

УДК 631.547:581.19:633.521

Д. В. Галиновский, мл. науч. сотрудник (ИГиЦ НАН Беларуси);
Д. А. Дубарь, магистрант (ИГиЦ НАН Беларуси); А. П. Райский, ассистент (БГТУ);
В. В. Титок, директор (ЦБС НАН Беларуси)

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ БИОСИНТЕЗА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МИКРОФИБРИЛЛ У ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

В работе идентифицированы гены целлюлозосинтаз, которые связаны с формированием волокна в стеблях льна-долгунца. Для идентификации на кДНК матрице, которую синтезировали с использованием общей РНК, выделенной из стеблей льна-долгунца, амплифицировали фрагменты HVRII-области целлюлозосинтаз. Полученные фрагменты сравнивали с *CesA*-генами *Arabidopsis thaliana*. В результате были идентифицированы три гена целлюлозосинтаз – *LusCesA4*, *LusCesA7* и *LusCesA9*. Полученные данные позволяют констатировать наличие экспрессии целлюлозосинтаз класса *CesA4*, *CesA7* и *CesA9* в стебле льна-долгунца на стадии быстрого роста. В работе также предложена методика идентификации HVRII-области целлюлозосинтаз четвертого класса посредством рестрикционного анализа.

We have identified the cellulose synthase genes, which are involved in the fiber formation in fiber flax stems. We compared the HVRII fragments amplified on cDNA matrix, that were synthesized on total RNA extracted from fiber flax stems, with the *CesA*-genes from *Arabidopsis thaliana*. We have found three cellulose synthase genes – *LusCesA4*, *LusCesA7* and *LusCesA9*. We have revealed the existence of expression cellulose synthase genes of the *CesA4*, *CesA7* and *CesA9* classes in fiber flax stems at the rapid growth phase.

Введение. Лен-долгунец является подвидом льна культурного (*Linum usitatissimum* L. subsp. *elongatum*), который как техническая культура длительное время возделывается в Беларуси. Эта сельскохозяйственная культура оптимально приспособлена к нашим климатическим условиям и позволяет получать хороший урожай технического волокна. В результате длительной селекции традиционными способами в Беларуси создано много высокопродуктивных сортов [1]. Получение новых конкурентоспособных сортов невозможно без изучения биологических особенностей наследования и проявления хозяйственно ценных признаков. Общеизвестно, что основным полимером волокна, получаемого из растений льна-долгунца, является целлюлоза, содержание которой может достигать 70% от массы зрелого волокна [2]. Данный полимер в основном накапливается в клетках флоэмы (лубяное волокно), где он откладывается в клеточной стенке [3]. Молекулярные механизмы биосинтеза целлюлозы пока изучены недостаточно, но основной компонент уже определен – это совокупность 36 полипептидов, образующих трансмембранную целлюлозосинтазную розетку. Этот комплекс образует микрофибриллу целлюлозы, состоящую из 36 глюкановых цепей [4]. Успешные молекулярно-генетические эксперименты позволили идентифицировать гены целлюлозосинтаз высших растений (*CesA*-гены) [5]. Геномы высших растений содержат несколько различных *CesA*-генов (например, у арабидопсиса 10, у тополя 17) [6]. До настоящего времени подходы молекулярной генетики остаются наиболее перспективными инструмен-

тами изучения синтеза целлюлозы в высших растениях. В экспериментах на растительных тканях четко показаны две группы генов, кодирующие целлюлозосинтазы, специфически экспрессирующиеся при биогенезе первичной и вторичной клеточной стенки [7], показана ткане- и стадийспецифичность различных *CesA*-генов. На генном уровне различия связаны с экспрессией разных генов целлюлозосинтаз, продукты которых формируют различные «розетки», что влияет на свойства полимера и качество технического волокна, которое напрямую связано с удлинением лубяных клеток и динамикой утолщения вторичной клеточной стенки у этих клеток. Цель настоящей работы заключалась в идентификации *CesA*-генов, которые экспрессируются в стеблях растений льна-долгунца и обеспечивают формирование вторичной клеточной стенки лубяных волокон.

Основная часть. Для идентификации генов целлюлозосинтаз в работе использовали метод, предложенный авторами статьи [8] с некоторыми модификациями. Данный метод основан на особенностях строения целлюлозосинтаз растений. Все CESA протеины обязательно содержат HVRII-домен, называемый еще CSRII-областью. Этот домен консервативен для CESA ортологов и различается у CESA паралоогов. Поэтому HVRII-область можно использовать для идентификации членов мультигенного семейства целлюлозосинтаз. Особенности структуры указанных белков обуславливаются нуклеотидной последовательностью генов, в строении которых также можно выделить HVRII-области. Сравнение полученных нук-

леотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз льна-долгунца с последовательностями идентифицированных генов целлюлозосинтаз позволяет идентифицировать данные гены. Поскольку в классификации целлюлозосинтаз в качестве модельного организма приняли *Arabidopsis thaliana*, то первостепенное значение имеет идентичность HVRII-областей с целлюлозосинтазами данного растения [6]. Для идентификации *CesA*-генов необходимо получение нуклеотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз.

