

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ОСОБЕННОСТИ ОПУШЕНИЯ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ У РАСТЕНИЙ СЕВЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *ARABIDOPSIS LYRATA* SUBSP. *PETRAEA* И *ARABIDOPSIS THALIANA*

Т. С. Николаевская, О. М. Федоренко

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показано существенное различие между двумя видами рода *Arabidopsis* по характеру опушения розеточного листа растений северных популяций. В популяции *A. l. petraea* опушение листа отсутствует, что вызвано мутацией регуляторного гена *GLABROUS1*. У растений популяций *A. thaliana* на адаксиальной эпидерме листа встречалось три типа трихом: простые (однолучевые); вильчатые (двухлучевые) и трехлучевые. Внутрипопуляционные различия выявлены по частоте трех типов трихом, межпопуляционные – только по частоте вильчатых трихом. Высокий уровень полиморфизма, особенности генетического разнообразия и распределения трихом на эпидерме и ее зонах характеризуют различия естественных континентальной и островных популяций. Установленные различия связаны с генетическими факторами и влиянием условий произрастания на формирование популяций *Arabidopsis*, находящихся на окраине ареала вида.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, трихомы, морфология, генетическое разнообразие, северные популяции.

T. S. Nikolaevskaya, O. M. Fedorenko. THE LEAF TRICHOME MORPHOLOGY FEATURES OF TWO *ARABIDOPSIS* PLANTS (*A. LYRATA* SSP. *PETRAEA* AND *A. THALIANA*) IN NORTHERN POPULATIONS

The main distinction between two species of *Arabidopsis* in leaf trichome production of plants in northern populations is shown. The lack of leaf trichomes in the *A. l. petraea* population is caused by a mutation in the regulatory gene *GLABROUS1*. Plants of *A. thaliana* populations had three types of trichomes on the adaxial epidermis: unbranched, two branched and three branched. Within-population differences concerned the frequency of each of the three trichome types, but interpopulation differences – only the frequency of two branched trichomes. The high level of polymorphism, peculiarities of the genetic diversity and trichome distribution across the epidermis and its zones characterize the distinctions between the natural continental and insular populations. The established distinctions are connected with genetic factors and the environmental conditions that influence *Arabidopsis* populations structure at the northern limit of the species range.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, trichome, morphology, genetic diversity, northern populations.

Введение

Клетки эпидермы многих растений образуют различные наружные выросты, так называемые трихомы, или волоски, которые встречаются на всех частях цветковых растений и могут быть как долговечными, так и эфемерными [Атлас..., 1980; Тутаяк, 1980]. Морфология трихом разнообразна: встречаются одноклеточные и многоклеточные волоски, ветвистые и простые, одревесневшие и живые – физиологически активные. Размеры кроющих и железистых волосков варьируют в значительных пределах: от нескольких микронов до нескольких сантиметров. Трихомы типичны для определенных видов, родов и семейств, они широко используются как диагностический показатель, в связи с чем признаку опушения придается самое существенное значение в таксономии семейства *Brassicaceae* и отмечается значительный внутривидовой полиморфизм [Beilstein et al., 2006]. Биологическое значение трихом, функции и адаптивная ценность неоднозначны. В частности, у растений семейства

Brassicaceae трихомы служат органами, поглощающими и испаряющими воду, отражающими свет на поверхности листа или препятствующими повреждению насекомыми; их филогения хорошо изучена [O’Kane, Al-Shehbaz, 2003; Beilstein et al., 2006].

Трихомы рода *Arabidopsis* относятся к типу кроющих волосков и представляют собой одноклеточные, редко многоклеточные выросты эпидермальных полиплоидных клеток [Haughn, Somerville, 1988; Marks, 1997; Schwab et al., 2000]. Они встречаются практически на всех органах растений. Как и у большинства *Brassicaceae*, трихомы *Arabidopsis* – это разветвленные или одностебельчатые клетки с утолщенной клеточной стенкой и папиллярной кутикулой (рис. 1). Основание трихомной клетки окружено одним слоем клеток, отличающихся от других эпидермальных клеток прямоугольной формой. Трихомы рано дифференцируются из отдельных протодермальных клеток в процессе развития эпидермы листьев и стеблей видов рода *Arabidopsis* и размещаются на адаксиальной, реже абак-

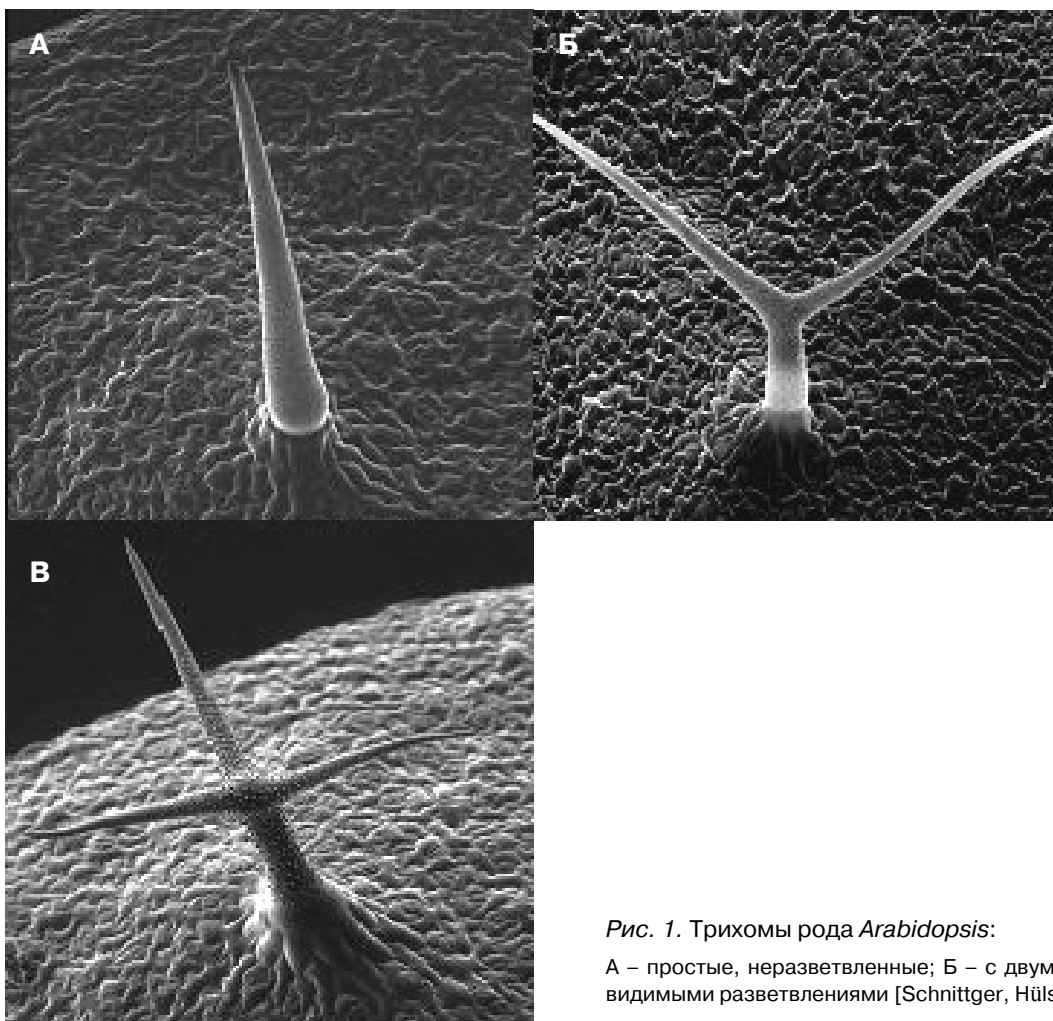


Рис. 1. Трихомы рода *Arabidopsis*:

