально, образуя главный побег (главную ось) растения, который растет своей верхушкой вплоть до заложения первого соцветия. В зависимости от сорта и условий возделывания на моноподии формируется от 4-6 до 12-15 листьев. В пазухах этих листьев из почек прорастают боковые побеги. После заложения первого соцветия рост растения продолжается за счет развития боковой почки, заложившейся непосредственно под соцветием в пазухе верхнего листа. Таким образом, последующий рост растений в высоту продолжается за счет симподиального ветвления. В результате симподиального ветвления формируется побег замещения второго порядка, который также заканчивает свой рост после образования 3-5 листьев и соцветия. Из пазухи листа, расположенного под этим соцветием, появляется побег замещения третьего порядка и т.д. Таким образом, рост растений продолжается непрерывно (индетерминантный тип роста) [1, 7, 13].

При продолжении роста побегов замещения соцветие отклоняется в сторону, а лист, в пазухе которого он заложился, как правило выносится с побегом выше соцветия. В результате при симподиальном ветвлении формируется «главный стебель» томата, состоящий из побегов последующих порядков. Вторичные боковые побеги формируются на главном побеге, растут и развиваются также. На них формируются третичные побеги и т.д. По своему строению они практически ничем не отличаются от главного побега.

Рост вторичного бокового побега и число листьев на нем зависят от того, в пазухе какого листа главной оси первого порядка он появился. Первыми по времени появляются боковые побеги в пазухах первого и второго листа главной оси первого порядка, но рост их идет довольно медленно, число листьев до первого соцветия, как правило, - 8-9. Чем выше по главной оси первого порядка закладываются боковые побеги (3-5 лист), тем меньше сила их роста. В верхней

части моноподия рост боковых побегов заметно усиливается. Самыми мощными боковыми побегами являются те, которые формируются в пазухах листьев, расположенных под соцветиями.

Кроме индетерминантного (непрерывного) типа роста, у томата довольно часто встречаются сорта с детерминантным, т.е. ограниченным типом роста. У детерминантных томатов рост растения прекращается после образования 2-10 соцветий. При этом среднее число листьев между соцветиями всегда меньше 3. Соцветия располагаются через 1-2 листа, реже подряд, одно за другим.

Листья томатов очередные, непарноперисторассеченные, резко различаются по структуре у разных морфотипов, поэтому тип листа является одним из важных сортоотличительных признаков, которым пользуются апробаторы. По степени рассеченности листья томатов различаются между собой не только в пределах одного вида, но даже в пределах одного растения. Признак рассеченности листовой пластинки у томата является наиболее консервативным, и его изменчивость мало зависит от условий выращивания.

Размер листа томата, наоборот, варьирует в значительных пределах. На стебле листья расположены по спирали, которая у каждого очередного симподиума меняет свое направление на противоположное. Формула листорасположения (фитотаксис) у томата равна $2/5$. Это значит, что при двух оборотах спирали на стебле формируется 5 листьев.

Продолжительность жизни у листа томата составляет в среднем 3-4 месяца. Старение и отмирание листьев у растений идут постепенно, начиная с семядолей, в акропетальной очередности [1, 7, 13].

Соцветие томата - завиток, но иногда его называют кистью. Ветвление соцветий у большинства культурных сортов симподиальное, т.е. образуется ложная ось, состоящая из плодоножек цветков различных порядков]. Различают несколько типов соцветий: простое соцветие; промежуточное; сложное; сильно ветвящееся. По структуре различают соцветия компактные и рыхлые. Тип соцветия контролируется генетически и является хорошим апробационным признаком. Первое соцветие начинает формироваться на растении в период раскрытия двух-трех настоящих листьев, т.е. в зависимости от сорта и внешних условий на 15-25-й день после появления всходов. Низкая ночная температура в этот период

увеличивает степень ветвления соцветия и способствует образованию большего количества цветков. При высоких же ночных температурах (22-24 град.) формируется меньшее число цветков на более длинной и тонкой оси соцветия [5,33]. Влияет на структуру соцветия и интенсивность освещения.

От всходов до начала цветения первого соцветия томата в обычных условиях проходит 50-60 дней. При удалении всех боковых побегов на растении у индетерминантных сортов томата одновременно цветет не более 3-4 соцветий. Детерминантные сорта из-за более частого расположения соцветий цветут значительно дружнее [1, 7, 13].

Цветок у томата обоеполюй, пяти-, шестичленный и состоит из чашечки, венчика, тычинок и пестика. Для нормального прорастания пыльцы и оплодотворения цветка оптимальная температура воздуха составляет 24-32 град. И относительная влажность воздуха - 70-80%. Цветок в зависимости от погоды цветет 3-5 дней. После оплодотворения семяночек начинается рост завязи.

Плод томата - сочная ягода, различной формы, размера, поверхности, окраски и массы. Чаще всего встречаются плоская, плоскоокруглая, округлая, округло-овальная, удлиненно-цилиндрическая формы плода; поверхность гладкая, реже сильнорребристая; окраска плода от темно-красной до розовой и лимонной. По массе плоды томата разделяют на мелкие (менее 50 гр.), средние (50-120 гр.) и крупные (свыше 120 гр., у некоторых сортов до 600-800 грамм и более).

Среди сортов томата, используемых в производстве, есть и партенокарпические, которые могут в неблагоприятных условиях завязывать плоды и без оплодотворения [1, 7, 13].

В зависимости от равномерности окраски зеленых плодов все сорта томата подразделяются на две группы: с равномерно окрашенными плодами и с плодами, имеющими в месте прикрепления плодоножки зеленое пятно различной интенсивности.

1.3. Томат как модельный объект в научных исследованиях

Для проведения научных исследований по генетике растений в качестве модельного объекта исследований удобно использовать томат (*Lycopersicon esculentum*). Это обуславливается следующими факторами:

- простота возделывания, достаточно короткий срок вегетации и невысокая требовательность к условиям выращивания;
- Достаточно короткий вегетационный период, и в то же время возможность многолетнего выращивания и вегетативного размножения;
- разработанная система агротехники;
- Самоопыление, а строение цветка позволяет проводить контролируемую гибридизацию, в том числе и с близкими дикими видами и полукультурными разновидностями;
- Пыльца томатов может сохраняться в течение длительного времени (до двух лет);
- высокая семенная продуктивность, позволяющая получать большие объемы (от 5000 до 25000) семян с одного растения;
- насыщенные генетические карты
- Возможно получение полиплоидов и анеуплоидов - трисомиков, и как следствие возможно изучение структуры генома томата. Поддержание форм с измененными числами хромосом обеспечивается вегетативным размножением
- Каждая из 12 хромосом генома томата (культурных и диких) может быть идентифицирована на стадии пахитены по своей длине, положению центромеры, распределению гетеро- и эухроматина
- Томат оказался удобным объектом для культивирования *in vitro*, что сделало его модельной культурой для выполнения различных молекулярно-биологических и генно-инженерных манипуляций [7];
- большое количество разнообразных мутаций в различных хромосомах (в частности, известно около 300 мутаций по типу листа [33]).

2. Некоторые аспекты онтогенеза растений

2.1. Введение

В настоящее время в биологии как науке наблюдается переход от описательного отражения действительности к расшифровке конкретных закономерностей, лежащих в основе живой природы. При этом традиционные биологические вопросы «как выглядит объект?» и «что с ним происходит?» заменяются другими - «почему он выглядит именно так?» и «как он функционирует?». Ответами на подобные вопросы занимается генетика развития и, в частности, генетика онтогенеза растений [11].

2.2. Особенности строения растения и способы регуляции его развития

Считается, что на рост и развитие различных органов растения действуют следующие факторы:

- экспрессия генов, регулирующих развитие апикальных меристем;
- экспрессия генов, отвечающих за морфогенез конкретного органа;
- наличие, концентрация и взаимодействие фитогормонов;
- факторы внешней среды (температура, интенсивность и длительность освещения и т.д.) [11].

Эти факторы можно разделить на две основные группы. К первой относятся гены, не затрагивающие фитогормональную систему, но влияющие на процессы развития растений. Ко второй системе относятся эндогенные вещества – фитогормоны, осуществляющие регуляцию развития растительного организма. Эти две системы объединяются в генетические программы развития. Каждая такая программа представляет собой последовательность элементарных событий, лежащих в основе морфогенеза или клеточной дифференцировки. При этом любое из рассматриваемых событий (т.е. любой молекулярный процесс в составе отдельной программы развития) является закономерным результатом предыдущего и непосредственной причиной последующего события [11].

Концепция генетических программ развития тесно связана с современными представлениями о молекулярных механизмах биологического ответа. Каждая программа развития запускается определенным сигналом и обеспечивает

адекватную реакцию организма. Таким образом, любая программа развития базируется на следующих компонентах:

1) Рецепторные молекулы, воспринимающие определенный сигнал физической или химической природы. Подобными сигналами могут служить наличие или отсутствие определенных ионов, температура, направление силы тяжести и т.д. Функцию рецепторных молекул обеспечивают определенные белки, специфически распознающие данный сигнал. При этом универсальным свойством подобных молекул является их способность менять свою конформацию в ответ на восприятие сигнала. Подобное изменение приводит к активации рецепторной молекулы и запуску соответствующей программы.

2) Система передачи воспринятого сигнала. Чаще всего рецепторные молекулы достаточно удалены от области реализации ответа, а потому передача воспринятого сигнала, как правило, осуществляется каскадной системой молекул посредников. Подобными посредниками могут служить белки (например, протеинкиназы), некоторые низкомолекулярные соединения (в частности, к ним относятся фитогормоны) и ионы.

3) Молекулы, непосредственно обеспечивающие реализацию ответа на сигнал. В реализацию биологического ответа вовлечено большое разнообразие молекул. В основе биологического ответа лежат два разных механизма. В первом случае необходимые для ответа белковые молекулы уже находятся в растении, но находятся в неактивном состоянии. При восприятии сигнала происходит их активация (чаще всего за счет специфического фосфорилирования или дефосфорилирования) с запуском надлежащих ответных реакций. Такая ситуация называется быстрым биологическим ответом. Во втором случае необходимые для ответа белки синтезируются в растении только после восприятия сигнала. В этой ситуации происходит дифференциальная экспрессия генов, в основном регулируемая на уровне транскрипции. Такой тип ответа называют медленным биологическим ответом [5].

Для растения как живого организма характерны следующие особенности строения и развития:

1) Каждое высшее растение представляет собой систему осевых структур (корней и/или побегов), потенциально способных к безграничному росту. Эта

способность обеспечивается апикальными меристемами, т.е. группами интенсивно делящихся недифференцированных клеток, располагающимися на вершине каждой из осевых структур. Кроме того, апикальные меристемы растения обеспечивают не только постоянное удлинение соответствующих осевых структур, но и их морфогенез (т.е. образование специализированных органов, таких, как почки, листья, цветки, плоды и т.д.).

2) В процессе онтогенеза формируется система дополнительных меристем (пазушных, вставочных, краевых и т.д.), временно находящихся в стадии покоя, но способных преобразовываться в апикальные. Именно покоящиеся меристемы обеспечивают способность к регенерации, а также к вегетативному размножению.

3) Некоторые дифференцированные клетки растений могут превращаться в меристематические с последующим образованием новых очагов деления и роста, т.е. они способны к дедифференцировке. Таким образом, даже дифференцированная живая растительная клетка не утрачивает способности «возвращаться» к стадии зиготы и поэтому клетки растений считаются тотипотентными, т.е. сохраняют способность к формированию всего организма [5, 11, 15, 24, 30].