В качестве растительного материала отбирали стебли растений льна-долгунца (сорт Блакит, Беларусь) на стадии быстрого роста (40 сут культивирования в открытом грунте). У растений удаляли апикальную часть над точкой слома, все листья, а также корень. Общую растительную РНК выделяли по методике с использованием тризола. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit фирмы Fermentas (Литва). Для амплификации HVRII-региона использовали праймеры, предложенные в [8]. ПЦР проводили при следующих условиях: после 4 мин при 95°C выполняли 30 циклов – 60 с при 94°C, 90 с при 41°C и 120 с при 72°C, затем финальная элонгация – 10 мин при 72°C.

Для клонирования ПЦР-продукта использовали InsTAclone™ PCR Cloning Kit фирмы Fermentas (Литва). Проверку на наличие необходимой вставки осуществляли с помощью ПЦР со стандартными праймерами к полилинкеру данной плазмиды при следующих условиях: после 4 мин при 95°C, выполняли 25 циклов – 60 с при 94°C, 60 с при 51°C и 60 с при 72°C, финальная стадия – 10 мин при 72°C. Разделение продуктов ПЦР-реакции осуществляли при помощи электрофореза. В работе использовали метод горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле с использованием TAE-буфера.

Секвенирующие реакции проводили с использованием Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Очистку продуктов реакции проводили путем переосаждения с 96% этанолом и ЭДТА, согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Секвенирующий электрофорез проводили на ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Сопоставление полученных последовательностей с данными, содержащимися в электронных базах данных, осуществляли с использованием электронного ресурса NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) при помощи программы *nucleotide blast*, алгоритм *discontiguous megablast*.

Из растительного материала выделяли общую РНК, затем с помощью ОТ-ПЦР и прайме-

ров к консервативным доменам, фланкирующим HVRII-область, синтезировали кДНК. Используя в качестве матрицы полученную кДНК, амплифицировали HVRII-область и получили ПЦР-продукт, размером около 600 п. н. После этого клонировали полученный фрагмент в плазмидный вектор в бактериях *E. coli*. В результате скрининга бактериальных колоний отобрали клоны, которые несли плазмиду со вставкой. Наличие вставки в плазмиде и определяли посредством ПЦР. Размеры ПЦР-фрагментов отличались в достаточно широких пределах: 2,5% из отобранных штаммов несли плазмиду с вставкой тяжелей 600 п. н., 87% – несли плазмиду с вставкой около 600 п. н., 10,5% – были со вставкой легче 600 п. н. Далее определяли нуклеотидные последовательности вставок полученных плазмид. На основании полученных результатов более тяжелые и более легкие фрагменты отнесли к артефактам эксперимента, которые не свидетельствуют о полиморфизме HVRII-областей генов целлюлозосинтазы, что дало основание для исключения их из дальнейшей работы.

Получение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов позволило определить, что наиболее «типичная» вставка, содержащаяся в плазмиде pBS58, составляет 611 нуклеотидов. При анализе нуклеотидных последовательностей размером ок. 600 п. н. оказалось, что они практически идентичны друг другу. При их сравнении с фрагментами, имеющимися в базах данных, наибольшую идентичность (80%) данные фрагменты обнаружили с целлюлозосинтазой (*CesA1*) *Populus tremula* × *Populus tremuloides* (gb[AY573571.1]), в то время как при сравнении полученных последовательностей с сиквенсом *Arabidopsis thaliana* наибольшую идентичность (67%) обнаружили с *CesA4* (NM123770.3). Поскольку номенклатура генов целлюлозосинтаз опирается на названия данных генов, принятых для *A. thaliana* [6], идентифицированный ген льна-долгунца следует отнести к *CesA4*, хотя его HVRII-область демонстрировала большую идентичность с *CesA1* гибрида *Populus tremula* × *Populus tremuloides*.

При анализе нуклеотидной последовательности HVRII-области плазмиды pBS58 обнаружили сайты узнавания эндонуклеазами *Bam*HI и *Hind*III (рис. 1).



Рис. 1. Рестрикционная карта ПЦР-продукта, амплифицированного на pBS58 со стандартными праймерами к полилинкеру плазмиды pTZ57R (черным цветом показаны фрагменты вектора)

Данное обстоятельство может быть использовано для идентификации HVRII-области целлюлозосинтаз четвертого класса методом рестрикционного картирования. Следует также учитывать, что при проведении ПЦР со стандартными праймерами к полилинкеру плазмиды pTZ57R также амплифицируется часть плазмидного вектора, где также содержится по одному сайту узнавания для *Bam*HI и *Hind*III (рис. 1). При гидролизе ПЦР-продукта, содержащего HVRII-область гена *CesA4*, ферментом *Hind*III образуется три фрагмента размером 504, 200 и 61 п. н. При рестрикции ферментом *Bam*HI также образуется три фрагмента, размеры которых 516, 152 и 97 п. н. При идентификации следует также учитывать возможность обратной ориентации вставки внутри плазмиды (рис. 2).

