Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

ДОКЛАДЫ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

МИНСК, БЕЛОРУССКАЯ НАУКА, 2012, ТОМ 56, № 1

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Редакционная коллегия:

М. В. Мясникович (главный редактор),
А. М. Русецкий (заместитель главного редактора),
С. А. Чижик (заместитель главного редактора),
И. М. Богдевич, Н. А. Борисевич, Г. А. Василевич, П. А. Витязь, И. Д. Волотовский, И. В. Гайшун, В. Г. Гусаков, И. В. Залуцкий, О. А. Ивашкевич, Н. А. Изобов, А. Ф. Ильющенко, Н. С. Казак, С. Я. Килин, А. А. Коваленя, Ф. Ф. Комаров, И. В. Котляров, В. А. Лабунов, Ф. А. Лахвич, О. Н. Левко, А. И. Лесникович, В. Ф. Логинов, А. А. Махнач, А. А. Михалевич, П. Г. Никитенко, О. Г. Пенязьков, Ю. М. Плескачевский, А. Ф. Смеянович, Л. М. Томильчик, В. М. Федосюк, Л. В. Хотылева, И. П. Шейко

Адрес редакции:

220072, Минск, ул. Академическая, 1, к. 119,
тел. 284-19-19
http:/nasb.gov.by/rus/publications/dan/
E-mail: doklady@open.by

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

DOKLADY
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

Published bimonthly

The journal has been published since July, 1957

MINSK, BELORUSSKAYA NAUKA, 2012, Vol. 56, No 1

Founder − National Academy of Sciences of Belarus

E d i t o r i a l B o a r d:

M. V. Miasnikovich (Editor-in-Chief),
A. M. Rusetsky (Associate Editor-in-Chief),
S. A. Chizhik (Associate Editor-in-Chief),
I. M. Bogdevich, N. A. Borisevich, G. A. Vasilevich, P. A. Vitiaz, I. D. Volotovski, I. V. Gaishun, V. G. Gusakov, O. A. Ivashkevich, N. A. Izobov, A. F. Ilyushchanka, N. S. Kazak, S. Ya. Kilin, A. A. Kovalenya, F. F. Komarov, I. V. Kotlyarov, V. A. Labunov, F. A. Lakhvich, O. N. Levko, A. I. Lesnikovich, V. F. Loginov, A. A. Makhnach, A. A. Mikhalevich, P. G. Nikitenko, O. G. Penyazkov, Yu. M. Pleskachevsky, A. F. Smeyanovich, L. M. Tomilchik, V. M. Fedosyuk, L. V. Khotyleva, I. P. Sheiko, I. V. Zalutsky

Address of the Editorial Office:

220072, Minsk, 1 Akademicheskaya Str., room 119
telephone: 284-19-19
http://nasb.gov.by/eng/publications/dan/
E-mail: doklady@open.by

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

Доклады Национальной академии наук Беларуси

2012 **январь–февраль** **Том 56 № 1**

БИОЛОГИЯ

УДК 631.547:581.19:633.521

Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ[1], Н. В. АНИСИМОВА[1], В. Н. ЛЕОНТЬЕВ[2], В. В. ТИТОК[3], академик Л. В. ХОТЫЛЕВА[1]

ОРТОЛОГИ *CesA*-ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L. У ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

[1]Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск
[3]Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.11.2011

Введение. Синтез целлюлозы – один из важнейших биохимических процессов в растительных клетках, тем не менее его молекулярные механизмы до настоящего времени изучены слабо. В последнее время сделан ряд важных открытий в понимании молекулярно-генетических процессов, обеспечивающих биосинтез целлюлозы в растительных организмах. Частично данные исследования выполнялись на популярном модельном растении – арабидопсисе (*Arabidopsis thaliana* L.) и различных его мутантах, которые широко используются для изучения генетики и биологии развития растений [1]. Малый размер генома (около 157 миллионов пар нуклеотидов) и небольшое число хромосом (5 пар) делают его удобным объектом для картирования и секвенирования генов [2]. Геном арабидопсиса в 2000 г. стал первым секвенированным геномом растения [3].