2.3. Строение побега и побеговых апикальных меристем растения

Побегом называют неразветвленный стебель с листьями. В онтогенезе побег развивается из почечки зародыша либо из пазушной или придаточной почки [2]. Побег состоит из повторяющихся модулей, включающих в себя лист, междоузлие и пазушную почку. Рост побега обеспечивается активностью вегетативных побеговых меристем, работа которых приводит к увеличению числа одинаковых модулей, или узлов [11, 15].

Побеговая апикальная меристема (ПАМ) – это небольшая группа клеток, формирующихся из верхнего слоя апикальной клетки в эмбриогенезе на стадии глобула-сердце, и сохраняющаяся в постэмбриональном развитии. ПАМ у цветковых растений имеет размер в среднем 100 мкм в диаметре и состоит из 800-1200 клеток [15].

ПАМ состоит из трех зон (центральной, периферической и подстилающей), каждая из которых имеет свои цитологические характеристики. Центральная зона находится на дистальном конце и содержит инициальные медленно делящиеся

клетки с выпуклыми ядрами. Клетки периферической зоны окружают центральную зону в виде наружной трубы. Скорость митоза здесь много выше, чем в центральной зоне. Из клеток этой зоны формируются боковые органы (например, листовые зачатки). В основании центральной зоны расположена подстилающая, или РИБ-зона. Она является границей между дифференцированными и недифференцированными клетками. Клетки РИБ-зоны делятся с высокой скоростью и формируют центральную часть побега – стебель. Деления клеток в периферической и РИБ – зонах приводят к продвижению ПАМ вверх, в то время как старые клетки остаются внизу, чем обеспечивает рост стебля вверх [11, 19, 30].

В свою очередь, каждую зону подразделяют на три слоя – Л1, Л2 и Л3. в слое Л1 клетки делятся антиклинально (т.е. параллельно поверхности), что обеспечивает рост ткани в длину. В слое Л2 клетки также делятся антиклинально, оба слоя вместе формируют тунику и служат основой для образования тканей эпидермиса и мезофилла. В слое Л3 деления происходят в двух направления – параллельно и перпендикулярно поверхности. Периклинальное деление клеток приводит к росту тканей в ширину. Из слоя Л3 формируется основная и проводящая ткань. Анализ растений с мутациями, затрагивающими деятельность ПАМ, показал, что различные способы деления клеток (т.е. параллельно или перпендикулярно поверхности) контролируются независимо [11, 15, 19, 30].

Таким образом, тип клеточного деления (параллельно или перпендикулярно поверхности) в ПАМ определяет форму органа, а число клеточных делений – его размер. Различные сочетания направления, скорости и числа делений обеспечивают формирование органов растения, различающихся по морфологии и размеру [9].

В ходе онтогенеза в ПАМ формируются новые меристемы и листовые зачатки. После инициации каждого нового листа в его пазухе формируется вторичная меристема, из которой образуются боковые побеги, а при переходе растения к репродуктивной фазе ПАМ дает начало цветочной (или флоральной) апикальной меристеме, из которой и образуется соцветие.

2.4. Морфология листа высших растений

Лист – один из основных вегетативных органов высших растений, занимающий боковое положение на побеге [2]. С точки зрения эволюционной

теории листа высших растений возникли в качестве органов, специализированных для фотосинтеза. Можно выделить три типа листьев, принципиально отличающихся друг от друга. У моховидных листья называют филлидиями, они являются органами гаметофита и по этой причине не могут быть отнесены к настоящим листьям. Листья плауновидных представляют собой выросты стебля, их называют филлоидами. У всех остальных высших растений листовые органы возникли в результате слияния и уплощения теломов и мезомов, поэтому такие листья принято называть теломными. [3, 30]. В дальнейшем будет рассматриваться строение, происхождение и особенности развития именно этого типа листьев.

Листья высших растений весьма разнообразны по форме и внутреннему строению. У двудольных они обычно состоят из плоской расширенной части – пластинки, и стеблевидного черешка. У основания некоторых листьев образуются мелкие чешуевидные или листовидные структуры, называемые прилистниками. У большинства однодольных и некоторых двудольных основание листа расширено в обхватывающее стебель влагалище [15].

Форма листовой пластинки может быть очень разнообразной – от нитевидной, до сложной и многократно рассеченной. Форма листовой пластинки является важным систематическим и апробационным показателем. В самом простом случае пластинка цельная, но она может быть рассечена на лопасти и доли [3], но иногда лист может состоять из десятков и сотен сильно рассеченных сегментов. Для удобства описания листа двудольных растений принято делить на простые и сложные. К сожалению, в настоящее время нет единой классификации листьев по этому признаку, и большинство исследователей пользуются той, что наиболее подходит для их темы исследований. Есть две основных классификации листьев по степени их сложности:

1) простой лист состоит из одной листовой пластинки, она может быть рассеченной, но не до черешка. Если на черешке располагается две и более листовых пластинки, лист считается сложным [3, 19, 28, 30].

2) у простых листьев одна листовая пластинка, они или не опадают со стебля, или имеют при опадении одно сочленение между черешком и стеблем. У сложных листьев имеется несколько листовых пластинок, каждая из которых имеет

свой черешочек, сидящий на общей оси – рахисе. При листопаде сложный лист распадается на части – сначала опадают листочки, а затем рахис [2, 15].

В данной дипломной работе используется первая из приведенных выше классификаций, т.к. она наиболее удобна для морфологического описания листа томата.

2.5. Этапы развития листа

Самыми первыми листовыми органами семенных растений являются семядоли, которые формируются на стадии проэмбрио. Остальные листья развиваются из зачатков - листовых примордиев, которые через определенные промежутки времени, называемые пластохронами, закладываются в периферической зоне апикальной меристемы стебля в виде бугорков. Вначале все клетки примордия равномерно делятся во всех направлениях. Затем наиболее интенсивно делятся клетки, расположенные на верхушке бугорка. В результате примордий приобретает вытянутую форму, причем большая часть его клеток впоследствии образует срединную жилку и черешок. После достижения зачатком определенной длины (обычно около 1 мм, но у разных растений эта длина может варьировать) расположенные на верхушке клетки перестают делиться, и дальнейший рост осуществляется за счет вставочных и краевых (маргинальных) меристем [3, 5, 11, 15].

Маргинальная меристема закладывается вдоль главной жилки и дает начало основной части листовой пластинки, в ней образуются все типы жилок, кроме главной. Если лист сложный, то вдоль оси листа, которая затем станет рахисом, закладываются бугорки, которые впоследствии развиваются в листочки.

Клетки маргинальной меристемы в разное время прекращают делиться, в результате чего возникает различная рассеченность листа. Первыми прекращают делиться расположенные на поверхности клетки эпидермиса, однако после этого они приступают к растяжению и растягиваются дольше всех остальных клеток листа. Затем перестают делиться клетки губчатого мезофилла, причем растягиваются они не долго, и поэтому между ними образуются обширные межклетники. После этого прекращают делиться клетки палисадного мезофилла, и поскольку они растягиваются слабее эпидермальных клеток, между ними также имеются межклетники, хотя их значительно меньше, чем в губчатом мезофилле [3].

Площадь поверхности взрослого листа может превышать зачаток более чем в тысячу раз. В зависимости от ряда факторов листья могут быть более или менее крупными, но, в отличие от корня и стебля, у них отсутствует неограниченный рост, поэтому размер листа ограничен изначально. Исключением являются листья вельвичии и вайи папоротников, у которых во взрослом состоянии имеется верхушечный рост, а также листья растений, мутантных по генам, регулирующим активность меристем [3].

В течение онтогенеза растений выделяют следующие типы листьев:

1) ювенильные – первые настоящие листья, развивающиеся сразу после прорастания семени. Обычно они организованы более просто, чем взрослые листья, и меньше их по размеру, но, как правило, значительно крупнее семядолей. У ювенильных листьев появляются трихомы. По сравнению с семядолями у этих листьев изменено жилкование и отсутствуют запасные белки.

2) переходные – развиваются после ювенильных листьев, более похожи на взрослые, но не достигают их размеров и степени рассеченности.

3) взрослые – характерны для взрослого растения. К этому моменту они достигают максимального размера, степени рассеченности и развития жилок и трихом [11].

Переход листа растения от одного типа к другому в процессе онтогенеза генетически обусловлен. Выделяют две группы генов, влияющих на развитие листа. К первой группе относятся гены, ответственные за инициацию образования листа и переход от ювенильной к вегетативной и генеративной стадиям. К ним относят гены *Viviparous (VP8)*, *Dwarf 1 (D1)*, *Dwarf 3 (D3)*, *Dwarf 5 (D5)* и *Anther ear (ANI)*, выделенные у арабидопсиса. Ко второй группе относят гены, определяющие идентичность листа, то есть эти гены обуславливают развитие формы листовой пластинки, наличие опушения, трихом и воскового налета. К данной группе относятся мутации по генам *Teopod 1,2 и 3 (TP1, TP2 и TP3)* соответственно), *Congress (CG)* и *Glossy 15 (GL15)*, открытым на кукурузе [11, 30, 31].

Анализ мутантов по этим генам показал, что процессы инициации листа и собственно формирование листа генетически контролируются независимо. Координация экспрессии этих двух генов и определяет время появления определенного типа листа. Кроме того, сильное влияние на инициацию листовых

зачатков оказывают побеговые апикальные меристемы, так как мутации, затрагивающие формирование ПАМ, также приводят к формированию измененных листьев [11].

2.6. Влияние фитогормонов на онтогенез растения

Как было сказано выше, за рост и дифференцировку органов растения отвечают две системы – генная и фитогормональная. Фитогормоны определяют процессы, происходящие в клетках растения. Интенсивность деления, рост и растяжение клеток, накопление в них различных веществ, старение и отмирание органов растения обеспечивается соотношением в них разных групп фитогормонов.

Выделяют пять групп фитогормонов: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизины и этилен [11, 16].

Ауксины – соединения преимущественно индольной природы – индолилуксусная кислота и ее производные. Они стимулируют рост клеток, регулируют формирование проводящих пучков, определяют апикальное доминирование, тормозят переход к цветению у короткодневных растений и стимулируют у длиннодневных. Снижение содержания ауксина вызывает формирование отделительного слоя и опадение листьев [11, 16].

Гиббереллины – это тетрациклические карбоновые кислоты, известно более 70 гиббереллинов. Гиббереллины стимулируют деление и растяжение клеток апикальных и интеркалярных меристем. Повышение их содержания у длиннодневных растений определяет их переход к цветению. Кроме того, гиббереллины отвечают за выход растения из стадии покоя, усиление интенсивности фотосинтеза, дыхания и транспирации [11, 16, 20]

Цитокинины – производные 6-аминопурина, синтезируются путем конденсации аденозин-5-монофосфата и изопентенилпирофосфата. Цитокинины – первичный фактор индукции клеточных делений, активируют рост клеток двудольных, способствуют их дифференцировке, стимулируют формирование почек и рост побегов, но угнетают рост корней; снимают апикальное доминирование и стимулируют рост боковых побегов, способствуют выходу растений из стадии покоя, задерживают старение листьев [11, 16].

К абсцизинам относится абсцизовая кислота и ее производные терпеноидной природы. Абсцизовая кислота является ингибитором широкого действия. С накоплением АБК связан переход растений в стадию покоя, созревание плодов и старение листьев. Она участвует в торможении роста отдельных частей растения и в регуляции устьичных движений [11, 16].

Этилен также является гормональным фактором, в растении синтезируется из метионина. Этилен тормозит деление клеток, удлинение проростков, останавливает рост листьев двудольных, изменяет направление роста клеток с продольного на поперечное, ускоряет опадение листьев и плодов, удлиняет период покоя, способствует смещению пола растений в сторону образования женских цветков [11, 16].

Также все выше перечисленные группы фитогормонов могут взаимодействовать друг с другом, обеспечивая различные физиологические реакции растения.

