Ф Е Д Е Р А Л Ь Н О Е Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н О Е
Б Ю Д Ж Е Т Н О Е У Ч Р Е Ж Д Е Н И Е Н А У К И
И Н С Т И Т У Т Б И О Х И М И И И Г Е Н Е Т И К И
У Ф И М С К О Г О Н А У Ч Н О Г О Ц Е Н Т Р А
Р О С С И Й С К О Й А К А Д Е М И И Н А К

На правах рукописи

КУЛУЕВ
Булат Разяпович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗМЕРОВ ОРГАНОВ У РАСТЕНИЙ

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

03.01.03 – молекулярная биология

Научный консультант:

Доктор биологических наук,
профессор
А.В. Чемерис

Уфа – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	12
ВВЕДЕНИЕ	15
ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	25
Глава 1. Промоторы каулимовирусов	27
Глава 2. Регуляция размеров органов у растений	36
2.1. Молекулярные механизмы регуляции роста и развития растений	39
2.2. Регуляция клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега	43
2.3. Морфогенез листа	46
2.3.1. Рост листа	49
2.3.2. Генетический контроль морфогенеза листа	50
2.4. Транскрипционные факторы, участвующие в регуляции роста растений	56
2.5. Молекулярные механизмы регуляции клеточного деления	59
2.5.1. Ген *ARGOS*	59
2.5.2. Транскрипционный фактор AINTEGUMENTA	61
2.5.3. Циклины и циклин-зависимые протеинкиназы	64
2.5.4. Ген *CYCLIN D3;1*	67
Глава 3. Регуляция роста клеток растяжением в растениях	70
3.1. Регуляция поступления воды в клетки растений	71
3.2. Фитогормоны и другие низкомолекулярные соединения	74
3.3. Сигнальные пептиды	80
3.4. Белки с OSR-доменом	81
3.5. Транскрипционные факторы	82
3.6. Эндогликаназы	84
3.7. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы	85

3.8. Экспансины 87
3.9. Другие неферментативные белки 91
3.10. Цитоскелет 91
3.11. Эндоредупликация 92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ 95
ЧАСТЬ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 98
Глава 4. Объекты и методы исследования 98
4.1. Краткая характеристика объектов исследований 98
4.2. Выделение и очистка тотальной ДНК растений и каулимовирусов методом фенольно-хлороформной экстракции 98
4.3. Выделение и очистка тотальной ДНК растений методом солевой экстракции 99
4.4. Выделение тотальной РНК растений тризолом и построение первой цепи кДНК для клонирования генов 100
4.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК 101
4.6. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами и реакция лигирования 103
4.7. Обработка ДНК щелочной фосфатазой и полинуклеотидкиназой фага Т4 104
4.8. Аналитический гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях 105
4.9. Препаративный гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях 106
4.10. Элюция ДНК из агарозных гелей 106
4.11. Очистка ДНК хроматографией с ДЭАЭ-целлюлозой 107
4.12. Выделение тотальной ДНК бактерий при помощи 0,5%-ного тритона Х-100 для ПЦР-анализа 108
4.13. Полимеразная цепная реакция 108
4.14. Проведение RAPD-анализа бактериальных клонов 109
4.15. ПЦР-ПДРФ-анализ ампликонов 109

4.16. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом 110
4.17. Получение одноцепочечной ДНК с помощью ДНК-полимеразы фага phi 29 110
4.18. ДНК шаффлинг 112
4.19. Выделение тотального белка из растений 113
4.20. Флюориметрическое определение активности GUS в клеточных экстрактах 113
4.21. Подготовка компетентных клеток *E. coli* 114
4.22. Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК 115
4.23. Подготовка электрокомпетентных клеток *A. tumefaciens* 115
4.24. Электропорация компетентных клеток *A. tumefaciens* 116
4.25. Приготовление протопластов из листьев табака *N. tabacum* 117
4.26. Трансформация протопластов табака методом химически индуцированного эндоцитоза 118
4.27. Агробактериальная трансформация листовых дисков табака 119
4.28. Анализ β-глюкуронидазной активности 121
4.29. Стерилизация семян трансгенных растений табака 122
4.30. Морфологический анализ трансгенных растений табака 122
4.31. Экзогенная обработка трансгенных растений табака эстрадиолом 124
4.32. Экзогенная обработка растений табака фитогормонами 125
4.33. Нумерация листьев и построение кДНК для анализа уровня содержания транскриптов исследуемых генов 125
4.34. Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени 127
4.35. Определение концентрации цитокининов, ИУК и АБК 127
4.36. Гистологический анализ тканей трансгенных растений 128
4.37. Определение плоидности трансгенных растений 128
4.38. Получение трансгенных растений рапса методом погружения цветков (floral dip) 129

4.39. Получение трансгенных растений осины при помощи *Argobacterium rhizogenes* с использованием игольчатых кристаллов карбида кремния 130
4.40. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей 131
4.41. Статистическая обработка полученных результатов 131
Глава 5. Реактивы и материалы 133
5.1. Бактериальные штаммы для молекулярно-биологических манипуляций, плазмидные и фагмидные векторы 133
5.2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при проведении ПЦР, ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени 133
5.3. Реактивы и материалы 139
5.4. Составы использованных стандартных растворов 141
ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 143
Глава 6. Новые промоторы каулимовирусов и конструирование их гибридных форм методами рестрикции-лигирования и ДНК шаффлинга 143
6.1. Выяснение филогенетических связей каулимовирусов, поиск промоторных последовательностей, подбор праймеров для их амплификации и поиск инфицированных каулимовирусами растений 144
6.2. Амплификация и клонирование промотора вируса мозаики георгина 146
6.3. Амплификация и клонирование промотора вируса кольцевой гравировки гвоздики 147
6.4. Секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора вируса мозаики георгина 148
6.5. Секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора вируса кольцевой гравировки гвоздики 149
6.6. Конструирование гибридных форм промоторов каулимовирусов методом ДНК шаффлинга 150
6.7. Анализ активности генов *GUS* и *GFP* под управлением 155

гибридных и природных форм промоторов каулимовирусов в клетках *E. coli, A. tumefaciens* и *N. tabacum*
6.8. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов методами ПЦР и рестрикции-лигирования 156
6.9. Определение активности природных и гибридных форм промоторов каулимовирусов флюориметрическим методом 158
6.10. Обсуждение результатов 160
Глава 7. Роль генов, контролирующих клеточную пролиферацию в апикальной меристеме побега и зачатках органов, в регуляции размеров листьев, стебля и цветков 164
7.1. Конститутивная экспрессия гена *CLAVATA3 A. thaliana* в трансгенных растениях табака 164
7.1.1. Клонирование гена *CLAVATA3 A. thaliana* и создание целевых генно-инженерных конструкций 167
7.1.2. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *CLAVATA3* 168
7.1.3. Обсуждение результатов 185
7.2. Участие гена *AINTEGUMENTA* и его ортологов в регуляции размеров надземных органов 188
7.2.1. Исследование функций гена *AINTEGUMENTA* табака 189
7.2.2. Морфологические особенности трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *ANT* рапса под контролем промотора вируса мозаики георгина 215
7.2.3. Конститутивная экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного в трансгенных растениях табака 220
7.2.4. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих консервативные участки гена *ANT* в антисмысловой ориентации 232
7.3. Заключение к главе 7 248
Глава 8. Роль *OSR*-генов в регуляции размеров органов растений 252
8.1. Конститутивная экспрессия гена *AtARGOS* под контролем 253

промотора вируса мозаики георгина
8.1.1. Поиск гомологов гена *AtARGOS A. thaliana* в GenBank и сравнительный анализ последовательностей ДНК и белков 253
8.1.2. Получение генно-инженерной конструкции гена *AtARGOS* с промотором вируса мозаики георгина и сайтом polyA вируса мозаики цветной капусты в векторе pCambia 2301 255
8.1.3. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARGOS A. thaliana* и их морфологический анализ 256
8.1.4. Обсуждение результатов 261
8.2. Влияние конститутивной экспрессии гена *AtARL* на размеры клеток и органов трансгенных растений табака 263
8.2.1. Поиск гомологов гена *AtARL A. thaliana* и биоинформационный анализ его предсказанной белковой молекулы 264
8.2.2. Амплификация гена *AtARL A. thaliana* и получение генно-инженерных конструкций целевого гена в векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1 267
8.2.3. Морфологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana* 268
8.2.4. Сравнительная морфологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana* под контролем промотора ВМГ 272
8.2.5. Обсуждение результатов 274
8.3. Эстрадиол-индуцибельная и цветокспецифичная экспрессия генов *AtARGOS* и *AtARL* в трансгенных растениях табака 277
8.3.1. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana* под контролем промотора хальконсинтазы петунии 278
8.3.2. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем эстрадиол-индуцибельной системы транскрипции 285

8.3.3. Обсуждение результатов 289
8.4. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации 293
8.4.1. Поиск и клонирование консервативных фрагментов гена *AtARGOS A. thaliana* 293
8.4.2. Сравнительная морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *AtARGOS A. thaliana* в антисмысловой ориентации 295
8.4.3. Обсуждение результатов 299
8.5. Клонирование и исследование гена *PnARGOS-LIKE* тополя черного 300
8.5.1. Определение филогенетического родства гена *PnARGOS-LIKE*, биоинформационный анализ его предсказанной аминокислотной последовательности и промоторной области 301
8.5.2. Оценка содержания мРНК гена *PtrARGOS-LIKE* в различных органах осины и под действием экзогенных фитогормонов и NaCl 306
8.5.3. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE* 309
8.5.4. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений осины, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE* 312
8.5.5. Обсуждение результатов 316
8.6. Создание трансгенного рапса, сверхэкспрессирующего ген *AtARL* методом погружения цветков 323
8.6.1. Получение трансгенных растений рапса методом погружения цветков и отбор предполагаемых трансгенных форм по фенотипу 325
8.6.2. Отбор трансгенных растений рапса методом ПЦР-анализа 326
8.6.3. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana* 327
8.6.4. Обсуждение результатов 331
8.7. Заключение к главе 8 333

Глава 9. Роль генов, контролирующих рост клеток растяжением в регуляции размеров органов 337
9.1. Роль гена эндоксилоглюкантрансферазы *NtEXGT* при росте растений и регуляции размеров органов 337
9.1.1. Определение филогенетических связей гена *NtEXGT* с его гомологами из некоторых представителей двудольных 339
9.1.2. Анализ уровня транскрипции гена *NtEXGT* в различных органах табака дикого типа 340
9.1.3. Анализ уровня транскрипции гена *NtEXGT* в различных органах табака дикого типа под влиянием экзогенных фитогормонов 342
9.1.4. Анализ изменений уровня транскрипции гена *NtEXGT* под влиянием избыточной NaCl, холода, кадмия и «стрессовых» фитогормонов 344
9.1.5. Участие генов *AtARGOS*, *AtARL* и *NtANTL* в регуляции экспрессии гена *NtEXGT* 349
9.1.6. Морфологический анализ трансгенных растений, сверхэкспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT* 351
9.1.7. Морфологический анализ трансгенных растений, сверхэкспрессирующих геномную форму гена *NtEXGT* 353
9.1.8. Изменения длины корней трансгенных по гену *NtEXGT* растений табака при действии NaCl 355
9.1.9. Обсуждение результатов 357
9.2. Роль генов экспансинов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* при регуляции роста и размеров органов табака 361
9.2.1. Определение филогенетических связей генов экспансинов табака с их гомологами из *A. thaliana*, томатов и тополя 363
9.2.2. Анализ уровня транскрипции генов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* в различных органах табака дикого типа 366
9.2.3. Изменения уровня транскрипции генов экспансинов табака в ответ на экзогенную обработку цитокининами, ауксинами, 371

брассиностероидами и гиббереллинами
9.2.4. Анализ изменений уровня транскрипции генов экспансинов под влиянием избыточной NaCl, холода и «стрессовых» фитогормонов 376
9.2.5. Влияние индуцибельной экспрессии гена *AtARL* на изменение уровня транскрипции генов экспансинов табака 381
9.2.6. Получение и морфологический анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA1* 383
9.2.7. Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* в трансгенных растениях табака 386
9.2.8. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации 391
9.2.9. Обсуждение результатов 396
9.3. Конститутивная экспрессия гена *AtEXPA10 A. thaliana* в трансгенных растениях табака 407
9.3.1. Амплификация и клонирование гена *AtEXPA10* 408
9.3.2. Получение трансгенных растений табака, с повышенной экспрессией гена *AtEXPA10* 409
9.3.3. Морфологический анализ трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *AtEXPA10* 410
9.3.4. Обсуждение результатов 414
9.4. Клонирование и исследование генов экспансинов тополя черного (*P. nigra*) 416
9.4.1. Конститутивная экспрессия гена *PnEXPA1* в трансгенных растениях табака 416
9.4.2. Конститутивная экспрессия гена *PnEXPA3* в трансгенных растениях табака 424
9.5. Заключение к главе 9 431
Часть 4. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ 435

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ 438
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 441

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Нуклеотиды:

дАТФ (А) – дезоксиаденозинтрифосфат

дГТФ (G) – дезоксигуанозинтрифосфат

дТТФ (Т) – дезокситимидинтрифосфат

дЦТФ (С) – дезоксицитозинтрифосфат

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат

АБК – абсцизовая кислота

АМП – апикальная меристема побега

АФК – активные формы кислорода

ВКГГ – вирус кольцевой гравировки гвоздики

ВМГ – вирус мозаики георгина

ВМН – вирус мозаики норичника

ВМНК – вирус мозаики ночной красавицы

ВМЦК – вирус мозаики цветной капусты

ВОЖЗ – вирус, окаймляющий жилки земляники

ГКЗ – гиббереллловая кислота

ДДС натрия – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотрейтол

ДЭАЭ-целлюлоза – диэтиламиноэтилцеллюлоза

ИУК – индолилуксусная кислота

МеЖ – метилжасмонат

МТ – кортикальные микротрубочки

НУК – 1-нафтилуксусная кислота

ОТ-ПЦР – обратно транскрипционная ПЦР

пн – пара нуклеотидов

тпн – тысяча пар нуклеотидов

ПДРФ – полиморфизм длины рестриктазных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

СК – салициловая кислота

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

ТВЕ – трис-боратный буфер

ТЕ – трис-ЭДТА буфер

ТФ – транскрипционные факторы

ЭБ – 24-эпибрассинолид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AIL – гены *AINTEGUMENTA-like*

AP2/ERF – семейство транскрипционных факторов растений (от APETALA2/Ethylene Responsive Factor)

ARF – Auxin Response Factor

ARGOS – от Auxin-Regulated Gene involved in Organ Size

ARR – гены ответа на цитокинины (от Arabidopsis Response Regulator)

ANT – AINTEGUMENTA

CAF – листоспецифичный транскрипционный фактор табака

chsA – хальконсинтаза

CKI – ингибитор циклин-зависимой киназы

CDK – циклин-зависимая киназа

CLV – CLAVATA

CRN - мембрано-ассоциированная киназа CORYNE

CYC – циклин

DL - гены семейства *YABBY* риса (от *DROOPING LEAF*)

GFP – зеленый флуоресцентный белок (от Green Fluorescent Protein)

GT1 – листоспецифичный транскрипционный фактор

GUS – β-глюкуронидаза

IPTG – изопропилтио-β-D-галактопиранозид

KN1 – ген *KNOTTED1* кукурузы

KNOX – гены *KNOTTED1-like HOMEOBOX*

LB-среда – среда Лурия-Бертрани

LBD – гены *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN*

MNF1 – листоспецифичный транскрипционный фактор кукурузы

NtANTL – AINTEGUMENTA-подобный ген табака

NtEXPA1- NtEXPA6 – гены экспансинов табака

NtEXGT – ген эндоксилоглюкантрансферазы табака

OSR – гены *A. thaliana* (от Organ Size Related)

PHB – ген *PHABULOSA*

PHV – ген *PHAVOLUTA*

PIP – обозначение генов аквапоринов плазмалеммы (от Plasma membrane Intrinsic Protein)

PnEXPA1-PnEXPA3 - гены экспансинов тополя черного

RAPD – случайная амплификация полиморфной ДНК (от Random Amplified Polymorphic DNA)

REV – ген *REVOLUTA*

RBR – гомолог гена ретинобластомы Rb человека

STM – ген *SHOOTMERISTEMLESS*

TIP – обозначение генов аквапоринов тонопласта (от Tonoplast membrane Intrinsic Protein)

WOX – WUS homeobox содержащие белки

WUS – ген *WUSCHEL*

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид

XET – ксилоглюканэндотрансгликозилазная активность

XTHs – ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы

XVE – эстрадиол-индуцибельная транскрипционная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из важных проблем науки о растениях является интенсификация растениеводства с целью увеличения продуктивности растений для удовлетворения растущих продовольственных потребностей, что невозможно без знаний молекулярных механизмов роста растений, особенно при постоянно изменяющихся условиях произрастания, в которых находятся растения в связи с их прикрепленностью к месту обитания. Одним из наиболее важных ростовых параметров являются размеры органов, которые регулируются множеством внутренних и внешних факторов как биотической, так и абиотической природы. В целом размеры органов растений находятся под контролем двух основных механизмов, а именно регуляции клеточного деления и клеточного растяжения. Во время первой, так называемой, пролиферативной фазы развития любого органа клетки митотически делятся, и увеличивается их количество. Затем клетки начинают постепенно увеличиваться в размерах за счет растяжения и дифференцируются. В рамках этих двух основных механизмов, конечные размеры органов зависят от ряда отдельных генетически регулируемых процессов, например, исходного числа стволовых клеток в апикальных меристемах; количества клеток, рекрутированных в зачатки органов, а также скорости и продолжительности их деления; роста клеток растяжением; деления меристемоидных клеток в растущих органах; уровня полиплоидизации и некоторых других (Gonzalez et al., 2012). Главными регуляторами поддержания стволовых клеток в центре апикальной меристемы побега и перехода клеток к стадии дифференциации являются пептид CLAVATA3 и транскрипционный фактор WUSCHEL (Dodsworth, 2009). Клеточная пролиферация в зачатках надземных органов контролируется транскрипционным фактором AINTEGUMENTA (Mizukami, Fischer, 2000). Из литературных данных следует, что системы регуляции клеточного деления и роста клеток растяжением взаимосвязаны между собой (Mizukami, Fischer, 2000; Feng et al., 2011), причем важная роль при координации этих процессов отводится белкам с OSR-доменом

(Qin et al., 2014), в то же время молекулярные механизмы таких взаимодействий остаются во многом неизученными. Молодые органы растут в основном за счет увеличения размеров клеток, причем важную роль при росте клеток растяжением выполняют неферментативные белки экспансины (Шарова, 2007) и ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы, а также относящиеся к этой же группе ферментов так называемые эндоксилоглюкантрансферазы (Miedes et al., 2011).

Рост растений контролируется большим количеством генов, поэтому может быть изучен на должном уровне лишь при помощи большого количества современных методов физико-химической биологии и средств биоинформатики. Однако для полноценного биоинформационного анализа и компьютерного моделирования так называемого «виртуального растения» (Holtorf et al., 2002), на данном этапе развития науки совершенно не хватает данных об особенностях взаимодействия сигнальных молекул, систем трансдукции внутриклеточного сигнала, транскрипционных факторов и белков, обеспечивающих клеточное деление и растяжение при регуляции роста и развития растений. К настоящему времени секвенированы геномы большого количества растений, но на фоне этих блестящих достижений ясно обозначился разрыв между формальными знаниями первичной структуры геномов и отсутствием какой-либо информации о функциях большинства генов. Данная работа направлена, в том числе, на преодоление этого барьера и соответствует идеологии постгеномных исследований в растительной биологии.

Большинство исследований по функциональной геномике растений ведутся на модельном растении *Arabidopsis thaliana*, которое не представляет хозяйственной ценности. В связи с этим, является актуальным проведение аналогичных исследований на других видах растений, которые представляют интерес для сельского или лесного хозяйств. Одним из таких модельных растений является табак, который характеризуется простотой обращения в культуре *in vitro* и поэтому может быть использован для получения большого количества линий трансгенных растений с увеличенной или сниженной экспрессией исследуемых

генов. Из древесных растений к модельным растениям можно отнести осину, которая относительно легко трансформируется агробактериями и не требовательна к составу среды для регенерации. Более того, геном одного из видов тополей *Populus trichocarpa* был полностью секвенирован и поэтому осина может быть успешно использована для исследований в области функциональной геномики древесных растений. Важной для России сельскохозяйственной культурой, для которой разработаны относительно легковоспроизводимые методы генетической трансформации, является рапс. Генетическая близость этой культуры с модельным объектом *A. thaliana* позволяет использовать гены последнего для создания трансгенных растений рапса с хозяйственно-ценными признаками.

Одним из перспективных способов увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур являются генно-инженерные манипуляции, направленные на изменение уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции роста и развития растений. Путем изменения уровня экспрессии различных генов могут быть получены генно-модифицированные растения с увеличенными и уменьшенными размерами органов. Такие растения могут быть востребованы в сельском и лесном хозяйствах, а также в декоративном растениеводстве. Однако при проведении работ по получению трансгенных растений, исследователи постоянно сталкиваются с различными проблемами, одной из наиболее острых при этом, является компенсаторный механизм, направленный на поддержание скорости роста и размеров органов, близких к физиологической норме (Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003). Один из возможных путей решения данной проблемы лежит в выяснении регуляторных связей между биомолекулами при координации роста и развития растений и использовании полученных знаний при генетической модификации культурных растений. Другой не менее важной проблемой в генной инженерии растений является низкий уровень экспрессии целевого гена, который довольно часто обуславливается косупрессией генов и проявляется в виде так называемого «молчания» трансгена. Для создания трансгенных растений с конститутивной экспрессией целевых генов в основном

применяется 35S промотор, активности которого часто оказывается недостаточно (Mitsuhara et al., 1996). В связи с этим поиск или создание более сильных, чем 35S промотор, растительных промоторов, а также создание генно-инженерных конструкций таких промоторов в сочетании с генами-регуляторами роста растений являются весьма актуальными и, в конечном счете, могут привести к получению трансгенных растений с увеличенными размерами органов. В то же время после агробактериальной трансформации трансгенные побеги с высоким уровнем экспрессии целевых генов, возможно, не выживают или даже не образуются из-за негативного влияния белковых продуктов трансгенов на начальных стадиях развития растения. Одним из путей решения данной проблемы может стать использование при создании трансгенных растений тканеспецифичных или индуцибельных промоторов вместо конститутивных.

Цель исследования: выяснение молекулярных механизмов регуляции транскрипции и взаимодействия генов *AINTEGUMENTA*, *OSR,* экспансинов и эндоксилоглюкантрансфераз, а также создание трансгенных растений с измененными размерами органов.

Задачи исследования:

1. Клонировать конститутивные промоторы каулимовирусов и создать на их основе генно-инженерные конструкции, пригодные для получения трансгенных растений. Создать гибридные формы промоторов каулимовирусов и отобрать варианты с наибольшей активностью.

2. Провести биоинформационный анализ и определить содержание транскриптов генов-кандидатов, участвующих в регуляции клеточного деления и роста клеток растяжением в различных органах растений в ответ на экзогенную обработку фитогормонами и действие стрессовых факторов.

3. Клонировать гены *CLAVATA3, AINTEGUMENTA*, *OSR*, экспансинов и эндоксилоглюкантрансфераз из различных растительных объектов и создать на их основе трансгенные растения табака с конститутивной и пониженной экспрессией

целевых генов. Получить трансгенные растения табака со специфичной и индуцибельной экспрессией генов *OSR*.

4. Провести морфофизиологический и молекулярный анализ созданных трансгенных растений и определить вклад каждого из исследуемых генов в регуляцию размеров органов.

5. На основе данных, полученных при исследовании генов *CLAVATA3, AINTEGUMENTA*, *OSR*, экспансинов и эндоксилоглюкантрансфераз, определить молекулярные механизмы взаимодействия клеточного деления и роста клеток растяжением в процессе роста листьев табака.

6. Установить молекулярные основы компенсаторного механизма, характерного для трансгенных растений с уменьшенным количеством клеток в органах и направленного на поддержание размеров органов близких к норме.

7. Отобрать эффективные генно-инженерные конструкции, способствующие наиболее существенному увеличению размеров органов табака и на их основе создать трансгенные растения рапса.

8. Определить эффективные генно-инженерные конструкции, способствующие наиболее существенному уменьшению размеров органов.

Научная новизна. Клонированы и исследованы промоторы вируса мозаики георгина и вируса кольцевой гравировки гвоздики. Методами ДНК шаффлинга и рекомбинантных ДНК получены гибридные формы промоторов вируса мозаики георгина, вируса мозаики цветной капусты и вируса кольцевой гравировки гвоздики в различных комбинациях. Установлено, что в трансгенных растениях табака промотор вируса мозаики георгина обладает большей активностью, чем классический 35S промотор. Впервые клонированы гены тополя черного *PnARGOS-LIKE*, *PnANTL1*, *PnANTL2*, *PnEXPA1*, *PnEXPA3*, а также гены табака *NtANTL*, *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*. Впервые получены трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией генов *CLAVATA3*, *PnARGOS-LIKE*, *PnANTL1*, *PnANTL2*, *PnEXPA1*, *PnEXPA3, NtANTL*, *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*. Получены трансгенные растения табака с пониженным уровнем экспрессии генов

NtANTL, *NtEXPA4* и *ARGOS,* а также трансгенные растения табака со цветокспецифичной и индуцибельной экспрессией *OSR*-генов. Получены сведения, свидетельствующие об участии транскрипционных факторов семейства AP2 не только в регуляции клеточного деления, но и в регуляции роста клеток растяжением. Показано, что сверхэкспрессия гена *CLAVATA3* в трансгенных растениях табака способствует уменьшению числа недифференцированных клеток, рекрутированных в зачатки органов, что приводит к увеличению размеров отдельных клеток в листьях и стеблях и способствует более быстрому старению клеток, при этом в молодых листьях по сравнению с контролем компенсаторно увеличивается концентрация цитокининов и содержание мРНК экспансинов и эндоксилоглюкантрансфераз. Впервые показано, что экспрессия транскрипционного фактора AINTEGUMENTA может регулироваться не только ауксинами, но также цитокининами и брассиностероидами. Конститутивная экспрессия гомологов гена *AINTEGUMENTA*, а также *OSR*-генов способствует повышению уровня содержания мРНК ряда экспансинов табака, что отражается в увеличении размеров отдельных клеток в органах растений. Индуцибельная экспрессия гена *AtARGOS* в цветках, главным образом, способствует увеличению содержания мРНК гена *NtANTL*, в то время как экспрессия гена *AtARL* приводит к накоплению транскриптов гена *NtEXPA1*. Сверхэкспрессия генов *NtEXPA5* и *PnEXPA3* способствует, в первую очередь, увеличению размеров стебля, а трансгены *NtEXPA1, AtEXPA10* и *PnEXPA1* оказывают большее влияние на рост листьев. Гены экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* являются листоспецифичными, а ген *NtEXPA6* специфичным для недифференцированных клеток. Экспансины NtEXPA1 и NtEXPA6 необходимы на стадии инициации клеточного растяжения в верхних молодых листьях, а в нижних листьях их экспрессия полностью прекращается и экзогенными фитогормонами не индуцируется. Экспансины NtEXPA4 и NtEXPA5 необходимы на всех стадиях клеточного растяжения, причем они остаются доступными для стимуляции экспрессии экзогенными фитогормонами, по крайней мере, до 8-го от верхушки побега листа.

Практическая значимость. Генно-инженерные конструкции на основе бинарных векторов с промоторами каулимовирусов могут быть использованы для получения трансгенных растений с повышенным уровнем экспрессии различных целевых генов. Знания о взаимодействии генов-регуляторов роста между собой и с фитогормонами будут способствовать разработке стратегии создания хозяйственно-ценных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов. Клонированные нами гены в сочетании с промоторами каулимовирусов могут быть использованы для увеличения размеров листьев, стебля, цветков, плодов и семян у хозяйственно-ценных растений. В рамках проведенной работы были определены некоторые молекулярные механизмы взаимодействия процессов клеточного деления и роста клеток растяжением. Эти знания в совокупности с многочисленными литературными данными в будущем позволят более эффективно разрабатывать методы управления процессами роста растений и станут одним из первых шагов по конструированию так называемых «виртуальных растений» (Holtorf et al., 2002) с заранее заданными свойствами. Полученные нами трансгенные растения табака, рапса и осины могут быть использованы для создания коммерческих сортов и пород, которые будут иметь спрос в сельском и лесном хозяйствах.

Результаты исследования могут быть использованы в генной инженерии, биотехнологии, селекции растений, а также при разработке перечня рекомендаций для сельского хозяйства, включающего технологию использования регуляторов роста и основы инновационной методики возделывания различных культур, направленную на повышение их продуктивности и стрессоустойчивости.

Разработанные и модифицированные в ходе работы методы и подходы используются на практических и лабораторных занятиях по предметам «Основы биотехнологии», «Основы генной инженерии» и «Методы молекулярной биологии» при обучении студентов Башкирского государственного университета. Полученные теоретические сведения используются при чтении курсов лекций по предметам «Молекулярная биология растений» в Башкирском государственном

университете и «Молекулярная вирусология» в Башкирском государственном медицинском университете.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В трансгенных растениях табака промотор вируса мозаики георгина обладает большей активностью, чем классический 35S промотор и при совместном использовании с генами, участвующими в регуляции роста, способствует более существенному влиянию последних на размеры органов в трансгенных растениях.

2. Компенсаторный рост клеток растяжением при уменьшении их количества в растущих органах контролируется цитокининами через стимуляцию экспрессии экспансинов и эндоксилоглюкантрансфераз.

3. Транскрипционный фактор AINTEGUMENTA контролирует размеры органов, влияя не только на клеточное деление, но и на рост клеток растяжением, причем его экспрессия регулируется не только ауксинами, а также цитокининами и брассиностероидами.

4. Экспрессия *OSR*-гена *ARGOS-LIKE* тополя контролируется ауксинами, а его белковый продукт участвует в регуляции роста клеток растяжением и конечных размеров органов.

5. Сигналы от фитогормонов к генам экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз частично идут через продукты *OSR*-генов, где происходит трансдукция сигнала и его передача к транскрипционному фактору AINTEGUMENTA.

6. Гены *PnANTL1*, *AtARGOS-LIKE*, *PnARGOS-LIKE*, *NtEXPA1*, *NtEXPA5*, *PnEXPA1* и *PnEXPA3* участвуют в регуляции размеров органов через стимуляцию роста клеток растяжением.

7. Гены *NtANTL*, *BnaX.ANT.b, PnANTL2* и *AtARGOS* контролируют размеры органов не только через влияние на клеточные деления, а также за счет стимуляции роста клеток растяжением.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2006); Всероссийской конференции в рамках конкурсного отбора инновационных проектов аспирантов и студентов по приоритетному направлению «Живые системы» (Киров, 2006); школе-семинаре молодых ученых Уфимского научного центра РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии (Уфа, 2007); 12-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2008); Всероссийской конференции «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем», посвященной 10-летию кафедры генетики БГПУ им.М.Акмуллы (Уфа, 2009); 14-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2010); I Всероссийской Интернет-конференции «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2010); 15-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2011); VII-м Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); Третьем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); II Всероссийской школе-конференции молодых ученых Уфимского научного центра РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии (Уфа, 2011); VI Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2011); IV Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, биобезопасность» (Москва, 2012); III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии и биотехнологии» (Уфа, 2013); X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013).

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны программой «У.М.Н.И.К.» (2008-2010 гг.), грантом Республики Башкортостан молодым ученым и молодежным научным коллективам (2009 г.), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» направления 1.3.1. (2009-2011 гг.) и грантом РФФИ мол-а (2011-2012 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 60 работ, в том числе в журналах из Перечня ВАК РФ – 20. В международной базе данных GenBank депонированы 4 нуклеотидные последовательности.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 486 страницах, иллюстрирована 13 таблицами и 141 рисунками. Список литературы содержит 428 источников, из них 386 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному консультанту д.б.н. проф. Чемерису А.В. и сотрудникам лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии ИБГ УНЦ РАН к.б.н. А.В. Князеву и Ю.М. Никонорову.

Часть 1. Обзор литературы

В связи с нарастающими по всему миру экологическими и продовольственными проблемами все более актуальным становится возможность получения хозяйственно ценных растений, характеризующихся увеличенными размерами органов. Одним из способов получения таких растений являются манипуляции с уровнем экспрессии генов-регуляторов роста. В то же время, несмотря на то, что геномы многих культурных растений уже секвенированы, в настоящее время имеется очень мало сведений о генах-мишенях, которые могли бы быть использованы для изменения параметров роста растений. При этом даже у *A. thaliana* функции многих генов остаются невыясненными. Поэтому одним из важнейших направлений исследований в постгеномный этап современной растительной биологии становится выяснение функций отдельных генов. Для этого в растительной биологии все чаще используют трансгенные растения с измененным уровнем экспрессии исследуемого гена. Морфофизиологический и молекулярный анализ таких растений может приблизить к пониманию вклада исследуемых генов в регуляцию и обеспечение роста органов.

При создании трансгенных растений весьма важным является выбор промотора для обеспечения достаточного уровня экспрессии чужеродного гена. В генной инженерии растений в основном применяются конститутивные, тканеспецифичные и индуцибельные промоторы. Из большого разнообразия специфичных промоторов, пожалуй, наиболее известными и изученными являются клубнеспецифичный промотор пататина картофеля (Kim et al., 1994) и цветокспецифичный промотор хальконсинтазы (chsA) *Petunia hybrida* (van der Meer et al., 1990). Хальконсинтаза является одним из ключевых ферментов биосинтеза антоцианов, поэтому промотор chsA проявляет активность в первую очередь в лепестках и чашелистиках (Han et al., 2005). Широкое распространение в последние годы в растительной биотехнологии получили также индуцибельные системы экспрессии (Aoyama, Chua, 1997; Zuo et al., 2000), которые все чаще используются при создании трансгенных растений вместо конститутивных

промоторов. Преимуществом данной группы транскрипционных систем является возможность активации экспрессии трансгена в любой момент вегетационного периода в зависимости от задач эксперимента. Например, широкое распространение получила эстрадиол-индуцибельная транскрипционная система XVE, где в качестве индуктора используется эстрадиол, являющийся гормоном животных и отсутствующий в растительных клетках (Zuo et al., 2000).

Однако по многим объективным причинам, в генной инженерии растений одним из наиболее широко используемых до сих пор является конститутивный 35S промотор, выделенный из вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) из группы каулимовирусов (Odell et al., 1985). Этот промотор имеет в 110 раз большую активность (Sanders et al., 1987), чем широко применявшийся ранее, промотор нопалинсинтазы из Т-ДНК агробактерий. Однако для решения некоторых задач по созданию трансгенных растений и обеспечения достаточного уровня экспрессии белковых продуктов, активности 35S промотора может быть недостаточно (Mitsuhara et al., 1996). При этом во многих бинарных векторах для трансформации растений как селективный, так и маркерный (а часто и целевой) гены находятся под контролем все того же 35S промотора, что может отрицательно сказываться на уровне экспрессии, а иногда приводит и к «молчанию» трансгена. В этой связи представляет значительный интерес как обнаружение новых, более эффективных промоторов, так и создание их гибридных форм. И поскольку 35S промотор ВМЦК оказался во многом универсальным, первой задачей нашей работы стал поиск новых промоторов каулимовирусов, которые могли оказаться более эффективными в трансгенных растениях табака, по сравнению с 35S промотором. Также планировалось на основе промоторов каулимовирусов создание искусственных растительных промоторов, которые могли оказаться более эффективными, чем их природные аналоги. Одним из путей создания новых эффективных промоторов является метод направленной молекулярной эволюции *in vitro*. Представляет особый интерес создание гибридных форм промоторов методом ДНК шаффлинга – высокоэффективного метода рекомбинации генетического материала

последовательностей гомологичных белков или их доменов (Stemmer, 1994), а также промоторных последовательностей (Remans et al., 2005). В качестве родительских последовательностей ДНК здесь предпочтительно использовать эффективные природные промоторы, каковыми являются промоторы каулимовирусов, все исследованные формы которых показали весьма высокий уровень экспрессии белков в трансгенных растениях.

Глава 1. Промоторы каулимовирусов

Каулимовирусы – это растительные вирусы, инфицирующие высшие растения и относящиеся к группе растительных параретровирусов, родственные ретровирусам. К супергруппе параретровирусов относят две большие группы вирусов, одни поражают представителей высших растений и относятся к семейству *Caulimoviridae*, другие поражают представителей позвоночных и относятся к семейству *Hepadnoviridae* (Haas et al., 2002). Параретровирусы в отличие от ретровирусов в качестве генома содержат ДНК, а не РНК, к тому же ДНК ретровирусов часто интегрирована с ДНК хозяина, а ДНК параретровирусов чаще всего ведет себя как свободная хромосома. Объединяет их то, что геном и тех и других проходит через стадию обратной транскрипции. Но у параретровирусов из прегеномной РНК образуется геномная ДНК, а у ретровирусов при этом из геномной РНК образуется прегеномная ДНК, которая интегрируется в геном хозяина (Hull, 1992). Все известные ныне растительные параретровирусы относятся к семейству *Caulimoviridae*. Семейство *Caulimoviridae* делят на две большие группы - каулимовирусы и баднавирусы, которые возводят в ранг родов *Caulimovirus* и *Badnavirus* (de Kochko et al., 1998; Lockhart, 1990). Наиболее типичным и изученным представителем каулимовирусов является ВМЦК (Odell et al., 1985; de Kochko et al., 1998), давший название всему роду. Все каулимовирусы, описанные к настоящему времени, инфицируют только двудольные растения, передаются различными видами тлей, имеют изометричное строение вириона и

содержат кольцевые молекулы ДНК с размерами от 7700 до 8300 пн (Hohn et al., 1985; de Kochko et al., 1998; Haas et al., 2002).

В составе генома каулимовирусов обнаружены два промотора. Один из них регулирует экспрессию всего генома вируса и называется промотором полноразмерного транскрипта. Размер этого промотора у разных каулимовирусов составляет примерно 500-600 пн (Maiti et al., 1997; Dey, Maiti, 1999; Pattanaik et al., 2004). Но эти последовательности включают обычно и околопромоторную область, не являющуюся необходимым элементом промотора. Показано, что для выражения наибольшей активности промотора достаточно 300-400 пн в зависимости от вида вируса (Sanger et al., 1990; Verdaguer et al., 1996; Maiti et al., 1997; Dey, Maiti, 1999; Pattanaik et al., 2004). Промотор полноразмерного транскрипта в геноме вируса располагается на конце кодирующей области гена шестого белка, и частично занимает большой межгенный спейсер, находящийся между шестой и седьмой открытыми рамками считывания (Noad et al., 1997). Среди каулимовирусов этот промотор был впервые описан и изучен у ВМЦК в 1985 году (Odell et al., 1985) и по значению константы седиментации полноразмерной РНК вируса был назван 35S промотором. Данный промотор оказался довольно сильным и конститутивным, потому и нашел широкое применение в генной инженерии растений. 35S промотор был помещен в различные векторные системы и является наиболее широко используемым в мире промотором, регулирующим экспрессию чужеродных генов в трансгенных растениях. 35S промотор применяют при получении трансгенных растений, где он управляет экспрессией тех или иных генных продуктов, и благодаря своей конститутивности может работать при различных физиологических состояниях растения и, главное, в большинстве двудольных растений, практически с одинаковой силой.

Вторым промотором каулимовирусов является 19S промотор, который регулирует экспрессию шестого гена. В результате экспрессии шестого гена образуется отдельный, субгеномный транскрипт, константа седиментации которого составляет 19S. Этот промотор у всех каулимовирусов обычно носит

название промотора субгеномного транскрипта (Bhattacharyya et al., 2002). Данный промотор располагается в малом межгенном спейсере, находящимся между пятым и шестым генами. Для проявления наибольшей промоторной активности 19S промотора достаточно 300 пн (Bhattacharyya et al., 2002). 19S промотор ВМЦК оказался намного слабее 35S промотора и не получил такого же широкого применения в генной инженерии растений, хотя в некоторых работах все же использовался (Sanders et al 1987; Sanger et al., 1990; van der Fits et al., 1997).

Первый промотор-делеционный анализ 35S промотора был проведен в 1985 году (Odell et al., 1985). Было выяснено, что для проявления наибольшей активности 35S промотора достаточно 343 пн. Делеция до -105 нуклеотида приводила к уменьшению активности в 3 раза, а до -46 – приводила к 20-ти кратному уменьшению активности. Было показано, что делеция до -168 нуклеотида не приводила к потере активности промотора (Odell et al., 1985). Дальнейшие исследования показали, что 5'-граница промотора лежит между -148 и -134 нуклеотидами (Lam, 1994). Делеции до -108 или -104 нуклеотида приводили к 5-ти кратному уменьшению активности. Делеция участка от -89 до -73 вызывала 20-ти кратное падение активности. Показано, что область между -89 и -73 нуклеотидами абсолютно необходима для способности последовательности -148/-89 активировать транскрипцию (Lam, 1994). Более детальный делеционный анализ 35S промотора (Fang, 1989) показал следующие результаты: область от -343 до -46 содержит, по меньшей мере, три домена, важных для экспрессии в листьях. Домен -343/-208 обеспечивает 50%-ную промоторную активность. В свою очередь делеция последовательности -208/-90 также приводит к уменьшению активности в два раза. Третий домен -90/-46 нуждается в активации двумя первыми доменами. В итоге стало известно, что для максимального уровня экспрессии необходима и достаточна последовательность -343/-46 (Fang, 1989).

Полноразмерные промоторы всех каулимовирусов включают три функционально важные области. Это, во-первых, два мотива области инициации экспрессии РНК-полимеразой II: TATA и CCACT боксы и энхансерная область, сильно влияющая на CCACT бокс (Bhullar et al., 2003; Lam, 1994). Выделяют также

–18 +1 домен, с которого происходит непосредственная инициация транскрипции. Активность промоторов полноразмерного транскрипта каулимовирусов есть результат синергизма и комбинированного эффекта энхансерных элементов, расположенных в области от –350 до -50 выше ТАТА-бокса (Noad et al., 1997). Последовательности, лежащие за сайтом инициации экспрессии и включающие около 60 пн транскрибируемой области, также показали энхансерную активность (Futterer et al., 1990). Этот участок получил название стимулирующей области 1 (S1) (Pauli et al., 2004). Энхансерная область делится на два домена: А домен (от -50 до -90) и В домен (от -90 до -350) (Fang et al., 1989). Все цис-регуляторные элементы имеют большое значение для развития вирусной инфекции. Удаление ТАТА, ССАСТ-боксов, энхансерной области приводило к потере инфекционности, в то время как удаление А-домена или В-домена по отдельности, не приводило к значительным нарушениям развития инфекции (Turner et al., 1996).

Активность промотора также зависит от различных тканеспецифичных элементов или так называемых транс-регуляторных ядерных факторов. Первый обнаруженный ядерный фактор, способный связываться с 35S промотором, был назван активирующим фактором 1 (Lam et al., 1989). Активирующий фактор 1 связывается с так называемой активируемой последовательностью 1 (сайт as-1), расположенной от -82 до -62 нуклеотида 35S промотора, что приблизительно совпадает с А-доменом энхансерной области (Lam, 1994). Весьма важным для ДНК-белковых взаимодействий являются два TGACG консервативных мотива, расположенных на сайте связывания активирующего фактора 1 (Lam et al., 1989). Было выяснено, что активирующий фактор 1 ответственен за корнеспецифическую экспрессию, поэтому его сайт связывания можно назвать корнеспецифическим цис-регуляторным элементом. Большое значение этот фактор имеет и для экспрессии в стеблях (Lam et al., 1989). Дальнейшие исследования в этой области привели к открытию еще нескольких ядерных белковых факторов, способных связываться с 35S промотором (Benfey et al., 1990; Lam et al., 1989, Lam, 1994). Наиболее изученный фактор был назван активирующим фактором 2 (Lam et al., 1989). Активирующий фактор 2 связывается с листоспецифическим цис-

элементом, расположенным в конце B-домена от -110 до -85 (Haas et al., 2002), по другим данным с последовательностью от -105 до -85 (Lam, 1994) и этот участок получил название активируемой последовательности 2 (сайт as-2). Активирующий фактор 2 взаимодействует с последовательностью GAT(A/G) в пределах активируемой последовательности 2. GAT(A/G) повтор был также найден в сходных позициях промоторов 12 различных генов хлорофилл-связанных белков многих видов растений (Lam et al., 1989). Мутации в пределах GAT(A/G) повторов активируемой последовательности 2 приводит к прекращению взаимодействия с активирующим фактором 2 и к прекращению экспрессии в листьях (Lam, 1994). Эти результаты совпадают с данными о том, что внутренняя делеция области -105/-90 приводила к потери экспрессии в листьях (Fang et al., 1989). Был также обнаружен еще один белковый фактор, который получил название GT1-фактор (Lam et al., 1989). Предполагается, что этот фактор вступает во взаимодействие с активирующим фактором 2 и этот комплекс также способен взаимодействовать с 35S промотором, регулируя уровень экспрессии (Lam, 1994). Было выяснено, что GT1-фактор стимулирует листоспецифическую транскрипционную активность. Расщепление по сайту рестрикции *Hin*fI приводило к прекращению взаимодействия GT1-фактора с 35S промотором и к редукции экспрессии в листьях (Lam, 1994). Благодаря этим данным стало известно, что GT1-фактор взаимодействует с последовательностью GGTTAA, расположенной в области -302/-299 (Lam, 1994). Были обнаружены еще два белковых фактора, способных связываться с 35S промотором, это фактор CAF, повышающий уровень экспрессии в листьях табака и MNF1 - листоспецифический фактор кукурузы. Фактор CAF взаимодействует с областью -208/-155, а фактор MNF1 взаимодействует с областью -281/-235 35S промотора (Lam, 1994).

Исследования активности 35S промотора в различных тканях выявили весьма незначительный уровень экспрессии на самых ранних стадиях развития растения. Экспрессия увеличивалась с переходом на более поздние стадии развития (Sunilkumar et al., 2002). Benfey с сотр. исследовали домены 35S промотора и выделили пять важных регуляторных областей или так называемых

субдоменов и выяснили, что на ранних стадиях развития растений лишь три из них активны и инициируют транскрипцию (Benfey et al., 1990). Эти субдомены занимают следующие положения: B1 (от -105 до -90); B2 (от -155 до -106); B3 (от -208 до -156); B4 (от -301 до -209); B5 (от -343 до -302).

B2 и B4 субдомены не показали экспрессию на ранних стадиях развития растений ни в листьях, ни в стебле, ни в корнях. В зрелом состоянии эти субдомены показали очень незначительный уровень экспрессии в стеблях и листьях, а в корнях показали нормальный уровень. В стеблях наибольшая экспрессия была обнаружена в апикальной меристеме побега. Самыми важными для экспрессии в стеблях оказались субдомены B1 и B3. Было определено, что для корней такими являются субдомены B2 и B3 (Benfey et al., 1990).

В зрелом состоянии во всех тканях наблюдается довольно высокий уровень экспрессии, обусловленный 35S промотором. Самый низкий уровень экспрессии был обнаружен в пыльниках (de Mesa et al., 2004; Sunilkumar et al 2002).

Активность 35S промотора подвержена также сезонным изменениям. Например, при исследовании экспрессионной активности 35S промотора в клетках сосны обыкновенной, она оказалась наиболее высокой в марте. Также было выяснено, что наиболее минимальный уровень экспрессии наблюдался в начале и в конце вегетационного периода (Aronen et al., 1995).

Итак, работа промотора полноразмерного транскрипта зависит от влияния различных белковых факторов растения на энхансерную область. В разных тканях растений на промотор влияют различные факторы, но все они распознаются сайтами связывания энхансерной области и в итоге тканеспецифичность промотора не проявляется. Промотор полноразмерного транскрипта каулимовирусов может работать и без влияния каких-либо активирующих факторов растения, хотя его активность будет несколько ниже.

Промоторы полноразмерного транскрипта других каулимовирусов интенсивно исследуются и некоторые уже находят применение в генной инженерии растений, причем часть из них оказалась более сильной, чем 35S промотор. В связи с этим представляет большой интерес поиск новых промоторов

каулимовирусов, часть из которых могут оказаться более эффективными, чем 35S промотор.

Вторым, после 35S промотора был охарактеризован промотор полноразмерного транскрипта вируса мозаики норичника (ВМН) (Sanger et al., 1990). Из-за того, что размер генома ВМН слегка меньше генома ВМЦК, он получил название 34S промотор, по аналогии с 35S промотором. 34S и 35S промоторы показывают примерно 63% нуклеотидную гомологию в TATA, CCAT и –18 +1 доменах, но на других участках гомология уменьшается до 50% и ниже (Sanger et al., 1990). 34S промотор оказался сравнимым по силе (Maiti et al., 1997) и даже превосходящим силу 35S промотора (van der Fits et al., 1997) и в 20 раз более активным, чем ранее широко используемый в генной инженерии, промотор маннопинсинтазы из Т-ДНК агробактерий (Sanger et al., 1990). Было изучено два штамма ВМН: М3 и DxS. Эти штаммы по последовательности нуклеотидов промоторных областей характеризовались 26%-м различием, в отличие от консервативных 35S промоторов различных штаммов ВМЦК.

Был проведен промотор-делеционный анализ 34S промотора, с использованием маркерных генов *GUS* и *CAT* в трансгенных растениях (Maiti et al., 1997). Этот анализ проводился для выяснения месторасположения основных доменов и важности того или иного домена для активности промотора. Был изучен 34S промотор в координатах генома ВМН от 6481 до 7680 пн. Было выяснено, что для максимальной экспрессии маркерного гена достаточен участок с 5'-концом в положении –249 относительно сайта инициации, а на 3'-конце в положении +64. Таким образом, размер самого 34S промотора составил 314 пн (Maiti et al., 1997).

При исследовании промотора полноразмерного транскрипта вируса мозаики ночной красавицы было выяснено, что для проявления наибольшей его активности достаточно 360 пн (от -297 до +63). Была доказана необходимость для экспрессии последовательности, расположенной за сайтом инициации экспрессии (от +33 до +63). При сравнительном анализе промотор вируса мозаики ночной красавицы оказался сильнее, чем 35S промотор (Dey, Maiti, 1999).

Был также выделен и исследован промотор вируса, окаймляющего жилки земляники (Pattanaik et al., 2004). Существенным для проявления активности данного промотора оказался фрагмент размером 371 пн (от -352 до +19) (Pattanaik et al., 2004), хотя по данным других исследователей для проявления максимальной активности было достаточно даже 328 пн (Wang et al., 2000a). Этот промотор показал 60%-ную гомологию с 35S промотором в CCACT и TATA-боксах (Wang et al., 2000a).

Промотор вируса мозаики маниока показал высокий уровень активности в вакуолях, листьях, корнях как двудольных, так и однодольных растений (Verdaguer et al., 1996). Этот промотор также оказался более сильным, чем 35S промотор (Samac et al., 2004). Для максимальной экспрессии генов была необходима область промотора от –443 до +72. Было показано, что нуклеотиды от –222 до –173 содержат цис-элементы, контролирующие экспрессию в зеленых тканях и в корнях. Результаты этих исследований показывают важность элемента as-1 и мотива GATA для экспрессии. Работа промотора в сосудистых элементах управляется областью, охватывающей нуклеотиды от –178 до –63. Элементы, расположенные между нуклеотидами –149 и –63 активируют работу промотора в зеленых тканях.

Промотор вируса кольцевой гравировки гвоздики упоминается в трех работах английских исследователей (Holmberg et al., 2002; Jobling et al., 2002; Holmberg et al., 2003). Был клонирован промоторный участок ВКГГ размером 380 пн (6737-7118). Этот промотор был использован для проверки экспрессии гена стерол 24-С метилтрансферазы типа 1 в семенах табака. Был сконструирован вектор с промотором ВКГГ, целевым геном и терминатором гена нопалинсинтазы. Использование этой конструкции позволило зафиксировать увеличение количества стеролов на 44% (Holmberg et al., 2002). Далее этот промотор был использован при исследовании иммуномодуляции ферментативной активности в растениях моноклональными антителами (Jobling et al., 2002). В третьей работе при помощи промотора ВКГГ было выяснено, что ферменты 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза и стерол 24-С метилтрансфераза типа 1 играют ключевую роль в обмене

углерода через регуляцию биосинтеза стерола (Holmberg et al., 2003). Но в упомянутых работах исследователи не занимались изучением активности промотора, не проводили промотор-делеционный анализ, и использовали его лишь как инструмент для обеспечения высокого уровня экспрессии целевых генов.

Из упомянутых выше каулимовирусов промотор полноразмерного транскрипта исследован еще у вируса бледной пятнистости сои (Hasegawa et al., 1989). Размер данного промотора составляет 378 пн. Промотор вируса сои также показал отсутствие тканеспецифичности, конститутивность и силу сравнимую с 35S промотором.

Активно ведутся исследования и субгеномных промоторов каулимовирусов. Например, был проведен промотор-делеционный анализ субгеномного промотора BMH (Bhattacharyya et al., 2002). Он показал в два раза большую силу, чем 35S промотор. При этом в двудольных растениях он оказался приблизительно в 25 раз сильнее, чем в однодольных растениях (Bhattacharyya et al., 2002).

Ввиду того, что активность 35S промотора часто бывает недостаточной, кроме поисков новых промоторов, ведутся работы по созданию промоторов с двумя или более энхансерными доменами. Увеличение повторов энхансерного домена приводит к возрастанию силы промотора в несколько раз. Также создаются гибридные формы промоторов. Например, были получены гибриды 35S промотора и промотора маннопинсинтазы. Этот гибридный промотор показал уровень экспрессии в 3-5 раз больший в листьях и в 10-15 раз больший в корнях, чем 35S промотор с двумя энхансерными доменами (Comai et al., 1990).

В одной работе говорится о создании гибридного промотора, содержащего промоторный участок пшеничного гена альфа-амилазы и два энхансерных домена 35S промотора. Данный промотор показал высокую активность в протопластах и трансгенных растениях риса (Omirulleh et al., 1993).

Сконструированы также и промоторные кассеты для высокоуровневой экспрессии генов (Mitsuhara et al., 1996). Для этих целей были применены 3 фрагмента 35S промотора:

1. Последовательность от -419 до -90 нуклеотида

2. Последовательность от -390 до -90 нуклеотида
3. Последовательность от -290 до -90 нуклеотида.

При конструировании гибридных промоторов также были применены первый интрон гена запасного белка фасоли *Phaseolus vulgaris*, 5'-нетранслируемая область генома вируса табачной мозаики, терминатор 35S транскрипта и терминатор гена нопалинсинтазы. Эффективность этих гибридных промоторов была проверена на протопластах двудольных (табак) и однодольных (рис) растений, где маркером служил ген β-глюкуронидазы (*GUS*). В протопластах табака показали активность только 1-й и 2-й фрагменты 35S промотора, а в протопластах риса эту активность показали все 3 фрагмента. Также было показано, что терминатор 35S транскрипта более эффективен, чем терминатор нопалинсинтазы. В итоге оказалось, что самой эффективной для протопластов табака является конструкция, содержащая все элементы 35S промотора, 5'-нетранслируемую область генома вируса табачной мозаики и терминатор 35S транскрипта. А для протопластов риса было важно также добавление интрона гена фасоли. Но во всех случаях, в протопластах табака уровень экспрессии был в несколько раз выше, чем в протопластах риса (Mitsuhara et al., 1996).

Глава 2. Регуляция размеров органов у растений

Согласно литературным данным, рост органов растений контролируется двумя основными механизмами, а именно регуляцией клеточного деления и клеточного растяжения и, таким образом, зависит от изначального числа клеток в апикальных меристемах побега и корня, количества клеток, рекрутированных в зачатки органов, скорости деления клеток в зачатках органов, продолжительности деления клеток в зачатках органов и сохранения меристематической компетентности, роста клеток растяжением, деления меристемоидных клеток, уровня полиплоидизации и др. (Gonzalez et al., 2012). В наших исследованиях мы, в первую очередь, обратили внимание на процессы поддержания меристематической компетентности в апикальной меристеме побега и зачатках

органов, а также на механизмы регуляции роста клеток растяжением, так как, согласно данным литературы, влияние именно на эти компоненты регуляторной системы способствовало большей степени изменения размеров органов растений (Mizukami, Fischer 2000; Hu et al., 2006).

Итак, во время первой, так называемой, пролиферативной фазы развития органа клетки митотически делятся, и происходит накопление цитоплазматической массы. Затем процессы деления постепенно сменяются клеточным растяжением, при котором клетки увеличиваются в размерах и дифференцируются. Очень часто процессы клеточного растяжения сопровождаются полиплоидизацией из-за эндоредупликации, что также способствует увеличению размера органов, возможно, за счет увеличения дозы генов (Щелкунов, 2004). Регуляция клеточного деления и растяжения в растениях скоординирована и контролируется одновременно фитогормонами, мембранными рецепторами, вторичными мессенджерами, протеинкиназами, протеинфосфатазами, кальциевыми каналами, белками-переносчиками фитогормонов, транскрипционными факторами, факторами ремоделлинга хроматина и многими другими (Тарчевский, 2001; Кошкин, 2010; Кулаева, Демиденко, 2010).

Регуляция роста и развития растений – это сложнейший и хорошо скоординированный процесс, который, видимо, контролируется тысячами генов, однако наибольший интерес представляет исследование основных генов-регуляторов роста, в первую очередь, так называемых переключателей развития (Медведев, Шарова, 2010), число которых в растениях должно быть на порядок меньше. Из литературных источников известно, что клеточное растяжение находится под контролем генов, кодирующих эндогликаназы, экспансины, ксилоглюканэндотрансгликозилазы, транскрипционные факторы, трансмембранные белки с OSR-доменом и другими, при этом большинство из них, видимо, пока остаются неизвестными. В регуляции клеточного деления задействованы такие гены, как *AINTEGUMENTA* (*ANT*), *ARGOS*, *CYCLIND3;1*, *CDPK*, *AN3/GIF1*, *WUSCHEL*, *CLAVATA3* и многие другие. Показано, что

сверхэкспрессия некоторых из перечисленных выше генов приводит к увеличению размеров органов у модельных трансгенных растений (Krizek, 1999; Mizukami, Fischer 2000; Hu et al., 2003; Cho, Cosgrove, 2000). В связи с этим предполагается, что используя генно-инженерные конструкции генов, участвующих в регуляции роста совместно с сильными конститутивными, индуцибельными или тканеспецифичными промоторами, возможно получение хозяйственно ценных растений с увеличенными размерами органов. Однако уже при проведении первых работ по получению трансгенных растений с увеличенными размерами органов исследователи столкнулись с проблемой компенсаторного механизма в растениях, направленного на поддержание размеров органов близких к норме (Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003). Например, при получении трансгенных растений с увеличенным количеством клеток в органе, уменьшались размеры отдельных клеток (Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003), а при стимулировании клеточного растяжения (Hu et al., 2006) уменьшалось количество клеток в органе. Все эти данные говорят о том, что процессы клеточного деления и клеточного растяжения тесно связаны друг с другом через целую сеть сигнальных молекул, особое место среди которых, безусловно, занимают фитогормоны и, судя по последним данным (Feng et al., 2011), так называемые белки с OSR-доменом. Необходимо отметить, что благодаря интенсивным исследованиям последних 20-ти лет было открыто и изучено множество генов, участвующих в регуляции роста и развития растений. Однако особенности регуляции их экспрессии, механизмы действия и мишени большинства исследованных генетических регуляторов, а также их взаимодействие между собой и влияние их эктопической экспрессии на фитогормональный статус во многом остается неизученным. К тому же клеточное деление и клеточное растяжение исследуется часто отдельно, что не совсем правильно, так как эти процессы тесно связаны между собой и зачастую находятся под контролем одних и тех же фитогормонов и белковых молекул (Шакирова, 2010; Qin et al., 2014). В связи с этим, наибольших результатов при исследовании роста растений можно добиться путем одновременного изучения

большого количества генов и их белковых продуктов, их взаимодействия между собой и влияния их на содержание фитогормонов. Большой интерес также представляет изучение влияния экзогенных фитогормонов на уровень экспрессии исследуемых генов. Данное направление исследований актуально не только в рамках фундаментальных исследований роста и развития, но и из-за возможности практического применения этих знаний в сельском и лесном хозяйствах, например, для увеличения размеров органов растений. Значительная часть данных о генетической регуляции роста и развития растений были получены при исследовании модельных растений *A. thaliana*, однако представляет не меньший интерес изучение этих процессов и поиск гомологов генов-регуляторов в хозяйственно-ценных растениях.

2.1. Молекулярные механизмы регуляции роста и развития растений

Надземные органы растений – листья, цветки и плоды – формируются в процессе постэмбрионального развития. Они образуются из стволовых клеток недифференцированной апикальной меристемы побега (Veit, 2009). Известно, что рост растений неограничен, то есть они могут расти в течение всей жизни, однако деление клеток происходит только на определенных участках растения, образованных недифференцированными тканями. Поскольку все органы у растений вырастают всегда только до какого-либо установленного размера и формы у каждого конкретного вида, они должны находиться под строгим генетическим контролем (Mizukami, 2001; Ingram, Waites, 2006). К примеру, размеры листьев и цветков у *N. tabacum* единообразны, но, в то же время, даже у родственных видов есть заметные различия в величине и архитектуре тех же органов (например, *N. tabacum* и *Petunia axillaris*). Иначе говоря, у каждого растения есть своя генетическая программа, которая контролирует - до каких пределов ему расти.

Размеры органа – наследуемый признак, который может измениться из-за воздействия факторов окружающей среды, но только до известных границ, определяемых нормой реакции. Характерные для вида параметры органов

определяются, как правило, количеством клеток в их составе, которое, в свою очередь, регулируется числом делений меристематических клеток побега (Mizukami, Fischer, 2001). В процессе развития растения латеральные органы в виде зачатков (примордий) инициируются из апикальной и латеральной меристем (Mizukami, Fischer, 2000). Клетки, образующие примордии, – недифференцированные, соответственно, они способны к пролиферации. Однако, когда орган достигает зрелости, его клетки теряют способность делиться. Поэтому считается, что поддержание меристематической компетентности клеток – это один из ключевых механизмов, ответственных за регуляцию числа клеток в органе и, в конечном счёте, за размеры этого органа.

Вегетативное и генеративное развитие растения зависит от активности недетерминированных и детерминированных меристем, а длительность вегетативной фазы и время перехода к цветению определяют общую скорость развития (Howell, 1998; Лутова и др., 2000). Дифференциальная экспрессия различных генов в определённые отрезки времени обеспечивает гомеостаз структуры апикальной меристемы в процессе вегетации, а при переходе к репродуктивному развитию запускает программу образования флоральной меристемы и дифференциации её клеток. Гены-регуляторы морфогенеза изучали на модельных растениях, а также частично на хозяйственно ценных видах, тем не менее, выявление многих других гомеозисных генов, определение их структуры и месторасположения в генной сети находятся ещё на ранней стадии исследования.

Как правило, все клетки организма, независимо от того какими они становятся в дифференцированном состоянии, содержат в геноме одну и ту же ДНК. Тем не менее, экспрессия генов в клетках одного типа явно отличается от их экспрессии в клетках другого типа. Каждая группа зрелых дифференцированных клеток обладает свойственной лишь им одним морфологией, и поддерживает свой собственный набор синтезируемых белков. Матричные РНК, содержащиеся в клетках разного типа, также неодинаковы (Рэфф, Кофмен, 1986). Таким образом, специализация клеток происходит благодаря изменениям дифференциальной экспрессии генов в различных линиях клеток развивающегося зародыша.

Гены, детерминирующие процессы роста и дифференцировки клеток, кодируют транскрипционные факторы, ответственные за программы образования тканей и органов растения. Гены-регуляторы развития известны также под названием гомеозисных; они контролируют работу других генов и детерминируют превращение внешне неразличимых участков зародыша или определённой ткани, органа или участка тела (Медведев, Шарова, 2010). Под действием мутации в гомеозисных генах процесс развития будет отклоняться от нормы, в результате чего какая-либо структура данного организма будет замещена гомологичной структурой. У растений существует ряд программ, контролируемых гомеозисными генами: филлотаксис, флоригенез, развитие побега или листа и др. (Coen, Meyerowitz, 1991; Weigel, Meyerowitz, 1993).

Подсчитано, что высшие растения содержат в среднем около 25-50 тыс. генов (Tyagi, 2001). Во всех тканях функционирует лишь третья часть генов растения, вторая треть экспрессируется избирательно, лишь в некоторых органах, последняя треть активна исключительно в каком-либо конкретном органе. К примеру, анализ экспрессионной активности генов *A. thaliana* выявил следующие особенности: из 8300 генов 36 экспрессируются только в цветках, 64 – в корнях, 94 – в листьях, 3 – в цветоносах. Также в составе этих органоспецифичных генов были найдены промоторы, обеспечивающие специфичность экспрессии, причём, только в определённый промежуток времени (Zhu et al., 2001). У высших растений наиболее хорошо изучено функционирование двух классов генов-регуляторов роста и развития: гены с MADS-боксом и гены с гомеобоксом.

Термин MADS-бокс – аббревиатура, образованная первыми буквами названий четырех генов: *MCM1* дрожжей, *AG A. thaliana*, *DEF* львиного зева и *SRF* млекопитающих (Liu, 2008). К генам данного класса относятся *AG, DEF (DEFICIENCE), AP1* и *AP3, TFL1 (TERMINAL FLOWER), PI* и др. Они контролируют развитие цветка и определяют судьбу клеток в семязачатке, более того, продукты их экспрессии были найдены в эмбрионе, листьях и корнях (De Bodt et al., 2003; Xu, Kong, 2007). Таким образом, к этому классу принадлежат гены идентичности органов цветка, а также многие другие гомеозисные гены.

Вероятно, возникновение новых подклассов MADS-бокс-генов происходило благодаря появлению новых органов в процессе эволюции растений (Ng, Yanofsky, 2001). Экспрессия самих генов-регуляторов развития контролируется внутренними (фитогормоны, сахароза, минеральные вещества) и внешними (свет, температура) факторами. При регуляции программ роста и развития важнейшую роль играют гены с промоторами, чувствительные к факторам окружающей среды. Также выявлено, что в составе промоторов многих генов, регулируемых фитогормонами, есть транскрипционные элементы, которые и определяют гормональную зависимость ростовых реакций (Медведев, Шарова, 2010).

На данный момент исследованы ключевые гены, контролирующие и регулирующие процессы эмбриогенеза, старения и фотоморфогенеза, функционирование апикальных (Haecker, Laux, 2001), латеральных (Anastasiou, Lenhard, 2008) и флоральных меристем, обеспечивающие формирование корня, листьев (Horiguchi et al., 2005; Busov et al., 2008) и сосудов. Наиболее хорошо изучены гены развития цветка (Krizek, Fletcher, 2005; Weiss et al., 2005; Лутова, 2005; Liu, 2008; Krizek, 2009).

С помощью средств автоматизированной обработки, математического анализа и имеющейся информации о генах на сегодняшний день вполне реально конструирование генных сетей. Генные сети позволят произвести тотальную оценку взаимодействия генов-регуляторов при реализации программ клеточной специализации и органогенеза. Каждый узел в данной сети будет регулировать и контролировать не один, а несколько процессов, исполняемых непараллельно во времени, а на различных стадиях роста и дифференцировки. Исходя из этого, фенотипы растений, проявляемые при одной и той же мутации, затрагивающей разные локусы одного гена, как правило, будут отличаться друг от друга (Медведев, Шарова, 2010).

Гомеобокс-содержащие гены имеют типичный участок ДНК, размером около 180 пн. Гомеобокс кодирует гомеодомен – консервативный участок ряда транскрипционных факторов. Такая нуклеотидная последовательность характерна

для генов регуляции развития каскадного типа (Chan et al., 1998; Reiser et al., 2000).

Первым клонированным и исследованным гомеобокс-содержащим геном растений был *KNOTTED1 (KN1)* кукурузы, название которого дало начало целому семейству генов, подобных *KN1, KNOX* (*KNOTTED1-like HOMEOBOX*). У мутантов *kn1* нарушена экспрессия гена *KN1* во времени и пространстве, а именно вокруг дифференцированных клеток листа появляются участки (“knots” – “узлы”) с интенсивно пролиферирующими клетками. Все *KNOX*-гены контролируют деятельность АМП, процесс закладки листовых зачатков и развития листьев, подавляют дифференцировку клеток, способствуя их пролиферации. Продукты экспрессии данных генов найдены в апикальных и флоральных меристемах (Williams, 1998; Hake, Ori, 2002; Scofield et al., 2007).

2.2. Регуляция клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега

Апикальная меристема побега может давать начало органам и вторичным меристемам на протяжении всей жизни растения. Стволовые клетки, локализованные в центральной зоне меристемы, активно делятся, смещая дочерние клетки к периферии, где они становятся частью зачатков органов и дифференцируются (Lenhard et al., 2002). Под двумя слоями клеток центральной зоны L1 и L2 располагается организующий центр, который состоит из недифференцированных, но при этом митотически малоактивных стволовых клеток (Lenhard et al., 2002). Правильное функционирование меристемы и сохранение стволовых клеток в центральной зоне достигается за счет согласованности процессов поддержания меристематической компетентности, деления клеток и их дифференцировки (Lenhard et al., 2002). Известно, что в контроле деления и дифференциации клеток в апикальной меристеме побегов участвуют гены *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) и *WUSCHEL* (*WUS*), кодирующие два основных транскрипционных фактора, действующие независимо друг от друга, подавляя дифференциацию клеток (Lenhard et al., 2002). Активация STM,

который относится к гомеодомен-содержащим транскрипционным факторам класса KNOX, приводит к увеличению экспрессии цитокинин-регулируемого гена *ARR-5*, а также генов *AtIPT5* и *AtIPT7*, участвующих в биосинтезе цитокининов (Jasinski et al., 2005). Данный транскрипционный фактор вовлечен в цитокининовый сигналинг направленный на регуляцию клеточного деления, который включает еще три близкие по строению гистидинкиназы – рецепторы цитокининов CRE1/AHK4, AHK3 и AHK2, а также ряд переносчиков фосфатов AHP (Романов, 2009).

Ген *WUS* кодирует гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, относящийся к группе генов *WOX*, экспрессирующийся в центральной зоне апикальной меристемы в небольшой группе клеток, которые составляют организующий центр, поддерживая клетки в недифференцированном состоянии (Leibfried et al., 2005). Транскрипционный фактор WUS негативно регулирует экспрессию генов *ARR* типа А, сдерживающих передачу цитокининового сигнала (Ikeda et al., 2009). Цитокинины активируют продукты генов *ARR* типа В, но, в то же время, опосредованно способствуют активации генов *ARR* типа А, разрывающих запущенную этой группой гормонов цепь сигналов. WUS-фактор блокирует эту петлю обратной связи, что проявляется в цитокинин-регулируемом поддержании стволовых клеток в недифференцированном сосотоянии. Таким образом, цитокинин в центральной зоне апикальной меристемы может оказывать свой эффект в полной мере только в клетках, активно экспрессирующих регуляторный белок WUS. Более того, цитокинины сами способны увеличивать уровень экспрессии гена *WUS* через рецепторный комплекс AHK4 (Sablowski, 2011).

Гены *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) являются негативными регуляторами клеточной пролиферации, способствующими переходу клеток к дифференцировке, при этом мутанты *A. thaliana clv1*, *clv2* и *clv3* фенотипически не различаются (Clark et al., 1997). Продуктом гена *CLV3* является небольшой секретирующийся в межклеточное пространство пептид, состоящий из 78 аминокислот, способный к транспорту по апопласту, при этом в зрелом состоянии

он гликозилирован L-арабинозой и состоит из 12-ти аминокислот, которые составляют так называемый CLE-домен (Shinohara et al., 2010). CLV3 относится к широко распространенным в растениях CLE- пептидам, которые иногда называют также гликопептидными фитогормонами (Shinohara et al., 2010). *CLV1* кодирует рецепторную киназу с внеклеточным лейцин-богатым повторяющимся рецепторным доменом и внутриклеточной серин/треонин-киназной областью. *CLV2* кодирует белок с внеклеточным доменом, похожим на домен CLV1, однако у этого белка отсутствует киназный домен (Clark et al., 1997). Было показано, что CLV3 связывается непосредственно с CLV1 (Trotochaud et al., 1999), то есть, в конечном счете, продукт гена *CLV3* является сигнальной молекулой, а продукт гена *CLV1* является его рецептором. В передаче сигнала CLV3 важную роль играет также мембрано-ассоциированная киназа CORYNE (CRN) (Zhu et al., 2010). Было показано, что сигнальный путь CLV3 включает как минимум два различных рецепторных комплекса, один из которых состоит из гомодимера CLV1, а второй из CLV2/CRN гетеродимера (Zhu et al., 2010). Необходимо отметить, что даже известная на данный момент часть регуляторной цепи пептида CLV3 выглядит намного сложнее: например, она еще включает рецептор-подобную протеинкиназу RPK2, но в целом сигнал от этих активированных рецепторных комплексов передается в ядро, где его мишенью служит ген *WUS* (Осипова и др., 2006), цитокинины же способствуют прерыванию этой петли обратной связи (Sablowski, 2011).

В литературе имеется множество данных о регуляции клеточной пролиферации в АМП и зачатках органов; накапливаются также данные о взаимосвязи между этими процессами, их скоординированности и контроле большим количеством белковых факторов и фитогормонов (Sablowski, 2011). В АМП обнаруживаются повышенные концентрации цитокининов и ауксинов, которые активируют клеточное деление и сдерживают процесс дифференцировки клеток (Sablowski, 2011). Концентрация же гиббереллинов и брассиностероидов возрастает в активно растущих органах, способствуя в основном растяжению клеток и их дифференцировке (Dodsworth, 2009). Цитокинины и ауксины также

участвуют в регуляции роста клеток растяжением, при этом взаимосвязи между этими фитогормонами и генами-переключателями развития во многом остаются неизвестными (Holst et al., 2011).

2.3. Морфогенез листа

Апикальная меристема побега (АМП) состоит из группы непрерывно делящихся стволовых клеток, из которых формируются латеральные органы. Ввиду того, что стволовые клетки постоянно дифференцируются и становятся частью тканей латеральных органов, необходимо, чтобы процесс их пролиферации также был непрерывен. АМП функционирует корректно, если пролиферация и дифференциация стволовых клеток скоординированы во времени и пространстве.

На стадии вегетативного развития растения АМП дает начало фитомерам, элементарным повторяющимся структурным единицам растения. Фитомер состоит из листа, междоузлия и пазушной почки у основания листа, обладая, таким образом, определённой автономностью. Отрезок времени между формированием отдельных фитомеров, так называемый пластохрон, часто используют как показатель скорости развития (Howell, 1998). Меристема пазушной почки потенциально может формировать боковой побег, перерастающий иногда в новое растение. Эта почка активируется, как правило, в случае гибели АМП (Лутова и др., 2000).

Фитомеры образуются как небольшие вздутия на АМП, называемые листовыми зачатками (примордиями), на расстоянии около 1 мм друг от друга. На каждый примордий приходится около сотни клеток. Местоположение листовых зачатков определяет будущее расположение листьев и называется филлотаксисом. Филлотаксис регулируется гормонально: зона закладки листового зачатка определяется направлением транспорта ауксина, который синтезируется в растительном организме волнами, при этом у зон будущих примордий наблюдается доминирование, то есть на смежных участках закладки зачактов не происходит, листья оказываются удаленными друг от друга на максимальное

расстояние (Лутова и др., 2000; Чуб, 2005). Когда поступает ауксиновый сигнал от АМП в примордиальной зоне “включаются” определённые гены (гены с гомеобоксом). Если нарушить систему транспорта ауксинов, произойдут характерные нарушения филлотаксиса и проводящей системы, а закладка примордий будет определяться простой диффузией. За распределение пространства между примордиями и междоузлиями также ответственны, главным образом, гены с гомеобоксом. Более того, обнаружено, что клетки разных слоев способны обмениваться достаточно высокомолекулярными соединениями (к примеру, транскрипционными факторами и РНК) (Haecker, Laux, 2001). Транспорт этих молекул является ещё одним механизмом для регуляции ростовых процессов. При повышении эндогенного уровня цитокининов на листьях образуются придаточные почки. Это означает, что репрессии функций меристемы побега не происходит. Таким образом, фитогормоны (ауксины, цитокинины) и гены с гомеобоксом рассматриваются как две одновременно действующие и взаимосвязанные регуляторные системы, контролирующие меристематическую активность (Лутова и др., 2000; Чуб, 2005).

В целом программа развития листа реализуется в три этапа:

1. образование листового зачатка (примордия);

2. образование оси листа;

3. образование листовой пластинки.

Деление клеток, дифференцировка и удлинение листа осуществляются от верхушки к основанию (Лутова и др., 2000). Меристематические клетки, инициирующие развитие листа, расположены в трёх слоях АМП (L1, L2, L3), формирующих определённые ткани органа. Так, у *Magnoliopsida* из клеток слоя L1 получается эпидермис, а из L2 и L3 — внутренние ткани. Число клеток, участвующих в формировании листового зачатка, варьирует в той или иной степени у разных видов и детерминируется генотипом. Например, у *A. thaliana* в каждом слое расположены по 5-10 клеток, инициирующих закладку листа (Лутова и др., 2000). При инициации листа сначала изменяются механические свойства верхушки побега из-за размягчения клеточных стенок, которое, судя по всему,

обеспечивается экспансинами (Fleming et al., 1997). Давление слоя L1 ослабевает, а в слое L2 начинаются периклинальные деления, то есть фактически изменяется направление веретена деления, образуется новый вектор роста. Интересно, что при изменении положения веретена деления меняется и общая поляризация клеток, а элементы цитоскелета располагаются вдоль новых осей. Это приводит в частности к тому, что изменяется направление отложения целлюлозных волокон на поверхности листового зачатка так, что растяжение и рост возможны только в одном направлении. По-видимому, процесс отложения целлюлозы является определяющим при детерминации формы будущего листа. У сложных по форме листьев все эти процессы повторяются несколько раз при образовании боковых лопастей или долей (Haecker, Laux, 2001; Чуб, 2005).

В процессе онтогенеза у одного и того же растения развиваются различные по морфологии листья. Как правило, их можно разделить на три класса: ювенильные, переходные и зрелые, но у некоторых видов количество классов может быть несколько бóльшим. В течение эмбриогенеза образуются семядоли, которые накапливают запасные вещества для развития зародыша. В это время в семядолях экспрессируются определенные гены, например, гены синтеза запасных белков. После того, как семя прорастёт, развиваются первые настоящие листья – ювенильные, с простой формой, но более крупными, чем семядоли, размерами. У ювенильных листьев жилкование иное, чем у семядолей, нет запасных белков. Когда начинается репродуктивное развитие – переход к цветению, листья также меняют свою форму и размеры. Одним из хороших примеров является изменение типа листа в онтогенезе у *Eucalyptus albina*. За счёт исчезновения воскового налёта и опушения лист меняется от серо-голубого опушенного до темно-зеленого глянцевого, а форма – от ланцетовидной до рассечённой во время перехода от ювенильной стадии к цветению. Многие признаки листа (наличие лопастей, наличие и толщина восковой кутикулы, опушение и др.) детерминированы генотипом. На морфологию также влияют факторы окружающей среды и физиологический статус растения.

Количественные параметры листа контролируются полигенно, а также зависят от условий внешней среды (Kerstetter, Poethig, 1998; Лутова и др., 2000).

2.3.1. Рост листа

В то время как рост целого растения, как правило, не имеет фиксированной конечной точки, отдельно взятые органы растут только до вполне определенных размеров и форм, определяемых генотипом, нормой реакции и особенностями самого органа. Высокая наследуемость различий в размерах указывает на то, что размер органа находится под строгим генетическим контролем (Horiguchi et al., 2005).

Как говорилось выше, листья, как и другие органы растений, растут путём регуляции двух различных, но при этом скоординированных процессов: клеточной пролиферации и роста клеток растяжением. В течение первой фазы развития органа, клетки митотически делятся и продуцируют новые цитоплазматические массы. Через некоторое время процессы клеточной пролиферации постепенно замедляются, и постмитотические клетки начинают расширяться. Растяжение клеток часто сопровождается увеличением плоидности вследствие эндоредупликации (например, в листьях и гипокотиле), хотя в отдельных случаях (к примеру, органы цветка), увеличивающиеся клетки остаются диплоидными (Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003). Различия в размерах и форме листьев среди разных видов и внутри одного вида являются результатом модификаций программ роста регулирующими факторами и эволюционными изменениями (Anastasiou, Lenhard, 2008).

Клеточное деление регулируется механизмом клеточного цикла, и направление ключевых периодов регулирует начало и продолжение через цикл *G0→G1, G1→S* и *G2→митоз*. Продолжительность периодов контролируется посредством активности циклин-зависимых протеинкиназ и, как правило, активируется синтезом циклина, других взаимодействующих белков и обратимого фосфорилирования ключевых аминокислотных остатков. Есть факты прямой

корреляции между уровнем клеточных делений и колебаниями величины органа (Mizukami, Fischer 2000; Hu et al., 2003), тем не менее, известно, что только лишь изменение количества клеток не всегда приводит к изменению размеров органа (Dewitte et al., 2003).