Основной компонент биосинтеза целлюлозы – совокупность 36 полипептидов, образующих трансмембранную целлюлозосинтазную розетку [4]. Данные пептиды, собственно, и кодируются генами целлюлозосинтаз (*CesA*-генами). У высших растений они принадлежат к мультигенному семейству, и при экспрессии разных генов целлюлозосинтаз могут формироваться различные розетки, продуцирующие клеточные стенки, различающиеся по физико-химическим свойствам [5]. Идентифицировать гены целлюлозосинтаз можно не только по полноразмерной последовательности гена, но и по последовательности класс-специфической области (CSRII-области), т. е. по последовательности фрагмента гена. Данные области консервативны у *CesA* ортологов и могут быть использованы для идентификации членов мультигенного семейства целлюлозосинтаз [6].

Исследования экспрессии генов биосинтеза целлюлозы на двух модельных объектах (арабидопсис и тополь) привели к идентификации предполагаемых гомологичных генов целлюлозосинтаз, которые, однако, имели разные обозначения. После получения полной последовательности генома тополя (*Populus trichocarpa* Torr., A. Gray) и идентификации всех генов целлюлозосинтаз была унифицирована номенклатура генов данного семейства и переименована по соответствующим гомологам арабидопсиса [7].

Особую научную и практическую значимость имеют исследования целлюлозосинтаз льна-долгунца, поскольку целлюлоза является основным полимером льноволокна, который может достигать 70 % от массы зрелого волокна [8]. В данном сообщении с целью идентификации *CesA*-генов льна-долгунца проводится сравнительный анализ CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна с *CesA*-генами *Ar. thaliana*.

Материалы и методы исследования. В работе использовали нуклеотидные последовательности фрагментов генов целлюлозосинтаз из листьев, стеблей, а также апикальной части (расположенной выше точки слома [9]) растений льна-долгунца (сорт Блакіт), собранных на стадии быстрого роста (41-е сутки после посева семян). Выделение данных фрагментов и установление их нуклеотидных последовательностей описаны нами в [10–12].

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

Использовали следующие последовательности генов целлюлозосинтаз *Ar. thaliana,* депонированные в GenBank: *AtCesA1* – NM_119393, *AtCesA2* – NM_120095, *AtCesA3* – NM_120599, *AtCesA4* – NM_123770, *AtCesA5* – NM_121024, *AtCesA6* – NM_125870, *AtCesA7* – NM_121748, *AtCesA8* – NM_117994, *AtCesA9* – NM_127746, *AtCesA10* – NM_128111. Идентификация CSRII-областей в приведенных последовательностях генов осуществлялась с помощью вырожденных праймеров, предложенных в [5]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей, расчет их идентичности (на основе попарного выравнивания) и построение филогенетического дерева (алгоритм Saitou and Nei) осуществляли с применением программы AlignX (пакет VectorNTISuite 7).

Результаты и их обсуждение. Анализ данных, полученных нами в [10–12], позволил идентифицировать четыре уникальных фрагмента генов целлюлозосинтаз, которые обозначены pBS58, pBS13, pBS19 и pBA12. Данные фрагменты существенно различались между собой, что дает основание рассматривать их как фрагменты паралогичных генов (рис. 1). Следует отметить, что из листьев выделили фрагменты CSRII-области в высокой степени (более 90 %) идентичные фрагменту pBS58 и не обнаружили фрагменты, подобные pBS13, pBS19 и pBA12. В стебле идентифицировали фрагменты pBS58, pBS13 и pBS19, но не выявили фрагменты, похожие на pBA12. В апикальной части растений выявили экспрессию целлюлозосинтаз, содержавших CSRII-области, аналогичные фрагментам pBS58 и pBA12, но CSRII-области pBS13 и pBS19 обнаружить не удалось. Сходство при сопоставлении полученных CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна-долгунца приведено в табл. 1. Из данных видно, что идентичность полученных CSRII-фрагментов колеблется в пределах 54–63 %. Сходство при сопоставлении полученных CSRII-фрагментов из льна-долгунца и CSRII-областей генов целлюлозосинтаз из *Ar. thaliana* варьирует в пределах 48–75 % (табл. 2).