3. Влияние отдельных генов на морфогенез листа томата

3.1.1 Актуальность исследования развития листа

В настоящее время вопросы генетики онтогенеза листа изучены недостаточно. Несмотря на то, что проблемами генетики развития растений давно занимаются во всем мире, большая часть работ посвящена развитию побега, корня и цветка. Для этих органов уже разработаны примерные программы развития, для листа модели генетической регуляции онтогенеза только начинают создаваться. Имея данные по регуляции онтогенеза отдельных органов, можно создать модель управления растительным организмом на генном уровне. Например, анализ морфогенетически мутантных растений, у которых семядоли и элементы цветка превращались в листья, позволил доказать единство происхождения этих органов. Из этого можно сделать вывод, что на определенных этапах развития в различных частях растения запускаются разные программы генетического контроля. Практическая цель данных исследований заключается в совершенствовании методов воздействия на наследственный материал растения для получения нужных признаков и предвидения последствий конкретного вмешательства в геном.

3.2. Способы и методы исследования развития листа

Для исследования механизмов развития различных органов могут применяться следующие приемы:

- выделение или получение мутаций по исследуемому признаку и изучение влияния как отдельных мутаций, так и их сочетаний, на растение с помощью генетического, биохимического, анатомического и т.д. анализов (например, таким образом была построена модель развития цветка у арабидопсиса)
- выявление генов, отвечающих за развитие сходных признаков у различных организмов, для построения общих моделей развития (например, программы развития цветка, сходные с таковой у арабидопсиса, были найдены и у других растений);
- введение в исследуемое растение трансгена с известной функцией и изучение его влияния на фенотип растения.

3.2.1. *KNOX* – гены. Их строение и регуляция

В 1990-е годы у кукурузы была описана мутация *KNOTTED* (*Kn1*), изменяющая клеточное деление и дифференцировку тканей листа. В результате этой мутации группа клеток продолжает делиться и окружает клетки, которые уже дифференцированы. Группы делящихся клеток фокусируются вдоль боковых жилок и оказываются разбросанными по листу, формируя узлы [11, 25, 27, 31]. На данный момент описано более 10 аллелей этого гена, фенотипически различающихся между собой. Этот ген особенно интересен тем, что содержит гомеобокс, типичный для генов каскадной регуляции развития у дрозофилы и других животных, что свидетельствует, что гомеобокс-гены растений, подобно таковым у животных, играют важную роль в регуляции процессов развития [18, 19]. Гомеобокс – это высоко консервативная область ДНК из 180 пар оснований, обнаруженная в гомеозисных генах [11]. На основе сходства последовательностей и типов экспрессии, гомеобокс-гены, сходные с *Kn1* (*knox* - гены) были сгруппированы в два класса - I и II. В то время как *knox*-гены класса II в разной степени экспрессируются во всех органах растения, гены класса I (например, *Kn1*, *LeT6*) экспрессируются, главным образом, в вегетативных и цветковых меристемах и влияют на деятельность побеговой меристемы и морфологию листа и цветка [18].

У *Drosophila melanogaster* экспрессия генов развития, таких, как гомеобокс-гены, поддерживается антагонистическим действием двух групп генов - *Polycomb* (*PcG*) и *trithorax* (*trxG*). *PcG* белки необходимы для устойчивой репрессии гомеологичных генов, а *trxG* белки требуются для поддержания их в активном состоянии. Возможно, что у растений работает подобная регуляторная система. В арабидопсисе были недавно идентифицированы несколько *PcG* генов, управляющих развитием вегетативных и генеративных органов. Например, рецессивная мутация *curly leaf-2* (*clf-2*) плеiotропно действует на морфологию листа и цветка и время цветения. *CLF*-ген кодирует *PcG* белок, осуществляющий отрицательную регуляцию экспрессии цветкового гомеологичного гена *AGAMOUS* (*AG*) в листьях [5, 6].

Несколько рецессивных мутаций генов кукурузы, изменяющих морфологию листа, участвуют в регуляции экспрессии *knox*-генов, например *leafbladeless1* (*lbl1*), *narrow sheath* (*ns*), и *rough sheath 2* (*rs2*). Ген *rough sheath 2* (*rs2*) был обнаружен методом маркирования ДНК и по фенотипическому сходству с растениями львиного зева (*Antirrhinum majus*), мутантными по гену *PHANTASTICA* (*PHAN*). Было установлено, что ген *RS2*, подобно *PHAN* гену, кодирует *Myb*-белок, подавляющий экспрессию гомеобокс-генов типа *ROUGH SHEATH1* (*RS1*) и *KN1* [18]. Таким образом, изучение мутантных растений позволяет выявлять механизмы регуляции экспрессии различных генов.

3.2.2. Влияние мутации *clausa* на экспрессию гомеобокс-гена *LeT6* у томата

Было обнаружено, что растения рецессивного мутанта томата *clausa:shootyleaf* (*clau:shl*) являются фенкопией некоторых трансгенных растений со сверхэкспрессией *knox*-генов класса I. Было высказано предположение, что этот мутант не способен должным образом управлять степенью экспрессии гомеологичных генов. Мутация *clau:shl* воздействует на развитие вегетативных и генеративных органов, приводя к изменению морфологии листа и плода, образованию эктопических меристем и срастанию органов. Нарушение экспрессии *knox*-гена *LeT6/TKn2* класса I наблюдалось в различных областях листьев и плодов у *clau:shl* [18, 26].

Мутантные растения *clau* обладают широким диапазоном фенотипических вариаций, включая измененную морфологию листа и цветка, цветки,

расположенные на листьях, срастание органов, асимметричную чашечку, и пуп-подобные плоды [18]. Замечено, что все *clau*-аллели имеют измененные, чрезмерно расчлененные листья, часто несущие побегообразные структуры на рахисе [18]. Такие побегообразные органы, образующиеся при срастании черешочков, чаще приводят к образованию долей с ортотропным типом роста, чем с нормальным плагиотропным. Сеянцы мутанта *clau:vc*, в отличие от сеянцев с диким типом, часто развивают *shooty cotyledons*, то есть формируют зародыш с двухлопастными семядолями, который, однако, может развиваться в зрелое растение [18]). Репродуктивная фаза мутанта *clau:ff* сильно подавлена; соцветия развиваются поздно и большинство из них имеет неразвитые цветки. Цветки мутантных растений частично клейстогамны, то есть чашелистики и лепестки не отогнуты назад в отличие от цветков дикого типа. Это напоминает цветки трансгенных растений томата со сверхэкспрессией гомеобокс - гена *LeT6* [18, 26]. Сросшиеся тычинки в мутанте *clau* выглядят нормально и содержат жизнеспособную пыльцу. Мутантные растения всегда имеют частично сросшиеся, асимметричные чашелистики. Плоды мутантных растений часто имеют пуп-подобный вид, при котором плодоподобные структуры развиваются на терминальном конце плода из-за неограниченного роста цветка [18].

В части плодов, образовавшихся из терминального конца завязи, плацентарная ткань занимает большую часть объема и образуется мало семян. Метод сканирующей электронной микроскопии показал, что такие плоды имеют эктопические семязачатки, различные вегетативные примордии и множество железистых волосков, обычно имеющих на листьях, стеблях и чашелистиках томата дикого типа [18].

Завязь культурного томата обычно состоит из нескольких гнезд, содержащих семязачатки. На продольном срезе завязи дикого типа видны одно или два гнезда (в зависимости от ориентации среза), содержащие несколько семязачатков. Мутантные завязи, содержащие нормальные семязачатки, состояли из многих гнезд, часто образующих двойные или тройные ряды. Эта неправильная структура может объяснить появление пуп-подобных плодов. В плодах мутантных растений меристемоподобные структуры часто эктопически образуются на месте семязачатков.

Вышеупомянутые фенотипические отклонения позволяют предположить, что у *clau*-мутантов, по крайней мере, отчасти, нарушена нормальная экспрессия гомеобокс-генов типа *LeT6/TKn2* [18, 26, 31]. Для определения степени экспрессии *LeT6* в различных тканях была проведена ДНК-гибридизация *in situ* в апексах побегов, взрослых листьях и завязях, взятых из растений дикого типа и *clau:shl* мутантов. Экспрессия *LeT6* у растений дикого типа была зафиксирована в меристемах, листовых примордиях и проводящих тканях, но не во взрослых долях листа. Степень экспрессии *LeT6* в мутантных растениях в вегетативных и генеративных меристемах была неотличима от таковой у дикого типа. Однако, в отличие от растений с диким типом, экспрессия гена *LeT6* была хорошо выражена во взрослых листьях мутантных растений, особенно в палисадной паренхиме и проводящей системе. ПЦР-анализ обратной транскриптазы показал, что *LeT6* неправильно экспрессировался в листьях *clau:ff*, но не в листьях дикого типа. В завязях дикого типа во время цветения *LeT6* экспрессировался в проводящих тканях и во внутренней части интегументов семязачатка, смежных с нуцеллусом. После цветения в завязях экспрессии обнаружено не было. Однако в завязях мутантных растений экспрессия *LeT6* была хорошо заметна после цветения в различных слоях клеток, окружающих зародышевый мешок во внутренней части интегумента и относительно слабо - в нуцеллусе. Мутантные растения также показали сильную экспрессию *LeT6* в эктопических меристемах около терминального конца завязи [18].

Поскольку ген *CLAUSA* расположен в IV хромосоме, а *LeT6* в хромосоме II, то изменение экспрессии *LeT6* в *clau*-мутантах не может быть приписано мутации в пределах регуляторных областей его транскрипции [18]. Возможно, что широкий диапазон гомеозисных явлений, обнаруженных у рецессивного *clau*-мутанта, отражает прекращение работы некоторого фактора, такого как *PcG*- или *Myb*-ген, которые отрицательно регулируют экспрессию гомеобокс-гена *LeT6/TKn2* и, вероятно, другие гомеологичные или отвечающие за развитие гены томата. Различия в уровне экспрессии гена *LeT6* у дикого типа и мутантных растениях обеспечивают понимание механизма, регулирующего степень экспрессии гомеозисных генов в процессе развития растения. В зрелых листьях дикого типа ген *LeT6* остается выключенным. Однако в зрелых листьях *clau* -мутантов *LeT6*

экспрессируется в некоторых тканях, например в палисадной паренхиме и проводящей системе.

Эти результаты позволяют предположить, что устойчивая репрессия *LeT6* в различных тканях взрослых листьев поддерживается различными регуляторными механизмами [18]. Была разработана модель, согласно которой ген *CLAUSA* определяет степень экспрессии *LeT6*, выключая его в клетках палисадной паренхимы и проводящих тканях, в то время как в других тканях, например, губчатой паренхиме, постоянная репрессия *LeT6* не зависит от *CLAUSA* [18].

Степень экспрессии *LeT6* в завязях дикого типа во время цветения ограничивается проводящей системой и отдельными участками семязачатка; экспрессия *LeT6* в завязях после цветения сильно снижается и ограничена внутренними частями интегумента. Эта интерпретация была подтверждена морфологическим изучением, показывающим, что семязачаток томата образует один слой клеток нуцеллуса, окруженный единым сплошным интегументом [18]. Возможно, что этот единый интегумент может быть биохимически разделен на две части: внутреннюю, в которой экспрессируется *LeT6*, и внешнюю, в которой экспрессии нет [18]. В завязях *clau*-мутантов экспрессия *LeT6* после цветения заметна не только во внутреннем интегументе, но и в нуцеллусе. Следовательно, экспрессия *LeT6* в семязачатках регулируется в пространстве и времени продуктами гена *CLAUSA*: в завязи во время цветения *CLAUSA* выключен и не подавляет экспрессию *LeT6* во внутреннем интегументе, но становится активным во внутреннем интегументе и нуцеллусе после цветения.