А – простые, неразветвленные; Б – с двумя и В – с тремя видимыми разветвлениями [Schnittger, Hülskamp, 2002]

сиальной поверхностях листовой пластинки или локализируются по ее краю и в центре вдоль жилок [Larkin et al., 1996].

Изучение генетического контроля инициирования и развития трихом *Arabidopsis* позволило выделить шесть групп генов: *GLABRA1 (GL1)*, *AtMYB23*, *GLABRA2 (GL2)*, *GLABRA3 (GL3)*, *ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)* и *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* [Larkin et al., 1993; Payne et al., 2000; Kirik et al., 2001; Ohashi et al., 2002]. Многие из этих генов также вовлечены в развитие волосков корня.

Гены *GL1* и *AtMYB23* – регуляторные, кодируют факторы транскрипции *R2R3-MYB*-типа. Результат мутаций в *GL1* – отсутствие трихом на поверхности листа, но они не затрагивают развитие волосков корня [Larkin et al., 1993]. Ген *AtMYB23* функционально с *GL1* регулирует развитие трихом на краях листа. Потеря функции *AtMYB23* также приводит к дефектам в морфогенезе трихом [Perazza et al., 1999; Kirik et al., 2001]. Кивимяки с соавторами [Kivimäki et al., 2007] показали, что мутации в начале третьего экзона гена *GL1* (по крайней мере до позиции 96 нуклеотида) у растений *A. lyrata* шведских и норвежских популяций приводят к отсутствию трихом. Такие растения без опушения больше повреждаются травоядными насекомыми по сравнению с особями, продуцирующими трихомы. Результаты изучения кодирующей области *GL1* позволили авторам предположить, что независимые мутации в этом регуляторном гене обеспечивают основы для параллельной эволюции снижения устойчивости к травоядным насекомым в различных популяциях *A. l. petraea* и у родственного ему вида *A. thaliana*. Подобный полиморфизм авторы рассматривают как адаптивную реакцию организмов, возникшую в ходе эволюции вида дивергентным путем.

Ген *GL2* также кодирует фактор транскрипции и необходим для нормального морфогенеза трихом. Он регулирует распределение трихом по поверхности листа у растений рода *Arabidopsis*. Мутации в этом локусе приводят к неправильному размещению и развитию трихом, при котором большинство трихом не разветвляется и имеет единственную ветвь [Rerie et al., 1994; Szymanski et al., 1998]. Гибридизация *in situ* показала, что ген *GL2* экспрессируется в трихомах прародительских клеток и определяет процесс их формирования [Gao et al., 2008].

Мутации в *GL3* имеют малое влияние на инициирование трихом и сильное влияние на их разветвление, размер клетки [Payne et al., 2000; Szymanski, 2001; Gao et al., 2008]. Ген

EGL3 функционально связан с *GL3*. Мутации в *EGL3* уменьшают число трихом и их разветвление, а мутанты *gl3*, *egl3* проявляют фенотип с гладким листом [Oppenheimer et al., 1997]. Были идентифицированы также мутации, которые разрушительно влияют на инициирование трихом, их развитие, расположение, плотность и морфологию.

В целом выделено более 15 генов, вовлеченных в регулирование разветвлений трихом. Форма ветвления у *Arabidopsis* наследуется как полигенный признак с относительно низкой наследуемостью из-за неаддитивности взаимодействия генов и сильного влияния средовой компоненты [Oppenheimer et al., 1997]. Клонирование *ZWICHEL (ZWI)*, *ANGUSTIFOLIA (AN)* и *STICHEL (STI)* генов указывает, что в формировании разветвлений большую роль играют микроканальцы цитоскелета, связанные с регуляцией клеточных делений [Schnittger, Hülskamp, 2002]. Современные гипотезы о контроле клеточного морфогенеза утверждают, что рост клеток находится в прямой связи с протеином цитоскелета и биосинтезом микрофибрилл клеточной стенки [Oppenheimer et al., 1997; Szymanski, 2001; Pesch, Hülskamp, 2011]. Возможно, что продукт локуса, контролирующего морфологию трихом, является компонентом цитоскелета. Например, *DIS1* и *DIS2* могут кодировать специфику микротрубочек, которые синтезируются в клетках трихом. Последний аспект подтверждается идентификацией сямского мутанта *Arabidopsis* с многоклеточными трихомами [Haughn, Somerville, 1988].

Необходимо отметить, что, несмотря на подробно изученную генную регуляцию морфогенеза трихом у *Arabidopsis*, вопросы популяционной изменчивости признака у естественно произрастающих растений северных популяций затрагиваются редко. В связи с этим целью нашей работы явилось сравнительное морфометрическое исследование опушения листа у растений из популяций рода *Arabidopsis*, расположенных на северной границе их ареала. Изучались особенности опушения на поверхности листовой пластинки и в отдельных ее зонах (апикальной, базальной и латеральной) у двух видов *Arabidopsis*, а также характер внутривидового разнообразия по этому признаку.

Материалы и методы

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. – диплоидное ($2n = 10$) самоопыляющееся растение из семейства Brassicaceae, имеющее неболь-

шой размер генома (около 100000 kb или 125 млн пар нуклеотидов), с низкой долей высокоповторяющейся ДНК. Растение однолетнее или двулетнее озимого типа. Характерные места обитания арабидопсиса в Карелии, территория которой принадлежит к зоне крайней северной границы ареала этого вида, – скалы с бедным почвенным покровом, в сообществе с типичной скальной растительностью. В таких приграничных районах популяции испытывают давление неблагоприятных для вида экологических условий. Исследовались растения трех природных популяций: двух изолированных, расположенных на островах Онежского озера Радколье и Большой Климецкий, и одной континентальной в пригороде Медвежьегорска. Далее в тексте все популяции названы по месту расположения.

Arabidopsis lyrata subsp. *petraea* (L.) O'Kane, Al-Shehbaz. — диплоидный ($2n = 16$) перекрестноопыляющийся вид семейства Brassicaceae с относительно небольшим геномом (около 207 млн пар нуклеотидов). Размер диплоидного генома *A. l. petraea*, определенный с помощью метода проточной цитометрии, составляет 0,46–0,51 пг и приблизительно в два раза превышает размер генома *A. thaliana* (0,23–0,29 пг) [O'Kane, Al-Shehbaz, 2003; Clauss et al., 2006]. *A. l. petraea* – многолетнее травянистое растение, образующее небольшие розетки, со слабо облиственными репродуктивными побегами высотой около 10–20 сантиметров. Исследуемая нами популяция находилась в пригороде Медвежьегорска на крутых песчаных откосах реки Кумса.

