

**ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В
РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM
USITATISSIMUM* L.)**¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск²Белорусский государственный технологический университет, Минск

Введение. Синтез целлюлозы – один из важнейших биохимических процессов в растительных клетках, тем не менее, его молекулярные механизмы на сегодняшний день изучены слабо. Несмотря на это, определен основной компонент, участвующий в этом процессе – это совокупность 36-ти полипептидов, образующих трансмембранную целлюлозосинтазную розетку. Данные пептиды 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 [1]. Частично исследования молекулярно-генетических процессов, обеспечивающих биосинтез целлюлозы, выполнялись на популярном модельном растении - резуховитке таля (*Arabidopsis thaliana*) и различных его мутантах [2]. Было установлено, что гены целлюлозосинтаз можно идентифицировать не только по их полноразмерным последовательностям, но и по последовательностям классоспецифических гипервариабельных областей (HVRII-области), т.е. по фрагментам генов [1].

Особую научную и практическую значимость имеют исследования целлюлозосинтаз льна-долгунца, поскольку основным полимером льноволокна является целлюлоза. Содержание целлюлозы может достигать 70% от массы зрелого волокна [3].

Целью данной статьи является идентификация генов целлюлозосинтаз льна-долгунца по их HVRII-фрагментам.

Материалы и методы. Для идентификации генов целлюлозосинтаз льна-долгунца их HVRII-последовательности сравнивали с HVRII-фрагментами *CesA*-генов *Ar. thaliana*. Использовали следующие последовательности генов целлюлозосинтаз из *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. В работе использовали последовательности HVRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна-долгунца (сорт Блакіт, стадия развития – быстрый рост), полученные нами экспериментально в предыдущих исследованиях, которые подробно описаны в серии наших публикаций [4-6].

Для доступа к серверам GenBank использовали пакета программ BLAST 2.2.20. Для хранения и анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Vector NTI Suite 7. Выравнивание нуклеотидных

последовательностей, расчет их идентичности осуществляли с помощью программы AlignX из указанного пакета.

Результаты и их обсуждение. Анализ данных, полученных нами в предшествующих исследованиях, позволил идентифицировать четыре уникальных фрагмента генов целлюлозосинтаз, которые были обозначены pBS58, pBS13, pBS19 и pBA12. Причем из листьев выделяли фрагменты HVRII-области в высокой степени (более 90%) идентичные фрагменту pBS58 и не обнаруживали фрагменты похожие на pBS13, pBS19 и pBA12. В стебле идентифицировали фрагменты pBS58, pBS13 и pBS19, но не обнаружили фрагменты похожие на pBA12. В апикальной части растений обнаруживали экспрессию целлюлозосинтаз, содержавших HVRII-области похожие на фрагменты pBS58 и pBA12, но не обнаруживали HVRII-области pBS13 и pBS19. Сходство при сопоставлении полученных HVRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз между собой приведено в таблице 1.

Таблица 1 - Идентичность (в %) нуклеотидных последовательностей HVRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз из растений льна-долгунца

	pBA12	pBS13	pBS19	pBS58
pBA12		56	54	56
pBS13	56		58	63
pBS19	54	58		55
pBS58	56	63	55	

Из данных таблицы 1 видно, что идентичность полученных HVRII-фрагментов колеблется в пределах 54-63%. Сходство при сопоставлении полученных HVRII-фрагментов из льна-долгунца и HVRII-областей генов целлюлозосинтаз из *Ar. thaliana* варьирует в пределах 48-75% (таблица 2).

Таблица 2 - Идентичность (в %) нуклеотидных последовательностей HVRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз из растений льна-долгунца с таковыми фрагментами из *Ar. thaliana*

	pBA12	pBS13	pBS19	pBS58
<i>AtCesA1</i>	75	62	59	60
<i>AtCesA2</i>	60	72	59	59
<i>AtCesA3</i>	67	61	62	60
<i>AtCesA4</i>	54	55	48	63
<i>AtCesA5</i>	60	72	58	59
<i>AtCesA6</i>	61	70	59	58
<i>AtCesA7</i>	61	60	72	56
<i>AtCesA8</i>	60	58	60	58
<i>AtCesA9</i>	59	74	58	59
<i>AtCesA10</i>	74	62	59	59

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

Фрагмент pBA12 наибольшую идентичность имеет с HVRII-областью гена *AtCesA1*, поэтому можно утверждать, что он содержит гипервариабельную область гена целлюлозосинтазы первого класса – *LusCesA1*. Следует отметить,

что также высокое совпадение наблюдается у рВА12 с *AtCesA10* – 74%, что объяснимо, поскольку совпадение гипервариабельных областей генов *AtCesA1* и *AtCesA10* между собой составляет 85%, сходства консервативных участков данных генов более значительны. 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 использовали HVRII-области данных генов, то мы не можем судить о наличии или отсутствии делеций в начале или конце исследуемого гена целлюлозосинтазы льна-долгунца. В соответствии с использованной нами методологией идентифицировали рВА12 как HVRII-область гена *LusCesA1*.