При изучении степени экспрессии *LeT6* в листьях и семязачатках было высказано предположение, что контроль над данным гомеобокс-геном осуществляется различными регуляторными механизмами, в зависимости от типа клеток. Это предположение подтверждается доминантным мутантом *Curl* (*Cu*), также влияющим на экспрессию гена *LeT6/TKn2*. В отличие от *clau*, в доминантном мутанте *Cu* ген *TKn2* экспрессируется в клетках губчатого мезофилла нижней стороны листа, но не в палисадной ткани, снова указывая на участие различных механизмов в контроле экспрессии гена *LeT6* в различных типах клеток [18, 26, 29]. Механизм аномальной экспрессии гена *TKn2* в листьях мутанта *Cu* до сих пор неизвестен. Возможно, что сверхэкспрессия *TKn2* в листьях этого мутанта может

быть результатом мутации внутри предполагаемого «выключателя» в длинном интроне 2 или в пределах 0,1сМ (50-100 КБ) локуса *Си*. Из этого следует, что пространственно-временная регуляция экспрессии *knox*-гена требует цис-регулирующих элементов, лежащих вне транскрибирующегося участка гена, но в пределах его регуляторной области (50-100 КБ) [18, 29]. Такие элементы могли бы быть посредником для репрессивного действия *polycomb*-белков на экспрессию гомеологичных генов, например, *polycomb response elements*.

Контроль над срастанием органов у мутанта *clau* не может объясняться воздействием только *LeT6*, т.к. растения томата с измененной экспрессией этого гена не имеют сросшихся органов. Рассмотренные фенотипические изменения, вызванные *clau*-мутацией, показывают, что *CLAUSA* участвует не только в регуляции степени экспрессии *LeT6*, но также и в регуляции других генов томата, отвечающих за развитие [18].

3.2.3. Различные гены, влияющие на рассеченность листа томата

Рассматривая развитие листовой пластинки томата различной степени сложности следует отметить, что в норме томат имеет однорассеченный лист, а мутации могут увеличивать или уменьшать степень его рассеченности. Листовая пластинка томата дикого типа овальная, прерывистоперисторассеченная, с тремя парами глубоко рассеченных больших боковых долей. Эти доли развиваются в базипетальной последовательности, самая молодая пара возникает в базальной области листа. Пары меньших нерассеченных долек возникают между большими боковыми долями. На пятом или шестом узле листья достигают типичного размера и степени рассеченности. [19, 20, 22, 24, 28]. В настоящее время выделено около 300 генов, влияющих на характер рассеченности и сложности листовой пластинки, но картировано намного меньше [33].

Все многообразие этих генов по характеру их влияния на фенотип растения можно разделить на четыре большие группы.

К первой группе относятся мутации, при которых листовая пластинка почти не развивается, или она редуцирована до центральной жилки. Такими мутациями являются *wiry*, *wiry-4*, *wiry-6* [19, 24].

Листья растений второй группы цельнокрайние, иногда слабо рассеченные, и состоящие из одной доли. К ним относятся мутации *Lanceolate* и *entire* [19, 24].

Растения третьей группы имеют уменьшенное по сравнению с диким типом количество сегментов листа, кроме того, эти сегменты часто цельнокрайние или слаборассеченные. Это наиболее многочисленная группа, сюда относятся гены *solanifolia*, *potato leaf*, *tripinnate*, *trifoliolate* и некоторые другие. Интересно отметить, что мутанты сразу по двум генам – *solanifolia* и *potato leaf* образуют маленькие редуцированные листья, состоящие из одной доли, также как и растения второй группы [19, 20, 21, 24]. Несмотря на это, при сочетании мутаций *potato leaf* и *entire* растения более близки по фенотипу к мутации *potato leaf* [9].

В четвертую группу объединены мутации, приводящие к развитию сверхсложного листа, состоящего из десятков и сотен сегментов. Это мутации *Mouse ears*, *Petroselinum*, *clausa*, *bipinnate*. [19, 24].

3.2.4. Действие Кп 1 на форму листа томата и

взаимодействие его с другими генами, отвечающими за морфогенез

Форма листа у томата зависит не только от действия одного конкретного гена. Для изучения влияния факторов, влияющих на морфогенез, удобно использовать мутантные по форме листа томаты, т.к. они хорошо изучены, для них составлены генетические карты и их количество и разнообразие форм велико. Впоследствии результаты этих исследований могут использоваться для других культур, т.к. программы развития различных растений во многом сходны [10].

В частности, форма листа может изменяться под воздействием факторов, влияющих на отношение различных типов клеток. По этому принципу на томат действует, например, ген кукурузы *Kn1* [25, 26, 27].

Разнообразные формы органов растения формируются при развитии соответствующих меристем, и идентификация *Kn1*, являющегося меристематическим гомеобокс-геном, позволяет проводить молекулярно-генетические исследования морфогенеза листа [24, 27].

Для изучения программ развития листа и влияния гена *Kn1* на различные виды этот ген был введен в несколько мутантных по листу растений томата, арабидопсис, табак, кукурузу и рис [25]. У всех растений наблюдались изменения в форме листа и характере роста, но эти изменения четко разделились на две группы [25]. У растений с исходным цельнокрайним листом (табак, рис, кукуруза, арабидопсис, мутант томата *La/+*) фенотипические последствия введения гена

ограничивались локальными деформациями листовой пластинки. Центральная жилка у этих растений укорачивалась, соответственно, лист становился более широким и коротким, система третичных жилок - более рассеянной, что приводило к увеличению ареол (самых маленьких полей листовой пластинки, ограниченных жилками) в 2-3 раза, наблюдалось замедление роста растения и потеря апикального доминирования [25].

Иначе ген проявлялся на мутантах томата *Petroselinum* (*Pts/Pts*), *potato leaf* (*c/c*) и *trifoliolate* (*tf/tf*) с исходно расчлененным листом. Мутант *Pts/Pts* с экспрессией *Kn1* не сильно отличается от растений томата дикого типа, обладающих трансгеном *Kn1*; он формирует сверхсложные листья со множественными миниатюрными долями, типичными для материнского растения. Приблизительно одна четверть (6 из 26) растений F₂ имеет, кроме сверхусложнения строения листьев, очень сильное замедление роста и доли с очень узкими листовыми пластинками. Таким образом, доминантный аллель *Pts* не ослабляет, но и не усиливает влияние *Kn1* на расчлененность.

Листья растений генотипа *c/c* - сложные, но их края скорее цельные, чем зубчатые, и они несут две (реже 3-4) пары долей. Такие листья отвечают на измененную экспрессию *Kn1* увеличением расчлененности так же, как и нормальные рассеченные листья, но расчленение ограничено терминальной частью осевой жилки при относительно длинных черешках, не имеющих или имеющих тонкую листовую пластинку.

У растений мутанта *tf/tf* каждый исходный вырост листа был превращен в тройчатый, то есть вместо одного триплета сформировалось три, а вместо трех долек – девять [25].

Из приведенных выше данных можно сделать вывод, что ген *Kn1* влияет на характер расчлененности листьев – он может усиливать расчлененность изначально изрезанных листьев, но не в состоянии повлиять на расчлененность цельнокрайней листовой пластинки; изменяется отношение между поверхностью листовой пластинки и жилками (их становится меньше). Он также вызывает формирование сверхсложного листа, увеличивая количество филломеров до 700-2000, причем габариты листа остаются неизменными за счет уменьшения расстояния между филломерами [25].

Полученные результаты позволяют предположить, что листья с цельнокрайней и с рассеченной пластинкой развиваются в соответствии с двумя различными генетическими программами [24, 25, 31]. Таким образом, условия, требующиеся для развития рассеченного листа, не могут быть выполнены генетической программой цельнокрайнего листа, поэтому продукты гена *Kn1*, повышающие меристематическую активность в листьях, воздействуют только на параметры вторичного роста, приводящие к ряду уродств [24, 31].

Доминантная мутация *La* влияет на меристематическую активность, дающую возможность к развитию сложного листа, поэтому расчленение не происходит [24].

Potato leaf и *trifoliolate* уменьшают сложность состава филломеров, но не входят непосредственно в программу, которая дает разрешение на усложнение. Воздействие *trifoliolate* сильнее, т.к. позволяет меристемам давать только одну пару боковых долей. Однако, если воздействие "картофельного листа" меньше, то формируются две пары долей, листовые пластинки которых скорее цельнокрайние, чем зубчатые, что позволяет предположить, что на функционирование меристем по-разному повлияли два гена. Мы предполагаем, что в обоих случаях повреждения благоприятствуют более раннему развитию листовой пластинки и, следовательно, тоже ограничивают способность к ответной реакции на *Kn1* [24].

Доминантная мутация *Pts* приводит к тому, что рост листовой пластинки не происходит без изменения сложности филломера.

Возможно, что подобную схему развития можно применять не только к *La* и простым листьям, но и к чашелистикам. Чашелистики томата, табака и арабидопсиса тоже простые и цельнокрайние и, подобно простым листьям, они не отвечают на измененную экспрессию *Kn1* усилением расчлененности, но у них меняется тип жилкования и увеличивается размер ареол [24, 27].

Из всего вышесказанного можно предположить, что развитие листа томата может контролироваться двумя различными генетическими программами, приводящими к появлению или цельнокрайнего, или рассеченного листа. Если на ранних этапах развития блокируется образование новых долей и долек, то развивается цельнокрайний лист (например, как при мутации *La/+*, *e/e*), то есть в этом случае лист образован одной разросшейся верхушечной долей. Появление дважды или трижды рассеченного листа (*Me/+*, *bip*, *Pts/+*) объясняется тем, что

мутации, его вызывающие, задерживают рост листовой пластинки, то есть, продолжается дифференцировка тканей, а не их рост. Механизм образования листьев с несколько уменьшенной по сравнению с диким типом рассеченностью листовой пластинки пока не выяснен [19, 28, 30].

ЧАСТЬ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1.1. Цель работы

- 1) Изучение взаимодействия генов *aa*, *d*, *wv*, *Me*, *La*, *tp*, *e* с генами, контролирующими развитие картофельного типа листа у формы Мо 755 и создание новых маркерных форм томата с сочетанием исследуемых генов.

1.2. Задачи

- 1) Создание, изучение и поддержание коллекции растений томата, мутантных по типу листа.
- 2) Получить гибридные семена в 5 комбинациях скрещиваний:
Мо755 (x^*) x Moneymaker (*wild type*)
Мо755 (x) x LA 0715 (*Me*)
Мо755 (x) x Мо 319 (*La*)
Мо755 (x) x Мо 556 (*tp*)
Мо 755 (x) x LA 0784 (*e*);
- 3) изучить проявление типа листа у растений F_1 ;
- 4) получить семена F_2 самоопылением F_1 ;
- 5) изучить расщепление по типу листа популяций F_2 ;
- 6) Выделить по фенотипу формы, несущие по два или несколько исследуемых генов.

* Примечание. В скобках дано обозначение гена, контролирующего развитие мутантного фенотипа. Символом « x » обозначено отсутствие локализованного гена, отвечающего за развитие картофельного типа листа у формы Мо 755.

1.3. Материал

В качестве материнского растения использовали мутант Мо 755 – (табл. 1, приложение 2.)

Таблица 1.

Характеристика материнской формы Мо 755 [4].

| Растение | Мутация | Фенотипическое проявление | Хромосома, локус |
|----------|---|--|------------------|
| Мо 755 | <i>wv</i> (<i>white virescent</i>) | семядоли беловато-желтые, листья появляются с белой пятнистостью, с развитием изменяются до нормальных, рост замедлен, | II, 41 |
| | <i>aa</i> (<i>anthocyanin absent</i>) | отсутствие антоциана во всех частях | II, 50 |
| | <i>d</i> (<i>dwarf</i>) | все части растения сильно уменьшены, листья морщинистые | II, 70 |
| | картофельный тип листа | лист слаборассеченный, гофрированный, число сегментов и порядков рассечения листа уменьшено по сравнению с диким типом | |

В качестве отцовских растений использовали следующие мутантные формы томата (табл.2, приложение 2).

