

УДК 631.547:581.19:633.521

Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ¹, В. Н. ЛЕОНТЬЕВ², Т. В. НИКИТИНСКАЯ¹, А. П. РАЙСКИЙ²,
академик Л. В. ХОТЫЛЕВА¹, В. В. ТИТОК¹

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *CesA*-ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В СТЕБЛЯХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск,²Белорусский государственный технологический университет, Минск

Поступило 23.12.2009

Введение. Лен является важной технической культурой Беларуси. Льняные ткани обладают хорошими техническими и гигиеническими свойствами, которые определяются особенностями строения волокон, получаемых из стеблей льна-долгунца. По химическому составу льняное волокно включает четыре основных компонента: гемицеллюлозу, пектин, целлюлозу и лигнин. Целлюлоза может составлять до 70 % массы зрелого волокна [1], а особенности пространственной упаковки целлюлозных микрофибрилл определяют параметры качества льноволокна.

С биологической точки зрения волокно стебля льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) представляет собой индивидуальную растительную клетку [2]. Морфолого-анатомические особенности данных клеток определяются гипертрофированным развитием вторичной клеточной стенки (рис. 1). Она занимает основную часть клетки, только маленький просвет внутри массивной оболочки составляет собственно «содержимое» клетки. Такая структурная организация связана с функциональной ориентацией клеток луба на синтез компонентов клеточной стенки. Современные данные свидетельствуют о динамизме и изменениях состава клеточной стенки, а также о наличии механизмов тонкой регуляции этих изменений. Практически во всех клетках растительных тканей происходят существенные перестройки в структуре клеточной стенки, связанные с заменой первичной клеточной стенки на вторичную. В результате этих изменений возрастает доля целлюлозы, увеличивается степень полимеризации данного полимера [3], а также изменяется пространственная ориентация целлюлозных микрофибрилл в структурах клеточной стенки [4]. До середины 1990-х годов много сил прилагалось для изучения синтеза целлюлозы

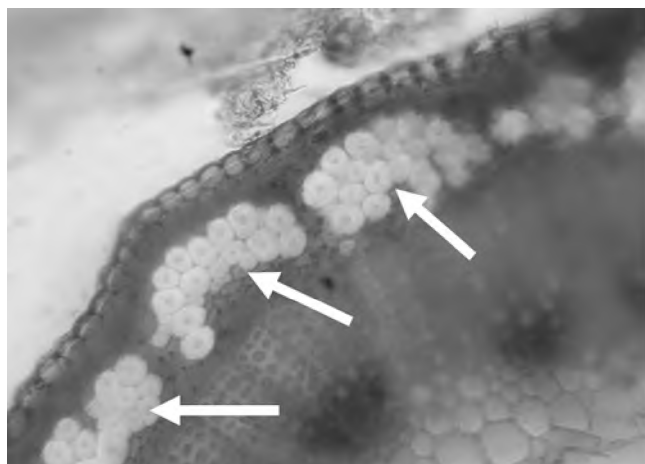


Рис. 1. Поперечный срез стебля льна-долгунца (сорт Блакіт, Беларусь). Стрелками обозначены пучки клеток лубяных волокон

в высших растениях, однако эти попытки были неудачными по нескольким причинам. Первая из них – это сложность строения целлюлозосинтезирующего комплекса. Данный комплекс (целлюлозосинтезирующая «роетка»), включающий 36 целлюлозосинтаз, образует микрофибриллу целлюлозы, состоящую из 36 глюкановых цепей. В качестве второй причины неэффективности биохимических подходов указывается низкая активность комплекса *in vitro*, так как ферментативной активностью обладает комплекс, связанный с клеточной мембраной. Успешные эксперименты на *Acetobacter xylinum*, позволившие идентифицировать гены, обеспечивающие образование целлюлозосинтезирующих ферментов у бактерий,

открыли возможности поиска гомологичных генов в растительных библиотеках кДНК [5]. С помощью молекулярно-генетических методов были идентифицированы гены целлюлозосинтаз высших растений (*CesA*-гены).

До настоящего времени подходы молекулярной генетики остаются наиболее перспективными инструментами 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 [6]. На геномном уровне различия связаны с экспрессией разных генов целлюлозосинтаз, продукты которых формируют различные «розетки». Поэтому от того, какие именно целлюлозосинтазы вовлечены в процесс биогенеза клеточной стенки зависят и физико-химические свойства полимера и качество технического волокна, которое напрямую связано с удлинением лубяных клеток и динамикой утолщения вторичной клеточной стенки у этих клеток.