Для анализа листовой пластинки семена растений всех четырех исследуемых популяций высевали в почву и доращивали в установке с люминесцентными лампами при температуре 21 °C и круглосуточном освещении до появления полноценной розетки и репродуктивного побега. При изучении характера опушения использовали оптическую лупу МБС-9. Подсчет трихом производили в 20 полях зрения с увеличением 6*2х. Выборка составила по 20 растений из популяций того и другого вида. Все полученные данные были обработаны с помощью статистических методов [Зайцев, 1984].

Показатели внутривидовой изменчивости *Arabidopsis* определяли по методу Л. А. Животовского [1982]. В качестве морф выделяли три морфологических типа волосков листа: простые, двухлучевые и трехлучевые. Вычисляли следующие показатели:

среднее число морф в популяции:

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2; \quad (1)$$

статистическую ошибку (s_μ):

$$s_\mu \sim \sqrt{\mu(m-\mu)/N}; \quad (2)$$

долю редких морф в популяции (h):

$$h = 1 - \mu/m; \quad s_h \sim \sqrt{h(1-h)/N}; \quad (3)$$

показатель сходства популяций (r):

$$r = \sqrt{p_1q_1 + p_2q_2 + \dots + p_mq_m}; \quad (4)$$

критерий идентичности (I):

$$I = 8N_1N_2 / (N_1 + N_2) * (1 - r - (p_0 + q_0)/4), \quad (5)$$

где m – число морф, p и q – частоты фенотипов в разных популяциях, N – объем выборки.

Показатель μ дает оценку разнообразия по числу морф. Максимально возможное его значение равно m при одинаковой частоте всех морф. При неравномерном распределении частот морф $\mu < m$. При мономорфизме $\mu = 1$.

Доля редких морф в популяции (h) дает информацию о характере и структуре внутривидовой изменчивости. Значение показателя сходства популяций (r) не превышает 1. Оно равно 1 в тех случаях, когда сравниваемые популяции идентичны (по частотам морф). Оно равно 0 тогда, когда сравниваемые популяции не имеют ни одной общей морфы. Критерий идентичности (I) – это еще один метод сравнения выборок, основанный на значениях показателя сходства популяций (r). Если I превышает табличное значение, то между выборками есть различие на соответствующем уровне значимости [Животовский, 1982].

Уровень межвидовой изменчивости и внутривидовой изменчивости исследуемых растений *Arabidopsis* по количеству трихом в эпидерме розеточного листа определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

Для оценки действия стабилизирующей формы естественного отбора вычисляли среднюю арифметическую, а также разность между средним и конкретным значением изучаемого признака. Полученные ряды разностей ранжировали. Отклонения от средней (+ или –) графически были представлены прямыми (линии рассеяния, тренды) с разными углами наклона (крутизна) к оси абсцисс, по которым устанавливали степень различий между группами индивидуумов (особей) в отношении действия стабилизирующего отбора. Использовали формулу:

$$y = a + bx, \quad (6)$$

где y – разность между средним и конкретным значением признака; a – значение пересечения линии тренда с осью Y ; b – tg угла наклона линии тренда, x – номер ранга особи. Высокие значения коэффициента детерминации (R^2) позволяют считать результаты статистически достоверными [Лебедева и др., 2007].

Результаты и обсуждение

Arabidopsis lyrata subsp. *petraea*

Морфологическое исследование растений Медвежьегорской популяции *A. l. petraea* показало, что на их листовых пластинках отсутствовали какие-либо следы опушения, это обнаруживается уже в ювенильной фазе развития (рис. 2, А). Однако известно, что во многих природных популяциях *A. l. petraea* встречаются растения и с опушением на эпидерме листа [Clauss et al., 2006; Kivimäki et al., 2007].

Так, среди пяти шведских популяций этого вида были выявлены четыре полиморфные по данному признаку популяции, в которых с различной частотой встречались растения и с опушением (рис. 2, Б), и без него. Одна из популяций, состоящая из растений без опушения, так же как и Медвежьегорская, была мономорфной [Kivimäki et al., 2007]. Как было указано во введении, число генов, участвующих в образовании трихом, велико, однако регуляторный ген (*GL1*) является основным в процессе инициации и развития трихом, и делеция в этом гене приводит к появлению растений с отсутствием опушения [Hermap, Marks, 1989; Larkin et al., 1993]. Генетические исследования *A. l. petraea* показали, что ген, гомологичный кандидату гена *GL1*, описанному у *A. thaliana*, имеет мутации в кодирующей области (третий экзон), и они подавляют развитие опушения [Kivimäki et al., 2007]. В частности, в популяциях Швеции и Норвегии были выявлены три мутации в третьем экзоне *GL1*: одна несинонимичная замена в позиции 95 нуклеотида (мута-

ция названа A95D), 3 п.н.-делеция (делеция размером в три пары нуклеотидов) в позиции 148 и 7 п.н.-инсерция в позиции 215. Они вызывают замену аминокислот и изменение свойств кодируемого белка у *A. l. petraea*, в отличие от нуклеотидной последовательности *GL1* у продуцирующих трихомы растений *A. thaliana* (рис. 3).

В то же время растения *A. l. petraea* немецкой популяции продуцировали трихомы, хотя имели аналогично растениям шведских популяций 3 п.н.-делецию и 7 п.н.-инсерцию, но расположенную далее 96 нуклеотида [Hauser et al., 2001]. У растений Медвежьегорской популяции *A. l. petraea* в отличие от популяций Швеции и Норвегии, несущих упомянутые выше мутации в третьем экзоне, отсутствие опушения было вызвано другими причинами, а именно – 4 п.н.-инсерцией в начале третьего экзона (см. рис. 3). Таким образом, наиболее вероятно, что у северных популяций *A. lyrata* различные мутации в начале третьего экзона гена *GL1* (по крайней мере до позиции 96 нуклеотида) приводят к отсутствию опушения, и это является их отличительной особенностью.

Arabidopsis thaliana

В исследованных нами популяциях *A. thaliana* – одной континентальной (Медвежьегорская) и двух островных (Климецкая и Радколье) – трихомы обнаруживались уже на ранних стадиях розеточных листьев (рис. 4, А, Б). Причем опушение у них располагалось только на адаксиальной, верхней эпидерме листовой пластинки. Нижняя, абаксиальная эпидерма не имела волосков.