Фрагмент рBS13 наибольшую идентичность по нуклеотидному составу демонстрирует с HVRII-областью гена *AtCesA9*, поэтому его идентифицировали как *LusCesA9*. Как и в случае с предыдущим фрагментом рВА12, данный фрагмент демонстрирует высокую идентичность и с паралогами данного гена, а именно: *AtCesA2*, *AtCesA5* и *AtCesA6*. Это обстоятельство согласуется с мнением общего происхождения перечисленных генов в результате двух последовательных дупликаций. Отмечается, что расхождения генов *AtCesA2*, *AtCesA5*, *AtCesA6* и *AtCesA9* было более древним эволюционным событием по сравнению с происхождением *AtCesA1* и *AtCesA10* [7].

Фрагмент рBS19 имел наибольшую идентичность с той же областью гена *AtCesA7*, поэтому его идентифицировали как HVRII-область гена *LusCesA7*. Следует также отметить, что данный фрагмент не имел высокого совпадения с HVRII-фрагментами других *CesA*-генов *Ar. thaliana*, как это было в случае двух предыдущих фрагментов. Это можно объяснить тем, что ген *AtCesA7* не имеет паралогов.

В случае фрагмента рBS58 наибольшую идентичность обнаружили при сравнении его с последовательностью HVRII-области гена *AtCesA4*. Совпадение с HVRII-областями других *CesA*-генов резуховитки были ниже. Мы обозначили здесь данный фрагмент как участок гена *LusCesA4*, но вынуждены признать, что сделано это на основании достаточно низкой идентичности. Следует особо отметить, что совпадение фрагментов рBS13 и рBS58 между собой также составляет 63%, но для нас это не является основанием отнести их к одному классу целлюлозосинтаз. Возможно, данный ген целлюлозосинтазы является специфичным для льна-долгунца и не имеет ортологов в геноме *Ar. thaliana*.

Экспериментальная экспрессия гена *LusCesA4* обнаруживалась во всех исследованных частях растений льна-долгунца, *LusCesA1* обнаруживали только в апикальной части растений, что может свидетельствовать о функционировании данного гена в молодых тканях, где идет биосинтез первичной клеточной стенки. HVRII-области генов *LusCesA7* и *LusCesA9* обнаруживали в стеблях льна-долгунца, что может указывать на участие данных генов в биогенезе льноволокна.

Заключение. При сравнении фрагментов HVRII-области льна-долгунца с последовательностями гомологичных генов *A. thaliana* были идентифицированы четыре гена целлюлозосинтаз – *LusCesA1* (pBA12), *LusCesA4* (pBS58), *LusCesA7* (pBS19) и *LusCesA9* (pBS13). Первый из них – *LusCesA1* – имел 75% идентичность с геном *AtCesA1*, второй – *LusCesA4* – 63% идентичность с *AtCesA4*, третий, *LusCesA7*, – 72% с *AtCesA7* и четвертый, *LusCesA9*, проявлял 74% идентичность с *AtCesA9*. Полученные данные позволяют констатировать наличие экспрессии целлюлозосинтаз класса *CesA4*, *CesA7* и *CesA9* в стебле, *CesA1* и *CesA4* в части растений, расположенной выше точки слома, 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. Дальнейшее изучение экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза целлюлозы в клеточных стенках волокна льна-долгунца, на основе современных молекулярно-генетических методов может повысить эффективность отбора генотипов с высокими технологическими свойствами лубяного волокна.

Литературные источники

1. Ranik M. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis // *Tree Physiology*. — 2006. — Vol. 26. — P. 545–556.
2. Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка как динамическая система / Т.А. Горшкова – М.: Наука, 2007. – 429 с.
3. Thermogravimetric analysis of the flax bast fiber bundle / V. Titok [et al.] // *Journal of Natural Fibers*. – 2006. – Vol. 3, N 1. – P 35-41.
4. Генетический контроль биосинтеза целлюлозы при формировании микрофибрилл у льна-долгунца / Д.В. Галиновский [и др.] // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия, технология орган. в-в и биотехнология*. – 2010. – Вып. XVIII. – С. 266-268.
5. Молекулярно-генетический анализ целлюлозосинтаз, экспрессирующихся в различных органах растений льна-долгунца / Д. В. Галиновский [и др.] // *Труды БГТУ. Сер. IV* – 2009. – Вып. XVII. – С. 178-182.
6. Идентификация *CesA*-генов, экспрессирующихся в стеблях растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / Д. В. Галиновский [и др.] // *Докл. НАН Беларуси*. - 2010. - Т. 54, № 3. - С. 92-97.
7. 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.

*D.V. Galinovsky*¹, *A.P. Raiski*²

THE CELLULOSE SYNTHESIS CONTROLLING GENES IN DIFFERENT PLANTS' PARTS OF FIBER FLAX

¹*Institute of Genetics and Cytology, Minsk*

²*Belarusian State Technological University, Minsk*

Summary

In this work the comparative analysis of the cellulose synthase HVRII's of fiber flax with *CesA*-genes of *Arabidopsis thaliana* was made. The high identity grade of the cellulose synthase genes of fiber flax with the homological gene sequences of *Ar. thaliana* was determined. The cellulose synthase genes of fiber flax, which were named *LusCesA1*, *LusCesA4*, *LusCesA7* and *LusCesA9*, using the sequences of HVRII's were identified.