Таблица 2.

Характеристика исходных отцовских форм [4, 23, 32, 33].

| Растение | Мутация | Фенотипическое проявление | Хромосома, локус | Результат скрещивания, шт |
|-----------------------|----------------------------|---|------------------|---------------------------|
| Сорт Moneymaker (Mm)* | ----- | Лист просто или дважды прерванно-перистые с продолговатойцевидными, надрезаннокрупнозубчатыми краями | ----- | 2 |
| LA 0715* | <i>Me – mouse ears</i> | Листья 3-4-дольные с булавовидными сегментами, проявляется на стадии роста | II, 48 | 2 |
| Мо 319* | <i>La - lanceolata</i> | Листья простые, маленькие, цельнокрайние, стебли тонкие, появляется на стадии сеянца, гомозиготы не образуют апикальной меристемы | VII, 48 | 1 |
| Мо 556 | <i>tp – tripinate leaf</i> | Листья сложные, трехдольные, рост замедлен, проявляется на стадии сеянца | VIII, 22 | 4 |
| LA 0784 | <i>e – entire</i> | Средняя жилка листа деформирована, сегменты листа уменьшены, проявляется на стадии сеянца | IV, 66 | 1 |

Использовали мутантные формы из коллекций кафедры генетики МСХА и Центра генетических ресурсов томата.

1.4. Методы

Семена томата перед проращиванием обеззараживали перманганатом калия. Для проращивания семена выкладывали в чашки Петри на слой фильтровальной бумаги и помещали в термостат. Каждый день после посева чашки Петри проветривали (для доступа кислорода к семенам, понижения влажности и для контроля за прорастанием семян). Через 3-5 дней после посева проросшие семена высаживали в грунт.

Работу проводили в теплице кафедры генетики МСХА. Растения исходных форм выращивали в вегетационных сосудах, растения F_1 и F_2 – в стеллажах.

В течение вегетации проводили полив, подкормку, подвязку, прополку растений и борьбу с болезнями и вредителями в соответствии с [1].

Гибридизацию осуществляли методом предварительной кастрации бутонов с опылением их через сутки. Для кастрации отбирали бутоны с зелено-желтыми пыльниками (для предотвращения самоопыления), для получения пыльцы – полностью раскрывшиеся цветки. Удаление пыльников и нанесение пыльцы на рыльце пестика осуществляли пинцетом; кастрированные, гибридные и используемые для получения пыльцы цветки изолировали ватой. Опыленные цветки отмечали пергаментными этикетками с указанием комбинации, а данные по проведенным скрещиваниям и уходу за растениями заносили в полевой журнал в соответствии с правилами, изложенными в [14].

После образования гибридных плодов ватные изоляторы снимали. При покраснении плодов (после их дозревания) семена из них выделяли в стеклянные бюксы и оставляли в них на 1-2 дня для брожения. Затем семена отмывали от тканей плода, высушивали и помещали в бумажные пакеты.

Форма листа у растений F_1 и F_2 оценивали по пятому-шестому листу на стадии восьми настоящих листьев (т.к. к этому периоду у томата формируются взрослые листья и все эффекты мутаций проявляются наиболее четко) [22, 28].

Расчет объема и статистическая оценка расщепления F_2 проводили по методикам, приведенным в [12, 17].

1.5. Результаты

1.5.1. Характеристика гибридов F₁

В первый год работы было получено 10 гибридных плодов (таблица 3).

Таблица 3.

Результаты гибридизации формы Мо 755 с маркерными линиями

| Материнская форма | Мо 755 | | | | |
|------------------------|------------|---------|--------|--------|---------|
| Отцовская форма | Moneymaker | LA 0715 | Мо 319 | Мо 556 | LA 0784 |
| Результат гибридизации | 2 | 2 | 1 | 4 | 1 |

Анализ растений первого поколения показал следующие результаты (табл. 4; приложение 2). У гибридов линии Мо 755 с формой LA 0715 наблюдается расщепление на растения дикого типа и с мутацией «мышинные ушки». При скрещивании с мутантным образцом Мо 319 (*La/+*) у гибридов F₁ развивались ланцетные и нормальные листья. В комбинациях с формами Мо 556, LA 0784 и сортом Moneymaker проявился лист дикого типа.

Таблица 4.

Проявление типа листа у гибридов F₁.

| материнская форма | | гибрид F ₁ | отцовская форма | |
|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| линия | фенотип | фенотип | линия | фенотип |
| Мо 755 | картофельный лист | дикий тип | Moneymaker | дикий тип |
| | | сильнорассеченный лист, дикий тип | LA 0715 | сильнорассеченный лист |
| | | ланцетный лист, дикий тип | Мо 319 | ланцетный лист |
| | | дикий тип | Мо 556 | тройчатый лист |
| | | дикий тип | LA 0784 | цельнокрайний слаборассеченный лист |

В комбинации Мо 755 x Moneymaker наблюдается ожидаемое проявление дикого типа листа как доминирующего признака. Расщепление в комбинации скрещивания Мо 755 x LA 0715 может свидетельствовать о гетерозиготности

отцовской формы. Появление в F₁ растений с ланцетным и диким типом листа в скрещивании Мо 755 x Мо 319 подтверждает известную из литературы гипотезу о жизнеспособности гетерозигот с мутацией La и гибели соответствующих гомозигот. Растения F₁ в комбинациях Мо 755 x Мо 556 и Мо 755 x LA 0784 имели лист дикого типа, что свидетельствует о том, что ген(ы), отвечающие за мутантный тип листа «Мо755», не аллельны.

1.5.2. Анализ наследования типа листа в гибридных популяциях F₂

Во втором поколении растения анализировали по типу листа и проявлению маркерных признаков - антоциана, окраске точки роста, типу роста.

1.5.2.1. Анализ наследования маркерных признаков в комбинации Мо 755 x Moneymaker

Таблица 5.

Результаты гибридологического анализ наследования признаков в комбинации Мо 755 x Moneymaker

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | ожидаемое отношение | χ^2 факт | χ^2 теор 0,05 |
|----------------------|------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------|-----------------------|
| антоциан | наличие | 407 | 399,75 | 3 | 0,526 | 3,84 |
| | отсутствие | 126 | 133,25 | 1 | | |
| окраска точки роста | зеленая | 410 | 399,75 | 3 | 1,051 | 3,84 |
| | желтая | 123 | 133,25 | 1 | | |
| тип роста | нормальный | 395 | 399,75 | 3 | 0,226 | 3,84 |
| | карлик | 138 | 133,25 | 1 | | |
| тип листа | дикий | 387 | 399,75 | 3 | 1,627 | 3,84 |
| | тип 755 | 146 | 133,25 | 1 | | |
| проанализировано, шт | | 553 | | | | |
| всхожесть, % | | 54 | | | | |

Маркерные признаки материнской формы наследуются моногенно, т.к. расщепление во втором поколении 3:1. Такие признаки, как наличие антоциана, зеленая точка роста, высокий рост и лист дикого типа являются доминантными. Эти данные соответствуют литературным [4, 33]. Во втором поколении появились

формы нормального роста и с листом типа «755». Это позволяет предположить, что за развитие картофельной формы листа и карликовый рост у Мо 755 отвечают разные гены. Ген, обуславливающий картофельную форму листа, не был локализован до этого. Было проверено сцепление данного гена с маркерными генами (aa, wv, d) материнской формы. Данные и результаты расчетов представлены в таблицах 6-11 и приложении 2.

Таблица 6.

Анализ расщепления F₂ Мо 755 x Moneumaker по признакам проявления антоциана и окраске точки роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0,05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 практ |
|---------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|----------------|
| | | | | | | | $\sqrt{*}$ | МП* | | |
| aa - wv | антоциан, желтый | 385 | 299,8 | 278,7 | 7,81 | гены сцеплены | 14,5 | 9,5 | 380,4 | 1,16 |
| | б/а, желтый | 22 | 99,9 | | | | | | 21,7 | |
| | антоциан, зеленый | 25 | 99,9 | | | | | | 21,7 | |
| | б/а, желтый | 101 | 33,3 | | | | | | 109,1 | |

* $\sqrt{\quad}$ - расчет расстояния между генами методом извлечения квадратного корня из двойного рецессива, МП – метод произведений

Согласно полученным данным, расстояние между генами aa-wv составило 9.5сМ по методу произведений. Различия расстояний, рассчитанных разными методами, обусловлены использованием при расчетах методом извлечения квадратного корня из двойного рецессива доли только одного фенотипического класса. В дальнейшем все сравнения будут проводиться только для результатов, полученных методом произведений. По литературным данным [4], расстояние между генами aa-wv составляет 9сМ, что не противоречит полученным экспериментальным данным.

Таблица 7.

Анализ расщепления F₂ Мо 755 x Moneumaker по признакам проявления антоциана и типу роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>aa</i> - <i>d</i> | антоциан, высокий | 365 | 299,8 | 214,7 | 7,81 | 16,7 | 14,5 | 363,9 | 2,03 |
| | б/а, высокий | 42 | 99,9 | | | | | 35,8 | |
| | антоциан, карлик | 30 | 99,9 | | | | | 35,8 | |
| | б/а, карлик | 96 | 33,3 | | | | | 97,4 | |

Расстояние между генами *aa-d* по методу произведений составляет 14.5 сМ. Это расстояние меньше, чем по генетической карте (20 сМ) [4, 33]. Возможно, это обусловлено пониженной выживаемостью некоторых форм.

Таблица 8.

Анализ расщепления F₂ Мо 755 x Moneumaker по признакам окраски точки роста и типу роста

| гены | фенотип | кол-во растений | Ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>wv</i> - <i>d</i> | зеленый, высокий | 370 | 299,8 | 234,2 | 7,81 | гены сцеплены | 15,8 | 13 | 367,4 | 3,57 |
| | зеленый, карлик | 40 | 99,9 | | | | | | 32,4 | |
| | желтый, высокий | 25 | 99,9 | | | | | | 32,4 | |
| | желтый, карлик | 98 | 33,3 | | | | | | 100,9 | |

По литературным данным расстояние между генами *white veriscent* и *dwarf* составляет 29 сМ.

Таблица 9.

Анализ расщепления Мо 755 x Moneymaker
по типу листа и проявлению антоциана

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0,05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|------------------|------------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| «755» - aa | дикий, антоциан | 363 | 299,8 | 244,0 | 7,84 | гены сцеплены | 14,1 | 13,0 | 367,4 | 6,40 |
| | дикий, без антоциана | 24 | 99,9 | | | | | | 32,4 | |
| | тип 755, антоциан | 44 | 99,9 | | | | | | 32,4 | |
| | тип 755, без антоциана | 102 | 33,3 | | | | | | 100,8 | |

Полученные данные позволяют предположить, что ген, отвечающий за развитие картофельного типа листа у формы Мо 755, находится на расстоянии 13 сМ от гена *anthocyanin absent*.

Таблица 10.

Анализ расщепления Мо 755 x Moneymaker по типу листа и окраске точки роста

| гены | фенотип | кол-во растений | Ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0,05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| «755» - wv | дикий, зеленый | 371 | 299,8 | 287,6 | 7,84 | гены сцеплены | 12,0 | 10,5 | 373,2 | 4,33 |
| | дикий, желтый | 20 | 99,9 | | | | | | 26,5 | |
| | тип 755, зеленый | 35 | 99,9 | | | | | | 26,5 | |
| | тип 755, желтый | 107 | 33,3 | | | | | | 106,7 | |

Расстояние между геном wv и геном, отвечающим за развитие листа типа 755 равно 10,5 сМ.