Цель работы – идентификация *CesA*-генов, экспрессирующихся в стеблях растений льна-долгунца и обеспечивающих формирование вторичной клеточной стенки лубяных волокон.

Материалы и методы исследований. В качестве растительного материала отбирали стебли растений льна-долгунца (сорт Блакіт, 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 [7]. ПЦР проводили при следующих условиях: после 4 мин при 95 °С выполняли 30 циклов – 60 с при 94 °С, 90 с при 41 °С и 120 с при 72 °С, затем финальная элонгация – 10 мин при 72 °С.

Аmplифицированные фрагменты клонировали в плазмидный вектор pTZ57R в бактерии *E. coli* XL1-Blue с использованием 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 °С выполняли 25 циклов – 60 с при 94 °С, 60 с при 51 °С и 60 с при 72 °С, финальная стадия – 10 мин при 72 °С.

Последующее разделение продуктов ПЦР-реакции осуществляли при помощи электрофореза. В работе использовали метод горизонтального электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с использованием ТАЕ-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 %-ным 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 ресурса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> при помощи программы *nucleotide blast*, алгоритм *discontiguous megablas*.

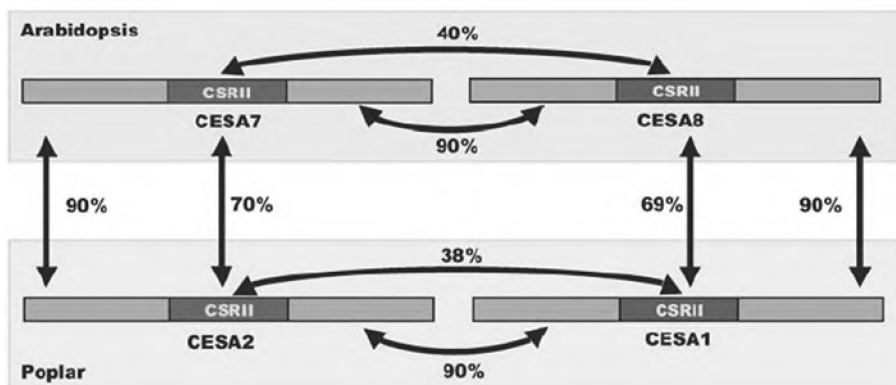


Рис. 2. Схематическое изображение CSR II (HVR II)-области у CESA-белков высших растений [8]

