

## БИОЛОГИЯ

УДК 631.547:581.19:633.521

Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ<sup>1</sup>, Н. В. АНИСИМОВА<sup>1</sup>, В. Н. ЛЕОНТЬЕВ<sup>2</sup>,  
В. В. ТИТОК<sup>3</sup>, академик Л. В. ХОТЫЛЕВА<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск

<sup>3</sup>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 (CSR-II-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 CSR-II-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].



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 CSR II-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 CSR II-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 CSR II-области, аналогичные фрагментам pBS58 и pBA12, но CSR II-области pBS13 и pBS19 обнаружить не удалось. Сходство при сопоставлении полученных CSR II-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна-долгунца приведено в табл. 1. Из данных видно, что идентичность полученных CSR II-фрагментов колеблется в пределах 54–63 %. Сходство при сопоставлении полученных CSR II-фрагментов из льна-долгунца и CSR II-областей генов целлюлозосинтаз из *Ar. thaliana* варьирует в пределах 48–75 % (табл. 2).

Фрагмент pBA12 наибольшую идентичность имеет с CSR II-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 CSR II-область гена *LusCesA1*. Следует отметить высокое совпадение pBA12 с *AtCesA10* – 74 %, что объяснимо: совпадение класс-специфических областей генов

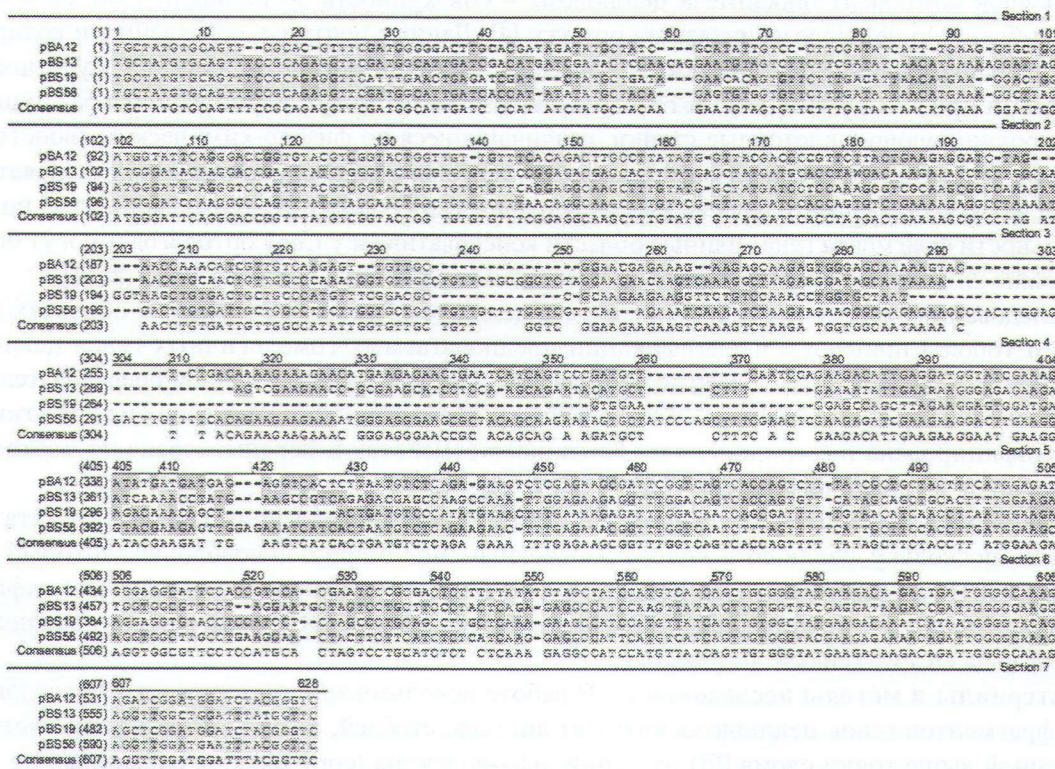


Рис. 1. Выравнивание CSR II-фрагментов генов целлюлозосинтаз льна-долгунца



Т а б л и ц а 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	

Т а б л и ц а 2. Идентичность нуклеотидных последовательностей CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтаз из растений льна-долгунца с таковыми фрагментами из *Ar. thaliana*, %

<i>CesA</i> -гены <i>Ar. thaliana</i>	<i>CesA</i> -гены льна-долгунца			
	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

П р и м е ч а н и е. 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.



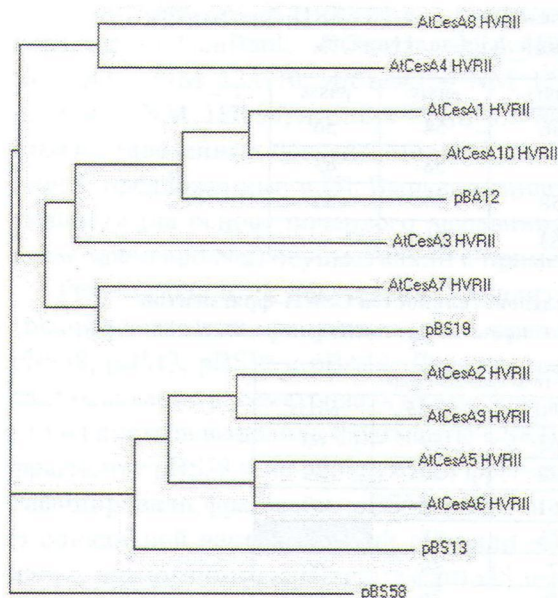


Рис. 2. Филогенетические отношения *CesA*-генов *A. thaliana* и *L. usitatissimum*, рассчитанные с использованием алгоритма присоединения ближайшего соседа

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].

Т а б л и ц а 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 <i>LusCesA4</i> , %
<i>Acacia mangium</i>	<i>CesA1</i>	AY643519	557	64
<i>Bambusa aoldhamii</i>	<i>CesA6</i>	DQ020214	590	65
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>CesA4</i>	AY221088	572	66
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>CelA2</i>	U58284	617	76
<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>CesA2</i>	DQ014506	617	77
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>CesA2</i>	HQ864584	617	77
<i>Betula platyphylla</i>	<i>CesA4</i>	EU591532	614	79
<i>Betula luminifera</i>	<i>CesA4</i>	FJ410446	614	79
<i>Ricinus communis</i>	<i>CesA6</i>	XM_002526514	614	79
<i>Salix sachalinensis</i>	<i>CesA4</i>	HM043716	611	79
<i>Populus tomentosa</i>	<i>CesA4</i>	FJ534554	611	79
<i>Populus tremuloides</i>	<i>CesA3</i>	AF527387	611	80
<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	<i>CesA1</i>	AY573571	611	80
<i>Populus tomentosa</i>	<i>CesA4</i>	HQ585869	611	80
<i>Populus trichocarpa</i>	—	XM_002301820	611	80



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 идентифицированы 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.