Фрагмент pBA12 наибольшую идентичность имеет с CSRII-областью гена *AtCesA1,* поэтому можно утверждать, что он содержит класс-специфическую область гена целлюлозосинтазы первого класса – *CesA1.* В соответствии с использованной нами методологией фрагмент pBA12 идентифицирован как CSRII-область гена *LusCesA1.* Следует отметить высокое совпадение pBA12 с *AtCesA10* – 74 %, что объяснимо: совпадение класс-специфических областей генов

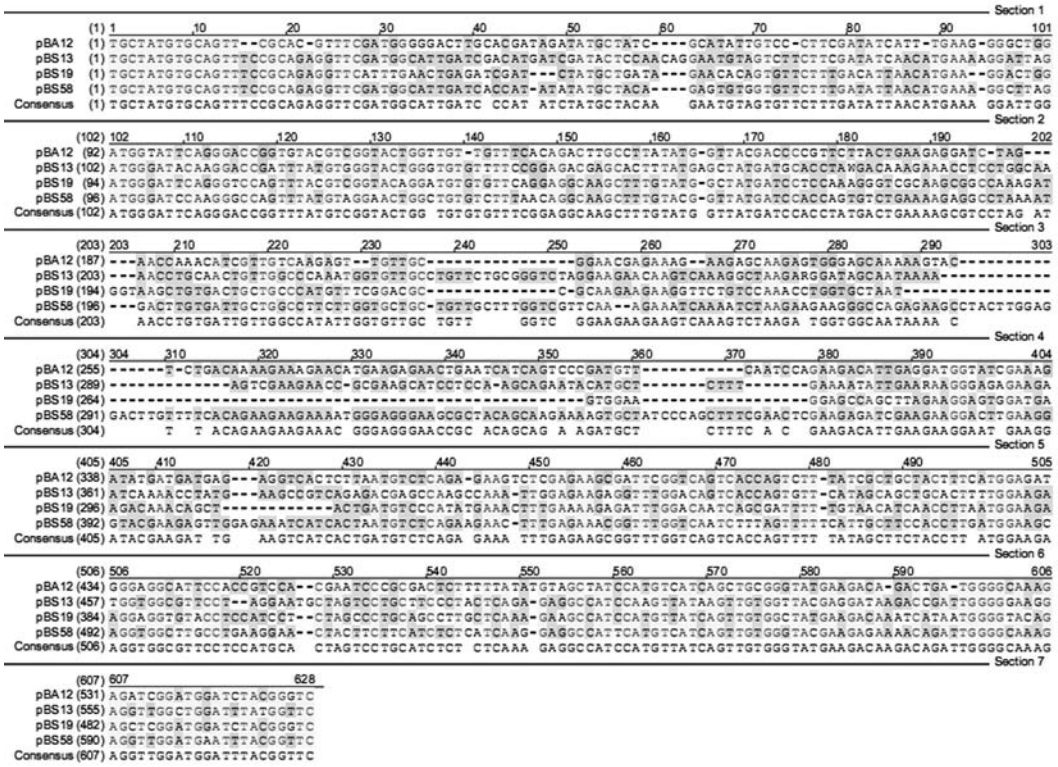

Рис. 1. Выравнивание CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна-долгунца

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

Таблица 1. **Идентичность нуклеотидных последовательностей CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз из растений льна-долгунца, %**

CSRII льна-долгунца	pBA12	pBS13	pBS19	pBS58
pBA12		56	54	56
pBS13	56		58	63
pBS19	54	58		55
pBS58	56	63	55	

Таблица 2. **Идентичность нуклеотидных последовательностей CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз из растений льна-долгунца с таковыми фрагментами из *Ar. thaliana*, %**

CesA-гены *Ar. thaliana*	*CesA*-гены льна-долгунца			
	pBA12	pBS13	pBS19	pBS58
AtCesA1	75	62	59	60
AtCesA2	60	72	59	59
AtCesA3	67	61	62	60
AtCesA4	54	55	48	63
AtCesA5	60	72	58	59
AtCesA6	61	70	59	58
AtCesA7	61	60	72	56
AtCesA8	60	58	60	58
AtCesA9	59	74	58	59
AtCesA10	74	62	59	59

Примечание. Цветом выделены наибольшие значения идентичности при попарном выравнивании CSRII-областей льна долгунца с фрагментами *CesA*-генов *Ar. thaliana*.

