

УДК 631.547:581.19:633.521

З. Е. Грушецкая, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;  
Д. В. Галиновский, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;  
В. А. Лемеш, зам. директора ИГиЦ НАН Беларуси;  
В. Н. Леонтьев, доцент;  
В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГЕНОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗЫ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК РАСТЕНИЙ

Cellulose synthase catalytic subunit genes, *CesA*, have been discovered in several higher plant species, and it was shown that the *CesA* gene family had multiple members. The aim of this study is development of specific molecular markers to *CesA-1* and *CesA-6* genes encoding corresponding cellulose synthase subunits of flax. Two pairs of specific primers to the certain fragments of *CesA-1* and *CesA-6* genes were developed based on comparison of six *CesA* EST sequences of flax obtained from GenBank (EF409998-EF410000, EF214742-EF214744). After the amplification of flax cDNA, bands of expected size were detected (201 and 300 b.p. for the *CesA-1* and *CesA-6* respectively). The identity of the obtained PCR fragments to the *CesA* EST loci was proved by sequencing. The developed markers can be used for identifying these genes and estimating their expression by the quantitative Real-time PCR.

**Введение.** Вторичная клеточная стенка растений представляет собой каркас из сложных биополимеров и включает четыре основных химических компонента: гемицеллюлозу, пектин, целлюлозу и лигнин, причем преобладают в основном два последних. О путях биосинтеза лигнина известно сравнительно много, в то время как особенности регуляции синтеза целлюлозы и факторы, контролирующие количество и качество целлюлозной составляющей вторичной клеточной стенки, изучены недостаточно.

Основными генами, участвующими в синтезе целлюлозной составляющей клеточной стенки, являются собственно гены целлюлозосинтазы (*CesA*) и целлюлозосинтаза-подобные гены (*Csl*) [1, 2]. Гены *CesA* высших растений принадлежат к мультигенному семейству: в геноме *Arabidopsis* обнаружено 10 *CesA* генов, у риса и кукурузы – 12, ячменя – 8 и около 18 *CesA* генов – в геноме тополя [3–5]. Установлено, что в образовании целлюлозосинтезирующего комплекса (так называемой «розетки») участвуют несколько различных *CesA* белков и как минимум три *CesA* гена транскрибируются одновременно; это свидетельствует о том, что три различных белка целлюлозосинтазы формируют функциональный целлюлозосинтезирующий комплекс. Показано, что в биосинтезе первичной и вторичной клеточной стенки участвуют продукты определенных *CesA* генов растений [4, 6, 7].

В настоящее время в мировой базе данных депонировано более 1000 фрагментов кДНК *CesA* генов злаковых, масличных, древесных и технических культур. Для всех *CesA* белков

показана сходная доменная структура, состоящая из двух N-терминальных и шести C-терминальных трансмембранных доменов. В N-терминальной области *CesA* протеина находится домен «цинковые пальцы», который, по всей видимости, отвечает за взаимодействие различных CESA белков между собой. За ним следует первая из двух гипервариабельных областей (HVR I), которая более консервативна среди *CesA* ортологов, чем среди паралогичных *CesA* генов [4]. Вторая гипервариабельная область (HVR II) ограничена двумя консервативными субдоменами (A и B) и более известна как классоспецифичная область (CSR) [8, 9]. Показано, что нуклеотидные и аминокислотные последовательности HVR2 областей различных *CesA* генов одного растения более изменчивы, чем HVR2 области ортологичных *CesA* генов различных видов растений. Поскольку субдомены A и B, фланкирующие HVR2 область, отличаются высоким консерватизмом среди всех изученных до настоящего времени видов растений, к ним возможно разработать универсальные вырожденные ПЦР-праймеры и амплифицировать вариабельный HVR II фрагмент *CesA* гена для любого вида растений.

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) является удобной модельной системой для фундаментального изучения процессов роста, дифференциации клеток и формирования клеточных стенок. Волокна льна – классический пример клеток, метаболизм которых ориентирован на масштабный синтез целлюлозы. Проблемы развития лубяных волокон важны и с практической точки зрения, так как удлинение клетки-

волокна и формирование ее клеточных стенок (первичной и вторичной) напрямую связаны с качеством технического волокна, а от количества и строения волокнистых пучков зависят величина и качество урожая льна.