Существует два механизма увеличения клеток сверх нормального размера: (1) активность вакуоли – увеличение внутриклеточного объема без увеличения объема цитоплазмы, и (2) эндоредупликация – удвоение генома без митоза. Увеличение размера клеток напрямую коррелирует с уровнем плоидии, так как связанные между собой прогрессия клеточного цикла и рост разделены во времени. Например, в эпидермальных клетках *A. thaliana* обнаруживается прямая пропорциональность между уровнем ядерной ДНК и размером клеток, а плоидность варьирует от 4C до 32C. Следует отметить, что увеличение размера клеток не всегда происходит в результате эндоредупликации. Так, защитные клетки *A. thaliana* увеличиваются в размерах, но при этом сохраняют содержание ДНК 2C. Таким образом, доля ДНК увеличивается только в клетках определенного типа.

В свою очередь биосинтез экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз является более поздним процессом, влияющим на морфологию клетки. Экспансины выделяются в апопласт, что приводит к размягчению клеточной стенки и увеличению размеров клеток и листа в целом (Шарова, 2007).

2.3.2. Генетический контроль морфогенеза листа

Выявленные мутации по развитию и типу листа можно подразделить на две группы: (1) влияющие на закладку органа и (2) его идентичность. Для мутаций первой группы присуще изменение морфологии листа на всех этапах развития. Гены, ответственные за эти изменения, участвуют в регуляции перехода фаз *ювенильная → вегетативная → репродуктивная*. У второй группы мутаций затронуты только стадиеспецифические признаки. Гены, обеспечивающие данные изменения, нужны для формирования листа, морфологически характерного для

каждой фазы. Их экспрессия зависит от эндогенных сигналов (Лутова и др., 2000). Картина клеточного деления модулируется на уровне органов сигналами, определяющими суммарную массу органа.

К генам первой группы можно отнести *VIVIPAROUS (VPS)* и гены, контролирующие биосинтез гиббереллловой кислоты (ГК3) — *DWARF (D) 1, 3, 5*, *ANTHER EAR (AN1)* и др. Мутации по данным генам приводят к длительному формированию ювенильных листьев. Если проводить внешнюю обработку мутантов ГК3, то эффект мутаций фентопически супрессируется, что свидетельствует о пониженном уровне ГК3. Таким образом, ГК3 регулирует переход от вегетативной фазы развития к репродуктивной, в которой отсутствуют ювенильные листья, причём ГК3 - не единственный гормон, вовлеченный в этот процесс.

Ген *VPS* кодирует белок, который необходим для перехода к цветению, однако он не оказывает непосредственного влияния на время перехода к цветению, а лишь удлиняет вегетативную фазу развития. Как уже было сказано выше, каждая фаза развития растения характеризуется определенным типом листа. У мутанта *amp1* (*altered meristem program 1*) ускоренная программа инициации развития листа приводит к формированию большего числа ювенильных листьев и трансформации части листьев в семядоли. Мутант *psd* (*paused*) характеризуется задержкой развития листьев, которая приводит к полному отсутствию ювенильных листьев. У мутанта *hasty* на месте формирования ювенильных листьев развиваются взрослые листья. Причиной таких изменений является сокращение времени прохождения ювенильной фазы.

При мутации *A. thaliana forever young (fey*) формируются более крупные зачатки листьев по сравнению с диким типом. В дальнейшем наблюдается истощение меристемы после образования нескольких листьев. Мутация *narrow sheath* имеет плейотропный эффект, количество клеток, участвующих в закладке зачатка листа значительно меньше по сравнению с диким типом, инициация листа происходит за счет изменения полярности и скорости клеточного деления (Лутова и др., 2000).

У второй группы мутаций затронуты признаки, специфичные для определенной стадии. К ним относятся мутации по генам *TEOPOD (TP) 1, 2, 3, CORNGRASS (CG), GLOSSY 15 (GL15)* (выделены у кукурузы) (Kerstetter, Poethig, 1998), *OSH1* (Williams, 1998; Scofield et al., 2007), *PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV)* (Dinneny et al., 2005), *YABBY (YAB)*: *FILAMENTOUS FLOWER (FIL), YAB2* и *YAB3* (у *A. thaliana*) (Nole-Wilson, Krizek, 2006), *FANTASTICA (FAN)* (у львиного зева) (Waites et al., 1998) и *DROOPING LEAF (DL)* (у риса) (Yamaguchi et al., 2004), *KANADI* (Eshed et al., 2001), *CINCINNATA* (Nath et al., 2003), *FRAGILE FIBERS2* (Weiss et al., 2005) и др. Гены, контролирующие эти изменения, необходимы для формирования листа, морфологически характерного для определенной фазы. Их экспрессия зависит от эндогенных сигналов.

У мутантов кукурузы по генам *TEOPOD (TP) 1, 2, 3, CORNGRASS (CG), GLOSSY 15* (*GL15*) затронуты такие признаки, как морфология листовой пластинки, восковой налет, наличие трихом и опушение. Например, листья доминантного мутанта *tp2* морфологически и анатомически имеют промежуточный тип между ювенильной и взрослой стадиями, при этом не затрагивается время вступления в определенную фазу развития. Таким образом, ген *TP2* контролирует независимую программу формирования листа, типичного для ювенильной фазы развития. В отличие от гена *TP2*, ген *GL15* действует на более ранних стадиях, он контролирует признаки эпидермиса, характерные для ювенильных листьев и репрессирует аналогичные признаки у взрослых листьев. Ген *GL15* клонирован; показано, что он кодирует белок со значительной гомологией с белком гена *APETALA2*. Утрата функции гена *GL15* приводит к трансформации эпидермиса, характерного для ювенильного листа в эпидермис зрелого листа. Таким образом, функция гена *GL15* заключается в регуляции развития эпидермиса листа (Kerstetter, Poethig, 1998; Лутова, 2000).

Ген *OSH1* отвечает за форму и морфологию ламины, его влияние связано с изменением направления ориентации деления в слоях L1-L3: у мутанта *osh1* в процессе формирования листа в его тканях вместо антиклинальных делений

происходят периклинальные деления, более того, ингибировался рост боковых жилок. Таким образом, данная мутация является результатом изменения клеточного деления, что приводит к изменению дифференцировки и развития листа, а ген *OSH1* соответственно определяет морфологию листа (Williams, 1998; Hake, Ori, 2002; Scofield et al., 2007).

Гены *PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV)* экспрессируются в адаксиальном домене зачатка листа. Доминантные мутации в *PHB* или *PHV* трансформируют абаксиальные клетки в адаксиальные и продуцируют радиально симметричные латеральные органы. У мутантов *rev* нарушено развитие АМП, в результате чего наблюдается редукция вторичных почек и увеличивается размер листьев и органов цветка. Тройные мутанты *phb/phv/rev* формируют единственную абаксиализированнную и радиализированную семядолю (Weiss et al., 2005).

При мутации по генам *REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1 A. thaliana*, продолжительность роста и пролиферации клеток продлена, что приводит к увеличению размеров листьев и цветков, а также к утолщению стебля. Напротив, мутант *auxin resistant1* (*axr1*) имеет уменьшенные по сравнению с нормальным растением размеры органов, причём уменьшение происходит за счет редукции количества клеток (Leyser et al., 1993; Hu et al., 2003).

Гены семейства *YABBY (YAB)*: *FILAMENTOUS FLOWER (FIL), YAB2* и *YAB3* (у *A. thaliana*), *FANTASTICA (FAN)* (у львиного зева) и *DROOPING LEAF (DL)* (у риса) стимулируют растяжение листовой пластинки, а также способствуют её абаксиальному развитию (Nole-Wilson, Krizek, 2006). *FAN* и *FIL* контролируют дорзивентральное строение листа; на начальных стадиях развития эти гены экспрессируются во всем объеме зачатка листа. Предположительно, в дальнейшем АМП посылает сигнал неизвестной природы, и в верхних частях зачатка экспрессия генов *FAN* и *FIL* ослабевает. В итоге на поздних этапах морфогенеза эти гены экспрессируются только в дистальной части зачатка. Зона их экспрессии определяет будущую нижнюю поверхность листа. При мутациях *fan* и *fil* все стороны листа оказываются верхними, лист становится цилиндрическим

(McConnell, Barton, 1998; Waites, Hudson, 2001; McConnell et al., 2001). Эктопическая экспрессия *YABBY*-генов может превращать некоторые типы адаксиальных клеток в абаксиальные (Sawa et al., 1999a, b; Siegfried et al., 1999), но при этом потеря активности *FIL* и *YAB3* не приводит к обратному результату (Eshed et al., 2004). Ген *DL* риса участвует в формировании жилкования листьев и контролирует развитие плодолистиков (Hirano, Yamaguchi, 1999).

Гены семейства *KANADI (KAN1, KAN2* и *KAN3)* определяют абаксиальную идентичность листа. У *kan*-мутантов абаксиальные клетки превращаются в адаксиальные, причём этот эффект носит характер полимерии. Сверхэкспрессия гена *KAN* приводит к абаксиализации адаксиальных областей и радиализации латеральных органов. Продукты экспрессии гена *KAN1* были найдены в абаксиальном домене развивающихся листьев (Eshed et al., 2001, 2004; Kerstetter et al., 2001).

Ген *CINCINNATA* (*CIN*) контролирует форму и размеры листа, репрессируя клеточный цикл, когда это необходимо. Также этот ген регулирует пролиферацию и растяжение клеток в лепестках (Crawford et al., 2004). Существуют мутации, затрагивающие образование клеточной стенки, причем они в основном имеют плейотропный эффект. Мутация в гене *FRAGILE FIBERS2 (FRA2)* затрагивает длину и ширину целлюлозных волокон, в результате чего проявляется плейотропный фенотип с короткими, но широкими листьями и цветками, свидетельствуя о том, что процесс отложения и формирования клеточной стенки играет важную роль для достижения нормальных размеров и пропорций всех органов растения (Cosgrove, 2000; Weiss et al., 2005; Burk et al., 2001).

Ген *KN1* можно отнести к обеим группам, так как он влияет и на закладку зачатков листьев, и на дальнейшее формирование листа. Он представляет особый интерес, так как содержит гомеобокс, типичный для генов каскадной регуляции развития дрозофилы. При мутации кукурузы *kn1* растение теряет лигулу, а вдоль ламины видны узелковые разрастания. У кукурузы клонировано множество генов, содержащих гомеобокс, которые имеют разную степень гомологии (Лутова и др., 2000). В будущих зачатках листьев ген *KN1* не экспрессируется, но в

междоузлиях экспрессия сохраняется. Полосы экспрессии гена *KN1* можно обнаружить еще до того, как начались первые периклинальные деления, обозначающие зачаток листа морфологически. Ген *KN1* – молекулярный маркер любых меристем. При нормальном функционировании организма этот ген участвует в поддержании клеточной пролиферации, поэтому его экспрессия ингибируется к моменту дифференциации органов. На примере кукурузы было продемонстрировано, что все гомеобокс-содержащие гены разбросаны по разным группам сцепления.

У *A. thaliana* также были найдены гомологи *KN1:* гены *KNAT1* и *KNAT2*, *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*). Продукты экспрессии этих генов обнаруживаются только в апикальной меристеме, включая периферическую зону, где инициируются зачатки листьев. Сверхэкспрессия *KNAT1* и *KNAT2* в трансгенных растениях приводит к образованию морщинистых листьев, что говорит о том, что данные гены, так же как и *KN1*, активизируют пролиферацию, репрессируя дифференциацию клеток, и вовлечены в программу развития листа. Именно гены класса *KNOX* (*KN1*, *KNAT1* и *KNAT2*) участвуют в передаче сигнала в процессе закладки и формирования листа, начиная от семядолей и заканчивая зрелыми листьями. Само образование листьев начинается с изменения направления и скорости делений клеток в слоях L1-L3. Скорость деления, влияющая на размер листа и направление клеточных делений, генетически детерминированы независимо (Лутова и др., 2000).

Как известно, решающим механизмом при регуляции размера органа являются клеточные деления на начальных стадиях его развития (Mizukami, Fischer, 2000). Было показано, что за регуляцию клеточной пролиферации в растущих листьях отвечают следующие гены: *AINTEGUMENTA* (Mizukami, Fischer, 2000; Nole-Wilson, Krizek, 2006; Mizumoto et al., 2009; Chen et al., 2010; Losa et al., 2010), *ARGOS* (Hu et al., 2003; Wang et al., 2009a, b), *CYCLIND3;1* (Meijer, Murray, 2000; Oakenfull et al., 2002; Dewitte et al., 2003), *AN3/G1F1* (Horiguchi et al., 2005), *ERECTA* (Shpak et al., 2004; Weiss et al., 2005) и др.

Таким образом, генетический анализ мутантов показал, что программа инициации листа и собственно его формирование контролируются на уровне генов независимо. Согласованная экспрессия двух групп генов и определяет время появления каждого типа листа.

2.4. Транскрипционные факторы, участвующие в регуляции роста растений

Транскрипционные факторы (ТФ) – белки, осуществляющие прямой контроль над морфогенезом тканей и органов, они способны перемещаться из цитоплазмы в ядро, где регулируют транскрипцию, связываясь с ДНК непосредственно, или вначале образуя комплексы с другими ДНК-связывающими белками (Latchman, 1997). Поэтому ТФ занимают особое место в регуляции роста и развития растения и заслуживают отдельного рассмотрения. ТФ высших организмов, как правило, состоят из ДНК-связывающего и трансактивирующего функциональных доменов. Факторы транскрипции обеспечивают клеточную и тканевую специфичность генетической регуляции. Некоторые ТФ осуществляют ферментативные модификации ДНК и белковых молекул, а также повышают или понижают константу связывания РНК-полимеразы с регуляторными последовательностями гена (Lobe, 1992). У высших растений выявлены почти все виды факторов транскрипции, функционирующие у животных организмов и дрожжей (Медведев, Шарова, 2010). У одного только *A. thaliana* идентифицировано более 1800 ТФ, которые принято классифицировать по строению доменов, связывающих ДНК (Riechmann, 2002; Guo et al., 2008; Prez-Rodriguez et al., 2010). Ниже представлено описание некоторых семейств транскрипционных факторов.

Гомеодомен-содержащие белки. Данные ТФ имеют в своем составе гомеодомен – полипептид из 60 аминокислотных остатков, распознающий олигонуклеотидные последовательности, контролируя, таким образом, экспрессию конкретных генов (Chan et al., 1998; Smith et al., 2002). Гомеодомен-содержащие факторы растений регулируют деятельность АМП, формирование

побега, проводящих тканей, развитие корневой системы и процессы апоптоза (Hake, Ori, 2002). Кроме гомеодомена в этих белках могут присутствовать регуляторные элементы, обеспечивающие связывание с ДНК: цинковые и PHD-пальцы, лейциновые застежки, стеролсвязывающий домен START и др. У *A. thaliana* обнаружено около 90 гомеодомен-содержащих белков: ATHB-2, 8, 13, BELL1, GLABRA2, KNAT1, LUMINIDEPENDENT, PHB, PHV, STM, WUSCHEL и др. (Riechmann , 2002; Ariel et al., 2007).

MADS-белки в своём составе имеют особый домен, состоящий из 56 аминокислотных остатков, служащий для распознавания участков ДНК и связи с ними. Распознаваемый участок расположен в промоторной области, состоит из 10 нуклеотидов ($CC(AT)_6GG$) и называется CArG-боксом (Riechmann, Meyerowitz, 1997; De Folter, Angenent, 2006; Xu, Kong, 2007). У большинства MADS-белков есть К-домен, обеспечивающий возможность димеризации белков. Формируемые гетеродимеры могут различаться по сродству к ДНК и транскрипционной активности (Riechmann et al., 1996; Honma, Goto, 2001). Между MADS-доменом и К-доменом сохраняется промежуточная область I, а С-терминальный домен (COOH) сильно различается среди белков с MADS-боксом и обладает транскрипционной активностью в AP1 и SEP (Honma, Goto, 2001).

Данное семейство ТФ включает более 100 белков, среди которых AG, AP1 и 3, PI, CAULIFLOWER, FLOWERING LOCUS C, FRUTFULL, SEP1, 2 и 3, SHP1 и 2, SUPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION, SHORT VEGETATIVE PHASE, и др. MADS-белки регулируют формирование цветков и плодов, принимают участие в регуляции развития корня и семян, некоторые из них способны контролировать гомеозисные процессы (Медведев, Шарова, 2010).

AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) – семейство ТФ, имеющих в составе ДНК-связывающий АР-домен, который состоит из двух повторов из 68 аминокислотных остатков (Feng et al., 2005). Семейство подразделяется на 5 групп: подсемейство AP2, подсемейство RAV, подсемейство DREB, подсемейство ERF и неклассифицированных представителей (Sakuma et al., 2002). Отличительным признаком транскрипционных факторов AP2/ERF является

наличие ДНК-связывающего участка AP2, причем члены подсемейства AP2 содержат два AP2-домена, подсемейства ERF один AP2-домен, подсемейства RAV один AP2-домен и B3-домен (Riechmann et al., 2000). В свою очередь подсемейство AP2 делится на две группы: euAP2 и ANT (Kim et al., 2006a). Представители группы ANT в первом (R1) и втором (R2) AP2-доменах содержат дополнительные вставки аминокислот (Kim et al., 2006a). Отличительным признаком группы euAP2 является наличие в постдоменной области участка связывания с микроРНК *miR172*, который негативно регулирует экспрессию данных белков на посттранскрипционном уровне (Kim et al., 2006a).

Именно AP2-домен способен распознавать нуклеотидную последовательность GCC-бокса в промоторах генов, контролируемых AP2/ERF-белками. AP2/ERF-факторы вовлечены в регуляцию развития цветков и семян, а также в процесс передачи этиленового сигнала (Wessler, 2005). Всего в семействе насчитывается около 150 белков.

Кроме перечисленных, существуют и другие семейства ТФ: NAC-, C_2H_2(Zn)-, C_2C_2(Zn)-, ABI3/VP1-, WRKY-, bZIP-, MYB-, bHLH-, GRAS-, CCAAT-, GARP-, ARF-белки и др., а информация про эти группы транскрипционных факторов освещалась в обзорной статье отечественных исследователей (Медведев, Шарова, 2010).

2.5. Молекулярные механизмы регуляции клеточного деления

У всех эукариот процесс клеточного деления включает фазы репликации и сегрегации ДНК: S-фазу (S) и митоз (M). Между ними имеется два интервала G1 и G2: G1 – промежуток между M- и S-фазами, а G2 – между S- и M-фазами (Новикова и др., 2013).

Клетки растений вступают в клеточный цикл и осуществляют синтез ДНК в ответ на внешние митогенные стимулы. Ауксины, цитокинины, брассиностероиды, гиббереллины, пептидные регуляторы роста и другие, взаимодействуя со своими рецепторами на поверхности клеток или же внутри клеток, индуцируют каскад реакций фосфорилирования внутриклеточных белков, сопровождающихся передачей сигнала к ядру и индукцией экспрессии соответствующих генов через транскрипционные факторы. В этом процессе участвуют, в первую очередь, рецепторы фитогормонов и вторичные посредники (Тарчевский, 2001; Кошкин, 2010). Кроме рецепторов в клетках растений имеется большое количество белков, участвующих в трансдукции фитогормональных сигналов. К таковым относятся, например, локализованные на эндоплазматическом ретикулуме белки OSR-доменом и в частности белок ARGOS (Hu et al., 2003).

2.5.1. Ген *ARGOS*

Индуцируемый ауксинами и цитокининами ген *AtARGOS* (от Auxin-Regulated Gene involved in Organ Size) *A. thaliana* кодирует трансмембранный белок, располагающийся на эндоплазматическом ретикулуме и участвующий в передаче сигналов от ауксинов и цитокининов к транскрипционным факторам (Feng et al., 2011). Известно, что сигналы от белка AtARGOS передаются на ген транскрипционного фактора AINTEGUMENTA, который в свою очередь контролирует клеточные деления в зачатках надземных органов и в семяпочках через регуляцию экспрессии циклина CYCD3;1 (Dewitte et al., 2003; Hu et al., 2003). AtARGOS представляет из себя небольшой белок, состоящий из 106-ти аминокислот, на С-конце которого имеется лейцин-богатый участок, который

предположительно является трансмембранным доменом. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *AtARGOS* проявляется в зачатках листьев, ювенильных листовых пластинках и черешках, а также в тычиночных нитях и молодых стручках. Трансгенные растения *A. thaliana*, сверэкспрессирующие ген *AtARGOS,* характеризовались увеличением размеров всех надземных органов. Наиболее существенно исследуемый ген влиял на размеры листьев, сырая масса которых у трансгенных растений увеличивалась на 50-120% по сравнению с контрольными растениями (Hu et al., 2003), при этом размеры семядолей и корешков изменялись в наименьшей степени.

Было показано, что изменение размеров органов у трансгенных по гену *AtARGOS* растений обуславливалось увеличением количества клеток, но не их размеров. Также для трансгенных растений, по сравнению с контрольными, было показано удлинение периода роста, более позднее начало цветения и увеличение количества семян. Полученные данные позволили предположить, что ген *AtARGOS* способствует сохранению меристематической компетентности клеток и более длительному поддержанию их в центре апикальной и боковой меристем (Hu et al., 2003). Не так давно ортолог гена *AtARGOS* был исследован у китайской капусты *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*, который был назван *BrARGOS* (Wang et al., 2009b). Были получены трансгенные растения *A. thaliana* с повышенным уровнем экспрессии данного гена. Эти растения также характеризовались увеличением размеров всех надземных органов из-за увеличения количества клеток и пролонгирования роста (Wang et al., 2009b). Ортолог гена *ARGOS* был обнаружен также в геноме риса *Oryza sativa*, при этом он был представлен единичной копией (Wang et al., 2009a). Этот ген получил название *OsARGOS* и размер его составил 534 пн. Для функциональной характеристики гена *OsARGOS* были получены трансгенные растения *A. thaliana*. В этом случае также было показано увеличение размеров основных надземных органов, но в отличие от гена *AtARGOS*, ген *OsARGOS* способствовал увеличению размеров не только надземных органов, но и корней (Wang et al., 2009a). Интересно отметить, что в случае с геном *OsARGOS* изменение размеров органов было обусловлено

увеличением как количества клеток, так и их размеров. В то же время трансгенные растения риса с повышенным или пониженным уровнем экспрессии гена *OsARGOS* по размеру органов не отличались от контрольных растений. Возможно, это объясняется преобладанием других путей регуляции размеров органов у риса и более мощным компенсаторным потенциалом, чем у *A. thaliana* (Wang et al., 2009a). Методом ОТ-ПЦР было показано, что повышение уровня экспрессии гена *ARGOS* увеличивает транскрипцию таких генов, как *AINTEGUMENTA*, *CYCLIN D3;1*, *AtGIF1*, регулирующих клеточную пролиферацию, и генов *AtEXPA10*, *AtGRF1*, участвующих в регуляции клеточного растяжения (Hu et al., 2003; Wang et al., 2009a, b).

2.5.2. Транскрипционный фактор AINTEGUMENTA

Транскрипционный фактор AINTEGUMENTA относится к семейству AP2/ERF, общее число представителей которых у *A. thaliana* составляет 146, при этом лишь 15 из них относятся к подсемейству AP2 (Riechmann et al., 2000). Все изученные к данному времени транскрипционные факторы подсемейства AP2 экспрессируются в молодых, растущих органах и принимают участие в регуляции роста и развития (Nole-Wilson et al., 2005). Из группы euAP2 наиболее изученным является гомеозисный ген класса A *APETALA2,* который кодирует белковый фактор регулирующий развитие чашелистиков и лепестков, при этом он негативно влияет на экспрессию гена *AGAMOUS*, относящемуся к классу C (Drews et al., 1991). Наиболее известным представителем группы ANT является сам транскрипционный фактор AINTEGUMENTA (ANT) (Krizek et al., 1999). Одним из мишеней ANT является ген *CYCLIND3;1*, который регулирует клеточное деление и способствует поддержанию клеток органа на стадии S (Mizukami, Fischer, 2000). Транскрипция гена *ANT* стимулируется трансмембранным белком ARGOS, экспрессия которого в свою очередь индуцируется фитогормонами ауксинами и цитокининами (Hu et al., 2003). Было показано, что трансгенные растения, экспрессирующие ген *ANT* под контролем 35S промотора, характеризуются более быстрым развитием и несколько

большими размерами не только генеративных (Krizek et al., 1999), но и вегетативных органов (Mizukami, Fischer, 2000). Мутанты *ant A. thaliana* отличались замедленным развитием и уменьшенными размерами цветков (Krizek et al., 1999). Из-за снижения клеточной пролиферации в зачатках цветков интегументы и функциональные зародышевые мешки в семязачатках мутантных растений были неразвиты, что являлось причиной их стерильности (Krizek et al., 1999). Схожие данные были получены не только на трансгенных резуховидках *A. thaliana*, но и с табаком *Nicotiana tabacum* L. (Mizukami, Fischer, 2000), относящимся к другому семейству, что говорит об определенной универсальности гена *ANT*, а также свидетельствует о его консервативности. Действительно, гомологи и ортологи гена *ANT* были обнаружены и исследованы у двудольных – *N. tabacum* (Rieu et al., 2005), *Brassica napus* L. (Chen et al., 2010), *Antirrhinum majus* L. (Delgado-Bennaroch et al., 2009), однодольных - *Aegilops crassa* Boiss. (Mizumoto et al., 2009), голосеменных - *Pinus thunbergii* L. (Shigyo, Ito 2004), *Gnetum parvifolium* (Warb.) W.C.Cheng (Yamada et al., 2008) и даже мхов - *Physcomitrella patens* (Aoyama et al., 2012) что, по-видимому, свидетельствует в пользу универсальности данного гена для всех высших растений.

В геноме *A. thaliana* содержатся еще 7 генов, обладающих высоким уровнем схожести с геном *ANT*, которые получили названия *AINTEGUMENTA-like* (*AIL*) с порядковыми номерами от 1 до 7 (Nole-Wilson et al., 2005). Гены *AIL2*, *AIL3* и *AIL4* больше известны под названиями *BABY BOOM*, *PLETHORA1*, *PLETHORA2* соответственно, причем первый из них при сверхэкспрессии способствует соматическому эмбриогенезу в проростках (Boutilier et al., 2002), а два последних участвуют в регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме корня (Aida et al., 2004). Уровень экспрессии остальных членов данной группы, а именно генов *AIL1*, *AIL5*, *AIL6* и *AIL7* также оказался наиболее высоким в молодых, активно растущих тканях и низким в зрелых листьях и стеблях (Nole-Wilson et al., 2005). Однако в целом, как в генеративных, так и в вегетативных тканях уровень экспрессии генов *AIL* был все же ниже, чем у гена *ANT*, что подчеркивает большую важность последнего для процессов роста и развития.

Исследования показали, что ген *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 18 (LBD18)* в комбинации с *LBD16* принимает участие в образовании корня, при этом в цепи генной регуляции они находятся ниже AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) и ARF19 в пути передачи ауксиновых сигналов. Оказалось, что экспрессия ANT-фактора подавляется под влиянием продукта гена *LBD18* (Lee, Kim, 2010).

Для исследования дополнительных функций фактора ANT в инициации и формировании органов были созданы растения *A. thaliana* с геном *ANT* под контролем конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты 35S (*35S::ANT*). В результате было обнаружено, что эктопическая экспрессия *ANT* вызывает увеличение размеров цветка. При этом увеличение чашелистиков происходило за счёт стимуляции деления клеток, а увеличение лепестков, тычинок и плодолистиков – за счёт клеточного растяжения (Krizek, 1999). Более того, в дальнейших исследованиях было показано, что трансгенные растения с *35S::ANT* развиваются быстрее по сравнению с растениями дикого типа; также наблюдалось увеличение и вегетативных органов. Тем не менее, фенотип трансгенных растений может варьировать в той или иной степени (Mizukami, Fischer, 2000).

Молекулярно-генетический анализ показал, что сверхэкспрессия гена *ARGOS,* кроме гена *ANT* позитивно регулирует транскрипцию гена *GIF1,* который является важным регулятором клеточной пролиферации (Horiguchi et al., 2005). Исходя из этого, предполагается, что согласованная экспрессия генов *ANT, CYCD3;1* и *GIF1* под регулирующим началом *ARGOS* оказывает влияние на размеры органов (Wang et al., 2009a).

Исходя из вышеизложенных литературных данных, можно предположить, что чем выше будет уровень экспрессии гена *ANT* (или его гомологов) до определенных пределов, конечно, тем более длительным будет время роста органов. Как известно, размеры органов находятся в прямой зависимости от продолжительности роста. Ввиду того, что гомологи гена *ANT*, по всей

видимости, есть у всех высших растений (Chen et al., 2010), *in spe* при помощи данной группы генов можно получить культурные растения с ценными хозяйственными признаками: увеличенными размерами листьев, цветков или семян, даже при условии гетерологичной сверхэкспрессии (Wang et al., 2009a).

2.5.3. Циклины и циклин-зависимые протеинкиназы

Под влиянием митотических сигналов у всех эукариот одними из первых активируются гены, кодирующие белки циклины, получившие свое название от того, что их внутриклеточная концентрация периодически изменяется по мере прохождения клеток через клеточный цикл, достигая максимума на его определенных стадиях. Циклины являются специфическими активаторами семейства циклин-зависимых протеинкиназ (CDK) (CDK - cyclin-dependent kinases) - ключевых участников индукции экспрессии генов, контролирующих клеточный цикл. Активация индивидуальной CDK происходит после ее взаимодействия со специфическим циклином, и образование этого комплекса становится возможным после достижения циклином критической концентрации. В ответ на уменьшение внутриклеточной концентрации конкретного циклина происходит обратимая инактивация соответствующей CDK. Каждый тип циклинов, обозначаемых от A до H, имеет гомологичный участок (100 аминокислотных остатков, называемый "циклиновый бокс". Этот участок отвечает за связывание с CDK (Новикова и др., 2013).

У *A. thaliana* имеется семь классов CDK: от A до G, причем у всех эукариот CDKA – главные регуляторы G1/S- и G2/M-переходов, имеющие консервативный PSTAIRE-мотив связывания с CYC (Doonan et al., 2009). Киназы класса CDKB, обнаруженные только у растений, связываются с CYC при помощи PPTA/TLRE-мотива и работают почти исключительно при переходе G2/M (Новикова и др., 2013). Другие классы циклин-зависимых протеинкиназ растений на данный момент остаются менее изученными.

У *A. thaliana* имеется 40 различных циклинов, содержание которых меняется в ходе клеточного цикла (Wang et al., 2004). Циклины A и B называют митотическими, так как пик их экспрессии приходится, соответственно, на S/G2/M и G2/M, где функцию их партнеров выполняют CDKA и CDKB (Новикова и др., 2013). Главные регуляторы G1/S-перехода – CYCD, имеющие в N-концевой области LxCx(D/E)-мотив связывания с белком RBR (от Retinoblastoma-Related) и PEST-мотив, обеспечивающий деградацию по протеасомному пути. Чаще всего партнерами CYCD являются CDKA и CDKB (Новикова и др., 2013). Для успешного прохождения клеточного цикла необходимо, чтобы комплекс CDK-циклин находился в активном состоянии. Активность комплексов CDK-циклин регулируется группой белков, которые имеют общее название CKI (от CDK Inhibitor). К этой группе относятся ICK (от Interactor/Inhibitor of Cdc2 kinase), которые, по-видимому, активны и при G1/S-, и при G2/M-переходах, хотя наиболее вероятно, что функционирование ICK необходимо для входа в S-фазу (Новикова и др., 2013).

В настоящее время в литературе имеется большое количество сведений о молекулярных механизмах того, как циклины типа D контролируют переход из фазы G1 в S через так называемый циклин-ретинобластомный путь (CYCD/Rb) (Huntley et al., 1998). Итак, циклины типа D стимулируются митогенными сигналами роста и формируют киназный комплекс с CDK-субъединицей. Ключевая цель фосфорилирования D-циклиновых киназ – белок RBR (гомолог гена ретинобластомы Rb человека, обнаруженный у растений). RBR связывает семейство гетеродимерных транскрипционных факторов, называемых E2F/DP, и расположенных на промоторах, содержащих участки связывания E2F. Для роста клеток и прогрессии клеточного цикла требуется множество E2F-регулируемых генов. Затем RBR усиливает гистон-деацетилазную активность транскрипционного фактора E2F, ограниченных промотором, ингибируя транскрипцию E2F-регулируемых генов. Фосфорилирование RBR приводит к потере связи с E2F, приводя к высвобождению от транскрипционного

сайленсинга E2F-регулируемых генов и последующего перехода в S-фазу (de Jager, Murray, 1999).

Как отмечалось выше, размеры органов и строение растения в целом зависят от числа клеток, которые после определенного числа делений обязательно проходят стадии клеточного растяжения и функциональной специализации (den Boer, Murray, 2000). Клеточная дифференциация часто бывает скоординирована с уменьшением активности или даже остановкой деления (Donelly et al., 1999; De Veylder et al., 2001), однако попытки определить молекулярные связи между контролем клеточного цикла и дифференциацией пока не увенчались успехом. Было показано, что манипуляции с компонентами клеточного цикла, включая циклин-зависимые киназы (CDK), белки-ингибиторы CDK (Wang et al., 2000b; De Veylder et al., 2001) и митотические циклины (Doerner et al., 1996) влияют на длительность фаз клеточного цикла, число клеточных циклов и в целом на окончательные размеры клетки. Данные регуляторы влияют непосредственно на клеточный цикл и не нарушают процессы дифференциации. Уменьшение экспрессии CDK-активирующих киназ уменьшает активность CDK и способствует дифференциации меристематических клеток в корнях, однако остановка клеточного цикла происходит после дифференциации и не может быть воспроизведена блокаторами клеточного цикла (Umeda et al., 2000). Следовательно, механизмы, контролирующие дифференциацию, не зависят от клеточного цикла.

В наших исследованиях мы, в первую очередь, заинтересовались геном *CYCLIN D3;1*, так как сверхэкспрессия как гена *ANT*, так и гена *ARGOS*, способствовали увеличению уровня экспрессии именно этого гена. Еще при планировании исследовательской работы (2007-2008 гг.) нами было выдвинуто предположение, что конститутивная экспрессия гена *CYCLIN D3;1* может способствовать еще более значительному увеличению размеров трансгенных растений за счет более существенного увеличения количества клеток в органах. Однако в литературе к этому времени уже имелась публикация, где это

предположение было опровергнуто. Было показано, что сверхэкспрессия гена *CYCLIN D3;1* не способствует увеличению размеров органов (Dewitte et al., 2003).

2.5.4. Ген *CYCLIN D3;1*

CYCLIN D3;1 (*CYCD3;1*) – один из наиболее хорошо охарактеризованных генов циклинов растений, сверхэкспрессия которого приводит к увеличению количества недифференцированных клеток в органах растений (Dewitte et al., 2003). Проведённые исследования *CYCD*-связанных генов в геноме *A. thaliana* показали, что существует десять генов, формирующих 6-7 групп, большинство из которых ещё подробно не изучены. Группа *CYCD3* включает три гена, из которых *CYCD3;1* стал наиболее широко известным благодаря ряду публикаций (Oakenfull et al., 2002; Vandepoele et al., 2002). Гомологи *CYCD3;1* обнаружены в разных растениях: в люцерне и *A. thaliana* (Dahl et al., 1995), кукурузе (Huntley et al., 1998), табаке (Setiady et al., 1995) и других.

В культуре клеток уровни мРНК *CYCD3;1* не зависят от стадии клеточного цикла, как это происходит при экспрессии митотических циклинов, таких как *CYCB1;1*. Скорее, экспрессия *CYCD3;1* зависит от доступности сукцинил-КоА и фитогормонов. Повторное добавление сукцинил-КоА к клеточным культурам, лишенным его, приводит к индукции экспрессии CYCD3;1 в поздней G1-фазе (Menges, Murray, 2002). Впоследствии мРНК гена *CYCD3;1* остаётся на относительно постоянном уровне в делящихся клетках. Более того, после ответной реакции на сукцинил-КоА, *CYCD3;1* индуцируется с помощью цитокинина и, в меньшей степени, с помощью брассиностероидов и других митогенных фитогормонов, включая ауксины и гиббереллины, причём это происходит как в клеточных культурах, так и в целых растениях (Riou-Khamlichi et al., 1999; Hu et al., 2000; Oakenfull et al., 2002). Более того, экспланты листьев, которые постоянно экспрессируют *CYCD3;1,* способны образовывать каллусы в отсутствие экзогенного цитокинина.

Активация *CYCD3;1* в течение фазы G1, вместе с реакцией на внешние факторы, в том числе и на фитогормоны (цитокинины, ауксины,

брассиностероиды и гиббереллины), которые известны как ключевые регуляторы пролиферации и дифференциации, говорит о том, что *CYCD3;1* может принимать участие в интеграции пролиферативных и других сигналов. Киназная активность в клетках повышалась вместе с увеличением уровня экспрессии гена *CYCD3;1* (Healy et al., 2001). Данное явление не характерно для *CYCD2;1*, что навело на мысль о том, что повышение уровня экспрессии можно применять для увеличения киназной активности, сопутствующей белку CYCD3;1 (Dewitte et al., 2003).

Высокий уровень экспрессии гена *CYCD3;1* был обнаружен в вегетативных меристемах побегов, а также в цветоносах, в особенности по периферии меристемы и в зачатках органов. Кроме того, высокие уровни экспрессии были обнаружены в развивающихся листьях, прокамбии, васкулярных тканях и пазушных бутонах цветков. В более развитых листьях экспрессия проявлялись в адаксиальных клетках. Наоборот, в клетках, подверженных эндоредупликации, располагающихся в мезофилле зрелых листьев и сердцевине стебля, сигналы экспрессии не наблюдались (Dewitte et al., 2003). Таким образом, экспрессия гена *CYCD3;1* связана с пролиферирующими тканями и отсутствует в зрелых органах.

Чтобы проанализировать возможную роль *CYCD3;1* в процессах пролиферации и дифференциации были созданы трансгенные растения *A. thaliana* с повышенной экспрессией *CYCD3;1* под контролем конститутивного 35S промотора (Dewitte et al., 2003). В проростках трансгенных по гену *CYCD3;1* растений семядоли были увеличены, а более поздние розеточные листья искривились вскоре после формирования абаксиальной поверхности и были меньше по размерам, чем листья контрольных растений. Морфологический анализ показал, что образование листьев и стеблей в сверхэкспрессирующих растениях длилось дольше по сравнению с диким типом. Стебель трансгенных растений был короче, стеблевые листья были «кудрявые», а цветков образовывалось меньше, чем у контрольных растений. Структура листьев в растениях со сверхэкспрессией данного гена значительно изменена, в них не развиты слои губчатого и палисадного мезофилла, благодаря гиперпролиферации

эпидермис состоял из большого числа мелких, не полностью дифференцированных многоугольных клеток.

Известно, что эндоредупликация – это маркер дифференцированного состояния клеток в большинстве надземных тканей растений, и в листьях она происходит только после прекращения нормальных митотических циклов (De Veylder et al., 2001). Сравнение уровней плоидности показало, что клетки растений со сверхэкспрессией гена *CYCD3;1* были по большей части недостаточно дифференцированы, и имели долю ядер с содержанием ДНК >4C, в то время как розеточные листья дикого типа имели долю ядер с ДНК 8C, 16C и 32C. Подобное уменьшение уровня эндоредупликации наблюдалось в большинстве зрелых тканей растений, включая розеточные листья, прицветник и участки стебля (Dewitte et al., 2003).

Белок RBR функционирует как негативный регулятор киназной активности CYCD3;1. Уровень экспрессии RBR был увеличен и в побегах, и в зрелых розеточных листьях, а также в побегах растений сверхэкспрессирующих ген *CYCD3;1* (Dewitte et al., 2003).

Таким образом, конститутивная экспрессия *CYCD3;1* уменьшает объемы клеток в фазе G1 клеточного цикла и приводит к гиперпролиферации эпидермальных тканей листа, в целом замедляя развитие растения и приводя к нарушениям дифференциации в тканях из-за замедления фазы G0 в листьях и семядолях. Происходит разъединение процессов роста и клеточного цикла в АМП. Завершение клеточного цикла, наблюдаемое до этого в корреляции с поздними стадиями развития листа (Donelly et al., 1999), требуется для нормальных процессов дифференциации различных типов клеток. Регуляция экспрессии *CYCD3;1* транскрипционным фактором ANT – важный фактор в запуске клеточного растяжения и дифференциации в растениях. Следует отметить, что сверхэкспрессия *CYCD3;1* влияет на активность специфических генов в пути CYCD-RBR. Полученные данные свидетельствуют о важнейшей роли гена *CYCD3;1* при переходе от клеточной пролиферации к конечным стадиям дифференциации (Dewitte et al., 2003).

Вопреки нашим предположениям, было показано, что, по крайней мере, в *A. thaliana* сверхэкспрессия гена *CYCD3;1* не увеличивает размеры органов, а ведет к нарушенному органогенезу с образованием многочисленных мелких и неполноценных клеток (Dewitte et al., 2003). В связи с этим, было решено не использовать данный ген для получения трансгенных растений. Предполагалось, что данный ген будет использован в нашей исследовательской работе как маркер высокого уровня клеточных делений и недифференцированного состояния клеток.

Глава 3. Регуляция роста клеток растяжением в растениях

Особенностью растительных клеток, в отличие от животных, является наличие в их развитии стадии роста растяжением. Переход к фазе растяжения сопровождается значительными структурными и физиологическими изменениями в клетке, которые приводят к увеличению объема центральной вакуоли, создающей через цитоплазму тургорное давление на клеточную стенку. Также процессы, обеспечивающие рост клеток растяжением, происходят в клеточной стенке, состоящей из трех структурно независимых, но взаимодействующих сетей полимеров: основной сети из микрофибрилл целлюлозы и связующих гликанов, а также пектиновой и белковой сетей. Отдельные целлюлозные микрофибриллы неспособны растягиваться, в связи с этим предполагается, что клеточное растяжение происходит за счет расхождения данных структур (Горшкова, 2007), при этом движущей силой роста клетки является осмотическое давление, развиваемое протопластом, прежде всего вакуолью (Обручева, 2008а). Весь каркас стенки держится за счет ковалентных и водородных связей, причем первые служат мишенью для множества ферментов в процессе клеточного растяжения. После расхождения микрофибрилл целлюлозы образовавшиеся «пустоты» заполняются новыми полисахаридами и другими компонентами стенки за счет их биосинтеза (Горшкова и др., 2010). Расхождение микрофибрилл при клеточном растяжении

достигается тремя основными механизмами: гидролизом части связующих гликанов эндогликаназами; разрезанием и новым сшиванием гликанов ксилоглюканэндотрансгликозилазами (XET); а также нарушением водородных связей между микрофибриллами целлюлозы и гликановыми цепями, которое осуществляется неферментативными белками экспансинами (Горшкова, 2007).

Важнейшее значение для роста клеток имеют эффективность поступления воды в клетки, а также растяжение компонентов клеточной стенки, и именно эти процессы к настоящему времени наиболее хорошо охарактеризованы. Менее исследованными остаются сигнальная функция самой клеточной стенки, вопросы биосинтеза полисахаридов клеточной стенки, регуляции осмотического потенциала, роста внутриклеточных структур и генерации энергии в связке с регуляцией роста клеток растяжением, поэтому, в данной главе будут освещены лишь основные аспекты регуляции растяжения клеточных стенок и поступления воды в клетки с упором на описание недавно исследованных генов и их белковых продуктов.

3.1. Регуляция поступления воды в клетки растений

Растительная клетка представляет собой осмотическую систему и водный режим клетки в основном зависит от двух мембран — плазмалеммы и тонопласта. Известно, что цитоплазмы и эндоплазматические сети соседних клеток соединены при помощи плазмодесм и именно в клеточном соке вакуоли концентрация осмолитиков может меняться в широких пределах. Исходя из этих данных, можно предположить, что для растяжения каждой отдельной клетки большее значение имеет давление, которое опосредованно, через цитоплазму, оказывает на клеточную стенку центральная вакуоль. С особенностями регуляции осмотического давления и поступления воды в клетки растений можно познакомиться в ряде обзорных статей отечественных исследователей (Шапигузов, 2004; Обручева, 2008а; Обручева, 2008б). В то же время для генетической инженерии большой интерес представляют различные белковые молекулы и их гены, участвующие в регуляции водного потенциала и

возможность их использования для стимуляции роста органов, о чем в литературе пока имеется очень мало сведений.

Быстрое поступление воды в клетки при росте клеток растяжением невозможно объяснить лишь механизмом диффузии через липидный бислой. Использование молекулярно-биологических подходов в исследованиях позволило идентифицировать белки водных каналов – аквапорины. Регуляция клеточного растяжения аквапоринами может осуществляться как путем изменения числа водных каналов в мембране, так и путем изменения их активности. Содержание водных каналов в мембране зависит от биосинтеза аквапоринов, который находится под контролем транскрипционных факторов и таких фитогормонов, как гиббереллины, АБК, ауксины, брассиностероиды и этилен (Шапигузов, 2004; Chen et al., 2013). Наиболее изученным механизмом регуляции активности аквапоринов является их фосфорилирование по остаткам серина, что открывает водный канал (Harvengt et al., 2000). Окисление сульфгидрильных групп цистеина в «узком» месте канала приводит к его замыканию (Обручева, 2008а).

Инактивация индивидуальных генов аквапоринов часто приводит к включению различных компенсаторных механизмов. Например, трансформация *A. thaliana* антисмысловой конструкцией к гену аквапорина *PIP1b* (Plasma membrane Intrinsic Protein), в результате которой водная проводимость плазмалеммы протопластов уменьшается примерно в три раза, сопровождается пятикратным увеличением корневой системы. Сверхэкспрессия того же гена приводит к повышению скорости роста опытных растений при благоприятных условиях культивирования (Шапигузов, 2004). Активность аквапоринов обнаруживается в замыкающих клетках устьиц, при элонгации клеток в зоне растяжения корней, при набухании и прорастании пыльцевого зерна и в некоторых других случаях (Шапигузов, 2004). Сверхэкспрессия аквапорина риса *Oryza sativa* OsPIP1;1 способствует увеличению урожая семян, повышает проводимость воды корнями и увеличивает скорость прорастания семян (Liu et al., 2013).

Все больше данных накапливается об участии аквапоринов в регуляции роста растений. Например, у розы *Rosa hybrida* были изучены два гена аквапорина *RhPIP1;1* и *RhPIP2;1*, экспрессия которых подавлялась этиленом в лепестках (Chen et al., 2013). Сайленсинг гена *RhPIP1;1* приводил к уменьшению площади клеток лепестка, что способствовало уменьшению размеров венчика по сравнению с контролем. Наиболее высокий уровень экспрессии аквапорина ZmTIP1 кукурузы (*Zea mays*) обнаруживался в меристематических и активно растущих клетках корней, зачатков листьев и соцветий (Chaumont et al., 1998). Имеются также данные об участии аквапоринов в регуляции растяжения клеток в тканях листьев ячменя (*Hordeum vulgare*) (Volkov et al., 2008), плодах винограда (*Vitis vinifera*) (Choat et al., 2009) и в волокнах калотрописа (*Calotropis procera*) (Aslam et al., 2013). Основным недостатком перечисленных работ является проведение исследований на уровне генов и мРНК, без доказательств на уровне белков. Однако даже эти скудные данные, хоть и косвенно, свидетельствуют о том, что аквапорины являются важнейшими белками, обеспечивающими рост клеток растяжением и индуцируемое повышение уровня их экспрессии на определенных стадиях клеточного растяжения может способствовать увеличению размеров отдельных клеток и как следствие возрастанию размеров органов и растения в целом. В то же время необходимо отметить, что транскрипционные факторы генов аквапоринов и другие белки, участвующие в регуляции транспорта воды через мембраны, пока остаются малоизученными. Поступление воды в клетки растений невозможно без соответствующего накопления эндогенных осмотически активных веществ внутри клетки, причем соответствующие исследования в связке с клеточным растяжением проводятся довольно интенсивно (Elumalai et al., 2002; Wang et al., 2010). Например, была показана корреляция роста трихом хлопчатника с активностью вакуолярной инвертазы, в то время как связь между клеточным растяжением и активностью цитоплазматических инвертаз не обнаруживалась (Wang et al., 2010).

3.2. Фитогормоны и другие низкомолекулярные соединения

Из эндогенных соединений, участвующих в регуляции роста клеток растяжением, наибольшее значение имеют фитогормоны и, следовательно, все белки, вовлеченные в их биосинтез, транспорт, рецепцию, передачу сигнала и деградацию. Регуляция экспрессии генетических факторов фитогормонами сильно зависит от органа и стадии развития растения, причем у каждой группы этих веществ имеются свои специфические особенности.

Ауксины участвуют в регуляции деления и роста клеток растяжением, дифференцировки корней, а также многих других процессов роста и развития растений. Рецептор ауксина TIR1, относится к F-box белкам и обеспечивает разрушение Aux/IAA белков-репрессоров ауксин-зависимых генов в убиквитин-протеасомной системе и таким образом включает генетическую программу ответа клетки на ауксин (Шпаков, 2009). Белки IAA1 являются негативными регуляторами транскрипционных факторов ARF, которые регулируют экспрессию ауксин-чувствительных генов. При этом сверхэкспрессия гена *IAA1* существенно уменьшает размеры клеток и их количество в соцветиях и листьях (Ku et al., 2009). Ауксины способны стимулировать клеточное растяжение через регулирование активности гидролаз клеточных стенок за счет снижения pH среды в клеточной стенке. Судя по всему в процессе «кислого роста» ключевую роль играет H^+-АТФаза плазмалеммы, обеспечивающая подкисление клеточной стенки необходимое для ее растяжения. Показано, что экспрессия генов H^+-АТФазы и протонной пирофосфатазы хлопчатника повышается в период интенсивного клеточного роста трихом (Smart et al., 1998). Теория «кислого роста» постулирует, что ауксин активирует H^+-АТФазу плазмалеммы, которая подкисляет клеточную стенку (Цыганкова и др., 2005), а низкий уровень pH, в свою очередь, видимо активизирует локализованные в апопласте специфичные ферменты или другие белковые молекулы, которые разрушают связи между полимерами клеточной стенки, в частности между микрофибриллами целлюлозы и прилежащими связующими гликанами, что позволяет им расходиться друг от друга. В то же время, ферменты, проявляющие свою активность исключительно при низких

значениях pH, в клеточной стенке пока не обнаружены. Однако имеются свидетельства о том, что в кислой среде проявляют свою активность α-экспансины (McQueen-Mason et al., 1992), причем по некоторым данным именно экспансины инициируют клеточное растяжение (Горшкова, 2007).

На клеточное растяжение ауксины могут оказывать влияние и через элементы цитоскелета. Например, было показано, что в присутствии ауксинов происходит гиперэкспрессия β-тубулина tubB1 в клетках зоны растяжения этиолированных гипокотилей сои. Показано, что ауксины ослабляют напряжение продольно ориентированных микрофиламентов и деполимеризуют актин, что также способствует росту клеток растяжением (Блюм и др., 2012).

Известно, что ауксины контролируют экспрессию ряда белковых факторов, которые принимают участие в регуляции роста клеток растяжением, например EBP1 (Horvath et al., 2006); структурных белков клеточной стенки, например, экстенсинов (Цыганкова и др., 2005); а также белков, непосредственно участвующих в клеточном растяжении, например, экспансинов (Jung et al., 2010) и других. Ауксины индуцируют секрецию эндоглюканаз в апопласт, где они проявляют гидролитическую активность, расщепляя ксилоглюкановые компоненты первичных клеточных стенок (Цыганкова и др., 2005).

Этилен может оказывать стимулирующее действие на растяжение клеток ряда органов в низкой концентрации и ингибирующее – в высокой (Обручева, 2008б). В присутствии этилена рецепторы ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 и EIN4, взаимодействуя с гормоном, инактивируют белок CTR1, что в свою очередь приводит к дерепрессии позитивного мембранного регулятора EIN2 и как следствие к повышению уровня экспрессии транскрипционных факторов EIN3/EILs (Wang et al., 2009c). Затем эти трансфакторы активируют транскрипцию генов белков ответа на этилен, в том числе трансфакторов, относящихся к семейству ERF (Ethylene Response Factors). В конечном счете, этилен индуцирует экспрессию ряда генов, непосредственно участвующих в регуляции клеточного растяжения, например, *XTHs* (Singh et al., 2011), экспансинов (Trivedi et al., 2004) и других. Транскрипция генов *LeEXPA1* томатов (*Solanum lycopersicum*), *PpEXPA3*

персиков (*Prunus persica*), *MiEXPA1* манго (*Mangifera indica*), *OeEXPA1* оливы (*Olea europaea*), *Pm68* абрикоса (*Prunus armeniaca*), участвующих в размягчении плодов, также индуцируется этиленом (Шарова, 2007). В то же время этилен уменьшает уровень экспрессии генов экспансинов *AtEXPA5 A. thaliana* (Son et al., 2012) и *TaEXPB23* пшеницы *Triticum aestivum* (Han et al., 2012).

Для цитокининов характерен исключительно широкий спектр регуляторного действия, который включает и регуляцию роста клеток растяжением. В *A. thaliana* выявлены элементы цитокининового сигналинга, которые включают локализованные на эндоплазматическом ретикулуме гибридные сенсорные киназные рецепторы, а также локализованные в ядре белки регуляторы ответа ARR A- и B-типа (Ломин и др., 2012). Нулевые мутанты по генам *ARR* характеризовались сниженной чувствительностью к цитокининам во время регенерации побегов и растяжения корня (Mason et al., 2005). Обработка растений цитокининами на ранних стадиях развития листа активирует деление клеток мезофилла, на более поздних этапах онтогенеза – растяжение растущих и только что закончивших рост клеток (Роньжина, 2003). Показано, что цитокинины способствуют стабилизации молекулы мРНК гена *Cim1*, кодирующего один из β-экспансинов сои (*Glycine max*) (Downes et al., 1998). В мутантных растениях петунии (*Petunia hybrida*) *trapu* был идентифицирован ген *tra1*, необходимый для растяжения клеток. Мутантные растения характеризовались отсутствием цветков, зоны растяжения корня, гипокотиля и черешков, цитокинины же способствовали росту мутантных проростков, хотя их морфология оставалась ненормальной (Dubois et al., 1996). Показано, что цитокинины могут стимулировать транскрипцию ряда генов белков, участвующих в клеточном растяжении, например, XTHs и пектинлиаз (Bhargava et al., 2013).

Брассиностероиды (БР) играют важную роль в регуляции прорастания семян, роста пыльцевых трубок, созревания плодов и др. Рецептором БР служит BR1 киназа, корецептором белок BAK1, а одним из транскрипционных факторов является белок BZR1 (He et al., 2005; Шпаков, 2009). Известно, что БР, например, участвуют в регуляции экспрессии генов *TCH4* (touch gene 4) (Xu et al., 1995),

AtEXPA5 (Park et al., 2010), *EXORDIUM* (Gonzalez et al., 2012) и других, контролирующих рост клеток растяжением. БР способствуют поддержанию поперечной ориентации микротрубочек в эпидермальных клетках эпикотилей бобов азуки (*Vigna angularis*), что способствует росту клетки растяжением (Блюм и др., 2012).

Гиббереллины также стимулируют растяжение клеток, например, способствуя преобладанию поперечно ориентированных кортикальных микротрубочек в тканях растений (Блюм и др., 2012). Рецептором гиббереллинов (ГК) является ядерный белок GID1, имеющий структурное сходство с семейством гормон-чувствительных липаз (Шпаков, 2009). Активность ГК в растениях репрессируется белками DELLA. Взаимодействие ГК и GID1 с DELLA-белком снимает репрессорное влияние DELLA на гиббереллин-зависимую генетическую регуляцию благодаря его разрушению и освобождению транскрипционных факторов, что обеспечивает включение ГК-зависимых генов (Шпаков, 2009). Показано, что гиббереллины индуцируют экспрессию генов *XTHs* (Chen et al., 2002) и экспансинов (Lee et al., 2002; Azeez et al., 2010). В рисе гиббереллины индуцируют экспрессию гена цинк-пальцевого белка *OsDOG*, при этом его сверхэкспрессия приводит к карликовости трансгенных растений из-за ингибирования клеточного растяжения и уменьшения содержания гиббереллинов (Liu et al., 2011).

Жасмоновая кислота может оказывать на клеточное растяжение как активирующее, так и ингибирующее действие в зависимости от концентрации. Например, при использовании жасмоновой кислоты в концентрации 10^{-8}М выявлено подавляющее действие этого фитогормона на рост клеток апикальных меристем клубней картофеля (Платонова и др., 2009). При рассмотрении воздействия экзогенного метилжасмоната на экспрессию гена экспансина пшеницы *TaEXPB23*, было выявлено ее значительное повышение, однако при обработке другими фитогормонами наблюдалось снижение экспрессии данного гена. Метилжасмонат способствует уменьшению уровня экспрессии генов *AtEXPA1* и *AtEXPA11*, кодирующих экспансины *A. thaliana* (NCBI GEO/EMBL).

Компоненты жасмонатного сигналинга частично выявлены и их описание доступно в русскоязычной литературе (Яковлева, Егорова, 2010).

Салициловая кислота (СК) может оказывать рост-стимулирующий эффект через влияние на уровень ИУК, что проявляется в усилении митотической активности и увеличении размеров клеток растений (Shakirova et al., 2003). В то же время, по данным ресурса NCBI GEO, СК способствует снижению уровня экспрессии ряда экспансинов *A. thaliana.* Если ранее были выявлены лишь некоторые молекулярные участники передачи сигнала от СК в геном (Яковлева, Егорова, 2010), то на данный момент уже установлено, что рецепторами СК являются белки NPR3 и NPR4, функционирующие как адапторы куллина 3 убиквитинлигазы, которые опосредуют деградацию белка NPR1 (Fu et al., 2012).

Безусловно, фитогормоны играют центральную роль в генетической регуляции роста клеток растяжением, и охватить даже часть аспектов такой регуляции в рамках данной главы не представляется возможным, более подробную информацию о сигналинге фитогормонов можно почерпнуть в сборнике «Клеточная сигнализация» (Шакирова, 2010; Яковлева, Егорова, 2010) и в различных обзорных статьях (Kieber, Schaller 2014; Song et al., 2014 и другие).

В сигналинг фитогормонов вовлечен оксид азота, который оказывает стимулирующее воздействие на рост всего растения, а также его отдельных частей: первичного корня, гипокотиля, мезокотиля, придаточных и боковых корней, листа и побега (Красиленко и др., 2010). Особенно важную роль выполняет оксид азота в передаче ауксинового сигнала к генам, кодирующим белки-регуляторы роста клеток растяжением (Beard et al., 2012), например, белка ARGOS-LIKE (Hu et al., 2006). Также оксид азота является медиатором действия ряда других сигнальных молекул, например, внеклеточных нуклеотидов, в частности АТФ, на рост клеток растяжением (Salmi et al., 2013). При помощи специальной репортерной системы, состоящей из АТФ-зависимой люциферазы с целлюлозо-связывающим доменом и люциферина было показано, что внеклеточный АТФ наиболее активен в зонах интенсивного роста клеток растяжением, причем его выделение в межклеточное пространство происходит

путем кальций-зависимого везикулярного транспорта (Kim et al., 2006b). Можно предположить, что этот АТФ активирует ферменты, участвующие в реструктуризации компонентов клеточной стенки, в то же время точно известно, что внеклеточный АТФ индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), а применение фермента апиразы, расщепляющего АТФ, наоборот приводит к снижению уровня АФК. В связи с этим были сделаны выводы, что везикулярный транспорт АТФ из клетки в межклеточное пространство действительно зависит от содержания АФК в кончиках корневых волосков (Kim et al., 2006b). В то же время, одними из известных стимуляторов роста клеток растяжением являются АФК в форме гидроксильного радикала, непосредственно участвующего в расщеплении полисахаридов клеточной стенки. В клеточных стенках гидроксильный радикал может образовываться путем реакции Фентона при взаимодействии ионов меди с перекисью водорода (Fry, 2004) или с участием пероксидаз, оксалатоксидаз и аминооксидаз (Liszkay et al., 2004).

Кроме фитогормонов, внеклеточного АТФ, оксида азота, известно о влиянии на клеточное растяжение и других низкомолекулярных соединений, например, добавление глюкозы и сахарозы в среду, которые воспринимаются клетками как питательные компоненты, способствует увеличению уровня экспрессии многих экспансинов *A. thaliana*, например, таких как AtEXPA1, AtEXPA10 и AtEXPA15 (данные NCBI GEO). Экзогенные олигосахарины, очевидно, также участвуют в регуляции клеточного растяжения, например, многие из этих соединений охарактеризованы как стимуляторы или ингибиторы удлинения отрезков стебля, а олигогалактурониды индуцируют образование этилена и эндо-(1→3)-β-глюканаз (Aldington et al., 2006). Можно предположить, что АФК и олигосахарины являются важными компонентами сигнальной системы самой клеточной стенки, причем необходимая информация о внешних факторах может передаваться в клетки через различные трансмембранные белки, в первую очередь, к кальциевой сигнальной системе. Действительно, ионы кальция играют исключительно важную роль в регуляции роста клеток растяжением, например, известно, что сайленсинг кальций-зависимой протеинкиназы 1 в *Medicago truncatula* способствует

уменьшению размеров корневых волосков за счет сокращения длины клеток (Ivashuta et al., 2005). На примере удлиняющихся пыльцевых трубок показано, что рост клеток растяжением носит пульсирующий характер, причем частота пульса совпадает с осцилляциями концентрации Ca^{2+} (Geitmann, 1999).

Ингибиторами клеточного растяжения являются тяжелые металлы (Серегин и др., 2011), АБК, а также высокие концентрации ауксина и этилена (Обручева, 2008б). При прорастании зерен кофе (*Coffea arabica*) АБК ингибирует продольный рост клеток зародыша, уменьшает количество микротрубочек и приводит к их дезорганизации (Da Silva et al., 2008). В клетках стебля риса идентифицированы гены *CYP707A5* и *CYP707A6*, кодирующие фермент АБК 8-гидроксилазу, отвечающий за окисление АБК. Продукты данных генов участвуют в катаболизме АБК и способствуют этилен-индуцированному удлинению клеток стебля риса (Yang et al., 2006).

Неоднозначно влияние повышенного содержания NaCl на уровень экспрессии белков, участвующих в обеспечении клеточного растяжения. С одной стороны незначительное повышение его концентрации в среде (до 100мМ) способствует существенному увеличению уровня экспрессии экспансинов (Веселов и др., 2008), что позволяет поддерживать рост клеток на нормальном уровне в условиях дефицита воды, с другой стороны широко известно об ингибировании клеточного растяжения при более высоких концентрациях NaCl (Обручева, 2008б), причем в литературе имеются данные о снижении уровня экспрессии β-экспансинов даже при действии 100мМ NaCl (Geilfus et al., 2011).

3.3. Сигнальные пептиды

Из большого разнообразия сигнальных пептидов растений, наиболее известными, пожалуй, являются CLE-пептиды (CLAVATA3/ESR). Показано, что CLE-пептиды играют центральную роль в развитии разных типов меристем высших растений: первичных меристем (апикальная меристема побега, апикальная меристема корня, прокамбий), вторичных (меристемы клубеньков), а также аномальных разрастаний корня, вызванных паразитическими нематодами

(Додуева и др., 2012). О прямом действии CLE-пептидов на рост клеток растяжением в литературе имеется мало сведений, однако известно, что данная группа пептидов участвует в росте корней растяжением в условиях дефицита азота (Araya et al., 2014).

У растений известны и другие группы биологически активных пептидов, которые принимают участие в регуляции роста клеток растяжением. Например, известно о влиянии на клеточное растяжение сульфатированных пептидов PSY1 и PSK (Amano et al., 2007), а пептиды POLARIS вовлечены в регуляцию линейного и радиального расширения корней, а также в развитие сосудов (Topping et al., 1997). Пептид POLARIS, видимо, участвует в системе обратной связи ауксинов и этилена (Chilley et al., 2006), так как его экспрессия активируется ауксинами, сам же он подавляет этиленовый сигнал, который в свою очередь, негативно влияет на ауксины. По мнению авторов, позитивное действие пептида POLARIS на клеточное растяжение объясняется влиянием, прежде всего, на микротрубочки. Был также изучен пептид RALF (Rapid Alkalinization Factor), способный при взаимодействии со своим рецептором FERONIA подавлять рост клеток в первичных корнях. Образование комплекса RALF-FERONIA приводит к фосфорилированию мембранной H^+-АТФазы и ингибированию протонного транспорта. Как следствие, клеточная стенка подщелачивается и «кислый рост» прекращается (Haruta et al., 2014).

3.4. Белки с OSR-доменом

Определенная роль в регуляции роста клеток растяжением и, особенно в координации процессов клеточного деления и растяжения, отводится белкам с OSR-доменом (Organ Size Related). На данный момент изучены только четыре гена, кодирующие белки данной группы, а именно *OSR1, OSR2, ARGOS* и *ARGOS-LIKE* (*ARL*) *A. thaliana* (Feng et al., 2011 Qin et al., 2014). Индуцируемый ауксинами и цитокининами ген *AtARGOS A. thaliana* кодирует трансмембранный белок, располагающийся на эндоплазматическом ретикулуме и предположительно участвующий в передаче сигналов от фитогормонов к транскрипционным

факторам (Feng et al., 2011). Известно, что сигналы от белка AtARGOS передаются на ген транскрипционного фактора AINTEGUMENTA, который в свою очередь контролирует клеточные деления в зачатках надземных органов и в семяпочках через регуляцию экспрессии циклина CYCD3;1 (Hu et al., 2003). В то же время ген *OsARGOS* риса влияет одновременно как на клеточное деление, так и на рост клеток растяжением (Wang et al., 2009a). Повышение уровня экспрессии гена *ARGOS* увеличивает экспрессию белков, участвующих не только в делении клеток, но и в регуляции и обеспечении клеточного растяжения, например транскрипционного фактора AtGRF1 и экспансина AtEXPA10 (Wang et al., 2009a).

Ген *AtARL* гомологичен гену *AtARGOS*, однако, кодирует белок, контролирующий только рост клеток растяжением (Hu et al., 2006). Экспрессия данного гена стимулируется брассиностероидами, его белковый продукт также локализуется на эндоплазматическом ретикулуме (Feng et al., 2011). Конститутивная экспрессия гена *AtARL* способствует повышению содержания мРНК гена *TCH4*, кодирующего одну из ХТН *A. thaliana* (Hu et al., 2006).

3.5. Транскрипционные факторы

В регуляции клеточного растяжения важную роль играют транскрипционные факторы типа спираль-петля-спираль (bHLH). Два bHLH белка PRE1 (Paclobtrazol resistance1) и IBH1 (Arabidopsis ILI1 binding bHLH1) антагонистически регулируют процессы клеточного растяжения в ответ на брассиностероидную и гиббереллиновую сигнализацию, но молекулярные механизмы данного процесса остаются неясными (Ikeda et al., 2012). Для выяснения схемы конкурентной регуляции клеточного растяжения было продемонстрировано взаимодействие системы PRE1, IBH1 и ACE (активатор транскрипционных факторов bHLH). В этой системе ACE, взаимодействуя с промотором, прямо активирует экспрессию генов ферментов, участвующих в клеточном растяжении. IBH1 негативно регулирует процесс клеточного растяжения, связываясь с ACE и, таким образом, вмешиваясь в их связь с ДНК. PRE1 связывается с IBH1, тем самым препятствуя связи IBH1 и ACE. Таким

образом, PRE1 восстанавливает транскрипционную активность ACE в результате индукции клеточного растяжения. Баланс белков PRE1, IBH1 и ACE, очень важен для определения размера клетки (Ikeda et al., 2012). Также был изучен ген *HBI1*, повышенная экспрессия которого стимулирует растяжение гипокотилей и черешков, а ингибирование данного гена и его гомологов приводит к карликовости. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что HBI1 связан с промоторами двух генов экспансинов *A. thaliana.* Транскрипционная активность гена *HBI1* ингибируется белком IBH1, но его ингибирующий эффект регулируется PRE1 (Bai et al., 2012). Ген *BIGPETALp* кодирует также один из транскрипционных факторов группы bHLH, который является ингибитором клеточного растяжения в лепестках (Powell et al., 2012).

Помимо bHLH белков в регуляции роста клеток растяжением в стеблях принимают участие транскрипционные факторы GRF (Growth Regulating Factor). В геноме риса было идентифицировано и охарактеризовано 12 генов, кодирующих GRF белки, содержащих по два высококонсервативных домена QLQ (Gln, Leu, Gln) и WRC (Trp, Arg, Cys), и последовательности, напоминающие транскрипционные факторы. Гены *OsGRF* экспрессируются преимущественно в молодых и растущих тканях, экспрессия семи генов при этом усиливается при воздействии гиббереллинов (Choi et al., 2004). *In situ* гибридизация показала высокий уровень содержания транскриптов *OsGRF* в апикальной и интеркалярной меристемах. Повышенная экспрессия генов *AtGRF1* и *AtGRF2 A. thaliana* способствовала увеличению размеров листьев и семядолей. Тройные инсерционные нулевые мутанты *Atgrf1-Atgrf3* имели меньше листьев и семядолей, в то время как мутант только по одному из этих генов не отличался от дикого типа, а двойной мутант отличался лишь небольшими изменениями. Изменения в размерах органов у мутантов и трансгенных по генам *AtGRF1* и *AtGRF2* растений было обусловлено изменением размеров клеток. Это говорит о том, что белки AtGRF играют важную роль в регуляции клеточного растяжения в листьях и семядолях (Kim et al., 2003).

Показано, что из транскрипционных факторов подкласса AP2/ERF в регуляции клеточного растяжения принимает участие белок BOLITA (Marsch-Martinez et al., 2006). Сверхэкспрессия данного фактора приводит к ингибированию роста клеток растяжением. Предполагается, что в регуляции клеточного растяжения могут принимать участие и ряд AINTEGUMENTA-подобных транскрипционных факторов, также относящихся к подклассу AP2/ERF (Manchado-Rojo et al., 2014). В литературе имеются также сведения об участии в регуляции роста клеток растяжением таких транскрипционных факторов, как ARF2, ATAF2, ATHB16, HRC1, OBP2 (Gonzalez et al., 2009), а также ZHD5 (Gonzalez et al., 2012). Генами-мишенями всех этих и многих других, не упомянутых здесь транскрипционных факторов, видимо, являются многочисленные семейства генов, кодирующих эндогликаназы, XTHs, экспансины и другие белки, обеспечивающие клеточное растяжение.

3.6. Эндогликаназы

Наиболее распространенными ферментами клеточной стенки растений являются эндогликаназы, гидролизующие молекулы полисахаридов. Из эндогликаназ в растениях присутствуют, в частности, эндо-β-(1→4)-глюканаза, эндо-β-(1→3),(1→4)-глюканаза, эндо-β-(1→4)-маннаназа, эндо-β-(1→4)-ксиланаза, эндо-β-(1→3)-глюказа, эндополигалактуроназа (Горшкова, 2007). При регуляции клеточного растяжения из этих ферментов наибольшее значение имеет эндо-β-(1→4)-глюканаза, которая предположительно расщепляет остов ксилоглюканов, что способствует расхождению микрофибрилл целлюлозы. Для эндо-β-(1→4)-глюканаз характерна корреляция экспрессии с другими белками, участвующими в клеточном растяжении, такими как экспансины и XTHs (Buchanan et al., 2012). Идея о важной роли эндогликаназ в разрыхлении клеточной стенки в ходе роста была подтверждена при использовании поликлональных антител на гликаназы, которые ингибировали индуцированный ауксином рост (Inouhe, Nevins, 1991). Идентифицированные к настоящему времени гены эндогликаназ экспрессируются на разных стадиях развития органов

растений: удлинение, созревание и опадение (Sukno et al., 2006). Анализ экспрессионного профиля с использованием микрочипов, показывает, что некоторые эндо-β-(1→4)-глюканазы транскрибируются в широком диапазоне тканей, тогда как другие отличаются тканеспецифичностью (Buchanan et al., 2012). Гены, кодирующие эндоглюканазы, наиболее подробно изучены у *A. thaliana.* Например, были получены растения *A. thaliana* с рецессивной мутацией гена *KOR*, кодирующего эндо-β-(1→4)-глюканазу. Радиальное расширение клеток гипокотиля у этих растений преобладало над продольным растяжением, в связи с чем первичная клеточная стенка мутантов имела волнистую поверхность. Мутация в гене *KOR* приводила к блокировке гидролиза 1,4-гликозидных связей молекулы целлюлозы, что способствовало нарушению продольного растяжения (Nicol et al., 1998). В *A. thaliana* обнаружен ген эндоглюканазы *AtCel1*, необходимый для нормального растяжения клеток. Повышенная экспрессия гена *AtCel1* обуславливала ускоренный рост трансгенных растений табака и тополя. И наоборот, растения *A. thaliana*, экспрессирующие участки гена *AtCel1* в антисмысловой ориентации, характеризовались короткими стеблями и корнями, неровными поверхностями клеточных стенок (Sukno et al., 2006). В этиолированных гипокотилях томатов был обнаружен и исследован ауксин-индуцибельный ген *Cel7*, кодирующий эндо-β-(1→4)-глюканазу. Было показано, что ген *Cel7* участвует в регуляции роста плодов (Catala et al., 2000).

3.7. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы (XTHs) в зависимости от характера субстрата выступают в качестве трансгликозилаз, объединяя синтезированные ксилоглюканы и реконструируя уже имеющиеся ксилоглюканы путем процесса трансгликозилирования, либо выступают в качестве гидролаз, расщепляя молекулы ксилоглюканов (Miedes et al., 2010). В целом у *A. thaliana* обнаружено 33 гена *XTHs*, все они, судя по данным микрочипов ДНК или наличию EST (Expressed Sequence Tag) в базах данных, экспрессируются. Повышенный уровень биосинтеза мРНК XTHs наблюдается при любом

прикосновении к растениям и при их обработке экзогенными ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами, при этом происходит удлинение стеблей опытных растений за счет стимуляции роста клеток растяжением (Miedes et al., 2010). Взаимосвязь между активностью XET и клеточным растяжением была обнаружена в апикальном сегменте гипокотилей томатов, сверхэкспрессирующих ген *SlXTH1*, где удельная активность XET была выше в сравнении с контрольной линией (Miedes et al., 2010). В гипокотилях трансгенных линий с пониженной экспрессией гена *SlXTH1* показатели общей растяжимости были ниже, чем в линиях дикого типа. Все это свидетельствует о том, что XTHs участвуют в реструктуризации клеточной стенки в период интенсивного роста органов, но судя по всему, блокирование экспрессии лишь одного гена может компенсироваться за счет гомологичных белков.

Важная роль ксилоглюканов в клеточном растяжении была продемонстрирована при анализе ксилоглюкан-дефицитных мутантов (*xtt1/xtt2*) растений *A. thaliana*, которые отличались маленькими размерами розеток, уменьшенными черешками и листовыми пластинками (Park et al., 2011). Хотя мутантные *xtt1/xtt2* растения имели более пластичные клеточные стенки, чем растения контрольной линии, в то же время, у опытных растений растяжимость клеточных стенок, опосредованная α-экспансинами, заметно снижалась. Обнаружено, что воздействие кислого буфера на черешки листьев контрольных растений способствовало растяжению клеток, в то время как клеточные стенки мутантов *xtt1/xtt2* слабо отвечали на данное воздействие (Park et al., 2011). Таким образом, кислотно-индуцированное растяжение клеточных стенок, опосредованное α-экспансинами, значительно уменьшается при дефиците ксилоглюканов (Park et al., 2011). Действительно, еще ранее была выдвинута гипотеза о том, что функция связующих гликанов заключается не только в соединении микрофибрилл целлюлозы, но и в их разделении для эффективного растяжения (Darley et al., 2001).

XTHs участвуют во многих морфогенетических и деструктивных процессах при росте и развитии растений. Из томатов был выделен ген *LeXET4*, который

экспрессируется преимущественно в прорастающих семенах, в меньшей степени в стеблях и отсутствует в корнях, листьях и цветках (Chen et al., 2002). Экспрессия гена *LeXET4* стимулируется гиббереллинами, и его белковый продукт играет важную роль при разрыве семенной кожуры и начале прорастания семени. Другой ген томатов - *LeXET1* экспрессируется в активно растущих тканях и активируется ауксинами (Catala et al., 2000).

Таким образом, XTHs являются одними из ключевых ферментов во всех процессах, которые требуют реорганизации клеточной стенки, но кроме них в этих процессах участвуют и другие белки. Например, ведутся исследования фермента транс-α-ксилозидазы, катализирующей перенос (1→4)-α-D-ксилобиозы на ксилоглюканы (Frankova, Fry, 2012). Предполагается, что данный фермент, модифицируя структуру ксилоглюканов, способствует изменению доступности сайтов для действия XET, тем самым трансксилозидазы также принимают участие в регуляции клеточного растяжения.

3.8. Экспансины

В растительных организмах идентифицированы четыре класса экспансинов: α-экспансины, β-экспансины, экспансин-подобные белки A и экспансин-подобные белки B, причем в геноме *A. thaliana* обнаружены 26 генов α-экспансинов и пять β-экспансинов (Шарова, 2007). На примере β-экспансина кукурузы было выдвинуто предположение, что эти белки, взаимодействуя с клеточной стенкой, разрывают водородные связи между арабиноксиланами и поверхностными микрофибриллами целлюлозы, в результате чего происходит локальное высвобождение арабиноксиланов из комплекса с целлюлозой. Предполагается, что во время этого движения, два домена экспансина связывают и отпускают арабиноксилан независимо друг от друга, что приводит в движение полисахариды клеточной стенки (Yennawar, Li, 2006).

Активность экспансинов в основном определяется транскрипцией, а она, в свою очередь, тонко регулируется фитогормональным сигналингом и условиями внешней среды (Шарова, 2007). Активность α-экспансинов многократно

возрастает при подкислении клеточных стенок. Активность β-экспансинов в меньшей степени зависит от кислотности среды.

Нерешенным до сих пор остается вопрос о целесообразности большого разнообразия экспансинов для растений. В первую очередь, можно предположить, что каждый из них выполняет свойственную только ему функцию. Например, экспансины могут также различаться по месту и времени проявления своей наибольшей активности, некоторые из них, видимо, являются ткане- или органоспецифичными. В литературе имеются данные об участии экспансинов в обеспечении роста различных органов растения, например, корней. Так, у *A. thaliana* был изучен ген экспансина *AtEXPA5,* мутанты по данному гену имели более короткие корни и гипокотили, меньшее число листьев розетки (Park et al. 2010). В клетках корневых волосков у *A. thaliana* экспрессируется ген *AtEXPA7* (Lin et al., 2011). При снижении количества транскриптов гена *AtEXPA7* на 25-58% в трансгенных растениях, полученных при помощи технологии РНК-сайленсинга, наблюдалось уменьшение длины корневых волосков трансгенных линий на 25-48% по сравнению с контрольными растениями (Lin et al., 2011). При изучении влияния экспансинов на рост корня риса был идентифицирован ген *OsEXPA17*. Мутация этого гена фенотипически выражается в укорочении корневых волосков. Однако подавление экспрессии гена *OsEXPA17* при помощи РНК-интерференции и комплементация с другими генами экспансинов корневых волосков (*OsEXPA30*) может восстановить функциональную способность данного гена к удлинению клеток корня (ZhiMing et al., 2011). Исследования экспансинов конского щавеля (*Rumex palustris*) свидетельствуют о варьировании уровня экспрессии генов в зависимости от типа корня (главный, боковые и придаточные корни). Высокая экспрессия генов экспансинов наблюдается в клетках сосудистого камбия стержневого корня, в апикальной части придаточных корней, а также в зоне всасывания корня. Это еще раз доказывает то, что экспансины участвуют в формировании корневых волосков и зачатков боковых корней (Colmer et al., 2004).

Экспансины принимают участие также в регуляции роста и развития осевых частей побега и листьев. Например, они способны влиять на меристематические

ткани, при этом, не только индуцируя образование новых листьев, но и определяя их расположение. В этом направлении исследований классической считается работа Fleming с соавт., которые показали, что именно в том месте, где помещали бусинки из сефакрила, содержавшие экспансин гипокотилей огурца, наблюдалась инициация зачатков листьев (Fleming et al., 1997). Экспансины принимают также участие и во всех дальнейших этапах роста листьев. Эктопическая экспрессия гена *TaEXPB23* β-экспансина, выделенного из колеоптилей пшеницы, приводит к ускоренному росту листьев и междоузлий на ранних стадиях развития растений (Xing et al., 2009). Экспрессия экспансина TaEXPB23 активируется при обработке метилжасмонатом, а этилен, ИУК и НУК уменьшают уровень его экспрессии.