AtCesA1 и *AtCesA10* составляет 85 %. Сходство консервативных участков данных генов еще выше. Это обстоятельство находит свое отражение и в филогенетических отношениях указанных генов (рис. 2). Существенным отличием *AtCesA10* от *AtCesA1* являются две делеции в начале (295 п. н.) и в конце (109 п. н.) последовательности гена. Значительное сходство в нуклеотидной последовательности данных генов позволяет говорить об общности их происхождения в результате относительно недавней дупликации общего предшественника [7]. Поскольку для идентификации целлюлозосинтаз льна-долгунца в нашей работе использованы CSRII-области генов, мы не можем судить о наличии или отсутствии делеций в концевых участках генов целлюлозосинтаз льна.

Фрагмент pBS13 наибольшую идентичность по нуклеотидному составу проявляет с CSRII-областью гена *AtCesA9*, поэтому его идентифицировали как *LusCesA9.* Как и в случае с предыдущим фрагментом pBA12, фрагмент pBS13 имеет высокое сходство и с паралогами данного гена, а именно *AtCesA2*, *AtCesA5* и *AtCesA6.* Это обстоятельство согласуется с мнением об общем происхождении перечисленных генов в результате двух последовательных дупликаций. Отмечается, что расхождение генов *AtCesA2*, *AtCesA5*, *AtCesA6* и *AtCesA9* было более древним эволюционным событием по сравнению с происхождением *AtCesA1* и *AtCesA10* [7].

Фрагмент pBS19 имеет максимальную идентичность с аналогичной областью гена *AtCesA7*, поэтому его идентифицировали как CSRII-область гена *LusCesA7.* Следует также отметить, что данный фрагмент не имел высокого совпадения с CSRII-фрагментами других *CesA*-генов *Ar. thaliana*, как это наблюдалось в случае двух предыдущих фрагментов. Это можно объяснить тем, что при построении филогенетического дерева *CesA*-генов *Ar. thaliana* на основе CSRII-областей ген *AtCesA7* не образовывал кластер с другими генами целлюлозосинтаз, т. е. ген *AtCesA7* не имеет паралогов.

В случае фрагмента pBS58 наибольшая идентичность (63 %) обнаружена при сравнении его с последовательностью CSRII-области гена *AtCesA4* (табл. 2). Мы обозначили данный фрагмент как участок гена *LusCesA4*, но вынуждены признать, что сделано это на основании недостаточно высокой идентичности. Однако совпадение pBS58 с CSRII-областями других *CesA*-генов арабидопсиса были еще ниже.

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

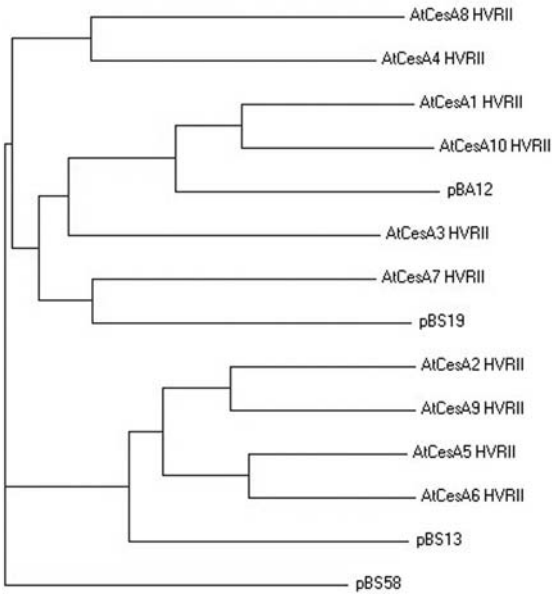

Рис. 2. Филогенетические отношения *CesA*-генов *A. thaliana* и *L. usitatissimum,* рассчитанные с использованием алгоритма присоединения ближайшего соседа

Следует особо отметить, что совпадение фрагментов pBS13 и pBS58 также составляет 63 %, но, по нашему мнению, это не является основанием причисления их к одному классу целлюлозосинтаз. На рис. 2, отражающем филогенетические отношения генов целлюлозосинтаз льна-долгунца и арабидопсиса, видно, что фрагмент pBS58 образует отдельный кластер, куда не входят другие гены. Возможно, данный ген целлюлозосинтазы является специфичным для льна-долгунца и не имеет ортологов в геноме арабидопсиса.