Таблица 11.

Анализ расщепления Мо 755 x Moneymaker по типу листа и типу роста

| | | кол-во растений | Ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|---------------|
| | | | | | | | √ | МП | | |
| «755» - <i>d</i> | дикий, высокий | 377 | 299,8 | 437,1 | 7,84 | гены сцеплены | 3,8 | 5,0 | 386,8 | 3,36 |
| | дикий, карлик | 10 | 99,9 | | | | | | 13,0 | |
| | Тип 755, высокий | 18 | 99,9 | | | | | | 13,0 | |
| | Тип 755, карлик | 128 | 33,3 | | | | | | 120,3 | |

Расстояние между геном карликовости и геном, отвечающим за развитие листа типа 755 равно 5 сМ.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы. Картофельный тип листа у формы Мо 755 обуславливается не плейотропным эффектом гена *dwarf*, а другим, ранее некартированным геном. Этот ген расположен во второй хромосоме на расстоянии 13 сМ от гена *anthocyanin absent*, 10,5 сМ от гена *white veriscent*, и 5 сМ - от гена *dwarf*. По результатам анализа расщепления F_2 : Мо755 x Moneymaker можно построить генетическую карту исследуемых генов (рис. 1).

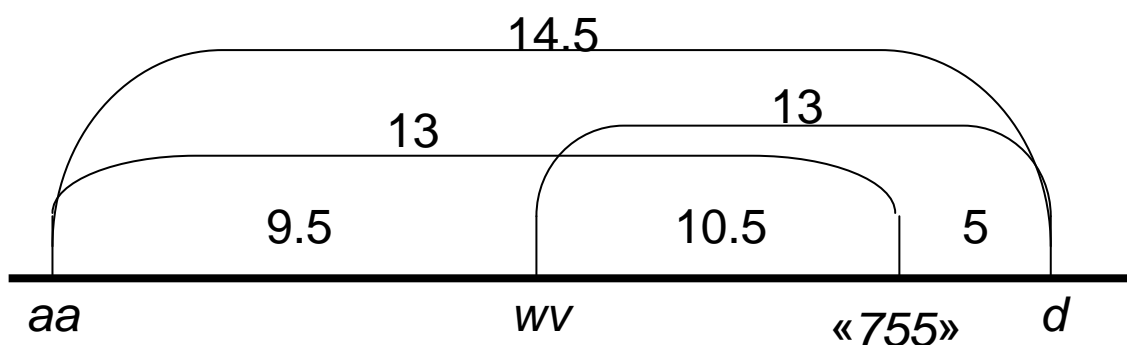


Рисунок 1. Взаимное расположение генов *aa*, *wv*, *d*, «755» томата по результатам анализа расщепления F_2 : Мо755 x Moneymaker.

Таким образом, ген, отвечающий за развитие листа типа «755», находится во второй хромосоме. Наблюдаемое отличие относительного расположения генов *aa*, *d*, *wv* от указанного в традиционных генетических картах может объясняться

инверсией у исходной формы участка хромосомы II, содержащего гены *aa* и *wv* относительно участка, содержащего ген *d*. Границы перемещенного участка неизвестны, что делает невозможным определение локуса гена «755» в нормальной хромосоме томата.

1.5.2.2. Анализ наследования маркерных признаков в комбинации

Mo 755 x LA 0715

Таблица 12.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации

Mo 755 x LA 0715(*Me*/+)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | | ожидаемое отношение | | χ^2 факт | | χ^2 теор 0.05 |
|----------------------|---------------|---------------------|----------------------|-------|---------------------|----|---------------|-------|--------------------|
| антоциан | наличие | 653 | 662,25 | | 3 | | 0,517 | | 3,84 |
| | отсутствие | 230 | 220,75 | | 1 | | | | |
| окраска точки роста | зеленая | 676 | 662,25 | | 3 | | 1,142 | | 3,84 |
| | желтая | 207 | 220,25 | | 1 | | | | |
| тип роста | нормальный | 671 | 662,25 | | 3 | | 0,462 | | 3,84 |
| | карлик | 212 | 220,25 | | 1 | | | | |
| тип листа | дикий | 97 | 165,6 | 165,6 | 3 | 3 | 135,31 | 99,93 | 5,71 |
| | тип 755 | 118 | 220,8 | 55,2 | 4 | 1 | | | |
| | мышинные ушки | 668 | 496,7 | 662,3 | 9 | 12 | | | |
| проанализировано, шт | | 883 | | | | | | | |
| всхожесть, % | | 92 | | | | | | | |

В данной комбинации скрещивания признаки наличия антоциана, окраски точки роста и типу роста наследуются моногенно, т.к. во втором поколении наблюдается расщепление 3:1. По типу листа наблюдается сцепленное наследование неаллельных генов, контролирующих развитие типов листа «755» и *Me*. Данные расщеплений и результаты анализа приведены в таблицах 13 – 19 и приложении 2.

Таблица 13.

Анализ расщепления F₂ Мо 755 x LA0715 (Me)
по проявлению антоциана и окраске точки роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>aa</i> - <i>wv</i> | антоциан, зеленый | 632 | 496,7 | 562,41 | 7,81 | гены сцеплены | 8,2 | 7,5 | 630,4 | 5,74 |
| | антоциан, желтый | 23 | 165,6 | | | | | | 31,9 | |
| | б/а, зеленый | 42 | 165,6 | | | | | | 31,9 | |
| | б/а, желтый | 186 | 55,2 | | | | | | 188,9 | |

Вычисленное расстояние между генами *aa* и *wv* 7,5 сМ. Полученные данные согласуются с результатами предыдущей комбинации скрещиваний (Мо 755 x Moneymaker).

Таблица 14

Анализ расщепления F₂ Мо 755 x LA0715 (Me)
по наличию антоциана и типу роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>aa</i> - <i>d</i> | антоциан, высокий | 571 | 496,7 | 180,67 | 7,81 | гены сцеплены | 23,3 | 23,5 | 572,4 | 1,63 |
| | антоциан, карлик | 82 | 165,6 | | | | | | 89,9 | |
| | б/а, высокий | 100 | 165,6 | | | | | | 89,9 | |
| | б/а, карлик | 130 | 55,2 | | | | | | 130,9 | |

Полученное расстояние между генами *aa* и *d* (23.5 сМ) лучше соответствует литературным данным (20 сМ) [4], чем вычисленное по данным скрещивания Мо 755 x Moneymaker.

Таблица 15.

Анализ расщепления F_2 : Мо 755 x LA0715 (*Me*)
окраске точки роста и типу роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | √ | МП | | |
| <i>wv</i> - <i>d</i> | зеленый, высокий | 583 | 165,6 | 141,28 | 7,84 | гены сцеплены | 28,1 | 25,0 | 565,7 | 1,63 |
| | зеленый, карлик | 93 | 55,2 | | | | | | 96,6 | |
| | желтый, высокий | 93 | 496,7 | | | | | | 96,6 | |
| | желтый, карлик | 114 | 165,6 | | | | | | 124,2 | |

Вычисленное расстояние между генами *wv* и *d* 25.0 сМ. Полученные результаты близки к литературным данным [4].

Таблица 16.

Анализ расщепления F_2 : Мо 755 x LA0715 (*Me*) по типу листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-------------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------------------|---------------|
| | | | | | | | √ | | |
| <i>Me</i> - «755» | дикий | 96 | 220,75 | 233,40 | 5,71 | гены сцеплены | 26,9 | 102,8 | 0,52 |
| | тип «755» | 118 | 220,75 | | | | | 118,0 | |
| | тип <i>Me</i> | 669 | 441,5 | | | | | 662,3 | |

Результаты анализа показывают сцепление генов *Mouse ear* и «755», они находятся на расстоянии 26,9 сМ. Рассчитать частоту кроссинговера по методу произведений не представлялось возможным из-за единого фенотипического проявления всех генотипов, несущих аллель *Me*, как содержащих, так и не содержащих мутантный аллель «755».

Таблица 17.

Анализ расщепления F_2 : Мо 755 x LA0715 (*Me*)
по типу листа и проявлению антоциана

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>Me</i> - <i>aa</i> | дикий, антоциан | 19 | 165,6 | 624,87 | 7,81 | гены сцеплены | 5,6 | 6,0 | 25,7 | 5,12 |
| | дикий, б/а | 195 | 55,2 | | | | | | 195,1 | |
| | тип <i>Me</i> , антоциан | 634 | 496,7 | | | | | | 636,6 | |
| | тип <i>Me</i> , б/а | 35 | 165,6 | | | | | | 25,7 | |

Вычисленное расстояние между генами *Me* и *aa* равно 6 сМ, по литературным данным – 2 сМ [4, 34].

Таблица 18.

Анализ расщепления F_2 : Мо 755 x LA0715 (*Me*)
окраске точки роста и типу листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>Me</i> - <i>wv</i> | дикий, зеленый | 18 | 165,6 | 687,49 | 7,81 | гены сцеплены | 5,6 | 4,5 | 19,4 | 4,25 |
| | дикий, желтый | 196 | 55,2 | | | | | | 201,3 | |
| | <i>Me</i> , зеленый | 658 | 496,7 | | | | | | 642,8 | |
| | <i>Me</i> , желтый | 11 | 165,6 | | | | | | 19,4 | |

По полученным данным, гены *Me* и *wv* находятся на расстоянии 4.5 сМ; по литературным данным – 7 сМ [4, 34].

Таблица 19.

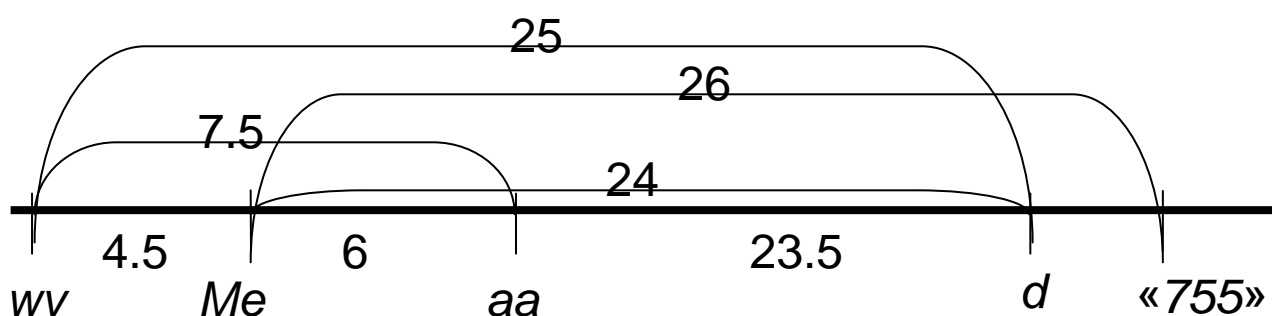
Анализ расщепления F₂ : Мо 755 x LA0715 (*Me*)
по окраске точки роста и типу роста

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>Me</i> - <i>d</i> | дикий, высокий | 92 | 165,6 | 161,70 | 7,81 | гены сцеплены | 25,7 | 24,0 | 93,2 | 0,54 |
| | дикий, карлик | 122 | 55,2 | | | | | | 127,5 | |
| | <i>Me</i> , высокий | 579 | 496,7 | | | | | | 569,0 | |
| | <i>Me</i> , карлик | 90 | 165,6 | | | | | | 93,2 | |

Вычисленное расстояние между генами *Me* и *d* 24,0 сМ. Результаты близки к литературным данным [4, 34].