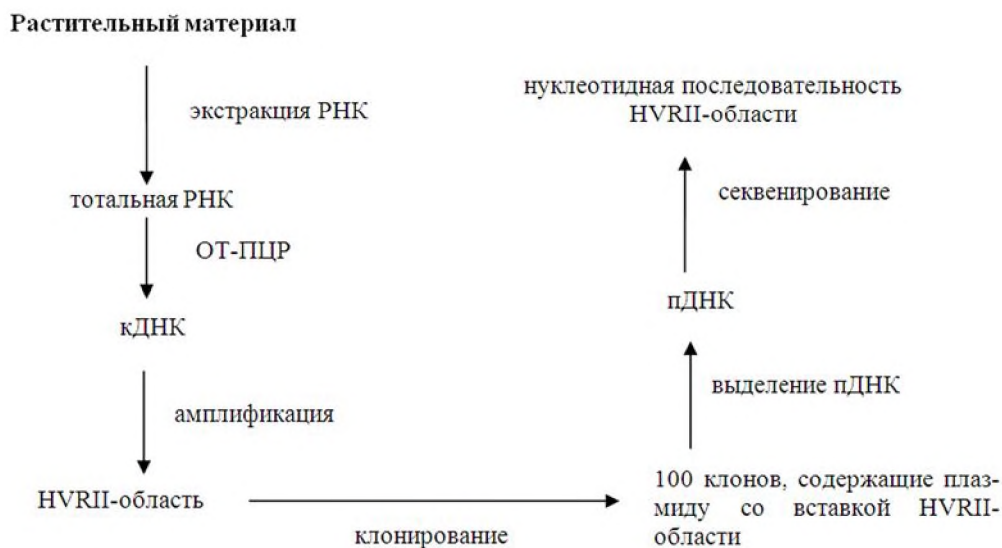


Рис. 3. Общая схема эксперимента

Результаты и их обсуждение. Для идентификации *CesA*-генов использовали известные особенности структуры *CESA*-белков, гены которых составляют полигенное семейство целлюлозосинтаз. Эта особенность заключается в наличии классоспецифической гипервариабельной области (HVRII-области), фланкированной консервативными доменами (рис. 2). *CESA*-белки содержат HVRII-домены (или CSRII-домены), которые консервативны среди *CESA*-ортологов и различаются у *CESA*-паралогов. Поэтому CSRII можно использовать для идентификации членов мультигенного семейства целлюлозосинтаз (рис. 2). Используя пример, приведенный на рис. 2, к одному классу целлюлозосинтаз можно отнести *CesA7* арабидопсиса и *CesA2* тополя, а также *CesA8* арабидопсиса и *CesA1* тополя.

Особенности структуры указанных белков обуславливаются нуклеотидной последовательностью генов, в строении которых тоже можно выделить HVRII-области. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз льна-долгунца с таковыми арабидопсиса позволяет идентифицировать целлюлозосинтазы льна-долгунца. Для идентификации *CesA*-генов необходимо получение нуклеотидных последовательностей HVRII-областей генов целлюлозосинтаз (рис. 3).

Из растительного материала выделяли общую РНК, затем с помощью ОТ-ПЦР и праймеров к консервативным доменам, фланкирующим HVRII-область, синтезировали кДНК. Используя в качестве матрицы полученную кДНК, амплифицировали HVRII-область и получили ПЦР-продукт, размером ок. 600 п. н. (рис. 4). После проведения ПЦР-реакции фрагмент пересаждали холодным этанолом. Полученный ПЦР-продукт содержал «смесь» HVRII-областей целлюлозосинтаз, которые экспрессировались в стебле в тот момент, когда срезали растение. Невозможно секвенировать амплифицированный фрагмент на этой стадии, а необходимо разделить «смесь» до «индивидуальных» продуктов.

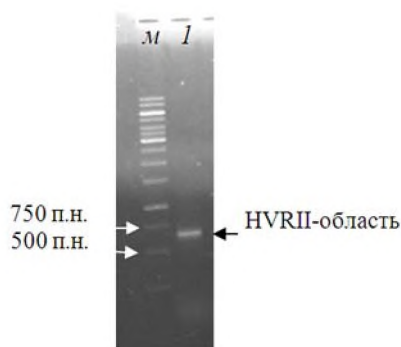


Рис. 4. Электрофореграмма HVRII-области: *м* – маркерные фрагменты (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas); *l* – HVRII-область целлюлозосинтаз из стебля льна-долгунца

Клонирование ПЦР-продукта проводили в плазмидный вектор с последующей трансформацией. В процессе клонирования лигирование вектора и вставки осуществляется в эквимольных количествах, а при трансформации в одну бактериальную клетку попадает одна химерная плаزمид. В итоге

каждая бактериальная колония, которая является потомком одной клетки, несет плазмиду с «индивидуальной» HVRII-областью. После трансформации было отобрано 113 клонов, которые несли вставку в плазмидный вектор. Размеры ПЦР-фрагментов отличаются в достаточно широких пределах (рис. 5): № 2, 6, 14 имели очень легкие фрагменты, а № 5 был наоборот тяжелее обычного. Из общего количества 113 отобранных клонов 98 имели вставку размером 600–650 п. н., 12 – 350–150 п. н. и 3 клон несли плазмиду со вставкой размером около 800 п. н. Нужно отметить, что из-за особенностей строения полиленкера плазмиды pTZ57R размер ПЦР-фрагмента увеличивается на 153 нуклеотида.