Целью данного исследования было создание специфических молекулярных маркеров к генам *CesA-1* и *CesA-6*, кодирующим соответствующие субъединицы целлюлозосинтазы льна, и разработка вырожденных праймеров к классоспецифической области HVRII целлюлозосинтазы льна на основе существующих EST-последовательностей *CesA* генов растений.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили сорта льна (*Linum usitatissimum* L.) различного эколого-географического и генетического происхождения.

Выделение тотальной РНК проводилось по методу Hegde et al. [10] из 100 мг ткани растений льна, относящихся к разным подвидам (долгунец, масличный, межумок) на стадии быстрого роста. Образцы ткани были зафиксированы в жидком азоте и хранились до выделения при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  для мгновенной фиксации протекающих реакций. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью олиго-dT16-праймера на 10 нг тотальной РНК согласно протоколу, приведенному в RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). На основании сравнения шести нуклеотидных последовательностей EST (Expressed Sequence Tag) субъединиц *CesA* льна, зарегистрированных в GenBank (EF409998-EF410000, EF214742-EF214744), в программе Vector NTI Suite 7 были сконструированы праймеры, специфичные к фрагменту кДНК субъединиц *CesA-1* и *CesA-6* следующего нуклеотидного состава, приведенного в таблице.

Таблица

**Нуклеотидные последовательности созданных праймеров**

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
F A1 201	5'-AGTGGTTGGAACGATTTTCG-3'
R A1 201	5'-CCCATTGCATCTCAAGGATA-3'
F A6 302	5'-TTATTGCTGTCCAGAGAGAG 3'
R A6 302	5'-AGAACCATATACTGGCAAGA-3'

Аmplification кДНК проводилась в реакционной смеси, включающей от 50 до 100 нг кДНК, по 0,25 mM прямого и обратного праймера, 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, от 1,5 до 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  и 1 единицу Taq-полимеразы в инкубационном буфере.

Условия проведения реакции были следующими: денатурация – 4 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ ; циклы 2 – 35, 30 с при  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 с при  $51-54^{\circ}\text{C}$  в зависимости от праймера и 1 мин при  $72^{\circ}\text{C}$ ; цикл 36 – 10 мин при  $72^{\circ}\text{C}$ .

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера 1 kb DNA ladder (BRL).

Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводили на секвенаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) по протоколу, приведенному в CycleReader Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas).

**Результаты и обсуждение.** На основании сравнения шести нуклеотидных последовательностей EST (*Expressed Sequence Tag*) субъединиц *CesA* льна, зарегистрированных в GenBank (EF409998-EF410000, EF214742-EF214744), были сконструированы праймеры, специфичные к фрагменту кДНК определенной субъединицы *CesA*. Амплификация кДНК растений льна, относящихся к разным подвидам (долгунец, масличный, межумок) на стадии быстрого роста, со специфическими праймерами к генам *CesA-1* и *CesA-6* (рис. 1) позволила идентифицировать фрагменты ожидаемого молекулярного размера (201 и 300 п. н. соответственно).

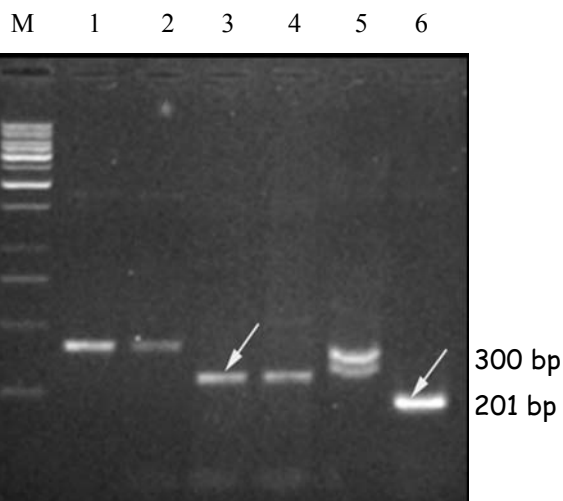


Рис. 1. ПЦР-фрагменты, полученные в результате амплификации ДНК и кДНК льна со специфическими *CesA-6* (1–4) и *CesA-1* (5, 6) праймерами. 1, 2, 5 – ДНК; 3, 4, 6 – РНК; М – маркер молекулярного размера (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелки указывают кДНК-маркеры *CesA* генов ожидаемого размера