Таким образом, показано, что гены *Me* и «755» неаллельны и находятся в одной группе сцепления. Определены расстояния между геном *Me*, геном «755» и маркерными генами: *Me*–«755» - 26,9 сМ, *Me*–*aa* – 6 сМ, *Me*–*wv* – 4,5 сМ, *Me*–*d* – 24 сМ, *aa*–*wv* – 7.5 сМ, *aa*–*d* – 23,5 сМ, *wv*–*d* – 25 сМ.

По результатам анализа расщепления F₂ : Мо 755 x LA 0715 (*Me*) можно построить генетическую карту исследуемых генов (рис. 2). Рисунок 2. Взаимное расположение генов *aa*, *wv*, *d*, «755», *Me* томата по результатам анализа расщепления F₂ Мо 755 x LA0715 (*Me*).



По результатам гибридологического анализа F₂ скрещивания Мо 755 x LA 0715 можно сделать следующие выводы. Взаимное расположение генов *Me*, *wv*, *aa*, *d* соответствует литературным данным [4, 34]. Положение гена «755» относительно

маркерных генов определить сложно из-за использования при расчете расстояния между генами «755» и *Me* только метода извлечения квадратного корня из доли двойных рецессивов, а также невозможности идентификации генотипов, содержащих аллель «755».

Анализ расщепления растений, имевших в первом поколении лист дикого типа, показал менделевское наследование маркерных признаков в расщеплении популяции второго поколения (табл.20).

Таблица 20.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации

Mo 755 x LA 0715 (+/+)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | ожидаемое отношение | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 |
|----------------------|------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------|--------------------|
| антоциан | наличие | 218 | 229,5 | 3 | 1,76 | 3.84 |
| | отсутствие | 86 | 87,5 | 1 | | |
| окраска точки роста | зеленая | 225 | 229,5 | 3 | 0,35 | 3.84 |
| | желтая | 81 | 87,5 | 1 | | |
| тип роста | нормальный | 225 | 229,5 | 3 | 0,35 | 3.84 |
| | карлик | 81 | 87,5 | 1 | | |
| тип листа | дикий | 237 | 229,5 | 3 | 0,98 | 3.84 |
| | тип 755 | 69 | 87,5 | 1 | | |
| Проанализировано, шт | | 306 | | | | |
| всхожесть, % | | 80 | | | | |

Данные расщеплений и результаты анализа представлены в таблицах 21 - 26 и приложении 2.

Таблица 21

Анализ расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+) по признакам типа роста и типа листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-----------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|--|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | | | |
| <i>aa</i> - <i>wv</i> | антоциан, зеленый | 211 | 171 | 296,16 | 7,81 | гены сцеплены | 2,2 | | 224,72 | 33,28 |
| | антоциан, желтый | 0 | 57 | | | | | | 3,3 | |
| | б/а, зеленый | 13 | 57 | | | | | | 3,3 | |
| | б/а, желтый | 80 | 19 | | | | | | 72,7 | |

Полученные методом извлечения квадратного корня из двойного рецессива результаты статистически недостоверны. Вероятно, это объясняется гибелью растений части фенотипических классов. Метод произведений неприменим в данном случае из-за отсутствия растений одного фенотипического класса.

Таблица 22.

Анализ расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+) по признакам типа роста и проявления антоциана

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>aa</i> - <i>d</i> | антоциан, высокий | 199 | 171 | 190,80 | 7,81 | гены сцеплены | 5 | 12 | 210,9 | 6,70 |
| | антоциан, карлик | 12 | 57 | | | | | | 17,2 | |
| | б/а, высокий | 24 | 57 | | | | | | 17,2 | |
| | б/а, карлик | 69 | 19 | | | | | | 58,9 | |

Полученное расстояние между генами *aa* и *d* равно 12 сМ, что не соответствует литературным данным (20 сМ) [4], зато близко к результатам по скрещиванию Mo 755 x Moneymaker (14.5 сМ).

Таблица 23.

Анализ расщепления F₂: Мо755 x La 0715 (+/+)
по признакам типа роста и типа листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|----------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| <i>ww</i> - <i>d</i> | зеленый, высокий | 203 | 171 | 190,80 | 7,81 | гены сцеплены | 11,3 | 14,0 | 208,2 | 0,46 |
| | зеленый, карлик | 21 | 57 | | | | | | 19,8 | |
| | желтый, высокий | 20 | 57 | | | | | | 19,8 | |
| | желтый, карлик | 60 | 19 | | | | | | 56,2 | |

Вычисленное на основании эксперимента расстояние между генами *ww* и *d* (14 сМ) не согласуется с данными генетической карты томата [4], но близко к полученному в скрещивании Мо 755 x Moneymaker (13 сМ).

Таблица 24.

Анализ расщепления F₂: Мо755 x La 0715 (+/+)
по признакам окраски точки роста и тип листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|------|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| «755» - <i>ww</i> | дикий, зеленый | 208 | 171 | 109,57 | 7,81 | гены сцеплены | 17,6 | 15,5 | 205,6 | 3,31 |
| | дикий, желтый | 28 | 57 | | | | | | 22,4 | |
| | тип 755, зеленый | 16 | 57 | | | | | | 22,4 | |
| | тип 755, желтый | 52 | 19 | | | | | | 53,6 | |

Расстояние между генами «755» и *ww* составляет 15,5 сМ.

Таблица 25.

Анализ расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+)
по признакам типа роста и типа листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| «755» - <i>d</i> | дикий, высокий | 217 | 171 | 109,57 | 7,81 | гены сцеплены | 10,0 | 7,5 | 217,0 | 8,27 |
| | дикий, карлик | 19 | 57 | | | | | | 11,0 | |
| | тип 755, высокий | 6 | 57 | | | | | | 11,0 | |
| | тип 755, карлик | 62 | 19 | | | | | | 65,0 | |

Вычисленное по методу произведений расстояние между генами «755» и *d* (7,5 сМ) не проходит проверку по критерию χ^2 , но результат, вычисленный методом извлечения квадратного корня из двойного рецессива (10 сМ) статистически достоверен ($\chi^2_{\text{факт}}=6,43$).

Таблица 26.

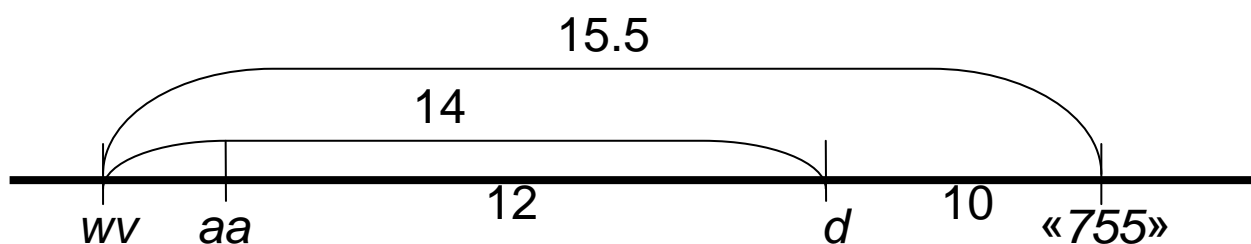
Анализ расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+)
по признакам проявление антоциана и тип листа

| гены | фенотип | кол-во растений | ожидаемое кол-во | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 | вывод | частота кроссинговера, % | | ожидаемое кол-во | χ^2 факт |
|-------------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------------|----|------------------|---------------|
| | | | | | | | $\sqrt{\quad}$ | МП | | |
| «755» - <i>aa</i> | дикий, антоциан | 202 | 171 | 227,39 | 7,81 | гены сцеплены | 12 | 13 | 209,5 | 18,21 |
| | дикий, б/а | 34 | 57 | | | | | | 18,5 | |
| | тип 755 антоциан | 9 | 57 | | | | | | 18,5 | |
| | тип 755, б/а | 59 | 19 | | | | | | 57,5 | |

Полученные результаты не подтверждаются статистически.

По результатам анализа расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+) можно построить генетическую карту (схема 3).

Схема 3. Взаимное расположение генов *aa*, *wv*, *d*, «755» томата по результатам анализа расщепления F₂: Mo755 x La 0715 (+/+)



Однозначно определить положение гена *aa* относительно остальных не удалось, однако, можно предположить, что взаимное расположение генов аналогично определенному по скрещиванию Mo755 x LA0715(Me) и соответствует литературным данным [4]

1.5.2.3. Анализ наследования маркерных признаков в комбинации Mo 755 x Mo 319

Таблица 27.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации

Mo 755 x Mo 319 (*La*/+)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | | ожидаемое отношение | | χ^2 факт | | χ^2 теор 0.05 |
|----------------------|------------|---------------------|----------------------|------|---------------------|---|---------------|-------|--------------------|
| антоциан | наличие | 225 | 264 | | 3 | | 23.05 | | 5,71 |
| | отсутствие | 127 | 88 | | 1 | | | | |
| окраска точки роста | зеленая | 267 | 264 | | 3 | | 0,14 | | 5,71 |
| | желтая | 85 | 88 | | 1 | | | | |
| тип роста | нормальный | 161 | 264 | | 3 | | 160.74 | | 5,71 |
| | карлик | 191 | 88 | | 1 | | | | |
| тип листа | дикий | 82 | 88.5 | 88.5 | 3 | 3 | 22.21 | 24.05 | 5,71 |
| | тип «755» | 51 | 29.5 | 88.5 | 1 | 3 | | | |
| | ланцетный | 219 | 236 | 177 | 8 | 6 | | | |
| проанализировано, шт | | 352 | | | | | | | |
| всхожесть, % | | 53 | | | | | | | |

Отличие фактического распределения от ожидаемого по всем признакам, кроме окраски точки роста может объясняться недостоверностью выборки из-за высокой гибели растений (отчасти она обусловлена гибелью гомозигот по аллелю *La*). Возможно, признаки типа роста и проявления антоциана наследуются не моногенно. Распределение по типу листа (дикий : «755» : ланцетный = 3 : 1.5 : 7,5), промежуточное между 3:1:8 и 3:3:6, позволяет выдвинуть гипотезу, что у растений

с генотипом *La/+ «755»/«755»* могут образовываться как листья типа «755», так и ланцетные (в пределах растения единообразие по типу листа сохраняется). В то же время возможно это обусловлено действием дополнительных генов – модификаторов.

Таблица 28.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации
Mo 755 x Mo 319 (+/+)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | ожидаемое отношение | χ^2 практ | χ^2 теор 0,05 |
|----------------------|------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| окраска точки роста | зеленая | 572 | 554,3 | 3 | 2,27 | 5,71 |
| | желтая | 167 | 184,8 | 1 | | |
| тип роста | нормальный | 432 | 415,67 | 9 | 1,46 | 5,71 |
| | карлик | 307 | 323,3 | 7 | | |
| тип листа | дикий | 439 | 415,7 | 9 | 2,99 | 5,71 |
| | тип «755» | 300 | 323,3 | 7 | | |
| Проанализировано, шт | | 739 | | | | |
| всхожесть, % | | 69,4 | | | | |

В данной комбинации скрещивания не учитывался признак наличия антоциана, так как анализ растений проводился на стадии 10-11 настоящих листьев и признак был плохо проявлялся. По окраске точки роста расщепление 3:1, наследование признака моногенное. По типу роста и типу листа наблюдается расщепление 9:7, что соответствует расщеплению при дигенном наследовании. Можно предположить, что существуют два гена d_1 и d_2 , рецессивная гомозигота по любому из них имеет карликовый рост. Аналогична гипотеза о двух генах «755»₁ и «755»₂, причем рецессивная гомозигота по любому из этих генов имеет «755» тип листа. Предполагается, что в данном случае произошла дупликация участка, несущего гены d и «755».