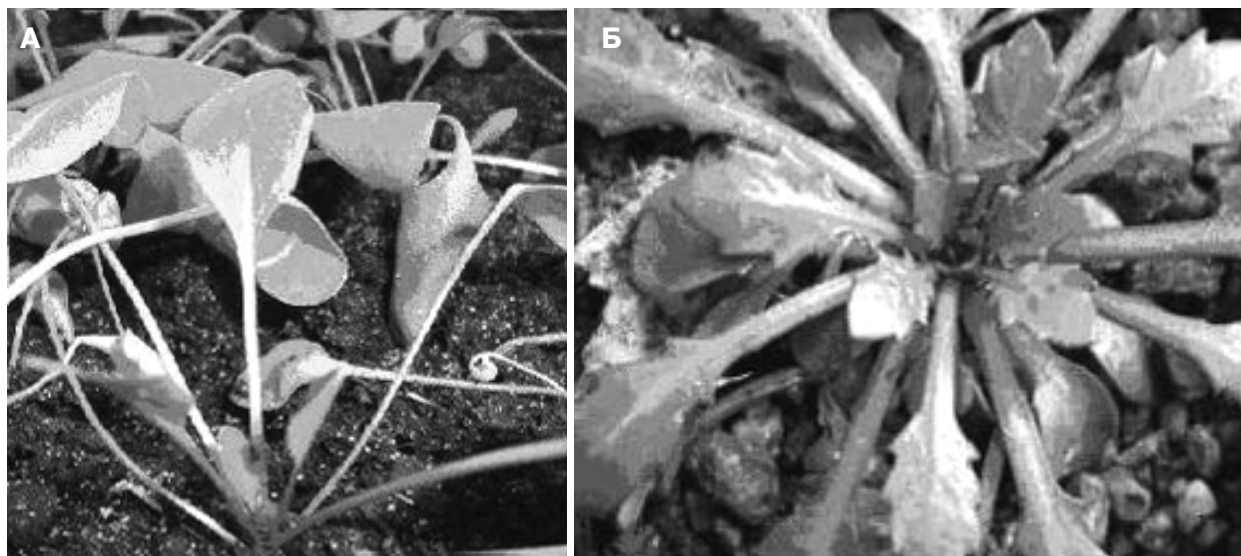


Рис. 2. Растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*:

А – ювенильные растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, Медвежьегорская популяция; Б – растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* с опушенными листьями [Kivimäki et al., 2007]

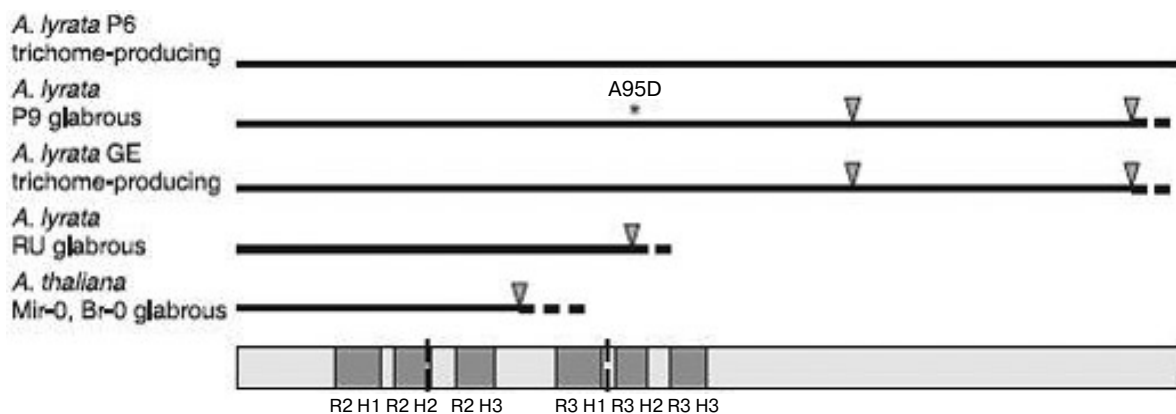


Рис. 3. Мутации в гене *GL1* у *Arabidopsis lyrata*, ассоциированные с отсутствием опушения [Kivimäki et al., 2007]:

▽ – инсерции и делеции, * – позиция несинонимичной замены (A95D). *A. lyrata* P6 и P9 – популяции из Швеции; *A. lyrata* GE – популяция из Германии; *A. lyrata* RU – популяция из России (Карелия). Для сравнения приведена делеция в одну пару нуклеотидов в двух образцах *A. thaliana* (Mir-0 – Италия и Br-0 – Чехословакия). В нижней части рисунка указаны функционально важные области *GL1* *Myb*-белка: представлена измененная белковая последовательность в результате мутации. R2 и R3 – повторы и соответствующие им спирали, 1–3 изображены серыми квадратами; границы экзона – прерывистые вертикальные линии

Общее количество трихом на лист у всех трех популяций различалось (табл. 1). Так, у растений континентальной Медвежьегорской популяции насчитывалось в среднем в 1,8–2,2 раза больше трихом, чем в островных Радколье и Климецкой популяциях (31 и 24 трихомы соответственно). Поскольку уровень различий довольно высок ($p = 0,001$), то можно предположить, что растения островных популяций или несут мутации в регуляторных генах, или у них существуют какие-то другие генетические

ограничения, проявляющиеся в период раннего развития трихом. В частности, известно наличие у растений *A. thaliana* популяции Landsberg erecta локуса Reduced Trichome Number (RTN), который затрагивает инициирование листовых трихом и приводит к редукции их количества [Larkin et al., 1996].

В отличие от растений *A. thaliana* популяции Columbia, характеризующейся наличием трихом только дикого типа (трехлучевые), в эпидерме листа взрослых растений северных по-

Таблица 1. Варьирование количества трихом разных типов в эпидерме растений *A. thaliana*

Статистические показатели	Типы трихом			
	Простые	Двухлучевые	Трехлучевые	Всего
Популяция острова Радколье (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	3,64 ± 0,23	24,45 ± 0,73	4,39 ± 0,24	30,81 ± 0,82
σ	2,61	9,27	2,69	10,40
V	71,62	37,93	61,25	33,76
Популяция острова Климецкий (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	3,90 ± 0,25	18,78 ± 0,46***	3,81 ± 0,24	24,35 ± 0,47***
σ	2,76	5,83	2,55	5,89
V	70,86	31,02	66,76	24,18
Континентальная популяция Медвежьегорск (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	15,47 ± 0,62***	34,45 ± 0,62***	6,33 ± 0,32***	56,25 ± 0,51***
σ	7,89	7,88	3,99	7,69
V	50,97	22,87	62,95	13,67
Континентальная популяция Царевичи (каулиновый лист, шт.)				
$M \pm s_m$	9,39 ± 0,47***	2,88 ± 0,25	1,57 ± 0,30**	
σ	2,63	1,27	0,78	
V	28,01	44,21	50,07	
Континентальная популяция Царевичи (черешок розеточного листа, шт.)				
$M \pm s_m$	4,12 ± 0,88	5,33 ± 1,22		
σ	2,474	3,01		
V	59,99	56,46		

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличия по количеству трихом от растений популяции о. Радколье достоверны: * – при $p = 95\%$; ** – при $p = 99,9\%$; *** – при $p = 999,9\%$; M – средняя арифметическая; s_m – ошибка средней; σ – среднее квадратическое отклонение; V – коэффициент вариации. В популяции Царевичи звездочками показан уровень отличия простых и трехлучевых трихом от двухлучевых.