В табл. 3 приведены данные сравнения CSRII-области гена *LusCesA4* с генами целлюлозосинтаз растений других видов. Как видно из таблицы, наибольшую идентичность *CesA4*-ген льна-долгунца имеет с генами целлюлозосинтаз различных видов рода *Populus* (80 %), *Betula* (79 %), т. е. с генами из геномов древесных растений. Поскольку рост и развитие клеточной стенки вторичной ксилемы древесных растений не удается с точностью смоделировать на травянистых растениях, *Ar. thaliana* не всегда удовлетворяет исследователей как универсальное модельное растение. Это обстоятельство вызвало необходимость использовать в качестве модельного объекта тополь, его североамериканский вид *Populus trichocarpa* [13]. Геном *P. trichocarpa* секвенирован полностью, хотя и не имеет подробной генетической аннотации, как для *Ar. thaliana*. Возможно, для изучения генетических аспектов биогенеза льноволокна, в частности функционирования генов целлюлозосинтаз льна-долгунца, древесные растения также могли бы оказаться удобной моделью.

В экспериментах на растительных тканях четко показаны две группы генов, кодирующие целлюлозосинтазы, специфически экспрессирующиеся при биогенезе первичной и вторичной клеточной стенки [14]. Для *Ar. thaliana* функционирование продуктов генов *AtCesA1*, *AtCesA2*, *AtCesA3*, *AtCesA5*, *AtCesA6* и *AtCesA9* связывают с образованием первичной клеточной стенки, экспрессия генов *AtCesA4*, *AtCesA7* и *AtCesA8* необходима для биогенеза более толстой и механически прочной вторичной клеточной стенки. Роль *AtCesA10* пока остается неизвестной [7].

Таблица 3. **Идентичность нуклеотидных последовательностей CSRII-области целлюлозосинтазы льна *LusCesA4* при попарном сравнении с целлюлозосинтазами других растений**

Растение	Ген	Код доступа к последовательности гена	Размеры CSRII-области, п. н.	Идентичность с CSRII-областью *LusCesA4*, %
Acaci amagnum	*CesA1*	AY643519	557	64
Bambus aoldhamii	*CesA6*	DQ020214	590	65
Solanum tuberosum	*CesA4*	AY221088	572	66
Gossypium hirsutum	*CelA2*	U58284	617	76
Eucaliptus grandis	*CesA2*	DQ014506	617	77
Eucaliptus camaldulensis	*CesA2*	HQ864584	617	77
Betula platyphylla	*CesA4*	EU591532	614	79
Betula luminifera	*CesA4*	FJ410446	614	79
Ricinus communis	*CesA6*	XM_002526514	614	79
Salix sachalinensis	*CesA4*	HM043716	611	79
Populus tomentosa	*CesA4*	FJ534554	611	79
Populus tremuloides	*CesA3*	AF527387	611	80
Populus tremula x Populus tremuloides	*CesA1*	AY573571	611	80
Populus tomentosa	*CesA4*	HQ585869	611	80
Populu strichocarpa	–	XM_002301820	611	80

Scientific Periodicals NASB (online-access)
http://csl.bas-net.by/Web/Pages/magNAS.asp

На основании сравнительного анализа можно предположить, что у льна-долгунца гены *LusCesA1* и *LusCesA9* ассоциированы с синтезом первичной клеточной стенки, а *LusCesA4* и *LusCesA7* – вторичной.

Экспрессия гена *LusCesA4* отмечена во всех исследованных частях растений льна-долгунца. Ген *LusCesA1* выявлен только в апикальной части растений, что свидетельствует о функционировании данного гена в молодых тканях, где идет биосинтез первичной клеточной стенки. CSRII-области генов *LusCesA7* и *LusCesA9* обнаружены исключительно в стеблях льна-долгунца, что может указывать на участие данных генов в биогенезе льноволокна. Учитывая, что льноволокно является вторичной клеточной стенкой клеток флоэмы, из двух генов, предположительно специфичных для стебля льна-долгунца, с биосинтезом вторичной клеточной стенки ассоциирован один – *LusCesA7*, тогда как второй (*LusCesA9*) участвует в формировании первичной клеточной стенки.