1.5.2.4. Анализ наследования маркерных признаков в комбинации

Mo 755 x Mo 556

Таблица 29.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации Mo 755 x Mo 556 (*tp*)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | ожидаемое отношение | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 |
|----------------------|-----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------|--------------------|
| тип листа | дикий | 75 | 79,86 | 9 | 1,02 | 5,77 |
| | «755» | 31 | 26,63 | 3 | | |
| | <i>tp</i> | 36 | 35,50 | 4 | | |
| Проанализировано, шт | | 142 | | | | |
| всхожесть, % | | 65 | | | | |

1.5.2.5. Анализ наследования маркерных признаков в комбинации

Mo 755 x LA 0784

Таблица 30.

Гибридологический анализ наследования признаков в комбинации Mo 755 x LA 0784 (*e*)

| признак | | количество растений | ожидаемое количество | ожидаемое отношение | χ^2 факт | χ^2 теор 0.05 |
|----------------------|----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------|--------------------|
| тип листа | дикий | 111 | 117 | 9 | 1,00 | 5,77 |
| | «755» | 58 | 52 | 4 | | |
| | <i>e</i> | 39 | 39 | 3 | | |
| Проанализировано, шт | | 208 | | | | |
| всхожесть, % | | 55 | | | | |

В комбинациях скрещивания Mo 755 x Mo 556 и Mo 755 x LA 0784 растения анализировали только по типу листа, т.к. подсчет растений F₂ проводили на стадии 10-11 настоящих листьев и признаки наличия антоциана, окраски точки роста и типа роста проявлялись нечетко. По типу листа в обеих комбинациях наблюдается расщепление 9:3:4, т.е. в скрещивании Mo 755 x Mo 556 растения с генотипом «755»/«755» *tp/tp* имели тип листа *tripinate*, а в скрещивании Mo 755 x LA 0784 растения с генотипом «755»/«755» *e/e* имели тип листа «755». Таким образом, в данных комбинациях скрещивания у всех растений второго поколения проявлялся тип листа одной из исходных форм. Новых типов листа при взаимодействии мутантных аллелей не обнаружено. Наблюдаемое взаимодействие генов называется рецессивный эпистаз [7].

1.5.2.6. Создание коллекции и получение новых маркерных форм

Из расщепления F₂ были отобраны ценные формы томата, несущие по несколько маркерных генов (табл. 38).

Таблица 31.

Формы томата, отобранные из F₂

| гены | <i>wv</i> | <i>aa</i> | <i>d</i> |
|-----------|-----------|-----------|----------|
| <i>Me</i> | + | + | + |
| | + | + | - |
| | - | + | + |
| <i>La</i> | + | + | + |
| | + | - | + |
| | - | + | + |
| | + | + | - |

Некоторые из отобранных форм обладают декоративной ценностью. Формы с мутацией *La* несут маркерные гены во II и VII хромосомах.

Кроме того, в Центре генетических ресурсов томата было получено 50 форм томата с мутациями, влияющими на тип листа. По итогам изучения проявления признаков листа были отобраны 20 форм с наиболее четким фенотипическим проявлением мутаций. Среди них проводятся скрещивания по полной диаллельной схеме с целью изучения взаимодействия исследуемых генов.

6. Выводы

В результате проведенного генетического анализа F_1 и F_2 в 5 комбинациях скрещиваний показано, что признаки карликового роста и «755» типа листа у исходной материнской формы Мо 755 обуславливаются двумя различными неаллельными генами (d и «755»), расположенными во второй хромосоме. Аллели, приводящие к развитию карликового роста и «755» типа листа, являются рецессивными. На исследованном участке второй хромосомы, несущем гены aa , wv , Me , d , «755» возможны хромосомные перестройки в виде инверсии и дупликации - по сравнению с генетической картой томата.

Наличие у гибридов F_1 в комбинациях скрещиваний Мо 755 x LA 0715 (Me) и Мо 755 x Мо 319 (La) расщепления по типу листа (дикий и сильнорассеченный) указывает на гетерозиготность исходных отцовских форм.

По итогам анализа расщепления в комбинации скрещивания Мо 755 x Moneumaker установлено взаимное расположение маркерных генов aa , wv , d , «755» и построены схематичные генетические карты фрагмента второй хромосомы.

В скрещивании Мо 755 x LA 0715 последовательность генов соответствовала литературным данным, а результаты анализа F_2 : Мо 755 x Moneumaker позволяют предположить наличие инверсии участка хромосомы, несущего гены aa и wv .

У гибридов второго поколения комбинации скрещивания Мо 755 x Мо 319 (+/+) наблюдаются расщепления по типу роста и типу листа 9:7, характерные для дигенного наследования, что позволяет выдвинуть гипотезу о дупликации участка II хромосомы с генами d и «755».

У гибридов второго поколения в комбинациях скрещиваний Мо 755 x Мо 556 и Мо 755 x LA 0784 отмечено взаимодействие генов, ответственных за форму листа по типу рецессивного эпистаза. При взаимодействии мутантного аллеля «755» с другими генами, отвечающими за тип листа (Me , e , tp), новых по сравнению с исходными формами типов листа не выявлено.

Создана коллекция форм томатов, различающихся по типу листа. В нее вошли формы, имевшиеся на кафедре, материал, полученный из Центра генетических ресурсов томата, и выделенные из расщепляющихся популяций второго поколения растения, несущие новые сочетания маркерных признаков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) ; Андреев «Овощеводство»
- 2) Андреева И.И., Родман Л.С. Ботаника. М., Колос, 1999
- 3) Билич Г.Л., Крыжановский В.А. Биология. Полный курс. Том 2. Ботаника. М., ООО «Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2002
- 4) Бочарникова Н.И., Козлова В.М. Мутантные формы томатов. Кишинев, Штииница, 1992;
- 5) Гилберт С. Биология развития (в трех томах). М., Мир, 1994
- 6) Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск, Сибирское университетское издательство, 2002
- 7) Жученко А.А., Генетика томата, Кишинев, Штииница, 1973
- 8) Калошин А.И. Охрана труда. М., ВО «Агропромиздат», 1991
- 9) Куземенский А.В., Неаллельное взаимодействие мутантных генов томата, Цитология и генетика, 2002, №1, с. 32-39
- 10) Куземенский А.В. Формирование разнообразия культурных форм томата и принципы его классификации, Цитология и генетика, 2003, №1, с.73-79
- 11) Лутова А.А., Прохоров Н.А., Тиходеев О.Н. и др; под ред. Инге-Вечтомова С.Г. Генетика развития растений. СПб, Наука, 2000;
- 12) Орлова Н.Н. Генетический анализ, М., МГУ, 1991;
- 13) Прохоров И.А., Крючков А.В., Комиссаров В.А. Селекция и семеноводство овощных культур. М., Колос, 1997
- 14) Прохоров И.А., Потапов С.П. Практикум по селекции и семеноводству овощных и плодовых культур. М., ВО «Агропромиздат», 1988
- 15) Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. М., Мир, 1990
- 16) Третьяков Н.Н., Кошкин Е.И., Макрушин Н.М. и др., под ред. Третьякова Н.Н. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений. М., Колос, 2000
- 17) Хотылева Л.В., Никоро З.С., Драгавцев В.А. Теория отбора в популяциях растений. Новосибирск, Наука, 1976
- 18) Avivi Y. et all. *Clausa*, a Tomato Mutant with a Wide Range of Phenotypic Perturbations, Displays a Cell Type-Dependent Expression of the Homeobox Gene *LeT6/TKn21*. *Plant Physiol*, October 2000, Vol. 124, pp. 541-552

- 19) Bharathan G., Sinha N. The Regulation of Compound Leaf Development, *Plant Physiol*, December 2001, Vol. 127, pp. 1533-1538
- 20) Chandra Shekar K.N., Sawney V.K. Regulation of the fusion of floral organs by temperature and gibberelic acid in the normal and solanifolia mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Can. J. Bot.* 68: 713-718, 1998
- 21) Chandra Shekar K.N., Sawney V.K. Leaf development of normal solanifolia mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Am. Bot. J.*, 77: 46-53, 1990
- 22) Coleman W.K., Greyson R.I. The growth and development of leaf in tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Can. J. Bot.* 54: 2704-2717, 1976
- 23) Dengler N.G. Comparison of leaf development in normal (+/+), entire (e/e) and *Lanceolate* (La/+) plants of tomato, *Lycopersicon esculentum*, 'Ailsa Craig'. *Bot. Gaz.* 145: 66-77, 1984
- 24) Goliber T.E., Kessler S.A., Chen J.J., Bharatan G., Sinha N., Genetic, molecular, and morphological analysis of compound leaf development. *Curr. Topics Dev. Biol.* 41: 259-290, 1998
- 25) Hareven D. et al. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 1996 Mar 8;84(5):735-44
- 26) Janssen B.-J., Lund L., Sinha N. Overexpression of a Homeobox Gene, *LeT6*, Reveals Indeterminate Features in the Tomato Compound Leaf. *Plant Physiol.* 117: 771-786, 1998
- 27) Janssen B.-J., Williams A., Chen J.J., Mathern J., Hake S., Sinha N. Isolation and characterization of two knotted-like homeobox genes from tomato. *Plant Mol. Biol.* 36: 417-425
- 28) Kessler Sh. et al. Mutations altering leaf morphology in tomato. *Int. J. Plant Sci.* 162(3):475-492. 2001
- 29) Parnis A., Cohen O., Gutfinger T., Hareven D., Zamir D., Lifshits E. The dominant developmental mutation of tomato, *Mouse ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcription regulated of a *Knotted* gene. *Plant Cell* 9: 2143-2158, 1997
- 30) Sinha N. Leaf development of angiospernes. *Plant. Mol. Biol.* 50: 419-446, 1999

- 31) Sinha N., Williams A., Hake S. Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, cause a switch from determinate and indeterminate cell fates. *Genes Dev.* 7: 787-795, 1993
- 32) Stettker R.F. Dosage effect of the *lanceolate* gene of tomato. *Am. Bot. J.* 51: 253-264
- 33) База данных Центра генетических ресурсов томата (TGRC) – <http://www.tgrc.ucdavis.edu>.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Часть I. Литературный обзор | 2 |
| 1. Происхождение и классификация форм томата культурного <i>Lycopersicon esculentum</i> | 2 |
| 1.1. Происхождение и классификация томата | |
| 1.2. Морфологические особенности томата | 3 |
| 1.3. Томат как модельный объект в научных исследованиях | 6 |
| 2. Некоторые аспекты онтогенеза растений | 8 |
| 2.1. Введение | 8 |
| 2.2. Особенности растения как живого организма и способы регуляции его развития | 8 |
| 2.3. Строение побега и побеговых апикальных меристем растения | 10 |
| 2.4. Морфология листа высших растений | 11 |
| 2.5. Этапы развития листа | 13 |
| 2.6. Влияние фитогормонов на онтогенез растения | 15 |
| 3. Влияние отдельных генов на морфогенез листа томата | 16 |
| 3.1. Актуальность исследования развития листа | 16 |
| 3.2. Способы и методы исследования развития листа | 17 |
| 2.2.1. <i>KNOX</i> – гены. Их строение и регуляция | 17 |
| 3.2.2. Влияние мутации <i>clausa</i> на экспрессию гомеобокс-гена <i>LeTb</i> у томата | 18 |
| 3.2.3. Различные гены, влияющие на рассеченность листа томата | 22 |
| 3.2.4. Действие <i>Kn 1</i> на форму листа томата и взаимодействие его с другими | 23 |
| Часть II. Экспериментальная часть | 27 |
| 1. Цель работы | 27 |
| 2. Задачи работы | 27 |
| 3. Материал | 28 |
| 4. Методы | 29 |
| 5. Результаты | 30 |
| 6. Выводы | 49 |
| Список литературы | 51 |
| Содержание | 53 |
| Приложения | |