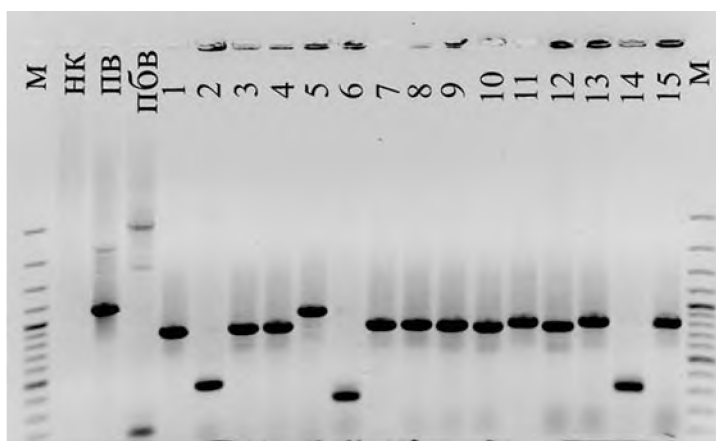


Рис. 5. Фрагменты HVRII-области стебля льна-долгунца, амплифицированных на пДНК: *M* – маркерные фрагменты (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas); *HK* – негативный контроль; *PB* – контрольная плазмид со вставкой ок. 1 т. п. н.; *пбв* – контрольная плазмид, не содержащая вставки в полилинкер; *1–15* – фрагменты, полученные при проверке трансформантов

Последующее определение нуклеотидной последовательности клонированных фрагментов позволило определить, что наиболее «типичная» вставка, содержащаяся в полученной нами плазмиде pBS58, составляет 611 нуклеотидов (рис. 6). Секвенирование легких фрагментов и анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что они идентичны концевым участкам сиквенса HVRII-фрагмента pBS58. Наличие фракции легких фрагментов в данном случае не свидетельствует о полиморфизме HVRII-областей генов целлюлозосинтазы, что дает нам основание для исключения их из дальнейшей работы.

При анализе нуклеотидных последовательностей размером ок. 600 п. н. оказалось, что они (за исключением двух фрагментов в составе плазмид pBS13 и pBS19) 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). Наиболее существенное различие, которое удалось обнаружить при сравнении pBS58 и pBS55 касалось участка HVRII-области между 513 и 526 нуклеотидами (рис. 7).

	BamHI
1	TGCTATGTGC AGTTCCCGCA GAGGTTCCGAT GGCATTGATC ACCATATATA TGCTACAGAG TGTGGTGTTC TTTGATATTA ACATGAAAAGG CTTAGATGGG ACGATACACG TCAAAGCCGT CTCGAAGCTA CCGTAACTAG TGGTATATAT ACGATGTCTC ACACCACAAG AAAATATAAT TGTACTTTCC GAATCTACCC
	BamHI HindIII
101	ATCCAAGGGC CAGTTTATGT AGGAACTGGC TGTGTCTTTA ACAGGCAAGC TTTGTACGGT TATGATCCAC CAGTGTCTGA AAAGAGGCCCT AAAATGACTT TAGGTTCCCG GTCAAATACA TCGTTGACCG ACACAGAAAT TGTCCGTTCC AAACATGCCA ATACTAGGTG GTCACAGACT TTTCTCCGGA TTTTACTGAA
201	GTGATTGCTG GCCTTCTTGG TGCTGCTGTT GCTTTGGTCC TTTCAAAGAA TCAAATCTA AGAAGAAGGG CCAGAGAAGC CTACTTGGAG GACTTGTTTT CACTAACGAC CGGAAGAACC ACGACGACAA CGAAACCAGC AAGTTTCTTT AGTTTTAGAT TCTTCTTCCC GGTCTCTTCG GATGAACCTC CTGAACAAAA
301	CACAGAAGAA GAAAATGGGA GGAAGCCGT ACAGCAAGAA AAGTGTATC CCAGCTTCCG AACTCGAAGA GATCGAAGAA GGACTTGAAG GGTACGAAGA GTGTCTTCTT CTTTACCCCT CCGTCCGCGA TGTCCTTCTT TTCACGATAG GGTGGAAGC TTGAGCTTCT CTAGCTTCTT CCTGAACCTC CCAATGCTTCT
401	GTGGGAGAAA TCATCACTAA TGTCTCAGAA GAATCTTGGG AAACGGTTTG GTCATCTTT AGTTTTTCAT TGCTTCCACC TTGATGGAAG CAGGTGGCTT CAACCTCTTT AGTAGTGATT ACAGAGTCTT CTGAAACTC TTTGCCAACC CAGTTAGAAA TCAAAAAGTA ACGAAGGTGG AACTACCTTC GTCCACCGAA
501	GCCTGAAGGA ACTACTTCTT CATCTCTCAT CAAAGGAGCC ATTCATGTCA TCAGTTGTGG GTACGAAGAG AAAACAGATT GGGGCAAGA GGTGGATGA CGGACTTCTT TGAAGAAGAA GTAGAGAGTA GTTCTCCCGG TAAGTACAGT AGTCAACACC CATGCTTCTC TTTTGTCTAA CCGCTTCTT CCAACCTACT
601	ATTTACGGTT C TAAATGCCAA G