Анализ 33 генов экспансинов кукурузы показал, что 19 из них экспрессируются в разных точках зоны удлинения листа. Это позволило объединить их в три группы, участвующих в реализации следующих процессов: растяжение клетки, максимальное расширение листа и дифференцировка клеточных стенок (Sloan et al., 2009). Серия экспериментов по изучению влияния повышенной экспрессии экспансинов на этапы роста и развития листа с использованием индуцибельного промотора показала, что существует небольшой промежуток времени чувствительности листа к воздействию экспансинов, когда увеличение экспрессии трансгена ведет к усилению активности эндогенного экспансина и, соответственно, усилению ростовой способности листа. Но предполагается, что эффективность действия экспансинов зависит от присутствия многих модулирующих факторов листа, и контроль экспрессии этих факторов (в сочетании с экспрессией экспансинов) определяет степень роста листовой пластинки (Sloan et al., 2009).

Исследования гена экспансина петунии *PhEXPA1* показали, что он экспрессируется преимущественно в расширяющихся тканях пазух листа. Морфологический анализ трансгенных растений с повышенной и пониженной экспрессией гена *PhEXPA1* показал, что изменения претерпевают размеры клеток и органов (Dal Santo et al., 2011). У картофеля (*Solanum tuberosum*) были изучены 9 генов экспансинов (Jung et al., 2010). Экспрессия гена *EXPA1* картофеля была

повышена в молодых растущих клубнях, этиолированных стеблях, растущей верхушке побега. Экспрессия генов *EXPA7* и *EXPA8* коррелировала с ростом клубней, но не стебля. После обработки ауксином повышался уровень экспрессии экспансинов картофеля EXPA1, EXPA3, EXPA4 и EXPA5 (Jung et al., 2010). У гладиолуса (*Gladiolus grandiflorus*) экспансин GgEXPA1 экспрессируется в растущих растяжением клетках, в тычиночных нитях, в столбиках пестика, растущих листьях, но не в зрелых и переставших расти органах (Azeez et al., 2010). Из обработанных ауксином этиолированных гипокотилей томатов был выделен ген *LeEXP2*. Экспрессируется этот ген в растущих зонах, его транскрипция стимулируется ауксином и сахарозой (Arru et al., 2008).

Особый интерес представляет изучение экспансинов древесных растений, так как они могут быть применены в лесной биотехнологии для создания новых пород деревьев с увеличенным размером ствола. В камбиальной зоне гибридной осины (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) наибольший уровень экспрессии был характерен для трех генов α-экспансинов (*PttEXPA1, PttEXPA2* и *PttEXPA8*) и одного β-экспансина (*PttEXPB1*) (Gray-Mitsumune et al., 2004), при этом в количественном отношении больше всего было мРНК гена *PttEXPA1*, что, по-видимому, говорит об активном участии данного экспансина в процессах вторичного роста у древесных растений. Для выяснения роли экспансинов в удлинении и развитии клеток древесины провели исследования α-экспансина PttEXPA1 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). Экспансин PttEXPA1 стимулировал увеличение волокна в диаметре, а у сосудистых элементов увеличивалась только длина. Эктопическая экспрессия гена *PttEXPA1* способствовала в основном увеличению размеров междоузлий и площади листьев у трансгенной осины (Gray-Mitsumune et al., 2008). Из дифференцирующейся ксилемы китайской ели (*Cunninghamia lanceolata*) было клонировано два гена *ClEXPA1* и *ClEXPA2*, которые преимущественно экспрессировались в камбии. В трансгенных по данным генам растениях наблюдалось возрастание размеров ряда органов за счет увеличения размеров клеток паренхимы, при этом в опытных растениях

содержание целлюлозы увеличивалось на 30-50% по сравнению с контролем (Wang et al., 2011).

3.9. Другие неферментативные белки

Из неферментативных белковых молекул клеточной стенки, участвующих в регуляции клеточного растяжения известны, кроме экспансинов, липид-переносящие белки LTP (Lipid Transfer Proteins), которые способны связывать липидные молекулы своим гидрофобным участком (Nieuwland et al., 2005). Показано, что белки LTP способствуют негидролитическому разрыхлению клеточной стенки и облегчению его растяжения, однако молекулярный механизм действия этих белков на компоненты клеточной стенки остается неизвестным. Обнаружен также класс белков илдинов (yieldins), которые влияют на растяжимость клеточных стенок (Okamoto-Nakazato, 2002). Эти белки проявляют активность при кислых значениях pH, снижают пороговую величину силы, которую необходимо приложить, чтобы клеточная стенка начала растягиваться. Одними из важнейших сенсоров, передающих информацию из клеточной стенки внутрь клетки, являются ассоциированные с клеточной стенкой киназы WAK (Wall-Associated Kinases). Было показано, что они необходимы не только для передачи информации о патогенах и механических воздействиях, но и участвуют в регуляции клеточного растяжения (Cosgrove, 2001).

3.10. Цитоскелет

Пролиферация, рост, дифференциация клеток, внутриклеточный везикулярный транспорт, биосинтез клеточной стенки, поддержание формы клетки и другие процессы у растений во многом определяются организацией и динамическими свойствами цитоскелета (Блюм и др., 2012). Морфогенетически важными элементами, обеспечивающими пространственной информацией целлюлозосинтазный комплекс и контролирующими ориентацию микрофибрилл целлюлозы, являются кортикальные микротрубочки (МТ), представляющие собой динамические полимеры, состоящие из гетеродимеров α- и β-субъединиц

тубулина (Цыганкова и др., 2005). В период клеточного растяжения контроль клеткой стабильности МТ осуществляется за счет качественных изменений экспрессии генов тубулина, через циклы тирозилирования/детирозилирования и ацетилирования β-тубулина, фосфорилированием белков МТ и посредством колебаний в уровне концентрации ионов Ca^{2+} (Цыганкова и др., 2005).

В распределение МТ вовлечены также ассоциированные с МТ белки (MAP65), причем показано участие этой группы белков в регуляции клеточного растяжения (Chan et al., 2003). В организации микротрубочек значительную роль играют фитогормоны. Предполагается, что именно ассоциированные с МТ белки участвуют в регуляции фитогормонами элементов цитоскелета (Chilley et al., 2006). Показано влияние гиббереллина на взаимодействие ядерного белка DELLA и префолдинового комплекса, необходимого для сборки тубулина. В присутствии гиббереллина DELLA белки разрушаются, и префолдиновый комплекс, локализуясь в цитоплазме, начинает работать. В отсутствии гиббереллина комплекс остается в ядре, вследствие чего содержание α/β-тубулиновых гетеродимеров уменьшается, тем самым влияя на организацию микротрубочек (Locascio et al., 2013). В регуляцию клеточного растяжения вовлечены и другие элементы цитоскелета, например, актиновые микрофиламенты. Известно, что сверхэкспрессия циклаза-ассоциированного белка CAP приводит к многочисленным морфологическим дефектам из-за деполимеризации актиновых микрофиламентов, при этом анализируемые трансгенные растения с повышенным уровнем экспрессии гена *CAP* характеризовались уменьшением размеров клеток эпидермиса и мезофилла листьев (Barrero et al., 2003).

3.11. Эндоредупликация

Известно, что полиплоидия приводит к увеличению размеров органов растений, причем исключительно за счет возрастания размеров отдельных клеток (Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003). Различные механизмы могут объяснить возникновение эндополиплоидии в растениях, однако в основном это становится возможным благодаря процессу эндоредупликации. Таким образом, можно

сказать, что еще одним регулятором роста клеток растяжением является эндоредупликация, обеспечивающая возникновение в ядре множества унифицированных копий ДНК при отсутствии конденсации хроматина, сегрегации хромосом и цитокинеза (Шакина, Страшнюк, 2011). Действительно корреляция между размером клеток и эндоредупликацией была обнаружена в *A. thaliana* и многих других видах растений. Например, в лепестках орхидеи (*Oncidium varicosum, Phalaenopsis spp.*) и капусты (*Brassica capitata*) наблюдается эндоредупликация, в некоторых клетках количество ДНК достигает 64C (Cheniclet et al., 2005). Корреляция между плоидностью и размером клеток указывает на то, что эндополиплоидия ядер способствует формированию крупных клеток. Умножение генома предполагает увеличение метаболической активности, синтеза рРНК и транскрипционной активности за счет увеличения дозы соответствующих генов. Эндополиплоидия важна для понимания регуляции экспрессии генов в дифференцированных тканях. Важную роль в регуляции эндоредупликации выполняют ингибитор митоза ccs52 (Cebolla et al., 1999), топоизомераза VI (Sugimoto-Shirasu et al., 2005) и другие. Считается, что переход от митотического цикла к циклам эндоредупликации происходит за счет изменения содержания белков-регуляторов клеточного цикла, а именно циклинов A и B, циклин-зависимых киназ классов A и B, а также модуляторов их активности (Шакина, Страшнюк, 2011). Уменьшение уровня экспрессии митоз-активирующих циклинов и циклин-зависимых киназ в клетках будет блокировать G2/M-переход, что может, в конечном счете, способствовать эндоредупликации. Однако сигналы, контролирующие выход из клеточного цикла или трансформирование митотического цикла в эндоцикл во время дифференцировки клеток еще до конца не определены.

***

Рост клеток растяжением у растений представляет собой сложный и скоординированный процесс, который контролируется множеством экзогенных и эндогенных факторов на клеточном, тканевом и организменном уровнях. Многие

морфологические и физиологические аспекты клеточного растяжения к нашему времени были описаны (Обручева, 2008б), однако работы по раскрытию молекулярных механизмов роста клеток растяжением и его регуляции находятся на начальных стадиях и пока вопросов гораздо больше, чем ответов. Например, совсем неясной остается роль пектиновой и белковой сетей клеточной стенки в обеспечении растяжения, непонятны взаимоотношения между процессами расхождения микрофибрилл целлюлозы и биосинтеза компонентов клеточной стенки. Более того, механизмы функционирования целлюлозосинтазного комплекса до сих пор не исследованы, несмотря на то, что он синтезирует наиболее распространенное на планете органическое соединение. Безусловно, клеточное растяжение сильно зависит от внешних условий, однако не до конца изученными остаются начальные этапы восприятия или генерации, а также распространения сигнала о внешнем воздействии (механические сигналы, свет, вода, соли, инфекция и др.) от клеточной стенки к элементам внутриклеточной сигнализации и как обеспечивается специфичность проводимого сигнала. Не совсем ясна, в связи с этим, роль в генерации и передаче сигнала полимеров клеточной стенки, их физиологически активных фрагментов – олигосахаринов, активных форм кислорода, внеклеточной АТФ, структурных белков и ассоциированных с клеточной стенкой киназ.

Благодаря большому прогрессу в полногеномном секвенировании, было описано множество генов, предположительно кодирующих белки, участвующие в клеточном растяжении, что облегчает проведение дальнейших исследований, однако функциональная значимость многих из этих генов на белковом уровне до сих пор остается недоказанной. В ближайшем будущем, используя современные методы физико-химической биологии, предстоит пройти долгий путь от описания генов к изучению белков и метаболитов и, в конечном счете, механизмов роста клеток растяжением на молекулярном уровне. При этом должны быть изучены все основные компоненты сигнальной системы клеточной стенки, внутриклеточного сигналинга, эпигенетические факторы, многочисленные белки и пептиды, участвующие в реорганизации и биосинтезе компонентов клеточной

стенки, а также установлены связи между ними. Особый интерес представляет раскрытие механизмов взаимодействия процессов клеточного деления, роста клеток растяжением и их дифференцировки. Эти данные актуальны не только для фундаментальной науки, но и для генной инженерии и селекции растений, так как полученные знания могут быть использованы для создания новых сортов культурных растений с хозяйственно-ценными признаками. В то же время, для генной инженерии в этой области также существует большое количество нерешенных проблем, например, в трансгенных растениях часто удается повысить уровень экспрессии белков, участвующих в клеточном растяжении, однако клеточная стенка восприимчива к ним только на короткое время, что часто нивелирует действие трансгена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Проведенный анализ литературы позволил нам определить план исследований, направленный на достижение основных целей работы и выполнение основных задач. Во-первых, для создания трансгенных растений было решено подготовить бинарные векторы, содержащие в своем составе конститутивные, тканеспецифичные и индуцибельные промоторы. Из конститутивных промоторов было решено клонировать промоторы вируса кольцевой гравировки гвоздики и вируса мозаики георгина, так как они не были еще исследованы и могли оказаться сильнее 35S промотора. Так как активности природных конститутивных промоторов недостаточно для получения трансгенных растений с высоким содержанием целевого белка, было решено также провести работы по получению более сильных форм промоторов каулимовирусов методом ДНК шаффлинга. Так как одной из важных прикладных аспектов планируемой работы было увеличение размеров цветков у растений, из тканеспецифичных промоторов нами было решено клонировать цветокспецифичный промотор хальконсинтазы петунии. Петуния была выбрана из-за того, что она является ближайшим родственником табака, который в свою очередь, мы планировали использовать в качестве модельного растения. В арсенале лаборатории уже имелся бинарный вектор pER8,

содержащий ген устойчивости к гигромицину и эстрадиол-индуцибельный транскрипционный активатор XVE. Данный вектор было решено использовать для работ по исследованию индуцибельной экспрессии целевых генов в табаке.

Анализ литературы показывает, что при изучении растительных генов, многие исследователи работают по следующему алгоритму. В первую очередь, методом ОТ-ПЦР выясняют в каких органах, на каких стадиях развития наблюдается наиболее высокий уровень экспрессии исследуемого гена и как он меняется под влиянием внешних воздействий. Если работа ведется на *A. thaliana*, то пытаются получить мутанты, не экспрессирующие исследуемый ген. Затем ген интереса клонируют и получают трансгенные растения с его повышенной или пониженной экспрессией. Тщательный морфофизиологический и молекулярный анализ мутантов и трансгенных растений позволяет сделать определенные выводы о вкладе исследуемого гена в регуляцию и обеспечение роста органов. Большой интерес представляет также анализ фитогормонального статуса трансгенных растений, однако такие работы встречаются гораздо реже. Объединяя исследуемый ген с репортерными белками и получая с помощью данной конструкции трансгенные растения, получают информацию о тканевой и внутриклеточной локализации его белкового продукта. Соединяя промоторную область исследуемого гена с генами репортерных белков, получают сведения о том, где и в каких условиях экспрессируется исследуемый ген. В наших исследованиях также было решено использовать часть этих хорошо зарекомендовавших себя методов. Так как геномы не всех хозяйственно-ценных растений секвенированы, представляет большой интерес, также то, каковы будут эффекты сверхэкспрессии целевых генов в гетерологичных условиях.

В результате проведенного анализа литературы в качестве целевых, были отобраны, в первую очередь, гены из различных растений, участвующих в регуляции клеточного деления: *AINTEGUMENTA* (*A. thaliana*, рапс, тополь черный, табак), *ARGOS* (*A. thaliana*) и *CLAVATA3* (*A. thaliana*). Большое внимание в нашей работе мы обратили также на гены, участвующие в регуляции роста клеток растяжением, а именно на гены экспансинов: *NtEXPA1*, *NtEXPA4*, *NtEXPA5*,

NtEXPA6 табака, *PnEXPA1* и *PnEXPA3* тополя черного, *AtEXPA10 A. thaliana.* Из других генов-регуляторов клеточного растяжения планировалось изучить *ARGOS-LIKE* (*A. thaliana,* тополь черный) и ген эндоксилоглюкантрансферазы табака *NtEXGT*. Отметим, что большинство из перечисленных здесь генов нам предстояло изучить впервые, кроме генов *A. thaliana.* Исследования растительных генов до нас в основном были проведены на *A. thaliana*, нами же в качестве модельного объекта был выбран табак, так как он представляет хозяйственную ценность и довольно легко поддается агробактериальной трансформации. Наиболее эффективные генно-инженерные конструкции, отобранные на табаке, планировалось использовать для получения других трансгенных хозяйственно-ценных трансгенных растений с увеличенными размерами органов.

Часть 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 4. Объекты и методы исследования

4.1. Краткая характеристика объектов исследования

Объектами исследований в данной работе служили, во-первых промоторы двух представителей каулимовирусов: вируса мозаики георгина и вируса кольцевой гравировки гвоздики. Растения георгина (*Dahlia pinnata*), инфицированные вирусом мозаики георгина, были найдены в Уфе и Нуримановском районе Республики Башкортостан. Листья растений, инфицированные вирусом кольцевой гравировки гвоздики, были получены из Института вирусологии, микробиологии и биологической безопасности (г. Брауншвейг, Германия). Были исследованы листья 3-х видов семейства гвоздичных: *Siléne viscária* L. (смолка обыкновенная или клейкая), *Dianthus caryophyllus* L. (гвоздика садовая), *Dianthus barbatus* L. (гвоздика турецкая).

Для амплификации и клонирования промотора хальконсинтазы chsA использовали растения петунии (*Petunia hybrida* L.), выращенные в условиях световой комнаты при температуре 27°C, освещенности около 5000 люкс и чередовании дня и ночи 16/8 часов.

Для выделения целевых генов использовались растения *Arabidopsis thaliana* L. экотип Columbia 0, *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1, *Brassica napus* L. сорта Hanna, выращенных в условиях световой комнаты. Для выделения генов тополя использовались растущие в условиях города листья *Populus nigra* L.

4.2. Выделение и очистка тотальной ДНК растений и каулимовирусов методом фенольно-хлороформной экстракции

На первых этапах осуществления работы, ДНК из растительного материала чаще всего выделяли фенольно-детергентным методом (Graham, 1978) с некоторыми модификациями. Для этого растительный материал растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния, не допуская его размораживания. Затем его переносили в колбу, добавляли 5-10 объемов (по

отношению к исходной навеске растительного материала) экстрагента, содержащего 100 мМ трис-HCl pH 8.0, 20 мМ ЭДТА, 1%-ный ДДС натрия и, слегка помешивая, прогревали на водяной бане при 60^0C в течение 10 мин. Охладив суспензию до комнатной температуры к ней добавляли 5 М $NaClO_4$ до конечной концентрации 1 М. Экстракцию ДНК с ее одновременной депротеинизацией осуществляли, встряхивая гомогенат с равным объемом (по отношению ко всему объему гомогената) смеси 80%-ного свежеперегнанного фенола (доведенного до pH 8.0 или с помощью многократных насыщающих встряхиваний с трис-HCl, pH 8.0 или путем добавления 5 М NaOH из расчета 1,5 мл щелочи на 100 мл фенола), хлороформа и изоамилового спирта (взятых в соотношении 25:24:1). Смесь расслаивали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин в микроцентрифуге MiniSpin Plus фирмы Eppendorf. Верхний водно-солевой слой, содержащий нуклеиновые кислоты, отбирали пипеткой с широким оплавленным кончиком и повторно депротеинизировали хлороформом (здесь и далее при упоминании хлороформа имеется ввиду его смесь с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1) в течение 20 мин. Затем смесь центрифугировали с целью осаждения ДНК, перенося водно-солевую фазу в пробирку с двумя объемами охлажденного 96%-ного этанола. Спиртовой осадок ДНК собирали центрифугированием, дважды промывали 70%-ным этанолом для удаления следов фенола и солей, подсушивали и растворяли в минимальном объеме деионизированной воды Milli-Q.

4.3. Выделение и очистка тотальной ДНК растений методом солевой экстракции

Для получения большого количества геномной ДНК использовали метод солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997). Для этого около 50-100 мг листа растения гомогенизировали в 400 мкл стерильного солевого буфера (0,4 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8,0, 2 мМ ЭДТА). Затем добавляли в эту смесь 40 мкл 20% SDS и 8 мкл протеиназы К (до конечной концентрации 400 мкг/мл) и тщательно перемешивали. После этого образцы инкубировали при 55-65°C в течение 1 часа,

добавляли 300 мкл 6М NaCl, перемешивали на вортексе и центрифугировали 30 мин при 12 тыс. об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли эквивалентное количество изопропанола, перемешивали и смесь инкубировали при -20°С в течение 1 часа. Затем образцы центрифугировали 20 мин при 12 тыс. об/мин в центрифуге с охлаждением. Осадок промывали 2 раза 70% этиловым спиртом и растворяли его в 100-200 мкл стерильной деионизированной воды (Milli-Q).

4.4. Выделение тотальной РНК растений тризолом и построение первой цепи кДНК для клонирования генов

Тотальную РНК табака выделяли тризолом собственного приготовления или фирмы “Invitrogen” (США). Все процедуры проводили в низкотемпературных условиях (на снегу). Небольшое растение или отдельный орган (2-5 мг) растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния, не допуская его размораживания. Затем образец помещали в охлажденную полипропиленовую коническую микроцентрифужную пробирку с крышкой типа «Эппендорф» объёмом 1,5 мл и опускали в жидкий азот. После этого помещали пробирки с растительной тканью в штатив и вносили 1 мл охлажденного тризола; быстро смешивали на вортексе; интенсивно встряхивали в пенопластовом штативе в течение 10 минут. Далее центрифугировали 15 минут при максимальных оборотах микроцентрифуги с охлаждением (13 тыс. об/мин), а супернатант переносили в новые пробирки. После чего добавляли хлороформ (до 20% от общего объема смеси) и встряхивали в течение 5-10 минут. Затем вновь центрифугировали 10 минут, переносили водную фазу в новые пробирки, добавляли равный объём хлороформа, встряхивали и центрифугировали 2-3 раза до полного исчезновения интерфазы. После этого РНК осаждали равным объемом изопропанола в течение 15 минут при комнатной температуре. Осадок собирали центрифугированием в течение 20 минут при максимальных оборотах микроцентрифуги и промывали 2 раза 70%-ным этиловым спиртом. Осадок подсушивали и растворяли в высокоочищенной стерильной воде Milli-Q. После проделанных операций,

полученную РНК не замораживали, а сразу же анализировали с помощью гель-электрофореза и использовали для построения первой цепи кДНК.

Построение кДНК исследуемых генов проводили, используя 1-3 мкг тотальной РНК табака, предварительно обработанную ДНКазой “Fermentas” (Литва), с помощью обратных транскриптаз Mint (Евроген, Россия), MMuLV (Fermentas, Литва) и олиго dT праймера при температурах 37-42°С в течение 1-2 часов. Реакцию останавливали нагреванием смеси до 70°С в течение 15 минут, добавляли воду Milli-Q до конечного разведения 5-10 раз. Полученная таким образом смесь использовалась в качестве матрицы для амплификации и клонирования целевых генов.

4.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли методом мягкого лизиса (Clewel, Helinski, 1969) с некоторыми модификациями. Колонией *E. coli*, несущей какую-либо плазмиду засевали 100 мл среды Лурия-Бертани (LB), содержащей селективный антибиотик и 12,5 мкг/мл тетрациклина для штамма *E. coli* XL1-Blue, несущего на эписоме транспозон *Tn*10, определяющий устойчивость к данному антибиотику) и выращивали при 37^{o}С на орбитальном встряхивателе в течение ночи. Часть полученной ночной культуры переносили, обеспечив ее 100-кратное разбавление, в колбу со свежеприготовленной средой LB, содержащей необходимые антибиотики. Наращивание продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации 2 – 3-х 10^{8} клеток/мл (обычно 14 - 16 час).

Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин в центрифуге К-23. Осадок суспендировали в 8 мл 10%-ной сахарозы. После добавления 2 мл свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл в 0,25 М трис-HCl, pH7,8) выдерживали 10 мин при 0^{o}С и добавляли 2 мл 0,5 М ЭДТА и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин при прежних условиях. Лизис проводили с помощью смеси детергентов бридж 58 - дезоксихолат натрия (конечные концентрации 1% и 0,4%, соответственно). Осторожно перемешивали в течение 5 мин пока раствор не становился вязким и

прозрачным. Полученный лизат осветляли в ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, Inc. США) в течение 45 мин при 29000 об/мин. Осторожно сливали супернатант, не допуская перетекания вместе с ним иногда образующегося вязкого придонного слоя, содержащего хромосомную ДНК, и добавляли к нему 1/5 объема 5 М NaCl и 1/4 объема 50%-го полиэтиленгликоля 6000. При 0^{o}C в холодильнике в течение нескольких часов формировался осадок плазмидной ДНК, содержащий загрязняющее количество РНК, белка, полисахаров.

Сформировавшийся осадок собирали в центрифуге К-23 при 3000 об/мин в течение 10 мин. После растворения осадка в 1х ТЕ перед этапом депротеинизации проводили удаление остаточного полиэтиленгликоля встряхиванием с хлороформом и расслаиванием в центрифуге К-23 при 2500 об/мин в течение 5 мин. Депротеинизацию проводили встряхиванием с равным объемом смеси хлороформа и 80%-ого свежеперегнанного фенола (pH 8,0), взятых в соотношении 1:1 в течение 10 мин. Затем проводили центрифугирование в центрифуге К-23 при 2500 об/мин в течение 20 мин. Верхний водно-солевой слой, содержащий ДНК, отбирали в новую микропробирку и подвергали повторной депротеинизации по той же схеме. Эту процедуру повторяли до тех пор, пока не исчезала интерфаза. Затем супернатант встряхивали с равным объемом хлороформа с последующим центрифугированием и осаждали ДНК двумя объемами этанола. Спиртовой осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом для удаления следов фенола и хлороформа и растворяли в соответствующем объеме 1х ТЕ.

При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки применяли быстрый метод щелочного лизиса бактериальных колоний (Sambrook et al., 1989). Для этого бактериологической петлей переносили бактериальные колонии в микроцентрифужные пробирки и суспендировали в 100 мкл раствора I, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,8) и 20 мМ ЭДТА. Затем добавляли 200 мкл раствора II, содержащего 1%-ный раствор ДДС натрия и 0,2 М NaOH. После осторожного перемешивания через 5 мин добавляли 150 мкл 5 М ацетата калия

(pH 5,0). Тщательно перемешав, выдерживали при 0°С в течение 10 мин и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин. Осторожно отбирали осветленную жидкость, не захватывая осадок и липидный слой, и осаждали ДНК двумя объемами этанола при -20°С. После растворения сформировавшегося и собранного в микроцентрифуге в минимальном объеме Milli-Q, препараты ДНК были готовы или для их непосредственного анализа агарозным гель-электрофорезом, для расщепления соответствующими рестрикционными эндонуклеазами или для амплификации соответствующих генов.

Довольно часто плазмиды также выделяли при помощи набора фирмы «Цитокин» (Россия). В основе протокола данного набора лежит также способ выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

4.6. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами и реакция лигирования

Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами проводили в буферах, рекомендованных фирмами-поставщиками (Fermentas, Сибэнзим, NEB, Promega). Время рестрикции варьировало от 1 часа до 1 суток в зависимости от цели эксперимента, а также от количеств, как самого препарата ДНК, так и фермента. При комбинированном расщеплении препаратов ДНК двумя или более рестрикционными эндонуклеазами выбирали буферные растворы наиболее оптимально соответствующие особенностям действия всех используемых ферментов или проводили последовательную инкубацию расщепляемой ДНК с разными ферментами, начиная с требующего более низкую ионную силу.

При препаративном расщеплении полноту рестрикции проверяли аналитическим электрофорезом соответствующих аликвот реакционной смеси в 0,8-2,0%-ных агарозных гелях.

В экспериментах по молекулярному клонированию рестрикционные эндонуклеазы инактивировали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ с последующей обработкой смесью фенола и хлороформа. Некоторые рестрикционные эндонуклеазы инактивировали в термостате при 65 или 80°С.

Для очистки рестрикционных смесей также часто применяли наборы фирмы Цитокин (Россия).

Рестрикционный анализ проводили в объеме 20 мкл в течение 2-3 часов в термостате при оптимальной для фермента температуре. Реакционная смесь состояла из 3-7 мкл плазмидной ДНК (0,5-1 мкг), 2 мкл буфера для рестрикции (10х), 1 мкл рестриктазы и воды Milli-Q до 20 мкл. По окончании процесса рестрикции к реакционной смеси добавили краситель и проводили анализ путем разделения образовавшихся фрагментов в 1%-ном агарозном геле.

Реакцию лигирования проводили в объёме 10 мкл. Состав лигазной смеси: плазмидная ДНК (0,5-1 мкг), вставка (1-3 мкг), буфер с АТФ (1 мкл), лигаза (1 мкл), вода до 10 мкл. Лигирование проводили при комнатной температуре в течение 4-х часов или при +4°С в холодильнике в течение суток.

4.7. Обработка ДНК щелочной фосфатазой

Для повышения эффективности лигирования плазмидных векторов со вставкой (но не амплифицированных фрагментов ДНК, как известно, уже не имеющих фосфатных групп на 5'-концах, вследствие особенностей стандартного химического синтеза олигонуклеотидных праймеров) предварительно удаляли 5'-концевой остаток фосфорной кислоты на концах расщепленного рестриктазой вектора, обработкой щелочной фосфатазой. Дефосфорилирование проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 9.0), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ спермидина и 1 мМ $ZnCl_2$ при 37^0С в течение 30 мин в присутствии 0.1 е.а. фермента. Щелочную фосфатазу удаляли двукратной фенольной обработкой. Затем препарат ДНК осаждали этанолом и центрифугировали в микроцентрифуге модели Eppendorf 5 мин при 12000 об/мин. Осадок, отмытый от следов фенола 70%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в требуемом объеме воды Milli-Q.

4.8. Аналитический гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях

Процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК осуществляли в зависимости от размера разделяемых фрагментов ДНК и требуемого разрешения, используя 0,6 - 2,0%-ные агарозные гели. Источниками питания служили приборы модели 250/2.5 фирмы Bio-Rad (США) или модели ЕС-103 (E-C Apparatus Corporation, США).

Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах подводного типа модели Sub-Cell GT WIDI MINI (“Bio-Rad”, США). В качестве буферной системы использовали ТАЕ-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (pH 7,6) и 2мМ ЭДТА. При разделении фрагментов ДНК крупного и среднего размеров (от 50 - 70 тпн до 2 тпн) электрофорез проводили в 0,6 - 1,0%-ных гелях агарозы, соответственно, при напряжении 2 – 3 V на см длины геля. При разделении мелких фрагментов ДНК (от 2 тпн до 200 пн) использовали 1 - 2%-ные гели агарозы с градиентом напряжения 8 – 10 V на см длины геля. Такой повышенный градиент напряжения способствовал сокращению времени электрофореза и уменьшения диффузии (Sealey, Southern, 1982).

В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК фага лямбда после расщепления рестрикционными эндонуклеазами *Eco*91I (или ее изошизомером рестриктазой *Bst*EII), *Hind*III и *Pst*I. Маркерные фрагменты ДНК маленького размера получали расщеплением плазмиды pBR322 рестрикционными эндонуклеазами *Alu*I, *Hinf*I, *Msp*I, а также использовали 123 пн маркерную лестницу. Также в экспериментах были использованы коммерчески доступные маркеры молекулярного веса 1kb, 100bp+1,5kb и другие (Сибэнзим, Россия).

После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в трансиллюминаторе ТМ-36. Гели фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

4.9. Препаративный гель-электрофорез ДНК в неденатурирующих условиях

Препаративный гель-электрофорез использовали для разделения различных форм плазмидной и фагмидной ДНК, рестриктазных фрагментов ДНК после их расщепления рестрикционными эндонуклеазами, неоднородных ампликонов с целью их последующей элюции и очистки. Основными отличиями препаративного электрофореза от аналитического являлись толщина гелевой пластины и размер колодцев для нанесения препарата ДНК. В зависимости от количества разделяемого препарата толщина геля могла достигать 1 см (для агарозных гелей) при ширине ячейки или колодца до 12 см.

4.10. Элюция ДНК из агарозных гелей

Элюцию фрагментов ДНК из препаративного агарозного геля проводили с помощью легкоплавкой агарозы (Sealey, Southern, 1982). Просматривая окрашенный бромистым этидием агарозный гель в ультрафиолетовом трансиллюминаторе с длиной волны 302 нм, перед искомым фрагментом ДНК в геле вырезали соответствующую лунку. В образовавшееся пространство заливали 1,5%-ную легкоплавкую агарозу (тип VII), содержащую бромистый этидий и повышенную (1,2 кратную) концентрацию ТАЕ-буфера, необходимую для торможения движущихся фрагментов ДНК при входе в зону легкоплавкой агарозы и за счет этого концентрирования молекул ДНК, приходящихся на единицу объема геля. После застывания легкоплавкой агарозы и превращения ее в гель продолжали электрофорез в том же направлении, периодически контролируя процесс перехода фрагмента ДНК из обычной агарозы в легкоплавкую с помощью трансиллюминатора. По завершению этого процесса легкоплавкую агарозу, содержащую требуемый фрагмент ДНК вырезали и помещали в пробирку, соответствующую объему вырезанного кусочка геля. К расплавленной на водяной бане при 65^{o}С легкоплавкой агарозе добавляли равный объем дистиллированной воды и раствор 7,5 М ацетата аммония до конечной концентрации 0,5 М, встряхивали с фенолом и расслаивали в микроцентрифуге

MiniSpin Plus фирмы Eppendorf при 14.5 об/мин, 5 минут. Фенол удаляли встряхиванием с равным количеством хлороформа и последующим центрифугированием. Водно-солевой слой, содержащий ДНК, осаждали 2 объемами этанола при температуре -70^{o}C. Сформировавшийся осадок собирали центрифугированием, растворяли в соответствующем объеме воды. Качество и количество полученного препарата проверяли аналитическим электрофорезом в 0,8% - 2%-ных агарозных гелях в зависимости от размера элюируемых фрагментов ДНК.

При необходимости экстракции больших фрагментов ДНК из агарозы, размером более 1000 пн, проводили электроэлюциию. Гель с разделенными фрагментами ДНК окрашивали бромистым этидием, локализовали нужный фрагмент, вырезали его скальпелем и помещали в диализный мешочек, заполненный буфером (0,5 X TAE). Элюцию проводили 30 мин в приборе для электрофореза при постоянном перемешивании буфера (0,5 X TAE) магнитной мешалкой. По окончании электрофореза на 15 сек меняли направление тока для того, чтобы ДНК со стенок мешочка перешла в раствор. Затем сливали содержимое мешочка в чистую пробирку, мешочек промывали небольшим количеством 0,5 X TAE и сливали в ту же пробирку остатки ДНК. Измеряли объем элюата и проводили очистку ДНК на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Также довольно часто для элюции ДНК из агарозного геля использовали наборы для очистки ДНК фирмы «Цитокин».

4.11. Очистка ДНК хроматографией с ДЭАЭ-целлюлозой

Хроматографическую очистку ДНК проводили по методу Sambrook (Sambrook et al., 1989). Микроколонку заполняли взвесью ДЭАЭ-целлюлозы объемом до 0,2 см^{3}. Последовательно промывали колонку буферами следующих составов: 3 мл (TE pH 7,6, 1 M NaCl); 3 мл (TE pH 7,6, 0,1 M NaCl). Наносили на колонку раствор элюированной ДНК, добавив к нему NaCl до 0.1 М. При этом ДНК сорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе. Промывали колонку 3 мл буфера (TE pH 7.6, 0.1 M NaCl). Далее извлекали ДНК в эппендорф 3 раза по 150 мкл

буфером (ТЕ pH 7,6, 1 М NaCl) и осаждали очищенный элюат двойным объемом этанола.

4.12. Выделение тотальной ДНК бактерий при помощи 0,5%-ного тритона Х-100 для ПЦР-анализа

Для быстрого выделения бактериальной ДНК с целью их дальнейшего ПЦР-анализа использовали 0,5% раствор тритона Х-100 с добавлением небольшого количества сорбента Chelex (Bio-Rad, США). При помощи бактериологической петли собирали колонию бактерий размером со спичечную головку и помещали в микропробирку. Далее добавляли 30-50 мкл лизирующего 0,5%-ного раствора Х-100 и ресуспендировали смесь на вортексе. Образцы инкубировали в течение 5 минут при 95ºС и центрифугировали на микроцентрифуге при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы при ПЦР.

4.13. Полимеразная цепная реакция

Для амплификации промоторов и целевых генов, а также для молекулярного анализа трансгенных растений применяли метод полимеразной цепной реакции. ПЦР проводили на ДНК-термоциклерах Терцик МС-2 (ДНК-Технология, Россия), T1 с модулем Combi и модулем *in situ* (Biometra, Германия) с использованием ДНК-полимераз Hi-Fi (Kapa biosystems, США), Pfu (Биоскрин, Россия), Q5, LongAmp (NEB, США), Taq (Биоскрин; Хеликон; Силекс; Россия), LR (Силекс, Россия) и других. Праймеры были подобраны при помощи программы PrimerSelect (DNAStar, США) и были синтезированы в ООО «Биоскрин» (Уфа) или в "Синтол" (Москва). Реакции проводили в 10-30 мкл общего объема смеси, содержащей 67 мМ трис-HCl, 16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,01% Tween-20, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ, с добавлением 1 единицы Taq-полимеразы. Иногда в ПЦР-смесь с целью увеличения выхода продукта амплификации добавляли диметилсульфоксид до 0,1%, $MgCl_2$ до 3 мМ. ПЦР проводили по различным схемам,

в зависимости от особенностей ДНК-матрицы. В целом, чаще всего использовали следующие параметры ПЦР: начальная денатурация (94°С, 1-3 мин); 30 циклов амплификации: 1) денатурация - 94°С, 30-50 сек; 2) отжиг – от 48°С до 60°С, 30-50 сек; 3) синтез - 72°С, от 20 сек до 2,5 мин. Затем проводили инкубацию при 72°С в течение 2-5 мин.

Список подобранных и использованных в ходе работы праймеров представлен в таблице 1 (глава 5).

4.14. Проведение RAPD-анализа бактериальных клонов

RAPD-анализ использовали для генетической паспортизации штаммов *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, содержащих целевые генно-инженерные конструкции, полученные в ходе работы. Для RAPD-анализа штаммов микроорганизмов использовали «произвольные» короткие (5-10н) праймеры, например, такие как 5’-GGGCGCTG-3’, 5’-CAGGCCCTTC-3’. ДНК бактерий для RAPD-анализа выделяли при помощи тритона X-100. Реакцию проводили в 30 мкл, для этого добавляли 3 мкл 10х буфера Taq-полимеразы, 3 мкл dNTP, праймер (2 ое/мл) – 1 мкл, образец ДНК – 1 мкл, Taq-полимераза – 1 ед., $MgCl_2$ – до 3 мМ и смесь доводили водой Milli-Q до 30 мкл. RAPD проводили используя следующие параметры: 94ºС – 1 мин, 1 цикл; 94ºС – 30 сек, 37ºС – 30 сек, 72ºС – 30 сек – 30 циклов; 72ºС – 2 мин, 1 цикл. После окончания RAPD, проводили агарозный гель-электрофорез.

4.15. ПЦР-ПДРФ-анализ ампликонов

Для доказательства специфичности полученных в ходе работы ампликонов использовали как агарозный гель-электрофорез с маркерами с известной молекулярной массой, так и ПЦР-ПДРФ-анализ. Для этого ампликон осаждали при помощи двойного объема 96%-ного этилового спирта в течение часа при -20ºС. Осадок собирали центрифугированием при 12 тыс.

об/мин на микроцентрифуге в течение 8 мин. Спирт сливали, а осадок промывали 70%-ным этиловым спиртом и подсушивали. Далее осадок растворяли в 10 мкл Milli-Q и очищенный таким образом ампликон использовали для реакции рестрикции с различными ферментами. Реакцию проводили в течение 2 часов, далее инактиврировали рестриктазу при температуре 65ºС в течение 20 минут. Для получения результатов анализа проводили агарозный гель-электрофорез.

4.16. Автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных генов растений и промоторов каулимовирусов проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 фирмы “Applied Biosystems” (США), используя наборы для секвенирования “Big Dye Terminator v.3.0”. Секвенирующие реакции проводили при следующем режиме: 96^{o}C – 60 сек., и 27 циклов: 96^{o}C – 20 сек., 50-55^{o}C – 15 сек., 60^{o}C – 2 мин. В конце проводили дополнительную элонгацию при 60^{o}C в течение 3 мин. Состав реакционной смеси включал 4 мкл «Terminator Ready Reaction Mix», 10-15 нг амплифицированной или плазмидной ДНК-матрицы, 3,2 пкм праймера. Смесь до конечного объема 10 мкл доводили деионизованной водой (Milli-Q). Очистку от избытка невключившихся меченых дидезокситерминаторов проводили с помощью набора «Centri-Step» “Applied Biosystems” (США).

4.17. Получение одноцепочечной ДНК с помощью ДНК-полимеразы фага phi 29

Одноцепочечную ДНК получали с помощью ДНК-полимеразы фага phi29, характеризующейся очень высокой процессивностью и обладающей свойством смещать цепь ДНК, приводя к наработке длинного одноцепочечного продукта при использовании в качестве матрицы кольцевой молекулы ДНК (Blasco et al., 1991; Garmendia et al., 1992; Esteban et al., 1993).

Промоторы каулимовирусов, клонированные в фагмидных векторах pKRX и pBluescript, были вырезаны с помощью эндонуклеазы рестрикции *Bse*PI (изошизомер *Bss*HI). Затем промоторы были элюированы из легкоплавкой агарозы или была проведена электроэлюция. Далее было проведено лигирование в 15 мкл реакционной смеси: 1,5 мкл – буфер Т4 ДНК лигазы (10х, Fermentas), 1,5 мкл – ПЭГ 4000 (Fermentas), 0,3 мкл – БСА (10 мг/мл, Сибэнзим), 1 мкл – Т4 ДНК лигаза (30 ед/мкл, Fermentas), 10 мкл – раствор элюата промотора, с липкими концами *Bse*PI (1,5-2 мкг), 0,7 мкл – вода Milli-Q.

Эту смесь держали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем помещали в холодильник на $+4^0$С на 16 часов. После инактивации лигазы (65^0С, 10 мин), проводили депротеинизацию фенольно-хлороформной смесью. Полученную ДНК промывали 70%-ным спиртом, подсушивали и растворяли в 10 мкл воды Milli-Q. При этом должны были получиться кольцевые молекулы ДНК, содержащие промоторные последовательности каулимовирусов. Реакцию с ДНК-полимеразой фага phi29 проводили в 30 мкл: 3 мкл – буфер ДНК-полимеразы фага phi29 (10х, Fermentas), 6 мкл – dNTP (2,5 mM, Promega), 10 мкл – раствор, содержащий кольцевые молекулы ДНК, 2 мкл – олигонуклеотидный праймер (2 опт.ед/мл), 8 мкл –деинозированная вода Milli-Q, 0,5 мкл – ДНК полимераза фага phi29 (10000 ед/мл, New England Biolabs, Inc.), 0,5 мкл – пирофосфатаза (1000 ед/мл, Сибэнзим).

Вначале смешивали буфер, dNTP, праймер, воду и проводили денатурацию при 96^0С в течение 6 - 10 минут, затем помещали пробирки в снег и сразу добавляли необходимые ферменты: полимеразу и пирофосфатазу. Реакцию полимеризации проводили в течение 1 суток при температуре 30^0С. Инактивацию полимеразы осуществляли при температуре 65^0С в течение 10 минут. После фенольно-хлороформной депротеинизации проверяли наличие наработанной одноцепочечной ДНК при помощи агарозного гель-электрофореза.

С помощью данного метода нарабатывали обе цепи ДНК промоторов каулимовирусов, применяя в каждом случае или форвард праймер, подобранный к данному промотору (табл. 1) или реверс праймер. Например, для 35S промотора

эти цепи были обозначены как 35SF и 35SR, а для промотора ВКГГ, размером 501 пн: CERVF и CERVR. В итоге были получены 6 различных цепей ДНК промоторов ВМЦК, ВМГ и ВКГГ, то есть по 2 цепи для каждого промотора.

4.18. ДНК шаффлинг

ДНК шаффлинг проводили по (Stemmer, 1994), с модификациями (Zhao, Arnold, 1997). Вначале смешивали полученные одноцепочечные ДНК различных промоторов каулимовирусов (например: 35SF+CERVR и CERVF+35SR). Для дальнейших экспериментов были использованы 6 различных смесей одноцепочечных ДНК 3-х видов каулимовирусов. Образцы ДНК обрабатывали ДНКазой I (1 ед. акт) в буфере (0.5 М Трис HCl pH 7.4, 0.1 М $MgCl_2$) в течение 2 мин при 15ºС. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до 25мМ и инкубацией смеси при 65ºС, в течение 20 мин (Zhao, Arnold, 1997). Степень расщепления проверяли электрофорезом в агарозном геле. После депротеинизации фенольно-хлороформной смесью, растворяли фрагментированную ДНК в 10 мкл деинозированной воды Milli-Q. Затем осуществляли ПЦР без добавления праймеров в 30 мкл реакционной смеси: Матричная ДНК, обработанная ДНКазой I (10 мкл), смесь всех четырех дезоксирибонуклеотидов (0.2 мМ каждый), буфер для ДНК-полимеразы Taq (60 мМ Трис HCl, pH 8.5, 1.5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 0.1% тритон X-100), Taq ДНК-полимераза (0.5-1 ед. акт.). Амплификацию осуществляли на приборе Терцик МС2 (фирма ДНК-Технология), ПЦР проводили по схеме: начальная денатурация 95^0С– 3 минуты; затем 40 циклов: 94^0С – 40 секунд, 45^0С – 1 минута, 72^0С – 1 минута; затем дополнительная элонгация при 72^0С в течение 7 минут. После этого проводили депротеинизацию фенольно-хлороформной смесью и 1 мкл из полученной реакционной смеси использовали для дальнейшего проведения ПЦР с добавлением праймеров. Данную реакцию проводили при аналогичном составе реакционной смеси. В каждом случае добавляли форвард праймер одного промотора и реверс праймер другого промотора. Например, для смеси 35SF+CERVR, добавляли форвард праймер 35S промотора и реверс праймер промотора ВКГГ.

ПЦР проводили по схеме: начальная денатурация 95^{0}С– 2 минуты; затем 30 циклов: 94^{0}С – 40 секунд, 55^{0}С – 40 секунд, 72^{0}С – 1 минута; затем дополнительная элонгация при 72^{0}С в течение 10 минут. После проведения аналитического гель-электрофореза, ПЦР в препаративных количествах (не менее 120 мкл амплификата), фенольно-хлороформной депротеинизации, промывки 70% спиртом, осуществляли клонирование амплифицированных продуктов в специально приготовленные Т-навешенные фагмидные векторы pKRX и pBluescript. Наиболее интересные клоны отбирались после анализа нуклеотидной последовательности, полученной после автоматического секвенирования.

4.19. Выделение тотального белка из растений

Листья трансгенного табака, с устойчивой экспрессией гена *GUS*, растирали в ступке с жидким азотом. Помещали полученный образец в пробирку и добавляли экстрагирующий буфер, следующего состава: 50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7-8; 10 мМ ЭДТА, 10мМ β-меркаптоэтанол, 0,1% SDS, 0,1% Тритон X-100. Перемешивали и центрифугировали на микроцентрифуге MiniSpin Plus фирмы Eppendorf при 14.5 об/мин, 5 минут. Полученный экстракт использовали для флюориметрического определения активности гена *GUS*.

4.20. Флюориметрическое определение активности GUS в клеточных экстрактах

Флюориметрическое определение активности GUS в клеточных экстрактах проводили по методу описанному (Jefferson, 1987), с модификациями (Зверева, Романов 2000). Для анализа брали либо свежие листья, либо замороженные и хранящиеся при -70^{0}С. Определяли концентрацию белка в приготовленном клеточном экстракте по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). В заранее приготовленные микропробирки, содержащие по 200 мкл раствора субстрата (1мМ 4-MUG в GUS-экстракционном буфере) и прогретые до 37^{0}С, добавляли по 20 мкл белкового экстракта (в двухкратной повторности) и быстро перемешивали с помощью встряхивателя для пробирок. Сразу после смешивания к одной из

проб добавляли 0,8 мл стоп-раствора (0.2 М Na_2CO_3), которая служила нулевой точкой для определения собственной флюоресценции экстракта. Остальные пробирки инкубировали в течение 1 часа, после чего останавливали реакцию добавлением 0,8 мл стоп-раствора. Содержание 4-MU в полученных растворах определяли с помощью спектрофлуориметра LS55 фирмы PerkinElmer (США). Заранее строили калибровочную кривую, с растворами 4-MU различной концентрации. Полученные результаты пересчитывали на 1 мг белка. Калибровочный раствор готовили следующим образом: 8,8 мг 4-MU растворяли в 5 мл диметилсульфоксида и разводили 1:100 в ДМСО и далее 1:200 в стоп-растворе.

4.21. Подготовка компетентных клеток *E. coli*

Для приготовления компетентных клеток 1 мл ночной культуры *E. coli* определенного штамма вносили в колбу на 500 мл со 100 мл LB (содержащей для штамма XL1-Blue 12,5 мкг/мл тетрациклина) и наращивали клетки до концентрации OD_{550}=0,3 при 37^{o}C, при интенсивной аэрации на орбитальном встряхивателе УВМТ 12-250. Затем собирали клетки центрифугированием в стерильных центрифужных стаканах в центрифуге К-23 при 3000 об/мин в течение 10 мин. Удаляли супернатант и осторожно суспендировали клетки в 25 мл холодного (4^{o}C) буфера I (10 мМ $CaCl_2$, 50 мМ $MnCl_2$, 100 мМ KCl, 30мМ ацетат калия, pH5,8). Повторно проводили центрифугирование при 2500 об/мин, 10 мин. Удаляли супернатант как можно более полно и мягко суспендировали клетки в 5 мл холодного буфера II (75 мМ $CaCl_2$, 10 мМ KCl, 15%-ный глицерин, 10 мМ MOPS, pH6,5). Оба буфера стерилизовали автоклавированием. Суспензию компетентных клеток расфасовывали по 200 мкл в предварительно охлажденные стерильные полипропиленовые микропробирки и замораживали при -70^{o}C. Следует отметить, что все вышеперечисленные операции выполнялись на льду в стерильных условиях в ламинарном боксе горизонтального типа (Flow, Шотландия).

4.22. Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* рекомбинантной ДНК проводили по методу Коэн (Cohen et al., 1972). К 200 мкл только что размороженной на льду суспензии компетентных клеток, приготовленных и хранящихся как описано в разделе 4.21, добавляли 10 мкл лигазной смеси и инкубировали 1 час на льду. Подвергнув клетки тепловому шоку при 42^{o}C в течение 2 мин инкубировали их еще один час при 37^{o}C, предварительно разбавив в 10 раз свежей средой LB. После инкубации суспензию клеток кратковременно осаждали в микроцентрифуге и осадок суспендировали в 100 мкл среды LB. Затем эту суспензию равномерно распределяли стерильным стеклянным шпателем по поверхности 1,5%-го агара, приготовленного на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) (и тетрациклином для штамма XL1-Blue), разлитого в чашки Петри. Жидкости давали возможность впитаться и чашки Петри помещали в перевернутом виде в термостат (37^{o}C) на 18 час. При использовании векторов с маркером в виде гена β-галактозидазы, по поверхности агаризованной среды предварительно растирали 50 мкл X-gal (20 мг/мл в диметилформамиде) и 80 мкл раствора изопропилтио-β-D-галактопиранозида (IPTG, 24 мг/мл).

4.23. Подготовка электрокомпетентных клеток *A. tumefaciens*

Электрокомпетентные клетки *Agrobacterium tumefaciens* готовили по методу Lin (1995). В течение 1-1,5 суток выращивали культуру *A. tumefaciens* в среде YM (0,4 г дрожжевого экстракта, 10 г маннитола, 0,1 г NaCl, 0,1 г $MgSO_4$ 0,5 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ на 1 л дистиллированной воды). Клетки наращивали при температуре 28-30^{o}C, при 200 об/мин, приблизительно до концентрации клеток 5-10x10^{7} на 1 мл. Далее, также используя пластиковые центрифужные пробирки на 50 мл, собирали клетки центрифугированием, сливали супернатант, суспендировали 10%-ным глицерином и центрифугировали, повторив эту процедуру 4 раза (добавляли вначале 50 мл, 30 мл, 20 мл и в последний раз по 10 мл 10%-го охлажденного глицерина). После этих процедур полученные клетки суспендировали в стерильном охлажденном 1 М сорбитоле. Сорбитол добавляли

от 500 мкл до 1 мл, в зависимости от количества выросших клеток. Клетки расфасовывали по стерильным, охлажденным микропробиркам по 40 мкл в каждую и сразу замораживали. Электрокомпетентные клетки *A. tumefaciens* также хранили в морозильнике при температуре -70°С не более шести месяцев.

4.24. Электропорация компетентных клеток *A. tumefaciens*

Электропорацию компетентных клеток проводили при помощи электропоратора фирмы “Bio-Rad” модели Micropulser, при этом чаще использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 0,1 см. При использовании для трансформации лигазной смеси, ее вначале очищали от содержащихся в ней солей при помощи нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 22-40 мкм. Для этого небольшой кусочек мембраны помещали на поверхность деионизированной воды Milli-Q гладкой стороной вверх. На поверхность наслаивали лигазную смесь объемом 10-20 мкл и проводили диализ в течение 20-30 мин. После проведенного таким образом диализа, лигазная смесь концентрировалась, и объем ее уменьшался до 3-5 мкл. При использовании для трансформации плазмид, выделенных методом мягкого лизиса, проводили его дополнительную очистку смесью фенол-хлороформ и несколько раз переосаждали ДНК и каждый раз проводили промывку 70%-ным спиртом, для уменьшения концентрации солей, которые могут вызвать электрическую дугу в электропорационной кювете.

Для электропорации *A. tumefaciens* чаще при наращивании клеток использовали среду LB, с повышенным содержанием питательных веществ (1,5% бактотриптона, 1% дрожжевого экстракта, 1% NaCl). Клетки *A. tumefaciens* после электропорации помещали в стерильный эппендорф и выдерживали при 28°С, в течение 3-4 часов, при постоянном перемешивании. Затем, клетки осаждали и суспендировали в 100 мкл среды и растирали на чашке Петри с агаризованной средой TY (1,5% бакто-агара, 0,2% дрожжевого экстракта, 1% бактотриптона и 0,1% $CaCl_2$) с добавлением соответствующего селективного антибиотика. Чашки Петри с трансформированными клетками *A. tumefaciens* держали в течение 1-2

суток, в зависимости от клонируемого вектора и селективного антибиотика, пока не вырастут отдельные клоны, которые затем пересевали и проводили ПЦР-анализ для поиска трансформированных клеток.

4.25. Приготовление протопластов из листьев табака *N. tabacum*

Протопласты табака были получены из листьев растений *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1, 2-х месячного возраста. Отбирали полностью сформировавшиеся листья и вырезали центральные жилки. Затем промывали листья 70%-ным спиртом для лучшей смачиваемости и далее проводили стерилизацию 10%-ным раствором белизны с небольшим добавлением Tween 20. После тщательной промывки листьев стерильной дистиллированной водой (до 5-ти раз), помещали кусочки листьев на большие стерильные чашки Петри и мелко нарезали эти листья стерильным скальпелем или лезвием бритвы. Все кусочки листьев затем помещали на более мелкие чашки Петри нижней стороной вверх. Затем добавляли 5 мл CPW13M (KH_2PO_4 – 27.2 мг/мл, KNO_3 – 101 мг/мл, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ – 246 мг/мл, KI – 0.16 мг/мл, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.025 мг/мл, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 1480 мг/мл, 13% маннитола) и смесь ферментов 0,2% целлюлазы и 0,1% мацерозима. После инкубации при 25^0C в темноте, встряхивали чашки Петри с кусочками листьев, для высвобождения протопластов. Полученную суспензию пропускали через сито с размером пор 64 мкм, чтобы удалить крупные агрегаты дебриса. Переносили суспензию протопластов в центрифужные пробирки, с завинчивающимися крышками и центрифугировали 10 мин при 400 об/мин на центрифуге типа LSZ–49 (Венгрия). Получившийся осадок протопластов ресуспендировали в CPW13M и переосаждали центрифугированием при 400 об/мин (5 мин). Для очистки протопластов от разрушенных клеток, суспендировали их в среде CPW21S (CPW с добавлением 21% сахарозы) и центрифугировали при 400 об/мин в течение 10 мин. При таком флотировании, интактные протопласты формируют компактную зону на поверхности среды CPW21S, тогда как более плотные разрушенные протопласты и дебрис осаждаются. После этих этапов очистки, протопласты ресуспендировали в 5 мл

среды MSP1 9M ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 440 мг/мл, KNO_3 – 1900 мг/мл, KI – 0,83 мг/мл, KH_2PO_4 – 170 мг/мл, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 370 мг/мл, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,025 мг/мл, NH_4NO_3 – 1650 мг/мл, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.025 мг/мл, H_3BO_3 – 6.2 мг/мл, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0.25 мг/мл, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 22.3 мг/мл, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 8.6 мг/мл, НУК – 2 мг/мл, 6-БАП – 0,5 мг/мл, маннитол – 9%) и подсчитывали число жизнеспособных протопластов с помощью гемоцитометра.

4.26. Трансформация протопластов табака методом химически индуцированного эндоцитоза

Протопласты трансформировали методом опосредованного полиэтиленгликолем (ПЭГ 4000) эндоцитоза плазмидной ДНК, затем проводили анализ транзиентной экспрессии (Lyznik et al., 1989; Locatelli et al., 2003).

Для каждого эксперимента использовали количество протопластов от 10^5 до 10^6 на 1 мл. Суспензию протопластов в MSP1 9M центрифугировали 10 мин при 400 об/мин. Осадок суспендировали в среде PTN (0.4M маннитол, 15мМ $CaCl_2 \cdot 2H_20$, pH 5,6) и добавляли плазмидную ДНК в количестве от 10 до 100 мкг на 10^6 протопластов. Затем в эту суспензию добавляли равный объем 40% раствора ПЭГ 4000 (100мМ $Ca(NO_3)_2$, 400мМ маннитол, pH 8,5) и перемешивали. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа, разводили инкубационную смесь, медленно добавляя MSP1 9M и затем осаждали протопласты (400 об/мин, 10 мин). Ресуспендировали протопласты в 1 мл MSP1 9M и оставляли при комнатной температуре на 35-40 часов. Транзиентную экспрессию гена *GUS* проверяли при помощи хромогенного субстрата x-gluc, которая при взаимодействии с продуктом данного репортерного гена дает синее окрашивание. При проверке транзиентной экспрессии GUS, добавляли к 50 мкл суспензии протопластов около 50 мкл раствора x-gluc и инкубировали при 37^0C 24 часа. Поиск трансформированных протопластов осуществляли при помощи светового микроскопа. Транзиентную экспрессию гена *GFP* проверяли с помощью светового микроскопа, оснащенного ультрафиолетовой лампой.

4.27. Агробактериальная трансформация листовых дисков табака

Трансгенные формы табака получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Horsch et al., 1985**).** Для этого были использованы листья растений *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 2-3-х месячного возраста. Брали наиболее плоские листья от крепкого здорового растения, росшего в хороших условиях освещения, температуры и полива, а также хорошо политого за сутки до проведения опыта. Вначале листья освобождали от крупных жилок, нарезая на куски. Далее, поместив их в стерильный сосуд, промывали стерильной дистиллированной водой, затем добавляли 70%-ный этанол, полностью покрывая материал. Аккуратно перемешивали в течение 15 секунд, после чего сливали спирт и в сосуд наливали 10% раствор хлорного отбеливателя "Белизна" с одной каплей Tween 20. Следили, чтобы раствор также полностью покрывал кусочки листьев. Стерилизацию проводили в течение 10 минут при осторожном периодическом перемешивании и покачивании. Затем сливали стерилизующий раствор и промывали кусочки листьев 5 раз стерильной дистиллированной водой. Далее переносили листья в стерильные чашки Петри, обрезали побелевшие края и стерильным скальпелем нарезали отдельные экспланты размером приблизительно 0,5 х 0,5 см без крупных жилок. Готовые экспланты переносили на регенерационные чашки, содержащие по 20-25 мл полутвердой регенерационной среды МС (состав на 1 литр - соли МС 4,6 г/л, 0,2% витаминов Гамборга, 100 мг/л инозитола, 3% сахарозы, 0,6 - 0,8% агара, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, pH 5,6-5,8). Экспланты ориентировали нижней стороной листа вверх. Чашки герметизировали парафильмом и ставили на предварительную инкубацию на слабый свет на 24 часа при температуре 25°С.

В тот же день ставили наращиваться культуру *A. tumefaciens* штамма AGL0, трансформированную бинарным вектором из семейства pCambia. В стерильную колбу на 100 мл наливали 10 мл жидкой среды LB с 100 мкг/мл рифампицина и 100 мкг/мл канамицина или 100 мкг/мл хлорамфеникола (при использовании pCambia 1291Z и pCambia 1281Z) и петлей переносили крупную колонию агробактерий из чашки в колбу. Ставили на орбитальный шейкер при 28-30°С и

150-200 об/мин на ночь. Бактериальную суспензию центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин, сливали супернатант и ресуспендировали клетки в жидкой среде МС ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 440 мг/мл, KNO_3 – 1900 мг/мл, KI – 0,83 мг/мл, KH_2PO_4 – 170 мг/мл, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 370 мг/мл, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,025 мг/мл, NH_4NO_3 – 1650 мг/мл, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.025 мг/мл, H_3BO_3 – 6.2 мг/мл, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0.25 мг/мл, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 22.3 мг/мл, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 8.6 мг/мл) с добавлениями витаминов Гамборга и 3% сахарозы (Murashige et al., 1962). Обычная концентрация бактерий после наращивания в течение ночи составляет 1-3 х 10^9 кл/мл. После этого центрифугировали суспензию агробактерий при 3000 об/мин в течение 10 минут. Сливали жидкость, а агробактерии ресуспендировали в 10 мл стерильной среды МС без агара. Затем наливали в пустую стерильную чашку 10 мл жидкой среды МС, переносили в нее холодным стерильным пинцетом экспланты с регенерационных чашек так, чтобы они плавали в среде так же, как и лежали на чашке, то есть нижней стороной листа вверх, но при этом не тонули и не намокали. Добавляли в чашку около 200 мкл суспензии агробактерий. Осторожно перемешивали и инокулировали в течение 10-15 минут с осторожным периодическим покачиванием, стараясь, чтобы на верхнюю поверхность эксплантов инокулюм не попадал. Далее брали новую пустую стерильную чашку и помещали в нее 2 кружка стерильной фильтровальной бумаги. Экспланты по очереди вынимали из инокуляционной среды обожженным и охлажденным стерильным пинцетом, промокали на фильтровальной бумаге и тут же выкладывали на те же самые регенерационные чашки верхней стороной листа в контакте со средой. Часть эксплантов не инокулировали и переносили просто на регенерационную среду для контроля регенерации. Закрыв чашки, заклеивали их парафильмом и ставили на слабый свет при температуре 23-25^{o}C на совместное культивирование в течение 2-4 суток.

Вначале экспланты переносили с регенерационных чашек обожженным стерильным холодным пинцетом в чашку с 10 мл жидкой средой МС, содержащей 250-400 мкг/мл клафорана и 50 мг/л канамицина или 12-15 мг/л гигромицина, в зависимости от селективного маркера. Осторожно покачивая, перемешивали в

течение нескольких минут, стараясь смыть капли агробактерий, если они уже появились. Затем, взяв новую пустую стерильную чашку, помещали в нее кружок стерильной фильтровальной бумаги. Отмытые экспланты по очереди вынимали стерильным пинцетом из отмывочной среды, и, быстро промокнув об фильтровальную бумагу, раскладывали (верхней стороной листа в контакте со средой) на селекционные чашки, плотно прижимая их к среде. Чашки запечатывали парафильмом и ставили в климатокамеру (температура инкубации - 23-25^{o}C, фотопериод 16/8 часов). В дальнейшем тщательно следили за чашками, чтобы они не зарастали агробактериями, при необходимости экспланты промывали раствором антибиотиков (использовали клафоран и карбенициллин) и переносили на свежую регенерационную среду.

На 3-4 сутки проверяли эффективность трансформации, путем детекции транзиентной экспрессии гена *GUS* с помощью x-gluc, при этом по краям листьев появлялись синие точки, которые были видны под бинокуляром. На каждом этапе эксперимента трансформанты выявляли по активности репортерного гена *GUS*. Через 3-4 недели в опытных чашках появлялись трансформированные каллусы, затем из них начинали расти проростки-регенераты. Субкультивацию проводили один раз в неделю, использовали агаризованные среды МС (0,6-0,8% агара). Энергично растущие и здоровые трансформанты высотой 3-5 см, переносили на среду для укоренения (соли МС, витамины Гамборга, 3% сахароза, 0,1 мг/л ИУК, 50 мкг/мл канамицина и 200-250 мкг/мл клафорана). Через 3-4 недели, лучшие варианты укоренившихся и не заросших агробактериями трансформантов высотой не менее 5 см, переносили в почву для акклиматизации. Полученные трансгенные растения проверяли на активность GUS, выделяли ДНК и проводили ПЦР анализ на наличие целевого гена.

4.28. Анализ β-глюкуронидазной активности

Гистохимический анализ активности GUS проводили по методу, описанному Jefferson (Jefferson, 1987). Растительный материал инкубировали в x-

gluc реактиве, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуронид, 0.5% тритон X-100, 100 мМ Na_2ЭДТА, 20% метанола, 0.5 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 мМ $K_4Fe(CN)_6$ и 50 мМ натриевый фосфатный буфер (pH 7.0). Растительные ткани инкубировали при 37°C в течение ночи, отбеливали в 70% этиловом спирте, выдерживали в 50% растворе глицерина в воде и микроскопировали.

4.29. Стерилизация семян трансгенных растений табака

Семена трансгенных растений табака с целевыми генами сеяли в чашки Петри со средой МС. Для этого семена промывали 1 минуту 70% этанолом в стерильной микропробирке, а затем 8 минут стерилизовывали 15% белизной с добавлением Tween 20 и 5 раз промывали стерильной водой Milli-Q.

Стерилизованные семена выращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия) с фотопериодом 16 часов день / 8 часов ночь. Через три недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии, характеризующиеся расщеплением 3:1. Устойчивые растения акклиматизировали к условиям почвы (пересаживали на универсальный грунт «Terra vita», Россия).

4.30. Морфологический анализ трансгенных растений табака

Для контроля наследования целевых генов и определения количества их вставок, часть T_1 семян каждой полученной линии проращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через три недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Отбор сеянцев, не дающих расщепление на селективной среде, в данной работе не проводили из-за большой длительности вегетационного периода у табака продолжительностью до пяти месяцев, то есть для морфологического анализа использовались как гомозиготные, так и гетерозиготные растения второго

поколения. Далее устойчивые к селективному агенту проростки табака пересаживали на почву, держали сутки в темноте и переносили в теплицу. Контрольные и опытные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом (“Terra vita”, Россия) в условиях теплицы при температуре 27°С с освещенностью около 140 ммоль на кв. м в сек и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). Наблюдение за растениями поколения T_1 осуществляли начиная от стадии акклиматизации к условиям почвы до получения семян, что занимало 4-5 месяцев. При изучении трансгенных растений в качестве контрольных использовали нетрансгенные растения табака сорта Petit Havana линии SR1, выращенные на среде МС без добавления антибиотиков и акклиматизированные к условиям почвы (SR1). Также для контроля использовали трансгенные растения, содержащие Т-ДНК бинарных векторов pCambia без целевого гена. При анализе трансгенных растений с индуцибельной системой экспрессии в качестве контроля и опыта использовали одни и те же линии растений, однако в первом случае их не обрабатывали индуктором, а лишь раствором, использованным для разведения эстрадиола (см. раздел 4.31). Определение длины и площади листьев производили в период цветения. При морфологическом анализе трансгенных растений для каждой линии исследовали по пять растений, у которых измеряли три нижних листа в длину (первый, второй и третий настоящие листья), начиная от начала листовой пластины, по центральной жилке до самого кончика листа. Длину стебля определяли в период цветения, у каждого растения также измеряли длину пяти цветков, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика, и вычисляли средние значения. Через пять дней после начала плодоношения для каждого растения измеряли длину трех семенных коробочек и вычисляли средние значения. Для определения средней площади клеток нижнего эпидермиса листьев и наружного эпидермиса венчика цветков при помощи пинцета со средней части трех нижних листьев и средней части трех венчиков цветков отбирали слой эпидермиса площадью около 0,5-1 $см^2$, располагали его на предметном стекле, добавляли дистиллированную воду и накрывали покровным стеклом. Каждый

препарат фотографировали в 20-ти различных участках, для каждого растения готовили по шесть препаратов, в итоге для каждой линии трансгенных растений измеряли обычно площади не менее 200 клеток. Измерения проводили при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения. Для статистической обработки результатов использовали программы Statistica 6.0 и MS Excel 2003. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни (см. раздел 4.41).

4.31. Экзогенная обработка трансгенных растений табака эстрадиолом

Опытные трансгенные растения содержащие Т-ДНК вектора pER8 и целевой ген обрабатывали 5 мкМ раствором β-эстрадиола (Sigma, США). Для этого готовили 5 мМ раствор эстрадиола в ДМСО, который хранили при -20°С, данный раствор перед использованием разбавляли в 1000 раз в дистиллированной воде и использовали для опрыскивания листьев и цветков. Для лучшей смачиваемости в раствор для опрыскивания добавляли сильвет до 0,05%. В эксперименте по каждой линии трансгенных растений было использовано по шесть растений, из них три опытных обрабатывались 5 мкМ раствором эстрадиола и три контрольных 5 мкМ раствором ДМСО. Обработку эстрадиолом проводили по следующей схеме: трансгенные растения проращивали на селективной среде МС, адаптировали к выращиванию в почве в условиях теплицы и через 30 и 34 дня после пересадки в грунт опрыскивали их листья 5 мкМ раствором эстрадиола. Потом дважды, на 40-й и 44-й дни повторно обрабатывали листья 5 мкМ раствором эстрадиола и через три часа после последней обработки из второго листа контрольных и опытных растений выделяли РНК и проводили полуколичественную ОТ-ПЦР для выяснения наличия или отсутствия экспрессии целевого гена. На следующие сутки третий лист каждого растения отбирали для измерения размеров клеток нижнего эпидермиса. Площадь листа делили на среднюю площадь клеток эпидермиса и определяли приблизительное число

клеток, приходящихся на один лист. Затем полученное число делили на площадь листа, что давало среднее значение количества клеток нижнего эпидермиса на 1 мм^2. После этого за весь период вегетации трансгенные растения дополнительно трижды опрыскивали 5 мкМ раствором эстрадиола (1 раз в неделю). В период цветения эстрадиолом также опрыскивали цветки и через три часа выделяли из них РНК с целью проведения количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

4.32. Экзогенная обработка растений табака фитогормонами

Перед экзогенной обработкой фитогормонами контрольные и опытные растения *N. tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 проращивали на среде МС в течение 20-ти дней в климатической камере Binder (Германия). Затем проростки табака в течение 50-55-ти дней выращивали на универсальном грунте (“Terra vita”, Россия) и на стадии 12-ти листьев опрыскивали раствором фитогормона с добавлением сильвета (до 0,05%) всю надземную часть растения, включая нижние стороны листьев. Расход раствора фитогормона на каждое растение составило по 5 мл. Использовали следующие концентрации фитогормонов: БАП – 50 мкМ, ИУК – 5 мкМ, НУК – 0,5 мкМ, 24-эпибрассинолид (ЭБ) – 1 мкМ, гиббереллловая кислота (ГК3) – 5 мкМ, метилжасмонат – 1 мкМ и АБК – 10 мкМ. Через 2 часа после опрыскивания БАП, ИУК, НУК, ЭБ и ГК3 верхушки побега и листья табака замораживали в жидком азоте и выделяли из них тотальную РНК. Контрольные растения опрыскивали 0,05% раствором сильвета. В случае с МеЖ и АБК время инкубации составило 4 часа.

4.33. Нумерация листьев и построение кДНК для анализа уровня содержания транскриптов исследуемых генов

Тотальную РНК из листьев и цветков (чашелистики, лепестки, тычинки и плодолистики) исследуемых растений выделяли с помощью тризола. Для этого использовали растения табака на стадии 12-ти листьев. Листья при анализе уровня экспрессии нумеровали начиная от верхушки побега, так как все

анализируемые гены экспрессировались, преимущественно, лишь в 5-6 самых молодых листьях. Таким образом, только начинающий формироваться и самый маленький, визуально выявляемый на врехушке побега листок был назван лист №1. Следующие за ним молодые листья получили нумерацию от №2 до №8, где первый из них является наиболее молодым, а последний наиболее старым (см. рис. 27). Листья расположенные ниже №8 на предмет наличия экспрессии целевых генов также исследовались, но было показано, что ни один из них в листьях, прекративших рост (расположенные ниже листка №8) не экспрессируется.

Для выделения тотальной РНК, вначале растительную ткань фиксировали в жидком азоте, растирали ее в ступке до порошкообразного состояния и переносили порошок в охлажденную микропробирку. Затем в эту микропробирку вносили 1 мл охлажденного тризола, быстро перемешивали на вортексе и встряхивали в пенопластовом штативе в течение 10 минут. Далее центрифугировали 10 минут при максимальных оборотах микроцентрифуги, полученный супернатант переносили в новые пробирки. Добавляли 20% хлороформ и встряхивали 5 – 10 минут, затем снова центрифугировали 10 минут. Далее водную фазу переносили в новые пробирки, добавляли равный объем хлороформа, встряхивали 5 – 10 минут и центрифугировали. Процедуру повторяли 2 – 3 раза до полного исчезновения интерфазы. Затем осаждали РНК изопропанолом в течение часа в морозильнике при – 20^0С, центрифугировали 20 минут при максимальных оборотах микроцентрифуги. Осадок промывали в 200 мкл 70%-ого этилового спирта и центрифугировали при 9000 об/мин 10 минут. Промывали и центрифугировали 2 раза. Осадок подсушивали и растворяли в высокоочищенной стерильной воде Milli-Q. Проводили агарозный гель – электрофорез тотальной РНК (Chomczynski et al., 1987).

Для построения кДНК смешивали следующие компоненты в объеме 20 мкл: буфер ревертазы (5х) – 4 мкл, dNTP (2,5мМ) – 6 мкл (не менее 4 мкл), ревертаза – 1 мкл, олиго dT праймер – 2 мкл, РНК – 2 − 3 мкл, вода Milli-Q – до 20 мкл. Реакцию проводили при 40^0С – 42^0С в течение часа, после обратной транскрипции

смесь разбавляли в 2 раза и прогревали 2 мин при 65^0С. Полуколичественную ОТ-ПЦР для определения уровня экспрессии проводили при помощи Taq-полимеразы. После агарозного гель-электрофореза и фотографирования геля уровень флуоресценции ампликонов определяли при помощи компьютерной программы Totallab v.2.01.

4.34. Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение содержания мРНК (после конверсии в кДНК) целевых генов проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). Расчеты производились по $2^{-\Delta\Delta C}{}_T$ методу (Livak, Schmittgen, 2001) используя в качестве стандартов мРНК тубулина или фактора элонгации EF-1α табака, уровень экспрессии которых принимали за 100%. При ОТ-ПЦР рапса и осины в качестве референсных генов были использованы гены, кодирующие актины соответствующих растений (AF111812; EF418792). Для ОТ-ПЦР табака в качестве референсного гена чаще всего использовали ген EF-1α, так как из литературных данных следовало, что его уровень экспрессии меньше всего подвержен влиянию внешних условий (Schmidt, Delaney, 2010). Реакцию амплификации проводили в 0,2 мл пробирках (AXYGEN, Inc., США) в объеме 25 мкл, используя стандартный набор (Синтол, Россия) в следующем режиме:

предварительная денатурация матрицы/активация фермента -5 мин; затем 35 циклов, включающих в себя стадии денатурации -10 сек при 95°С, гибридизации - 30 сек 53°С, элонгации - 40 сек при 72°С.

4.35. Определение концентрации цитокининов, ИУК и АБК

Количественную оценку свободных форм фитогормонов в одних и тех листьях проводили методом иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител против зеатин рибозида, ИУК и АБК и антикроличьих антител, меченых пероксидазой (Shakirova et al., 2004). Для этого навески пятых

от верхушки побега листьев (листья №5) 60-дневных растений табака массой 1,5 г растирали в жидком азоте, и фитогормоны экстрагировали 80% этанолом 16 ч при 4°С. После центрифугирования в течение 10 мин при 18 000 g супернатант упаривали в токе воздуха до водного остатка, в аликвоте которого определяли суммарное содержание цитокининов, иммунореактивных к антизеатинрибозидной сыворотке. Из оставшегося водного остатка ИУК и АБК экстрагировали серным эфиром, метилировали их диазометаном и после упаривания сухой остаток растворяли в 80% этаноле, в аликвоте которого определяли концентрацию ИУК и АБК. Последовательные ступени иммуноанализа фитогормонов детально описаны ранее (Shakirova et al., 2004).

4.36. Гистологический анализ тканей трансгенных растений

Для гистологического анализа использовались листья №5 и №6, а также верхушки побегов. Ткани фиксировали в течение 24 ч в 4% параформальдегиде (Riedel deHaen, Germany) и 0,1% глутаровом альдегиде (Sigma, Германия) в фосфатном буфере. Образцы промывали в течение 1 ч с фосфатным буфером и обезвоживали с использованием серийных разведений этанола (20, 20, 50, 70, 80 и 96%), причем в каждом разведении этанола ткани выдерживали в течение 30 мин. Далее образцы выдерживали в полиметилметакрилате GB4. Гистологические срезы размером 1,5 мкм изготавливали при помощи микротома (HM 325, MICROM Laborgerate, Germany). Препараты были визуализированы под световым микроскопом Axio Imager A1 (Carl Zeiss Jena, Germany), оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Jena, Germany).

4.37. Определение плоидности трансгенных растений

Для определения возможного влияния повышенной экспрессии генов экспансинов на плоидность трансгенных растений использовали метод подсчета числа хлоропластов в устьичных клетках (Малецкий и др., 2013, Монахос и др., 2014). Для этого готовили препараты нижнего эпидермиса листьев трансгенных растений табака и под 200-кратным увеличением микроскопа подсчитывали

количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. В результате было показано, что в среднем одна замыкающая клетка устьиц содержит от 14 до 20 хлоропластов, что, вероятнее всего, свидетельствует о диплоидности опытных растений. Существенное увеличение числа хлоропластов, обычно говорит об увеличении плоидности у опытных растений (Малецкий и др., 2013).

4.38. Получение трансгенных растений рапса методом погружения цветков (floral dip)

Трансгенные растения рапса получали методом погружения цветков (floral dip) (Clough, Bent, 1998). Рапс высаживали в теплице во вторую неделю мая. Трансформацию начинали проводить с момента начала бутонизации (середина июля) до начала августа. Для трансформации рапса использовали суспензию агробактерий с добавлением 15 мкл/л 5мМ раствора ацетосирингона, 0,1% сильвета, 0,2 мкл БАП (0,5 мг/л) и сахарозы 30 г/л. Соцветия рапса погружались в 50 мл ёмкость с агробактериальной суспензией на 1-2 минуты, затем оборачивались полиэтиленовой плёнкой на сутки для обеспечения более оптимальных для проникновения агробактерий условий. После созревания осуществлялся ручной сбор семян с каждого растения отдельно. Первичный отбор трансгенных проростков осуществлялся путём обработки семян селективным антибиотиком гигромицином. Для этого семена замачивались в растворе гигромицина (100-150 мг/л) в течение 1-2 суток. Затем семена, не промывая водой, высживали на увлажненный грунт. Всхожесть семян составляла в среднем 80%. Различия в цвете листьев наблюдались через месяц после появления всходов. В итоге успешность трансформации в целом составила до 10% (количество зеленых проростков). Проростки пересаживали в грунт на огороженном земельном участке, а также в пятилитровые ёмкости с грунтом для выращивания в лабораторных условиях. Для подтверждения трансгенности рапса проводили ПЦР-анализ, у трансгенных растений отбирали семена, снова подвергали их селекции гигромицином и выжившие и не побелевшие растения

пересаживали на грунт и выращивали до стадии цветения, когда проводили их морфологический анализ.

4.39. Получение трансгенных растений осины при помощи *Argobacterium rhizogenes* с использованием игольчатых кристаллов карбида кремния

Культуры *in vitro* осины были получены из молодых весенних стеблей осины и выращивались на среде WPM с 2% гельритом без добавления фитогормонов. Для проведения агробактериальной трансформации, части стеблей осины с удаленными листьями с одной почкой предварительно культивировали двое суток на среде для каллусообразования (среда МС с MES и агаром, с добавлением 2 мг/л НУК и 1 мг/л 2-изопентиладенина). Культуру *A. rhizogenes* штаммов А4 и 15834 центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл среды MinA, добавляли раствор ацетосирингона до концентрации 50 мкМ и ставили на орбитальный шейкер качаться при 28°С на 1 час. Затем смешивали подготовленные экспланты с агробактериями и добавляли заранее подготовленную суспензию карбида кремния (до 1%). Полученную смесь встряхивали на вортексе и проводили дальнейшую инокуляцию в течение 30-ти минут на чашке со средой MinA. Затем подсушивали экспланты на фильтровальной бумаге и ставили их на совместное культивирование с агробактериями на среде для каллуссобразования. После трех суток экспланты переносили на среду МС с 3% сахарозой, агаром с добавлением 250 мг/л цефотаксима и 250 мг/л карбенициллина и культивировали их в темноте при 25°С в течение 1,5 месяцев. Полученные в ходе эксперимента косматые корни осины проверяли на наличие экспрессии репортерного гена *GUS*. Окрашивающиеся в синий цвет корни отбирали и пересаживали на новую среду МС и культивировали их в климатической камере Binder (Германия) при 25°С. Через 2,5 месяца на культуре косматых корней спонтанно начинали появляться побеги. Гистохимический анализ показал наличие экспрессии в этих побегах репортерного гена *GUS*. Далее побеги укореняли на среде МС и проводили

акклиматизацию трансгенных растений к условиям почвы. Морфологический анализ трансгенных растений осины проводили через 4 месяца выращивания на почве в сосудах объемом 450 мл.