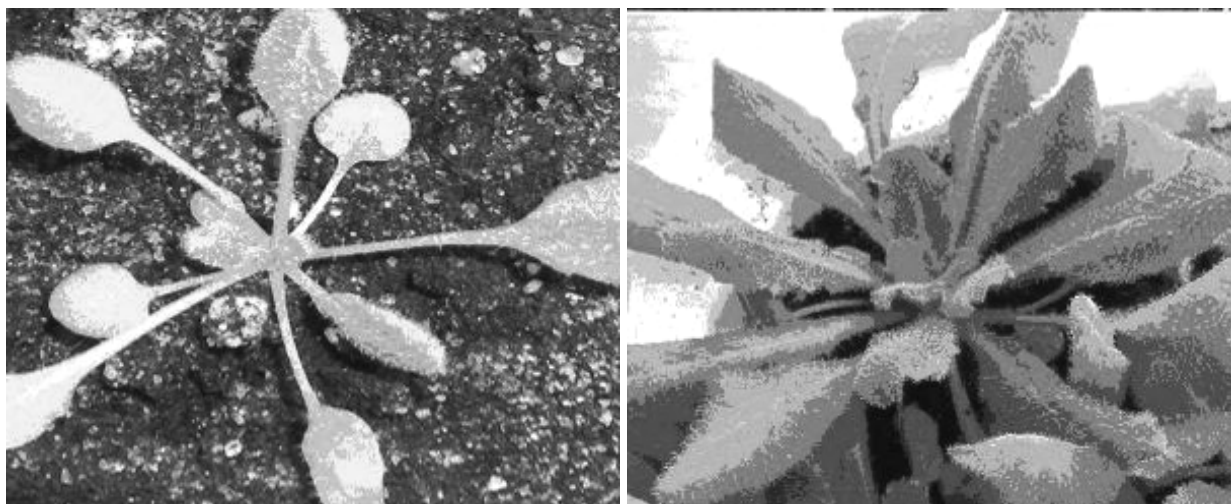


Рис. 4. Растения *A. thaliana*, выращенные в лабораторных условиях. А – ювенильное и Б – взрослое растения с видимым опушением

пуляций встречались сразу три типа трихом: простые (однолучевые), двухлучевые и трехлучевые. Простые трихомы представляют собой вырост эпидермальной клетки, не имеющий никаких ответвлений (рис. 1, А). Двухлучевые (вилочатые) трихомы – это волоски с двумя одинаковой длины ветвями, а трехлучевые – с тремя одинаковыми или реже разной длины ветвями (рис. 1, Б, В). Как полагают, двухлучевые и простые трихомы у *A. thaliana* – это результат мутаций в различных генах, определяющих морфогенез полиплоидных клеток эпидермы и процесс появления в них трихом [Schnittger, Hülskamp, 2002].

Морфологический анализ показал, что количество трихом разных типов на поверхности розеточного листа было неоднозначным. Так, у растений всех популяций количественно преобладали двухлучевые трихомы, их насчитывалось в 5–6 раз больше, чем трихом двух других типов. Трихомы дикого типа, т. е. трехлучевые, так же как и простые, у растений островных популяций встречались в незначительном числе (табл. 1). Статистические различия по их количеству между растениями островных популяций не выявлены, хотя в популяции Радколье трехлучевых трихом оказалось чуть больше, чем простых, и в 1,2 раза больше, чем трихом тех же типов у растений о. Климецкий.

Растения континентальной Медвежьегорской популяции несколько выделялись количественным соотношением разных типов трихом (см. табл. 1). По сравнению с растениями островных популяций Радколье и Климецкой у них встречалось значительно больше, в 4,25–3,9 раза соответственно, простых трихом и в 1,4–1,66 раза соответственно больше трехлучевых.

Как и у растений двух других популяций, вилочатые волоски преобладали, и их тоже было соответственно в 1,4–1,8 раза больше, чем в эпидерме листа островных растений.

Варьирование биологических данных в обеих островных популяциях оказалось очень высоким (51–72 %), но чуть ниже – в континентальной (22–62 %). Особенно большой разброс значений наблюдался во всех случаях для трихом дикого типа и однолучевых (см. табл. 1).

В основных зонах эпидермы розеточного листа (апикальной, базальной и латеральной) количество трихом разных типов у растений всех популяций было практически одинаковым. Характер распределения трихом в разных зонах листа, так же как и при анализе их общего количества в целом на лист, сохранял ту же тенденцию: двухлучевых волосков всегда на порядок больше, чем простых и трехлучевых (табл. 2). Количество трехлучевых волосков оказалось совершенно одинаковым во всех зонах листа и для всех популяций. Различия между островными популяциями оказались существенными по числу как двухлучевых, так и простых волосков. Однако в двух популяциях (Климецкая и Медвежьегорская) простых трихом в растениях насчитывалось несколько больше, чем трехлучевых. Причем у растений Медвежьегорской популяции они оказались многочисленнее в апикальной и базальной частях листа. Приведенный выше анализ локализации трихом в разных зонах листа, с одной стороны, подчеркивает характерные различия между островными и континентальными популяциями *A. thaliana*. Как оказалось, две популяции – островная Радколье и континентальная Медвежьегорская – сходным образом отличались от по-

Таблица 2. Количество трихом, локализованных в разных зонах розеточного листа растений популяций *A. thaliana*

Популяции <i>A. thaliana</i>	Зоны розеточного листа								
	Апикальная			Базальная			Латеральная		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Радколье	3 ± 0,20	11 ± 0,23	3 ± 0,18	3 ± 0,18	11 ± 0,21	3 ± 0,19	3 ± 0,17	11 ± 0,20	3 ± 0,18
Климецкий	5 ± 0,30	8 ± 0,34	3 ± 0,27	5 ± 0,28	8 ± 0,33	3 ± 0,19	5 ± 0,31	8 ± 0,35	3 ± 0,25
Медвежье-горск	7 ± 0,35	12 ± 0,4	3 ± 0,19	6 ± 0,3	11 ± 0,31	3 ± 0,21	5 ± 0,26	12 ± 0,30	3 ± 0,19
Критерий Стьюдента (t)									
Радколье / Климецкий	4,05***	8,06***	0,27	4,86***	7,66***	1,66	4,70***	7,72***	0,30
Радколье / Медвежье-горск	8,27***	0,79	0,67	8,08***	0,29	0,23	5,10***	2,41*	0,26
Климецкий / Медвежье-горск	8,27***	0,79	0,67	8,08***	0,29	0,23	5,10***	2,41*	0,26

Примечание. 1 – простые, 2 – двухлучевые и 3 – трехлучевые трихомы.