Рис. 6. Нуклеотидная последовательность HVRII-области целлюлозосинтазы из стебля льна-долгунца (плазмид pBS58)

	509	520	530
pBS58	GAAC	TACTTCTTCATCTCTCATCA	
pBS55	GAAGCAGGTC	-----TCTCATCA	

Рис. 7. Участок HVRII-области, в котором обнаружены различия

Эти изменения затрагивают пять нуклеотидных триплетов, что, в зависимости от положения рамки считывания, может приводить к изменению до пяти аминокислотных остатков в продуктах данных генов. Благодаря тому, что делеция в шесть нуклеотидов соответствует двум триплетам (рис. 7), не происходит сдвига рамки считывания, и изменения в первичной структуре продуктов указанных

генов носят локальный характер. В зависимости от первоначального шага рамки считывания принципиально возможны три варианта (здесь рассматривается только одно направление трансляции, которое наиболее вероятно) изменения первичной структуры полипептида:

+1) Glu–Leu–Leu–Leu–His–Leu–Ser–(pBS58)
 Glu–Ala–Glu–Leu –Ser–(pBS55);

+2) Asn–Tyr–Phe–Phe–Ile–Ser–(pBS58)
 Lys–Gln–Val– –Ser (pBS55);

+3) Thr–Thr–Ser–Ser–Ser–Leu–(pBS58)
 Ser–Arg–Ser –Leu–(pBS55).

Конечно, сложно рассматривать изменения в какой-то части белка в отрыве от общей структуры молекулы, но мы можем сказать, что эти изменения затрагивают как минимум четыре аминокислоты, причем наиболее существенные изменения касаются второго варианта. Здесь происходит потеря двух гидрофобных аминокислот (фенилаланин и изолейцин) и значимое изменение трех предшествующих триплетов, причем в одном случае гидрофобная аминокислота аспарагин меняется на гидрофильный лизин. Согласно данным, полученным с помощью программы blastx, наиболее вероятное положение рамки считывания соответствует третьему из приведенных здесь вариантов. В этом случае происходит связанная с делецией потеря двух серинов и замена двух треонинов – первого на серин, а второго на аргинин.

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* (NM 127746.1). Нуклеотидная последовательность гипервариабельной области целлюлозосинтазы плазмиды pBS19 обнаруживала 79 %-ную идентичность с *CesA2* геном *P. tremuloides* (AY 095297.1) и 74 %-ную идентичность с *CesA7 A. thaliana*, также известным как *Irx3* (NM 121748.3). 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* – продемонстрировал 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 перспективности 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. Titok V., Leontiev V., Shostak L., Khotyleva L. // J. of Natural Fibers. 2006. Vol. 3, N 1. P. 35–41.
2. Горшкова Т. А., Агеева М. В., Сальников В. В. и др. // Ботан. журн. 2003. Т. 88, № 12. С. 1–11.
3. Mutwil M., Debolt S., Persson S. // Current Opinion in Plant Biology. 2008. Vol. 11, N 3. P. 252–257.
4. Горшкова Т. А. Растительная клеточная стенка как динамическая система. М., 2007.

5. Pear J.R., Kawagoe Y., Schreckengost W.E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93, N 22. P. 12637–12642.
6. Burton R. A., Farrokhi N., Bacic A., Fincher G. B. // Planta. 2005. Vol. 221, N 3. P. 309–312.
7. Liang X., Joshi C. P. // Tree Physiology. 2004. Vol. 24, N 5. P. 543–550.
8. Ranik M. // Tree Physiology. 2006. Vol. 26, N 5. P. 545–556.

GALINOUSKY D. V., LEONTIEV V. N., NIKITINSKAYA T. V., RAISKI A. P., KHOTYLEVA L. V., TITOK V. V.

dimgal200@rambler.ru

**IDENTIFICATION OF *CesA*-GENES EXPRESSED IN THE STEMS OF FIBER FLAX PLANTS
(*LINUM USITATISSIMUM* L.)**

Summary

We have identified the cellulose synthase genes that are involved in the fiber formation in fiber flax stems. We have compared the HVRII fragments amplified on cDNA matrix that was 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 the expression of cellulose synthase genes of the *CesA4*, *CesA7* and *CesA9* classes in fiber flax stems at the rapid growth phase.