4.40. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы DNASTAR, Inc. (США) с использованием IBM−совместимых персональных компьютеров. Поиск потенциальных трансмембранных доменов в исследуемых молекулах белков проводили при помощи программы DAS (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS). Анализ аминокислотных последовательностей предсказанных белковых молекул проводили при помощи программ сервера I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER), которые позволяют определить предполагаемую вторичную структуру белка (Roy et al., 2010). Поиск цис-регуляторных областей промоторов осуществляли при помощи базы данных AtcisDB (http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB). Нуклеотидные последовательности исследуемых генов были взяты из базы данных GenBank, доступной на сайте www.ncbi.nlm.nih.gov.

4.41. Статистическая обработка полученных результатов

Для оценки морфометрических различий между выборками контрольной и опытной групп растений, а также разницы в уровнях экспрессии между разными частями растения или в ответ на внешнее воздействие, использовали U-критерий Манна – Уитни:

$$U=n_1*n_2+n_x*(n_x+1)*2-T_x, \text{ где}$$

$n1$ – количество элементов в первой выборке;

$n2$ – количество элементов во второй выборке;

T_x – большая из двух ранговых сумм;

n_x – количество элементов в группе с большей ранговой суммой.

Полученное эмпирическое значение сравнивали с критическим значением U-

критерия по таблице критических значений U-критерия Манна – Уитни. Если полученное значение *U* меньше табличного или равно ему, то признается наличие существенного различия между уровнем признака в рассматриваемых выборках. Достоверность различий тем выше, чем меньше значение *U*.

Глава 5. Реактивы и материалы

5.1. Бактериальные штаммы для молекулярно-биологических манипуляций, плазмидные и фагмидные векторы

В работе использованы бактерии *E. coli* штаммов XL1-Blue, XL10-Gold, *A. tumefaciens* штаммов AGL0, LBA4404, *A. rhizogenes* штаммов ATCC 15834, A4. Из плазмид использовали pGEM3Zf(+), pGEM3Zf(-), pGEM5Zf(+), pGEM5Zf(-), pBluescript IIKS, pRT103, pJM166, Т-векторы pKRX, pGEMTeasy, pAL-TA, бинарные векторы семейства pCambia (CAMBIA, Австралия), pER8 с индуцибельной транскрипционной системой XVE (Zuo et al., 2000).

5.2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при проведении ПЦР, ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

Таблица 1. Список олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Назначение праймера	Форвард праймер	Реверс праймер
Амплификация 35S промотора из вектора pCambia 1301	35SCambF AGAGGACCTAACAGAACTCG	35SCambR CGTGTTCTCTCCAAATGAAA
Амплификация промотора ВМГ из *Dahlia pinnata*	DMVF ATCAACGGAGAAACAAAGAT	DMVR ATGGGTTACTACTCACACAT
Амплификация промотора ВКГГ размером 651 пн из	651F ATTAAAAGAACAATGGCAAG	501R AGGACTTAGGCTCAACACAT

Dianthus sp.		
Амплификация промотора ВКГГ размером 501 пн из *Dianthus sp.*	501F AGAAGATTTAATGGCAATCC	501R AGGACTTAGGCTCAACACAT
Амплификация промотора ВКГГ размером 371 пн из *Dianthus sp.*	371F TTTTCGATGCCTTAACAATG	371R TTTTCGATGCCTTAACAATG
Амплификация промотора хальконсинтазы chsA *Petunia x hybrida*	chsAF TTCCTGTTCAAAGCTGATGC	chsAR CGATTTTTGCTTGAAAAAAG
Амплификация гена *ARGOS A. thaliana*	ArgF TTGTCTTCCTCATTTCCCTAC	ArgR ATCATCATATAATAAATTTCAGAT
Амплификация гена *ARGOS-LIKE A. thaliana*	ARLF: CTTCTTTAAATGATTCGTGAG	ARLR: TTATTACATAAAAGTGGAAG
ПЦР-анализ трансгенных растений, содержащих ген *ARGOS-LIKE A. thaliana*	ARLPCRF TTCGTGAGTTCTCCAGTCTACAAA	ARLPCRR GAACCATAAGCAAAACCATAATCC

Амплификация гена *PnARGOS-LIKE Populus nigra*	PnARGF CAGAGTTGTTGAATGG ATGTGAG	PnARGR ACAGGTGCATAAGTTTTC TTGA
ОТ-ПЦР гена *ARGOS-LIKE* тополя черного и осины	PnARGRTF: TGGATGTGAGAGCAAG AAAGA	PnARGRTR: GTAGCAGAAGTAACATGA AAGGTG
Амплификация консреативного участка гена *ARGOS A. thaliana*	AtARGiF CGGCGAATTATTTCAGT TTAGAG	AtARGiR GAGAAGAAGGCATGAAG GCAAGAA
Поиск клонов бактерий, содержащих ген *ARGOS* в смысловой ориентации в векторе pCambia 2301	DMVF ATCAACGGAGAAACAA AGAT	polyAR GCATGCCTGCAGGTCACT GG
Амплификация гена *ANT A. thaliana*	ANTF ACAATGGAGTCTTTTTG TGATAATG	ANTR ACATCAAGAATCAGCCCA AGCAG
ОТ-ПЦР гена *ANT A. thaliana* и *B. napus*.	GTTTCTCTAGGGGTGCT TCCATCT	AGCGGTTTCCTCGTCGTTA TTGT
Амплификация гена *NtANTL Nicotiana tabacum*	ANTabF: AACAATGAAGATGAAG TCTATGAATG	ANTabR: TCATGCATCATTCAAAGC AGCAAAGAC

ОТ-ПЦР гена *NtANTL Nicotiana tabacum*	NtANTRTF: ACATCATCAGTTCAATAATCAGAGC	NtANTRTR: CATAATGCCCCCAACTTTTC
Амплификация гена *BnaX.ANT.b* рапса	ANTRapF ATGGAGTCTTTTTGTGATAATG	ANTRapR TCAAGAATCAGCCCAAGCAG
Амплификация гена *PnANTL1* тополя черного	PnANTL1F: ACAATGAAAATGGAGGTTGCTTCT	PnANTL1R: GGTATCATTCCATGCAGCAAAAAC
ОТ-ПЦР гена *PnANTL1* тополя черного	PnANTLRT1F ATGGAAGATGGCAAGCAAGGATAGG	PnANTLRT1R TTGCACTGCCACTGAGAAAGAGGT
Амплификация гена *PnANTL2* тополя черного	PnANTL2F: ACAATGAAGTCCATGAACAATG	PnANTL2R: GGCATCTGTCCAAGCAGCAAAAAC
ОТ-ПЦР гена *PnANTL2* тополя черного	PnANTLRT2F GCCTCAAATGCTGTGGATAAT	PnANTLRT2R AGCAAAAACTGGCGTGTGA
Амплификация консервативного участка гена *ANT* Reg1	ANTReg1F: TGTTCATAGGAAATCTATTGATAC	ANTReg1R: TTGCCTTCCTTTTCTACTCTGACC
Амплификация консервативного участка гена *ANT* Reg2	ANTReg2F: GAGAATTATCAGAAAGAGATTG	ANTReg2R: GTTACTCCTCTATAGATTGAAG

Амплификация участка гена *ANT* размером 314 пн	ANTRapF ATGGAGTCTTTTTGTGATAATG	ANTantiR GAGTGAGAAGATCTGTTGAG
Амплификация и ОТ-ПЦР гена *AtEXP10 A. thaliana*	AtEXPF AGACGTAAACATGGGTCATC	AtEXPR TGCCCTTTTTAACGGAACTG
Амплификация гена *NtEXPA1* табака	NtEXPA1F CTTCTTCTTCTTCTGTTGCTTTG	NtEXPA1R TGAACTCACAAACTCTAAATCCTG
ОТ-ПЦР гена *NtEXPA1 N. tabacum*	Nt1RealF AACATTGGCATTTACAGAGGTG	Nt1RealR AAGGGTTGGCCATTGAGATA
ОТ-ПЦР гена *NtEXPA4 N. tabacum*	Nt4RealF TGTAATCCTCCCCTTCACCAT	Nt4RealR ATAATTGTTGTT-TTG-CCAGTTTTG
Амплификация гена *NtEXPA5*	NtEXPF ACAATGGCAACATTCTCCATTATCTC	NtEXPR CTACTTAATTAAAATTGAGCCCC
ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5 N. tabacum*	NtEXP5RTF TGGTGCAATCCCCCTCTC	NtEXP5RTR GACATTGTTTGCCATCCAGTATTA
ОТ-ПЦР гена *NtEXPA6 N. tabacum*	Nt6RealF ACAATCAATGGTTTC-CGTTACTTCAA	Nt6RealR CAATGGGCTGGCGCAATGTTC
Амплификация гена *PnEXPA1*	PnEXPA1F GAGAGAAAATGGCAATGAGC	PnEXPA1R TATTAAACCCTGAAATTCTTGCC

ОТ-ПЦР гена *PnEXPA1*	PnEXPA1F CTTGCTTCGAGATAAAATGT	PnEXPA1R AACCCTTCACGCTCACCT
Амплификация гена *PnEXPA3*	PnEXP3F AATCTTCCTGAAAATGGCTC	PnEXP3R ACGGTCCCTAACGAAACTGG
ОТ-ПЦР гена *PnEXPA3*	PnEXPA3F GCCCAATATAGAGCAGGAA	PttEXPA3R TAGAAGGAGCAACATTGTAGGAGAC
Амплификация консервативного участка гена *NtEXPA4*	EXPi1F: AATACTGCAGCTTTAAGCACAGC	EXPi1R: GCAATGTGTTGGAAGACAGGCTG
Амплификация гена *NtEXGT N. tabacum*	NtEXGTF CTGATTGGCTTTGCTTTAGAAC	NtEXGTR CACGACTCCACC-AATGATACA
ОТ-ПЦР гена *NtEXGT N. tabacum*	NtXETRTF ATTTACTGCCTCCTACACATCATTCC	NtXETRTR ATCTCTGTCCTTAGTGCATTCTGGTG
ОТ-ПЦР гена *NtCYCD3;1 N. tabacum*	NtCYCRTF AGATTTTCAAGTGGAGGATGCTA	NtCYCRTR GTCAACAGAATTACAAGGCTCAACT
ОТ-ПЦР гена *CDKB1-1 N. tabacum*	CdkRTF GGCTTTCACTGTCCCAATAA	CdkRTR GAGGCCAAGTTCTGAGGTTC
Амплификация гена *CLAVATA3 A.*	CACTCAGTCACTTTCTCTCT	GAAAATCATGAGATATAATAGTG

thaliana		
ОТ-ПЦР гена *CLAVATA3 A. thaliana*	ATGTCCGGTCCAGTTCAACA	TCAAGGGAGCTGAAAGTTGT
ОТ-ПЦР гена α-тубулина табака	tubAF CAAGGTGCAAAGGGCTGTATGTATGA	tubAR GCACCAACTTCCTCGTAATCCTTTTC
ОТ-ПЦР гена EF-1α табака	EF-1αF GAATTGGTACTGTCCCTGTT	EF-1αR TTGCCAATCTGTCCTGAAT
ОТ-ПЦР гена актина рапса	ActF GTGCCGATCTACGAAGGT	ActR TCAGGGCAACGGAATCT
ОТ-ПЦР гена актина осины	ActPF ACTGGTATTGTGTTGGATTCTGG	ActPR AGTTGTATGTAGTCTCGTGGATGC

5.3. Реактивы и материалы

Агарозы:

для электрофореза ДНК (Bio-Rad, США; Serva, ФРГ) тип II (Sigma, США)

агароза легкоплавкая, тип VII (Sigma, США)

агароза легкоплавкая (Bio-Rad, США)

агароза для пульс электрофореза, PFGE grade (Amresco, США)

Акриламид (Amresco Inc., США)

Аммония персульфат (Amresco Inc., США)

Ампициллин (Serva, ФРГ)

АТФ (Serva, ФРГ)

Бакто-агар (Difco, США)

Бакто-триптон (Difco, США)

Бридж 58 (Serva, ФРГ)

5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактопиранозид (Boehringer Mannheim, ФРГ)

Бромфеноловый синий (Serva, ФРГ)

Бычий сывороточный альбумин (Sigma, США)

Глицерин (Serva, ФРГ)

Глицин (Amresco Inc., США)

Глутаровый альдегид (Merck, ФРГ)

Гуанидина гидрохлорид (Serva, ФРГ)

DE52-целлюлоза (Whatman Biosystems Ltd, Англия)

Дезоксинуклеотидтрифосфаты:

- дАТФ (MBI Fermentas, Литва)
- дЦТФ (MBI Fermentas, Литва)
- дГТФ (MBI Fermentas, Литва)
- дТТФ (MBI Fermentas, Литва)

Дезоксихолат натрия (Serva или Merck, обе ФРГ)

Дитиотрейтол (Serva, ФРГ)

ДНК-лигаза фага Т4 (MBI Fermentas, Литва)

Додецилсульфат натрия (ДДС-натрия) (Serva, ФРГ)

Дрожжевой экстракт (Difco, США)

Изопропил-β-тиогалактопиранозид (IPTG) (Boehringer Mannheim, ФРГ)

Кальций хлористый (Merck, ФРГ)

Кленовский фрагмент ДНК полимеразы I *E. coli* (NEN, США)

Кленовский фрагмент ДНК полимеразы I *E. coli* exo minus (Promega, США)

Лизоцим (Serva, ФРГ)

Магний хлористый (Serva, ФРГ)

Обратная транскриптаза MMuLV (Fermentas, Литва)

Поливинилпирролидон К90 (Serva, ФРГ)

Полиэтиленгликоль 6000 (Fluka, Швейцария или Merck, ФРГ)

Рестрикционные эндонуклеазы:

*Apa*I, *Bam*HI, *Bgl*I, *Bse*PI, *Bsp*19I, *EcoR*I, *EcoR*V, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I (Сибэнзим, Новосибирск); *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, (MBI Fermentas, Литва); *Eco*RV (Promega Corporation, США).

Тетрациклин (Serva, ФРГ)

Трис (гидроксиэтиламинометан) "тризма" или "Sigma 7-9" (Sigma, США)

Хроматографическая бумага 3ММ (Whatman, Англия)

Цинк хлористый (Aldrich, США)

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль) (Serva, ФРГ)

Этидиум бромид (Fluka, Швейцария)

Остальные реактивы отечественного производства.

5.4. Составы использованных стандартных растворов

1 х ТЕ	10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА
1 х ТАЕ	40 мМ трис-основание, 20 мМ уксусной кислоты, 2 мМ ЭДТА, (pH 7,6)
среда LB	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%)
агаризованная среда LB	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%), агар-агар (1,5%)
среда TYP	бакто-триптон (1,6%), дрожжевой экстракт (1,6%), NaCl (0,5%), K_2HPO_4 (0,25%)
среда TY	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), $CaCl_2$ (0,1%)
среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), $MgSO_4$ (0,01%), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,05%)
среда TB	бакто-триптон (1,2%), дрожжевой экстракт

	(2,4%), K_2HPO_4, KH_2PO_4 10 мМ, pH 7,4.
MSD4x2	на 100 мл среды: соли Мурасиге-Скуга — 0,47 г 10 мг инозитола, 3 г сахарозы, 0,1 мг БАП (6-бензиламинопурин), 0,01 мг НУК (нафтилуксусная кислота), 0,64% бактоагара, pH 5,7
MC	на 100 мл среды: соли Мурасиге-Скуга — 0,47 г 10 мг инозитола, 3 г сахарозы, pH 5,7

Часть 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 6. Новые промоторы каулимовирусов и конструирование их гибридных форм методами рестрикции-лигирования и ДНК шаффлинга

В рамках исследования молекулярных механизмов регуляции размеров органов у растений, нами планировалось создание большого количества трансгенных растений с измененным уровнем экспрессии различных целевых генов. При создании трансгенных растений весьма важным является выбор промотора для обеспечения достаточного уровня экспрессии чужеродного гена. В настоящее время одним из наиболее широко используемых для этих целей служит “сильный” конститутивный 35S промотор, выделенный из вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) из группы каулимовирусов (Odell et al., 1985). Однако для решения некоторых задач по созданию трансгенных растений и обеспечения достаточного уровня экспрессии белковых продуктов, активности 35S промотора оказалось недостаточно (Mitsuhara et al., 1996). В этой связи представляет значительный интерес как обнаружение новых, более эффективных промоторов, так и создание их гибридных форм. И поскольку 35S промотор вируса мозаики цветной капусты оказался во многом универсальным, стали осуществляться поиски аналогичных промоторов других каулимовирусов. Из известных ныне промоторов каулимовирусов оставались не исследованными таковые у вирусов мозаики георгина (ВМГ), кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ), желтых листовых завивок цеструма и некоторых других. Помимо поиска новых каулимовирусов, были проведены эксперименты по созданию эффективных промоторных кассет, в состав которых были включены модифицированные и гибридные с другими промоторами формы 35S промотора (Comai et al., 1990; Omirulleh et al., 1993). Тем не менее, пока нет оснований считать, что самые лучшие промоторы для целей создания трансгенных растений уже найдены или сконструированы.

Одним из путей создания новых эффективных промоторов является создание химерных или гибридных форм промоторов методом ДНК шаффлинга (Stemmer, 1994). Гибридные формы промоторов каулимовирусов также могут быть получены с применением широко распространенных методов молекулярной биологии, таких как ПЦР, расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирования при помощи ДНК-лигазы. В целом, данное направление исследований может привести к получению конструкций, более эффективных в трансгенных растениях, чем природные формы промоторов каулимовирусов. Полученные в ходе этой работы промоторы планировалось в дальнейшем использовать для создания трансгенных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов. Предполагалось, что при использовании более сильного промотора, могут быть получены трансгенные растения с более существенным изменением размеров органов, чем при использовании классического 35S промотора.

6.1. Выяснение филогенетических связей каулимовирусов, поиск промоторных последовательностей, подбор праймеров для их амплификации и поиск инфицированных каулимовирусами растений

Для проведения экспериментов по направленной молекулярной эволюции *in vitro* необходимым условием является наличие гомологии между нуклеотидными последовательностями (Stemmer, 1994). Поэтому нами был предварительно проведен поиск каулимовирусов, близкородственных к вирусу мозаики цветной капусты. Для определения филогенетических связей каулимовирусов был проведен анализ 14-ти полностью секвенированных последовательностей геномов каулимовирусов и частично секвенированной последовательности генома скрытого вируса хрена. Для этого использовали данные из GenBank. Было выяснено, что по гомологии нуклеотидной последовательности геномов наиболее близко к вирусу мозаики цветной капусты стоят скрытый вирус хрена и вирус кольцевой гравировки гвоздики (рис. 1). Другую близкую группу образуют вирус мозаики норичника (ВМН) и вирус мозаики ночной красавицы. Несколько дальше отстоит вирус, окаймляющий жилки земляники. Еще одну группу

каулимовирусов, с меньшей гомологией нуклеотидной последовательности с вирусом мозаики цветной капусты образуют каулимовирусы черешни, цеструма, арахиса, маниока и сои (рис. 1).

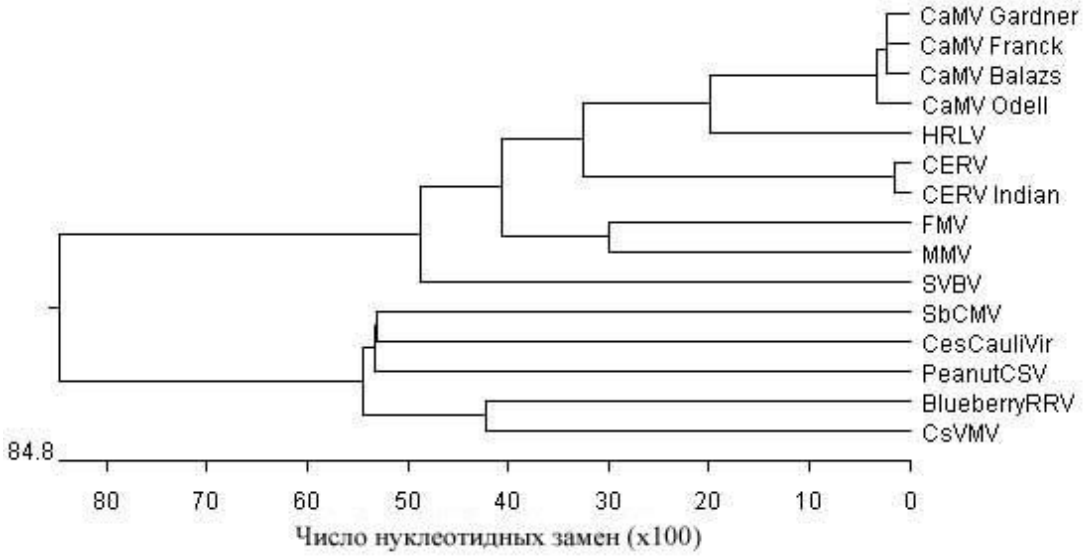


Рис. 1. Филогенетическое древо сходства основных представителей каулимовирусов, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов. CaMV – ВМЦК (Gardner, Franck, Balazs, Odell – фамилии авторов секвенированных последовательностей); HRLV – скрытый вирус хрена; CERV – вирус кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ); CERV Indian – индийский изолят ВКГГ; FMV – вирус мозаики норичника (ВМН); MMV – вирус мозаики ночной красавицы (ВМНК); SVBV – вирус, окаймляющий жилки земляники (ВОЖЗ); SbCMV – вирус бледной пятнистости сои; CesCauliVir – вирус желтых листовых завивок цеструма; PeanutCSV – вирус бледной полосатости арахиса; BlueberryRRV – вирус красных кольцевых пятен черешни; CsVMV – вирус мозаики маниока.

Для проведения дальнейшего анализа и отбора промоторов для ДНК шаффлинга с 35S промотором, были взяты ВКГГ, ВМН и ВОЖЗ, поскольку эти вирусы оказались филогенетически близки к ВМЦК. Нуклеотидные последовательности геномов 4-х штаммов ВМЦК, 2-х штаммов ВКГГ и по одному штамму ВМН, ВОЖЗ, а также ВМНК были выровнены с помощью

программы MegAlign. Используя информацию о расположении промоторов ВМЦК, ВМН и ВМНК в геноме, было оценено примерное местоположение промоторов ВКГГ и ВОЖЗ, затем промоторные участки исследуемых каулимовирусов были выровнены для оценки их гомологии. Оказалось, что уровень схожести нуклеотидных последовательностей промоторов каулимовирусов почти совпадает с уровнем схожести последовательностей геномов, и в построенном филогенетическом древе каулимовирусы образовали те же филогенетически связанные группы. Позже было выяснено, что вирус мозаики георгина также является одним из близких к ВМЦК представителей каулимовирусов. В литературе к началу наших исследований имелись лишь скудные сведения о данном вирусе (Черкасский, 1965; Богунов, 2006). По данным GenBank геном данного вируса ко времени начала наших исследований (2007 год) был секвенирован лишь частично, тем не менее, по анализу известных последовательностей было показано, что этот вирус имеет большее филогенетическое родство с ВМН и ВМНК. Исходя из полученных нами данных и по анализу литературы о распространении каулимовирусов, были подобраны праймеры для амплификации промоторов ВМН, ВОЖЗ ВМГ и ВКГГ и был осуществлен поиск инфицированных каулимовирусами растений в Уфимском регионе. В результате из перечисленных вирусов в г. Уфе был обнаружен лишь вирус мозаики георгина (ВМГ).

6.2. Амплификация и клонирование промотора вируса мозаики георгина

Промотор ВМГ и его фланкирующие участки по данным GenBank к 2007 году не были секвенированы, и это не позволяло подобрать удобные праймеры для амплификации полногеномного промотора. Было решено амплифицировать более протяженный участок нуклеотидной последовательности, включающий промоторную область. При подборе праймеров использовались лишь известные последовательности генома ВМГ и подбирались участки, наиболее близко

прилегающие к промотору. Наиболее подходящей оказалась следующая пара праймеров:

5'-CAGTGACTCATCCTCCAATA-3' и

5'-AATATCTACTGACATTTCTT-3'.

Размер амплифицируемого участка составил приблизительно 1290 пн (рис. 2).

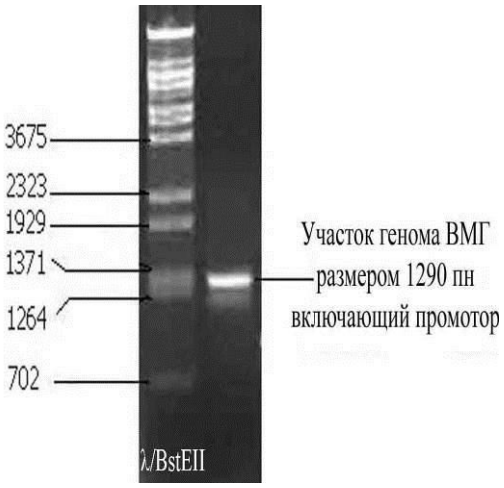


Рис. 2. Электрофореграмма ампликона участка генома ВМГ, размером около 1290 пн, из образцов ДНК инфицированного георгина. Маркером служит ДНК фага λ, расщепленная эндонуклеазой рестрикции *Bst*EII.

Проведенный анализ нуклеотидной последовательности позволил оценить расположение и подобрать праймеры для амплификации самого промотора, размер которого, судя по гомологии с родственными каулимовирусами, не должен был превышать 400 пн. В итоге был амплифицирован промоторный участок генома ВМГ размером 442 пн, который был клонирован в фагмидном векторе pKRX.

6.3. Амплификация и клонирование промотора вируса кольцевой гравировки гвоздики

Растения, листья которых по морфологическим признакам соответствовали болезни, связанной с инфекцией вирусом кольцевой гравировки гвоздики, были получены из Института вирусологии, микробиологии и биологической безопасности (г. Брауншвейг, Германия). В GenBank опубликована последовательность генома ВКГГ. Для оценки расположения промотора провели выравнивание генома ВКГГ с геномами 4-х штаммов ВМЦК. Далее, учитывая выравнивание с наиболее близкородственными каулимовирусами, осуществили

подбор праймеров для амплификации промотора ВКГГ, при этом отдавали преимущество более консервативным участкам. Было подобрано 3 праймера: 651F, 501F, 501R (таблица 1).

При амплификации с праймерами 651F и 501R размер ампликона должен составить 651 пн, а с праймерами 501F и 501R - 501 пн. Из 4-х образцов ДНК, выделенных из листьев гвоздичных, нам удалось амплифицировать ДНК с размерами около 500 пн и 650 пн (рис. 3), что подтвердило наличие ВКГГ в листьях гвоздичных. Далее оба фрагмента ДНК, отличающиеся лишь расположением праймеров, были клонированы в фагмидном векторе pKRX.

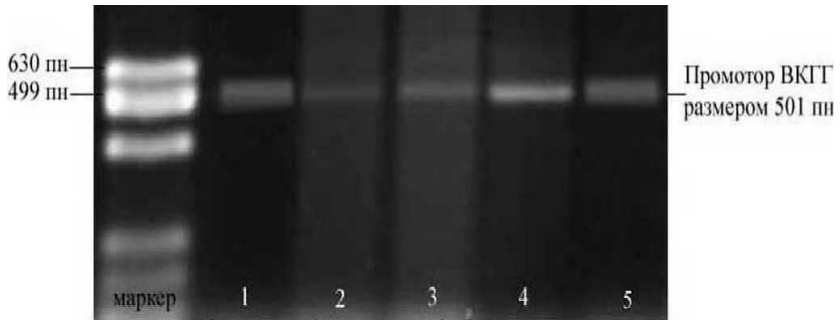


Рис. 3. Результаты амплификации промоторного участка генома ВКГГ размером 501 пн из различных инфицированных представителей гвоздичных (Германия, Брауншвейг). Маркер - pBluescript II SK+, расщепленная эндонуклеазой рестрикции *Hpa*II; 1 - *Lychnis* (смолка обыкновенная или клейкая); 2, 3 - *Dianthus caryophyllus* (гвоздика садовая); 4 - *Dianthus barbatus* (гвоздика турецкая); 5 - представитель семейства гвоздичных, видовая принадлежность которого не определена.

6.4. Секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора вируса мозаики георгина

Участок генома ВМГ размером 1290 пн был секвенирован с применением “прямого” и “обратного” праймеров. Сравнительный анализ показал, что была клонирована последовательность, включающая часть гена 6, промотор, большой межгенный спейсер и 7-ю открытую рамку считывания ВМГ. Нуклеотидная последовательность большого межгенного спейсера размером 678 пн был нами зарегистрирован в GenBank (EF463101). Промотор ВМГ частично оказался

гомологичным промоторам других каулимовирусов: гомология с промотором вируса мозаики норичника составила 60%, а с промотором вируса мозаики ночной красавицы - 63%. Сравнительный анализ регуляторных областей промоторов ВМГ, вирусов мозаики норичника и ночной красавицы показал следующее: ССАСТ-бокс у вируса норичника имеет каноническую последовательность, у ВМГ она представлена последовательностью ССААТ, у вируса ночной красавицы – GCAAC. У вирусов норичника и ночной красавицы 1-й TGACG мотив представлен последовательностью TGACG, а у ВМГ тимин заменен на аденин; 2-й TGACG мотив у всех трех видов представлен последовательностью TGACG. TATA-бокс у всех трех видов представляет собой консенсусную последовательность TATATAA.

Нуклеотидная последовательность промотора ВМГ размером 442 пн была зарегистрирована в GenBank (EF513491). Кроме часто исследуемых регуляторных участков, у промоторов ВМГ, ВМН и ВМНК была выявлена еще одна консенсусная последовательность. Оказалось, что у всех этих трех каулимовирусов в сайте инициации экспрессии имеется каноническая последовательность GATCA(A)TCGAAA (рис. 4).

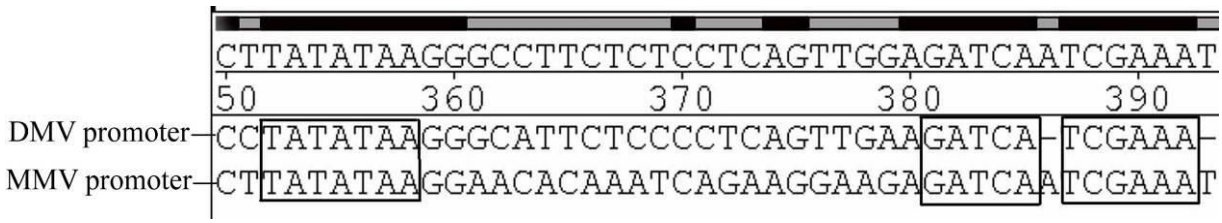


Рис. 4. Консенсусная последовательность ДНК, расположенная за ТАТА боксом и совпадающая с 3' концом -18/+1 домена промоторов ВМГ (DMV) и ВМНК (MMV).

6.5. Секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора вируса кольцевой гравировки гвоздики

Клонированные в pKRX фрагменты генома ВКГГ размером 501 и 651 пн были секвенированы и последовательность промоторного участка размером 455

пн была зарегистрирована нами в GenBank (EF513492). Поиск сходных последовательностей в базе данных генов с помощью программы Megablast (доступной на сайте NCBI) показал 95%-ную гомологию секвенированного нами промотора с промоторным участком изолята вируса ВКГГ из Нидерландов (NC 003498). Выравнивание секвенированного нами промотора ВКГГ с последовательностью промотора индийского изолята ВКГГ (AJ853858) с помощью программы MegAlign показало уровень схожести 96%. Уровень схожести промоторов ВКГГ и ВМЦК составил 48%. Сравнительный анализ последовательностей промоторов вируса мозаики цветной капусты и вируса кольцевой гравировки гвоздики показал, что CCACT-бокс у промотора ВКГГ отличается от такового промотора ВМЦК и представлен последовательностью CTACT; TATA-бокс представлен у ВКГГ последовательностью TATATAAAGG и у ВМЦК последовательностью TATATAAGGA. 1-й TGACG мотив – у ВМЦК представлен канонической последовательностью TGACG, у ВКГГ последовательностью AGACG, 2-й TGACG мотив у обоих видов представлен последовательностью TGACG. CCACT и TGACG боксы у промотора ВМЦК имеют один общий нуклеотид T (Sanger et al., 1990), при этом в отличие от ВМГ, до CCACT бокса в геноме у ВМЦК не было обнаружено схожих последовательностей. Следует отметить, что после второго TGACG мотива у ВМЦК есть одна последовательность CCACT, что также совпадает с данными из литературы о наличии повторов этих последовательностей (Sanger et al., 1990).

6.6. Конструирование гибридных форм промоторов каулимовирусов методом ДНК шаффлинга

Промоторы ВМЦК (510 пн), ВКГГ (501 пн) и ВМГ (442 пн) были вырезаны из фагмидного вектора pKRX по сайту рестрикции *Bss*HI. После этапа самолигирования проводили наработку одноцепочечных последовательностей при помощи ДНК-полимеразы фага phi29. Для затравки использовали праймеры T3, T7 и праймеры, подобранные к самим промоторам. При использовании T7

праймера синтезировалась плюс-цепь, а при использовании Т3 праймера минус-цепь (рис. 5).

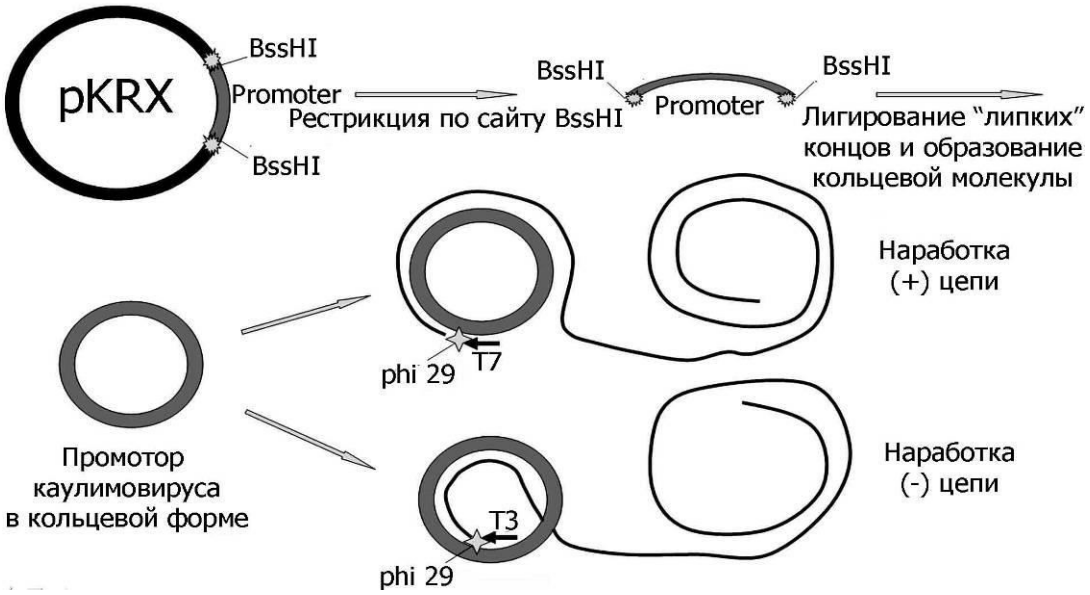


Рис. 5. Общая схема получения одноцепочечной ДНК при помощи ДНК-полимеразы фага phi29.

Одноцепочечные формы промоторов ВМЦК, ВКГГ и ВМГ были использованы нами в качестве исходного материала при проведении ДНК шаффлинга. Промоторы в одноцепочечной форме были обозначены нами в соответствии с названием вируса и праймера, с которого данную цепь ДНК нарабатывали (форвард – F, реверс – R): 35SF, 35SR, CERVF, CERVR, DMVF, DMVR. Для проведения ДНК шаффлинга, использовали все 6 комбинаций разных цепей ДНК этих промоторов: 35SF+CERVR (смесь 1), CERVF+35SR (смесь 2), 35SF+DMVR (смесь 3), DMVF+35SR (смесь 4), CERVF+DMVR (смесь 5), DMVF+CERVR (смесь 6).

В соответствии с данными по гомологии промоторов каулимовирусов, были смешаны разные цепи ДНК промоторов ВМЦК и ВКГГ, обработаны ДНКазой I, при этом были получены фрагменты ДНК размерами около 50 - 300 пн. Далее был проведен первый раунд амплификации без добавления праймеров, при котором происходит постепенное увеличение размеров восстанавливаемых фрагментов и образование их пула. В ходе первого раунда ДНК шаффлинга генерируется

библиотека рекомбинантов, несущих точки состыковки – кроссоверы, где происходит перестановка отдельных частей матрицы с одной родительской последовательности на другую. Затем был проведен 2-й раунд амплификации с использованием специально подобранных праймеров, фланкирующих исходные гены. В результате при смешивании плюс-цепи промотора ВМЦК с минус-цепью промотора ВКГГ (1 смесь) и двух раундов ПЦР, получили ампликон размером больше 500 пн (рис. 6). При этом образовался шмер, видимо из-за неоднородного состава ампликона, содержащий ДНК различного размера. Благодаря тому, что при втором раунде ПЦР использовали форвард праймер промотора ВМЦК и реверс праймер промотора ВКГГ, в качестве конечных продуктов реакции нарабатывались лишь гибридные молекулы ДНК. Для контроля использовали смесь промоторов ВМЦК и ВКГГ в двуцепочечной форме и использовали эту матрицу во втором раунде ПЦР, при этом наработка продукта, как и ожидалось, не происходила. При смешивании плюс-цепи промотора ВКГГ и минус-цепи промотора ВМЦК (смесь 2) получили однородный ампликон размером около 500 пн (рис. 6). При использовании форвард праймера промотора ВКГГ и реверс праймера ВМЦК, амплификация смеси промоторов в двуцепочечной форме также не проходила (“минус” контроль).

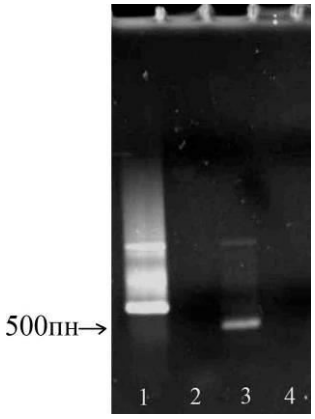


Рис. 6. Электрофореграмма ампликонов после проведения двух раундов ПЦР ДНК шаффлинга промоторов ВМЦК и ВКГГ. 1 – результат ДНК шаффлинга смеси 1 (плюс-цепь промотора ВМЦК и минус-цепь промотора ВКГГ); 2 – “минус” контроль для смеси 1 (ПЦР анализ смеси промоторов ВМЦК и ВКГГ в двуцепочечной форме при помощи форвард праймера промотора ВМЦК и реверс праймера ВКГГ); 3 - результат ДНК шаффлинга смеси 2 (плюс-цепь промотора ВКГГ и минус-цепь промотора ВМЦК); 4 - “минус” контроль для смеси 2 (ПЦР анализ смеси промоторов

ВМЦК и ВКГГ в двуцепочечной форме при помощи форвард праймера промотора ВКГГ и реверс праймера ВМЦК).

Полученные ампликоны были клонированы в плазмиде pKRX, далее был проведен ПЦР-анализ полученных клонов, при этом были получены амплификаты различного размера (рис. 7), все они были приблизительно равны или больше по размеру, чем промоторы ВМЦК и ВКГГ.

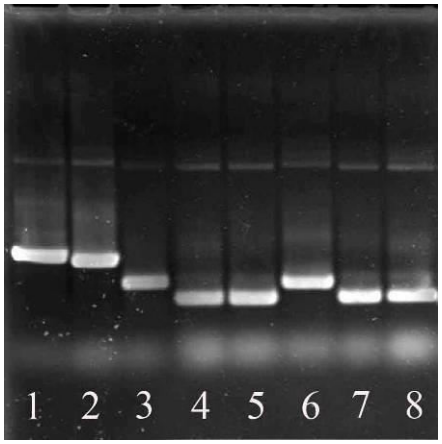


Рис. 7. Электрофореграмма ПЦР анализа клонов, полученных при клонировании ампликонов из смеси 1 после ДНК шаффлинга в фагмидном векторе pKRX. С 1 по 7 - номера анализируемых клонов; 8 – ампликон промотора ВКГГ размером 501 пн (маркер).

Последовательности промоторов первых двух клонов были секвенированы. Анализ секвенированной последовательности показал, что оба клона содержат гибридные формы промоторов ВМЦК и ВКГГ. Размер промотора первого клона составил приблизительно 900 пн (рис. 8). В начале располагается полноразмерный промотор ВМЦК (510 пн), затем 5'-конец промотора ВКГГ размером 253 пн, далее часть фагмидного вектора pKRX размером 75 пн (область полилинкера) и в конце находится 3'-конец промотора ВКГГ размером 67 пн. Размер промотора второго клона составил приблизительно 710 пн, где последовательно расположены 5'-конец промотора ВМЦК размером 214 пн и полноразмерный промотор ВКГГ (501 пн) (рис. 8).

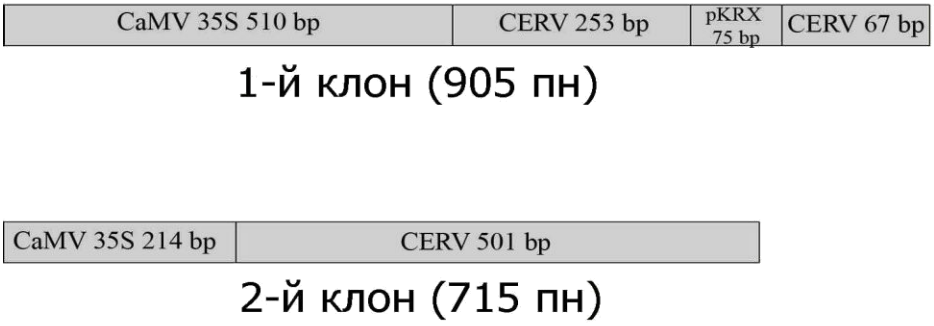


Рис. 8. Расположение составных частей в гибридных промоторах 1 го и 2 го клонов.

В итоге было получено около 30-ти клонов, промоторы которых были секвенированы и оказались гибридными, при этом были использованы все возможные комбинации промоторов каулимовирусов (смеси 1 – 6) (рис. 9).

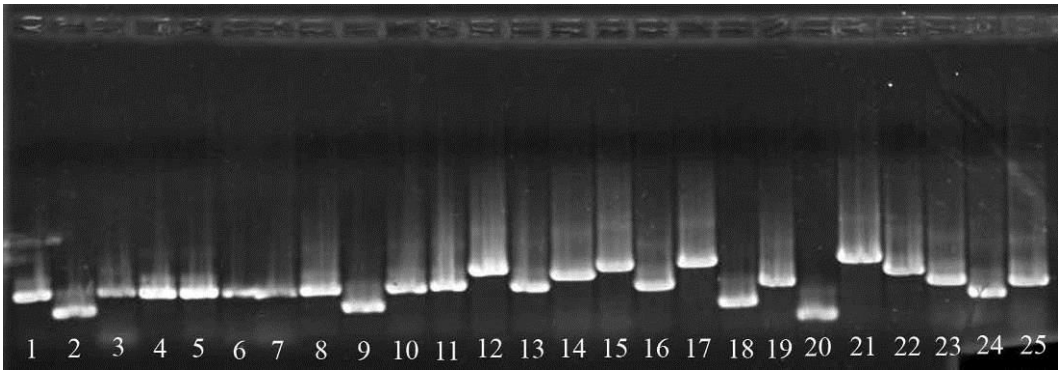


Рис. 9. Электрофореграмма ПЦР анализа клонов, полученных при клонировании амплификата из смеси 4 (DMVF+35SR) в фагмидном векторе pKRX после ДНК шаффлинга. 1 – ампликон промотора ВМЦК (маркер - 510 пн); 2 – промотор ВМГ (маркер - 442 пн); 3 – 25 – номера анализируемых клонов.

Было выбрано три гибридных промотора для клонирования в бинарном векторе pCambia 1304, с целью проведения анализа их экспрессионной активности в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens.*

6.7. Анализ активности генов *GUS* и *GFP* под управлением гибридных и природных форм промоторов каулимовирусов в клетках *E. coli, A. tumefaciens* и *N. tabacum*

Промоторы ВКГГ (501 пн и 370 пн), ВМГ (442 пн) и три гибридных промотора были клонированы в векторе pCambia 1304, где они могли управлять экспрессией генов *GUS* и *GFP* одновременно. Полученными ДНК-конструкциями трансформировали компетентные клетки *E. coil* и *A. tumefaciens* и анализировали экспрессию гена *GUS* при помощи субстрата x-gluc. Все анализируемые промоторные последовательности показали примерно одинаковую, визуально детектируемую, активность как в клетках *E. coil*, так и в клетках *A. tumefaciens* (рис. 10).

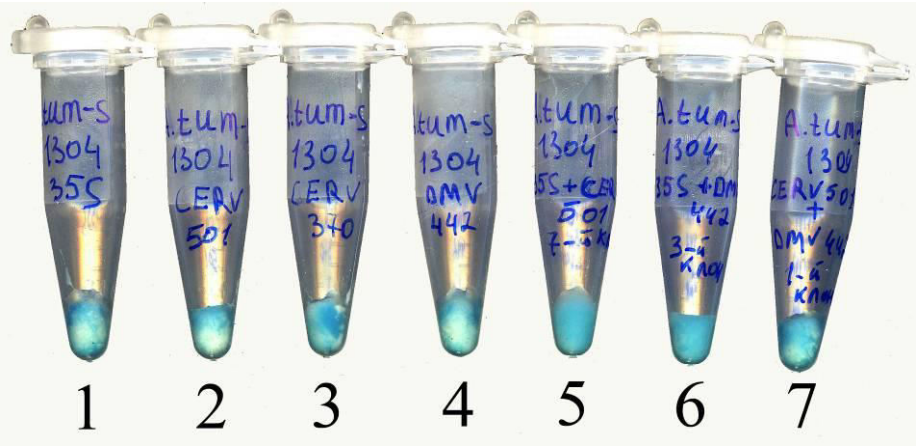


Рис. 10. Результаты анализа экспрессионной активности гена *GUS* под управлением гибридных и природных форм промоторов каулимовирусов в клетках *A. tumefaciens*. 1 – pCambia 1304 (35S промотор); 2 – промотор ВКГГ размером 501 пн; 3 – промотор ВКГГ размером 370 пн; 4 – промотор ВМГ размером 442 пн; 5 – гибридный промотор ВМЦК и ВКГГ (1 смесь); 6 – гибридный промотор ВМЦК и ВМГ (4 смесь); 7 – гибридный промотор ВМГ и ВКГГ (6 смесь).

Конструкции вектора pCambia 1304 с промоторами ВКГГ (501 и 370 пн) и ВМГ (442 пн) были использованы для трансформации протопластов табака и анализа транзиентной экспрессии репортерных генов *GUS* и *GFP* в растительных клетках. С помощью данного метода было показано, что амплифицированные

нами промоторные последовательности ВМГ и ВКГГ являются достаточными для проявления транзиентной экспрессии генов *GUS* и *GFP* в растительных клетках (рис. 11а-11г).

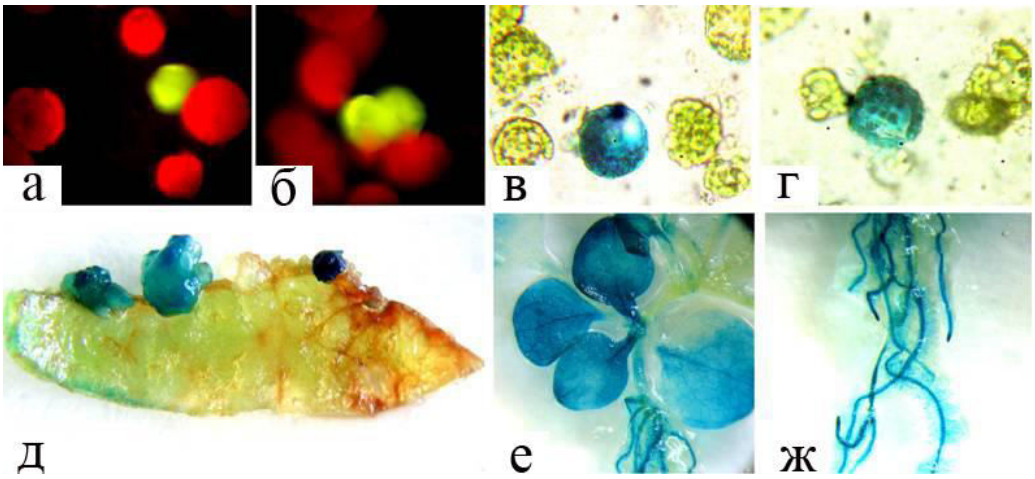


Рис. 11. Анализ активности промоторов ВМГ и ВКГГ в протопластах, каллусах и трансгенных растениях табака: а, в - транзиентная экспрессия генов *GFP* и *GUS* под контролем промотора ВМГ в протопластах табака; б, г - транзиентная экспрессия генов *GFP* и *GUS* под контролем промотора ВКГГ размером 501 пн в протопластах табака; д – активность промотора ВМГ в каллусах табака; е, ж – активность промотора ВМГ в листьях и корнях трансгенных растений табака.

Генно-инженерные конструкции, использованные при трансформации протопластов, были применены также для получения трансгенных растений табака. Анализируемые промоторы проявляли свою активность в листьях, стебле и корнях табака (рис. 11е, ж). Было показано, что клонированные нами промоторы являются конститутивными и характеризуются высоким уровнем активности в трансгенных растениях.

6.8. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов методами ПЦР и рестрикции-лигирования

Для получения гибридных форм промоторов каулимовирусов методами ПЦР и рестрикции-лигирования были использованы промотор вируса мозаики

георгина (ВМГ) размером 442 пн (EF513491) и промотор вируса кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ) размером 501 пн (EF513492). Промотор ВМГ был расщеплен рестриктазой *Hind*III, при этом образовались два фрагмента размерами 249 и 193 пн. При расщеплении той же рестриктазой промотора ВКГГ, были получены также два фрагмента размерами 50 и 451 пн. Фрагменты данных промоторов размерами 249 и 451 пн были лигированы Т4 ДНК-лигазой, лигазная смесь амплифицирована, а полученный ампликон клонирован в Т-векторе pKRX. В итоге был получен гибридный промотор размером 700 пн (рис. 12, *1*). При расщеплении промотора ВМГ рестриктазой *Aat*II, были получены фрагменты размерами 299 и 143 пн, а промотор ВКГГ дал фрагменты размерами 286 и 215 пн. После проведения перекрестных лигирований, амплификации методом ПЦР и клонирования в векторе pKRX были получены гибридные промоторы размерами 514 и 429 пн (рис. 12, *2*, *3*). Далее промоторы ВМГ и ВКГГ были амплифицированы при помощи Pfu ДНК-полимеразы, в результате были получены ампликоны с “тупыми” концами. Исследуемые промоторы расщеплялись рестриктазой *Zra*I, которая также приводит к образованию фрагментов ДНК с “тупыми” концами, при этом из промотора ВМГ образовались фрагменты размерами 297 и 145 пн, а из промотора ВКГГ – 284 и 217 пн. Фрагмент промотора ВКГГ размером 284 пн был лигирован с полноразмерным промотором ВМГ, в результате чего получен гибридный промотор размером 726 пн (рис. 12, *4*). Далее фрагмент промотора ВМГ размером 297 пн был лигирован с полноразмерным промотором ВМГ, при этом был получен модифицированный промотор ВМГ размером 739 пн (рис. 12, *5*). Все полученные гибридные промоторы были клонированы в бинарных векторах pCambia 1281Z/1291Z и затем при помощи последних получены трансгенные растения табака.

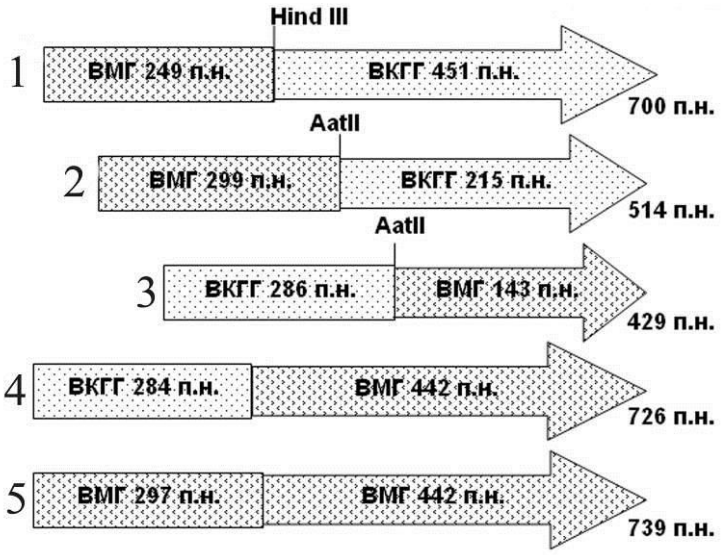


Рис. 12. Схемы созданных гибридных промоторов каулимовирусов.

6.9. Определение активности природных и гибридных форм промоторов каулимовирусов флюориметрическим методом

Методом ДНК шаффлинга нами были получены гибридные формы промоторов каулимовирусов гвоздики и георгина как между собой, так и с 35S промотором в различных комбинациях, 6 из которых были отобраны для проведения дальнейших анализов. Из гибридных между промоторами каулимовирусов цветной капусты и гвоздики было отобрано три варианта: 4^1, 7^1 и 14^1; между промоторами каулимовирусов цветной капусты и георгина 2 варианта: 9^4 и 11^4; между промоторами каулимовирусов гвоздики и георгина 1 вариант: 19^6 (во всех вариантах цифра означает номер клона полученного при генно-инженерных манипуляциях, а надстрочный индекс означает номер смеси промоторов, см. раздел 6.6). После проведения агробактериальной трансформации листовых дисков табака, укоренившиеся на селективной среде с гигромицином трансгенные растения отбирали для проведения качественного гистохимического анализа активности репортерного гена *GUS*. По результатам проведенных анализов стало ясно, что для полученных нами гибридных и модифицированных форм промоторов каулимовирусов, как и для 35S промотора характерна конститутивность и отсутствие тканеспецифичности. По 6 растений с каждого варианта с устойчивой активностью β-глюкуронидазы в листьях, стеблях

и корнях, использовали для выяснения и сравнения силы промоторов флюориметрическим методом. Для анализа активности 35S промотора, например, было отобрано 19 хорошо укоренившихся растений, из которых 15 оказались *GUS*-положительными, количественный *GUS*-анализ 6 отобранных растений показал силу в среднем 26,2±2,8 нмоль 4MU/(мин мг белка). Для анализа промотора ВМГ использовались 6 *GUS*-положительных растений, количественный анализ которых показал силу в среднем 45,1±10,2 нмоль 4MU/(мин мг белка), то есть промотор ВМГ оказался в среднем в 1,7 раза сильнее 35S промотора. Из рис. 13 видно, что наиболее сильным из полученных нами гибридных и модифицированных форм промоторов каулимовирусов является промотор размером 739 пн, а наиболее слабыми оказались гибридные промоторы размером 429 и 726 пн.

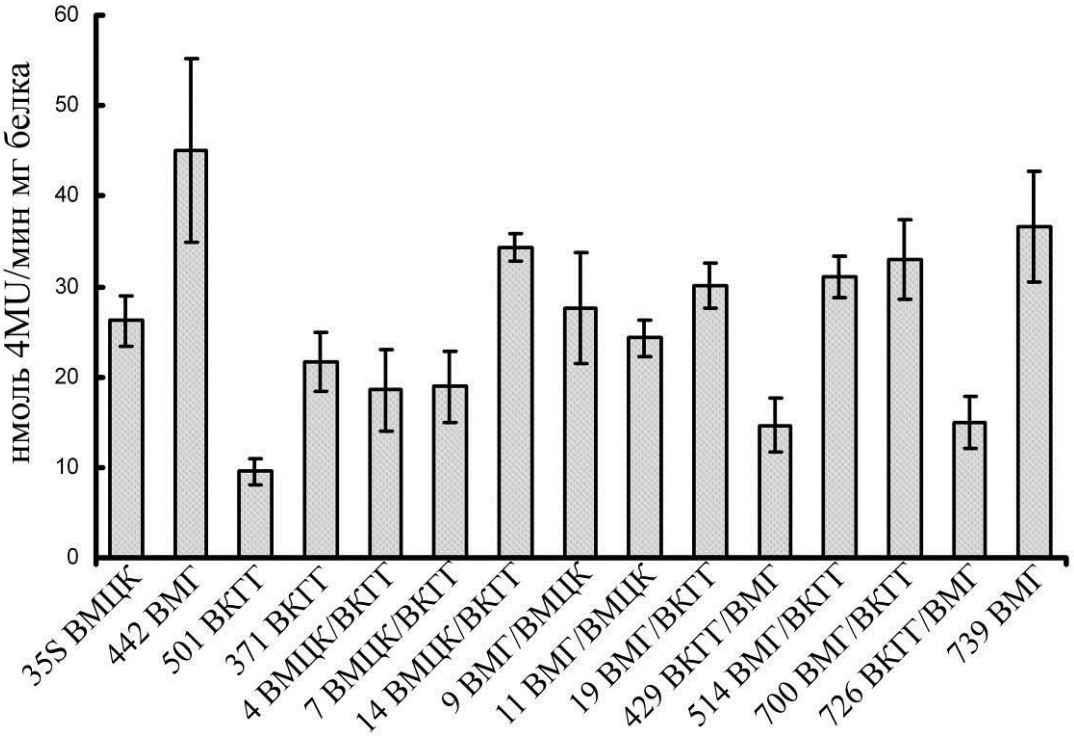


Рис. 13. Активность природных и гибридных промоторов каулимовирусов по сравнению с классическим 35S промотором в трансгенных растениях табака, определенная флюориметрическим методом. 35SВМЦК, 442ВМГ, 501 ВКГГ, 371 ВКГГ – природные промоторы каулимовирусов. 4, 7, 14 ВМЦК/ВКГГ – гибридные промоторы, полученные методом ДНК шаффлинга из смеси 1 (ВМЦК+ВКГГ). 9, 11 ВМГ/ВМЦК - гибридные промоторы, полученные методом

ДНК шаффлинга из смеси 4 (ВМГ+ВМЦК). 19 ВМГ/ВКГГ – гибридный промотор, полученный методом ДНК шаффлинга из смеси 6 (ВМГ+ВКГГ). 429, 514, 700, 726 – гибридные промоторы каулимовирусов, полученные методом рестрикции-лигирования. 739 ВМГ – модифицированный промотор ВМГ с двумя энхансреными доменами.

Таким образом, наибольшая активность в трансгенных растениях табака была характерна для промотора ВМГ. Объединив данные для всех полученных и исследованных нами гибридных и природных форм промоторов каулимовирусов можно привести следующий ряд, в котором все они представлены по убыванию активности в трансгенных растениях табака:

Промотор ВМГ (442 пн)>739>14^4>700>514>19^6>9^4>35S промотор>11^4> промотор ВКГГ (371 пн)>7^1>4^1>429 и 726>промотор ВКГГ (501 пн).

6.10. Обсуждение результатов

В результате проведенных экспериментальных работ был получен ряд сильных конститутивных растительных промоторов, различающихся по экспрессионной активности и нуклеотидной последовательности, при этом 7 из них показали большую, а 7 меньшую, чем 35S промотор силу. Самым сильным из исследованных промоторов оказался промотор ВМГ дикого типа, который в наших экспериментах был активнее 35S промотора в 1,7 раза. Наименьшая активность была показана для промотора ВКГГ дикого типа размером 501 пн, который оказался слабее 35S промотора в 2,7 раза. Промотор ВКГГ дикого типа размером 371 пн показал примерно равную с 35S промотором силу. Из этих данных можно делать выводы, что промотор ВКГГ размером 371 пн оптимальнее, чем промотор ВКГГ размером 501 пн и больше отражает его объективную экспрессионную активность. Наиболее слабые варианты промоторов, а именно варианты 501, 429 и 726 объединяет наличие на 5'-конце участка размером 280 пн, часть которого вероятнее всего не входит в состав промотора, а относится к гену VI каулимовирусов. Промотор ВКГГ размером 371 пн на 130 пн меньше

промотора 501 с 5'-конца и это заметно способствует увеличению его экспрессионной активности. Судя по всему, именно этот участок, размером 130 пн способствует уменьшению экспрессионной активности, что означает, что он не только не содержит энхансерных доменов, но и вероятнее всего не относится к промоторной последовательности. Напротив, для амплификации промотора ВМГ, видимо, нами был изначально выбран оптимальный участок, так как все гибридные промоторы, содержащие его 5'-конец, отличаются высокой активностью. Как известно, около 300 первых нуклеотидов (с 5'-конца) промоторов каулимовирусов соответствуют так называемой энхансерной области (Lam, 1994). Видимо в этом случае был выделен полноразмерный промотор ВМГ с полной энхансерной областью, без значительной примеси открытой рамки считывания гена VI каулимовирусов. Поэтому не удивительно, что из гибридных промоторов наибольшую активность показал модифицированный промотор ВМГ размером 739 пн, так как он теоретически должен содержать две энхансерные области. При проведении экспериментов предполагалось, что данный модифицированный промотор покажет большую силу, чем природный промотор ВМГ, однако этого не удалось подтвердить. То есть наши данные не совпали с литературными, где имеются сообщения о большей активности промоторов каулимовирусов с двумя энхансерными областями, по сравнению с природными промоторами каулимовирусов с одной энхансерной областью (Comai et al., 1990). Такие результаты могут быть связаны как с возможными мутациями промотора при генно-инженерных манипуляциях, так и с низким уровнем активности промотора в отобранных по варианту 739 трансгенных растениях табака. Так как согласно нашим экспериментальным данным активность одного и того же промотора в разных растениях табака варьирует в достаточно широком диапазоне.

С момента начала наших исследований в 2007 году и до опубликования наших результатов в 2010 году, не появилась ссылка ни на одну научную работу, где бы упоминался промотор ВМГ. Упоминание о промоторе ВКГГ имелось в работах английских исследователей из Бедфорда (Holmberg et al., 2002). Этими

исследователями был клонирован промоторный участок ВКГГ размером 380 пн (6737-7118), который практически совпадает с исследуемым нами промоторным участком ВКГГ размером 371 пн (6721-7091). Этот промотор был использован для различных целей, например, для проверки экспрессии гена стерол 24-С метилтрансферазы, что позволило добиться увеличения количества стеролов на 44% (Holmberg et al., 2002). Но данные исследователи не занимались изучением силы промотора, а использовали его как инструмент для достижения сверхэкспресии определенных целевых белков. Из группы каулимовирусов, кроме 35S промотора были исследованы промоторы вируса мозаики норичника (Sanger et al., 1990), вируса мозаики ночной красавицы (Dey, Maiti, 1999), вируса окаймляющего жилки земляники (Pattanaik et al., 2004) и некоторые другие. Что характерно, все они, как и промотор ВМГ показали немного большую, чем 35S промотор активность в трансгенных растениях. Весьма интересна работа индийских авторов, создавших серию химерных промоторов на основе 35S, где они меняли местами домены (Bhullar et al., 2003). И главное в этой работе даже не столько то, что они усилили транскрипционную активность трансгенов, а то, что ими были созданы равные по силе промоторы с отличающейся нуклеотидной последовательностью, что может иметь определенное значение для преодоления такого явления как “молчание” трансгенов. Наши эксперименты также направлены не только на исследование промоторов каулимовирусов, но и преследуют цели получения растительных промоторов с различной активностью, а также преодоление проблем связанных с “молчанием” трансгенов. В рамках проведенных исследований впервые для получения промоторных последовательностей в одноцепочечной форме нами была применена ДНК-полимераза фага phi 29 и небольшие кольцевые молекулы ДНК, состоящие только из промотора. Впервые с использованием различных молекулярно-биологических методов были получены гибридные между различными каулимовирусами формы промоторов и определена их активность в трансгенных растениях. Из исследованных нами промоторов, для создания трансгенных растений с повышенным уровнем экспрессии целевого гена, наиболее оптимальным будет

применение промотора ВМГ размером 442 пн. При проведении различных фундаментальных исследований, особенно в случае высокой вероятности летальности трансгенных растений из-за сверхэкспресии целевого белка, более предпочтительным может стать применение промотора ВКГГ размером 501 пн, который примерно в 4 раза слабее промотора ВМГ размером 442 пн. Но, несмотря на относительно меньшую по сравнению с 35S промотором активность, данный промотор все же является более активным, чем промотор маннопинсинтазы из Т-ДНК агробактерий и может поддерживать уровень экспрессии целевого белка на достаточно высоком уровне.

35S промотор является наиболее известным конститутивным промотором, используемым в генной инженерии растений. Пожалуй, все выращиваемые на полях на сегодняшний день трансгенные растения содержат в своем геноме именно этот промотор. Поэтому для детекции ГМО в продуктах питания используют ПЦР-анализ для выявления 35S промотора. В то же время одной из основных проблем генной инженерии растений остается очень низкий уровень экспрессии целевых генов в трансгенных растениях. Эти проблемы частично могут быть решены в будущем путем получения транспластомных растений, однако такие растения создавать намного сложнее, в отличие от ядерных трансформантов. Именно поэтому представляет большой интерес работы по поиску и созданию новых, более сильных конститутивных промоторов. С целью получения сильных растительных промоторов, нами был впервые осуществлен их ДНК шаффлинг. Было показано, что ДНК шаффлинг промоторных последовательностей вполне возможен, однако в данной работе не удалось в полной мере осуществить молекулярную эволюцию промоторов. Для успешной молекулярной эволюции необходимо было разработать технологию отбора наиболее сильных вариантов промоторов из всего пула, образующихся при ДНК шаффлинге, путем анализа их транзиентной экспрессии в протопластах. На сегодняшний день уже существуют технологии, позволяющие проводить массовый отбор промоторов по их силе с использованием различных репортерных

генов, поэтому данное направление исследований может быть продолжено, так как остается до сих пор весьма актуальным.

Промотор ВМГ оказался почти в 2 раза более активным, чем классический 35S промотор, поэтому нами было решено использовать именно его в дальнейшей нашей работе по получению трансгенных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов. До наших работ такие трансгенные растения получали только с использованием 35S промотора, при этом исследователям удавалось изменять размеры органов максимум в два раза по сравнению с контролем. Исходя из этого, можно было предполагать, что при использовании более сильных промоторов можно добиться более существенного увеличения размеров органов. Именно поэтому промотор ВМГ нами был клонирован в бинарные векторы pCambia и использован в последующем для получения трансгенных растений, сверхэкспрессирующих гены, белковые продукты которых участвуют в регуляции размеров органов растений. Однако для фундаментальных исследований планировалось использовать также классический 35S промотор.

Глава 7. Роль генов, контролирующих клеточную пролиферацию в апикальной меристеме побега и зачатках органов, в регуляции размеров листьев, стебля и цветков

7.1. Конститутивная экспрессия гена *CLAVATA3 A. thaliana* в трансгенных растениях табака

Размеры органов растений контролируются не только скоростью и продолжительностью клеточного деления и роста клеток растяжением в растущих органах, но могут зависеть и от изначального количества клеток в центральной зоне АМП (Gonzalez et al., 2012), а также количества клеток рекрутированных из АМП в зачатки органов (Mizukami, Fischer, 2000). Клеточная пролиферация в АМП контролируется пептидом CLAVATA3 (CLV3), который секретируется в межклеточное пространство и способен передвигаться по апопласту. При этом в

зрелом состоянии этот пептид гликозилирован L-арабинозой и состоит из 12 аминокислот, которые составляют так называемый CLE-домен (Shinohara, Matsubayashi 2010). Пептид CLV3 через различные рецепторные молекулы, например, CLAVATA1, CLAVATA2/CORYNE и другие (Clark et al., 1997; Trotochaud et al., 1999; Zhu et al., 2010), способствует переходу недифференцированных клеток АМП к стадии дифференциации, рекрутированию их в зачатки органов и тем самым способствует уменьшению количества меристематических, а также стволовых клеток в центральной зоне (Clark et al., 1997). Известно, что в контроле деления и дифференциации клеток в АМП также участвует ген *WUSCHEL* (*WUS*), который кодирует гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, относящийся к группе WOX. Ген *WUS* экспрессируется в центральной зоне АМП в небольшой группе клеток, которые составляют организующий центр, поддерживая клетки в недифференцированном состоянии (Sablowski, 2011). Пептид CLV3 снижает уровень экспрессии гена *WUS,* тем самым ограничивая пространственно только центральной зоной АМП проявление WUS-фактора (Leibfried et al., 2005). В целом, между пептидом CLV3 и WUS-фактором функционирует хорошо изученная система отрицательной обратной связи (Sablowski, 2011). Также известно, что транскрипционный фактор WUS негативно регулирует экспрессию генов *ARR* типа А, сдерживающих передачу цитокининового сигнала (Leibfried et al., 2005; Sablowski 2011). Цитокинины стимулируют экспрессию генов *ARR* типа В, но, в то же время, опосредованно способствуют активации генов *ARR* типа А, разрывающих цепь сигналов, запущенных этой группой гормонов. WUS-фактор блокирует эту петлю обратной связи, что проявляется в цитокинин-индуцируемом поддержании клеток в недифференцированном состоянии. В зачатках органов пролиферацию клеток контролирует транскрипционный фактор AINTEGUMENTA (Mizukami, Fischer, 2000), который способствует поддержанию меристематической компетентности клеток. В молодых же органах рост преимущественно поддерживается за счет

повышения уровня клеточного растяжения, который индуцируется и обеспечивается экспансинами (Шарова, 2007) и ксилоглюканэндотрансгликозилазами (Miedes et al., 2011). В регуляции и координации процессов клеточного деления, дифференцировки и роста клеток растяжением в АМП, зачатках органов и молодых органах важную роль выполняют также фитогормоны, например, ауксины, цитокинины, брассиностероиды, гиббереллины и АБК (Huang et al., 2008; Veit, 2009). Таким образом, на сегодняшний день молекулярные механизмы регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки в АМП были довольно подробно изучены и описаны в литературе (Sablowski, 2011), также накапливаются данные о регуляции меристематической компетентности клеток в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000). Однако о влиянии изначального количества клеток, находящихся в центральной зоне АМП на конечные размеры органов мало что известно (Gonzalez et al., 2012). Исходя из этого, с целью выяснения особенностей взаимодействия между регуляцией клеточной пролиферации в АМП с делением и ростом клеток растяжением в растущих органах, нами была поставлена задача создать модельные трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген *CLV3 A. thaliana* под контролем 35S промотора. В *A. thaliana* сверхэкспрессия гена *CLV3* приводила к тому, что меристема побега прекращала закладку органов сразу же после появления первых листьев (Brand et al., 2000), лишь у части трансгенных растений меристема продолжала функционировать, побег формировался, но листья и цветки были уродливыми, а тычинки и плодолистики не развивались. В табаке же проявления данного гена могут быть не столь существенными, и это могло бы позволить выявить отклонения в морфофизиологических параметрах, фитогормональном статусе и в профиле экспрессии различных генов трансгенных растений и подойти ближе к пониманию вопроса о координации клеточной пролиферации в АМП, зачатках и молодых растущих органах.

7.1.1. Клонирование гена *CLAVATA3 A. thaliana* и создание целевых генно-инженерных конструкций

Для подбора праймеров и амплификации гена *CLV3 A. thaliana* была использована последовательность гена, зарегистрированная в GenBank под номером NM_128283. Участок ДНК *A. thaliana*, содержащий ген *CLV3,* был амплифицирован из тотальной ДНК, и его размер составил немногим более 750 пн (рис. 14а), что совпадало с теоретически ожидаемым размером в 783 пн. Ампликон был клонирован в фагмидном Т-векторе pKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемой последовательностью и не содержит замен нуклеотидов. Далее, в вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования. Ген *CLV3* был субклонирован в векторе pCambia 1301 с 35S кассетой по сайту рестрикции *Sma*I. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, ClaF и ClaR (табл. 1). Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны только в случае сочетания следующих пар ПЦР праймеров: 35SCambF/ClaR, ClaF/1301R, 35SCambF/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/ClaF, ClaR/1301 амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *CLV3*. После полной проверки полученный бинарный вектор с геном *CLV3* под контролем 35S промотора был введен в клетки *A. tumefaciens*. Агробактериальный клон, содержащий вектор pCambia 1301 с целевым геном в смысловой ориентации, был использован для трансформации листовых дисков табака.

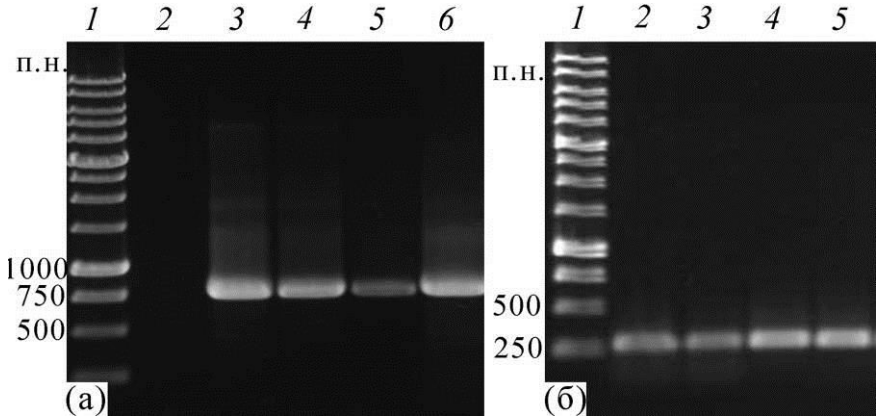


Рис. 14. Электрофореграмма ПЦР и ОТ-ПЦР гена *CLV3*: а – результаты ПЦР участка ДНК *A. thaliana*, содержащего ген *CLV3*. 1 - маркер молекулярной массы 250 пн-10000 пн (Сибэнзим, Россия), 2 – отрицательный контроль ПЦР, 3-6 – ампликоны гена *CLV3* размером 783 пн. б – результаты ОТ-ПЦР гена *CLV3*. 1 - маркер молекулярной массы 250 пн-10000 пн (Сибэнзим, Россия). 2-5 – ампликоны кДНК гена *CLV3* размером 285 пн (2 – растение №7, 3 - №14, 4 - №18, 5 - №20).

7.1.2. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *CLAVATA3*

В результате трансформации листовых дисков табака был отобран 21 трансгенный побег, из которых успешно укоренились на селективной среде лишь 12. Репортерный ген *GUS* экспрессировался в восьми отобранных растениях табака. Эти трансгенные растения с высоким уровнем экспрессии репортерного гена были акклиматизированы к условиям почвы. При выращивании поколения T_0 у трех растений (№14, №18 и №20) были выявлены определенные морфологические особенности, например, закругление и пятнистость листьев, их бледная окраска, а также отставание в росте (рис. 15). Экспрессию целевого гена удалось доказать только для четырех растений, в том числе и для растений №14, №18 и №20 (рис. 14б), причем размер ампликона при ОТ-ПЦР составил 285 пн, что совпадает с теоретически ожидаемым размером. Было решено отобрать растения под номерами 14, 18 и 20. Из них были получены семена и далее второе

поколение трансгенных растений табака (T_1) были использованы в дальнейших экспериментах по их морфофизиологической характеристике.

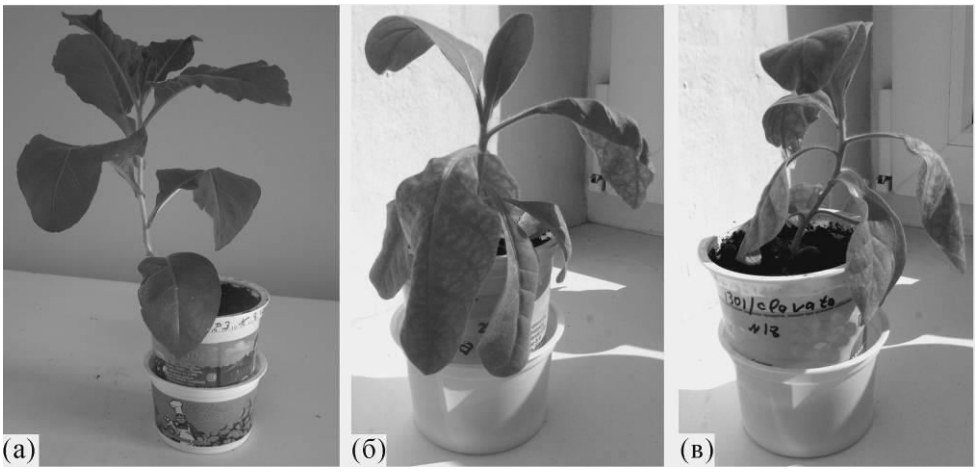


Рис. 15. Трансгенные растения табака с повышенной экспрессией гена *CLV3 A. thaliana* поколения T_0: а – контрольное растение линии №5, содержащее в геноме Т-ДНК вектора pCambia 1301; б – трансгенное растение табака линии №14, сверхэкспрессирующее ген *CLV3 A. thaliana*; в - трансгенное растение табака линии №18, сверхэкспрессирующее ген *CLV3 A. thaliana*.

Семена трех линий трансгенных растений второго поколения были высажены на селективную среду, где они показали классическое соотношение выживших и погибших 3:1, что косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Далее по 15 растений линий №14, №18 и №20 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфофизиологической характеристике. Для контроля использовали две линии трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (№5 и №19).

При выращивании на почве поколения T_1 трансгенных *35S::CLV3* растений табака, для всех трех линий (14, 18 и 20) были выявлены три различных фенотипа (рис. 16а). Они нами были обозначены как фенотип 1, фенотип 2 и фенотип 3. Фенотип 1 был характерен примерно для 7% всех растений, фенотип 2 для 15% растений, тогда как все остальные анализируемые растения относились к

фенотипу 3. Фенотип 2 и в особенности фенотип 1 наиболее сильно отличались от контрольных растений. Листья у растений фенотипа 1 были бледные, искривленные, на ощупь более твердые, шершавые (рис. 16д). Проводящая система листьев у этих растений была недоразвитой, размеры клеток нижнего и верхнего эпидермиса листьев увеличены в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 16ж). Размеры устьиц оставались неизменными, но их было очень мало, и они все были закрытыми. Лишь через три месяца у этих растений мог образоваться небольшой побег со светло-зелеными листьями, состоящими из крупных клеток. Довольно часто у растений фенотипа 1 побег вообще не образовывался, а у фенотипа 2 побег был укорочен и листья становились более длинными (рис. 16а). Для всех трех фенотипов был характерен высокий уровень экспрессии гена *CLV3* (рис. 17), что, судя по литературным данным (Brand et al., 2000) могло способствовать проявлению фенотипов 1 и 2. Вероятнее всего это связано со специфическим действием трансгена, так как из полученных нами данных можно сделать вывод, что для растений фенотипов 1 и 2 характерен все же более высокий уровень экспрессии гена *CLV3,* чем для растений фенотипа 3 (рис. 17). В то же время трансгенные растения с фенотипом 3, несмотря на относительно высокий уровень экспрессии гена *CLV3,* по ростовым параметрам приближались к контрольным растениям, видимо за счет функционирования компенсаторных механизмов (Mizukami, Fischer, 2000), с которыми исследователи часто сталкиваются при получении трансгенных растений. Мы предположили, что изучение растений фенотипа 3 может способствовать раскрытию некоторых молекулярных основ этого компенсаторного механизма. Поэтому при наших дальнейших исследованиях морфофизиологических параметров были использованы в основном трансгенные *35S::CLV3* растения табака, относящиеся к фенотипу 3.