В результате амплификации сконструированных праймеров с ДНК льна были получены более тяжелые продукты размером около 300 п. н. для *CesA-1* и 400 п. н. для *CesA-6*, что может свидетельствовать о наличии интрона в амплифицируемой области. Идентичность полученных ПЦР-фрагментов ожидаемым EST-локусам была подтверждена секвенированием (рис. 2).

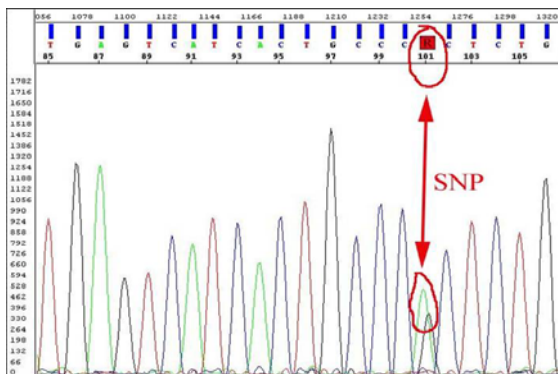


Рис. 2. Фрагмент нуклеотидной последовательности EST *Cesa-6*. Стрелкой показана область SNP

Сравнение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов *Cesa* генов с известными последовательностями *Cesa* генов арабидопсиса, тополя и эвкалипта [8, 11, 12] показало, что полученный ПЦР-фрагмент локализован в области консервативного домена В *Cesa* гена и может быть использован для дальнейшего секвенирования.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов кДНК *Cesa* генов *Arabidopsis*, риса, кукурузы, ячменя, тополя и других видов растений, полученных из GenBank, и сравнения их с известными EST-фрагментами *Cesa* генов льна были разработаны праймеры к HVRII областям генов целлюлозосинтазы льна. Праймеры обладают достаточной степенью вырожденности, для того чтобы амплифицировать все экспрессирующиеся гены целлюлозосинтазы, и могут быть использованы для клонирования и секвенирования отдельных генов *Cesa* льна, анализа их тканеспецифичности, стадийспецифичности и участия в синтезе первичной или вторичной клеточной стенки растения.

### Литература

1. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase / J. R. Pear [et al.] // Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 12637–12642.

2. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene / R. A. Burton [et al.] // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 691–705.

3. Hazen, S. P. Cellulose synthaselike genes of rice / S. P. Hazen, J. S. Scott-Craig, J. D. Walton // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 128. – P. 336–340.

4. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes / M. S. Doblin [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43. – P. 1407–1420.

5. The *Cesa* gene family of barley (*Hordeum vulgare*): quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes / R. A. Burton [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 134. – P. 224–236.

6. Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes are required for cellulose synthesis in the secondary wall / K. Tanaka [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 133. – P. 73–83.

7. Interactions among three distinct *Cesa* proteins essential for cellulose synthesis / N. G. Taylor [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 1450–1455.

8. Liang, X. Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees / X. Liang, C. Joshi // Tree Physiology. – 2004. – Vol. 24. – P. 543–550.

9. Vergara, C. E. b-D-Glycan synthases and the *Cesa* gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1-3),(1-4)beta-D-glucan synthase / C. E. Vergara, N. C. Carpita // Plant Mol Biol. – 2001. – Vol. 47. – P. 145–160.

10. A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis / P. Hegde [et al.] // BioTechniques. – 2000. – Vol. 29, № 3. – P. 548–562.

11. Ranik, M. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis / M. Ranik, A. Myburg // Tree Physiology. – 2005. – Vol. 26. – P. 545–556.

12. Richmond, T. The Cellulose Synthase Superfamily / T. Richmond, C. R. Somerville // Plant Physiol. – 2000. – Vol. 124. – P. 495–498.