пуляции о. Б. Климецкий. В обеих популяциях количество двухлучевых трихом во всех зонах было больше в 0,7 раза. Помимо того, растения о. Радколье обнаруживали в 0,6–0,4 раза меньшее количество простых трихом во всех трех зонах по сравнению с популяциями Медвежьегогорска и о. Б. Климецкий соответственно. С другой стороны, выявленный характер распределения трех типов трихом подчеркивает неоднозначность процессов морфогенеза эпидермы и его генной регуляции в разных зонах листа. Количество трехлучевых волосков оказалось одинаковым в каждой из трех зон листа у растений всех популяций. Этот факт, возможно, подтверждает, что указанный тип трихом является характерным (диким) для арабидопсиса. Варьирование же числа трихом двух других типов в разных зонах листа связано скорее всего с разной экспрессией регуляторных генов и мутациями в различных локусах. Так, известно, что инициирование трихом на краях листа регулируется геном *AtMYB23*, который функционально накладывается с геном *GL1* [Kirik et al., 2001].

Опушение обнаруживалось также и в эпидерме черешка и каулиновых (стеблевых) листьев. Характер их опушения и распределение трихом были изучены у растений континентальной популяции Царевичи и значительно отличались от опушения розеточных листьев (см. табл. 1).

Оказалось, что в эпидерме каулиновых листьев и их черешков преобладают не двухлучевые, как у розеточных, а простые трихомы. Двухлучевые встречались в 3,2 раза реже, чем простые, а трехлучевые трихомы чрезвычайно редки. При этом чем выше на цветочном стебле расположен лист, тем более редким становится его опушение [Hauser et al., 2001]. Эпидерма че-

решка также отличается практически полным отсутствием трехлучевых трихом, однако другие два типа встречаются здесь с близкой частотой, но в меньшем количестве, чем в розеточных листьях растений других популяций.

Эти различия, с одной стороны, связаны с условиями развития тех и других листьев. Для розеточных, возникающих ранней весной и подвергающихся резким колебаниям температуры вплоть до заморозков, необходим более плотный и густой защитный покров эпидермы, тогда как каулиновые листья возникают позже, при более благоприятном температурном режиме, и необходимость в подобной защите отпадает. С другой стороны, к моменту репродуктивного развития растений, когда меняются все физиологические ростовые процессы, возможно, нарушается экспрессия генов, которые регулируют нормальное развитие трихом в эпидерме генеративного стебля, и те или иные мутации усиливаются [Larkin et al., 1993; Gao et al., 2008].

Необходимо отметить, что у растений всех популяций встречались листья с отсутствием или простых, или трехлучевых трихом, тогда как двухлучевые присутствовали на всех рассмотренных образцах. Частота листьев без простых трихом в популяции Медвежьегогорска оказалась немного меньшей (10%), чем у растений о. Радколье и о. Б. Климецкий (21 и 16%) соответственно. Трехлучевые волоски отсутствовали у более значительного числа растений, но во всех популяциях примерно с одинаковой частотой – 31, 31 и 43% соответственно. Листья, в эпидерме которых отсутствовали и простые, и трехлучевые трихомы, обнаружались в незначительном количестве в популяциях о. Б. Климецкий – 0,05 и о. Радколье – 0,02, тогда как в Медвежьегогорской их доля оказалась

наибольшей – 0,13. Частота отсутствия тех или иных типов трихом в различных зонах листа не показала каких-либо значительных особенностей, тем не менее немного различалась в разных популяциях. Так, в Климецкой эта доля была наибольшей и составила 0,074–0,076, в Радколье – 0,053–0,061 и менее всего в Медвежьегорской – 0,043–0,050.

Таблица 3. Частота различных типов трихом в популяциях *A. thaliana* (в долях)

Популяции	Всего трихом	Типы трихом		
		простые	двухлучевые	трехлучевые
Климецкая	62011	0,307	0,564	0,127
Радколье	7557	0,159	0,704	0,135
Медвежьегорская	9000	0,275	0,612	0,112

Таким образом, в пуле проанализированных листьев трех популяций *A. thaliana* (160 листовых пластинок в каждом случае), произрастающих в различных экологических условиях, обнаруживается вполне явный полиморфизм, связанный с варьированием количества трихом разных морфологических типов. Наличие в изученных популяциях нескольких вариантов (или морф) данного признака позволило оценить уровень внутри- и межпопуляционной изменчивости вида *A. thaliana*. Известно, что вклад признаков в величину показателя популяционной изменчивости пропорционален их частоте в популяциях [Животовский, 1982], поэтому варианты признака в нашем исследовании представлены в таблице 3 частотами различных типов трихом, а показатели внутривидовой популяционной изменчивости – в таблице 4.

Как видно, уровень внутривидовой популяционной изменчивости оказался идентичным в популяциях Климецкой и Медвежьегорской (см. табл. 4). В популяции о. Радколье он был наименьшим; возможно, в связи с тем, что частота простых

и трехлучевых трихом почти одинакова и они составляют одну редкую морфу. В Климецкой и Медвежьегорской популяциях в качестве редкой морфы выступают только трехлучевые трихомы, и потому здесь популяционное разнообразие определяется частотами всех трех типов волосков.

Попарные показатели генетического сходства популяций, свидетельствующие о степени их родства и уровне различий, оказались в целом довольно высокими (см. табл. 4). Однако необходимо отметить, что наиболее тесным родством обладают островные популяции Радколье и Климецкая, вследствие близости экологических условий, в которых они формировались. Меньшим генетическим сходством отличается от них континентальная популяция Медвежьегорска, причем наиболее далеко она отстоит от популяции о. Б. Климецкий (см. табл. 4). Критерий идентичности ($I_{\text{эсп}}$) свидетельствует о том, что генетические различия между популяциями значимы на соответствующем высоком уровне ($W = 0,001$). Представленные генетические взаимоотношения исследованных популяций вполне согласуются с данными кластерного анализа методом UPGMA на основе значений дистанций Нея [Федоренко и др., 2011].

Генетические различия островных и континентальной популяций подтверждаются результатами дисперсионного анализа общего количества трихом (табл. 5). Межпопуляционное несходство вполне очевидно, и оно обусловливается влиянием прежде всего генетического фактора (70,7%), в качестве которого рассматривается признак «типы трихом». Влияние эпигенетического фактора – локализация популяций (14,9%) – не менее значимо ($F_{\text{эмгир}} = 135,4^{***}$). Оба фактора являются главными источниками изменчивости в исследуемых популяциях.