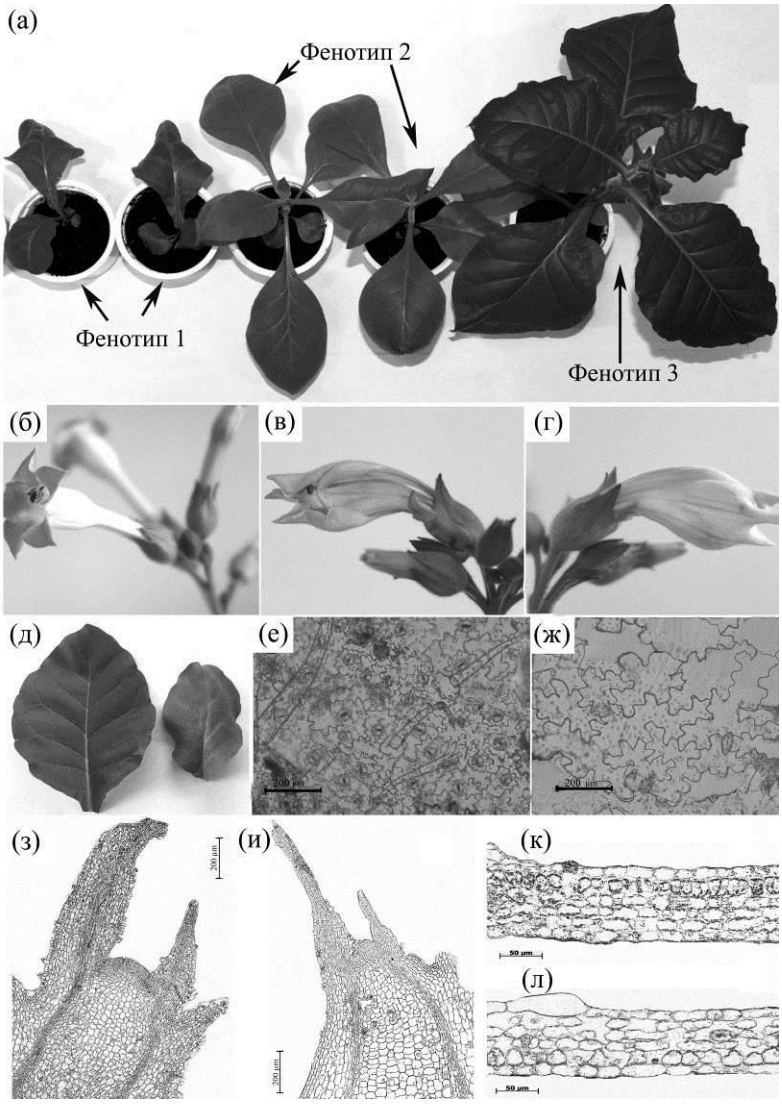


Рис. 16. Морфологические особенности некоторых трансгенных растений табака поколения T_1, сверхэкспрессирующих ген *CLV3 A. thaliana*: а – трехмесячные трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *CLV3* поколения T_1, относящиеся к трем разным фенотипам; б – цветки контрольных растений; в, г – цветки трансгенных растений поколения T_1 линии №18; д – сравнение листьев контрольных (слева) и трансгенного (справа) растения линии №18 фенотипа 1; е - клетки нижнего эпидермиса листьев контрольных растений; ж – клетки нижнего эпидермиса листьев трансгенных по гену *CLV3* растений линии №18, фенотипа 1; з – продольный срез верхушки побега контрольного растения; и - продольный срез верхушки побега трансгенного растения линии №18, фенотипа 3; к – поперечный срез листа контрольного растения; л - поперечный срез листа трансгенного растения линии №18, фенотипа 3.

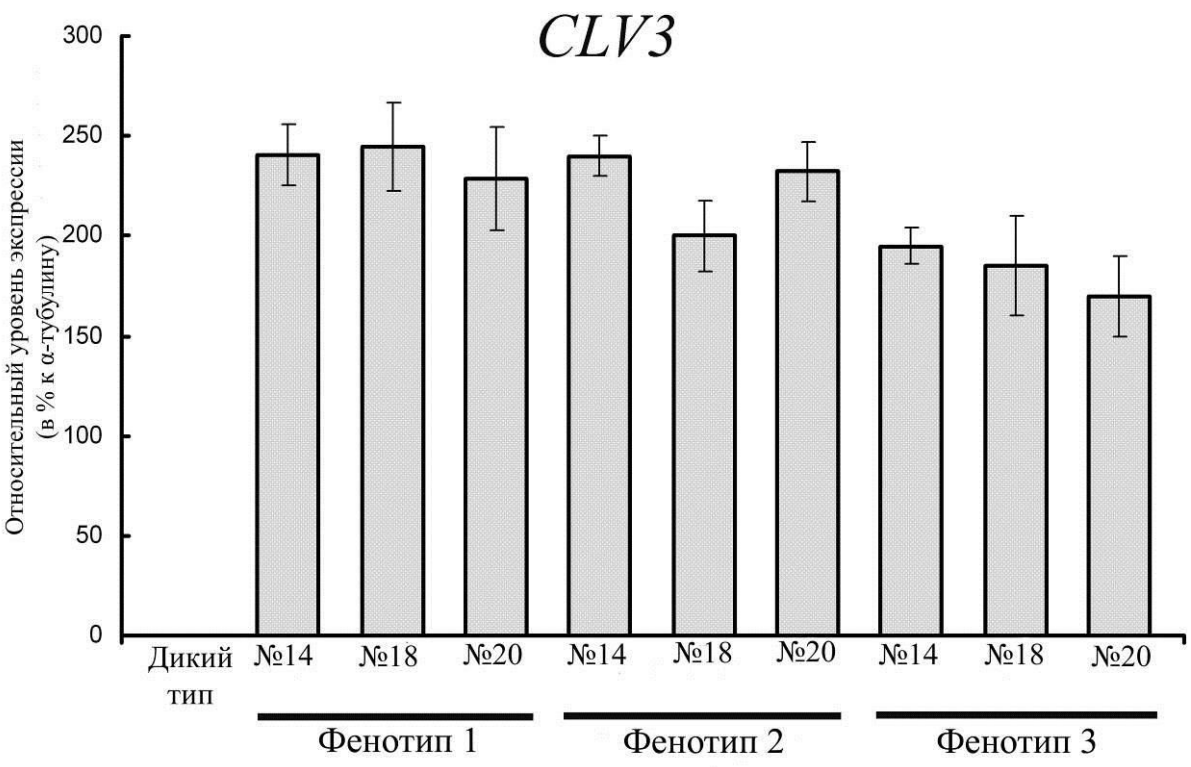


Рис. 17. Количественный анализ уровня экспрессии гена *CLV3* в трех линиях отобранных трансгенных растений, относящихся к трем выявленным фенотипам. Для ОТ-ПЦР были взяты листья №3.

Морфологический анализ показал, что растения линий №18 и №20 достоверно между собой не различаются ни по одному морфологическому параметру, поэтому далее в таблице 2 приводятся данные только для двух линий - №14 и №18. Линейные размеры листьев у опытных трансгенных растений фенотипа 3 и контрольных растений в период цветения достоверно не различались. Различий не наблюдалось и при измерении площади листьев (табл. 2). Соотношение длины и площади листьев у всех анализируемых растений составило примерно 0,09-0,13, что свидетельствует о том, что по форме листья также были весьма схожими. Высота стебля лишь у линии опытных растений №18 была снижена на 17% по сравнению с контролем, размеры же стебля у растений линии №14 не изменялись. Размеры цветка у опытных растений были лишь незначительно уменьшены, по сравнению с размерами цветка контрольных.

В то же время у части анализируемых растений, в отличие от контроля, наблюдались необычные цветки (рис. 16в, г), что выражалось в асимметричности венчика, в наличии больших разрывов в венчике и чашечке, слиянии тычинок с лепестками и их недоразвитии. Отметим также, что опытные растения всегда зацветали раньше контрольных, при этом растения линии №14 в среднем на 9 дней, а растения линии №18 на 25 дней раньше растений, содержащих Т-ДНК вектора pCambia 1301. Также у сверхэкспрессирующих ген *CLV3* растений табака наблюдалось сокращение количества цветков, например, у линии №18 наблюдалось их уменьшение в среднем на 2. В целом растения линии №14 фенотипа 3 визуально мало отличалась от контрольных растений, однако при исследовании растений линии №18 фенотипа 3, кроме уменьшения размеров стебля, было выявлено уменьшение числа листьев (на три листа) и иногда изменение формы листьев, выражавшееся в их небольшой удлиненности относительно ширины, что их сближало с фенотипом 2.

Наиболее интересные данные были получены нами при измерении размеров клеток у анализируемых растений. Оказалось, что, несмотря на одинаковые размеры листьев у исследуемых растений, размеры клеток у опытных растений всегда были заметно больше, чем у контрольных форм. У опытных растений линии №14 размеры клеток по сравнению с контрольной группой были увеличены в среднем на 38%, а число клеток на 1 мм^2 листовой поверхности уменьшалось на 28%. Еще более значительным оказалось увеличение размеров клеток эпидермиса листьев у растений линии №18 и составило в среднем 64% по сравнению с контролем. При этом число клеток эпидермиса листьев, приходящихся на 1 мм^2 листовой поверхности, наоборот, уменьшалось на 36% (табл. 2). Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев и эпидермиса цветков.

Таблица 2. Морфометрические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301, и трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих ген *CLV3 A. thaliana*, относящиеся к фенотипу 3[a].

Параметр	Линии контрольных растений pCambia 1301		Линии опытных растений *35S::CLV3*	
	№5	№19	№14	№18
Длина листьев, см				
30 дней	4,3±0,6	3±0,2	4,1±0,4	7,1±1,2*
45 дней	9,6±1,6	7,1±0,8	10,3±0,4	13,4±2,0*
60 дней	14,7±1,6	11,5±0,4	16,4±0,8	15,2±2,2
В период цветения	16,6±1,6	16,5+1,0	17,1±0,6	16,6±0,8
Площадь трех самых крупных листьев, см²	129,7±21,6	169,3±17,6	153,8±9,6	129,4±14,2
Высота стебля, см	81,7±4,6	80,1±6,8	87,7±3,8	**67,5±4,4***
Длина цветка, см	4,49±0,04	4,50±0,06	4,37±0,06*	4,45±0,04
Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм²	15517±1408	13960±1062	**20397±860***	**24149±2640***
Число клеток эпидермиса листьев на 1 мм²	7,4±0,6	7,9±1,0	**5,5±0,2***	**4,9±0,6***
Число листьев	17,9±1,0	18,7±0,6	17,2±0,8	**15,3±1,2***
Время цветения, дней после акклиматизации	107.8±8,8	110.6±4,2	100,1±6,6	**83,7±2,6***
Число цветков	5,6±0,4	5,8±1.2	4±0,6	**3,8±0,4***

[a]Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

Продольный срез верхушки трансгенных растений фенотипа 3 (то есть зона АМП с образующимися зачатками листьев) показал уменьшение объёма апикальной меристемы у трансгенных растений и в целом, уменьшение количества клеток в верхушке побега (рис. 16з, и). Но при этом клетки оказались увеличены в размерах, поэтому в целом размеры самого растения у фенотипа 3 не

сильно отличались от контроля. Молодые листья, растущие из АМП, также у трансгенных растений видоизменялись. Поперечный срез листа трансгенных растений фенотипа 3 показал наличие в основном губчатой паренхимы с довольно крупными межклетниками, что косвенно могло означать недоразвитость фотосинтетического аппарата (рис. 16к, л).

Поскольку ключевая роль в регуляции онтогенеза растений отводится гормональной системе, особый интерес представляло проведение сравнительного анализа концентрации различных фитогормонов в одних и тех же листьях опытных и контрольных растений. В результате проведенных исследований, нами было обнаружено, что трансгенные растения линии №18, отличаются более высоким уровнем содержания цитокининов в сравнении с контрольными растениями линии №5 (рис. 18). Например, если концентрация цитокининов в седьмых листьях контрольных растений (лист №5) в среднем составляла 7 нг/г сырой массы, то в опытных растениях их содержание достигало около 32 нг/г сырой массы. Интересно отметить, что по содержанию ИУК и АБК контрольные и опытные растения почти не различались (рис. 18).

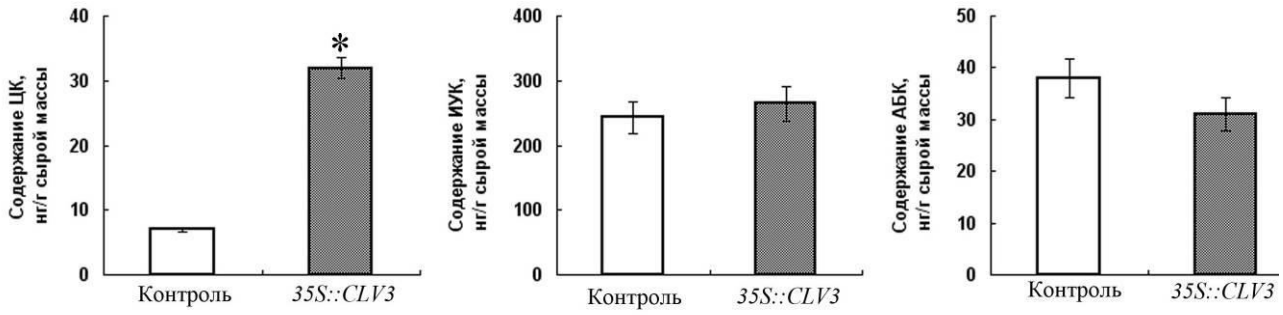


Рис. 18. Сравнительный анализ содержания фитогормонов в 7-м листе (лист №5) двухмесячных контрольных (содержащих Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена) и трансгенных по гену *CLV3* растений табака (*35S::CLV3*). Данные представлены в виде среднего арифметического± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Размеры клеток в листьях трансгенных растений могли увеличиваться за счет стимуляции клеточного растяжения, которое обеспечивается, в том числе, экспансинами и ксилоглюканэндотрансгликозилазами. Поэтому можно предположить, что одной из молекулярных основ выявленного нами компенсаторного роста клеток может оказаться повышение уровня экспрессии генов, кодирующих белки, контролирующие и осуществляющие разрыхление клеточной стенки. Также нельзя заранее исключать наличие изменений в уровне экспрессии генов, белковые продукты которых участвуют в регуляции клеточного деления.

Исходя из вышесказанного, нами в трансгенных растениях табака *35S::CLV3* линии №18, фенотипа 3 был проанализирован уровень содержания транскриптов генов *NtANTL, NtEXPA4* и *NtEXGT,* первый из которых участвует в регуляции клеточного деления (Mizukami, Fischer, 2000), а два последних кодируют белки, обеспечивающие рост клеток растяжением (Link, Cosgrove, 1998). В трансгенных растениях табака наблюдалось уменьшение уровня экспрессии гена *NtANTL*, как в верхушке побега (в 1,4 раза), так и в третьих от верхушки побега молодых листьях (лист №3) (в 2,7 раза) (рис. 19а, г), что соотносится с данными о снижении количества клеток в листьях опытных растений. В то же время в верхушках побега опытных растений наблюдалось повышение уровня содержания транскриптов гена *NtEXPA4* (рис. 19а), что возможно, является отражением функционирования компенсаторных механизмов, направленных на поддержание размеров органов в пределах нормы в условиях уменьшения количества клеток, приходящихся на один орган. В то же время в молодых листьях (лист №3) опытных растений наблюдается небольшое снижение уровня экспрессии гена *NtEXPA4* (рис. 19д), что можно связать с более ранним старением органов у опытных растений по сравнению с контролем, так как пептид CLV3 способствует уменьшению пула стволовых клеток, ускоряя их дифференцировку (Sablowski, 2011). Уровень содержания транскриптов гена *NtEXGT* в анализируемых растениях менялся в меньшей степени, однако, как и в случае с

геном *NtEXPA4*, в верхушках побега наблюдалось увеличение его уровня экспрессии (рис. 19в), а в листьях №3, наоборот его снижение (рис. 19е).

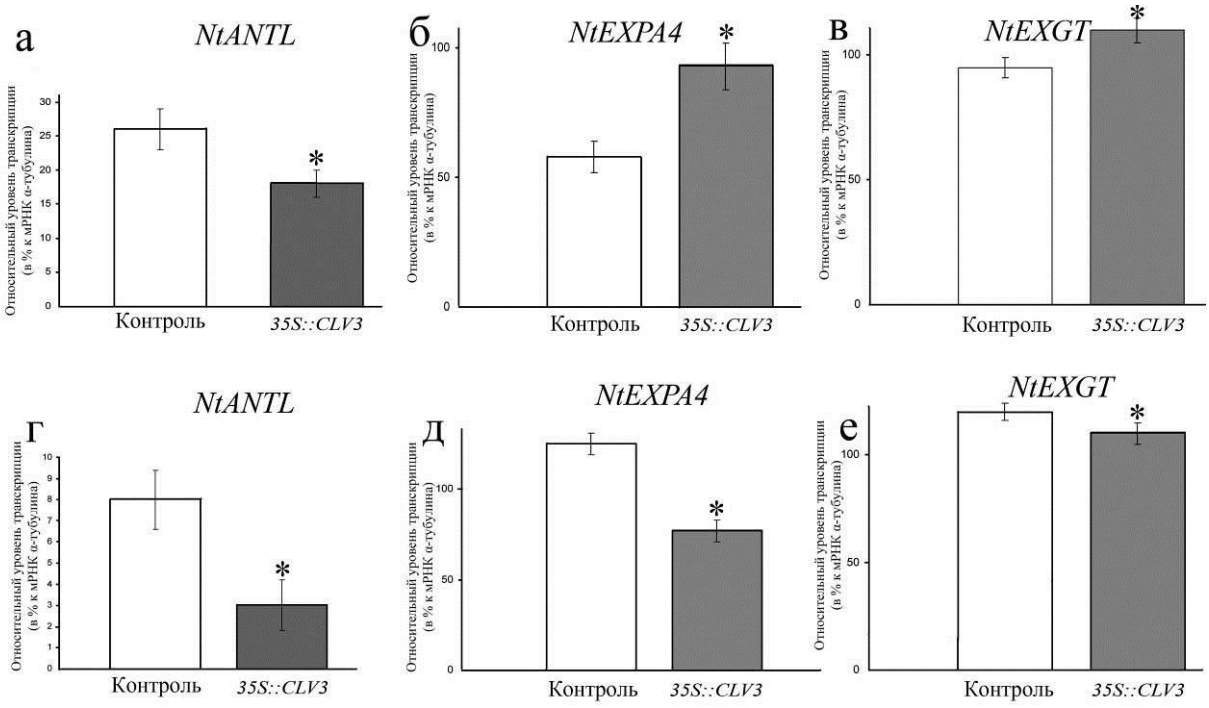


Рис. 19. Анализ уровня содержания транскриптов генов *NtANTL*, *NtEXPA4* и *NtEXGT* в трансгенных растениях табака, сверхэкспрессирующих ген *CLV3* по сравнению с контрольными растениями, содержащими Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301: а, б, в – верхушки побега; г, д, е – молодые листья (листья №3). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Чтобы подтвердить наши предположения о более быстром старении клеток в органах у *35S::CLV3* растений по сравнению с контролем нами был проведен анализ содержания в них 18S рРНК. Так как уровень 18S рРНК является показателем интенсивности биосинтеза белка, справедливо предполагать, что его содержание будет больше в молодых органах, нежели в органах, состоящих из более старых клеток (Goncalves et al., 2005, Kozera, Rapacz, 2013). В результате проведенного нами эксперимента было показано, что если в верхушках побега опытных растений наблюдается лишь незначительное снижение уровня

экспрессии 18S рРНК (рис. 20а), то уже в листе №3 его уровень экспрессии снижается в 4,8 раза (рис. 20б) по сравнению с контролем.

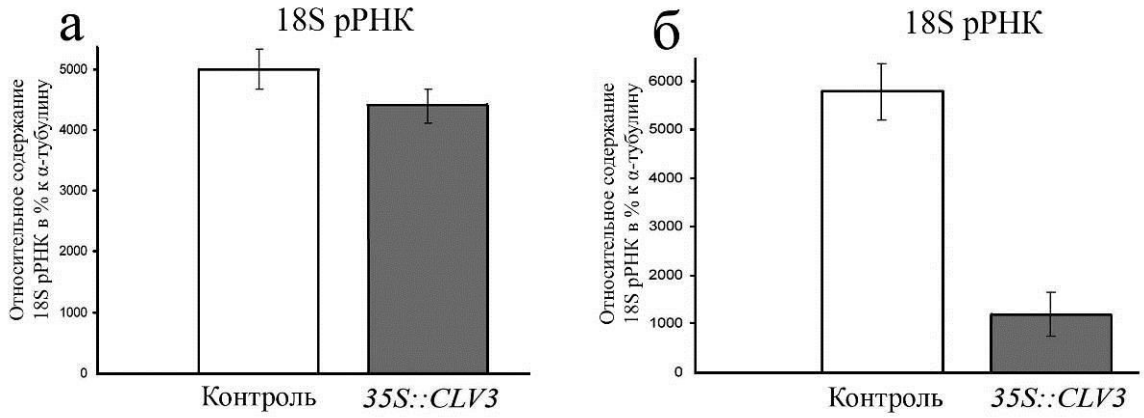


Рис. 20. Анализ содержания 18S рРНК в трансгенных растениях *35S::CLV3* и в растениях контрольной группы, содержащей Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена.

Итак, нами было показано, что в основе компенсаторного механизма, направленного на достижение нормальных размеров органов у трансгенных *35S::CLV3* растений табака может лежать рост клеток растяжением, индуцированный экспансинами и ксилоглюканэндотрансгликозилазами. Однако эти данные, безусловно, требовали дополнительных доказательств. Наибольший уровень фенотипического проявления сверхэкспрессии гена *CLV3* был характерен для фенотипа 1 (рис. 16а). Меньшие изменения были отмечены в растениях фенотипа 2. Наибольшая степень компенсаторного увеличения размеров клеток была выявлена у растений фенотипа 1 (рис. 16ж). В растениях фенотипа 2 также наблюдалось компенсаторное увеличение размеров клеток, причем, в большей степени, чем у растений фенотипа 3. Таким образом, наибольшая степень компенсаторного роста клеток была характерна для фенотипа 1, чуть меньшая степень для фенотипа 2 и наименьшая степень для фенотипа 3. Исходя из вышесказанного, представляло интерес определение уровня экспрессии экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в растениях всех трех фенотипов

и сравнение полученных данных. Для анализа были взяты вторые по размеру листья растений фенотипа 1, так как эти растения состояли лишь из двух листьев (рис. 16а), а также листья №4 растений фенотипа 2 и листья №4 фенотипа 3. Было показано, что уровень экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* последовательно снижается от фенотипа 3 к фенотипу 1 (рис. 21а, в). В то же время, содержание транскриптов гена *NtEXGT*, наоборот, оказалось наиболее высоким у растений фенотипа 1 (рис. 21г). Что касается гена *NtEXPA4*, то здесь, как и в случае с геном *NtEXGT*, уровень его экспрессии в растениях фенотипа 1 был выше, чем у растений фенотипа 2 (рис. 21б). Таким образом, у растений фенотипа 1, имеющих наименьшее количество клеток в органе и наибольшие размеры отдельных клеток наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *NtEXGT* и *NtEXPA4*.

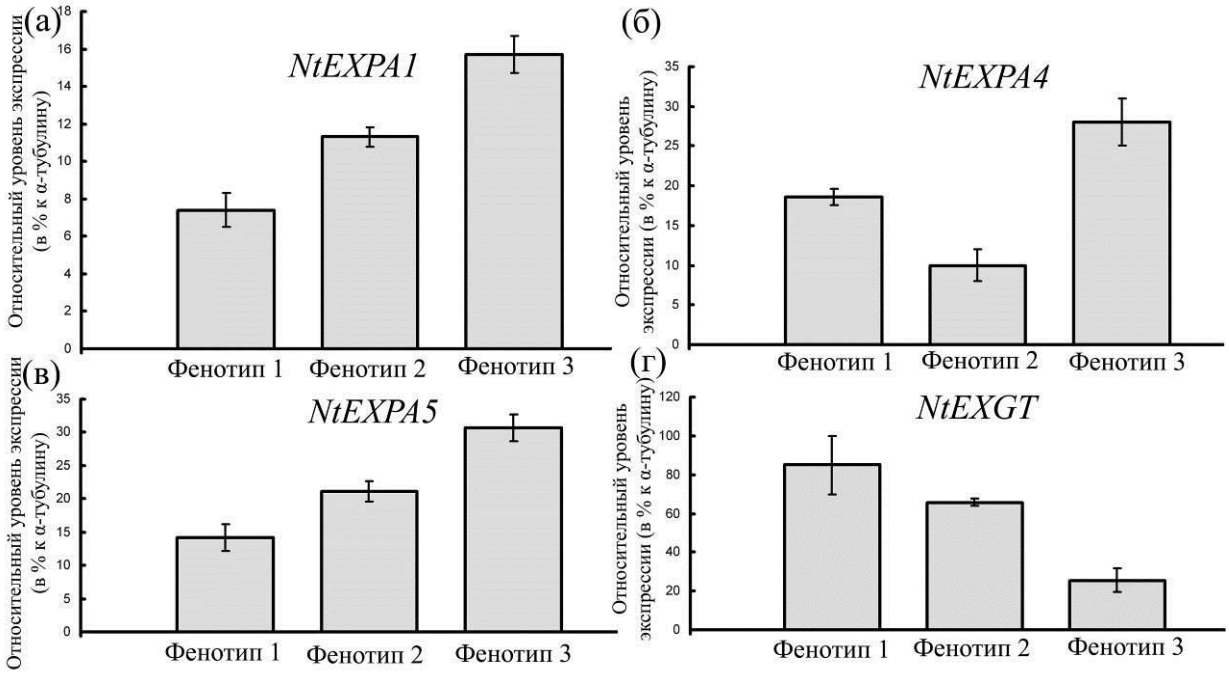


Рис. 21. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtEXPA1* (а), *NtEXPA4* (б), *NtEXPA5* (в) и *NtEXGT* (г) в трансгенных растениях линии №18 трех фенотипов (1, 2 и 3).

Таким образом, в данном исследовании получили подтверждение наши предыдущие результаты о том, что в компенсаторном увеличении размеров

клеток в трансгенных растениях табака *35S::CLV3* могут принимать участие экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы и в частности белки, кодируемые генами *NtEXPA4* и *NtEXGT*.

Учитывая значительное повышение уровня содержания цитокининов в трансгенных растениях *35S::CLV3* (рис. 18), мы предположили, что именно этот фитогормон может участвовать в регуляции компенсаторного увеличения размеров клеток путем стимуляции экспрессии белков, обеспечивающих рост клеток растяжением. Так как в трансгенных растениях увеличивалось содержание транскриптов генов *NtEXGT* и *NtEXPA4*, то, в первую очередь, возникает мысль, что именно эти гены могут оказаться мишенями цитокининов. Для проверки данной гипотезы мы провели экзогенную обработку табаков дикого типа БАП, ИУК, НУК, ЭБ и ГКЗ. Далее провели количественную ОТ-ПЦР в листьях №4. Было показано, что под влиянием цитокининов в растениях дикого типа повышается уровень экспрессии генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXGT* (рис. 22а, б, г). Однако наиболее существенное повышение уровня экспрессии по сравнению с контролем было характерно именно для генов *NtEXPA4* и *NtEXGT*, которые вероятнее всего являются цитокинин-индуцируемыми. Таким образом, нами было показано, что гены *NtEXPA4* и *NtEXGT* на самом деле могут быть мишенями цитокининов, по крайней мере, в растениях табака дикого типа.

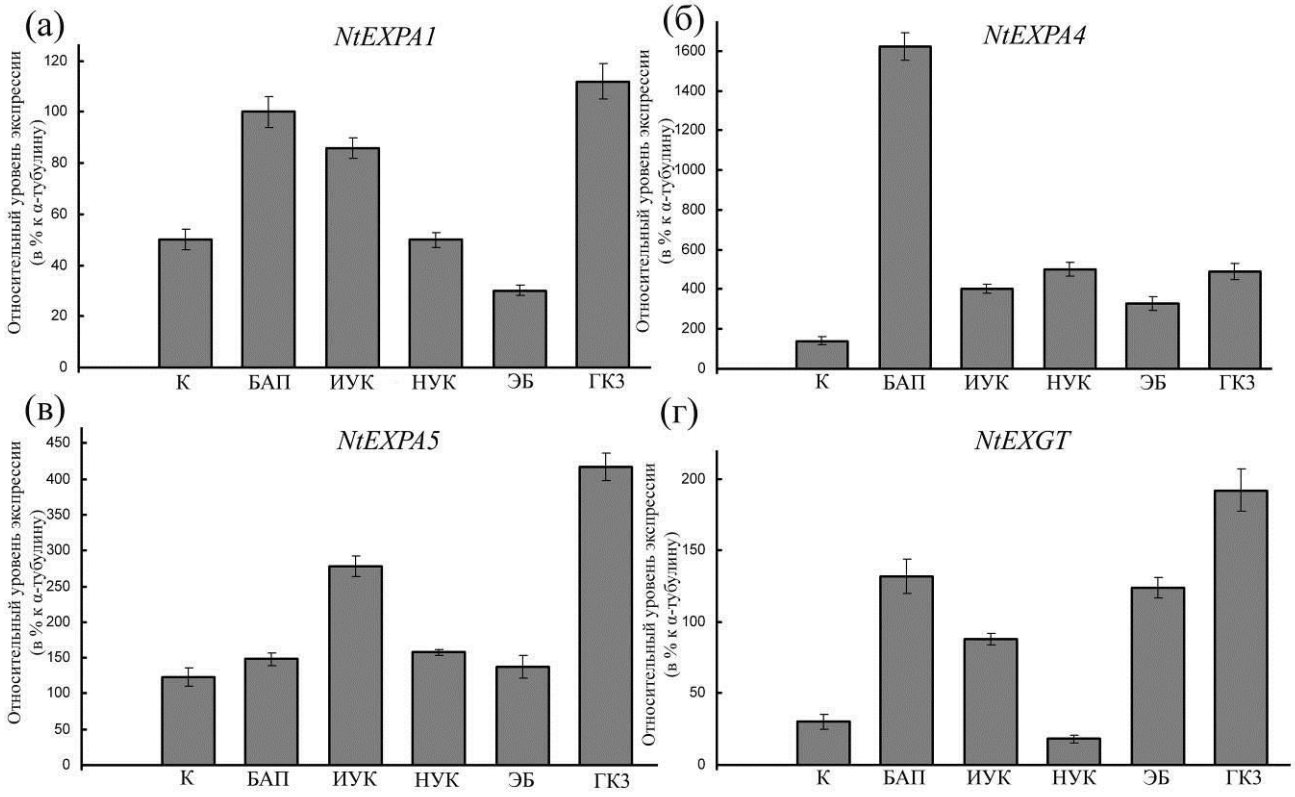


Рис. 22. Изменения уровня экспрессии генов *NtEXPA1* (а), *NtEXPA4* (б), *NtEXPA5* (в) и *NtEXGT* (г) в нетрансгенных растениях табака дикого типа в ответ на экзогенную обработку фитогормонами.

Исходя из литературных (Dodsworth, 2009; Sablowski, 2011) и полученных нами данных следует, что при сверхэкспрессии гена *CLV3* блокируется цитокининовый сигнал, направленный на поддержание клеточных делений на высоком уровне. Возможно, из-за этого компенсаторно возрастает содержание цитокининов, которые в свою очередь могут принимать участие в индуцировании роста клеток растяжением путем стимуляции экспрессии генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. Возможно при участии этого механизма, в том числе, трансгенные растения *35S::CLV3* растения табака фенотипа 3 достигают нормальных размеров и визуально мало отличаются от растений дикого типа.

С целью проверки гипотезы о блокировании цитокининового сигнала, нами была поставлена задача определить уровень содержания транскриптов гена *CYCLIN D3;1* (*NtCYCD3;1*, AB243209) в ответ на экзогенную обработку БАП как в растениях табака дикого типа, так и в трансгенных *35S::CLV3* растениях.

Известно, что ген *CYCLIN D3;1* кодирует один из циклинов (Novikova et al., 2013), индуцируется цитокининами (Dewitte et al., 2003) и наибольший уровень его экспрессии наблюдается на стадии митоза (Delmas et al., 2003). Результаты проведенного нами количественного ОТ-ПЦР показали, что в верхушке побега с листом №1 и в листьях №2 растений дикого типа в ответ на экзогенную обработку БАП уровень экспрессии гена *NtCYCD3;1* повышается приблизительно в 3 раза (рис. 23а, б). В то же время в верхушках побега трансгенных *35S::CLV3* растений табака уровень экспрессии практически не меняется при экзогенной обработке БАП (рис. 23в). В листьях №2 трансгенных *35S::CLV3* растений табака уровень экспрессии гена *NtCYCD3;1* все же возрастает, в сравнении с контролем (рис. 23г), однако в меньшей степени, чем у растений табака дикого типа.

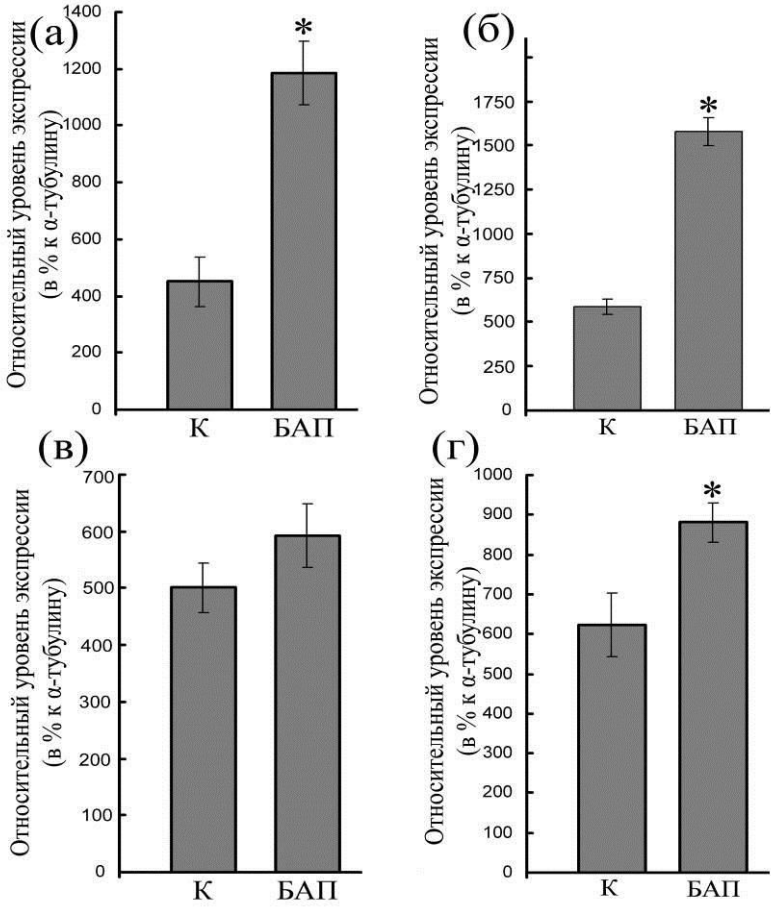


Рис. 23. Изменения уровня экспрессии гена *NtCYCD3;1* в верхушках побегов (а) и листьях №2 (б) табака дикого типа, а также в верхушках побегов (в) и листьях №2 (г) *35S::CLV3* растений табака (линия №18, фенотип 3) в ответ на экзогенную обработку 6-БАП. К – контроль, БАП – 6-бензиламинопурин.

Исходя из того, что в листьях №2 *35S::CLV3* растений табака цитокинины уже были способны стимулировать экспрессию гена *NtCYCD3;1* (рис. 23г), а также, судя по литературным данным (Dodsworth, 2009; Sablowski, 2011), мы предполагаем, что механизм блокирования цитокининового сигнала пептидом CLV3 функционирует только в верхушках побегов. Вероятно в листьях, несмотря на высокий уровень экспрессии гена *CLV3* (рис. 17), его продукт не может оказывать своего специфического влияния, по крайней мере, на транскрипционный фактор WUS, так как последний экспрессируется и функционирует только в организующем центре АМП (Lenhard et al., 2002; Leibfried et al., 2005). Из этого следует, что все выявленные нами морфофизиологические особенности трансгенных *35S::CLV3* растений возникают, не из-за негативного влияния пептида CLV3 на клеточное деление в зачатках и молодых органах, а вероятнее всего, в результате специфичного взаимодействия между генами и их продуктами, функционирующими в АМП. Действительно, 35S промотор проявляет свою активность во всех клетках АМП (см. главу 1), и поэтому конститутивная экспрессия гена *CLV3* способствует существенному уменьшению зоны экспрессии транскрипционного фактора WUS. Несмотря на то, что нами эти предположения были подтверждены результатами молекулярного анализа листьев №2, представлял определенный интерес изучение листьев более старшего возраста. Нами был проведен количественный анализ уровня экспрессии гена *NtCYCD3;1* в листьях №3 растений дикого типа и *35S::CLV3* растений при экзогенной обработке БАП. Было показано, что в листьях №3 (рис. 24) трансгенных *35S::CLV3* растений, цитокинины способствуют гораздо большему повышению уровня экспрессии гена *NtCYCD3;1*, чем в листьях №2 (рис. 23г). Это означает, что цитокининовый сигнал, направленный на регуляцию клеточного деления в листьях трансгенных *35S::CLV3* растений полностью восстанавливается. Поэтому можно предполагать, что уровень клеточных делений в листьях *35S::CLV3* растений снижается в основном из-за более быстрого старения клеток (Gonzalez et al., 2012), которые перестают быть способными делиться, а могут лишь расти растяжением.

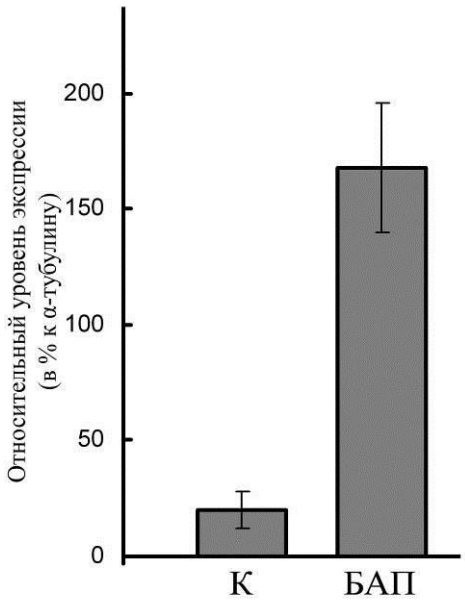


Рис. 24. Увеличение уровня содержания транскриптов гена *NtCYCD3;1* в листьях №3 трансгенных *35S::CLV3* растений табака в ответ на экзогенную обработку 6-БАП.

Итак, мы предполагаем, что в *35S::CLV3* растениях повышается содержание цитокининов, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. В растениях табака дикого типа цитокинины повышали уровень содержания транскриптов генов *NtEXPA4* и *NtEXGT* (рис. 22а, г), однако оставалось неясным, не блокируется ли цитокининовый сигнал и в случае регуляции роста клеток растяжением. Для ответа на данный вопрос, нами был проведен анализ уровня экспрессии гена *NtEXPA4* в трансгенных *35S::CLV3* растениях в ответ на экзогенную обработку цитокининами. Было показано, что также как и в табаках дикого типа, уровень экспрессии гена *NtEXPA4* повышался в ответ на экзогенную обработку 6-БАП как в листе №2 (рис. 25а), так и в листе №3 (рис. 25б). Это означает, что сверхэкспрессия гена *CLV3* не является препятствием для стимуляции экспрессии экспансинов цитокининами в листьях. Таким образом, полученные нами данные говорят о том, что в трансгенных *35S::CLV3* растениях из-за повышения содержания цитокининов увеличивается уровень экспрессии как циклинов, так и экспансинов. Однако при этом повышается лишь скорость и продолжительность роста клеток растяжением, а уровень клеточного деления остается неизменной. Видимо, это связано с более быстрым переходом клеток к дифференцировке и более быстрым их старением. А, как известно, клетки в процессе развития листьев прекращают делиться

гораздо раньше, чем прекращают расти растяжением (Gonzalez et al., 2012). Более того, клетки могут расти вплоть до окончательного созревания листьев.

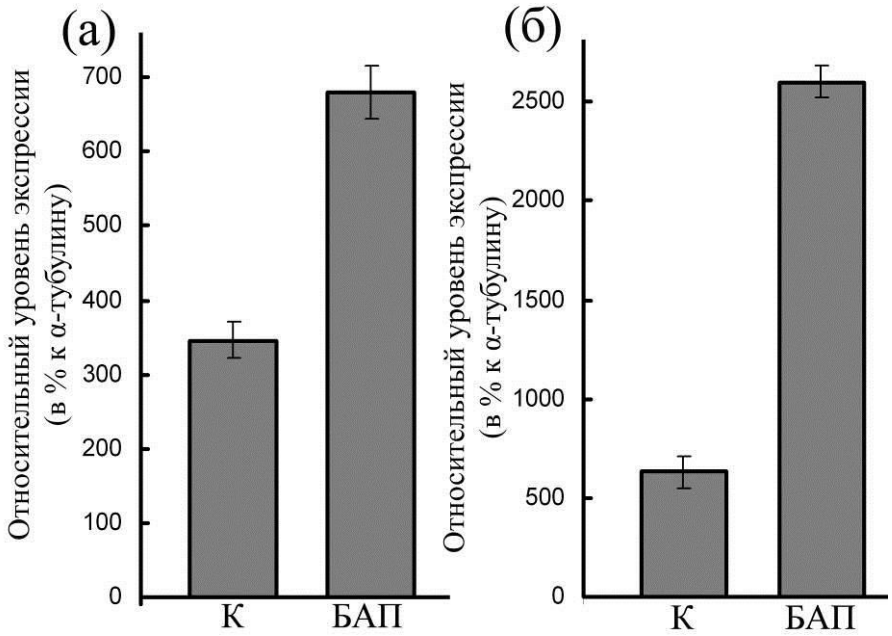


Рис. 25. Увеличение уровня содержания транскриптов гена *NtEXPA4* в листьях №2 (а) и листьях №3 (б) трансгенных *35S::CLV3* растений табака в ответ на экзогенную обработку БАП. К – контроль, БАП – 6-бензиламинопурин.

7.1.3. Обсуждение результатов

Результаты проведенного нами морфофизиологического анализа подтверждают литературные данные о том, что продукт гена *CLV3* способствует снижению числа клеток в центральной зоне АМП (Brand et al., 2000) и как следствие уменьшается число клеток, приходящихся на один орган (Gonzalez et al., 2012). Наши данные также позволяют говорить о тесной взаимосвязи регуляции клеточной пролиферации в АМП и в зачатках листьев. Сокращение времени зацветания у трансгенных растений, по-видимому, обусловлено тем, что экспрессия *CLV3* способствует более быстрой дифференцировке клеток, в то время как WUS-фактор ответственен за поддержание меристематически компетентных клеток в центре апикальной меристемы побега (Leibfried et al., 2005). Уменьшение количества листьев исследуемых растений, вероятно, связано с более ранним переходом к стадии цветения. В целом, полученные нами

трансгенные *35S::CLV3* растения табака характеризовались сокращением срока вегетации и отцветали быстрее контрольных растений.

Из литературных данных известно, что конститутивная экспрессия гена *CLV3* приводит к уменьшению уровня экспрессии гена *WUS*, что в свою очередь сопровождается блокированием цитокининового сигналинга клеточного деления за счет подавления экспрессии генов *ARR* типа B продуктами генов *ARR* типа A (Осипова и др., 2006). Концентрация цитокининов в трансгенных растениях *35S::CLV3* вероятнее всего повышается за счет действия компенсаторных механизмов, направленных на снижение эффекта блокирования цитокининового сигналинга, направленного, в свою очередь, на поддержание стволовых клеток в недифференцированном состоянии. Так как цитокининовый клеточный ответ, выражающийся в более длительном сохранении у клеток способности делиться, блокируется на уровне генов первичного ответа, то независимо от количества этого фитогормона в тканях, уровень клеточной пролиферации снижается. Все это способствует уменьшению количества клеток в АМП, снижению их количества в зачатках органов и как следствие все органы образуются из меньшего количества клеток. Конститутивная экспрессия гена *CLV3* способствовала снижению уровня экспрессии гена *NtANTL* не только в листьях, но и в верхушке побега. В связи с этим можно предположить, что это связано не только с более быстрым старением клеток, а, возможно, ген *NtANTL* также, как и ген *NtCYCD3;1* относится к системе цитокининового сигналинга, контролирующего не только клеточное деление, но и пролонгирующего меристематическую компетентность клеток (Mizukami, Fischer, 2000). Действительно, нами позже было показано, что цитокинины способны индуцировать экспрессию гена *NtANTL* как в верхушке побега, так и в молодых листьях (см. раздел 7.2.1). Исходя из этих данных, можно предполагать, что продукты генов *ARR* типа B, как гены первичного ответа на цитокинины (Осипова и др., 2006), способны активировать экспрессию транскрипционного фактора NtANTL, однако здесь требуются дополнительные исследования.

Несмотря на существенное уменьшение количества клеток, из которых образуется орган, уменьшения размеров органов у большинства трансгенных

растений *35S::CLV3* не происходило. Было показано, что в листьях и цветках трансгенных растений увеличиваются размеры отдельных клеток, за счет чего трансгенные растения и достигали нормальных размеров. Так как трансгенные растения характеризовались повышением содержания цитокининов, а содержание ауксинов и АБК оставалось неизменным, мы предположили, что именно цитокинины задействованы в регуляции компенсаторного увеличения размеров клеток у трансгенных растений. В результате проведенного молекулярного анализа было показано, что в верхушке побега трансгенных растений наблюдается увеличение уровня экспрессии генов *NtEXPA4* и *NtEXGT*, продукты которых контролируют и обеспечивают растяжение клеточной стенки. Однако уже в листьях трансгенных растений наблюдалось небольшое уменьшение уровня экспрессии этих же генов *NtEXPA4* и *NtEXGT*. По нашим данным, уровень экспрессии генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз наиболее высок в молодых, интенсивно растущих органах и снижается с увеличением возраста органа (см. главу 9). Поэтому, исходя из этого и данных анализа содержания 18S рРНК (рис. 20) справедливо предполагать, что снижение уровня экспрессии генов *NtEXPA4* и *NtEXGT* в листьях трансгенных растений связано с более быстрым старением клеток в трансгенных *35S::CLV3* растениях. Молекулярный анализ листьев трансгенных растений трех различных фенотипов позволил определить, что наиболее вероятными участниками выявленного нами компенсаторного механизма являются экспансин NtEXPA4 и эндоксилоглюкантрансфераза NtEXGT. Вероятнее всего в обеспечении компенсаторного роста клеток растяжением участвует и множество других белков, однако большинство из них остается пока неизвестным. Также из наших данных следует, что именно цитокинины индуцируют экспрессию генов *NtEXPA4* и *NtEXGT*. Экзогенные ауксины тоже индуцировали экспрессию генов *NtEXPA4* и *NtEXGT*, но в меньшей степени, чем цитокинины. К тому же содержание ауксинов в трансгенных растениях не повышалось, что предполагает участие именно цитокининов, а также генов *NtEXPA4* и *NtEXGT* в компенсаторном увеличении размеров клеток в листьях трансгенного табака.

Из литературных данных следовало, что пептид CLV3 может блокировать цитокининовый сигнал через влияние на транскрипционный фактор WUS (Осипова и др., 2006). Эти данные нам частично удалось подтвердить, по крайней мере, на примере гена *NtCYCD3;1*. Однако при этом, цитокинины были способны индуцировать экспрессию гена *NtEXPA4*, то есть в случае с экспансинами блокирования сигнала не происходило. Это может говорить о том, что клеточное деление и рост клеток растяжением контролируется цитокининами через разные системы клеточной сигнализации. Однако в литературе встречается крайне мало данных о механизмах регуляции цитокининами роста клеток растяжением (см. главу 3).

7.2. Участие гена *AINTEGUMENTA* и его ортологов в регуляции размеров надземных органов

Меристематические клетки центральной зоны АМП постепенно переходят к зонам, где формируются зачатки органов, которые растут в основном за счет интенсивных клеточных делений (Dodsworth, 2009). Чем больше клеток образуется в зачатках органов за счет их деления, тем из большего количества клеток будет состоять в итоге орган (Gonzalez et al., 2012). В свою очередь, от количества клеток в органе зависят их конечные размеры (Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003; Gonzalez et al., 2012). Пролиферация клеток в зачатках органов контролируется транскрипционным фактором AINTEGUMENTA, который способствует увеличению продолжительности клеточных делений путем более длительного сохранения меристематической компетентности клеток (Mizukami, Fischer, 2000). Данный транскрипционный фактор был изучен у *A. thaliana* (Klucher et al., 1996; Krizek, 1999; Mizukami, Fischer, 2000), однако в других растениях, в том числе хозяйственно-ценных, он остается неизученным. Гены-мишени транскрипционного фактора ANT до сих пор остаются неизвестными, также мало известно о регуляции экспрессии самого гена *ANT*. Так как сверхэкспрессия гена *ANT* способствовала увеличению размеров органов у трансгенных растений *A. thaliana*, представляет также большой интерес

испытание данного гена в гетерологичных условиях, а также изучение гомологов гена *ANT* в геномах хозяйственно-ценных растений.

7.2.1. Исследование функций гена *AINTEGUMENTA* табака

Основным модельным объектом в нашей работе является табак, геном которого к 2015 году не был секвенирован. Поэтому нами была поставлена задача, в первую очередь, изучить ген *ANT* у *N. tabacum*. Ранее у табака был клонирован *ANT*-подобный ген, который получил название *NtANTL* (AY461432), открытая рамка считывания которой оказалась равной 1932 пн (Rieu et al., 2005), причем результаты секвенирования показали наличие значительной гомологии с геном *AtANT A. thaliana*. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *NtANTL* был обнаружен в пестике, но содержание его мРНК детектировалось и в листьях. Однако каков уровень экспрессии данного гена в верхушке побега, в листьях и цветках разного возраста оставалось неизвестным. Также представляло интерес определение уровня экспрессии гена *NtANTL* под влиянием OSR-белка ARGOS, экзогенных фитогормонов и стрессовых факторов. Эти исследования могли бы пролить свет на вопрос о генах-мишенях транскрипционного фактора ANT, которые до сих пор остаются неизвестными. В связи с этим, первой целью нашей работы было определение уровня экспрессии гена *NtANTL* в разных органах табака дикого типа, а также под влиянием экзогенных фитогормонов, NaCl и белков с OSR-доменом. Следующей целью нашей работы являлось получение, а также морфологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака с повышенной и сниженной экспрессией гена *NtANTL*, что также может способствовать определению вклада продукта этого гена в регуляцию размеров органов. Предполагалось, что, используя эти растения, можно получить также данные о возможных генах-мишенях транскрипционного фактора ANT. Для повышения уровня экспрессии целевого гена было решено использовать конститутивный 35S промотор. Для снижения уровня экспрессии целевого гена в растения обычно внедряют конструкции, содержащие небольшой участок целевого гена в антисмысловой или же в смысловой ориентации (Frizzi, Huang,

2010), все чаще используют также технологии создания искусственных РНК (Ossowski et al., 2008), однако в любом случае для запуска механизма РНК-интерференции, в конечном результате, должна образовываться двуцепочечная РНК, комплементарная участку мРНК гена *NtANTL.* В связи с этим, нами было решено вначале получить трансгенные растения экспрессирующие участок гена *NtANTL* в антисмысловой ориентации, а затем в эти же растения внедрить конструкции того же участка ДНК в смысловой ориентации. Предполагалось, что даже в случае транс-положения комплементарных участков целевого гена образование двуцепочечных РНК будет происходить все же чаще и более эффективно, чем в трансгенных растениях, экспрессирующих участок гена *NtANTL* только в антисмысловой или смысловой ориентации.

Определение филогенетического родства гена *NtANTL* с *ANT*-подобными генами других растений

Исходя из предположения, что сходные по нуклеотидному составу гены могут выполнять одинаковые функции при регуляции роста и развития растений, нами при помощи программы MegAlign (DNASTAR, США) был проведен филогенетический анализ 57 предполагаемых ортологов и гомологов гена *ANT* некоторых представителей цветковых и голосеменных растений. Как и следовало ожидать, наибольшей схожестью по последовательности нуклеотидов с геном *NtANTL* характеризовались соответствующие гены растений семейства пасленовых, а именно *ANT*-подобные гены *Nicotiana sylvestris* (XM_009777953), *Nicotiana tomentosiformis* (XM_009611927), *S. tuberosum* (XM_006356775.1) и *S. lycopersicum* (NM_001301001.1). Довольно близкими по составу нуклеотидов к гену *NtANTL* также оказался *ANT*-подобный ген львиного зева *Antirrhinum majus* (KF975389.1). Другие ортологи гена *ANT*, в том числе и сам ген *AtANT A. thaliana,* в филогенетическом древе расположились немного дальше (рис. 26), но, в то же время ближе, чем гомологичные гены голосеменных, однодольных и гены *AINTEGUMENTA-LIKE (AIL) A. thaliana*. Поэтому можно предположить, что ген *NtANTL*, вероятнее всего, действительно является ортологом гена *AtANT A.*

thaliana или, по крайней мере, выполняет схожие с геном *ANT A. thaliana* функции.

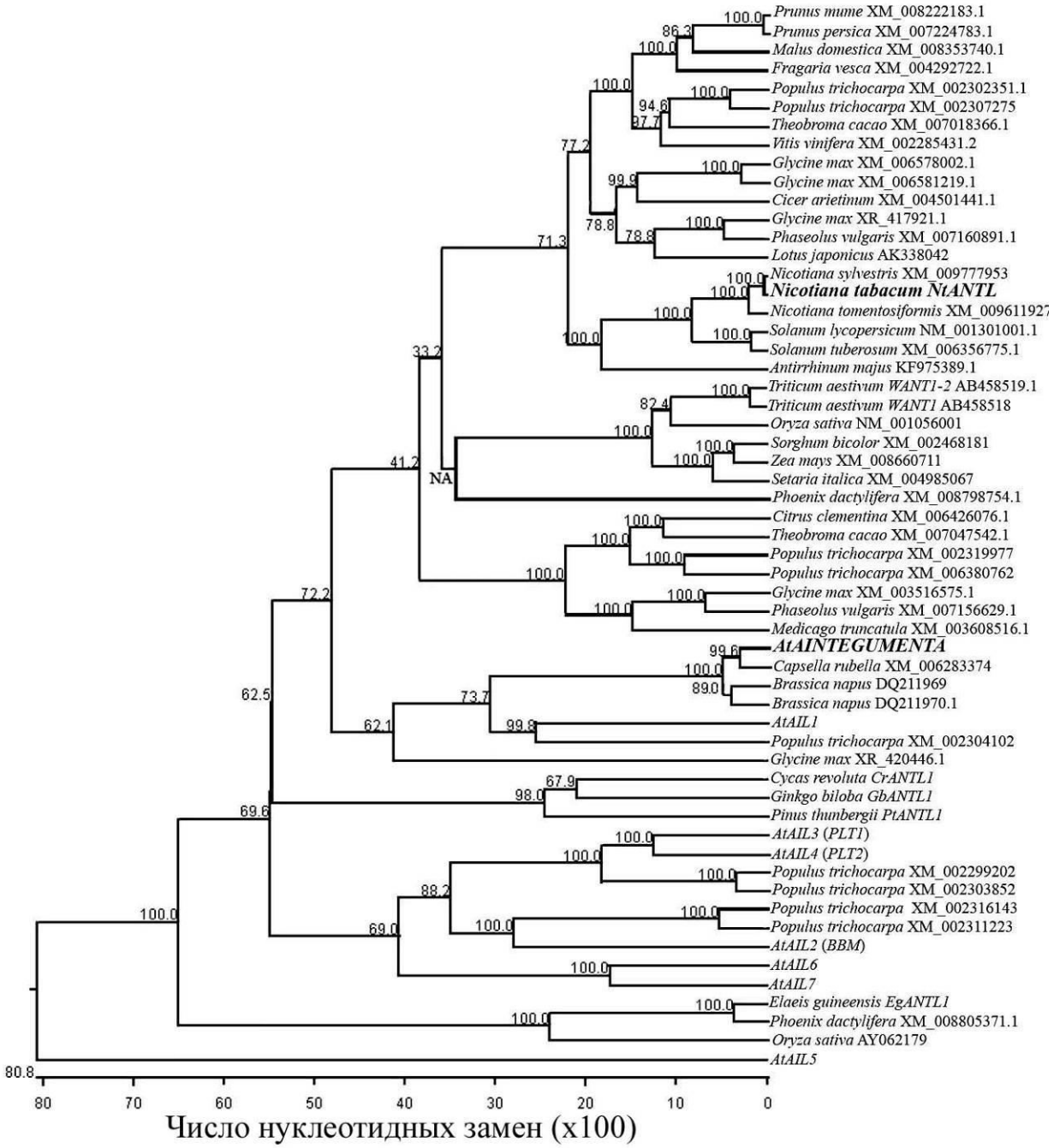


Рис. 26. Филогенетическое древо сходства ортологов гена *ANT*, близких по последовательности нуклеотидов к гену *NtANTL* построенное с использованием бутстреп-поддержки (Bootstrap trials=1000, seed=111).

Анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* в различных органах табака дикого типа

Во всех проанализированных органах табака уровень экспрессии гена *NtANTL* был существенно ниже, того уровня, который демонстрировали гены α-тубулина и EF-1α. Относительно высокое содержание мРНК гена *NtANTL* было детектировано лишь в верхушках побегов и цветках (рис. 27а). Транскрипты исследуемого гена детектировались нами в верхушках побегов и молодых листьях всех проанализированных растений табака любого возраста, что говорит о функциональной важности продукта гена *NtANTL* для роста вегетативных органов. В то же время уже в четвертых от верхушки побега листьях уровень экспрессии гена *NtANTL* резко падал (рис. 27а) и в растущих листьях более старшего возраста практически не определялся. Таким образом, экспрессия гена *NtANTL* тесно связана с очень молодыми органами, в которых высок уровень клеточных делений, однако, отметим, что в этих же молодых органах клетки переходят к стадии роста растяжением.

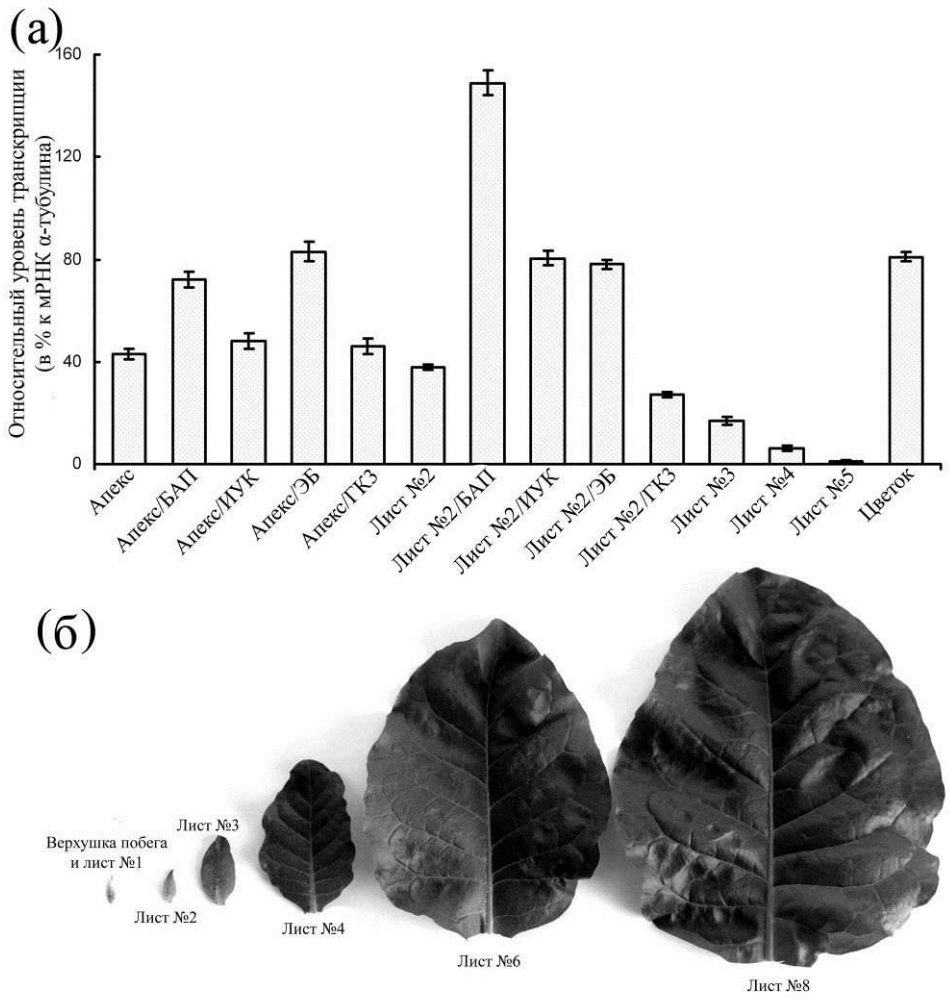


Рис. 27. а - количественный анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* в различных органах табака и под влиянием экзогенной обработки фитогормонами. Апекс – верхушка побега с листом №1, БАП – 6-бензиламинопурин, ИУК – индолилуксусная кислота, ЭБ – 24-эпибрассинолид, ГКЗ – гиббереллловая кислота; б – внешний вид использованных в работе листьев.

Наиболее высокий уровень экспрессии гена *NtANTL* нами был обнаружен в цветках (рис. 27а). Однако цветок состоит из четырех основных частей (органов): чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков. Ранее было показано, что наибольший уровень экспрессии гена *NtANTL* наблюдается в плодолистиках, однако в цитируемой литературе (Rieu et al., 2005) не уточнялся возраст анализируемого цветка. Исходя из данных литературы, также можно было предполагать, что экспрессия гена *NtANTL* связана с какими-то уникальными процессами, характерными только для семязачатка (Klucher et al., 1996). Чтобы подтвердить или опровергнуть эти предположения нами был проведен анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* в разных частях как молодых растущих цветков, так и полностью раскрывшихся зрелых цветков. Было показано, что в молодых цветках уровень экспрессии гена *NtANTL* снижался в следующем ряду: плодолистики>тычинки>чашелистики>лепестки (рис. 28а). То есть в данном

случае литературные данные подтверждались. В то же время в зрелых цветках уровень экспрессии гена *NtANTL* был одинаково низким во всех органах цветка (рис. 28б). Таким образом, из наших данных следовало, что экспрессия гена *NtANTL* ассоциирована не с плодолистиками, а с молодыми интенсивно растущими органами в целом.

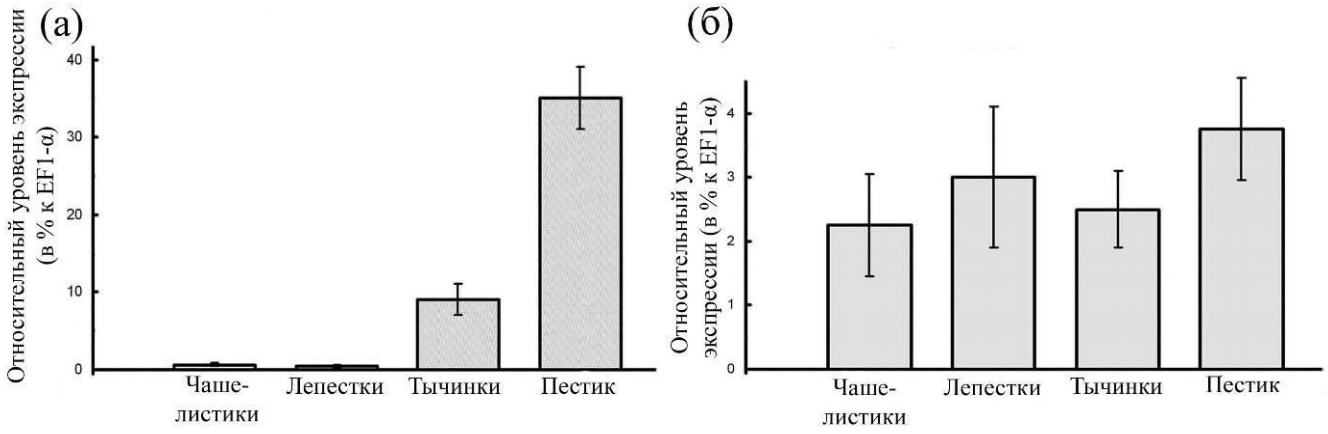


Рис. 28. Количественный анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* в органах молодого (а) и зрелого (б) цветков.

Исходя из того, что ключевую роль в регуляции роста и развития растений играют фитогормоны, была поставлена задача определить изменения уровня экспрессии гена *NtANTL* в ответ на экзогенную обработку фитогормонами. Так как из вегетативных органов в верхушках побега уровень экспрессии гена *NtANTL* был наиболее высоким, было решено, в первую очередь, проверить влияние экзогенных фитогормонов на экспрессию целевого гена именно в этом органе. Было показано, что содержание мРНК гена *NtANTL* незначительно повышалось только под влиянием цитокининов и брассиностероидов (рис. 27а), в то время как, ауксины и гиббереллины совсем не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого гена. Такое незначительное влияние экзогенных фитогормонов на уровень экспрессии гена *NtANTL* в верхушках побега может объясняться наличием больших концентраций в этом органе эндогенных фитогормонов, высокой упорядоченностью и более жестким контролем их циркуляции в АМП (Veit, 2009). Поэтому мы предположили, что в листьях влияние экзогенных

фитогормонов на экспрессию гена *NtANTL* может оказаться более существенным. Для анализа был отобран самый молодой, но сформировавшийся лист, а именно, согласно принятой нами нумерации, второй от верхушки побега лист (лист №2).

Молекулярный анализ показал, что экспрессия гена *NtANTL* в листьях №2 повышается под влиянием БАП, ИУК и 24-эпибрассинолида (рис. 27а). Интересно отметить, что в случае использования цитокининов было зафиксировано наибольшее увеличение уровня экспрессии целевого гена в среднем в 4 раза по сравнению с контролем. Поэтому можно предположить, что в регуляции экспрессии гена *NtANTL* участвуют не только ауксины, но и цитокинины и брассиностероиды. Таким образом, вопреки данным литературы (Aoyama et al., 2012), цитокинины значительнее влияли на экспрессию гена *NtANTL*, нежели ауксины. Нами также были проведены исследования по анализу уровня экспрессии гена *NtANTL* в листьях №4 и №5 при экзогенной обработке фитогормонами. Было показано, что в этих листьях экспрессия исследуемого гена резко снижается и не увеличивается даже при действии экзогенных фитогормонов.

Сравнительный анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* в листьях и каллусах

Хорошо известно, что каллус состоит из недифференцированных клеток и характеризуется высоким уровнем клеточных делений. Так как ген *NtANTL* участвует в регуляции клеточных делений, нами предполагалось, что в каллусе уровень экспрессии исследуемого гена должен быть выше, чем в листьях. Для подтверждения этих предположений, нами был проведен эксперимент по определению уровня содержания транскриптов гена *NtANTL* в 5-м от верхушки побега листе (лист №5) и в двух видах каллуса, образованных из эксплантов этого листа. В первом случае каллусообразование индуцировали при помощи 2,4Д (0,5 мг/л) и БАП (0,02 мг/л), во втором случае при помощи НУК (2 мг/л) и кинетина (0,2 мг/л). Как и ожидалось, в 5-м от верхушки побега листе экспрессия гена *NtANTL* не детектировалась, однако в обоих видах каллуса, образовавшихся из

этого листа, наблюдалось довольно высокое содержание мРНК исследуемого гена (рис. 29). Таким образом, полученные нами результаты еще раз подтверждают литературные (Rieu et al., 2005) и наши данные о том, что продукт гена *NtANTL* необходим в тканях, растущих за счет интенсивных клеточных делений.

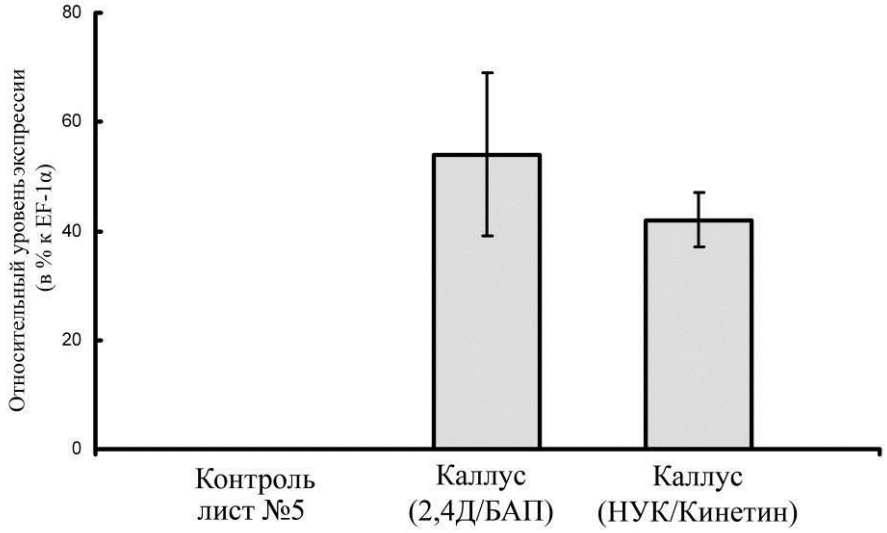


Рис. 29. Количественный анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* табака в листьях и каллусе.

Анализ уровня экспрессии гена *NtANTL* и генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* при воздействии NaCl

Одним из наиболее распространенных факторов среды, вызывающих дефицит влаги для растений, является избыточное содержание NaCl в почве. В таких условиях рост растений обычно прекращается за счет снижения уровней клеточного деления и роста клеток растяжением (Кошкин, 2010), что приводит к уменьшению конечных размеров органов. В то же время, в литературе имеются сведения о повышении под влиянием избыточной NaCl уровня экспрессии генов, белковые продукты которых участвуют в регуляции клеточного деления (Huang et al., 2008), что, видимо, связано с попыткой растений адаптироваться к стрессовому фактору и продолжать рост даже при действии NaCl. Видимо данный механизм может быть полезен, прежде всего, в корнях и использован растениями

для быстрого преодоления очагов с локальным засолением или для быстрого достижения водоносных слоев почвы при дефиците влаги (Веселов и др., 2008). Так как в литературе имелись сведения, что под влиянием избыточной соли повышается уровень экспрессии циклин-зависимых протеинкиназ (Huang et al., 2008), нами, в свою очередь, также были проведены исследования уровня содержания транскриптов генов-регуляторов клеточного деления табака под влиянием NaCl в листьях №2. Были получены довольно интересные данные, свидетельствующие о повышении уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* под влиянием избыточного содержания соли (рис. 30). Уровень экспрессии этих генов начинал повышаться при содержании NaCl в среде от 80мМ и поднимался дальше, по крайней мере, в течение первых двух часов воздействия стрессового фактора, до достижения содержания соли в 850 мМ, что существенно превышает летальную концентрацию для табака (Binzel et al., 1985). Интересно отметить, что по данным ресурса NCBI GEO, 100мМ раствор NaCl также оказывал положительный эффект на уровень экспрессии генов *AtCYCD3;1* и *AtCDKB1;1* (GDS3918/253270_at/CYCD3;1, GDS3918/266401_s_at/CDKB1;1).

В то же время, уровень экспрессии гена *NtANTL* лишь немного колебался из-за изменения содержания соли в среде, и в целом оставался на уровне контроля вплоть до очень высоких концентраций NaCl (рис. 30). Интересно отметить, что на ресурсе NCBI GEO имеются данные о положительном влиянии содержания NaCl в концентрации 100 мМ на уровень экспрессии гена *AtANT A. thaliana* (GDS3918/253010_at/ANT), однако, по крайней мере, для табака, нами такие данные пока подтвердить не удалось.

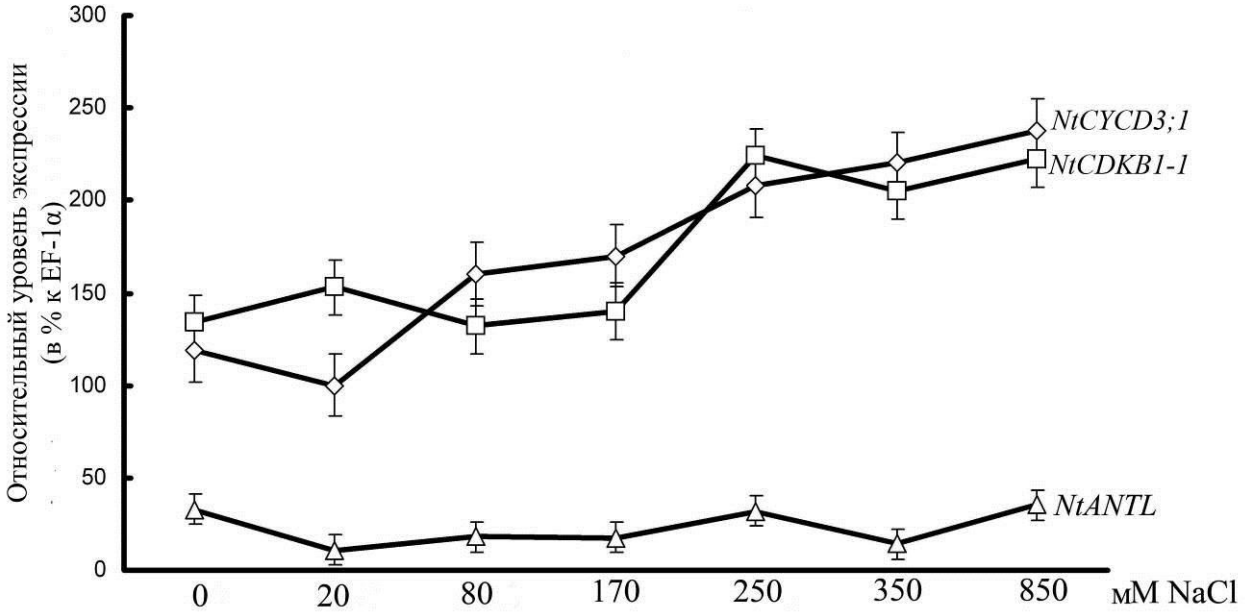


Рис. 30. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1, NtCDKB1-1* и *NtANTL* табака под влиянием NaCl в листьях №2.

Исходя из литературных данных (Mizukami, Fischer 2000), можно предположить, что одной из мишеней транскрипционного фактора ANT является ген *CYCD3;1*, однако в свете полученных нами сведений об отсутствии корреляции между уровнями экспрессии генов *NtANTL* и *CYCD3;1* при повышении концентрации NaCl, по крайней мере, для табака, можно предположить о существовании более сложных взаимоотношений между этими двумя белками и изменениях в функционировании системы клеточного сигналинга при нормальных условиях и солевом стрессе. В то же время положительная корреляция между уровнями экспрессии генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* соотносится с данными о совместном функционировании их продуктов при регуляции клеточного деления (Novikova et al., 2013).

Изменения уровня экспрессии генов *NtANTL, NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в ответ на экзогенную обработку АБК и метилжасмонатом

NtANTL относится к семейству транскрипционных факторов AP2/ERF, многие представители которого вовлечены в ответ на абиотические стрессовые

факторы (Horstman et al., 2014). В регуляцию ответа растений к абиотическим стрессовым факторам и в частности к засолению вовлечена АБК (Novikova et al., 2009, Gao et al., 2010). Исходя из этого, можно предположить, что NaCl-индуцированное накопление транскриптов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* может быть АБК-зависимым. Для проверки этого предположения нами была поставлена задача по определению уровня экспрессии генов *NtANTL, NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в ответ на экзогенную АБК. Для доказательства того, что NaCl-индуцированное накопление транскриптов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* может быть преимущественно ассоциированным с АБК, нами было решено использовать еще один «стрессовый» фитогормон – метилжасмонат (МеЖ). Хорошо известно, что МеЖ в основном вовлечен в регуляцию у растений устойчивости к биотическим стрессам (Santino et al., 2013). Однако в литературе имеются сведения и о положительном влиянии МеЖ на устойчивость растений к солевому стрессу (Yoon et al., 2009), поэтому нельзя было заранее исключать участия этого фитогормона в регуляции экспрессии генов *NtANTL, NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* при действии стрессовых факторов.

В результате проведенного анализа было показано, что МеЖ не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии исследуемых генов ни в верхушках побега, ни в листьях №2 (рис. 31). В то же время экзогенная АБК существенно уменьшала содержание мРНК гена *NtANTL* в листьях №2 и генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в верхушках побега (рис. 31б, в, д). Однако в листьях №2 экзогенная АБК стимулировала экспрессию генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* (рис. 31г, е), что соотносится с данными, полученными при экзогенной обработке NaCl (рис. 30).

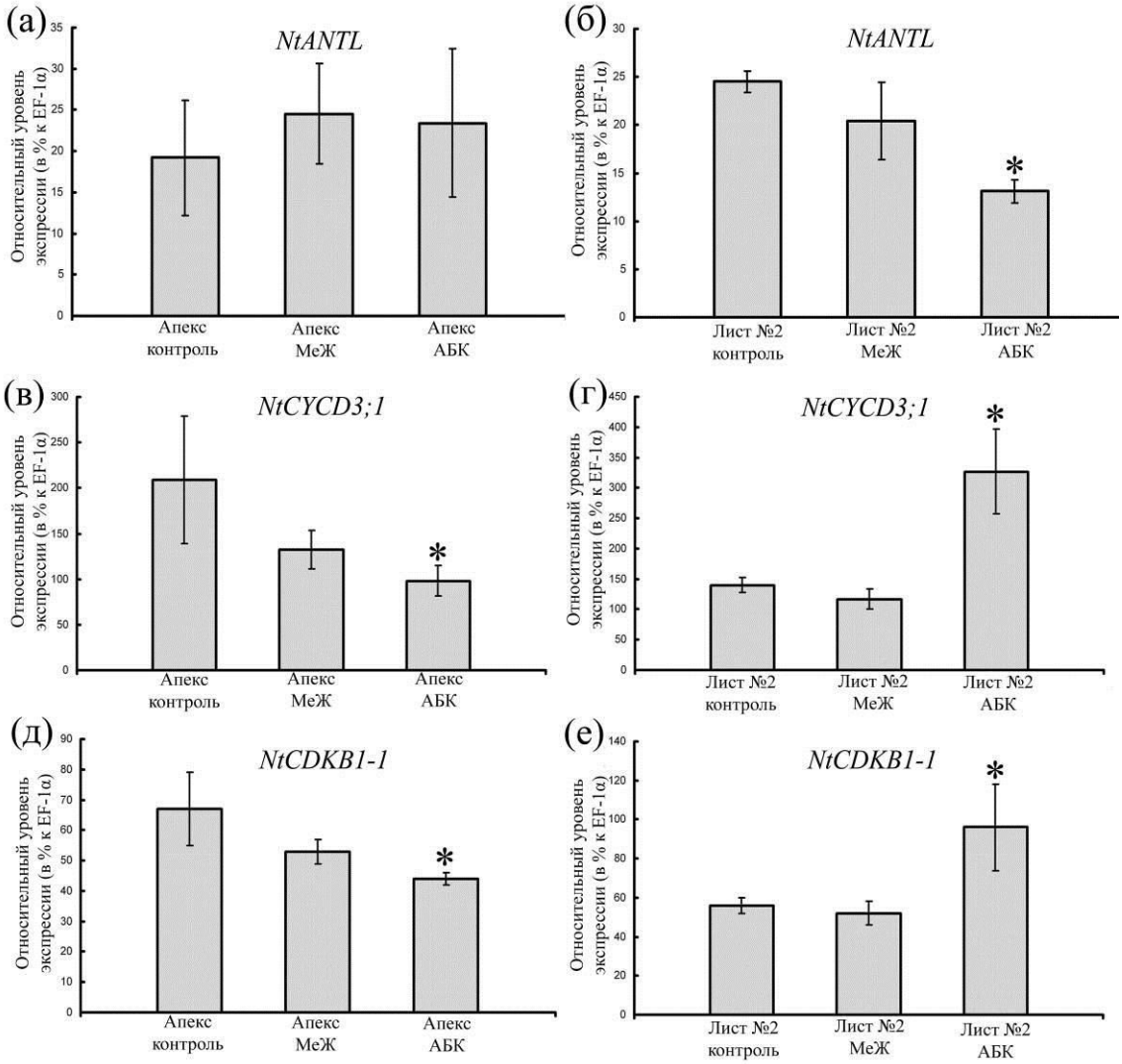


Рис. 31. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1, NtCDKB1-1* и *NtANTL* табака в ответ на экзогенную обработку АБК и МеЖ. Апекс – верхушка побега. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

Корреляция содержания мРНК гена *NtANTL* с уровнем экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного деления

Косвенным признаком того, что одними из мишеней транскрипционного фактора NtANTL являются гены *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1*, может служить обнаружение корреляции между уровнями их экспрессии при экзогенной обработке фитогормонами. Поэтому следующим этапом наших исследований стало определение уровня содержания транскриптов генов *NtCYCD3;1* и

NtCDKB1-1 в верхушке побега и листе №2 под влиянием цитокининов, ауксинов, брассиностероидов и гиббереллинов (рис. 32) и сравнение полученных данных с профилем экспрессии гена *NtANTL*. В верхушке побега положительная корреляция с уровнем содержания транскриптов гена *NtANTL* была показана для обоих генов при использовании БАП. Во втором листе транскрипция гена *NtCYCD3;1* положительно коррелировала с содержанием мРНК гена *NtANTL* при обработке БАП, ИУК и ЭБ (рис. 27а). В случае с геном *NtCDKB1-1* отличие заключалось в том, что его экспрессия в листьях вовсе не индуцировалась цитокининами (рис. 32б). Таким образом, по полученным нами данным можно предположить, что, по крайней мере, при нормальных условиях, между генами *NtCYCD3;1*, *NtCDKB1-1* и *NtANTL* существуют взаимосвязи и они могут быть отнесены к коэкспрессирующимся генам.