Заключение. При сравнении фрагментов CSRII-области льна-долгунца с последовательностями гомологичных генов *Ar. thaliana* были индентифицированы четыре гена целлюлозосинтаз – *LusCesA1* (pBA12), *LusCesA4* (pBS58), *LusCesA7* (pBS19) и *LusCesA9* (pBS13). Первый из них, *LusCesA1*, имел 75 %-ную идентичность с геном *AtCesA1*, второй, *LusCesA4*, – 63 %-ную идентичность с *AtCesA4*, третий, *LusCesA7*, – 72 %-ную с *AtCesA7*, и четвертый, *LusCesA9*, проявлял 74 %-ную идентичность с *AtCesA9*. Гены *CesA1* и *CesA9* ассоциированы с синтезом первичной клеточной стенки, а *CesA4* и *CesA7* необходимы для биосинтеза более толстой вторичной клеточной стенки.

Полученные данные позволяют констатировать наличие экспрессии генов целлюлозосинтаз класса *CesA4*, *CesA7* и *CesA9* в стебле, *CesA1* и *CesA4* в апикальной части растений и *CesA4* в листьях растений льна-долгунца на стадии быстрого роста. Предположительно, экспрессия генов *LusCesA7* и *LusCesA9* является специфичной для стеблей льна-долгунца и может влиять на качество формируемого льноволокна.

Литература

1. *Coelho S. M., Peters A. F., Charrier B.* et al. // Gene. 2007. Vol. 406, N 1–2. P. 152–170.
2. *Bennett M. D., Leitch I. J., Price H., Johnston J.S* // Annals of Botany. 2003. Vol. 91, N 5. P. 547–557.
3. *The Arabidopsis Genome Initiative* // Nature. 2000. Vol. 408. P. 796–815.
4. *Saxena I. M., Brown R. M.* // Annals of Botany. 2005. Vol. 96. P. 9–21.
5. *Liang X., Joshi C. P.* // Tree Physiology. 2004. Vol. 24. P. 543–550.
6. *Ranik M., Myburg A. A.* // Tree Physiology. 2006. Vol. 26, N 5. P. 545–556.
7. *Kumar M., Thammannagowda S., Bulone V.* et al. // Trends in Plant Science. 2009. Vol. 14. P. 248–254.
8. *Titok V., Leontiev V., Shostak L., Khotyleva L.* // J. of Natural Fibers. 2006. Vol. 3, N 1. P. 35–41.
9. *Горшкова Т. А.* Растительная клеточная стенка как динамическая система. М., 2007.
10. *Галиновский Д. В., Леонтьев В. Н., Никитинская Т. В.* и др. // Труды БГТУ. Сер. IV. 2009. Вып. XVII. С. 178–182.
11. *Галиновский Д. В., Дубарь Д. А., Райский А. П., Титок В. В.* // Труды БГТУ. Сер. IV. 2010. Вып. XVIII. С. 266–268.
12. *Галиновский Д. В., Леонтьев В. Н., Никитинская Т. В.* и др. // Докл. НАН Беларуси. 2010. Т. 54, № 3. С. 92–97.
13. *Janson S., Douglas C. J.* // Annu Rev Plant Biol. 2007. Vol. 58. P. 435–458.
14. *Burton R. A., Farrokhi N., Bacic A., Fincher G. B.* // Planta. 2005. Vol. 221, N 3. P. 309–312.

D. V. GALINOUSKY, N. V. ANISIMOVA, V. N. LEONTIEV, V. V. TITOK, L. V. KHOTYLEVA

dimgal200@rambler.ru

CesA-GENES ORTHOLOGS OF _ARABIDOPSIS THALIANA_ L. IN FIBER FLAX (_LINUM USITATISSIMUM_ L.)

Summary

In this article, a comparative analysis of the cellulose synthase CSRIIs of fiber flax with *CesA*-genes of *Arabidopsis thaliana* L. was made. The high identity grade (more than 70 %) of the cellulose synthase genes of fiber flax with the homological gene sequences of *Ar. thaliana* was determined for three of the four examined fragments. One tested fragment exhibited the low identity (63 %) with *CesA*-genes of *Ar. thaliana*. The cellulose synthase genes of fiber flax, which were named *LusCesA1, LusCesA4*, *LusCesA7* and *LusCesA9,* were identified using the sequences of CSRIIs.