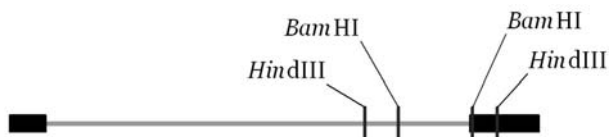


Рис. 2. Рестрикционная карта предполагаемого ПЦР-продукта, амплифицированного со стандартными праймерами к полилинкеру плазмиды pTZ57R при обратной ориентации в сравнении с rBS58 вставки HVRII-области

В таком случае число фрагментов, образуемых при гидролизе ферментом, будет таким же, но изменится их размер. При расщеплении рестриктазой *Hind*III образуются фрагменты размером 513, 191 и 61 п. н. (что очень близко к rBS58), а при использовании *Bam*HI – 561, 107 и 97 п. н. Фрагменты размером 107 и 97 п. н. в 1%-ном агарозном геле обладают близкой подвижностью, поэтому при электрофоретическом разделении продуктов гидролиза при окрашивании геля будут видны две полосы – в области около 550 п. н. и 100 п. н.

При дальнейшем анализе нуклеотидных последовательностей размером ок. 600 п. н. обнаружили две плазмиды (pBS13 и pBS19), вставки которых имели низкую идентичность со вставкой rBS58, а значит существенно отличались по нуклеотидной последовательности от HVRII-области *CesA4*. Анализ HVRII-области, содержащейся в составе плазмиды pBS13, показал 75%-ную идентичность с нуклеотидной последовательностью гена *CesA7* *P. tremuloides* (AY162180.1) и 72%-ную идентичность с *CesA9* из *A. thaliana* (NM127746.1). Нуклеотидная последовательность гипервариабельной области целлюлозосинтазы плазмиды pBS19 обнаруживала 79% идентичность с *CesA2*-геном *P. tremuloides* (AY095297.1) и 74%-ную идентичность с *CesA7* *A. thaliana*, также известным как *Irx3*, (NM121748.3). Все идентифицированные в данной

работе гены целлюлозосинтаз льна-долгунца (*LusCesA4*, *LusCesA7* и *LusCesA9*), которые экспрессируются в стебле, ассоциированы с синтезом вторичной клеточной стенки.

Заключение. При сравнении фрагментов HVRII-области, амплифицированных на РНК, выделенной из стебля льна-долгунца, с геномом *A. thaliana* были идентифицированы три гена целлюлозосинтаз – *LusCesA4*, *LusCesA7* и *LusCesA9*. Первый из них, *LusCesA4*, демонстрировал 67%-ную идентичность с *AtCesA4*, второй, *LusCesA7*, был на 74% идентичен *AtCesA7* и третий, *LusCesA9*, проявлял 72%-ную идентичность с *AtCesA9*. Все идентифицированные гены ассоциированы с синтезом вторичной клеточной стенки. Полученные данные позволяют констатировать наличие экспрессии целлюлозосинтаз класса *CesA4*, *CesA7* и *CesA9* в стебле льна-долгунца на стадии быстрого роста, что свидетельствует о возможности использования анализа гипервариабельных классоспецифических областей *CesA*-генов для данной культуры. В перспективе использованный подход может быть применен для молекулярно-генетической идентификации факторов, определяющих качество формирующегося льноволокна.

Литература

1. Голуб, И. А. Льноводство Беларуси / И. А. Голуб, А. З. Чернушок. – Борисов: Борисовская укрупненная типография имени 1 Мая, 2009. – 245 с.
2. Thermogravimetric analysis of the flax bast fiber bundle / V. Titok [et al.] // Journal of Natural Fibers. – 2006. – Vol. 3, № 1. – P. 35–41.
3. Чернова, Т. Е. Биогенез растительных волокон / Т. Е. Чернова, Т. А. Горшкова // Онтогенез. – 2007. – Т. 38, № 4. – С. 1–14.
4. Cellulose metabolism in plants / T. Hayashi [et al.] // International Review of Cytology. – 2005. – Vol. 247. – P. 1–34.
5. Ranik, M. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis / M. Ranik // Tree Physiology. – 2006. – Vol. 26. – P. 545–556.
6. An update on the nomenclature for the cellulose synthase genes in *Populus* / M. Kumar [et al.] // Trends in Plant Science. – 2009. – Vol. 14. – P. 248–254.
7. Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes / R. A. Burton [et al.] // Planta. – 2005. – Vol. 221, № 3. – P. 309–312.
8. Liang, X. Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees / X. Liang, C. P. Joshi // Tree Physiology. – 2004. – Vol. 24. – P. 543–550.

Поступила 26.03.2010