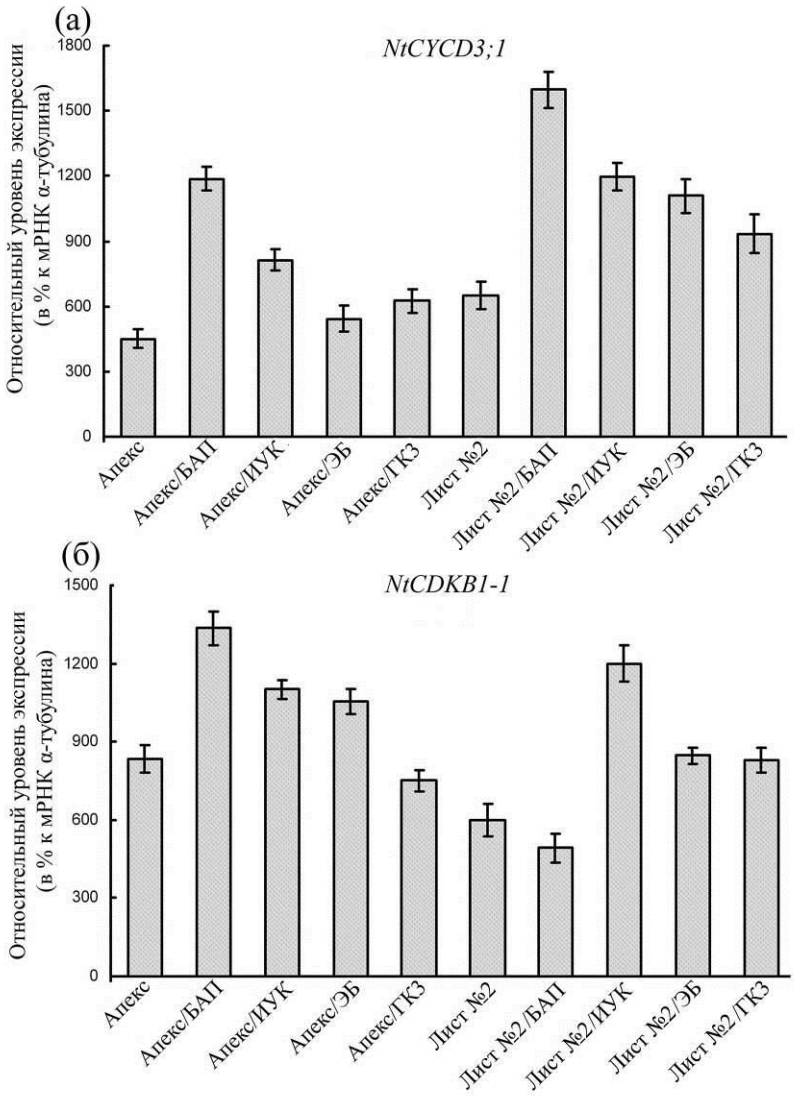


Рис. 32. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1* (а) и *NtCDKB1-1* (б) в различных органах табака и под влиянием экзогенной обработки фитогормонами.

Дальнейшее исследование предполагало определение уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в листьях и каллусе и сравнение с данными, полученными для гена *NtANTL.* В листе №5 содержание мРНК гена *NtCDKB1-1* не детектировалось, тогда как ген *NtCYCD3;1* продолжал экспрессироваться (рис. 33). В процессе каллусообразования содержание транскриптов генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* существенно возрастало (рис. 33).

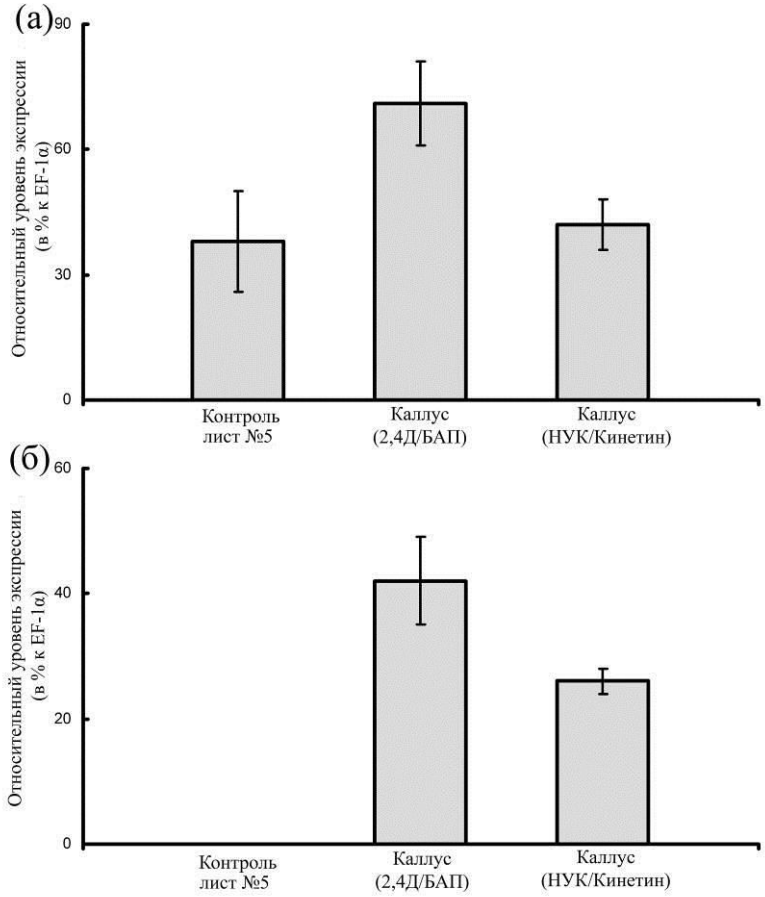


Рис. 33. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtCYCD3;1* (а) и *NtCDKB1-1* (б) табака в листьях и каллусе.

Если сравнивать с данными, полученными для гена *NtANTL* (рис. 29), то наибольшая схожесть в профилях экспрессии наблюдается с геном *NtCDKB1-1* (рис. 33). Здесь также, как и в случае с геном *NtANTL*, ген *NtCDKB1-1* начинает экспрессироваться только в каллусе, при этом уровень содержания транскриптов в обоих случаях наиболее высокий в каллусе, образованном на среде МС, содержащей 2,4Д и БАП.

Участие гетерологичных генов *AtARGOS* и *AtARGOS-LIKE* в регуляции экспрессии гена *NtANTL*

На примере *A. thaliana* было показано, что сверхэкспрессия гена *AtARGOS* способствует повышению уровня экспрессии гена *AtANT* (Hu et al., 2003). У гена *AtARGOS* в геноме *A. thaliana* имеется гомолог, известный под названием *AtARL*, который участвует в регуляции роста клеток растяжением (Hu et al., 2006), но о связи его белкового продукта с геном *AtANT* ничего неизвестно. В то же время в других растениях, в зависимости от стадии развития, взаимодействия между этими генами могут иметь немного другой характер. В связи с этим, представляло большой интерес выяснение соответствующих связей между этими двумя *OSR*-генами с геном *AtANT* на примере табака, однако у этого растения ортологи гена *ARGOS* пока не секвенированы. Поэтому для выяснения особенностей регуляции экспрессии гена *NtANTL* нами были созданы трансгенные растения табака, экспрессирующие гены *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana* под контролем эстрадиол-индуцибельной транскрипционной системы XVE. Было показано, что при индуцировании экспрессии гена *ARGOS* в цветках содержание мРНК гена *NtANTL* повышается в среднем в 5 раз (рис. 34), в то же время продукт гена *AtARL* не оказывал заметного влияния на уровень экспрессии гена *NtANTL.* Полученные нами результаты в целом соотносятся с литературными данными по *A. thaliana*, причем эти данные соответствуют предполагаемым функциям генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* (Hu et al., 2006).

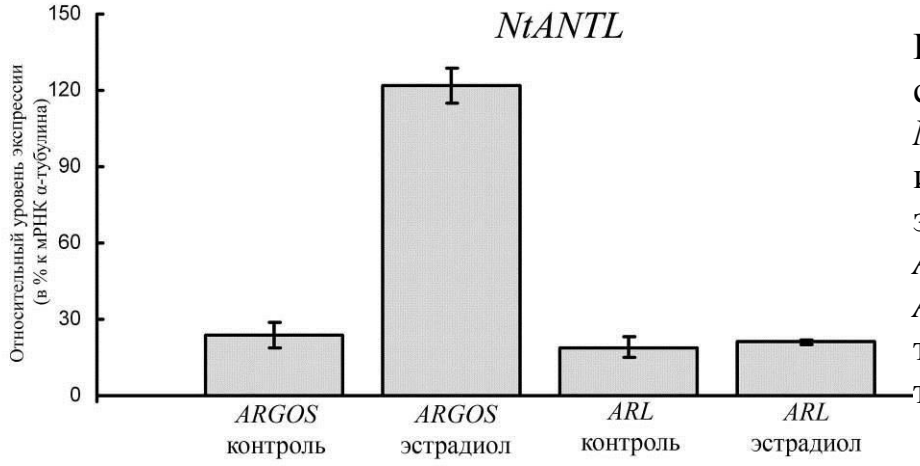


Рис. 34. Изменения содержания мРНК гена *NtANTL* под влиянием индуцибельной экспрессии генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE A. thaliana* в цветках трансгенных растений табака.

Морфологический анализ трансгенных растений с повышенным уровнем экспрессии гена *NtANTL*

Из 11-ти полученных нами линий трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *NtANTL* для морфологического анализа были отобраны три линии растений под номерами 1, 5 и 9, характеризующиеся единичной копией трансгена в геноме и относительно высоким уровнем его экспрессии (рис. 35). Статистически достоверным увеличением длины и площади листьев по сравнению с контролем характеризовались линии 1 и 5 (рис. 36), причем степень увеличения длины листьев составила в среднем до 27% в случае с линией 5. Наибольшей степенью увеличения площади листьев характеризовалась линия 1 и по этому показателю разница с контролем в среднем составила 32%. По длине стебля контрольные и опытные растения достоверно не различались (рис. 36). Длина тубуса венчика у опытных растений увеличивалась у линии 5 в среднем на 7%, а у линии 9 на 4%, в то же время у линии 1 размеры венчика от контроля не отличались (рис. 36). По размерам клеток эпидермиса листьев контрольные и опытные растения различались в меньшей степени, чем по размерам листьев (рис. 36), однако все же для всех трех линий было характерно увеличение размеров клеток, причем разница для линии 1 составила 18%, для линии 5 – 13%, а для линии 9 – 11% по сравнению с контролем (рис. 36). Число клеток эпидермиса, приходящихся на 1 мм^2, в свою очередь, уменьшалось для всех трех линий трансгенных растений. Поэтому можно предположить, что основной причиной увеличения размеров листьев трансгенных растений было не только увеличение количества клеток, но и их размеров. Размеры клеток эпидермиса цветков у трансгенных растений достоверно увеличивались у линии 5, поэтому можно предположить, что причиной увеличения размеров венчика являлось так же, как и в листьях, увеличение как количества клеток, приходящихся на один орган, так и размеров отдельных клеток.

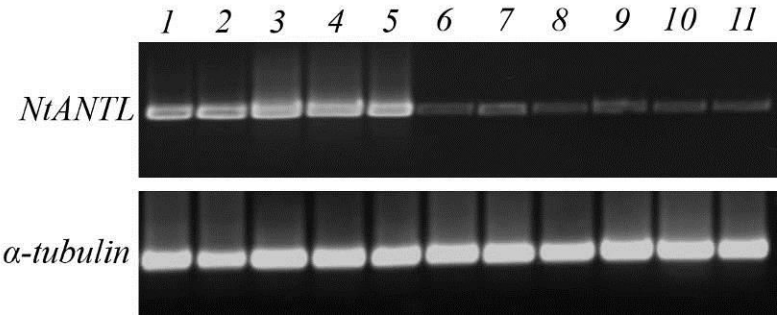


Рис. 35. Содержание мРНК гена *NtANTL* во вторых от верхушки побега листьях (листья №2) анализируемых растений. 1 – табак дикого типа. 2 – контрольные трансгенные табаки, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. 3-5 – опытные растения табака *35S::NtANTL* (3 – линия 1, 4 – линия 5, 5 – линия 9). 6-11 – трансгенные растения с уменьшенным уровнем экспрессии целевого гена (6 – линия 3, 7 – линия 4, 8 – линия 9, 9 – линия 10, 10 – линия 12, 11 – линия 14).

Морфологический анализ трансгенных растений с пониженным уровнем экспрессии гена *NtANTL*

Для создания трансгенных растений с пониженной экспрессией целевого гена, был амплифицирован его небольшой участок размером около 250 пн при помощи праймеров ANTReg1F и ANTReg1R (табл. 1). Далее вставляли полученный ампликон в модифицированный нами ранее бинарный вектор pCambia 2301 в антисмысловой ориентации по отношению к промотору ВМГ. Используя данную конструкцию, были получены три линии трансгенных растений, одна из которых, содержащая в геноме единичную копию трансгена, далее была использована в качестве материнской при внедрении конструкции участка гена *NtANTL* в смысловой ориентации. Для создания этой конструкции тот же фрагмент гена *NtANTL* размером около 250 пн был клонирован в векторе pCambia 1301 в смысловой ориентации по отношению к 35S промотору. Отбор трансгенных побегов при агробактериальной трансформации листовых эксплантов и регенерации при использовании вектора pCambia 2301 осуществляли на среде МС с канамицином, а при использовании вектора pCambia1301 на среде МС с гигромицином.

В результате проведенной работы по трансформации табака, было получено 14 линий трансгенных растений, экспрессирующих участок гена *NtANTL* как в смысловой, так и в антисмысловой ориентациях одновременно. Для морфологического анализа были отобраны линии под номерами 3, 4, 9, 10, 12 и 14. Все эти опытные растения отличались уменьшением размеров листьев по сравнению с контролем и снижением уровня экспрессии целевого гена (рис. 35). Наиболее существенное уменьшение размеров листьев было характерно для линии 3, причем длина листьев у этой линии в среднем уменьшалась на 23%, а площадь листьев на 39% (рис. 36). Длина стебля достоверно уменьшалась у линий 3, 9, 10 и 14, причем степень уменьшения, например, для линии 9 в среднем составила 40% по сравнению с контролем (рис. 36). Все трансгенные растения, кроме линии 4, характеризовались достоверным увеличением размеров клеток эпидермиса листьев, по сравнению с контролем и соответственно уменьшением количества клеток, приходящихся на 1 мм^2. Вероятнее всего, это связано с тем, что благодаря уменьшению уровня экспрессии фактора NtANTL, снижается количество клеток в зачатках листьев (Mizukami, Fischer, 2000) и увеличение размеров клеток происходит за счет функционирования компенсаторного механизма, направленного на поддержание размеров листьев в пределах нормы. Отметим, что схожие данные были получены на мутантах *ant-1 A. thaliana*, которые также характеризовались уменьшением размеров органов и одновременным увеличением размеров отдельных клеток (Mizukami, Fischer, 2000).

По размерам тубуса венчика контрольные и опытные растения отличались мало, однако для линий 9, 12 и 14 было зафиксировано достоверное уменьшение их размеров по сравнению с контролем (рис. 36, 37). В то же время, визуально, более существенные различия между контрольными и опытными растениями были характерны больше для лимба венчика, чем для тубуса (рис. 37). Интересно отметить, что все трансгенные растения с уменьшенным уровнем экспрессии исследуемого гена характеризовались увеличением размеров клеток эпидермиса венчика (рис. 36). Можно предположить, что количество клеток в цветках из-за

снижения уровня экспрессии фактора NtANTL уменьшалось, но размеры цветков все равно часто вырастали до нормального уровня благодаря компенсаторному увеличению размеров отдельных клеток.

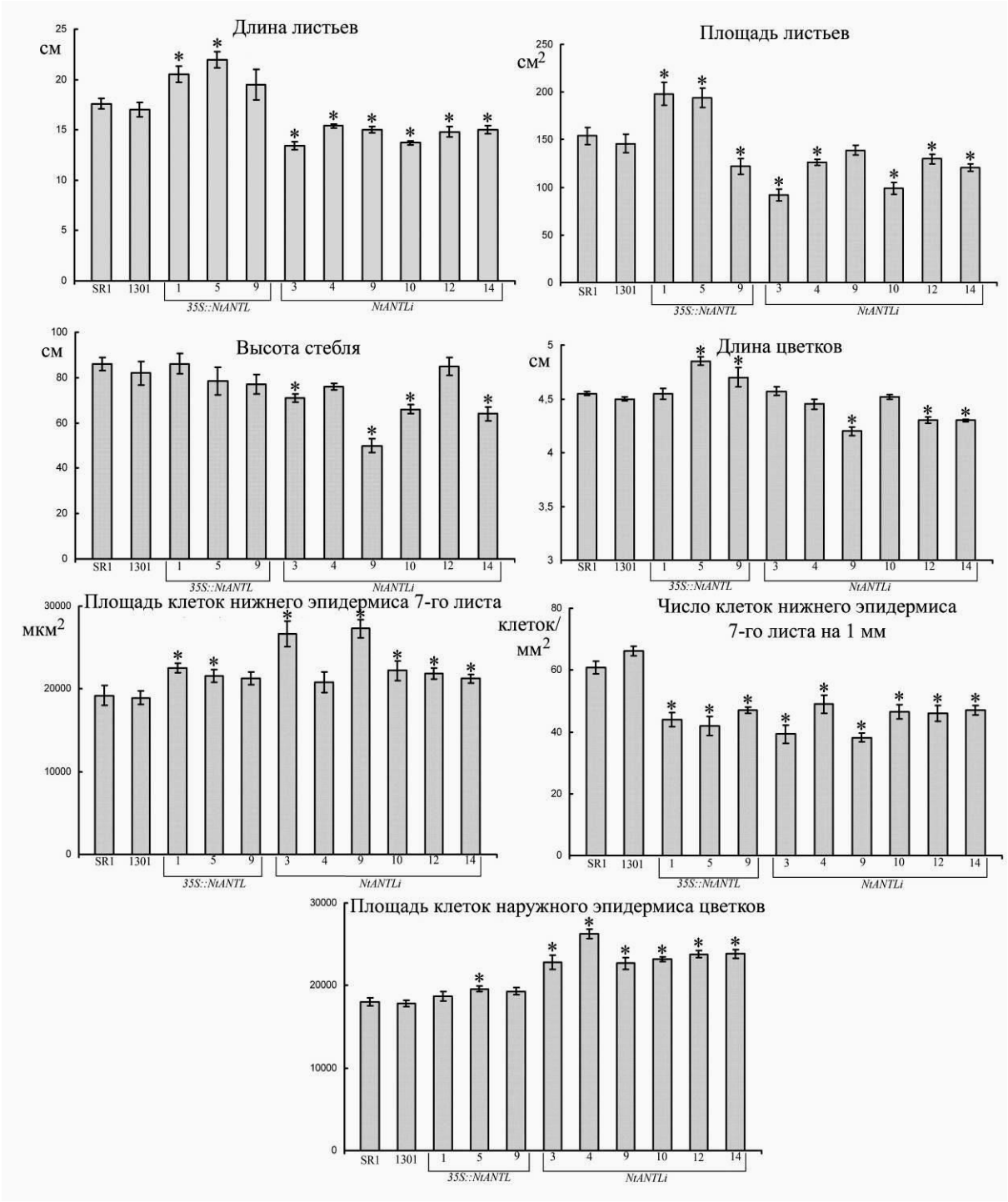


Рис. 36. Сравнительный анализ трансгенных растений табака с конститутивной и пониженной экспрессией гена *NtANTL*. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. *35S::NtANTL* – трансгенные растения с конститутивной экспрессией исследуемого гена. *NtANTLi* – трансгенные растения с пониженной экспрессией исследуемого гена.

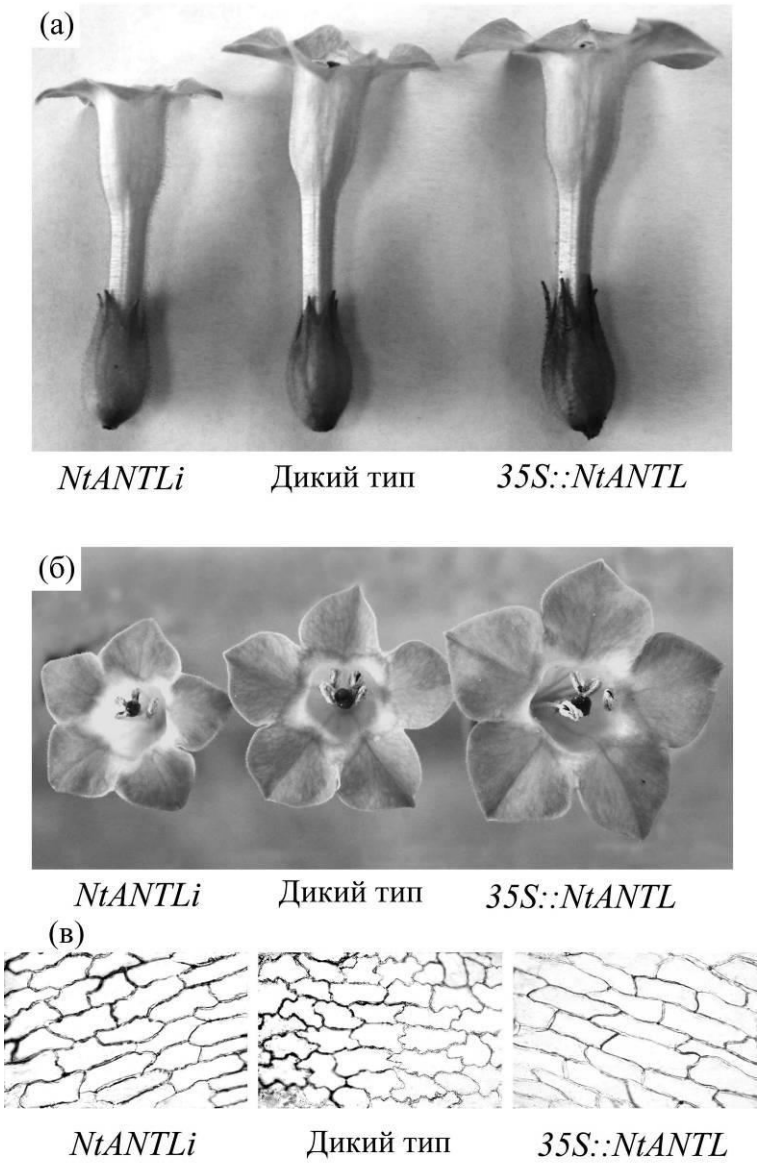


Рис. 37. Цветки трансгенных растений табака с повышенной и пониженной экспрессией гена *NtANTL*: а – сравнение длин тубуса венчика; б – сравнение размеров лимба венчика; в – сравнение размеров клеток наружного эпидермиса венчика. *35S::NtANTL* – трансгенные растения с конститутивной экспрессией исследуемого гена. *NtANTLi* – трансгенные растения с пониженной экспрессией исследуемого гена.

Обсуждение результатов

ANT относится к обширному семейству транскрипционных факторов AP2/ERF, участвующих в тонкой регуляции роста и развития растений в изменяющихся условиях внешней среды. У всех высших растений, геномы

которых секвенированы, обнаруживаются ортологи гена *ANT*, что говорит о его специфических функциях, важных для всех растений, начиная от мохообразных (Aoyama et al., 2012). Проведенный нами филогенетический анализ свидетельствует о том, что изучаемый ген *NtANTL*, вероятно, является ортологом гена *AtANT A. thaliana* и должен выполнять схожие функции в табаке.

ANT-фактор необходим для правильного формирования женского гаметофита (Klucher et al., 1996). В то же время ген *AtANT* экспрессируется не только в семяпочках, но и в вегетативных органах и даже в корнях (Klucher et al., 1996), что указывает на его участие в регуляции клеточной пролиферации во всем растении. Нами был зарегистрирован высокий уровень содержания транскриптов гена *NtANTL* в пестиках молодых цветков. Однако в зрелых цветках уровень экспрессии гена *NtANTL* был одинаково низким во всех частях цветка. Высокий уровень экспрессии гена *NtANTL* мы также обнаружили в верхушках побега, в наиболее молодых листьях, расположенных на верхушке побега и в каллусе. Исходя из этого, мы предполагаем, что высокий уровень экспрессии гена *NtANTL* в пестике не связан с уникальными процессами, которые характерны только для развития женского гаметофита. Дело видимо в том, что любой орган в начальный период роста характеризуется высоким уровнем клеточных делений, а не роста клеток растяжением (Gonzalez et al., 2012). Из этого следует, что транскрипционный фактор NtANTL необходим в молодых тканях и органах, растущих за счет клеточных делений. Однако в молодых листьях табака (см. главу 9) и даже в каллусе (Blackman, Overall, 1995) происходят не только интенсивные клеточные деления, но также и инициация клеточного растяжения. Поэтому нельзя исключать участия транскрипционного фактора NtANTL в регуляции роста клеток растяжением.

Ауксины играют важную роль во многих аспектах роста и развития растений, в том числе и в регуляции размеров органов (Wang, Guo, 2015). Имеются сведения о возможной связи между функциями гена *AtANT* и ауксиновой сигнализацией (Krizek, 2011). Однако по данным ресурса NCBI GEO, ауксины не стимулировали экспрессию гена *AtANT A. thaliana* (GDS744/253010_at/ANT), что соотносится с

нашими данными по гену *NtANTL* табака, полученного для верхушек побега. Показанное нами отсутствие влияния экзогенного ауксина на уровень экспрессии гена *NtANTL* может объясняться наличием высоких концентраций эндогенных ауксинов и более жестким контролем их циркуляции в верхушках побега (Veit, 2009). В то же время в листьях №2 табака экзогенные ауксины оказывали положительное влияние на экспрессию гена *NtANTL*, что подтверждает данные о вовлеченности ауксина в регуляцию экспрессии *ANT*-подобных генов (Aoyama et al., 2012). По данным базы данных AGRIS, промотор гена *AtANT* (At4g37750) содержит два мотива TGTCTC, которые являются ауксин-чувствительными элементами, связанными с ARF-факторами (Ulmasov et al., 1999), что свидетельствует в пользу участия ауксинов в регуляции экспрессии *ANT*-подобных генов. Также хорошо известно о косвенном действии ауксинов на экспрессию гена *AtANT* через ген *ARGOS* (Hu et al., 2003). В нашем исследовании, также как и в *A. thaliana* (Hu et al., 2003), сверхэкспрессия гетерологичного гена *ARGOS* способствовала повышению уровня экспрессии гена *NtANTL*, что говорит об универсальности таких взаимоотношений между этими двумя белками для многих растений. В то же время, индуцибельная экспрессия гена *ARGOS-LIKE* не стимулировала транскрипцию гена *NtANTL,* что еще раз подтверждает данные о выполнении белками ARGOS и ARGOS-LIKE разных функций, несмотря на то, что эти белки являются гомологичными (Feng et al., 2011).

В наших исследованиях показано, что на экспрессию гена *ANT* влияют не только ауксины, но и цитокинины, что не совсем соответствует некоторым литературным данным (Aoyama et al., 2012), однако вполне соотносится с данными о том, что цитокинины участвуют в регуляции клеточной пролиферации (Романов, 2009). Ген *NtANTL* экспрессируется в органах, растущих преимущественно за счет клеточного деления, что косвенно подтверждает литературные данные об участии ТФ ANT в поддержании меристематической компетентности в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000).

Известно, что ауксины, цитокинины и брассиностероиды оказывают положительное влияние на скорость клеточного деления, в том числе, путем

активации регуляторов клеточного цикла, таких как циклинов и циклин-зависимых киназ (D'Agostino and Kieber, 1999; Hu et al., 2000; Mizukami and Fischer 2000; Magyar et al., 2005; Feng et al., 2012). В данной работе мы обнаружили коэкспрессию между генами *NtANTL*, *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в ответ на обработку экзогенными ауксинами, цитокининами и брассиностероидами, что свидетельствует в пользу возможного взаимодействия этих генов и их продуктов в системе клеточной сигнализации. Отметим, что экспрессия двух *ANT*-подобных генов яблони (*MdANT1* and *MdANT2*) положительно коррелировала с уровнем экспрессии циклинов типа A и B, а также циклин-зависимых киназ типа B (Dash, Malladi, 2012). К тому же, согласно базе данных AGRIS, промоторы генов *AtCYCD3;1* и *AtCDKB1;1 A. thaliana* также, как и гена *AtANT* содержат ауксин-связывающие цис-регуляторные элементы (ARF). Это может говорить о том, что фитогормоны, такие как ауксины, могут непосредственно и может быть даже независимо от других сигналов, влиять на экспрессию генов *NtANTL*, *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1*. При экзогенной обработке ГК3 корреляция между уровнями экспрессии генов *NtANTL*, *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* не наблюдалась, хотя уровни содержания двух последних генов повышались в ответ на ГК3. Известно, что гиббереллины также принимают участие в регуляции клеточного деления (Achard et al., 2009), однако в ответ на ГК3 уровень экспрессии гена *NtANTL* снижался.

Известно, что циклины и циклин-зависимые киназы участвуют в формировании каллуса (Ikeuchi et al., 2013). Кроме того, при эктопической экспрессии гена *AtANT* полностью дифференцированные клетки начинают проявлять неопластическую активность и начинают формировать каллус (Mizukami, Fischer, 2000). Исходя из этого, представляло большой интерес сравнение уровней экспрессии генов *NtANTL*, *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* в каллусе. В процессе формирования каллуса нами были обнаружены положительные корреляции между уровнями экспрессии генов *NtANTL*, *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* и это подтверждает возможную связь между ANT-фактором и регуляторами клеточного цикла. Для более точного определения взаимоотношений между

NtANTL, NtCYCD3;1 и NtCDKB1-1 их уровни экспрессии необходимо исследовать в трансгенных растениях с повышенной и пониженной экспрессией гена *NtANTL*. Тем не менее, наши результаты согласуются с предположениями о том, что NtANTL в системе клеточной сигнализации находится до белков-регуляторов клеточного цикла, однако для доказательства того, что этот белок является транскрипционным фактором генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* требуются дополнительные исследования.

Засоление является одним из главных стрессовых факторов, которое негативно влияет на различные аспекты роста и развития растений. Одним из основных эффектов солевого стресса является ингибирование клеточного деления и клеточного растяжения, что в итоге может приводить к остановке роста растения (Кошкин, 2010). В литературе имеются сведения о снижении уровня экспрессии циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ в условиях засоления (Burssens et al., 2000). Однако в данной работе нами было показано, что уровень экспрессии генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1* увеличивается как при солевом стрессе, так и в ответ на экзогенную обработку АБК. Эти результаты согласуются с данными Huang и др. (2008), где была показана положительная регуляция экспрессии гена циклин-зависимой протеинкиназы *Oryza;CDKC;1* под действием NaCl и АБК. Исходя из этих данных, можно предположить, что повышение уровня экспрессии регуляторов клеточного цикла под влиянием соли и АБК реализуется в рамках реакции растения в ответ на стрессовый фактор. Это может быть связано с тем, что при стрессовых условиях для поддержания роста на должном уровне требуется больше регуляторов клеточного деления, чем при нормальных условиях. То есть, можно предполагать, что это один из адаптационных механизмов, который позволяет растению некоторое время продолжать рост даже при действии стрессовых факторов.

Интересно отметить, что содержание мРНК гена *NtANTL* не изменялось в ответ на соль и экзогенную АБК. Поэтому можно предположить, что NtANTL-фактор не участвует в регуляции ответа растений к действию соли, по крайней мере, в табаке. Возможно, NtANTL не регулирует вызванное солевым стрессом

повышение уровня экспрессии *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1*, поэтому здесь не исключается вовлечение других транскрипционных факторов, в том числе АБК-регулируемых.

Могут показаться не совсем обычными наши данные о положительном влиянии АБК и NaCl на уровень экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Несмотря на преимущественно негативное влияние на рост растений, АБК участвует в регуляции (и даже в стимулировании) роста и развития растений, также как и другие фитогормоны. В литературе имеются сведения о положительном влиянии АБК на рост различных органов растений. Например, АБК способен усиливать вегетативный рост в оптимальных условиях среды (Novikova et al., 2009). Кроме того, АБК-дефицитные мутанты характеризуются снижением параметров роста, что говорит о важности АБК для обеспечения роста и развития растения (Barrero et al., 2005). В статье Huang и др. (2008) сообщается об обнаружении в промоторной области циклин-зависимой протеинкиназы гена *Oryza;CDKC;1* риса двух АБК-чувствительных элементов (ABRE) TTTACGTATC и ACTACGTTTA. Напомним, что экспрессия этого гена повышается под влиянием соли и АБК. Более того, согласно данным AGRIS, промоторная область гена циклин-зависимой протеинкиназы *AtCDKB1;1* (At3g54180) *A. thaliana* имеет ABRE-подобный сайт связывания GACGTGGA и АБК может быть вовлечена в регуляцию его экспрессии именно через этот цис-регуляторный элемент. К сожалению, геном табака пока не секвенирован и поэтому нет доказательств наличия ABRE-мотивов в промоторах генов *NtCYCD3;1* и *NtCDKB1-1*, хотя изменения уровня экспрессии этих генов под влиянием экзогенной АБК указывает на наличие подобных цис-регуляторных элементов и в их промоторных областях.

Повышение или снижение уровня экспрессии гена *NtANTL* в трансгенных растениях табака в наибольшей степени способствовали изменению размеров листьев и в меньшей степени размеров цветков и стебля. В то же время для *A. thaliana*, при этом было характерно преимущественное изменение размеров цветков (Krizek, 1999). Возможно, это связано с тем, что у табака размеры цветков

находятся под более жестким генетическим контролем, повлиять на который гораздо сложнее, чем у *A. thaliana.* Трансгенные растения, как с повышенным, так и с пониженным уровнем экспрессии гена *NtANTL* характеризовались увеличением размеров клеток эпидермиса венчика. Однако, исходя из наших данных, нельзя делать выводы о прямой стимуляции клеточного растяжения продуктом гена *NtANTL,* так как нами были измерены размеры клеток только в наружном эпидермисе венчика, тогда как в других тканях и органах цветка могло изменяться и количество клеток, как уже было показано ранее для *A. thaliana* (Krizek, 1999). То же самое касается и листьев, где нами не были измерены размеры клеток мезофилла листьев, вполне возможно, что при сверхэкспрессии гена *NtANTL* количество этих клеток и возрастало. В то же время компенсаторное увеличение размеров клеток в цветках и листьях при снижении экспрессии гена *NtANTL* может объясняться уменьшением количества клеток в зачатках цветков и листьев (Mizukami, Fischer, 2000).

Интересно отметить, что конститутивная экспрессия гена *CYCD3;1*, которая стимулирует клеточное деление и способствует увеличению количества клеток в органе, не способствует увеличению размеров органов (Dewitte et al., 2003). Это связано с тем, что в органах трансгенных по гену *CYCD3;1* растений *A. thaliana*, несмотря на увеличение количества клеток, уменьшались их размеры. В то же время конститутивная экспрессия гена *AtANT* способствовала увеличению количества клеток нормального размера (Mizukami, Fischer, 2000), что может свидетельствовать о том, что ТФ AtANT оказывает влияние не только на клеточное деление, но и на рост клеток растяжением. Действительно, было показано, что конститутивная экспрессия гена *AtANT* способствует увеличению размеров цветков за счет увеличения количества клеток в чашелистиках и за счет увеличения размеров отдельных клеток в лепестках, тычинках и плодолистиках (Krizek, 1999). Более того, было показано, что при сверхэкспрессии гена *AtANT* в петунии и львином зеве размеры лепестков увеличиваются за счет увеличения размеров отдельных клеток (Manchado-Rojo et al., 2014).

Исходя из полученных нами данных, следовало, что сверхэкспрессия гена *NtANTL* способствует увеличению размеров листьев и цветков. Поэтому нами было выдвинуто предположение, что ортологи гена *ANT* могут быть использованы для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Поэтому дальнейшая наша работа в рамках исследования гена *ANT* заключалась в получении трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ортологи исследуемого гена, выделенных из различных хозяйственно-ценных растений. В первую очередь, была поставлена задача клонирования ортологов гена *ANT* из рапса и тополя черного и создания на основе этих генов и промоторов каулимовирусов генно-инженерных конструкций, пригодных для получения трансгенных растений. Апробацию генно-инженерных конструкций планировалось провести на табаке, с целью отбора наиболее эффективных сочетаний генов и промоторов, которые оказывают наибольшее влияние на размеры органов трансгенных растений.

7.2.2. Морфологические особенности трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *ANT* рапса под контролем промотора вируса мозаики георгина

У рапса обнаружены два гена-кандидата *ANT* с названиями *BnaX.ANT.a* (DQ211969) и *BnaX.ANT.b* (DQ211970) (Chen et al., 2010). Для повышения уровня экспрессии целевых генов в трансгенных растениях чаще всего применяют 35S промотор, однако на практике применение данного промотора часто оказывается неэффективным (Mitsuhara et al., 1996). В следующей нашей работе, с целью получения трансгенных растений с увеличенными размерами органов, нами был использован полноразмерный ген *ANT* рапса, а именно *BnaX.ANT.b,* в сочетании как с 35S промотором, так и с промотором ВМГ (см. главу 6).

Участок ДНК, содержащий ген *BnaX.ANT.b*, был амплифицирован из геномной ДНК рапса при помощи праймеров ANTRapF и ANTRapR. Затем ген *BnaX.ANT.b* вырезали из вектора pKRX по сайту *Bse*PI и осуществили его

ненаправленное клонирование в бинарных векторах pCambia 2201 с 35S промотором и pCambia 2301 (CAMBIA, Австралия) с промотором ВМГ (рис. 38).

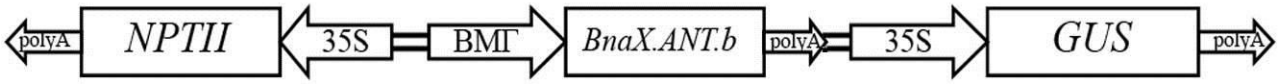


Рис. 38. Генно-инженерная конструкция Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301, состоящая из селективного и репортерного генов, а также целевого гена *BnaX.ANT.b* под контролем промотора ВМГ. 35S – 35S промотор; ВМГ – промотор вируса мозаики георгина; *NPTII* – ген неомицинфосфотрансферазы II; *GUS* – ген β-глюкуронидазы; polyA – сайт полиаденилирования ВМЦК.

Целевой генно-инженерной конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе pCambia 2201 были проведены две агробактериальные трансформации листовых дисков табака и на селективной среде отобрано 90 первичных трансформантов. Из них укоренились на среде МС с канамицином 12 растений, из которых лишь три показали активность репортерного гена *GUS* в листьях. Эти три растения были акклиматизированы к условиям почвы, доведены до цветения с целью получения семян. Таким образом, были получены три линии трансгенных растений с номерами 11, 21 и 23. Из этих отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *BnaX.ANT.b* и 35S промотора. Было показано, что все три растения содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор.

В ходе агробактериальной трансформации табака конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе pCambia 2301 на селективной среде было отобрано 67 первичных побегов. Из них 6 трансформантов укоренилось на среде с канамицином, при этом лишь последнее во всей группе растение под номером 67 показало высокую активность репортерного гена *GUS*. Данное растение было доведено до цветения, а семена были отобраны для дальнейшей работы.

Семена трех линий трансгенных растений 2201/BnANT второго поколения были высеяны на селективную среду, где только растения линий №21 и №23

показали классическое соотношение выживших и погибших 3:1, что косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Семена трансгенных растений pCambia 2301/BnANT №67 на селективной среде МС также показали расщепление 3:1. Через 20 дней проращивания на среде МС был проведен морфологический анализ проростков. По длине корня и гипокотиля между опытными и контрольными растениями разница была обнаружена лишь для линии №67, причем было отмечено их удлинение в среднем на 55% и 56% соответственно (табл. 3). Далее по 5 растений трех отобранных линий №21, №23 и №67 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 без целевого гена. Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (табл. 3). В то же время в период цветения листья у опытных растений были длиннее, чем у контрольных в среднем на 14-25% (табл. 3), что может говорить о пролонгировании времени роста листьев под влиянием сверхэкспрессии гена *BnaX.ANT.b*. По площади листьев лишь трансгенные растения 2301/BnANT №67 характеризовались небольшим их увеличением (табл. 3). По высоте стебля опытные растения были выше контрольных, и разница в среднем составляла у линии №23 - 19%, у линии №21 – 25%, а у линии №67 – 28%. По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были небольшими, но в целом цветки характеризовались увеличением от 6% у линии №21 до 9% у линий №67 (табл. 3). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не различались. Большинство растений были фертильными, пропорции между размерами чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков по сравнению с контролем оставались в пределах нормы. Было показано влияние сверхэкспрессии гена *BnaX.ANT.b* на массу семян (табл. 3), причем наибольшая разница была характерна для линии 2301/BnANT №67. Для выяснения возможных причин увеличения размеров листьев, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса листьев. Размеры

органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет увеличения количества клеток. Оказалось, что размеры клеток эпидермиса листьев у опытных растений не только не увеличивались, но у линий №21 и №23 даже немного уменьшились (табл. 3). Это означает, что длина листьев опытных растений, вероятнее всего, увеличивалась за счет стимулирования клеточного деления, а не процессов клеточного роста.

Таблица 3. Морфометрические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 и трансгенных растений табака поколения T_1, экспрессирующих ген *BnaX.ANT.b* рапса[a].

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 2301	Линии трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *BnaX.ANT.b*		
		2201/BnANT №21	2201/BnANT №23	2301/BnANT №67
Длина листьев, см				
через 30 дней	3,9±0,3	4,8±0,2	3,4±0,1	3,0±0,1
через 45 дней	9,1±0,8	9,9±0,2	9,4±0,2	9,1±0,4
В период цветения	15,7±0,7	**18,2±0,5***	**17,9±0,5***	**19,6±0,3***
Средняя площадь трех нижних листьев, $см^2$	137±10	143±5	143±10	**151±4***
Площадь клеток эпидермиса листьев, $мкм^2$	18271±624	17029±620	**14609±515***	**19564±135***
Высота стебля, см	82,5±1,9	**103,3±4,5***	**98,0±6,2***	**110,7±4,3***
Длина цветка, см	4,46±0,02	**4,74±0,05***	**4,75±0,04***	**4,85±0,09***
Длина корней через 20 дней после посева на среду МС, см	1,10±0,06	1,20±0,11	1,03±0,09	**1,70±0,12***
Длина гипокотилей через 20 дней после посева на среду МС, мм	1,8±0,1	2,0±0,2	1,6±0,1	**2,8±0,2***
Масса 30-ти семян, г	1,6±0,2	1,9±0,2	1,8±0,2	**2,3±0,4***

[a]Данные представлены в виде среднего арифметического± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

Методом полуколичественной ОТ-ПЦР было проведено определение содержания мРНК гена *BnaX.ANT.b* в трех линиях трансгенных растений. Было показано, что уровень экспрессии целевого гена наиболее высок у растений линии №67 (рис. 39), которые содержат в качестве регулятора экспрессии целевого гена промотор ВМГ. Таким образом, повышение уровня экспрессии гена *BnaX.ANT.b* в результате функционирования промотора ВМГ отражалось в трансгенных растениях в виде более существенного увеличения размеров листьев, стебля и цветков, чем при использовании 35S промотора.

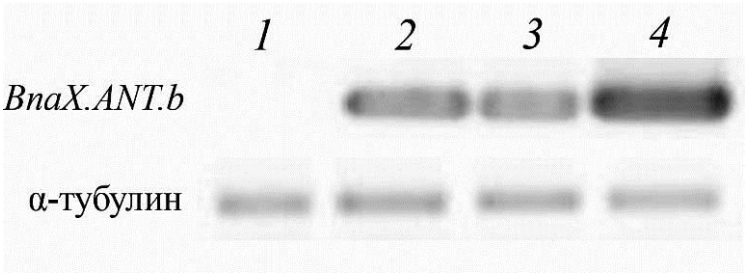


Рис. 39. Электрофореграмма результатов полуколичественной ОТ-ПЦР гена *BnaX.ANT.b* в исследуемых линиях трансгенных растений: 1 – контрольное растение; 2 – трансгенное растение линии 2201/BnANT №21; 3 - трансгенное растение линии 2201/BnANT №23; 4 - трансгенное растение линии 2301/BnANT №67.

Обсуждение результатов

Конститутивная экспрессия гена *BnaX.ANT.b* способствовала увеличению размеров ряда органов табака (табл. 3), причем в отличие от *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), большинство полученных растений были фертильными. Как и в случае с *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), нами получены данные, свидетельствующие о влиянии продукта гена *ANT* на клеточное деление, что, видимо, способствует пролонгированию времени роста листьев. Напомним, что конститутивная экспрессия гена *NtANTL* оказывала также определенное влияние и на рост клеток (см. раздел 7.2.1). Сверхэкспрессия гена *BnaX.ANT.b* тоже немного влияла на рост клеток растяжением, однако только при использовании сильного промотора ВМГ. В отличие от *A. thaliana,* где сверхэкспрессия гена *AtANT*

наиболее сильно влияла на размеры органов цветка (Krizek, 1999), в случае с табаком и геном *BnaX.ANT.b* разница в величине цветков составила лишь 6-9%, что, кстати, приблизительно схоже с данными, полученным нами при использовании гена *NtANTL.* При этом наибольшие изменения нами были зафиксированы при измерении высоты стебля и массы семян (табл. 3). Поэтому, предполагается, что исследованный нами ген *BnaX.ANT.b* может быть применен на практике, прежде всего с целью увеличения именно этих морфометрических параметров. Степень изменения размеров органов была больше в случае использования вместо 35S промотора его гомолога, выделенного нами ранее из ВМГ (см. главу 6). Полученные в ходе проделанной работы данные подтверждают наши предположения о том, что промотор ВМГ может обеспечивать больший уровень экспрессии целевых генов в трансгенных растениях табака по сравнению с 35S промотором, что может, в свою очередь, способствовать большему уровню фенотипического проявления целевых генов.

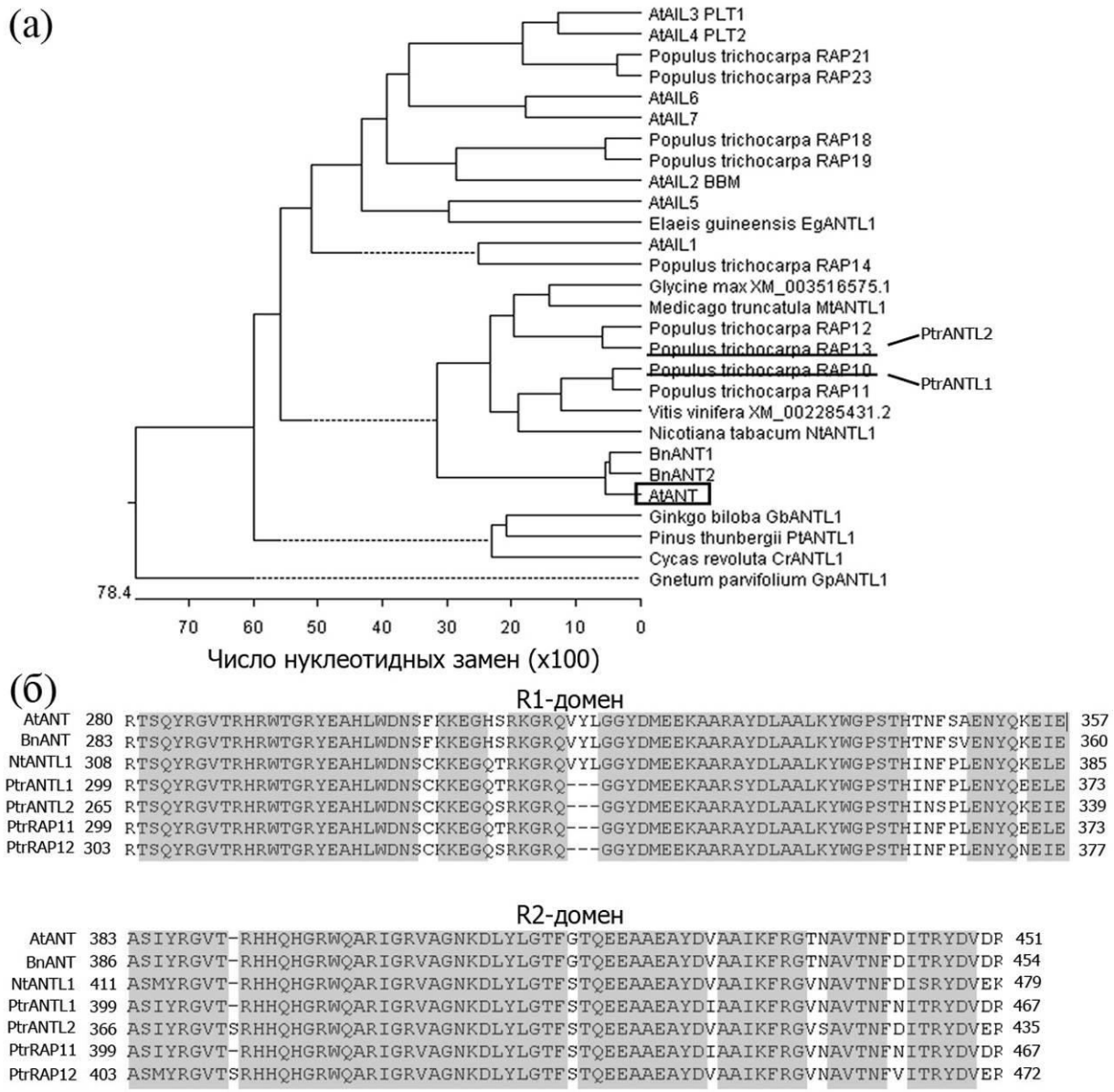
7.2.3. Конститутивная экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного в трансгенных растениях табака

Большой интерес для лесной биотехнологии представляет возможность получения быстрорастущих пород древесных растений с увеличенными размерами ствола. Из деревьев полностью секвенирован геном лишь тополя *P. trichocarpa,* однако, AP2-факторы этого растения на момент начала наших исследований, оставались не изученными. В связи с этим, нами был проведен поиск всех *ANT*-подобных генов в геноме тополя и два наиболее близких к *AtANT* гена, которые были обозначены как *PnANTL1* и *PnANTL2,* были амплифицированы из геномной ДНК тополя черного (*Populus nigra*). Были получены трансгенные растения табака, конститутивно экспрессирующие гены *PnANTL1* и *PnANTL2*. Предполагалось, что за счет стимулирования клеточного деления в зачатках органов, трансгенные растения табака, экспрессирующие целевые гены, будут отличаться увеличенными размерами листьев, цветков и стебля.

Поиск гомологов гена *ANT* в геноме тополя, сравнительный анализ последовательностей аминокислот и отбор предполагаемых ортологов

При помощи ресурса MegaBlast нами в геноме тополя были обнаружены 9 наиболее близких к гену *AtANT* нуклеотидных последовательностей с условными обозначениями RAP: RAP10 (XM_002307275.1), RAP11 (XM_002302351.1), RAP12 (XM_002319977.1), RAP13 (XM_002310846.1), RAP14 (XM_002304102), RAP18 (XM_002316143.1), RAP19 (XM_002311223.1), RAP21 (XM_002299202.1), RAP23 (XM_002303852.1). Далее нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания этих генов были выровнены с ортологами гена *ANT* из различных растений и с генами *AIL A. thaliana* и на основе полученных данных было построено филогенетическое древо (рис. 40а). Наиболее близкими к гену *AtANT A. thaliana* оказались гены тополя с обозначениями RAP10, RAP11, RAP12 и RAP13, причем из филогенетического древа было неясно, который из них может оказаться ортологом гена *ANT*. Интересно отметить, что ген тополя RAP14 оказался ближе к гену *AtAIL1*, гены RAP18 и RAP19 ближе к гену *AtBBM*, а гены RAP23 и RAP24 к генам *PLETHORA* (рис 40а). Путем выравнивания аминокислотных последовательностей белковых молекул генов RAP10, RAP11, RAP12 и RAP13 тополя были обнаружены оба AP2-домена (R1 и R2). Отличительным признаком предсказанных белковых молекул ANT тополя, в отличие от *A. thaliana* и табака, было отсутствие трех аминокислот в R1-домене и ряд аминокислотных замен в обоих доменах (рис. 40б). Все четыре предполагаемых ортолога гена *ANT* тополя характеризовались наличием протяженной предоменной области размером около 300 аминокислот, что является признаком принадлежности к подгруппе euANT, группы ANT, подсемейства AP2 (Kim et al., 2006a). В предоменной области исследуемых белков нами были обнаружены три консервативных участка в положениях 19-28 а.к., 81-103 а.к., 265-280 а.к. относительно ANT *A. thaliana*, которые вероятнее всего являются euANT2, euANT3 и euANT4 мотивами соответственно (Kim et al., 2006a). Исходя из этих результатов, с целью получения трансгенных растений, были отобраны гены с обозначениями «RAP10» и «RAP13», которым мы дали

условные названия *PtrANTL1* и *PtrANTL2* (*Populus trichocarpa AINTEGUMENTA-like*). Так как тополь *P. trichocarpa* во флоре России отсутствует, была поставлена задача клонировать целевые гены из генома его ближайшего родственника тополя черного *Populus nigra*. В связи с этим, названия генов были изменены на *PnANTL1* и *PnANTL2*.



(б)

R1-домен

```
AtANT    280 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSFKKEGHSRKGRQVYLGGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHTNFSAENYQKEIE 357
BnANT    283 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSFKKEGHSRKGRQVYLGGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHTNFSVENYQKEIE 360
NtANTL1  308 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGRQVYLGGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHINFPLENYQKELE 385
PtrANTL1 299 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGRQ---GGYDMEEKAARSYDLAALKYWGPSTHINFPLENYQEELE 373
PtrANTL2 265 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQSRKGRQ---GGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHINSPLENYQKEIE 339
PtrRAP11 299 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQTRKGRQ---GGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHINFPLENYQEELE 373
PtrRAP12 303 RTSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWDNSCKKEGQSRKGRQ---GGYDMEEKAARAYDLAALKYWGPSTHINFPLENYQNEIE 377
```

R2-домен

```
AtANT    383 ASIYRGVT-RHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFGTQEEAAEAYDVAAIKFRGTNAVTNFDITRYDVDR 451
BnANT    386 ASIYRGVT-RHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFGTQEEAAEAYDVAAIKFRGTNAVTNFDITRYDVDR 454
NtANTL1  411 ASMYRGVT-RHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFSTQEEAAEAYDVAAIKFRGVNAVTNFDISRYDVEK 479
PtrANTL1 399 ASIYRGVT-RHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFSTQEEAAEAYDIAAIKFRGVNAVTNFNITRYDVDR 467
PtrANTL2 366 ASIYRGVTSRHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFSTQEEAAEAYDVAAIKFRGVSAVTNFDITRYDVER 435
PtrRAP11 399 ASIYRGVT-RHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFSTQEEAAEAYDIAAIKFRGVNAVTNFNITRYDVDR 467
PtrRAP12 403 ASMYRGVTSRHHQHGRWQARIGRVAGNKDLYLGTFSTQEEAAEAYDVAAIKFRGVNAVTNFVITRYDVER 472
```

Рис. 40. Результаты анализа последовательностей нуклеотидов и аминокислот гена *AtANT* и его гомологов: а - филогенетическое древо сходства гена *AtANT A. thaliana* с гомологичными генами других растений, все значения бустреп-анализа на древе превышали 70%; б - результаты выравнивания последовательностей аминокислот AtANT и его гомологов из рапса, табака и тополя. Серым цветом выделены консервативные участки R1- и R2-доменов.

Клонирование генов *PnANTL1* и *PnANTL2* и получение генно-инженерных конструкций целевых генов в векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1

Участки ДНК *P. nigra*, содержащие гены *PnANTL1* и *PnANTL2*, были амплифицированы из геномной ДНК и их размер составил около 3000 пн, что совпало с теоретически ожидаемыми размерами в 3181 и 3113 пн соответственно (по геному *P. trichocarpa*) (рис. 41а, б). Ампликоны были клонированы в фагмидном Т-векторе pKRX, а затем частично секвенированы (примерно по 500 нуклеотидов с обоих концов). Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенные нами копии целевых генов совпадают с ожидаемыми. Далее в вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования. Целевые гены были вырезаны из вектора pKRX по сайту *Bse*PI, а липкие концы затуплены Т4 ДНК-полимеразой. После этого по сайту рестрикции *Sma*I было осуществлено ненаправленное клонирование генов *PnANTL1* и *PnANTL2*. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, PnANTL1F, PnANTL1R, PnANTL2F и PnANTL2R (см. табл. 1). Ген *PnANTL2* также был клонирован в векторе pCambia 1305.1 вместо репортерного гена *GUS*. После проверки, полученные бинарные векторы с генами *PnANTL1* и *PnANTL2* были введены в клетки *A. tumefaciens*. Агробактериальные клоны, содержащие векторы pCambia 1301 и pCambia 1305.1 с целевыми генами в сенс-ориентации, были использованы для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получению трансгенных растений.

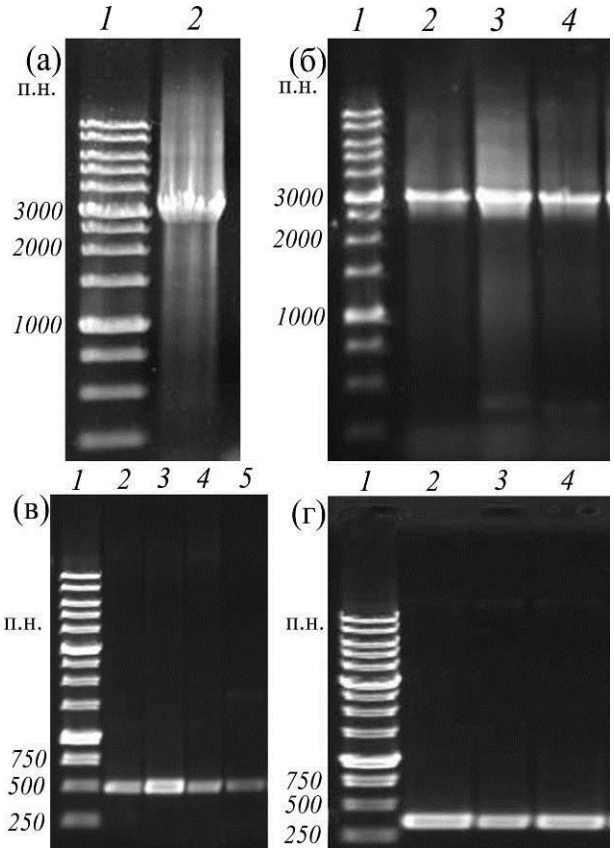


Рис. 41. Электрофореграммы результатов ПЦР и ОТ-ПЦР генов *PnANTL1* и *PnANTL2*: а – амплификация геномной копии гена *PnANTL1* тополя черного размером 3181 пн, 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия); 2 – ампликон гена *PnANTL1*; б - амплификация геномной копии гена *PnANTL2* тополя черного размером 3113 пн, 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия); 2-4 – ампликоны гена *PnANTL2*; в - результаты ОТ-ПЦР гена *PnANTL1* (2 - 7, 3 - 31, 4 - 32 и 5 – 37-я линии), 1 - маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия); г - результаты ОТ-ПЦР гена *PnANTL2* (2 – 6, 3 – 8, 4 – 11-я линии), 1 - маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия).

Сравнительная морфологическая характеристика трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих гены *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного

При помощи вектора pCambia 1301/PnANTL1 было получено 39 трансгенных побегов, из которых укоренились, характеризовались высоким уровнем экспрессии репортерного гена и были успешно акклиматизированы к условиям почвы семь растений. Семена этих растений были высеяны на селективную среду, где четыре растения под номерами 7, 31, 32 и 37 показали классическое соотношение выживших и погибших 3:1, что косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Наличие экспрессии целевого гена в отобранных растениях было доказано методом ОТ-ПЦР (рис. 41в). При использовании генно-инженерной конструкции pCambia 1301/PnANTL2 в целом удалось пересадить на среду для укоренения 27 трансгенных побегов, из которых в итоге было получено пять линий трансгенных растений. Расщепление 3:1 и экспрессия репортерного гена *GUS* были показаны для линий под номерами 5, 6 и 8, причем лишь в последних двух линиях обнаруживался высокий уровень

экспрессии целевого гена *PnANTL2* (рис. 41г). Для создания трансгенных растений также была использована конструкция pCambia 1305.1/PnANTL2. В этом случае были получены 16 трансгенных побегов, из них укоренились и были акклиматизированы к условиям почвы восемь растений, а у линий под номерами 8, 9, 11 и 14 была показана экспрессия целевого гена *PnANTL2* (рис. 41г). Далее, по пять растений второго поколения этих отобранных линий, были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике.

Трансгенные по генам *PnANTL1* и *PnANTL2* растения табака по длине листьев через 30 дней после акклиматизации к условиям почвы превосходили контрольные растения в среднем на 20%. Через 45 дней после пересадки на почву было зафиксировано увеличение длины листьев по сравнению с контролем для вариантов с целевым геном *PnANTL1* на 58% и с геном *PnANTL2* на 29% в среднем (рис. 42а). В период цветения длина листьев у всех трансгенных растений была больше, чем у контрольных (рис. 42б), причем в случае с геном *PnANTL1* в среднем на 21%, а с геном *PnANTL2* на 17%. По площади листьев трансгенные и контрольные растения практически не различались, лишь для вариантов с геном *PnANTL2* было отмечено небольшое увеличение в среднем на 9%. Следует отметить, что внутри контрольной группы растений различия в размерах листьев ни по площади, ни по длине не превышали в среднем 5%. Поэтому справедливо полагать, что изменения в длине листьев у трансгенных растений обусловлены специфическим действием конститутивной экспрессии целевого гена. Вопреки ожиданиям, трансгенные по гену *PnANTL1* растения табака отличились не увеличением, а уменьшением размеров цветка в среднем на 8% (рис. 42в). В то же время трансгенные растения, экспрессирующие ген *PnANTL2*, характеризовались небольшим увеличением длины цветка в среднем на 4% (рис. 42в). Внутри группы контрольных растений длина цветка варьировала только в пределах 1%, что подтверждает наши предположения о специфическом влиянии конститутивной экспрессии целевого гена на размеры цветка.

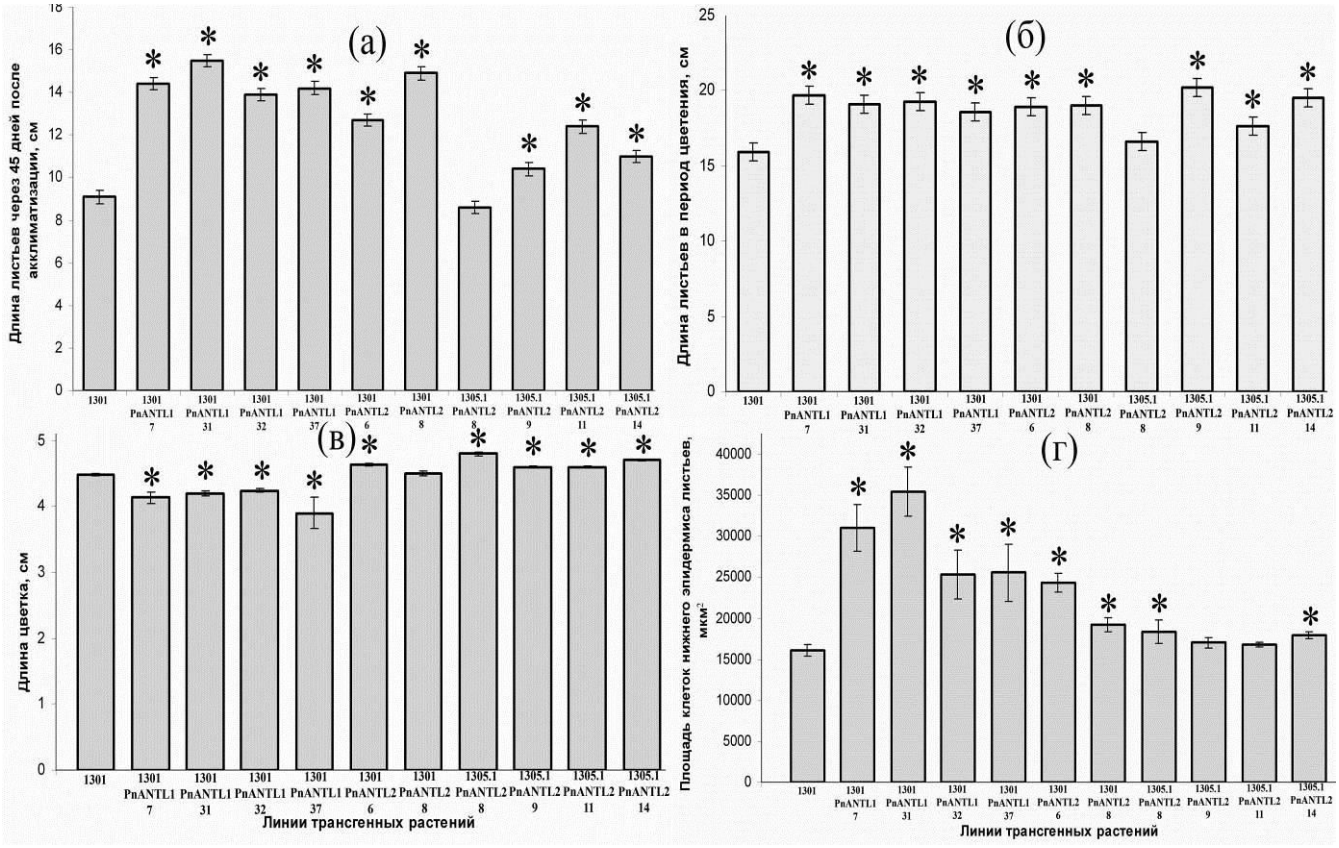


Рис. 42. Морфометрические параметры трансгенных растений: а – длина листьев через 45 дней после пересадки на почву, см; б – длина листьев в период цветения, см; в – длина цветка, см; г – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, мкм^2. 1301 – контрольные растения, содержащие в своем геноме Т-ДНК pCambia 1301 без целевого гена. PnANTL1 и PnANTL2 – обозначения линий трансгенных растений. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * - $p<0,05$).

Для выяснения причины увеличения размеров органов, нами были проведены микроскопические исследования клеток нижнего эпидермиса листьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет стимулирования клеточного деления. Трансгенные по гену *PnANTL1* растения, в отличие от контрольных растений, характеризовались существенным увеличением размеров клеток эпидермиса листьев (рис. 42г и 43). При этом у линии 1301/PnANTL1 №7 клетки были больше на 92%, у линии 1301/PnANTL1 №31 на 120%, у линии

1301/PnANTL1 №32 на 57%, а у линии 1301/PnANTL1 №37 на 59% крупнее, чем у контрольных растений. Из полученных данных видно, что размеры клеток у опытных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры отдельных листьев (рис. 42, 43). Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев, однако степень увеличения была меньше и составила в среднем 30%. Размеры клеток эпидермиса листьев у трансгенных по гену *PnANTL2* растений табака также были увеличены, но в меньшей степени, чем у трансгенных по гену *PnANTL1* (рис. 42г). В среднем разница по площади клеток у трансгенных по гену *PnANTL2* и контрольных растений составила 18%. Это означает, что листья в данном случае у трансгенных растений увеличивались в основном за счет возрастания размеров клеток, хотя клеточное деление также, скорее всего, было затронуто. Отметим, что в случае с геном *PnANTL2* компенсаторного уменьшения количества клеток, как в случае с геном *PnANTL1* не происходило (рис. 43). В среднем на 1 мм^2 листовой поверхности у контрольных растений приходилось 64 клетки эпидермиса, в то время как у трансгенных растений этот показатель составил от 37 в случае с геном *PnANTL1* до 57 клеток с геном *PnANTL2*.

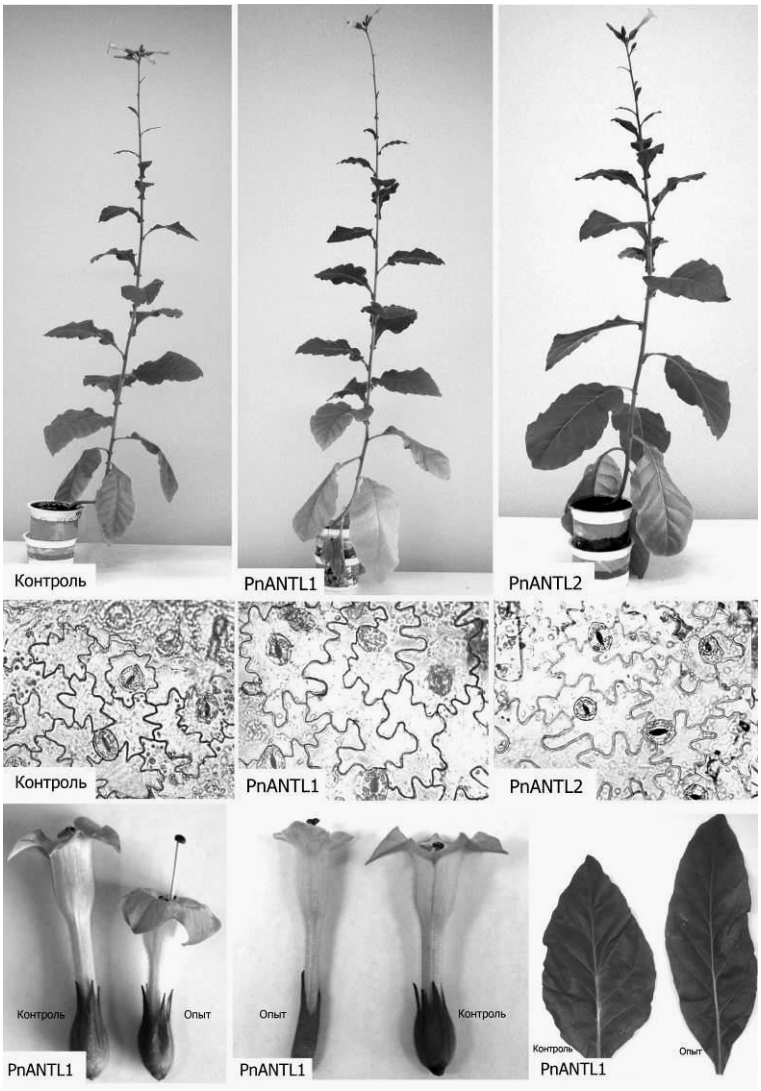


Рис. 43. Сравнение трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих гены *PnANTL1* и *PnANTL2,* и контрольной группы, содержащей в своем геноме Т-ДНК плазмиды pCambia 1301 без целевого гена. Сверху – контрольные и опытные растения в период цветения; в середине – клетки нижнего эпидермиса листьев (200х увеличение); снизу – сравнение цветков и листьев трансгенных растений с отличающимися по морфологии органов от нормы и контрольной группы.

Конститутивная экспрессия гена *PnANTL1* влияла негативно не только на длину цветка, но иногда приводила к различным дефектам развития данного органа. Одним из проявлений трансгена *PnANTL1* было уменьшение размеров венчика и тычинок, при этом размеры плодолистиков и чашелистика оставались неизменными (рис. 43, снизу слева). Также были получены трансгенные растения с нарушенной симметрией в венчике и чашелистиках (рис. 43, снизу посередине).

В некоторых трансгенных по гену *PnANTL1* растениях табака листья сильно удлинялись, но их площадь и ширина были даже меньше, чем у контрольных растений (рис. 43, снизу справа).

Известно, что в регуляции клеточного растяжения принимают участие экспансины (Шарова, 2007). У табака на данный момент идентифицировано лишь 6 генов α-экспансинов (Link, Cosgrove, 1998), которые получили названия *NtEXPA*, с порядковыми номерами от 1 до 6, и их нуклеотидные последовательности имеются в GenBank (AF049350-AF049355). Нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры для проведения полуколичественной ОТ-ПЦР мРНК генов *NtEXPA4* (см. раздел 5.2). В ходе проведенных экспериментов было показано, что в трансгенных по генам *PnANTL1* и *PnANTL2* растениях табака наблюдается повышенный, по сравнению с контролем, уровень содержания транскриптов соответствующего гена экспансина (рис. 44).

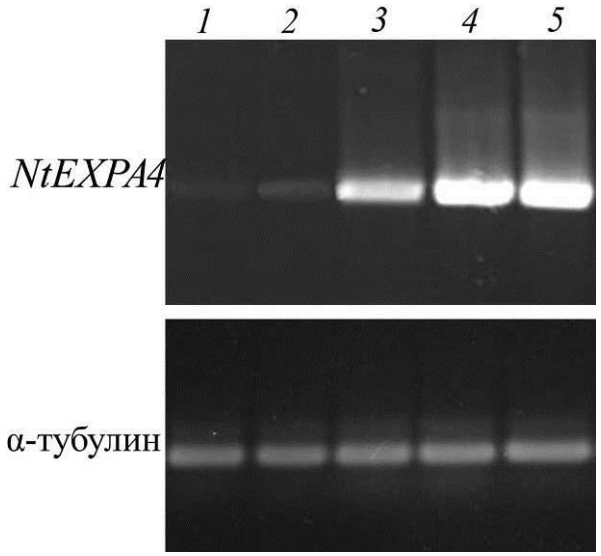


Рис. 44. Влияние конститутивной экспрессии генов *PnANTL1* и *PnANTL2* на уровень содержания транскриптов гена, кодирующего экспансин NtEXPA4. 1-2 – контрольные растения; 3 – трансгенные по гену *PnANTL2* растения табака, 4, 5 - трансгенные по гену *PnANTL1* растения табака.

Обсуждение результатов

В результате проведенных нами исследований, в геноме тополя были обнаружены четыре предполагаемых ортолога гена *ANT*, в то время как в *A. thaliana* данный ген, судя по всему, представлен лишь в единичной копии. Все это, видимо, является отражением более сложной организации генома тополя по сравнению с *A. thaliana*. Регуляция роста и развития в *A. thaliana* и *P. nigra*, вероятнее всего, весьма сходны, но в тополе этот процесс более сложен и может регулироваться большим количеством транскрипционных факторов.

Экспрессия гомологов гена *AtANT* находится под контролем ауксинов (Hu et al., 2003; Aoyama et al., 2012) и цитокининов (см. раздел 7.2.1), которые, в свою очередь, регулируют одновременно клеточное деление и клеточное растяжение (Downes et al., 1998; Роньжина, 2003; Романов, 2009, Шакирова, 2010). А вот гены, экспрессия которых регулируется транскрипционными факторами подсемейства AP2, в большинстве своем не известны. В литературе имеются лишь сведения о влиянии сверхэкспрессии гена *AtANT* на клеточную пролиферацию через ген *CYCD3;1* (Mizukami, Fischer, 2000), а про влияние на уровень экспрессии генов-регуляторов клеточного растяжения ранее не сообщалось. Рост клеток растяжением в растениях находится под контролем большой группы белков экспансинов (Шарова, 2007), причем из наших данных следует, что через регуляцию экспрессии этих белков транскрипционные факторы AP2 тополя могут стимулировать рост клеток растяжением в трансгенных растениях табака. Действительно, в *A. thaliana* сверхэкспрессия гена *AtANT* стимулировала не только клеточное деление, но и клеточное растяжение, например, в лепестках, тычинках и плодолистиках (Krizek, 1999). Сверхэкспрессия этого же гена в гетерологичных условиях, а именно в петунии и львином зеве, также способствовала увеличению размеров цветков, причем за счет стимуляции роста клеток растяжением (Machnado-Rojo et al., 2014). К тому же, одна и та же группа белковых факторов вполне может быть ответственна за экспрессию генов-регуляторов различных процессов, например, известно, что транскрипционные факторы семейства GRF контролируют как клеточную пролиферацию, так и

клеточное растяжение (Horiguchi et al., 2005; Kim et al., 2003). Экспрессия экспансинов контролируется многими фитогормонами, в том числе ауксинами и цитокининами (Шарова, 2007), а такие транскрипционные факторы, как AP2 и GRF, судя по литературным данным, являются важными звеньями в передаче фитогормонального сигнала к генам, белковые продукты которых обеспечивают рост клеток растяжением.

Конститутивная экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2*, также как и в случае с геном *BnaX.ANT.b* способствовала росту листьев в длину, в то время как эктопическая экспрессия гена *AtANT* в *A. thaliana* приводила к увеличению размеров листьев с сохранением пропорций (Mizukami, Fischer, 2000). Можно предположить, что исследуемые нами гены транскрипционных факторов тополя участвуют, в том числе, в регуляции роста клеток растяжением, а не только в контроле над клеточной пролиферацией в зачатках органов как AtANT-фактор *A. thaliana*. Но, в то же время, полученные нами результаты, возможно, говорят об особенностях проявления трансгена в гетерологичных условиях в табаке, который, как известно по организации генома более сложен, чем *A. thaliana*. Полностью не исключается также возможность косупрессии, когда уровень экспрессии как гена *ANT* табака, так и трансгенов *PnANTL1* или *PnANTL2* в опытных растениях на самом деле снижается, а благодаря компенсаторному механизму размеры клеток увеличиваются из-за уменьшения их количества в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000). Однако, учитывая увеличение размеров органов у трансгенных растений, это представляется маловероятным.

Наиболее стабильными у табака являются размеры цветка, длина которых у растений дикого типа сорта SR1 в наших исследованиях всегда составляла 4,5 см. По нашим данным можно сделать вывод, что продукт гена *PnANTL1* отрицательно влияет на рост венчика и тычинок. Возможно, это объясняется влиянием транскрипционного фактора PnANTL1 на уровень экспрессии гомеозисных генов ABC (Drews et al., 1991), однако подтверждающие данные в литературе отсутствуют. Наоборот, конститутивная экспрессия гена *PnANTL2* подобно генам *AtANT A. thaliana* (Krizek, 1999), *NtANTL* табака (раздел 7.2.1) и

BnaX.ANT.b рапса (раздел 7.2.2), способствует пропорциональному увеличению размеров всех цветочных органов. Однако изменения в размерах цветков у трансгенных табаков были менее выраженными, чем в случае с *A. thaliana*, что, возможно, объясняется гораздо большим компенсаторным потенциалом генетической системы регуляции размеров цветков в табаке по сравнению с резуховидкой.

7.2.4. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих консервативные участки гена *ANT* в антисмысловой ориентации

Исходя из наших (раздел 7.2.1) и литературных данных (Mizukami, Fischer, 2000), следует, что путем снижения уровня экспрессии гена *ANT* могут быть получены трансгенные растения с уменьшенными размерами органов. Например, мутанты *ant A. thaliana* отличались замедленным развитием, уменьшением количества цветков и их размеров, при этом у мутантных растений также наблюдались такие нарушения в развитии семяпочки, как отсутствие интегументов и женского гаметофита, что являлось причиной их стерильности (Krizek et al., 1999). При снижении уровня экспрессии гена *PhANT* петунии, было показано уменьшение размеров его венчика, тычинок и чашелистиков (Machnado-Rojo et al., 2014).

Наиболее простым способом получения трансгенных растений с уменьшенными размерами органов, является внедрение в растения участков гена *ANT* в антисмысловой ориентации по отношению к промотору. Такие генно-инженерные конструкции теоретически могут быть использованы для ускоренного получения так называемых “бонсай”, на выращивание которых в настоящее время тратится значительное время и много усилий. Однако геномы многих растений пока не секвенированы и гомологи гена *ANT* изучены лишь у ограниченного круга растений. Поэтому представляет определенный интерес создание универсальных генно-инженерных конструкций, которые могут быть использованы для получения трансгенных растений, относящихся к широкому кругу видов.

Исходя из перечисленных выше соображений, нами были проведены исследования, в ходе которых осуществили поиск и амплифицировали два консервативных участка гена *ANT* из *A. thaliana*, рапса, табака и тополя. Эти участки ДНК были клонированы нами в бинарных векторах pCambia в антисмысловой ориентации. Полученные генно-инженерные конструкции были проверены на трансгенных растениях табака. Предполагалось, что часть трансгенных растений будет отличаться существенным замедлением развития и уменьшением размера как вегетативных, так и генеративных органов. Наиболее эффективные генно-инженерные конструкции планировалось в будущем отобрать для создания декоративных древесных растений с уменьшенными размерами органов.

Поиск консервативных участков гена *ANT* и подбор универсальных праймеров для их амплификации

Для поиска консервативных участков гена *ANT* в качестве основы использовали последовательность под номером NM_119937 из GenBank, относящейся к *A. thaliana*. Вначале были рассмотрены гомологи гена *ANT*, которые относятся к *N. tabacum* (AY461432), *V. vinifera* (XM_002285431), *P. trichocarpa* (XM_002307275 и XM_002310846), *B. napus* (DQ211970), *Ginkgo biloba* (AB195245), *Pinus thunbergii* (AB101585), *Cycas revoluta* (AB195243), *O. sativa* (NM_001056001), *Triticum aestivum* (AB458519), *Sorghum bicolor* (XM_002468181) и др. Было проведено выравнивание последовательностей генов *ANT* различных растений. По гомологии нуклеотидных последовательностей гены *ANT* табака, винограда и тополя сформировали первую, а *A. thaliana* и рапса вторую группу. Далее расположились гены *ANT* голосеменных и однодольных. Для поиска консервативных участков исследуемого гена были отобраны лишь представители двудольных растений. Гены *ANT* табака, винограда, тополя, *A. thaliana* и рапса были выровнены, в результате чего были обнаружены два довольно протяженных консервативных участка ДНК (рис. 45). Для выделения этих двух участков гена *ANT* были подобраны относительно универсальные праймеры, которые, по нашему предположению, должны позволить провести

успешную амплификацию коротких участков целевых генов у целого ряда двудольных растений. Прямой праймер для первого участка был подобран к области 804–827 пн гена *AtANT A. thaliana*, а обратный праймер к области 925–948 пн, праймеры получили условные названия ANTReg1F и ANTReg1R (см. табл. 1). Теоретически рассчитанный размер первого участка как у *A. thaliana*, так и у других растений составил 145 пн, однако внутри этого участка находится один интрон и с учетом этого полный его размер составляет 233 пн. Для амплификации второго консервативного участка была выбрана область 1051–1169 пн гена *AtANT A. thaliana*, при этом размер ампликона должен был составить 119 пн (праймеры получили условные названия ANTReg2F и ANTReg2R). Было выяснено, что этот участок ДНК не содержит интронов, поэтому при использовании для ПЦР геномной ДНК его размер не должен был меняться.