Важную составляющую в адаптивном процессе фотосинтезирующих организмов, тесно

Таблица 4. Особенности популяционной изменчивости островных и континентальной популяций *A. thaliana* по признаку «типы трихом»

Показатели популяционной изменчивости	Обозначения	Популяции <i>A. thaliana</i>		
		Климецкая (К)	Радколье (Р)	Медвежьегорск (М)
Показатель внутривидовой популяционной изменчивости	μ	2,767	2,584	2,698
	s_p	0,010	0,012	0,009
Доля редких морф	h	0,078	0,138	0,101
	s_p	0,003	0,004	0,003
Показатель сходства популяций	Обозначения	К/Р	К/М	Р/М
	r	0,985	0,708	0,990
	s_p	0,002	0,006	0,001
Критерий идентичности	$I(\text{эсп})$	431,9	8579,51	325,6
	$I(\text{табл})$	9,21 при $W = 0,01$; 13,82 при $W = 0,001$ и 2 степенях свободы		

Таблица 5. Результаты дисперсионного анализа количества трихом разного типа в розеточном листе у растений континентальной и островных популяций *A. thaliana*

Варьируемые данные	Сумма квадратов отклонений	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера		Доля влияния фактора, %
				F _{эмпир.}	F _{табл.}	
Типы трихом	15770,9	2	7885,5	637,8***	3,0	70,7
Популяции	3348,1	2	1674,17	135,4***	3,0	14,9
Взаимодействие факторов	1101,8	4	275,4	22,3***	2,4	4,9
Остаточное	2114,2	171	12,4			9,5
Общее	22335,1	179				

Примечание. *** – отличия между F_{эмпир.} и F_{табл.} достоверны при p = 999,9 %.

связанную с выживаемостью, представляет естественный отбор, в частности, стабилизирующая его форма. Эффект действия естественного отбора этой формы в отношении морфологического признака «общее количество трихом» в эпидерме розеточного листа был исследован на основе анализа ранжированных отклонений от средних арифметических их значений. Хорошо известно, что особи, чьи количественные признаки близки к среднепопуляционному (или модальному) значению, отличаются максимальной приспособленностью [Алтухов, 2003]. В популяции Радколье значения частот трихом отстоят дальше от своей средней арифметической. Это отражается в большей крутизне принадлежащих им линейных трендов, и, следовательно, действие стабилизирующего отбора здесь ослаблено (рис. 5). Напротив, в популяциях Климецкой и Медвежьегорской линии тренда, характеризующие частоту трихом, отличаются меньшей крутизной с соответствующим более выраженным эффектом отбора.

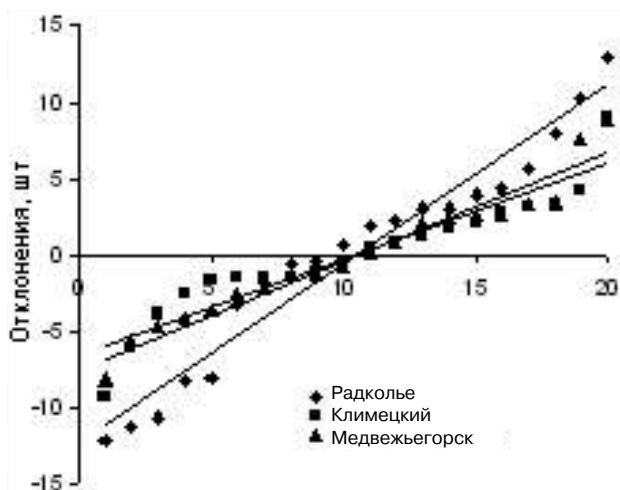


Рис. 5. Общее количество трихом в эпидерме листа у растений континентальной и островных популяций *A. thaliana*, выраженное в отклонениях от их среднеарифметических значений

По оси абсцисс – отклонения, шт. По оси ординат – ранг растений. Параметры линий трендов: Радколье $y = 1,17x - 12,28$, $R^2 = 0,98$; Б. Климецкий $y = 0,63x - 6,53$, $R^2 = 0,88$; Медвежьегорск $y = 0,71x - 7,47$, $R^2 = 0,95$

Рассматривая эти данные как отражение специфического адаптивного состояния, находящегося под контролем естественного отбора (стабилизирующая форма), можно отметить, что стабилизирующий отбор благоприятствует в большей мере растениям популяции Радколье. Тогда как в популяциях Медвежьегорской и Климецкой мы наблюдаем более сильное его действие на формирование того или иного количества трихом в эпидерме розеточного листа растений.

Таким образом, сравнительное морфометрическое исследование опушения листа у растений северных популяций двух видов рода *Arabidopsis* показало их кардинальное различие. В популяции *A. l. petraea* отсутствует опушение листа, что вызвано мутацией в третьем экзоне регуляторного гена *GLA1* [Kivimäki et al., 2007]. Тогда как у растений естественных популяций другого вида, *A. thaliana*, в эпидерме адаксиальной стороны листовых пластинок встречалось три типа трихом: простые, или однолучевые, двухлучевые и трехлучевые. Растения островных (Радколье, Б. Климецкий) и континентальной (Медвежьегорск) популяций характеризовались преобладанием трихом двухлучевого типа и меньшей частотой простых и трехлучевых. Различия по уровню внутривидового варьирования частот трех типов трихом оказались существенными, а межвидовые выявились только по частоте двухлучевых трихом. В целом естественные (континентальная и островные) популяции имеют высокий уровень полиморфизма и сходные коэффициенты генетического разнообразия в отношении частоты встречаемости трихом на поверхности розеточного листа. Наиболее высоким варьированием всех типов трихом отличались островные популяции.

Выявленные особенности в характере распределения трихом в целом на лист и по его зонам и различия между растениями островных и континентальной популяций, несомненно, связаны как с генетическими, так и, возможно, с эпигенетическими факторами.

Известно, что инициация того или иного типа трихом, их рост, локализация и количество в эпидерме листа определяются генной регуляцией этих процессов. Она связана с наличием или отсутствием мутаций во многих генах: *GL1*, *TTG1*, *AtMYB23*, *GL2*, *GL3*, *EGL3* и др. [Larkin et al., 1993; Payne et al., 2000; Kirik et al., 2001; Ohashi et al., 2002]. Преобладание на листьях северных популяций *A. thaliana* трихом двухлучевого типа оказалось характерной особенностью, отличающей их от растений линий Columbia и Landsberg, листья которых имеют трихомы только дикого типа, т. е. трехлучевые. Возможно, что растения исследованных нами популяций *A. thaliana* несут мутации, ограничивающие развитие разветвлений трихом. К таким генетическим эффектам приводят, в частности, мутации в генах *ZWI* и *AN*, вызывающие развитие только вильчатых трихом, ограничивая дальнейшее их ветвление в ходе морфогенеза. Мутации в гене *ST1* специфически влияют на ветвление трихом, в результате чего трихомы *sti*-мутантов являются неветвящимися [Schnittger, Hülskamp, 2002]. Неправильное развитие трихом, при котором большинство из них не разветвляется, вызывают также и мутации в гене *GL2* [Rerie et al., 1994; Marks, 1997; Ohashi et al., 2002]. С другой стороны, известно, что ветвление трихом связано с сильным влиянием средовой компоненты [Oppenheimer et al., 1997]. Экологические условия северного региона естественным образом влияют как на развитие этих популяций, так и на сложно организованные молекулярно-генетические процессы формирования листа и его эпидермы: неравномерность, продолжительность и характер клеточных делений в базальной, апикальной и маргинальной меристемах; их взаимодействие, направление и скорость дифференциации растущих клеток [Эсау, 1969; Грицких и др., 2009]. Действие естественного отбора, и прежде всего стабилизирующей его формы, определяет и уровень генетического разнообразия, и специфическое адаптивное состояние популяций арабидопсиса [Динамика..., 2004; Соколова, 2009]. Все это формирует отличительные особенности в развитии опушения на поверхности листовой пластинки и в отдельных ее зонах (базальной, апикальной и латеральной), а также характер внутривидового разнообразия по этому признаку в популяциях *Arabidopsis*, находящихся на северной окраине своего ареала. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования растений северных популяций

A. thaliana, возможно, позволят более точно установить комплекс генов, участие которых в развитии трихом создает своеобразный северный фенотип *Arabidopsis*.