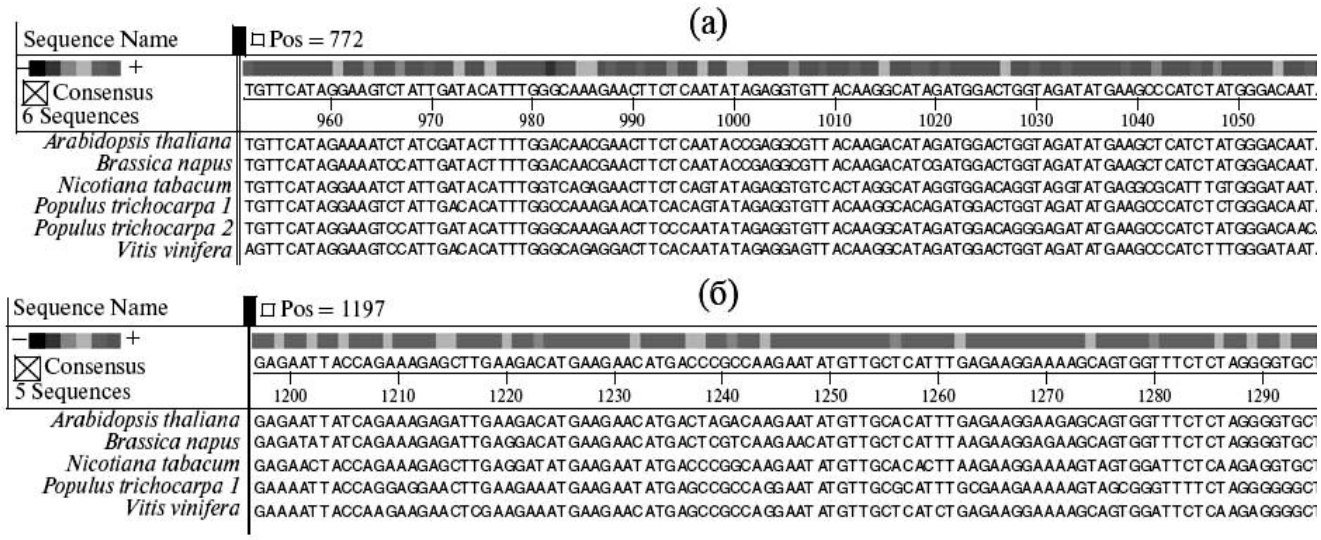


Рис. 45. Результаты сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов гена *ANT* различных растений: а – первый консервативный участок гена *ANT*, обозначенный Reg1; б – второй консервативный участок гена *ANT*, обозначенный Reg2.

Амплификация и клонирование консервативных участков гена *ANT A. thaliana*, рапса, табака и тополя в бинарных векторах pCambia 2301, pCambia 1301 и pCambia 1305.1

После этапа выделения и очистки геномной ДНК *A. thaliana*, рапса, табака и тополя провели амплификацию консервативных участков гена *ANT*. В результате проделанной работы из *A. thaliana*, табака и тополя были получены ампликоны первого участка с ожидаемым размером около 230 пн (рис. 46а). Из табака же был амплифицирован участок большего размера, а именно около 250 пн, что, видимо, объясняется наличием более протяженного интрона (рис. 46а). Были также получены ампликоны второго участка гена *ANT A. thaliana*, рапса, табака и тополя (рис. 46а, б), размеры которых по результатам электрофореза составили около 100 пн и совпали с теоретически ожидаемыми. Также был амплифицирован 5'-конец гена *ANT* рапса размером 314 пн, этому участку амплифицированной ДНК при этом дали название ANTB (рис. 46в). Все полученные ампликоны были секвенированы, полученные последовательности ДНК были проверены при помощи программ MegAlign и MegaBlast. По результатам выравниваний было сделано заключение, что выделенные нами копии участков гена *ANT* полностью совпадают по нуклеотидной последовательности с исследуемыми участками ДНК (NM_119937, AY461432, XM_002310846, DQ211970), а первый участок гена *ANT* табака действительно содержит интрон большего размера. Все полученные ампликоны были очищены, а их концы достраивались Т4 ДНК-полимеразой. После дополнительного этапа очистки все фрагменты ДНК были готовы к ненаправленному клонированию в бинарных векторах.

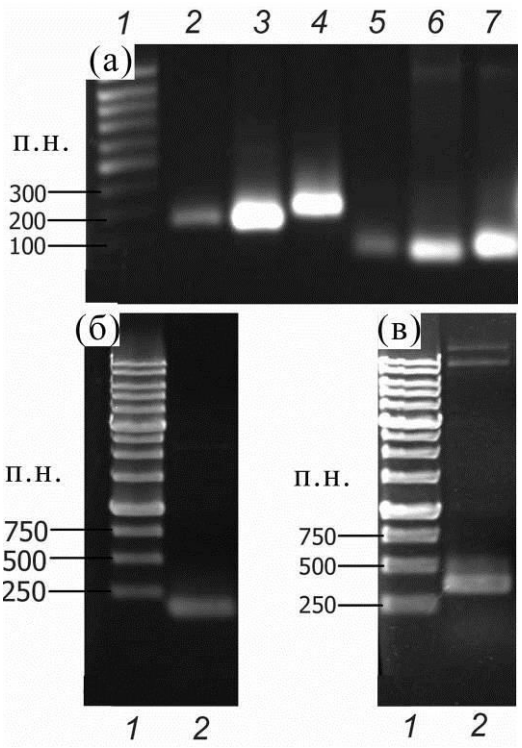


Рис. 46. Электрофореграммы результатов ПЦР участков гена *ANT* различных растений: а – результаты амплификации консервативных участков гена *ANT*, где 1 – маркер молекулярной массы 100–1000 пн (Силекс, Россия); 2 – ампликон Reg1 *A. thaliana*; 3 – ампликон Reg1 рапса; 4 – ампликон Reg1 табака; 5 – ампликон Reg2 *A. thaliana*; 6 – ампликон Reg2 рапса; 7 – ампликон Reg2 табака; б – результаты амплификации второго консервативного участка гена *ANT* тополя черного, где 1 – маркер молекулярной массы 250–10 000 пн (Сибэнзим, Россия), 2 – ампликон Reg1 тополя черного; в – результаты амплификации 5'-концевого участка гена *ANT* рапса размером 314 пн, где 1 – маркер молекулярной массы 250–10 000 пн (Сибэнзим, Россия), 2 – ампликон ANTB рапса.

Бинарный вектор pCambia 2301, содержащий промотор ВМГ, был расщеплен эндонуклеазой рестрикции *Xba*I; липкие концы достраивались Т4 ДНК-полимеразой. Это было сделано для того, чтобы ненаправленно клонировать в этом векторе ампликоны с “тупыми” концами. Также в бинарный вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и 35S polyA. В этом модифицированном бинарном векторе можно клонировать

различные целевые гены по сайту рестрикции *Sma*I. Из вектора pCambia 1305.1 по сайтам рестрикции *Nco*I и *Pml*I был выщеплен ген *GUS*, а липкие концы были достроены Т4 ДНК-полимеразой. В этом видоизмененном векторе также можно клонировать различные целевые гены по “тупым” концам. Таким образом, нами были модифицированы три бинарных вектора pCambia, в которых были клонированы в антисмысловой ориентации ампликоны двух консервативных участков гена *ANT A. thaliana*, рапса, табака, тополя и 5'-конец гена *ANT* рапса размером 314 пн. Поиск клонов с антисенс-ориентацией целевого гена осуществляли при помощи комбинации праймеров подобранных для амплификации промотора, целевого гена и сайта полиаденилирования. Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны при ПЦР, например, в случае сочетания следующих пар праймеров: DMVF/ANTReg1F, DMVF/ANTReg2F, 35SF/ANTReg1F, 35SF/ANTReg2F, ANTReg1R/polyAR, ANTReg2R/polyAR и т.д. Наоборот, при сочетании прямого праймера промотора и обратного праймера целевого гена специфичные ампликоны образовывались только при сенс-ориентации участков целевого гена. Список некоторых полученных в ходе работы генно-инженерных конструкций приведен в табл. 4. Для дальнейших экспериментов были использованы только конструкции, содержащие консервативные участки гена *ANT A. thaliana* и табака, а также 5'-конец гена *ANT* рапса размером 314 пн, так как одновременное получение большего количества трансгенных растений табака представляет определенные трудности из-за больших размеров растений, очень длительного вегетационного периода табака и увеличения объема работы. После полной проверки полученные бинарные векторы были внедрены в клетки *A. tumefaciens*. Агробактериальные клоны, содержащие целевые генно-инженерные конструкции, были использованы для экспериментов по получению трансгенных растений табака и исследованию их морфофизиологических особенностей.

Таблица 4. Список генно-инженерных конструкций и количество полученных трансгенных растений по каждому варианту

Генно-инженерная конструкция	Общее число трансгенных побегов	Количество Km^r/Hg^r растений	Количество GUS^+ растений	Количество акклиматизированных растений	Число линий, с уменьшенными размерами органов
1301/Reg1A[a]	44	7	24	6	6
1301/Reg1N	50	10	28	7	5
1301/Reg2N	37	7	21	6	3
2301/Reg1N	44	9	2	4	3
2301/Reg2A	36	16	3	4	2
1305.1/Reg2N	17	11	-	9	4
2301/ANTB	32	5	6	3	3

[a]1301/Reg1A – 1301 означает бинарный вектор pCambia 1301, Reg1A - участок ДНК Reg1 *A. thaliana*. N – *N. tabacum*, B – *B. napus*.

Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих участки гена *ANT A. thaliana* и рапса в антисмысловой ориентации

Для получения трансгенных растений табака были отобраны следующие генно-инженерные конструкции: 1301/Reg1N, 1301/Reg1A, 1301/Reg2N, 2301/Reg1A, 2301/Reg1N, 2301/Reg2A, 1305.1/Reg2N, 2301/ANTB, 2301/промотор ВМГ, 1301/35S промотор, где N – это табак, A – *A. thaliana*, ANTB – участок гена *ANT* рапса. Для адаптации к условиям почвы отбирали только хорошо укоренившиеся на селективной среде растения с высокой активностью GUS. Все данные по количеству отобранных растений содержатся в табл. 4. Например, для варианта 1301/Reg1A было получено 44 трансгенных побега, из которых 7 укоренились на агаризованной среде МС и 6 были адаптированы к условиям почвы. Затем растения были доведены до стадии цветения, при этом все они были фертильными, самоопылялись и дали семена. Часть растений поколения T_0, как и ожидалось, заметно отставала в росте от контрольных растений, содержащих Т-ДНК вектора без целевого гена. Все эксперименты по оценке скорости роста и размеров органов проводились только с растениями поколения T_1. Семена всех отобранных вариантов были высажены на селективную среду МС, где определяли соотношение трансгенных и нетрансгенных сеянцев. Для каждого варианта было

отобрано по 3–7 разных линий растений, дающих расщепление 3:1. Из каждой чашки Петри в почву было пересажено по 10 проростков среднего размера, из которых оставляли в итоге по 5 растений, использовавшихся для измерения основных морфометрических параметров, начиная с 30-го дня адаптации и до периода цветения. Из трансгенных растений каждой линии выделяли ДНК и проводили ПЦР-анализ на наличие промотора и целевого гена.

Сравнительный морфологический анализ растений табака, экспрессирующих участки гена *ANT* в антисмысловой ориентации

Более половины полученных нами линий трансгенных растений, экспрессирующих участки гена *ANT* в антисмысловой ориентации поколения T_1, характеризовались статистически достоверным уменьшением размеров органов (рис. 47). Например, в варианте 1301/Reg1N из 7 линий растений 5 отличались замедлением роста и уменьшением размеров вегетативных органов (табл. 5). В то же время, необходимо отметить, что часть линий трансгенных растений не отличалась от контрольных и не характеризовалась уменьшением размеров органов. Поэтому в дальнейших наблюдениях и измерениях использовали только линии трансгенных растений с уменьшенными размерами органов. Через 30–45 дней после адаптации к условиям почвы трансгенные и контрольные растения практически еще не отличались по размеру листьев и стеблей, т.е. на ранних стадиях развития наши генно-инженерные конструкции в меньшей степени влияли на рост и развитие трансгенных растений табака. Однако, начиная с 60-го дня после пересадки в почву, у трансгенных растений в отличие от контрольных, начиналось заметное отставание в росте листьев (табл. 5). Через некоторое время у трансгенных растений рост листьев практически прекращался, тогда как рост листьев контрольных растений продолжался вплоть до стадии цветения. В итоге в период цветения растения варианта 1301/Reg1A характеризовались уменьшением площади листьев в среднем на 83%, а по сырой массе на 77%, по сравнению с контрольными растениями (табл. 5). Растения варианта 1301/Reg1N по площади листьев были меньше в среднем на 71%, по массе на 63%, а трансгенные растения 2301/Reg3A по площади листьев на 61%, по массе на 51% меньше, чем контрольные.

Таблица 5. Размеры органов контрольной группы и некоторых трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих участок гена *ANT* в антисмысловой ориентации[a]

Параметр	Трансгенные растения						Контрольные растения	
	1301/ Reg1A	1301/ Reg1N	1301/ Reg2N	2301/ Reg1N	2301/ Reg2A	2301/ ANTB	2301	1301
Длина листьев, см								
30 дней	4,5±0,4	**2,8+0,3***	4,7±0,9	4,3±0,4	**2,7±0,1***	5,3±0,6	4,2±0,1	4,0±0,5
45 дней	6,2±0,8	7,5±0,4	7,5±0,8	8,0±0,7	6,9±0,4	7,4±0,7	6,7±0,5	7,2±0,4
60 дней	**6,8±0,9***	**9,7±0,7***	**10,4±0,8***	13,3±0,6	**6,3±0,4***	12,7±0,1	13,3±0,6	13,0±0,6
В период цветения	**7,4±0,6***	**9,8±0,6***	**13,7±1,5***	**14,0±0,4***	**12,8±0,6***	**13,2±0,1***	19,3±0,2	17,2±0,2
Площадь листьев, см^2	**22,8±1,8***	**39,6±5,8***	**93,5±14,4***	**96,0±8,0***	**63,3±2,1***	**67,5±2,2***	162,0±0,6	137,3±2,9
Высота стебля, см	**47,5±7,6***	**53,2±7,8***	82,5±3,3	77,0±5,6	73,5±3,6	73,3±0,9	88,0±4,2	78,0±3,3
Длина цветка, см	**3,90±0,04***	**4,24±0,02***	**4,30±0,05***	**4,3±0,1***	**4,3±0,1***	**4,2±0,1***	4,5±0,1	4,5±0,1
Масса растения, г	**8,7±1,1***	**14,2±2,2***	**26,3±3,0***	**33,0±4,3***	**24,7±0,7***	**19,0±1,1***	50,0±2,5	38,0±1,2

[a]Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

Растения других вариантов также характеризовались существенным уменьшением размеров листьев и сырой массы, при этом разница составляла от 30 до 65% по сравнению с контрольными растениями. По высоте стебля трансгенные растения отличались от контрольных в меньшей степени, чем по размеру листьев, но, в то же время, например, в вариантах 1301/Reg1A и 1301/Reg1N стебли были меньше в среднем на 38 и 32% соответственно, чем у контрольных растений. Наименьшие размеры цветков были характерны для растений варианта 1301/Reg1A, у которых они были в среднем на 13% меньше, чем у контрольных растений (табл. 5). У других трансгенных растений размеры цветков в меньшей степени отличались от контрольных растений, т.е. полученные нами генно-инженерные конструкции существенно влияли на развитие некоторых

растений, но в целом это в меньшей степени отражалось на размерах цветков, чем на размерах листьев и стеблей.

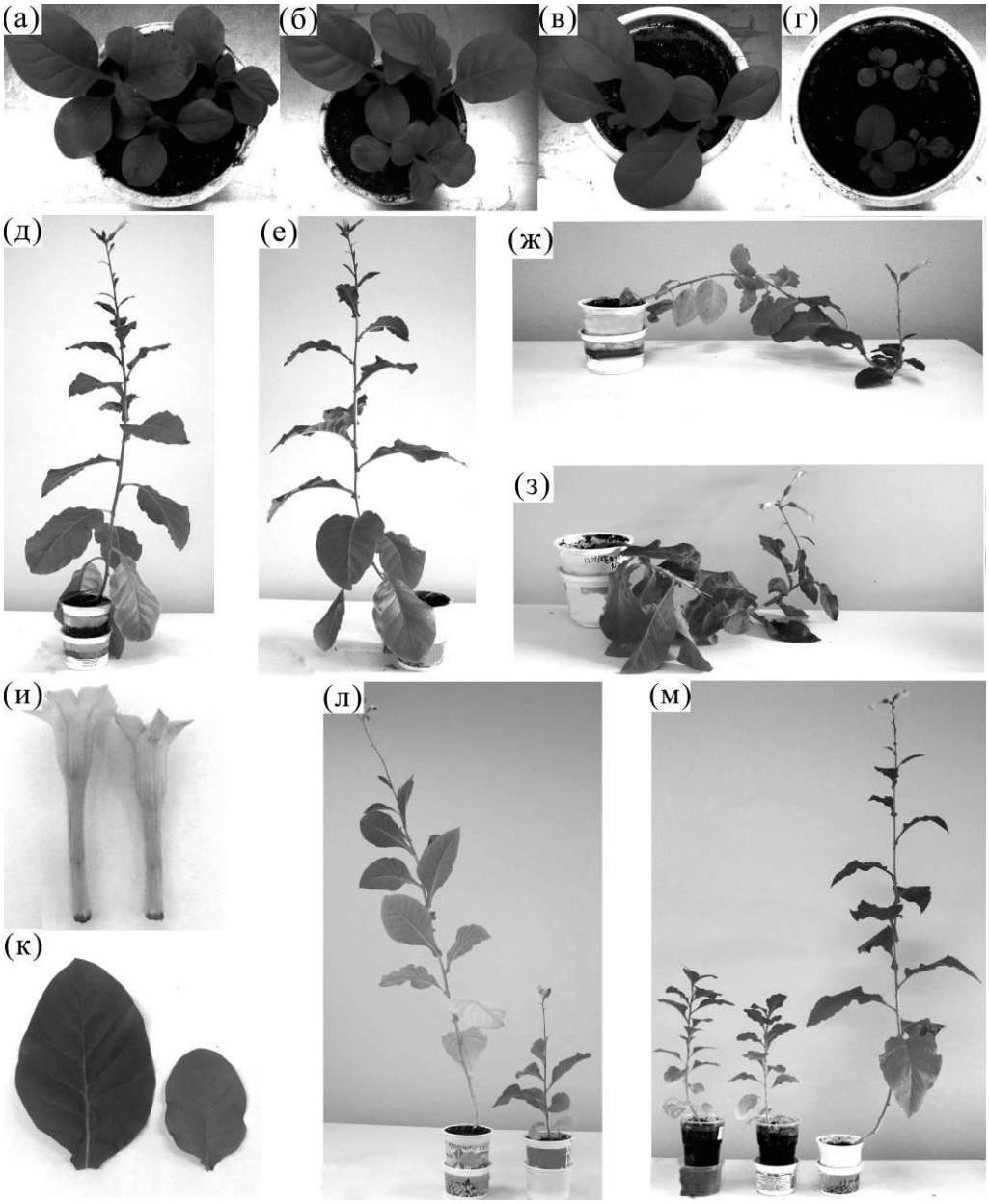


Рис. 47. Сравнение трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих участок гена *ANT* в антисмысловой ориентации и контрольной группы, содержащей в своем геноме Т-ДНК векторной молекулы без целевого гена: а – контрольные растения pCambia 1305.1 через 30 дней после акклиматизации; б – контрольные растения pCambia 2301 через 30 дней после акклиматизации; в – трансгенные растения 1301/Reg1A через 30 дней после акклиматизации; г – трансгенные растения 1301/Reg1N через 30 дней после акклиматизации; д – контрольные растения pCambia 1305.1 в период цветения; е – контрольные растения pCambia 2301 в период цветения; ж – трансгенные растения 1301/Reg1A в период цветения; з – трансгенные растения 1301/Reg1N в период цветения; и –

сравнение цветков контрольных растений (слева) и трансгенных растений 1301/Reg1A; к – сравнение листьев контрольных растений (слева) и трансгенных растений 1301/Reg1A; л – контрольные растения pCambia 1301 (слева) и трансгенные растения 1301/Reg1N в период цветения; м – трансгенные растения 1301/Reg1A и 1301/Reg1N (слева), не зацветавшие в течение семи месяцев вегетации в сравнении с контрольным растением (справа).

Для определения причины уменьшения размеров органов у трансгенных растений были измерены размеры клеток нижнего эпидермиса листьев. Установили, что клетки эпидермиса трансгенных и контрольных растений практически не отличались по размеру (табл. 6).

Таблица 6. Клетки эпидермиса нижней стороны листа трансгенных и контрольных растений табака

Параметр	Контрольные растения	Трансгенные растения			
	1301	1301/ Reg1A	1301/ Reg1N	1301/ Reg2N	2301/ ANTB
Площадь клеток эпидермиса, мкм^2	17600±643	15761±590	16035±455	17028±581	15675±455
Площадь листа, мм^2	3520	1820	1310	3390	3650
Число клеток эпидермиса на 1 лист	199996	115460	81693	199066	232842
Число клеток на 1 мм^2	56,3	63,4	61,7	58,1	63,5

При уменьшении размеров органов у трансгенных растений наблюдали уменьшение количества клеток, но не их размеров (рис. 48). Число клеток эпидермиса в расчете на единицу площади поверхности листа у контрольных и трансгенных растений табака оказалось примерно одинаковым, тогда как при уменьшении размеров клеток этот показатель должен был бы увеличиваться. Все

эти данные говорят о том, что единственной причиной уменьшения размеров органов у трансгенных растений, экспрессирующих участок гена *ANT* в антисмысловой ориентации, является уменьшение количества клеток в органе, но на единицу площади листа их количество не уменьшалось (рис. 48а, б). Размеры эпидермальных клеток лепестков у трансгенных растений также оставались практически неизменными (рис. 48в, г).

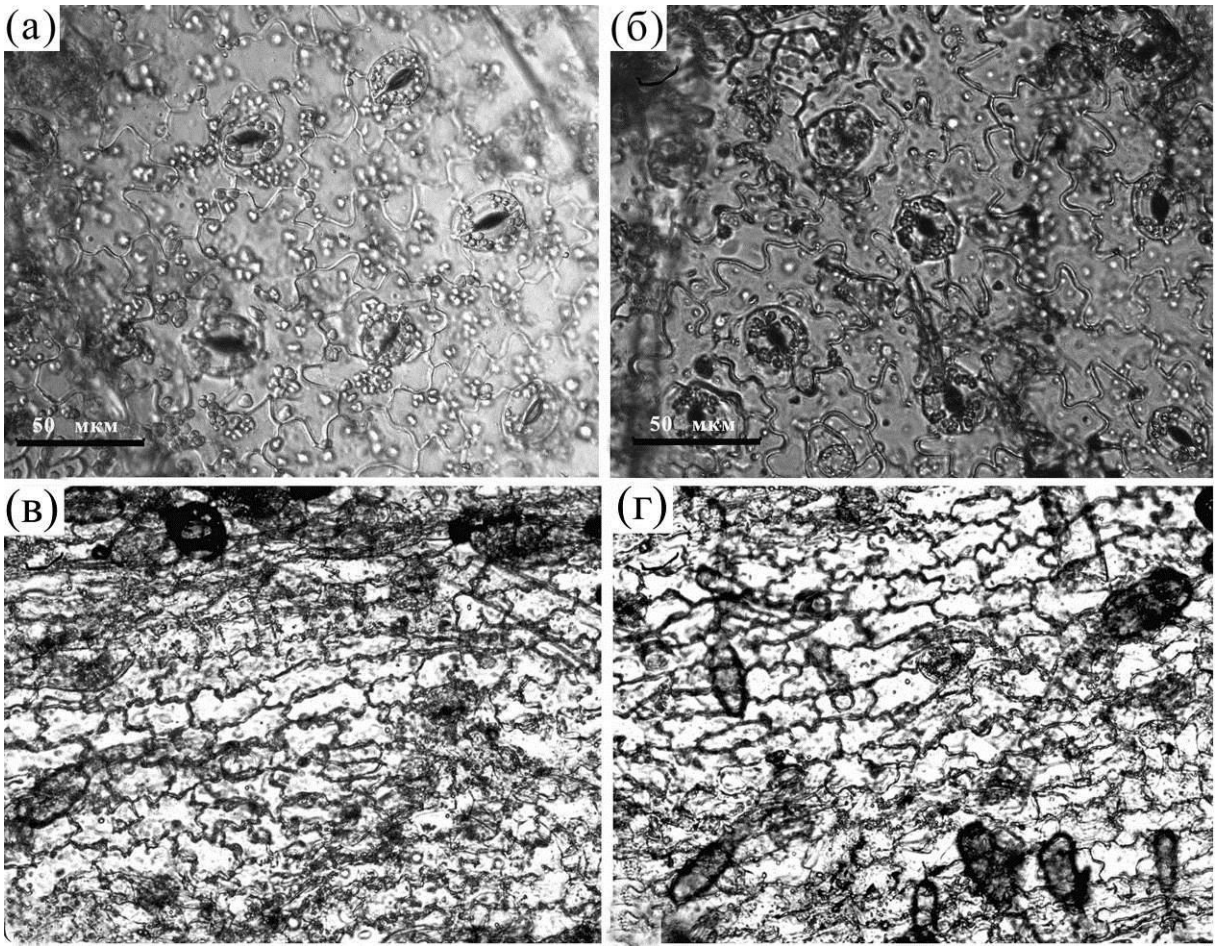


Рис. 48. Сравнение размеров клеток листа и лепестков контрольного растения и трансгенных по целевым генам растений: а – клетки нижнего эпидермиса контрольного растения; б – клетки нижнего эпидермиса трансгенного растения 1301/Reg3N; в – клетки эпидермиса лепестков контрольного растения; г – клетки эпидермиса лепестков трансгенного растения 1301/Reg3N. Шкала: 50 мкм.

Трансгенные растения прекращали свой рост раньше контрольных. Так, большинство опытных растений переставало расти уже к 60-му дню после адаптации к условиям почвы, тогда как контрольные растения росли вплоть до

стадии цветения. Трансгенные растения зацветали обычно позже контрольных и характеризовались уменьшением количества цветков до двух−трех. Часть трансгенных растений, в отличие от контрольных, росла в горизонтальном направлении, при этом часто наблюдалось искривление стебля (рис. 47ж, з). У некоторых трансгенных растений отсутствовали черешки на листьях, особенно это было характерно для варианта 1301/Reg1N (рис. 47з), другие были в два−три раза меньше контрольных (рис. 47л), третьи не зацветали даже в течение семи месяцев после адаптации к условиям почвы (рис. 47м). Наибольшее количество растений с уменьшенными размерами органов было получено при помощи генно-инженерных конструкций 1301/Reg1A и 1301/Reg1N, тогда как в варианте 1301/Reg2N из 6 трансгенных растений лишь 3 характеризовались уменьшением размеров органов.

Обсуждение результатов

Выравнивание нуклеотидных последовательностей ортологов исследуемого гена *ANT* позволило нам обнаружить в этом гене два консервативных участка, которые использовались для РНК-сайленсинга гена *ANT* в трансгенных растениях табака. Были подобраны относительно универсальные праймеры, которые теоретически позволяют амплифицировать эти два консервативных участка ДНК из многих двудольных растений. Таким образом, эти праймеры могут быть использованы для амплификации и клонирования специфических участков гена *ANT* различных двудольных растений, в том числе и у тех видов, у которых нуклеотидная последовательность этого гена не определена.

Предполагалось, что экспрессия консервативных участков гена *ANT* в антисмысловой ориентации может быть использована для уменьшения размеров органов не только *A. thaliana*, но и других видов двудольных растений. Для подтверждения этого предположения нами были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие консервативные участки гена *ANT A. thaliana* и табака в антисмысловой ориентации. Необходимо отметить, что получить трансгенные растения с уменьшенным уровнем экспрессии гена *ANT* оказалось довольно

сложно, возможно, из-за негативного влияния недостаточного количества транскрипционного фактора ANT на начальных стадиях развития трансгенного побега. Однако все полученные нами в итоге трансгенные растения были фертильны и дали семена. Более половины полученных нами трансгенных растений характеризовалось уменьшением размеров всех надземных органов. Некоторые опытные растения были меньше контрольных в два–три раза, в среднем же по площади листьев мы наблюдали уменьшение на 60–80%, а по сырой массе целого растения на 50–70%. Такое же уменьшение размера органов наблюдалось у мутантов *ant-1 A. thaliana*, однако у этих растений размеры цветков уменьшались в большей степени, чем размеры листьев (Mizukami, Fischer, 2000). В полученных нами трансгенных растениях табака, наоборот, размеры цветков уменьшались в среднем лишь на 5–13% по сравнению с контрольными растениями. Это может объясняться существованием альтернативных путей регуляции размеров цветков у табака, в отличие от *A. thaliana*, а также сравнительно маленькими размерами цветков у табака, по сравнению с размерами листьев, что до некоторой степени предполагает меньшие вариации в размерах при изменении количества клеток. У трансгенных растений уменьшались размеры всех органов цветка (чашелистики, лепестки, тычинки и плодолистики), однако функции мужского и женского гаметофитов, видимо, сохранялись на должном уровне, так как все опытные растения были фертильными. Высота побега у трансгенных растений была меньше, но не столь существенно, как размеры листьев, что может объясняться тем, что ген *ANT* в меньшей степени участвует в регуляции роста стебля. Это соответствует литературным данным, из которых известно, что в растениях дикого типа экспрессия гена *ANT* обнаруживается в первую очередь в семядолях, листьях, цветках и семязачатках, поэтому, видимо, данный транскрипционный фактор участвует, прежде всего, в регуляции роста и развития этих органов (Krizek, 1999). В табаке наибольший уровень экспрессии гена *ANT* наблюдали в пестике и молодых листьях (Rieu et al., 2005), поэтому предполагалось, что снижение уровня экспрессии целевого гена должно приводить, в первую очередь, к

уменьшению размеров именно этих органов. Действительно, у полученных нами трансгенных растений пестики были меньше, чем у контрольных растений, но размеры тычинок, лепестков и чашелистиков также пропорционально уменьшались. Известно, что сверхэкспрессия гена *ANT* способствует пролонгированию роста органов (Mizukami, Fischer, 2000); соответственно уменьшение уровня его экспрессии должно способствовать, наоборот, раннему прекращению роста. Действительно, полученные нами трансгенные растения рано прекращали свой рост, особенно это касалось листьев, тогда как стебли иногда продолжали расти вплоть до стадии цветения. Это более раннее прекращение роста листьев может объясняться более быстрым старением клеток, так как каждая группа клеток имеет ограничение по количеству делений. Известно, что из-за снижения уровня экспрессии гена *ANT,* может уменьшаться изначальное количество клеток в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000), а это в свою очередь приводит к тому, что органы развиваются из меньшего количества клеток (Gonzalez et al., 2012). Нами ранее было показано, что уменьшение количества стволовых клеток в АМП из-за сверхэкспрессии гена *CLV3* также может способствовать уменьшению количества клеток в органе (см. раздел 7.1). Однако в случае сверхэкспрессии гена *CLV3*, видимо происходило более радикальное уменьшение количества клеток, так как в зрелых листьях наблюдалось не только уменьшение количества клеток, но и компенсаторное увеличение их размеров. К тому же уменьшение количества стволовых клеток в АМП, по всей видимости, приводит к более быстрому старению клеток в органе при последующем его развитии, чем при уменьшении количества меристематических клеток из-за блокирования экспрессии ANT-фактора (см. раздел 7.1).

В данной работе представляло определенный интерес, какая из полученных нами генно-инженерных конструкций наиболее эффективно способствует уменьшению размеров органов. В целом, наиболее эффективными конструкциями оказались 1301/Reg1A и 1301/Reg1N, которых объединяет наличие одного и того же бинарного вектора pCambia 1301 и первого консервативного участка гена *ANT* как *A. thaliana*, так и табака (Reg1). К сожалению, однозначно объяснить

эффективность именно этих конструкций очень сложно, но скорее всего, это связано с первым консервативным участком гена *ANT*, так как растения с тем же вектором и вторым консервативным участком *ANT* не отличались столь же существенным уменьшением размеров органов.

По размеру клеток листьев полученные нами трансгенные растения не отличались от контрольных, и размеры органов уменьшались только из-за снижения количества клеток в органе. Следует отметить, что размеры клеток у мутантов *ant-1 A. thaliana* были больше, чем у растений дикого типа, т.е. у мутантов *ant-1* в органах сильно уменьшалось количество клеток, но размеры клеток не только не уменьшались, а наоборот, увеличивались (Mizukami, Fischer, 2000). У полученных нами трансгенных растений количество клеток, приходящихся на орган, уменьшалось, но размеры клеток в основном оставались неизменными. Увеличение размеров клеток нами было зафиксировано ранее при получении трансгенных растений, одновременно экспрессирующих участок гена *ANT* как в антисмысловой, так и в смысловой ориентации (см. раздел 7.2.1). Возможно, эти результаты связаны с тем, что в последнем случае количество клеток, приходящихся на один орган уменьшалось в большей степени. Таким образом, в случае с трансгенными растениями NtANTLi (см. раздел 7.2.1) нами была зафиксирована определенная схожесть фенотипических проявлений снижения экспрессии ANT-фактора и конститутивной экспрессии гена *CLV3*.

Более позднее цветение трансгенных растений объясняется, видимо, общим негативным влиянием на рост и развитие растения сниженного уровня экспрессии гена *ANT*. Предполагаемое участие транскрипционного фактора ANT в закладке зачатков органов (Mizukami, Fischer, 2000) проявилось и в данном исследовании в виде уменьшения количества цветков у трансгенных растений.

Итак, нами были получены генно-инженерные конструкции, которые могут быть использованы для получения различных трансгенных растений с уменьшенными размерами органов. Получены линии трансгенных растений табака с уменьшенными размерами листьев, стеблей и цветков. В будущем планируется создание трансгенных древесных растений с уменьшенным размером

ствола и листьев, для этого нами ведутся работы по получению растений осины, экспрессирующих участок гена *ANT* тополя в антисмысловой ориентации. К сожалению, уменьшить размеры стебля трансгенных растений табака нам удалось в среднем лишь на 30%, и полученные генно-инженерные конструкции едва ли могут быть применены в декоративном растениеводстве для создания карликовых деревьев. Для этого необходимо продолжить интенсивные исследования механизмов регуляции роста и развития растений и вести поиск новых генов, участвующих не только в регуляции клеточного деления, но и в координации роста клеток растяжением.

7.3. Заключение к главе 7

Пролиферация клеток и их дифференцировка в АМП регулируется продуктами генов *CLV3* и *WUS*. Конститутивная экспрессия гена *CLV3* уменьшает зону экспрессии гена *WUS* и тем самым блокирует цитокининовый сигнал, поддерживающий стволовые клетки в организующем центре в недифференцированном состоянии, причем эти клетки очень мало делятся, сохраняясь недифференцированными и меристематически компетентными в течение всей жизни растения. В целом сверхэкспрессия гена *CLV3* способствует переходу стволовых клеток организующего центра на стадию интенсивной пролиферации, перемещению их в другие участки центральной зоны АМП, их последующей дифференцировке и по сути именно с этого начинается отчет времени жизни всех клеток побега. Из-за уменьшения количества стволовых клеток в центральной зоне АМП, уменьшается число меристематически компетентных клеток в периферической зоне АМП, а затем и в зонах верхушки побега, где формируются зачатки органов. Так как клетки в *35S::CLV3* растениях раньше переходят на стадию дифференцировки, они делятся меньшее количество раз, гораздо быстрее теряют меристематическую компетентность и в итоге каждый орган образуется из меньшего количества клеток, способных делиться достаточно продолжительное время. На первый взгляд, уменьшение количества клеток должно способствовать существенному уменьшению размеров органов,

однако, в растениях функционирует компенсаторный механизм, направленный на поддержание размеров органов в пределах нормы. Функционирование этого компенсаторного механизма направлено на увеличение размеров клеток, из которых состоит растущий орган. Одним из фитогормонов, участвующих в регуляции роста клеток растяжением при этом, являются цитокинины. Несмотря на то, что при сверхэкспрессии гена *CLV3* цитокининовый сигнал, направленный не только на поддержание стволовых клеток в недифференцированном состоянии, но и на пролонгирование меристематической компетентности клеток АМП, блокируется, эта группа фитогормонов остается способной влиять на экспрессию белков, обеспечивающих рост клеток растяжением. Например, при сверхэкспрессии гена *CLV3*, цитокиннины повышают уровень экспрессии гена экспансина *NtEXPA4* и гена эндоксилоглюкантрансферазы *NtEXGT*, тем самым, способствуя увеличению размеров отдельных клеток. В листьях *35S::CLV3* растений блокирование цитокининового сигнала прекращается и эта группа фитогормонов становится способной стимулировать клеточные деления. Однако при этом количество клеток в органе, способных к делениям остается гораздо меньше, чем в контрольных растениях и последующий рост органа обеспечивается в основном только за счет компенсаторного увеличения размеров отдельных клеток.

Несмотря на то, что нам путем увеличения уровня экспрессии гена *CLV3* уменьшить размеры органов не удалось, данное направление исследований необходимо продолжить, так как путем одновременного изменения уровня экспрессии генов *CLV3* и *WUS*, возможно, могут быть получены трансгенные растения с измененными размерами органов. Кроме того, представляет интерес испытание полученной нами генно-инженерной конструкции *35S::CLV3* на других растениях, где его фенотипические проявления могут отличаться от тех, что были характерны для табака.

Меристематические клетки после перемещения в зачатки органов интенсивно делятся и начинают постепенно дифференцироваться. Меристематическая компетентность клеток зачатка органов поддерживается

определенное время за счет функционирования транскрипционного фактора AINTEGUMENTA. Данный транскрипционный фактор получил такое название из-за того, что у мутантных по его гену растений в семязачатках отсутствовали интегументы (Klucher et al., 1996). Однако ANT-фактор контролирует не только развитие женского гаметофита, а связан с ростом всех надземных органов и их зачатков, которые характеризуются высоким уровнем клеточных делений. Экспрессия транскрипционного фактора ANT контролируется цитокининами, ауксинами и брассиностероидами. В зависимости от возраста органа, экспрессия ANT-фактора может регулироваться фитогормонами по-разному. Например, в верхушке побега ауксины не влияют на уровень его экспрессии, а во вторых от верхушки побега листьях существенно повышают содержание транскриптов гена *ANT*. Однако в листьях, расположенных ниже 3-го от верхушки побега, уровень экспрессии ANT-фактора невозможно повысить даже путем экзогенной обработки фитогормонами, что может свидетельствовать в пользу вовлеченности в данном случае эпигенетических механизмов регуляции экспрессии. Сигналы от фитогормонов к исследуемому транскрипционному фактору поступают через OSR-белки, которые гомологичны белку ARGOS (см. главу 8). В свою очередь, транскрипционный фактор ANT контролирует клеточные деления в зачатках органов через регуляцию экспрессии циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ. В то же время, ANT-фактор может регулировать и рост клеток растяжением через влияние на уровень экспрессии экспансина NtEXPA4. Данный экспансин, в отличие от экспансина NtEXPA5, функционирует на более ранних стадиях роста клеток растяжением (см. главу 9), из этого следует, что ANT-фактор контролирует, преимущественно, ранние стадии роста клеток растяжением и возможно инициирует этот процесс. Таким образом, ANT это один из ключевых транскрипционных факторов, связанных с регуляцией размеров органов в целом, так как он контролирует как клеточные деления, так и рост клеток растяжением.

Циклины и циклин-зависимые протеинкиназы контролируют только клеточные деления, однако, под действием экзогенных фитогормонов при

нормальных условиях коэкспрессируются с ANT-фактором. При кратковременном действии NaCl уровень экспрессии генов циклина *NtCYCD3;1* и циклин-зависимой протеинкиназы *NtCDKB1-1* возрастает, причем этот процесс, по всей видимости, является АБК-зависимым. Уровень экспрессии ANT-фактора при действии соли существенно не меняется, что говорит в пользу того, что этот транскрипционный фактор не вовлечен в механизм клеточного ответа на засоление. В то же время ANT-фактор может быть вовлечен в молекулярный механизм реакции на другие стрессовые факторы, поэтому исследования в данном направлении должны быть продолжены.

Ген *ANT* может быть использован в генной инженерии для получения трансгенных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов. Конститутивная экспрессия гена *ANT* способствует увеличению размеров листьев, стебля и цветков через стимулирование клеточных делений и роста клеток растяжением. При этом степень изменения морфометрических параметров трансгенных растений зависит от уровня экспрессии гена *ANT*. Поэтому для получения трансгенных растений с более существенным увеличением размеров органов, необходимо использовать ген *ANT* в сочетании с сильными конститутивными промоторами, например, с промотором ВМГ.

Используя технологии РНК-сайленсинга можно добиться снижения уровня экспрессии гена *ANT*. При этом размеры листьев, стебля и цветков уменьшаются только за счет уменьшения количества клеток, приходящихся на один орган. А размеры отдельных клеток при уменьшении уровня экспрессии гена *ANT*, наоборот, увеличиваются за счет функционирования компенсаторного механизма. Для уменьшения уровня экспрессии гена *ANT* можно получать трансгенные растения сверхэкспрессирующие короткие участки этого гена в антисмысловой ориентации. Однако более существенного уменьшения уровня экспрессии того или иного гена можно добиться путем получения трансгенных растений,

одновременно экспрессирующих участок гена как в антисмысловой, так и в смысловой ориентации.

Созданные нами в ходе данной работы генно-инженерные конструкции могут быть использованы для получения трансгенных форм хозяйственно-ценных растений с увеличенными размерами листьев, стебля, цветков и семян. Увеличение размеров листьев и стебля может оказаться полезным, в первую очередь, при модификации кормовых культур и тех пищевых растений, у которых используется вегетативная часть. Увеличение размеров цветка может быть востребовано в декоративном садоводстве и цветоводстве. Продуктивность семян при увеличении их размеров также может повыситься, поэтому созданные нами генно-инженерные конструкции могут быть рекомендованы и для модификации растений, у которых используются семена.

Глава 8. Роль *OSR*-генов в регуляции размеров органов растений

Важную роль в координации процессов клеточного деления и растяжения, выполняют белки с OSR-доменом (Feng et al., 2011). У *A. thaliana* обнаружено и изучено четыре гена, кодирующие белки данной группы, а именно *AtARGOS*, *AtARGOS-LIKE* (*AtARL*), *OSR1* и *OSR2* (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011; Qin et al., 2014). Эти гены образуют небольшое семейство и получили общее название *OSR*-генов (Feng et al., 2011). Так как гены белков с OSR-доменом могут быть использованы для получения трансгенных растений с повышенной продуктивностью, актуальными являются исследования фенотипических проявлений их сверхэкспрессии в гетерологичных условиях. Также практический интерес представляет изучение гомологов этих генов в геномах хозяйственно-ценных растений (Wang et al., 2009a; Wang et al., 2009b; Guo et al., 2014).

8.1. Конститутивная экспрессия гена *AtARGOS* под контролем промотора вируса мозаики георгина

Нуклеотидная последовательность гена *ARGOS* у табака пока не определена, поэтому для проведения исследования функций этого гена, нами была поставлена задача по клонированию гена *ARGOS* из тех растений, геномы которых секвенированы. В первую очередь было решено амплифицировать и клонировать ген *ARGOS* у *A. thaliana*. Затем была поставлена задача получения трансгенных растений табака, конститутивно экспрессирующих ген *AtARGOS* под контролем промотора ВМГ, так как по нашим предыдущим результатам следовало, что данный промотор обладает большей активностью, чем 35S промотор. Также в рамках данной серии работ, планировалось изучение функций гена *AtARL A. thaliana*, характеризующегося высоким уровнем схожести нуклеотидных последовательностей с геном *AtARGOS*.

8.1.1. Поиск гомологов гена *AtARGOS A. thaliana* в GenBank и сравнительный анализ последовательностей ДНК и белков

Для подбора праймеров и амплификации гена *AtARGOS A. thaliana* была использована последовательность под номером AY305869 из GenBank. При поиске высокогомологичных к этому гену последовательностей был обнаружен лишь один ген *ARGOS*, относящийся к китайской капусте *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (FJ171724). Гомологичные последовательности ДНК нами также были обнаружены у *Boechera divaricarpa* (DQ226826), *Vitis vinifera* (AM464743), *P. trichocarpa* (XM_002331606), *S. lycopersicum* (FJ171725) и *O. sativa* (DQ641272). Гомологичным гену *AtARGOS* является также ген *AtARL*, который регулирует клеточное растяжение, однако он пока исследован только у *A. thaliana* (Hu et al., 2006). В приведенных выше последовательностях ДНК, были идентифицированы открытые рамки считывания, близкие по размеру к гену *AtARGOS A. thaliana*. Основные результаты выравнивания этих последовательностей ДНК отражены в виде филогенетического древа на рисунке 49. По анализу древа можно сделать

вывод о том, что последовательность ДНК *B. divaricarpa* вероятнее всего является ортологом гена *AtARL A. thaliana*. Очень близкими по уровню схожести нуклеотидных последовательностей оказались гены *AtARGOS A. thaliana* и китайской капусты. У всех исследуемых гомологичных генов был обнаружен довольно протяженный консервативный участок, который можно охарактеризовать как лейцин-богатый. В центре этого участка имеется консервативная последовательность из шести молекул пролина и одной молекулы лейцина (рис. 49б).

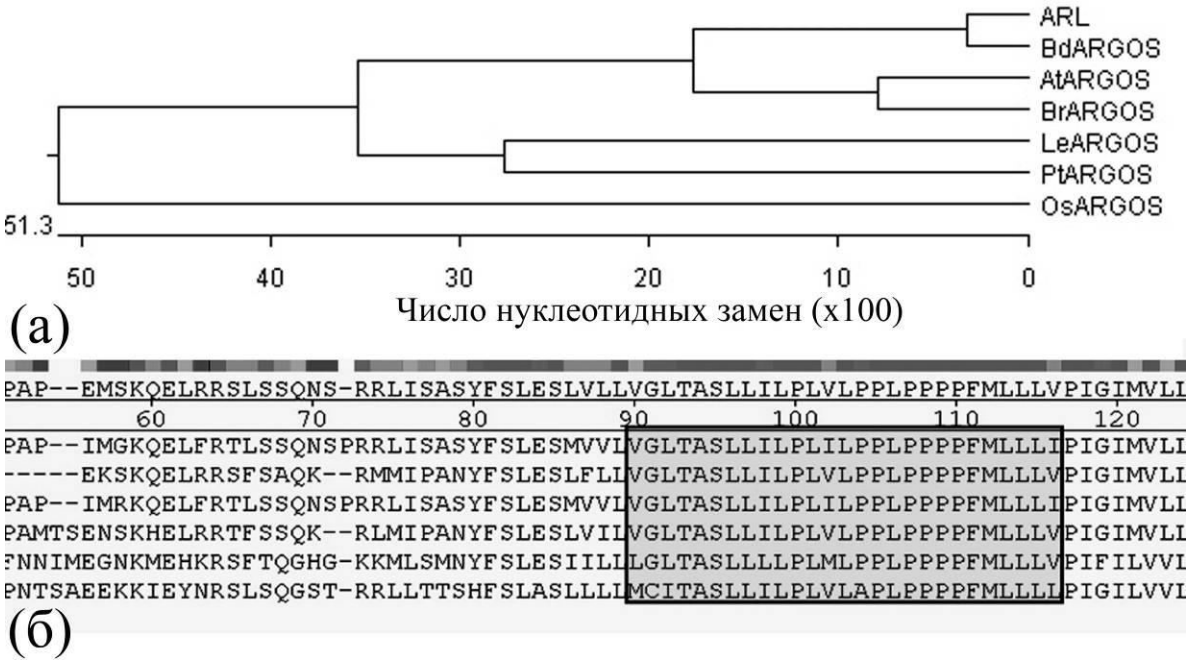


Рис. 49. Результаты сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов и аминокислот гомологов гена *ARGOS* различных растений: а – филогенетическое древо сходства гена *AtARGOS A. thaliana* с гомологичными генами других растений, *ARL* – *ARGOS*-подобный ген *A. thaliana*, *BdARGOS* – ген *B. divaricarpa, BrARGOS* – ген *B. rapa, LeARGOS* – ген *S. lycopersicum, PtARGOS* – ген *P. trichocarpa, OsARGOS* – ген *O. sativa*; все значения бустреп-анализа на древе превышали 70; б – результаты выравнивания предсказанных последовательностей аминокислот гена *ARGOS* и его гомологов из различных растений. Серым цветом выделен консервативный лейцин-богатый участок, располагающийся на С-конце белка.

8.1.2. Получение генно-инженерной конструкции гена *AtARGOS* с промотором вируса мозаики георгина и сайтом polyA вируса мозаики цветной капусты в векторе pCambia 2301

Участок молекулы ДНК *A. thaliana* размером 732 пн, включающий ген *AtARGOS,* был амплифицирован и клонирован в Т-векторе pKRX. Этот участок ДНК был секвенирован, полученная последовательность была проверена при помощи программ MegAlign и MegaBlast. По результатам выравнивания было показано, что выделенная нами копия гена *AtARGOS* полностью совпадает по нуклеотидной последовательности с исследуемым участком ДНК *A. thaliana* (AY305869). Затем ген *AtARGOS* был вырезан из вектора pKRX по сайту *Bse*PI, а липкие концы затуплены Т4 ДНК-полимеразой. Модифицированный нами вектор pCambia 2301 был расщеплен по сайту рестрикции *Xba*I, а липкие концы затуплены Т4 ДНК-полимеразой. После проведенных процедур в этом векторе осуществили ненаправленное клонирование гена *AtARGOS* (рис. 50). Поиск клонов с сенс-ориентацией целевого гена осуществляли ПЦР-анализом при помощи комбинации праймеров DMVF, DMVR, ArgF, ArgR и PolyAR (табл. 1).

Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: DMVF/DMVR, DMVF/ArgR и ArgF/polyAR, а при сочетании пар DMVF/ArgF и ArgR/polyAR амплификация проходила только в случае антисенс-ориентации гена *AtARGOS*. Кроме этого, для проверки полученной генно-инженерной конструкции использовали рестрикционный анализ, ПЦР-ПДРФ-анализ и секвенирование. После полной проверки, полученный бинарный вектор был внедрен в клетки *A. tumefaciens*. Скрининг целевых клонов в агробактериях осуществляли при помощи ПЦР-анализа с праймерами DMVF/DMVR и ArgF/ArgR. Агробактериальный клон, содержащий вектор pCambia 2301 с геном *AtARGOS*, был использован для экспериментов по трансформации листовых дисков табака.



Рис. 50. Генно-инженерная конструкция в Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301, состоящая из селективного, репортерного и целевого генов, а также промотора ВМГ. *NPTII* – ген неомицинфосфотрансферазы II, ВМГ – промотор ВМГ, *GUS* – ген β-глюкуронидазы, polyA – сайт полиаденилирования 35S РНК ВМЦК, 35S – 35S промотор.

8.1.3. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARGOS A. thaliana*, и их морфологический анализ

В ходе экспериментальной работы по агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевой генно-инженерной конструкцией с геном *AtARGOS* удалось отобрать только 12 растений. Из них укоренились на агаризованной среде МС пять растений, из которых, в свою очередь, только три растения окрашивались синим цветом при обработке субстратом x-gluc. Для дальнейшей работы были отобраны только эти три растения, так как предполагалось, что только в них уровень экспрессии трансгена относительно высок, как и репортерного гена *GUS*. Из трех отобранных растений табака была выделена тотальная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *AtARGOS* и промотора ВМГ. Было показано, что все отобранные растения содержат в своем геноме как ген *AtARGOS A. thaliana*, так и промотор ВМГ. Транскрипция целевого гена в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР (рис. 51).

Отобранные растения были акклиматизированы к условиям почвы и находились под наблюдением до периода созревания семян. У двух растений отмечались существенное по сравнению с нормой увеличение размера листьев, более быстрый переход к стадии цветения, немного увеличенные по размеру цветки (рис. 52). Семена этих двух трансгенных по гену *AtARGOS* растений, а

также семена растений табака, содержащих Т-ДНК вектора pCambia 2301 без вставки целевого гена, были высеяны на среду с канамицином. Количественное соотношение трансгенных и нетрансгенных растений на чашках Петри составило 15:1 для обоих вариантов опытных растений, что косвенно предполагает двойное встраивание трансгена. Контрольные растения с вектором pCambia 2301 без целевого гена на среде с антибиотиком показали стандартное расщепление 3:1, что говорит о монокопийности Т-ДНК в их геноме.

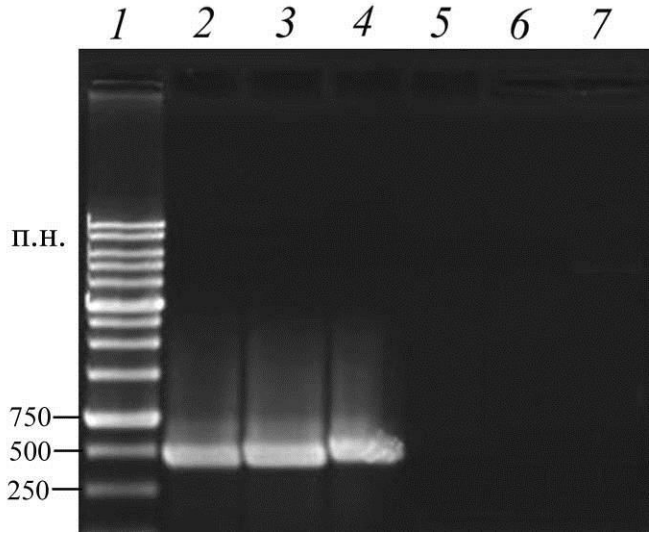


Рис. 51. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР целевого гена *AtARGOS* в трансгенных растениях табака поколения T_0. 1 – маркер молекулярного веса 250-10000 пн (Сибэнзим, Россия). Результаты ОТ-ПЦР первого растения (2), второго растения (3), третьего растения (4). 5-7 – ОТ-ПЦР гена *AtARGOS* из образцов кДНК трех контрольных растений табака.

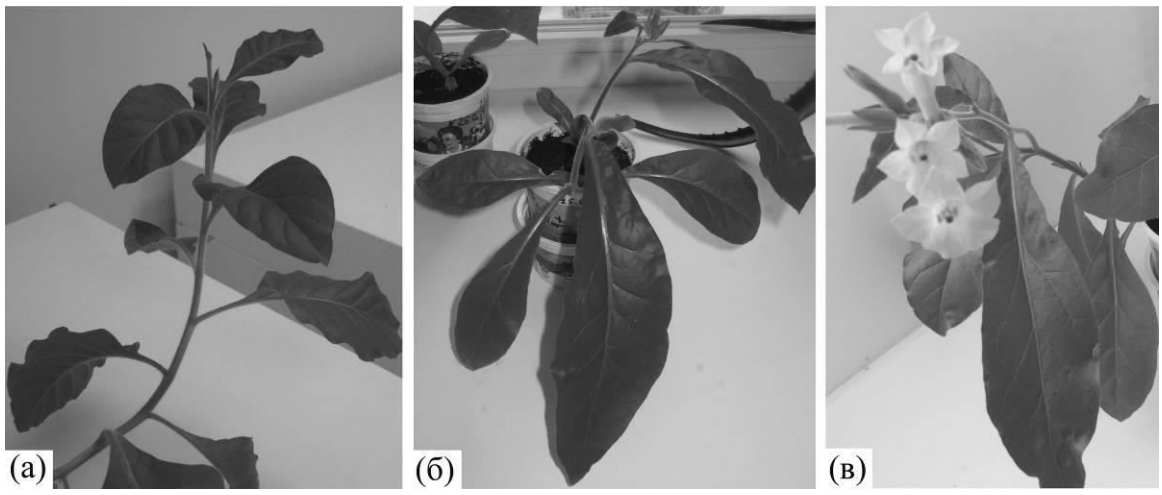


Рис. 52. Трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *AtARGOS* поколения T_0 на различных стадиях развития. Трансгенные растения характеризовались увеличением размера листьев и ускорением перехода на стадию цветения (б, в), по сравнению с контрольными растениями (а).

Ещё на стадии прорастания, трансгенные по гену *AtARGOS* растения поколения T_1 заметно опережали в росте контрольные растения с Т-ДНК вектора pCambia 2301 без целевого гена. Отмечалось более быстрое появление корешков и семядолей. Через 15 дней культивирования по 20 растений с каждого варианта были пересажены на почву. Для дальнейшего эксперимента были отобраны по шесть абсолютно здоровых растений от каждой из трех линий. Далее для всех трех линий трансгенных растений составляли по две выборки, в каждую из которых входило по три растения. Основные результаты измерений длины листьев, длины стебля, размера цветков растений поколения T_1 приведены в таблице 7. Трансгенные по гену *AtARGOS* шесть групп растений были обозначены как ARG1.1 – ARG3.2, где первая цифра обозначает номер линии, а вторая цифра номер растения (по два растения на каждую линию). Контрольные растения, содержащие Т-ДНК пустого вектора, были обозначены как 2301/1 - 2301/3. Каждая из трех групп контрольных растений содержала также по три растения. У каждого растения измеряли в длину по три нижних настоящих листа (1-й, 2-й, 3-й листья) и вычисляли их средние значения.

Через 15 дней после пересадки, во время первого замера, трансгенные по гену *AtARGOS* растения опережали контрольные растения по размеру листьев в среднем на 50% (табл. 7, рис. 53). Во время второго замера, через 30 дней после пересадки, эта разница увеличилась и составила примерно 79%. Уже во время третьего замера, через 45 дней после пересадки на почву, разница между опытными и контрольными растениями начала уменьшаться и составила в среднем 52% (табл. 7), еще через 15 дней она уменьшилась до 42%. Во время последнего замера: через 75 дней после пересадки на почву, растения уже начинали цвести и перестали наращивать вегетативную массу, то есть появилась возможность сравнительного анализа конечных размеров органов контрольных и опытных растений. В этот период размеры листьев у трансгенных по гену *AtARGOS* растений уже были всего лишь в среднем на 30% больше, чем у контрольных. Стебли у опытных растений табака были длиннее, чем у контрольных в среднем на 40%. По размеру цветков разница составила в среднем

для растений ARG1.1 - 13%, для растений ARG1.2 – 9%, для растений ARG2.1 – 9%, для растений ARG2.2 – 16% по сравнению с контролем. Растения ARG3.1 и ARG3.2 по основным морфометрическим параметрам от контроля статистически не отличались (табл. 7).

Семена трех самых крупных трансгенных растений, экспрессирующих ген *AtARGOS*, и одного растения с пустым вектором pCambia 2301 были собраны и посажены на среду МС. Через 15 дней по пять растений с каждого варианта акклиматизировали на почве. Был проведен морфологический анализ. В третьем поколении тенденция к увеличению размеров органов трансгенных растений сохранилась. Через 15 дней опытные растения были крупнее по размеру листьев, чем контрольные на 34%, через 30 дней на 45%, через 45 дней на 35%, через 60 дней на 30%. Во время последнего замера, когда анализируемые растения переходили на стадию цветения, разница в размерах листьев между опытными и контрольными растениями составила 24%. Разница в размерах стеблей составила 31%, цветки у опытных растений были крупнее в среднем на 8%.

Таблица 7. Размеры органов трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих ген *AtARGOS A. thaliana,* и контрольной группы в зависимости от стадии развития. (n=3; * – p < 0,05).

	ARG1.1	ARG1.2	ARG2.1	ARG2.2	ARG3.1	ARG3.2	2301/1	2301/2	2301/3
Длина листьев, см									
15 дней	**2,1±0,4***	**1,9±0,3***	1,5±0,3	**2,0±0,4***	1,8±0,3	1,3±0,2	1,1±0,4	1,6±0,5	0,9±0,2
30 дней	**7,3±0,8***	**4,5±0,6***	4,3±0,5	**6,2±0,5***	**5,0±0,7***	3,8±0,4	2,8±0,6	3,5±0,6	2,5±0,5
45 дней	**14,7±0,9***	**13,6±0,6***	**10,2±0,7***	**15,0±0,6***	9,8±0,4	9,0±0,6	7,3±0,8	9,5±0,5	6,8±0,7
60 дней	**17,6±0,9***	**16,9±0,7***	**17,2±0,9***	**18,2±0,9***	16,2±0,6	15,8±0,8	10,4±1,0	15,5±0,8	9,6±0,8
75 дней	**20,1±1,0***	**18,5±0,9***	**19,0±1,1***	**22,0±1,2***	17,7±0,6	17,3±0,9	14,5±1,0	16,8±0,8	13,1±1,0
Высота стебля, см	**45±6***	29±5	27±4	**35±7***	25±4	24±6	22±5	26±4	19±4
Длина цветка, см	**5,1±0,2***	**4,9±0,1***	**4,9±0,1***	**5,2±0,1***	4,6±0,1	4,8±0,2	4,5±0,2	4,6±0,1	4,4±0,1

При помощи микроскопического анализа было показано, что размеры клеток нижнего эпидермиса листьев опытных и контрольных растений были больше в среднем на 15%. Исходя из этих данных можно предполагать, что размеры листьев у трансгенных растений увеличивались как за счет возрастания количества клеток, так и увеличения их размеров.

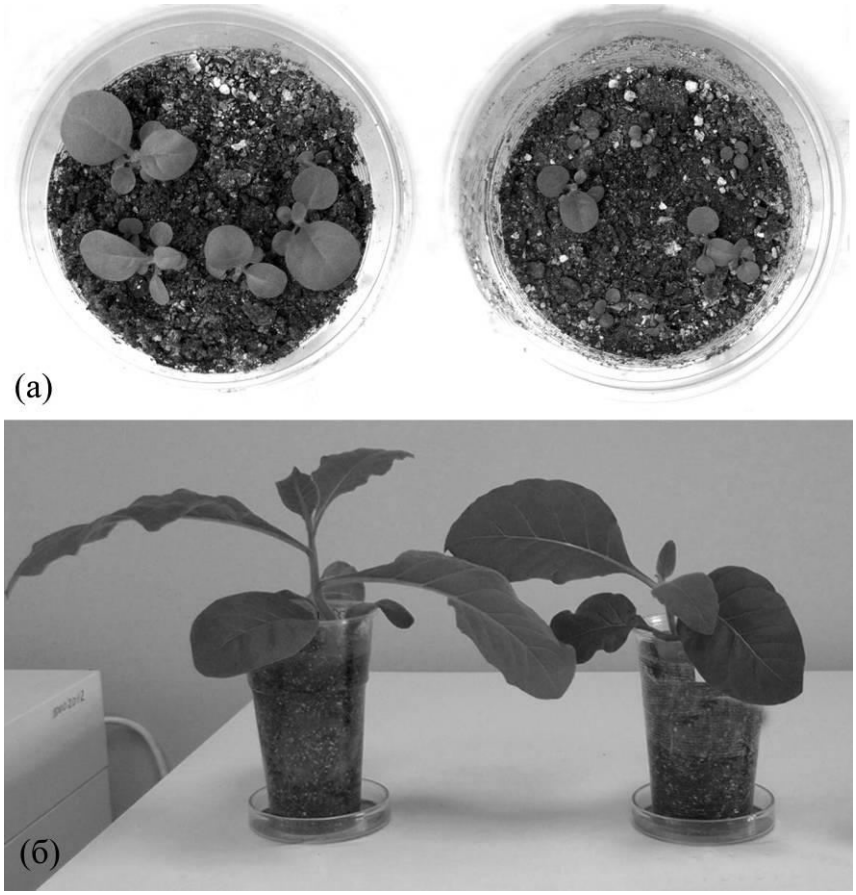


Рис. 53. Сравнение трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих ген *AtARGOS A. thaliana* (слева), и контрольной группы (справа), содержащей в своем геноме Т-ДНК векторной молекулы без целевого гена: а – сравнение размеров растений через 15 дней после пересадки на почву; б – сравнение размеров растений через 45 дней после пересадки на почву. На фотографиях видно, что табаки, экспрессирующие ген *AtARGOS A. thaliana* (слева), характеризуются увеличенными размерами органов, по сравнению с контрольными растениями (справа).

8.1.4. Обсуждение результатов

К моменту начала наших исследований *OSR*-генов в 2010 году гомологи гена *ARGOS* были подробно исследованы только у *A. thaliana* (Hu et al., 2003), риса (Wang et al., 2009а) и китайской капусты (Wang et al., 2009б). Однако по мере увеличения количества секвенированных геномов растений, появляется возможность поиска этого гена и у других видов. Судя по данным GenBank в геномах неродственных *A. thaliana* растений, также имеются гомологичные гену *AtARGOS* участки ДНК, например, у тополя (см. раздел 8.5), винограда и томата.

В предсказанной белковой молекуле ARGOS, который имеет небольшие размеры, нами в 2010 году был идентифицирован консервативный участок на С-конце, богатый лейцином и пролином, очевидно имеющий функциональное значение. Согласно данным литературы, этот консервативный участок оказался трансмембранным доменом (Feng et al., 2011) и на данный момент уже имеются доказательства расположения белка ARGOS на эндоплазматическом ретикулуме.

Для получения трансгенных растений, экспрессирующих ген *AtARGOS,* был использован впервые клонированный нами относительно сильный промотор ВМГ. Промотор ВМГ мы применяли с целью увеличения уровня экспрессии целевого гена, при этом предполагая, что должны быть получены растения с более существенным увеличением органов не только по сравнению с диким типом, но и с растениями, полученными с использованием 35S промотора.

Тем не менее, получить трансгенные растения табака с повышенным уровнем экспрессии гена *AtARGOS,* оказалось довольно сложно. По-видимому, это обусловливалось влиянием негативных последствий высокого уровня экспрессии данного гена, так как *AtARGOS* выполняет важные функции в растительном организме. При выполнении данной работы было получено только три полноценных трансгенных растения – остальные потенциально трансгенные побеги не могли сформировать органы на стадии регенерации, проявлялась уродливость, или же эти трансгенные побеги не укоренялись. Лишь три растения, несущие по две копии целевого гена выжили и дали семена, но так и не удалось

получить ни одно растение с единичной копией гена *AtARGOS*. Теоретически в полученных растениях, несущих в геноме по два трансгена, может быть снижена экспрессия целевого гена из-за косупрессии, но, несмотря на это, они всё же отличились увеличенными размерами органов. По литературным данным, в трансгенных растениях *A. thaliana* с эктопической экспрессией гена *AtARGOS* надземные органы были увеличены на 50-120% (Hu et al., 2003). В наших же исследованиях было показано увеличение конечных размеров органов только на 30-40%, при этом размеры цветков увеличивались незначительно, однако на более ранних стадиях развития, листья трансгенных растений были больше, чем у нетрансгенных на 79%. Трансгенные растения росли быстрее, однако их рост останавливался немного раньше, чем у контрольных растений. Это означает, что ген *AtARGOS A. thaliana* в табаке в основном влиял на скорость клеточного деления и растяжения, но меньше влиял на длительность этих процессов. Вероятнее всего, в полученных нами трансгенных растениях ген *AtARGOS* не поддерживал меристематическую компетентность клеток, а скорее запускал процессы клеточного деления и растяжения. В то же время в *A. thaliana* данный ген удлиняет время роста и развития, позволяя трансгенным растениям расти дольше. Именно за счет такого пролонгирования трансгенные растения *A. thaliana* характеризовались увеличенными конечными размерами органов (Hu et al., 2003). Это означает, что особенности проявления трансгена *AtARGOS* могут зависеть не только от применяемого промотора, но и от видовой принадлежности растения, подвергаемого трансформации.

Фенотипические проявления экспрессии гена *AtARGOS A. thaliana* в табаке были схожи с таковыми гена *AtARL* (Hu et al., 2006). Экспрессия гена *AtARL* в *A. thaliana* также в основном влияла только на процессы роста органов, но не оказывала положительного влияния на продолжительность роста. Видимо, это объясняется гомологией между генами *AtARGOS* и *AtARL*, поэтому исследуемый ген мог проявиться в табаке не специфично. Ген *AtARGOS A. thaliana* в табаке мог повлиять как на процессы клеточной пролиферации, так и, подобно гену *AtARL*, на процессы клеточного растяжения. К сожалению, по результатам нашего

исследования сделать окончательные выводы по влиянию продукта гена *AtARGOS* на деление и растяжение клеток нельзя. Это связано с тем, что при увеличении количества клеток в одних частях растения, в других частях могло происходить увеличение размеров отдельных клеток. Из наших результатов очевидно лишь то, что ген *AtARGOS* влиял на процессы роста в табаке в меньшей степени, чем в *A. thaliana*.

Результаты наших исследований свидетельствуют в пользу того, что ген *AtARGOS A. thaliana* может быть использован в качестве целевого гена, в том числе в гетерологичных условиях, для создания растений с увеличенными размерами органов, тем не менее, применение этого гена ограничивается компенсаторными механизмами в самих растениях. В связи с вышесказанным, существует необходимость в поиске и исследовании гомологов гена *ARGOS* у других растений, причем эти гены могут оказаться более эффективными при условии конститутивной, индуцибельной или тканеспецифичной экспрессии в гомологичных условиях.

8.2. Влияние конститутивной экспрессии гена *AtARGOS-LIKE* на размеры клеток и органов трансгенных растений табака

Ген *AtARGOS-LIKE* (*AtARL*) кодирует белковый фактор, контролирующий клеточное растяжение, однако является ближайшим гомологом гена *AtARGOS,* продукт которого контролирует клеточные деления (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). Сам факт участия двух весьма схожих белков в регуляции совершенно разных процессов изначально выглядело довольно интригующим. Это могло означать, что *OSR*-гены участвуют в координации клеточного деления и роста клеток растяжением при росте органов. Возможно, именно в рамках выполнения этой интегральной для регуляции роста органов функции происходила эволюция этих генов. В литературе ко времени начала наших исследований ответов на эти вопросы не было, поэтому нами было решено продолжить исследования *OSR*-генов, и наше внимание привлек ген *AtARL.* Нами было решено изучить влияние сверхэкспрессии гена *AtARL* на основные морфометрические параметры

трансгенных растений табака. Предполагалось, что данное исследование позволит приблизиться к пониманию некоторых функций продукта гена *AtARL* при росте органов растения. В случае получения трансгенных растений табака с увеличенными размерами органов, целевые генно-инженерные конструкции могли быть рекомендованы для практического применения в генной инженерии хозяйственно-ценных растений.

8.2.1. Поиск гомологов гена *AtARL A. thaliana* и биоинформационный анализ его предсказанной белковой молекулы

Для подбора праймеров и амплификации гена *AtARL A. thaliana* была использована последовательность гена, зарегистрированная в GenBank под номером NM_180078.3. Поиск гомологичных генов при помощи программы BLAST показал высокий уровень схожести гена *AtARL* с нуклеотидными последовательностями *Arabidopsis lyrata* (XM_002880036.1) и *B. divaricarpa* (DQ226826.1). Довольно высоким уровнем схожести к гену *AtARL* обладает также ген *ARGOS*, нуклеотидные последовательности которого определены у *A. thaliana* (NM_115853.4), *B. rapa* (FJ171724.1), *V. vinifera* (AM475052.1), *Ricinus communis* (XM_002533293.1), *S. lycopersicum* (NM_001247750.1), *P. trichocarpa* (XM_002310336.1; XM_002331606.1), *Picea sitchensis* (EF678316.1), *O. sativa* (DQ641272.1), *Z. mays* (AEQ59626.1), *Hordeum vulgare* (AK369743.1) и других, что говорит об универсальности данной группы генов для всех высших растений. Некоторые из этих последовательностей нуклеотидов нами были выровнены и на основе полученных результатов было построено филогенетическое древо (рис. 54а). Нуклеотидная последовательность гена *B. divaricarpa* (DQ226826.1), которому можно дать название *BdARL*, оказался самым близким к гену *AtARL*, после которого по уровню схожести располагались гены *AtARGOS A. thaliana, B. rapa* и других (рис. 54а). Необходимо отметить, что исследуемая группа генов имеет два близко расположенных ATG-кодона, что вероятнее всего означает наличие на N-конце белковой молекулы короткого сигнального пептида, который как у AtARL, так и у AtARGOS состоит из 24-х аминокислот. На рисунке 54б

представлены результаты выравнивания аминокислотных последовательностей предсказанного белка AtARL с лидерным пептидом и белковых молекул ARGOS без этого пептида. Поиск гомологичных к этому короткому участку последовательностей аминокислот при помощи BLAST показал отсутствие таковых в базе GenBank. При помощи программы DAS (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS) был проведен поиск потенциальных трансмембранных доменов в исследуемом белке, причем таковых в AtARL оказалось два, которые располагаются от 72-й до 96-й аминокислоты и от 100-й до 120-й аминокислоты (рис. 54в). Далее был проведен анализ предсказанного белка AtARL на сервере I-TASSER, при помощи которого можно определить предполагаемые структуру и функции белковых молекул (Roy et al., 2010). Было показано, что N-конец белка AtARL состоит, большей частью, из растворимых или гидрофильных аминокислот, а его C-конец можно охарактеризовать как гидрофобный, что предполагает трансмембранное расположение этого домена. Одна из предполагаемых вторичных структур белка AtARL, полученная при помощи сервера I-TASSER приведена на рисунке 54г из которого видно, что он, вероятно, состоит как из β-цепей, так и из α-спиралей. Несмотря на то что, сверхэкспрессия гена *AtARL* способствует повышению уровня экспрессии гена *TCH4* (Hu et al., 2006), его белковый продукт не может быть отнесен к транскрипционным фактором, так как в нем мы не обнаружили ни одного известного ДНК-связывающего участка. Поиск схожих белков среди ферментов при помощи метода COFACTOR (Roy et al., 2010) показал лишь небольшую схожесть с формиатдегидрогеназой *E. coli*. Исходя из полученных данных, можно предполагать, что предсказанный белок AtARL не является ни транскрипционным фактором, ни ферментом.

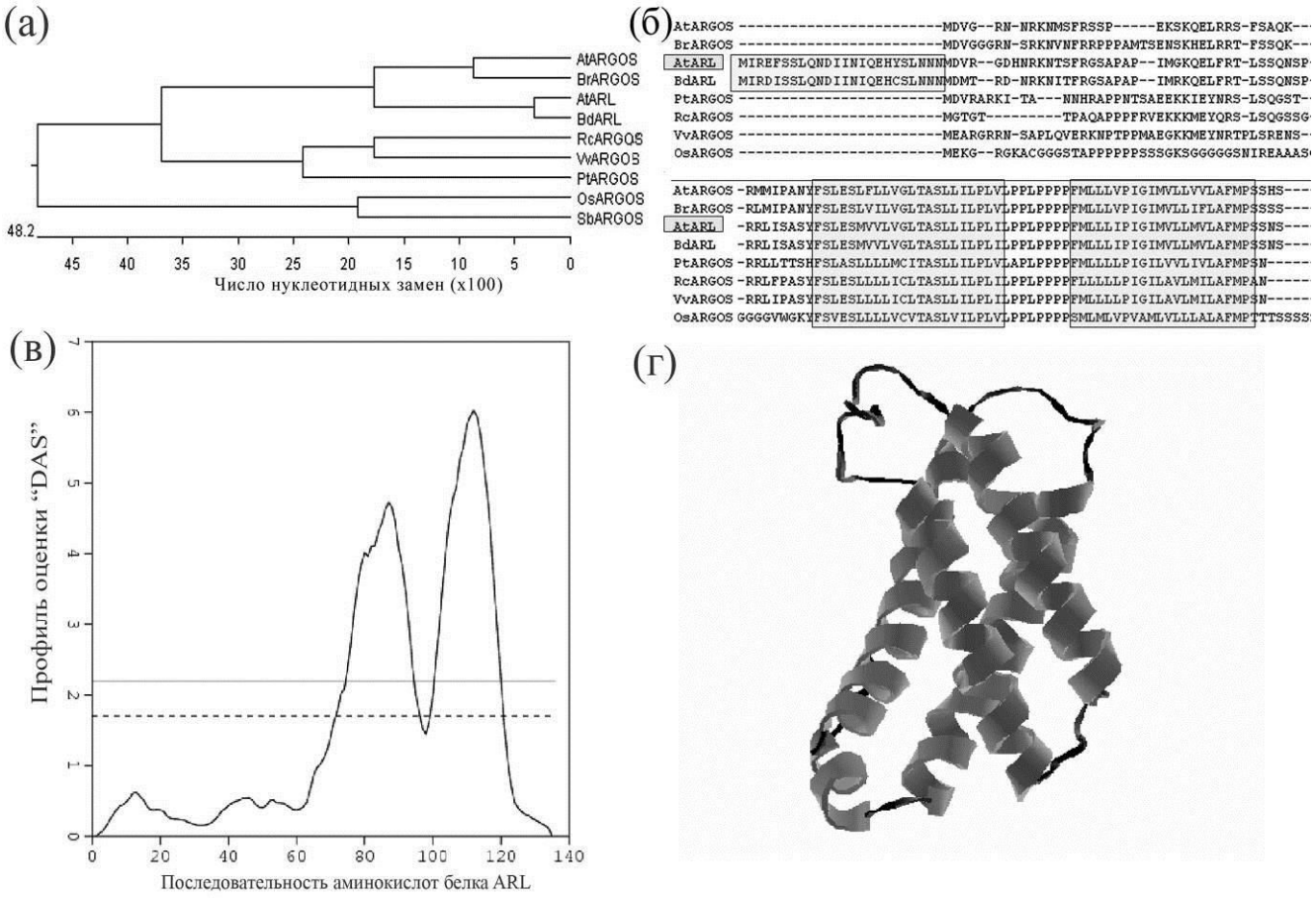


Рис. 54. Результаты биоинформационного анализа последовательностей нуклеотидов и аминокислот гена *AtARL* и его белкового продукта: а - филогенетическое древо сходства гена *AtARL A. thaliana* с гомологичными генами других растений; все значения бустреп-анализа на древе превышали 70; б - результаты выравнивания последовательностей аминокислот предсказанных белков ARL и ARGOS различных растений. Серым цветом выделен предполагаемый трансмембранный OSR-домен; в – результаты поиска потенциальных трансмембранных доменов в предсказанном белке AtARL при помощи программы DAS. Два пика на графике означают, что в белке AtARL имеются два участка, которые с высокой долей вероятности являются трансмембранными; г – один из вариантов предполагаемой вторичной структуры белка AtARL, полученная при помощи сервера I-TASSER.

8.2.2. Амплификация гена *AtARL A. thaliana* и получение генно-инженерных конструкций целевого гена в векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1

Участок ДНК *A. thaliana*, содержащий ген *AtARL,* был амплифицирован из геномной ДНК при помощи праймеров ARLF/ARLR (табл. 1) и его размер составил менее 500 пн, что совпало с теоретически ожидаемым размером в 420 пн (рис. 55а). Ампликон был клонирован в Т-векторе pKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемой, и не содержит замен нуклеотидов. Далее в векторе pCambia 1301 по сайту *Sma*I была клонирована 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования ВМЦК. *Bse*PI-фрагмент вектора pKRX, несущий последовательность гена *AtARL* был обработан Т4 ДНК-полимеразой для достройки липких концов и далее клонирован в векторе pCambia 1301, предварительно гидролизованный ферментом рестрикции *Sma*I. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, ARLF и ARLR (табл. 1). Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35SCambF/ARLR, ARLF/1301R, 35SCambF/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/ARLF, ARLR/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *AtARL*. Таким же образом ген *AtARL* был клонирован в векторе pCambia 1305.1. Агробактериальные клоны, содержащие векторы pCambia 1301 и pCambia 1305.1 с целевым геном в сенс-ориентации, были использованы для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получению трансгенных растений.