Литература

- Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
- Атлас ультраструктуры растительных тканей / Ред. М. Ф. Данилова, Г. М. Козубов. Петрозаводск: Карелия. 1980. 456 с.
- Грицких М. В., Николаевская Т. С., Топчиева Л. В., Федоренко О. М. Генетические и морфофизиологические особенности северных природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2009. № 3. С. 38–45.
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ред. Ю. П. Алтухов. М.: Наука, 2004. 619 с.
- Животовский Л. А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М.: Наука, 1982. С. 38–44.
- Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.
- Киселева Н. С., Шелухин Н. В. Атлас по анатомии растений / Ред. С. В. Калишевич. Минск: Вышэйш. школа, 1969. 288 с.
- Лебедева О. Н., Титов А. Ф., Стафеева Е. Б., Николаевская Т. С. О стратегии фотозащиты у высших растений // Доклады РАСХН. 2007, № 4. С. 15–19.
- Соколова Е. И. Мутации и рекомбинации у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Современные проблемы эволюционной биологии, посв. 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и 150-летию выхода в свет «Происхождения видов...»: матер. междунар. научно-метод. конф. (Брянск, 12–14 февр. 2009 г). Брянск, 2009. С. 4–8.
- Тутаюк В. Х. Анатомия и морфология растений. М.: Высш. школа, 1980. 317 с.
- Федоренко О. М., Грицких М. В., Топчиева Л. В., Лебедева О. Н. Сравнительный анализ генетической структуры природных популяций двух видов растений *Arabidopsis* с разной степенью панмиксии // Генетика. 2011. Т. 47, № 4. С. 508–515.
- Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 564 с.
- Beilstein M. A., Al-Shehbaz I. A., Kellogg E. A. Brassicaceae Phylogeny and Trichome Evolution // Amer. J. Bot. 2006. Vol. 93. P. 607–619.
- Clauss M. J., Dietel S., Schubert G., Mitchell-Olds T. Glucosinolate and Trichome Defenses in a Natural *Arabidopsis lyrata* Population // J. Chem. Ecol. 2006. Vol. 32. P. 2351–237.
- Haughn G. W., Somerville C. R. Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. 1988. Dev. Genet. Vol. 9. P. 73–89.
- Hauser M.-T., Harr B., Schlötterer C. Trichome Distribution in *Arabidopsis thaliana* and its Close Relative *Arabidopsis lyrata*: Molecular Analysis of the Candidate Gene *GLABROUS1* // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. P. 1754–1763.

Herman P. L., Marks M. D. Trichome Development in *Arabidopsis thaliana*. II. Isolation and Complementation of the *GLABROUS1* Gene // *Plant Cell*, 1989. Vol. 1. P. 1051–1055.

Gao Y., Gong X., Cao W., Zhao J., Fu L., Wang X., Schumaker K. S., Guo Y. *SAD2* in *Arabidopsis* Functions in Trichome Initiation through Mediating *GL3* Function and Regulating *GL1*, *TTG1* and *GL2* Expression // *J. Integrative Plant Biology*. 2008. Vol. 50. P. 906–917.

O'Kane S. L., Al-Shehbaz I. A. Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis* (*Brassicaceae*) based on sequences of nuclear ribosomal DNA // *Ann. Missouri Bot. Gard.* 2003. Vol. 90. P. 603–612.

Kirik V., Schnittger A., Radchuk V., Adler K., Hülskamp M., Baumlein H. Ectopic expression of the *Arabidopsis AtMYB23* gene induces differentiation of trichome cells // *Dev. Biol.* 2001. Vol. 235. P. 366–377.

Kivimäki M., Kärkkäinen K., Caudeul M., Løe G., Egren J. Gene, phenotype and function: *GLABROUS1* and resistance to herbivory in natural populations of *Arabidopsis lyrata* // *Mol. Ecol.* 2007. Vol. 16. P. 453–462.

Larkin J. C., Oppenheimer D. G., Pollock S., Marks M. D. *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function // *Plant Cell*. 1993. Vol. 5. P. 1739–1748.

Larkin J. C., Young N., Prigge M., Marks M. D. The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis* // *Development*. 1996. Vol. 122. P. 997–1005.

Marks M. D. Molecular genetic Analysis of Trichome Development in *Arabidopsis* // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 48. P. 137–163.

Ohashi Y., Oka A., Ruberti I., Morelli G., Aoyama T. Entopically additive expression of *GLABRA2* alters the frequency and spacing of trichome initiation // *Plant J.* 2002. Vol. 29. P. 359–369.

Oppengeimer D. G., Pollok M. A., Vasik J., Szymanski D. B., Ericson B., Feldman K., Marks D. Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis // *Developmental Biology*. 1997. Vol. 94. P. 6261–6266.

Payne C. T., Zhang F., Lloyd A. M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* // *Genetics*. 2000. Vol. 156. P. 1349–1362.

Perazza D., Herzog M., Hülskamp M., Brown S., Dorne A.-M., Bonneville J.-M. Trichome Cell Growth in *Arabidopsis thaliana* Can Be Derepressed by Mutations in at Least Five Genes // *Genetics Soc. America*. 1999. Vol. 152. P. 461–476.

Pesch M., Hülskamp M. Role of *TRIPTYCHON* in trichome patterning in *Arabidopsis* // *BMC Plant Biology*. 2011. Vol. 11. P. 603–612.

Rerie W. G., Feldmann K. A., Marks M. D. The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis* // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. P. 1388–1399.

Schnittger A., Hülskamp M. Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2002. Vol. 357. P. 823–826.

Schwab B., Folkers U., Ilgenfritz H., Hülskamp M. H. Trichome morphogenesis in *Arabidopsis* // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2000. Vol. 355. P. 879–883.

Szymanski D. B., Jilk R. A., Pollock S. M., Marks M. D. Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes // *Development*. 1998. Vol. 125. P. 1161–1171.

Szymanski D. *Arabidopsis* Trichome Morphogenesis: A Genetic Approach to Studying Cytoskeletal Function // *J. Plant Growth Regul.* 2001. Vol. 20. P. 131–140.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Федоренко Ольга Михайловна

старший научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: fedorenko_om@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nicoltn@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Fedorenko, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: fedorenko_om@mail.ru
tel.: (8142) 573107