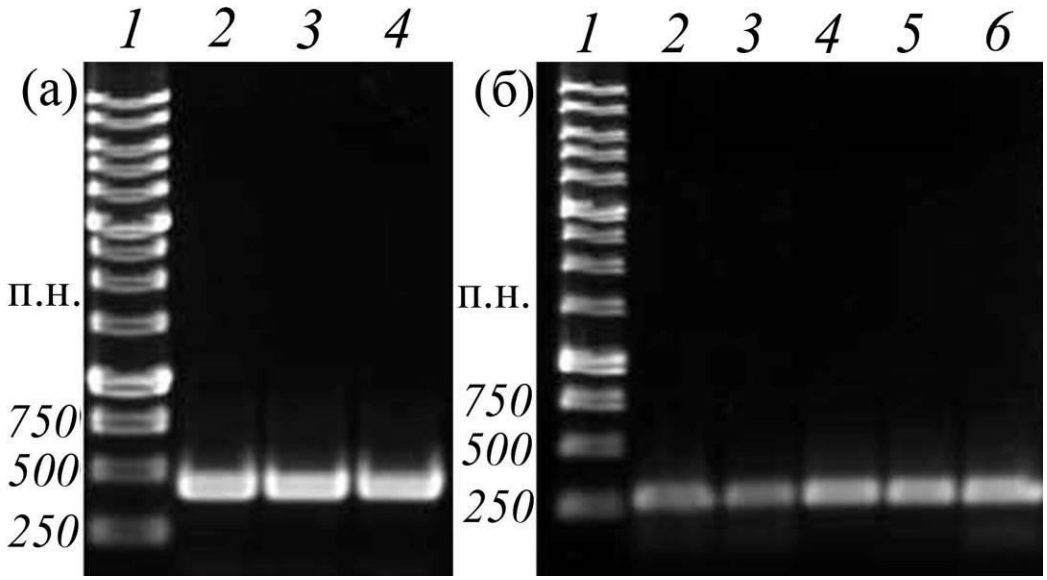


Рис. 55. Электрофореграммы результатов ПЦР и ОТ-ПЦР гена *AtARL*: а – амплификация геномной копии гена *AtARL A. thaliana* размером 420 пн. 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия). 2-4 – ампликоны гена *AtARL A. thaliana*; б - результаты ОТ-ПЦР гена *AtARL* (2 – линия 1305.1/№2, 3 – линия 1305.1/№3, 4 - линия 1301/№1, 5 – линия 1301/№2, 6 – линия 1301/№5). 1 - маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия).

8.2.3. Морфологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana*

При помощи вектора pCambia 1301/ARL было получено 14 трансгенных побегов, из которых успешно укоренились и были акклиматизированы к условиям почвы 5 растений. При трансформации табака вектором pCambia 1305.1/ARL получено 10 трансгенных побегов, из которых укоренили и пересадили на почву 6 растений. Таким образом, нами было получено 5 линий растений с вектором pCambia 1301 и 6 линий растений с вектором pCambia 1305.1. В целом высокий уровень экспрессии целевого гена удалось доказать лишь для пяти линий трансгенных растений (рис. 55б), второе поколение которых и использовалось в дальнейших экспериментах по их морфологической характеристике.

Семена пяти линий трансгенных растений второго поколения были высеяны на селективную среду, где все анализируемые растения показали классическое соотношение выживших и погибших 3:1, что косвенно предполагает наличие

единичной копии встроенного трансгена. Далее по пять растений этих отобранных линий были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали как нетрансгенные растения табака линии SR1, так и линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (линия 1301). Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (табл. 8). В то же время, при визуальной оценке трансгенные растения всех пяти линий характеризовались большими размерами органов (данные представлены только для трех линий). Например, листья у опытных растений были длиннее, чем у контрольных на 20% у линии 1305.1/ARL №2, на 23% у линии 1305.1/ARL №3 и на 13% у линии 1301/ARL №5 (рис. 56а). По площади листьев трансгенные растения также характеризовались увеличением в среднем от 18 до 23% (рис. 56б), по сравнению с контрольными растениями линии 1301. По высоте стебля опытные растения были выше контрольных, и разница составляла у линии 1305.1/ARL №2 - 25%, у линии 1305.1/ARL №3 - 27%, а у линии 1301/ARL №5 - 10% (рис. 56в.). По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были не столь значительными, и в среднем составили не более 5% (табл. 8). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не отличались. Внутри каждой линии как трансгенных, так и контрольных растений различия в размере листьев и стебля между разными вариантами выборки никогда не превышали 10%, а в размерах цветков различий совсем не было. В то же время внедрение Т-ДНК бинарного вектора также значительно не влияло на морфометрические параметры исследуемых растений (рис. 56). Это означает, что увеличение размеров органов трансгенных растений, вероятнее всего, обусловливалось конститутивной экспрессией гена *AtARL*.

Таблица 8. Морфометрические параметры контрольных растений, не содержащих целевого гена, и опытных растений поколения T_1, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana*[a].

Параметр	Линии контрольных растений		Линии трансгенных растений, экспрессирующих ген *AtARL*		
	N. tabacum SR1	pCambia 1301	pCambia 1305.1 ARL №2	pCambia 1305.1 ARL №3	pCambia 1301 ARL №5
Длина листьев, см					
30 дней	5,2±0,6	4,6±0.4	5,9±0,5	4,8±0,1	4,6±0,1
45 дней	11,7±0,4	11,3±0.8	10,6±0,2	9,1±0,3	11,1±0,4
Длина цветка, см	4,50±0,04	4,49±0,01	**4,75±0,11***	**4,73±0,07***	**4,72±0,03***
Число клеток эпидермиса листьев на 1 мм^2	63,4±4,5	66,2±3,6	**41,1±1,8***	**42,9±1,8***	**45,6±2,7***
Время цветения, дней после акклиматизации	100,2±3,5	107,8±2,4	110,5±1,2	117,7±4,2*	103,0±1,8

[a]Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Для выяснения причины увеличения размеров органов, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса листьев. Трансгенные по гену *AtARL* растения, в отличие от контрольных растений, характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев (рис. 56г, 57). При этом у линии 1305.1/ARL №2 клетки были больше в среднем на 58%, у линии 1305.1/ARL №3 на 52%, а у линии 1301/ARL №5 на 42% крупнее, чем у контрольных растений (рис. 56г, 57). Из полученных данных следовало, что размеры клеток у опытных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры отдельных органов. Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток эпидермиса цветков,

однако они увеличивались в среднем лишь на 15-20%. То есть сверхэкспрессия гена *AtARL* в первую очередь влияла на площадь клеток листьев, а размеры клеток эпидермиса цветков изменялись в меньшей степени.

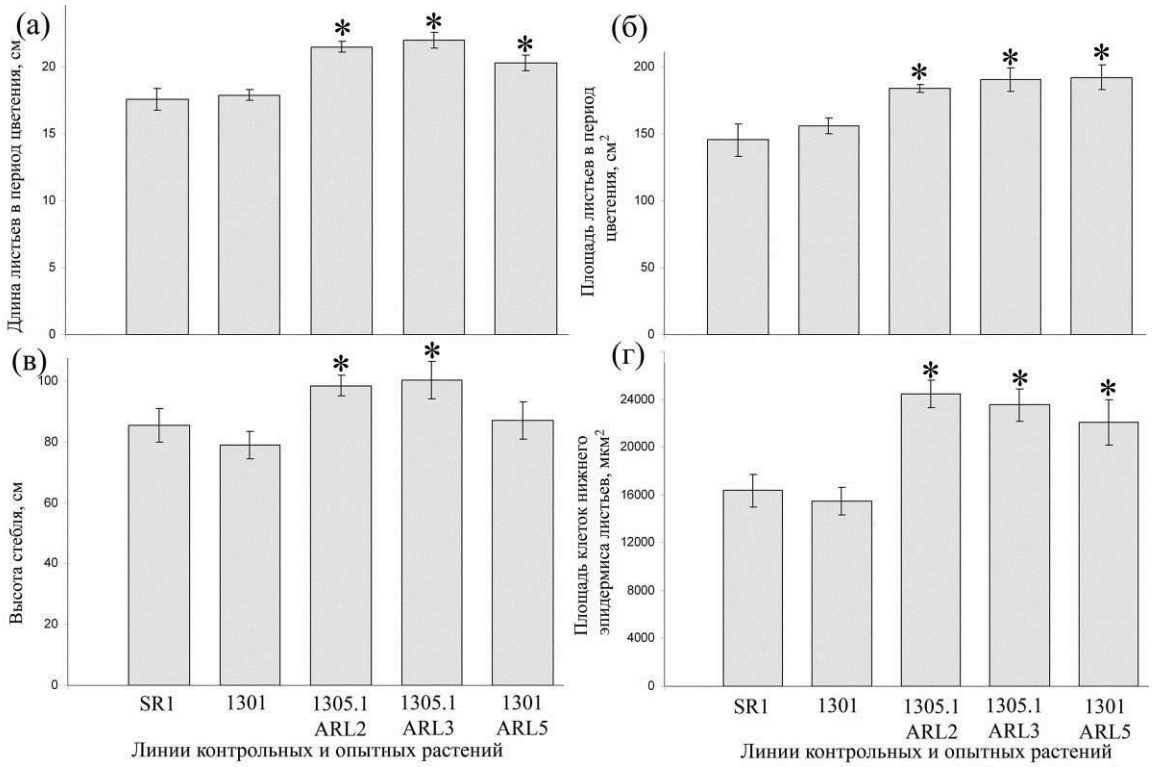


Рис. 56. Морфометрические параметры трансгенных *35S::AtARL* и контрольных растений: а – длина листьев в период цветения; б – площадь листьев в период цветения; в – высота стебля; г – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев. SR1 – дикий тип, 1301 – контрольные трансгенные растения, содержащие Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена (n=5; * – $p < 0,05$).

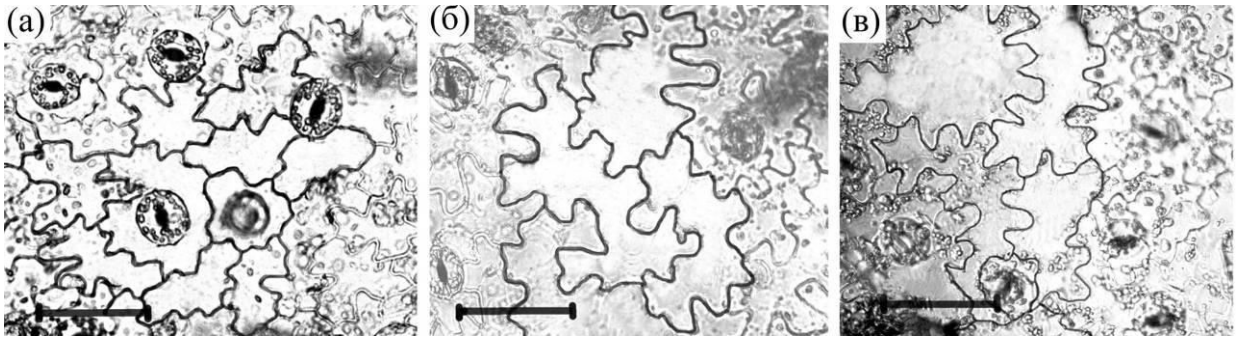


Рис. 57. Сравнительный анализ размеров клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных и опытных растений, экспрессирующих ген *AtARL*: а - клетки эпидермиса листьев контрольных растений табака, увеличение 200х; б, в - клетки эпидермиса листьев трансгенных по гену *AtARL* растений табака, увеличение 200х. Шкала 100 мкм.

Известно, что в регуляции клеточного растяжения принимают участие экспансины (Шарова, 2007). У табака на данный момент идентифицировано 6 генов α-экспансинов (Link, Cosgrove, 1998) которые получили названия *NtEXPA*, с порядковыми номерами от 1 до 6, и их нуклеотидные последовательности имеются в GenBank (AF049350-AF049355). В данной работе нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры для проведения ОТ-ПЦР мРНК гена *NtEXPA5* (табл. 1). В ходе проведенных экспериментов было показано, что в листьях №3 трансгенных по гену *AtARL* растениях табака наблюдается повышенный, по сравнению с контролем, уровень транскрипции соответствующего экспансина (рис. 58).

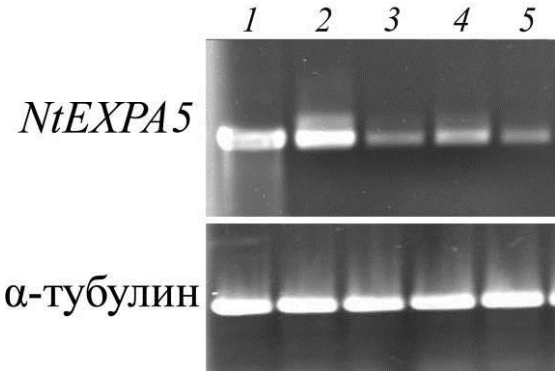


Рис. 58. Влияние конститутивной экспрессии гена *AtARL* на уровень экспрессии гена *NtEXPA5* в 3-х от верхушки побега листьях (листья №3). 1-2 – трансгенные по гену *AtARL* растения табака; 3-5 – контрольные растения.

8.2.4. Сравнительная морфологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana* под контролем промотора ВМГ

В связи с тем, что промотор ВМГ в табаке показал более высокую активность, чем 35S промотор (см. главу 6), было решено использовать его для получения трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *AtARL*. Предполагалось, что при использовании генно-инженерной конструкции *ВМГ::AtARL* могут быть получены трансгенные растения с более существенным увеличением размеров органов, чем при использовании 35S промотора. Для выполнения данной работы был использован бинарный вектор pCambia 1301, в

который нами были клонированы промотор ВМГ и сайт полиаденилирования 35S РНК ВМЦК. Плазмиду pCambia 1301 расщепляли при помощи рестриктазы *Xba*I, липкие концы тупили и проводили лигирование с ампликоном гена *AtARL*, наработанного при помощи Pfu-полимеразы. Используя полученную генно-инженерную конструкцию, проводили агробактериальную трансформацию листовых дисков табака. В ходе проведенной работы было получено 36 трансгенных побегов, из которых удалось отобрать и размножить 7 линий трансгенных растений поколения T_1, причем растения, принадлежавшие этим линиям, характеризовались высоким уровнем содержания мРНК целевого гена. Морфологический анализ отобранных трансгенных растений показал, что большинство из них характеризуются достоверным увеличением размеров листьев, стебля и цветков, по сравнению с контролем. Длина листьев достоверно увеличивалась у всех линий, кроме 14-й, а разница с контролем достигала 39% у линии 19 (рис. 59а). Опытные растения также характеризовались увеличением площади листьев, по сравнению с контролем (рис. 59б). Степень увеличения площади листьев по сравнению с контролем в среднем составила от 23% для линии 7 и до 60% для линии 4 (рис. 59б). Высота стебля достоверно увеличивалась лишь у линий 7, 12 и 26 (рис. 59в), а степень увеличения данного органа по сравнению с контролем составила для этих линий в среднем 23%. Длина цветка, как и в предыдущих наших работах, увеличивалась лишь незначительно, а достоверное различие с контролем было характерно для линий 4, 7 и 12 (рис. 59г). В среднем длина цветков у этих линий увеличивалась на 6% по сравнению с контролем. Далее нами была поставлена задача определить размеры клеток листьев и цветков исследуемых растений. В первую очередь определяли площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, причем все линии опытных растений характеризовались их достоверным увеличением по сравнению с контролем (рис. 59д). Разница с контролем составила от 10% для линии 14 и до 42% для линии 19. Трансгенные *ВМГ::AtARL* растения линий 4, 7, 12, 14 и 19 характеризовались достоверным увеличением размеров клеток наружного

эпидермиса лепестков (рис. 59е). Разница с контролем составила от 12% для линии 19 и до 34% для линии 12.

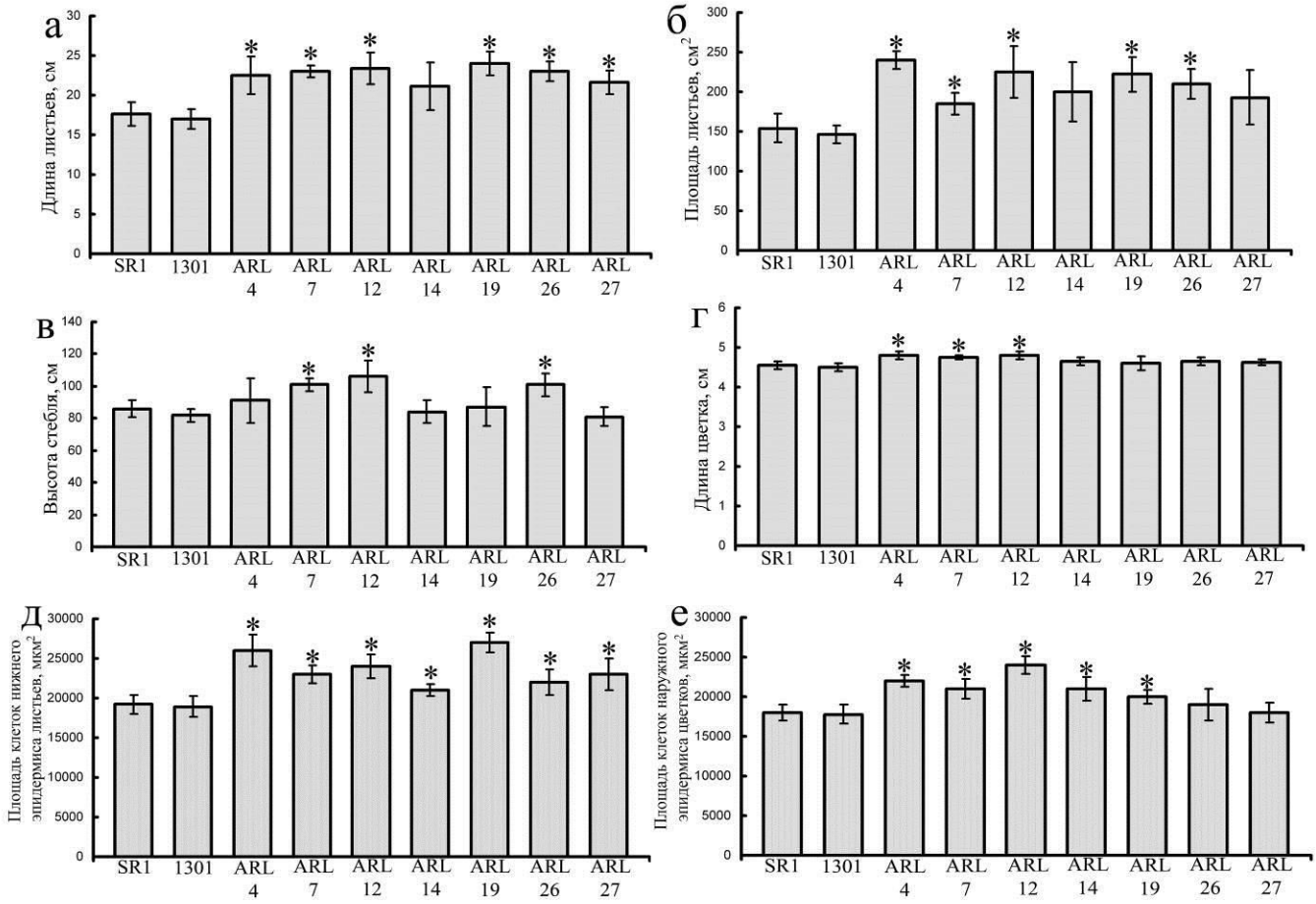


Рис. 59. Морфометрические параметры трансгенных растений табака, конститутивно экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana* под контролем промотора ВМГ: а – длина листьев, см; б – площадь листьев, см^2; в – высота стебля, см; г – длина цветка, см; д – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, мкм^2; е – площадь клеток наружного эпидермиса лепестков, мкм^2. (n=5; * – $p < 0,05$).

8.2.5. Обсуждение результатов

Результаты проведенного нами морфологического анализа трансгенных растений подтверждают данные об участии белкового продукта гена *AtARL* в регуляции клеточного растяжения (Hu et al., 2006). Однако вопрос о структурных и функциональных различиях между OSR-белками остается открытым. Среди белков с описанной структурой и известными функциями ни ортологи ARL, ни

близкие к ним полипептиды нами не обнаружены, в связи с этим, выяснению функциональной значимости белка ARL в растительном организме должны быть посвящены дальнейшие исследования. Исходя из результатов данного исследования и литературных данных можно лишь предположить, что белок ARL является одной из многочисленных белковых молекул, задействованных в трансдукции сигналов поступающих от различных фитогормонов к транскрипционным факторам, участвующим в переключении развития растений. Возможно, сигналы от белка ARL передаются к транскрипционным факторам GRF, которые участвуют в регуляции клеточного растяжения (Kim et al., 2003; Horiguchi et al., 2005). А конечной точкой поступления сигналов от белков с OSR-доменом, судя по нашим данным, могут быть экспансины, непосредственно участвующие в обеспечении роста клеток растяжением (Шарова, 2007).

Результаты нашего исследования показывают, что при помощи гена *AtARL A. thaliana* могут быть получены трансгенные растения с увеличенными размерами органов, причем не только *A. thaliana* (Hu et al., 2006), но и неродственных ему видов. Например, данный ген может быть использован для увеличения длины стебля и размеров листьев, что может иметь практическое значение в сельскохозяйственной и лесной биотехнологии. В первую очередь нами были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *AtARGOS A. thaliana* под контролем промотора ВМГ (раздел 8.1). При этом трансгенные растения *ВМГ::AtARGOS* отличались более существенным увеличением размеров органов, чем *35S::AtARL* растения. Например, по размерам листьев и стебля трансгенные по гену *AtARGOS* растения табака были больше на 30-40%, а *35S::AtARL* растения лишь на 10-27%, чем контрольные линии. Вероятнее всего, данное различие обуславливалось большей активностью промотора ВМГ по сравнению с 35S промотором (см. главу 6), так как, судя по данным литературы, трансгенные растения *A. thaliana* сверхэкспрессирующие гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем 35S промотора мало различались между собой по размерам органов (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011). Действительно, дальнейшие наши исследования показали, что трансгенные растения табака,

сверхэкспрессирующие ген *AtARL* под контролем промотора ВМГ отличаются более существенным увеличением размеров органов, чем при использовании 35S промотора. Например, если в случае использования 35S промотора длина листьев, площадь листьев, высота стебля и длина цветка увеличивалась в среднем на 23%, 23%, 27% и 5% соответственно, то при использовании промотора ВМГ было показано увеличение тех же морфометрических параметров на 39%, 60%, 23% и 6% соответственно. Интересно отметить, что трансгенные по генам *AtARGOS* и *AtARL* растения *A. thaliana* характеризовались более значительным увеличением размеров органов, чем исследованные нами трансгенные растения табака. Например, листья у трансгенных по гену *AtARGOS* растений *A. thaliana* были больше, чем у контрольных растений на 50% и более (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). То есть в гетерологичных условиях исследуемые *OSR*-гены проявляли себя менее выражено, чем в гомологичных условиях. Поэтому существует определенный интерес в поиске ортологов и гомологов генов *ARGOS* и *ARL* в геномах хозяйственно-ценных растений с целью их клонирования и создания на их основе трансгенных растений.

Как и предполагалось, все полученные трансгенные по гену *AtARL* растения табака отличались увеличением размеров клеток эпидермиса листьев. Например, размеры клеток эпидермиса листьев трансгенных растений *35S::AtARL* увеличивались на 42-58%, при этом листья у анализируемых растений по площади пластинки увеличивались лишь на 18-23%. Это говорит о том, что в листьях трансгенных растений происходило компенсаторное уменьшение количества клеток, что способствовало, сохранению размеров органов более близких к размерам органов контрольных растений. В связи с полученными данными не исключается, что сверхэкспрессия гена *AtARL* влияет негативно на уровень экспрессии различных транскрипционных факторов, стимулирующих клеточное деление, при этом сигнальными молекулами могут оказаться различные фитогормоны и сами белки с OSR-доменом (Feng et al., 2011). Однако отметим, что, по крайней мере, уровень экспрессии гена транскрипционного

фактора NtANTL под влиянием сверхэкспрессии гена *AtARL* не снижался (см. раздел 7.2).

8.3. Эстрадиол-индуцибельная и цветокспецифичная экспрессия генов *AtARGOS* и *AtARL* в трансгенных растениях табака

В ходе выполнения предыдущих работ с генами семейства OSR (разделы 8.1 и 8.2), нами были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие гены *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana* под контролем конститутивных промоторов каулимовирусов. Трансгенные растения характеризовались, в первую очередь, увеличением размеров листьев и стебля в основном за счет стимулирования роста клеток растяжением, при этом число клеток в органе по сравнению с контролем уменьшалось. В то же время, степень увеличения размеров органов по сравнению с контролем составляла в среднем в случае листьев и стебля около 25% и в случае цветков только 5%. Мы предположили, что столь незначительное увеличение размеров органов у опытных растений может быть связано не только с компенсаторным уменьшением количества клеток в органе или косупрессией трансгенов, но и с низким уровнем экспрессии целевых генов. Возможно, после агробактериальной трансформации эксплантов листьев трансгенные побеги с высоким уровнем экспрессии генов *AtARGOS* и *AtARL* не выживали или даже не образовывались из-за негативного влияния белковых продуктов трансгенов на начальных стадиях развития растения. Одним из путей решения данной проблемы может стать использование при создании трансгенных растений тканеспецифичных или индуцибельных промоторов вместо конститутивных. Так как при увеличении экспрессии генов *AtARGOS* и *AtARL,* в меньшей степени изменялись размеры цветков, наибольший интерес представляло использование промотора, функционирующего преимущественно в цветках. Из большого разнообразия цветокспецифичных промоторов, пожалуй, наиболее известным и изученным является промотор хальконсинтазы (chsA) *Petunia hybrida* (van der Meer et al., 1990). Хальконсинтаза является одним из ключевых ферментов биосинтеза антоцианов, поэтому промотор chsA проявляет активность в первую

очередь в лепестках и чашелистиках (Han et al., 2005). Широкое распространение в последние годы в растительной биотехнологии получили также индуцибельные системы экспрессии (Aoyama, Chua, 1997; Zuo et al., 2000), которые все чаще используются при создании трансгенных растений вместо конститутивных промоторов. Преимуществом данной группы транскрипционных систем является возможность активации экспрессии трансгена в любой момент вегетационного периода в зависимости от задач эксперимента. В связи с этим, целью нашей дальнейшей работы стало получение и морфофизиологический анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем цветокспецифичного промотора хальконсинтазы (chsA) *Petunia hybrida* (van der Meer et al., 1990) и эстрадиол-индуцибельной системы регуляции транскрипции XVE (Zuo et al., 2000). Предполагалось, что при помощи этих транскрипционных систем можно добиться более значительного влияния на размеры органов, чем при использовании конститутивных промоторов из-за исключения негативного влияния экспрессии трансгенов на начальных стадиях развития растений. Так как у табака на данный момент секвенированы ген эндоксилоглюкантрансферазы *NtEXGT* (AB017025.1), ряд генов экспансинов (Link, Cosgrove, 1998) и ортолог гена *ANT* (*NtANTL*) (Rieu et al., 2005), участвующих в регуляции роста органов, была поставлена также задача, определить их уровень экспрессии в анализируемых трансгенных растениях.

8.3.1. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana* под контролем промотора хальконсинтазы петунии

В данной работе при создании генно-инженерных конструкций использовали бинарный вектор pCambia 1301, с селективным маркером устойчивости к гигромицину, в котором мы клонировали искусственно созданную кассету, состоящую из промотора хальконсинтазы петунии и сайта полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты (35S PolyA). Для этого промотор хальконсинтазы был вначале клонирован в векторе pAL-TA, а затем из него

вырезан по сайту *Eco*RI. Далее промотор хальконсинтазы был клонирован в векторе pCambia 1301 по сайту *Eco*RI. Потом в этот же вектор был также вставлен 35S polyA (вырезан из вектора pRT103) по сайтам рестрикции *Sma*I и *Pst*I. Сконструированную плазмиду расщепляли по сайту рестрикции *Xba*I, достраивали липкие концы при помощи Т4 ДНК полимеразы и в полученном бинарном векторе клонировали целевые гены *AtARGOS* и *AtARL*. По результатам ПЦР-анализа отбирали конструкции, содержащие вставку генов *AtARGOS* и *AtARL* в смысловой ориентации по отношению к промотору.

При помощи генно-инженерной конструкции гена *AtARGOS A. thaliana* в векторе pCambia 1301 с промотором хальконсинтазы петунии были получены 28 побегов, из которых на селективной среде укоренились 16 растений. По результатам анализа экспрессии репортерного гена *GUS* и ПЦР было отобрано 10 растений под номерами 2, 4, 6, 9, 15, 18, 20, 22, 23 и 27, которые были адаптированы к выращиванию в почве в условиях теплицы. На селективной среде с гигромицином расщепление 3:1 было показано только для линий 4, 9, 15, 20 и 22 (линии обозначены аббревиатурой ARG), которые и использовались в дальнейших экспериментах по их морфологической характеристике.

При использовании вектора pCambia 1301 с геном *AtARL* после трансформации листовых дисков было получено 47 побегов, из которых на селективной среде укоренились 25 растений. После ПЦР-анализа и анализа экспрессии репортерного гена *GUS* из этих растений были отобраны лишь 18. Семена этих растений рассевали на селективной среде с гигромицином и расщепление 3:1 было показано для линий ARL3, ARL7, ARL10, ARL21, ARL25, ARL27, ARL30 и ARL33. Данные растения пересаживали на грунт, выращивали до стадии цветения и проводили их морфологический анализ. Изначально нельзя было исключать возможность того, что выделенная нами копия промотора хальконсинтазы может функционировать не только в цветках, но и в листьях и стеблях, поэтому было решено измерить размеры последних тоже.

Было показано, что в период цветения опытные растения по длине и площади листьев мало отличаются от контрольных растений (рис. 60а, б). Наибольшее увеличение размеров листьев было характерно для линий ARG4, ARG22, ARL10, ARL27, ARL33, но степень увеличения для этих растений составила в среднем не более 10%, что, по нашим предыдущим данным, не превышает норму реакции длины листьев табака. Достоверного возрастания высоты стебля по сравнению с контролем нами зафиксировано не было (рис. 60в). Вопреки нашим ожиданиям, существенного увеличения размеров цветков у опытных растений также не произошло, наоборот, у линий ARG22, ARL3, ARL10 и ARL33 наблюдалось статистически достоверное уменьшение величины цветков в среднем на 5% (рис. 60г), в то время как норма реакции размеров цветка у табака, по нашим данным, не превышает 1-2%. А вот у линий ARG4, ARG20 (рис. 61а, б), ARL7 и ARL27 (рис. 61в) было зафиксировано статистически достоверное увеличение размеров цветков по сравнению с контролем в среднем на 4% (рис. 61г). Необходимо отметить, что некоторые полученные нами трансгенные растения из вышеперечисленных линий характеризовались степенью увеличения размеров цветков до 20% по сравнению с контролем. Кроме изменения размеров цветков, нами были зафиксированы нарушения формы данного органа у опытных растений, например, в случае с трансгенными по гену *AtARL* растениями, цветки четырех растений из линий 3, 10 и 25 вместо пяти лепестков имели четыре (рис. 61д), что в случае с контрольными и другими трансгенными растениями нами никогда ранее не регистрировалось. Нарушения формы и симметрии цветков (рис. 61г, е) встречались практически во всех анализируемых линиях опытных растений. Достоверное увеличение размеров семенных коробочек было характерно только для линий ARG20 и ARL27 в среднем на 14% по сравнению с контролем (рис. 60д).

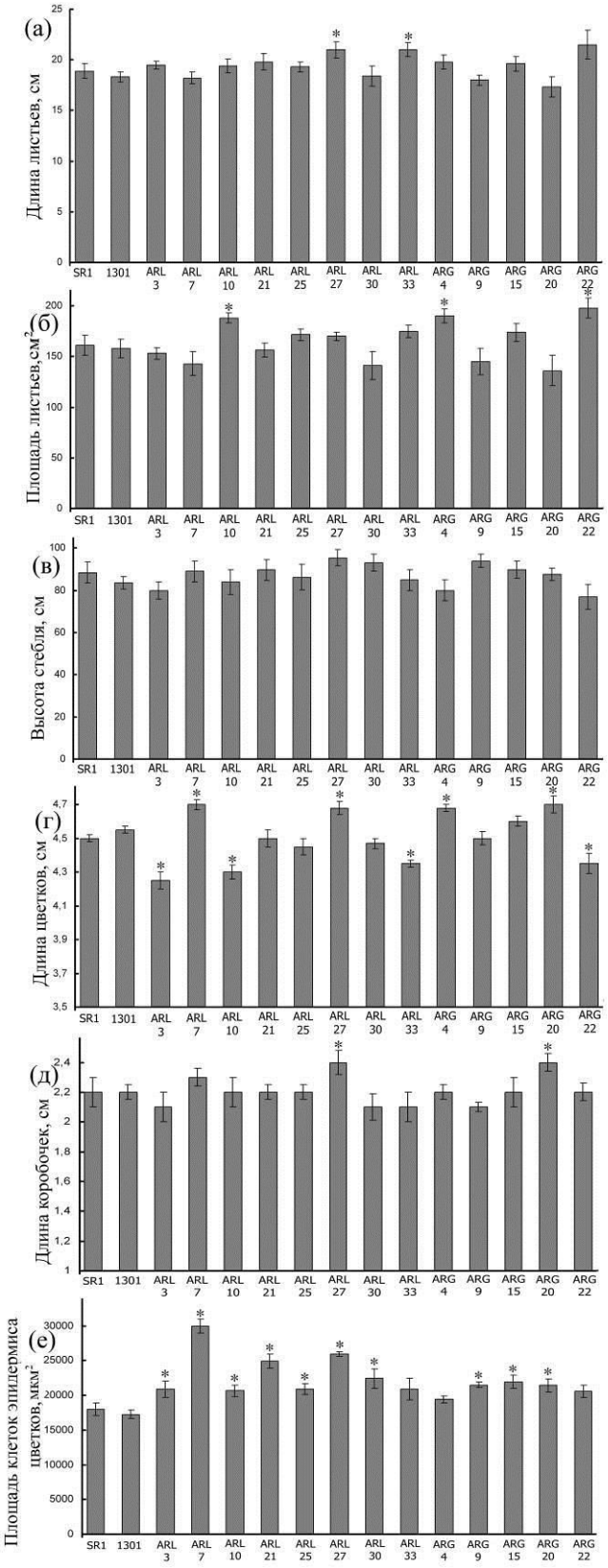


Рис. 60. Морфометрические параметры трансгенных растений, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем промотора chsA: а – длина листьев в период цветения, см; б – площадь листьев в период цветения, см^2; в – высота стебля в период цветения, см; г – длина цветков, см; д – длина семенных коробочек, см; е – площадь клеток эпидермиса цветков, мкм^2. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. ARL3-33 – линии опытных растений табака, экспрессирующих ген *ARL*. ARG4-22 - линии опытных растений табака, экспрессирующих ген *AtARGOS*. (n=5; * – $p < 0,05$).

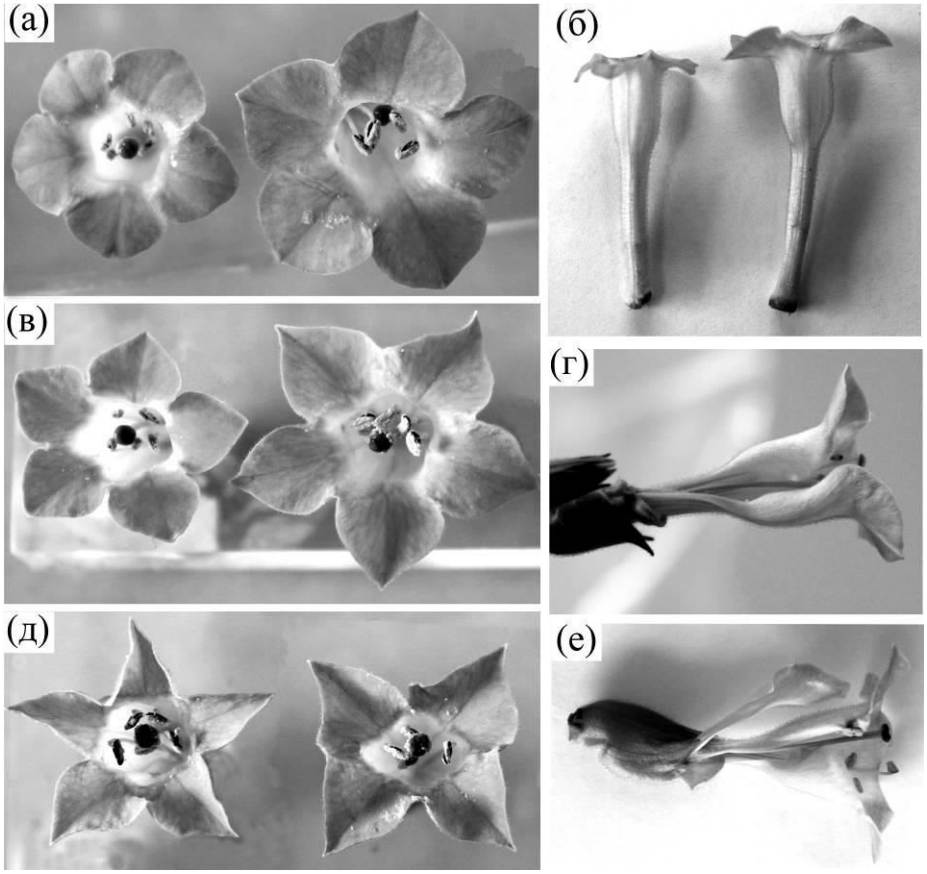


Рис. 61. Цветки трансгенных растений, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем промотора chsA: а - цветки трансгенных растений линии ARG20, вид сверху; б - цветки трансгенных растений линии ARG20, вид сбоку; в - цветки трансгенных растений линии ARL27, вид сверху; г – цветок трансгенного растения линии ARL10 с нарушением развития; д – цветки трансгенных растений линии ARL10 с нарушением симметрии; е – цветок трансгенного растения линии ARL27 с нарушением развития. На рисунках а, б, в и д – слева контроль, справа опытное растение.

Для выяснения возможных причин изменения размеров цветков были проведены измерения площади клеток эпидермиса лепестков. Большинство линий опытных растений характеризовались статистически достоверным увеличением площади клеток эпидермиса лепестков по сравнению с контролем (рис. 60е). В случае с геном *AtARL* увеличение размеров клеток эпидермиса часто совпадало с увеличением размеров цветка. У линий ARL3, ARL10, ARL25 и ARL33 размеры клеток эпидермиса цветков лишь немного превышали таковые у контроля (рис.

60e), и именно у этих растений наблюдалось уменьшение размеров цветков. Все линии трансгенных растений, экспрессирующие ген *AtARGOS,* характеризовались незначительным увеличением размеров клеток эпидермиса лепестков, однако в данном случае корреляции между величиной цветка и размерами отдельных клеток эпидермиса не наблюдалось (рис. 60e). Это может говорить о большем влиянии количества клеток на размеры цветков в случае экспрессии гена *AtARGOS*, а при использовании гена *AtARL* размеры цветков возрастали, вероятнее всего, за счет увеличения размеров отдельных клеток.

При помощи полуколичественной ОТ-ПЦР было показано, что в цветках всех исследуемых линий трансгенных растений действительно обнаруживается экспрессия генов *AtARGOS* и *AtARL* (рис. 62. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26), однако экспрессия трансгенов, хотя и на более низком уровне, нами часто фиксировалась и в листьях (рис. 62. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25).

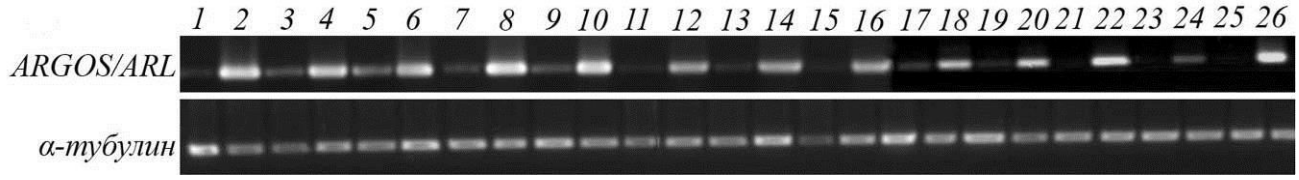


Рис. 62. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ цветокспецифичной экспрессии генов *AtARGOS* и *AtARL*: в листьях (первая дорожка) и цветках (вторая дорожка) трансгенных растений. 1, 2 - ARG4, 3, 4 – ARG9, 5, 6 – ARG15, 7, 8 – ARG20, 9, 10 – ARG22, 11, 12 – ARL3, 13, 14 – ARL7, 15, 16 – ARL10, 17, 18 – ARL21, 19, 20 – ARL25, 21, 22 – ARL27, 23, 24 – ARL30, 25, 26 – ARL33

Из литературных источников известно, что сверхэкспрессия *OSR*-генов может положительно влиять на уровень экспрессии генов *ANT* (Hu et al., 2003), экспансинов (Wang et al., 2009a) и ксилоглюканэндотрансгликозилаз (Hu et al., 2006). У табака на данный момент секвенирован один ортолог гена *ANT*, получивший название *NtANTL* (AY461432), шесть генов экспансинов *NtEXPA1-6* (AF049350-AF049355) и один ген *NtEXGT*, кодирующий эндоксилоглюкантрансферазу (AB017025.1). Нами был проведен количественный

ОТ-ПЦР анализ цветков исследуемых растений на содержание мРНК генов *NtANTL*, *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXGT*. Перед этим наличие экспрессии данных генов было проверено на контрольных растениях дикого типа. В целом, нами было показано, что экспрессия всех перечисленных четырех генов связана с зонами активного роста в растениях, причем учитывая наши (раздел 7.2.1) и литературные данные (Mizukami, Fischer, 2000), экспрессия гена *NtANTL* может служить маркером зоны клеточного деления, а экспрессия генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXGT* (см. главу 9) маркером зоны роста клеток растяжением (Link, Cosgrove 1998). Обобщая данные по всем линиям опытных растений, было показано, что трансгенные по гену *AtARGOS* растения табака характеризуются увеличением уровня экспрессии гена *NtEXPA1* в среднем в 2 раза (рис. 63а), гена *NtEXPA4* в 1,4 раза (рис. 63б), гена *NtEXGT* в 1,3 раза (рис. 63в), гена *NtANTL* в 85 раз по сравнению с контролем (рис. 63г). Но, отметим, что уровень экспрессии гена *NtANTL* при этом был лишь в два раза больше, чем гена α-тубулина. Цветокспецифичная экспрессия гена *AtARL* способствовала еще большему увеличению содержания мРНК генов, участвующих в регуляции роста клеток растяжением: гена *NtEXPA1* в 2,6 раза (рис. 63а), гена *NtEXPA4* в 2,2 раза (рис. 63б), гена *NtEXGT* в 1,7 раза (рис. 63в) по сравнению с контролем. В трансгенных растениях табака со цветокспецифичной экспрессией гена *AtARL* наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *NtANTL* в 53 раза по сравнению с контролем (рис. 63г), что приблизительно в 1,5 раза выше уровня экспрессии гена α-тубулина.

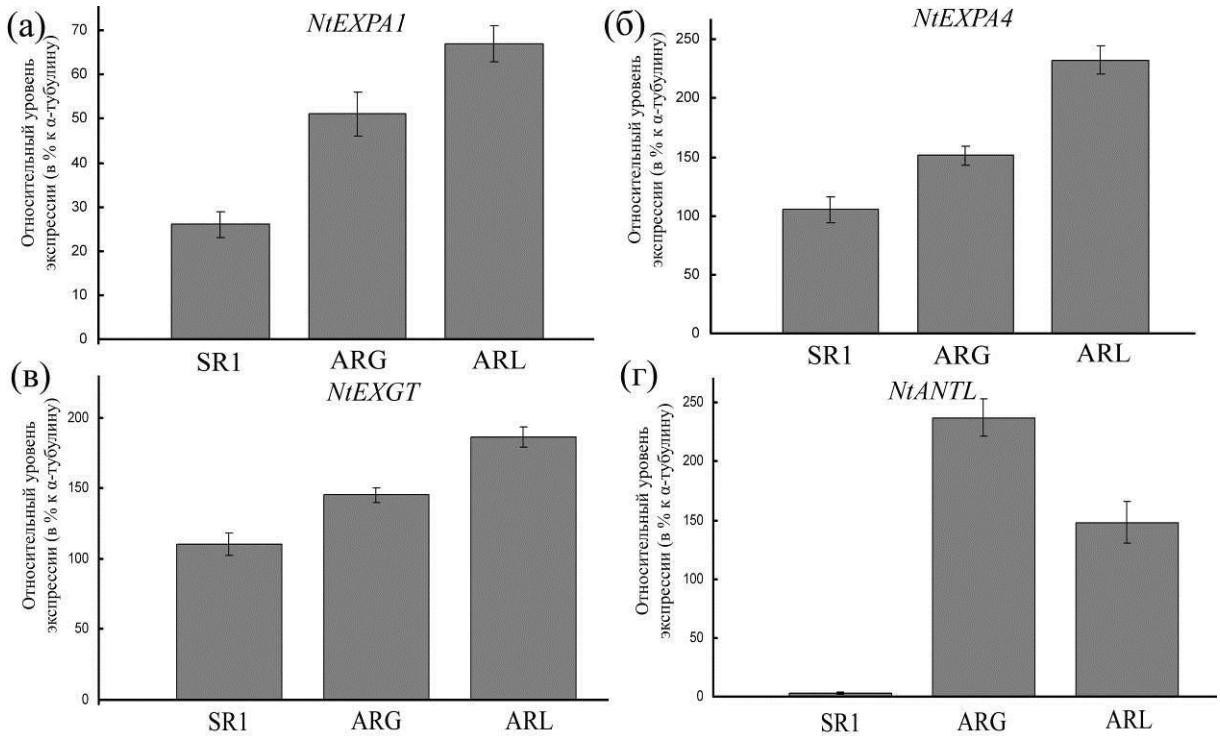


Рис. 63. Результаты количественного анализа уровня экспрессии генов *NtEXPA1* (а), *NtEXPA4* (б), *NtEXGT* (в) и *NtANTL* (г) в цветках всех линий трансгенных растений, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем промотора chsA. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. ARG – трансгенные по гену *AtARGOS* растения табака. ARL – трансгенные по гену *AtARL* растения табака.

8.3.2. Морфофизиологический и молекулярный анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем эстрадиол-индуцибельной системы транскрипции

Для получения трансгенных растений с эстрадиол-индуцибельной экспрессией целевого гена использовали бинарный вектор pER8, содержащий ген устойчивости к гигромицину, химерный транскрипционный активатор XVE и сильный промотор G10-90 (Zuo et al., 2000). Бинарный вектор pER8 расщепляли по сайту рестрикции *Xho*I, достраивали липкие концы при помощи Т4 ДНК полимеразы и в полученном бинарном векторе клонировали целевые гены. Направленность генов определяли при помощи ПЦР с праймерами,

подобранными к системе XVE и к нуклеотидным последовательностям самих целевых генов (табл. 1).

Для постановки эксперимента по эстрадиол-индуцибельной экспрессии целевых генов, руководствуясь перечисленными выше соображениями (см. раздел 8.3.1), а именно по результатам анализа экспрессии репортерного гена *GUS,* ПЦР-анализа и анализа наследования и расщепления устойчивости к селективному агенту, были отобраны линии трансгенных растений ARG3, ARG6, ARG7, ARG17 и ARG18, содержащих ген *AtARGOS*. Из трансгенных по гену *AtARL* растений табака были отобраны линии ARL3, ARL14 и ARL15. Индуцибельная экспрессия положительно влияла на длину листьев у линий ARG7, ARG18 и ARL15 (рис. 64а), при этом у опытных растений длина листьев увеличивалась в среднем на 21%, что, по нашим данным, превышает норму реакции для листьев табака. У остальных линий контрольные и опытные растения по длине листьев практически не различались. Значительное увеличение площади листьев было зафиксировано только для линии ARG7 в среднем на 30% и линии ARG18 на 66% (рис. 64б). По высоте стебля контрольные и опытные растения в целом отличались друг от друга в меньшей степени, например для линии ARG6 было зафиксировано увеличение на 10%, линии ARG18 увеличение на 20%, линии ARL14 увеличение на 16%, а у линии ARL15 наблюдалось уменьшение высоты стебля на 20% по сравнению с контролем (рис. 64в). Увеличение размеров цветка было характерно для линии ARG3 в среднем на 8%, а для линий ARG7, ARL3 и ARL15 в среднем на 6% (рис. 64г). Для линии ARG18, наоборот, было показано уменьшение размеров цветков по сравнению с контролем на 7%. Длина семенных коробочек у контрольных и опытных растений достоверно не различалась между собой и составляла в среднем 2,1 см. У исследуемых растений были измерены площади клеток нижнего эпидермиса листьев и рассчитано приблизительное значение числа клеток, приходящихся на 1 мм^2 листовой поверхности (рис. 64д). Анализ показал, что основной причиной увеличения размеров листьев в линиях ARG7 и ARG18 было возрастание числа клеток, приходящихся на один орган (рис. 64д). В линиях ARL3 и ARL14 наблюдалось уменьшение количества клеток, а размеры листьев

увеличивались за счет стимуляции роста клеток растяжением. Таким образом, результаты нашего исследования соотносятся с литературными данными о том, что экспрессия гена *AtARGOS* преимущественно влияет на клеточное деление, а ген *AtARL* участвует в регуляции роста клеток растяжением (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011).

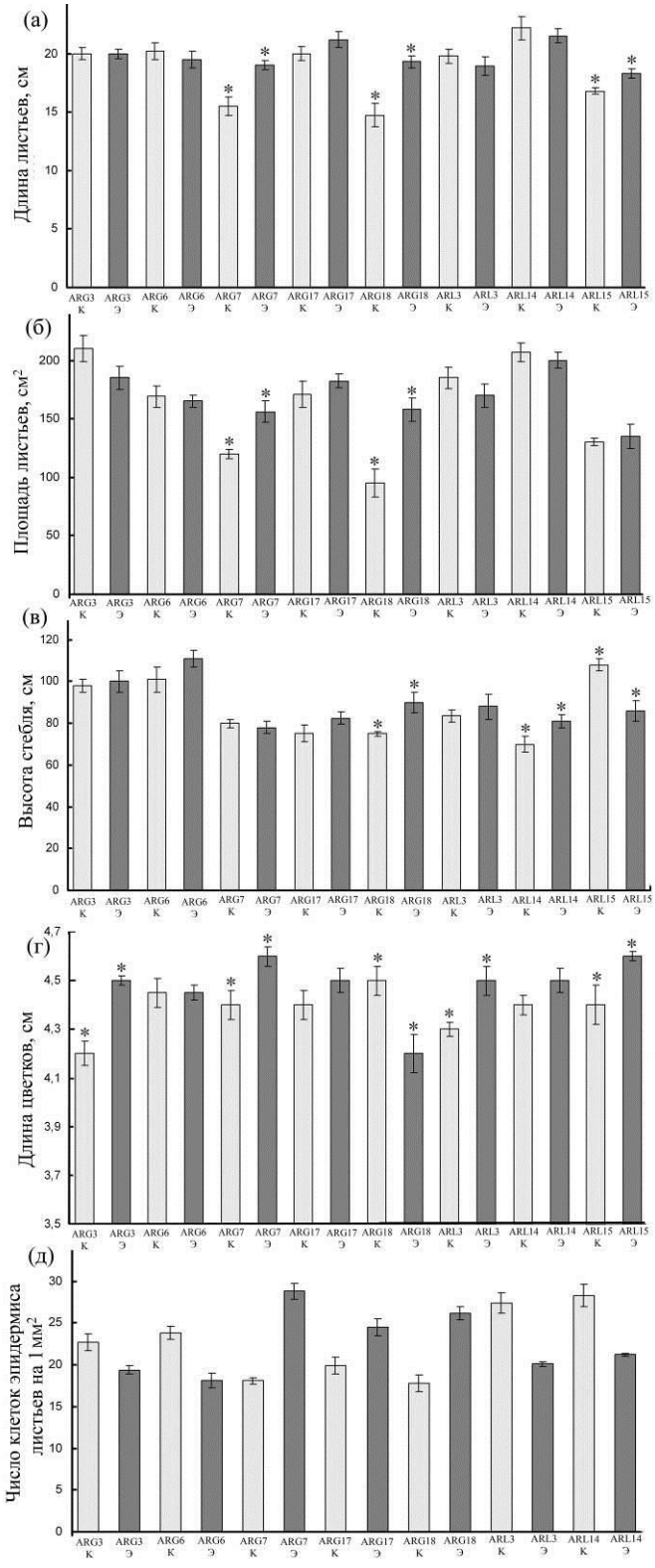


Рис. 64. Морфометрические параметры трансгенных растений, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем эстрадиол-индуцибельной системы XVE: а – длина листьев в период цветения, см; б – площадь листьев в период цветения, см^2; в – высота стебля в период цветения, см; г – длина цветков, см; д – приблизительное число клеток нижнего эпидермиса листьев на 1 мм^2 листовой поверхности. К – контрольные растения, обработанные 5 мкМ раствором ДМСО. Э – опытные растения, обработанные 5 мкМ раствором эстрадиола. (n=5; * – $p < 0,05$).

ОТ-ПЦР анализ показал, что у контрольных растений, обработанных только раствором ДМСО, экспрессия целевых генов не проявляется (рис. 65. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15), в то же время обработка эстрадиолом в растворе с ДМСО действительно приводила к появлению экспрессии генов *AtARGOS* и *AtARL* в листьях всех опытных растений (рис. 65. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16).

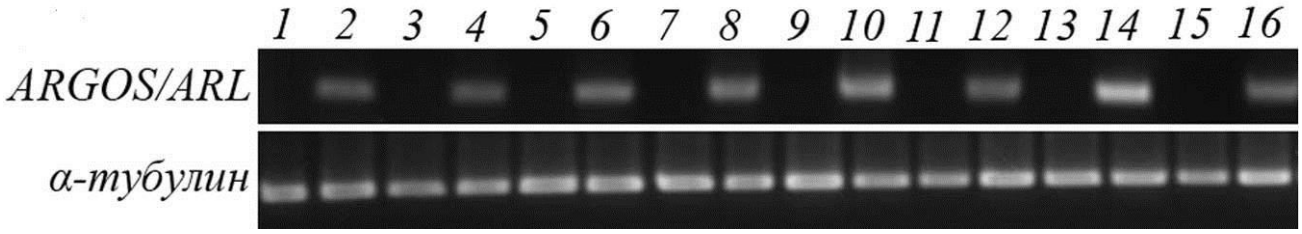


Рис. 65. Индуцибельная экспрессия генов *AtARGOS* и *AtARL.* Первая дорожка - после обработки ДМСО, вторая дорожка – после обработки эстрадиолом. 1, 2 – ARG3; 3, 4 – ARG6; 5, 6 – ARG7; 7, 8 – ARG17; 9, 10 – ARG18; 11, 12 – ARL3; 13, 14 – ARL14; 15, 16 – ARL15.

Количественная ОТ-ПЦР генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4*, *NtEXGT* и *NtANTL* в листьях исследуемых растений не позволил сделать определенных выводов из-за большой разницы в уровне экспрессии данных генов в разных растениях (данные не представлены), поэтому для двух линий трансгенных растений ARG7 и ARL3 было решено провести анализ уровня экспрессии этих генов в цветках. Эти линии были отобраны в связи с тем, что именно в выборках этих линий обработка индуктором наиболее существенно влияла на рост цветков (рис. 64г). В результате проведенного исследования было показано, что индуцибельная экспрессия гена *AtARGOS* в цветках способствует увеличению содержания мРНК гена *NtEXPA1* в 1,5 раза (рис. 66а), гена *NtANTL* в 6 раз (рис. 66г). При этом уровень экспрессии гена *NtEXPA4* уменьшался в 2 раза (рис. 66б), а экспрессия гена *NtEXGT* повышалась менее значительно (рис. 66в). Индуцибельная экспрессия гена *AtARL* приводила к увеличению уровня экспрессии гена *NtEXPA1* в 2,5 раза (рис. 66а) и гена *NtEXGT* в 1,4 раза (рис. 66в). Уровень экспрессии генов *NtEXPA4* (рис. 66б) и *NtANTL* (рис. 66г) при этом, по сравнению с контролем, практически не менялся. Таким образом, нами очередной раз было показано, что

гены *AtARGOS* и *AtARL* по-разному регулируют экспрессию генов, контролирующих клеточное деление и рост клеток растяжением. При этом экспрессия экспансинов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* регулируется тоже по-разному, что может говорить о том, что их белковые продукты выполняют отличающиеся функции (см. раздел 9.2).

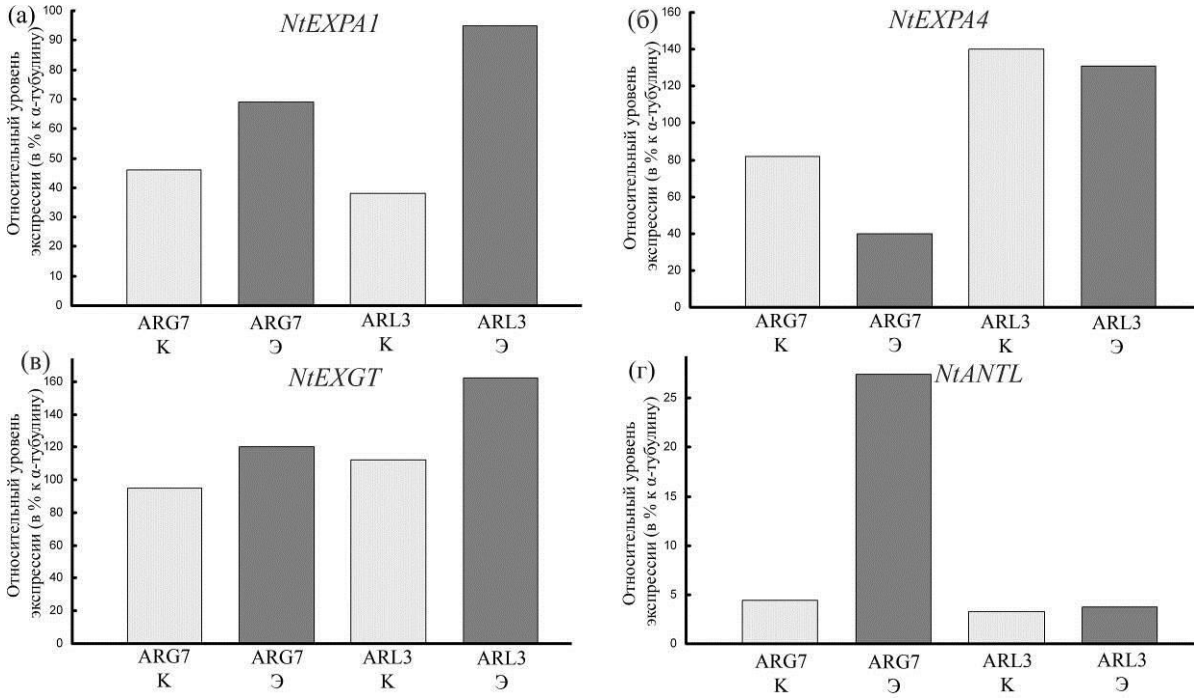


Рис. 66. Результаты количественного анализа уровня экспрессии генов *NtEXPA1* (а), *NtEXPA4* (б), *NtEXGT* (в) и *NtANTL* (г) в цветках трансгенных растений, экспрессирующих гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем системы XVE. К – контрольные растения, обработанные 5 мкМ раствором ДМСО. Э – опытные растения, обработанные 5 мкМ раствором эстрадиола, содержащего 5 мкМ ДМСО.

8.3.3. Обсуждение результатов

В результате проведенной работы, в первую очередь, были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем цветокспецифичного промотора хальконсинтазы. Исходя из литературных данных (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006), предполагалось, что трансгенные растения в целом будут отличаться крупными размерами цветков,

однако степень увеличения для большинства полученных растений не превышала таковую, когда использовались конститутивные промоторы каулимовирусов (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Wang et al., 2009а, Wang et al., 2009б; Feng et al., 2011). Отметим, что некоторые трансгенные растения, экспрессирующие гены *AtARGOS* и *AtARL* под контролем промотора chsA, характеризовались даже уменьшенными размерами цветков, что может объясняться косупрессией генов. В литературе имеются данные о получении трансгенных растений с увеличенными размерами цветков за счет цветокспецифичной экспрессии гена изопентилтрансферазы под контролем промотора гена *APETALA3* (Verdonk et al., 2008), что говорит об актуальности данного направления исследований, особенно для получения новых сортов декоративных растений. Однако следует признать, что полученные нами генно-инженерные конструкции оказались не столь эффективными, чтобы использовать их на практике для увеличения размеров цветков. Возможно, в случае с табаком, в отличие от *A. thaliana* (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006), сверхэкспрессия генов *AtARGOS* и *AtARL* меньше влияет на гены, участвующие в регуляции роста и развития цветка. Отметим, что нами в промоторной конструкции вместо сайта полиаденилирования гена *chsA* был использован 35S polyA, что также может оказывать влияние на активность и специфичность промотора (Mitsuhara et al., 1996).

Многократное увеличение уровня экспрессии гена *NtANTL*, выявленное нами в трансгенных растениях, соответствует данным литературы (Hu et al., 2003) и может говорить о прямом действии белкового продукта трансгена *ARGOS* на данную мишень. Менее значительное влияние на уровень экспрессии экспансинов и NtEXGT скорее всего предполагает опосредованное действие трансгенов *AtARGOS* и *AtARL* на эти мишени через сеть регуляторных молекул. Известно, что наибольшее содержание мРНК гена *NtANTL* наблюдается в плодолистиках (Rieu et al., 2005), в которых он, вероятнее всего, контролирует клеточные деления (см. раздел 7.2.1), в то же время увеличения размеров пестика в исследуемых нами трансгенных растениях не зафиксировано. Возможно, это объясняется тем, что промотор хальконсинтазы проявляет наибольшую активность в окрашенных

частях венчика (Fritze et al., 1991), но не в плодолистиках. Вероятнее всего в лепестках влияние транскрипционного фактора NtANTL имеет меньшее значение для ростовых процессов, так как здесь в основном происходит рост клеток растяжением. Уровень экспрессии генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4*, *NtEXGT* и *NtANTL* менялся сходным образом в трансгенных растениях, экспрессирующих как ген *AtARGOS*, так и ген *AtARL,* при этом ген *ARGOS* в отличие от работ с *A. thaliana* (Hu et al., 2003) оказывал влияние и на рост клеток растяжением. Это может объясняться тем, что продукты генов *AtARGOS* и *AtARL* гомологичные (Feng et al., 2011) и в условиях гетерологичной экспрессии они могут распознаваться генной сетью, участвующей в регуляции роста органов, как один и тот же белок. В то же время, в литературе имеются сходные данные, например, сверхэкспрессия гена *ARGOS,* несмотря на данные об участии в регуляции клеточного деления (Hu et al., 2003), может влиять положительно и на уровень экспрессии экспансинов (Wang et al., 2009б), а гены *OsARGOS* риса и *OSR1 A. thaliana* влияют одновременно как на клеточное деление, так и на рост клеток растяжением (Wang et al., 2009a; Feng et al., 2011).

Используя индуцибельную систему экспрессии, нам также не удалось увеличить размеры органов в большей степени, чем при применении конститутивных промоторов каулимовирусов. Из литературы известно о превышении активности эстрадиол-индуцибельной системы над 35S промотором в 8 раз (Zuo et al., 2000), но вопреки этим данным, эффективность полученных нами генно-инженерных конструкций была ниже ожидаемой. Однако полученные результаты вполне могут быть объяснены теми же причинами, что и при использовании промотора хальконсинтазы, то есть, косупрессией генов. Анализ числа клеток эпидермиса листьев, приходящихся на 1 мм^2, показывает, что сверхэкспрессия гена *AtARGOS* может оказывать влияние на клеточное деление и клеточное растяжение, а ген *AtARL* только на последнее, что хорошо соотносится с данными, полученными на *A. thaliana* (Wang et al., 2009a; Hu et al., 2006).

Наиболее значимым результатом количественной ОТ-ПЦР в данном случае является положительное влияние гена *AtARGOS* на уровень экспрессии гена *NtANTL*. Отметим, что на *A. thaliana* также было показано, что сверхэкспрессия гена *AtARGOS* способствует увеличению уровня экспрессии гена *AtANT* (Hu et al., 2003), который, судя по нашим данным, является ортологом гена *NtANTL* табака (см. раздел 7.2.1). Интересно отметить, что при применении индуцибельной системы XVE ген *AtARL* на экспрессию гена *NtANTL* влияния не оказывал, причем эти данные вполне соответствуют предполагаемой функции белка AtARL (Hu et al., 2006).

В целом по нашим и литературным данным можно сделать вывод, что основным препятствием при получении трансгенных растений с увеличенными размерами органов является не только низкий уровень экспрессии целевых генов, но и сложная система генетической регуляции роста, способствующая поддержанию гомеостаза и компенсирующая большинство изменений в профиле экспрессии в трансгенных растениях. Одной из самых труднопреодолимых проблем в этой области генной инженерии остается косупрессия генов. Для преодоления этих трудностей и получения трансгенных растений со значительно увеличенными размерами органов, необходимы дальнейшие исследования, направленные на одновременное повышение экспрессии генов, участвующих как в регуляции клеточного деления, так и клеточного растяжения. Также предполагается, что при получении трансгенных растений необходимо использовать трансгены из неродственных видов растений, что может способствовать снижению вероятности косупрессии из-за уменьшения уровня схожести нуклеотидных последовательностей между генами из Т-ДНК и хромосомными генами. В то же время из поля зрения не должны ускользать и другие гены, контролирующие эндоредупликацию, водный транспорт, биосинтез компонентов клеточной стенки и другие процессы.

8.4. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации

Ценные сведения о возможных функциях тех или иных растительных генов могут быть получены также путем уменьшения уровня экспрессии гена-мишени (Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). К тому же, результаты, полученные при уменьшении уровня экспрессии тех или иных генов играют важную роль для подтверждения и дополнения данных, полученных при сверхэкспрессии исследуемых генов. Одной из эффективных стратегий подавления экспрессии генов на посттранскрипционном уровне у растений является РНК-интерференция (Рукавцова и др., 2010). Для этого довольно часто клонируют короткий участок целевого гена в антисмысловой ориентации по отношению к промотору и проводят трансформацию растений (Frizzi, Huang, 2010). Такие работы в основном ведутся на модельном объекте *A. thaliana* и о функционировании описанных в литературе генно-инженерных конструкций в других растениях известно гораздо меньше. В связи с тем, что геномы многих растений не секвенированы и клонирование генов каждого растения занимает определенное время, представляет особый интерес создание универсальных генно-инженерных конструкций, которые будут функционировать во многих двудольных растениях. Апробация созданных в ходе работы генно-инженерных конструкций должна происходить не только на *A. thaliana*, но и на других модельных растительных объектах, например, табаке. Исходя из этого, целью следующей нашей работы являлось клонирование коротких консервативных участков гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации и получение на основе этих генно-инженерных конструкций трансгенных растений табака.

8.4.1. Поиск и клонирование консервативных фрагментов гена *AtARGOS A. thaliana*

В GenBank имеются нуклеотидные последовательности гомологов гена *ARGOS* довольно большого количества растений: *A. thaliana* (NM115853.4), *A.*

lyrata (XM002880036.1), *B. divaricarpa* (DQ226826.1), *B. rapa* (FJ171724.1), *V. vinifera* (AM475052.1), *R. communis* (XM002533293.1), *S. lycopersicum* (NM001247750.1), *P. trichocarpa* (XM002310336.1; XM002331606.1), *Picea sitchensis* (EF678316.1), *O. sativa* (DQ641272.1), *Z. mays* (AEQ59626.1) *Hordeum vulgare* (AK369743.1). Высоким уровнем схожести к гену *AtARGOS* характеризуется также ген *AtARL A. thaliana* (NM180078.3). Ранее нами было показано, что к гену *AtARGOS A. thaliana* наиболее близки по нуклеотидному составу гомологичные участки ДНК *B. divaricarpa, B. rapa, R. communis, V. vinifera* и *P. trichocarpa* (раздел 8.1.1). Открытые рамки считывания гомологов гена *ARGOS* этих растений были нами выровнены между собой и с геном *AtARL* с целью поиска консервативных участков. Однако такой участок ДНК в гене *AtARGOS* найти не удалось, поэтому было решено выбрать фрагмент ДНК размером 171 пн, отличающийся относительно высокой консервативностью (рис. 67). Этот участок ДНК был амплифицирован из геномной ДНК *A. thaliana* и клонирован в бинарном векторе pCambia 1301 в антисмысловой ориентации. Полученная в ходе работы генно-инженерная конструкция была внедрена в клетки *A. tumefaciens*.



Рис. 67. Результаты выравнивания открытых рамок считывания генов *AtARGOS* и *AtARL*, а также гомологичных участков ДНК *B. divaricarpa, B. rapa, R. communis, V. vinifera* и *P. trichocarpa*. Серым цветом выделен клонированный нами консервативный участок генов *ARGOS*.

8.4.2. Сравнительная морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *AtARGOS A. thaliana* в антисмысловой ориентации

При помощи генно-инженерной конструкции фрагмента гена *AtARGOS A. thaliana* в антисмысловой ориентации были получены 17 побегов, из которых на селективной среде укоренились 12 растений. Пять растений не были отобраны для дальнейшей работы из-за отрицательных результатов при ПЦР-анализе и анализе экспрессии репортерного гена *GUS*. В целом к условиям почвы удалось акклиматизировать семь растений под номерами 2, 3, 9, 12, 13, 14 и 17. Расщепление 3:1 было показано только для линий 3, 9, 12, 14 и 17, которые и использовалось в дальнейших экспериментах по их морфологической характеристике.

Из пяти отобранных линий растений достоверным уменьшением размеров органов характеризовались лишь две линии под номерами 3 и 12, остальные линии трансгенных растений существенно не отличались от контроля (рис. 68). Длина листьев у линий 3 и 12 была меньше, чем у контроля в среднем на 13% (рис. 68а), а площадь листьев на 16% (рис. 68б). По высоте стебля контрольные и опытные растения достоверно не различались между собой (рис. 68в). По длине цветка некоторые опытные растения характеризовались статистически достоверным уменьшением: на 6% у линии 3, на 2% у линии 9, на 4% у линий 12 и 14 , а у линии 17 длина цветков не отличалась от контроля (рис. 68г). При этом длина семенных коробочек была уменьшена лишь у линий 3 и 12 (на 17% и 13% соответственно) (рис. 68д).

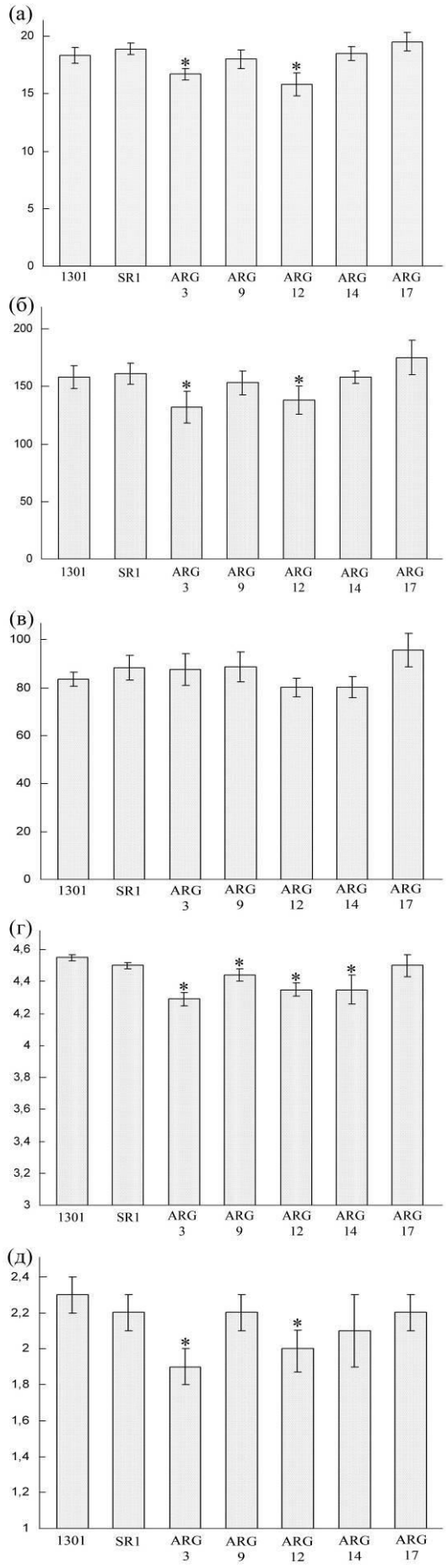


Рис. 68. Морфометрические параметры трансгенных растений, экспрессирующих участок гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации и контрольных растений: а – длина листьев в период цветения, см; б – площадь листьев в период цветения, $см^2$; в – высота стебля в период цветения, см; г – длина цветков, см; д – длина коробочек, см. 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. ARG3-17 – линии опытных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации. (n=5; * – $p < 0,05$).

Внутри каждой линии как трансгенных, так и контрольных растений различия в размере листьев и стебля между разными вариантами выборки никогда не превышали 10%, а в размерах цветков - 1%. В то же время внедрение Т-ДНК бинарного вектора также значительно не влияло на морфометрические параметры исследуемых растений (рис. 68). Это означает, что уменьшение размеров органов трансгенных растений линий 3 и 12, вероятнее всего, обусловливалось специфическим влиянием полученной в ходе работы генно-инженерной конструкции.

Уменьшение размеров органов у растений может обуславливаться снижением скорости и продолжительности клеточного деления или частичным блокированием роста клеток растяжением. В связи с чем, для выяснения причин уменьшения размеров органов, нами были проведены измерения размеров клеток эпидермиса листьев и лепестков исследуемых растений. Было показано, что опытные растения, экспрессирующие фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации, характеризуются различными размерами клеток эпидермиса листьев, в зависимости от линии (рис. 69а). Трансгенные растения линий 3 и 12 отличаются небольшим уменьшением размеров клеток эпидермиса листьев на 26 и 14% соответственно. В связи с чем, можно предположить, что уменьшение размеров листьев у этих растений обуславливалось, в первую очередь, именно уменьшением размеров клеток, однако уменьшение количества клеток, вероятнее всего, тоже играет определенную роль в данном случае. Интересно отметить, что у линий 9, 14 и 17, у которых размеры органов не уменьшались, обнаруживались, наоборот, более крупные, чем в контроле клетки (рис. 69а). Например, у линии 9 размеры клеток увеличивались на 16%, у линии 14 на 51%, а у линии 17 на 41%. Площади клеток эпидермиса лепестков у линий 3 и 12 также были немного уменьшены (на 11 и 5% соответственно), а у линий 9, 14 и 17 наблюдалось их увеличение в размерах (на 5, 18 и 10% соответственно), по сравнению с контролем (рис. 69б).

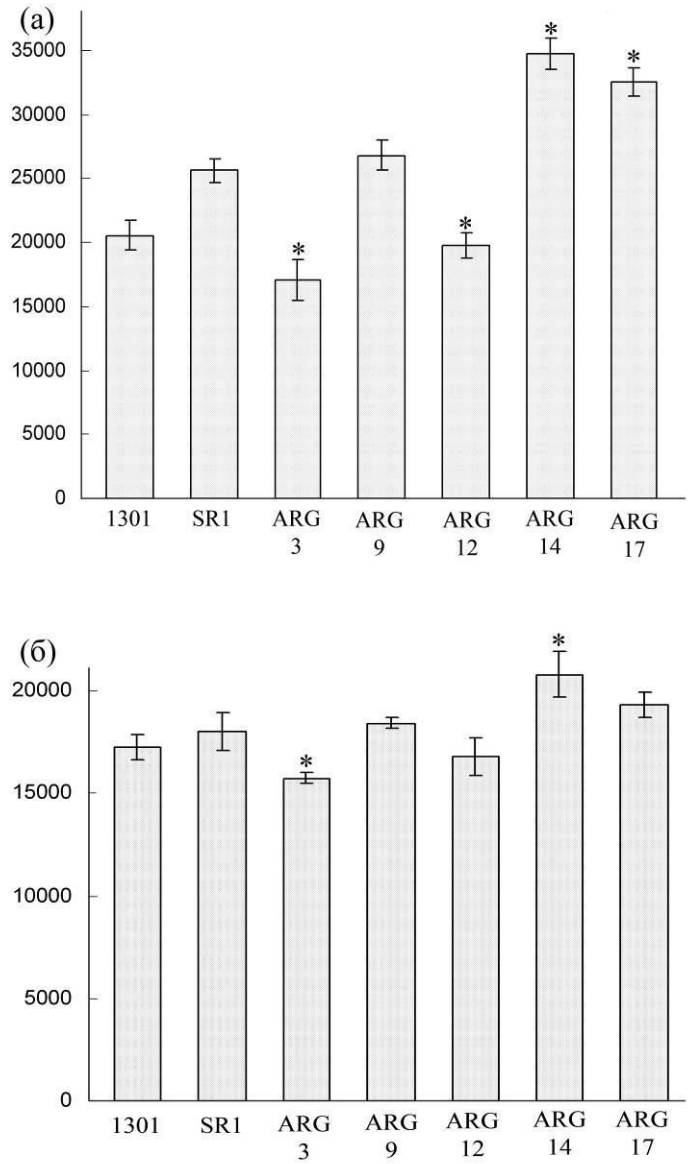


Рис. 69. Сравнительный анализ размеров клеток эпидермиса листьев и лепестков контрольных и опытных растений: а – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев табака, мкм^2; б - площадь клеток наружного эпидермиса цветков табака, мкм^2. 1301 и SR1 – контрольные растения. ARG3-17 – линии опытных растений. (n=5; * – $p < 0,05$).

Нами ранее было показано, что сверхэкспрессия гена *AtARL* способствует увеличению уровня экспрессии экспансинов табака (раздел 8.2.3). Исходя из того, что гены *AtARGOS* и *AtARL* являются гомологичными, можно предположить, что в трансгенных растениях, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации, может быть изменен уровень экспрессии генов некоторых эксансинов. Для подтверждения данного предположения, нами была проведена полуколичественная ОТ-ПЦР генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в молодых растущих листьях табака (листья №3). Уровень экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* оказался довольно высоким именно в верхушках побегов, молодых цветках и листьях (см. главу 9), что говорит об участии данных экспансинов в

процессе роста органов (рис. 70, *1*, *2*). В то же время, в молодых листьях №3 трансгенных растений линий 3 и 12 наблюдалось заметное уменьшение уровня экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* (рис. 70, *3*, *5*). Отметим, что именно для этих растений было показано уменьшение размеров органов. А в листьях трансгенных растений линии 9 уровень экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* оставался в пределах нормы (рис. 70, *4*).

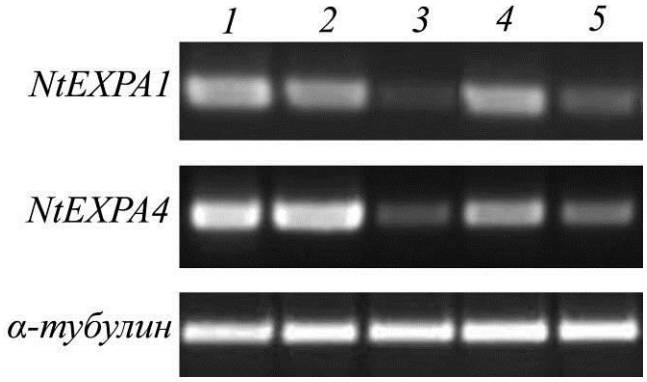


Рис. 70. Электрофореграммы результатов полуколичественной ОТ-ПЦР в листьях №3 трансгенных растений, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации: 1 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена; 2 – контрольные растения табака дикого типа; 3 – опытные растения табака линии 3; 4 – опытные растения табака линии 9; 5 – опытные растения табака линии 12.

8.4.3. Обсуждение результатов

Как и ожидалось, часть трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации, действительно характеризовалась уменьшением размеров органов. В то же время, большинство линий трансгенных растений не отличалось по морфологическим признакам от контроля. Так как у растений, размеры органов которых не изменялись, были увеличены размеры отдельных клеток, то можно предполагать о функционировании в данном случае выявленного нами ранее компенсаторного механизма (см. раздел 7.1), который способствует поддержанию размеров органов в пределах нормы. Например, в случае уменьшения уровня экспрессии гена *AtARGOS* должно уменьшаться количество клеток, приходящихся на один орган

(Hu et al., 2003), однако за счет стимуляции роста клеток растяжением размеры органов сохраняются в пределах нормы (у линий 9, 14 и 17). Однако у линий 3 и 12 размеры клеток были не больше, а даже меньше чем у контроля, именно поэтому размеры органов этих растений оказались меньше, чем в контроле. Ответить на вопрос, почему именно в этих линиях растений не наблюдается компенсаторное увеличение размеров клеток довольно трудно, так как многое о молекулярных механизмах координации клеточного деления и роста клеток растяжением остается неизвестным. Можно предположить, что в этих растениях уменьшается уровень экспрессии не только предполагаемого ортолога гена *ARGOS* табака, регулирующего клеточное деление (Hu et al., 2003), но, возможно, и ортолога ген *ARL* табака, который, по крайней мере, в *A. thaliana* отвечает за регуляцию клеточного растяжения (Hu et al., 2006). По нашим данным, сверхэкспрессия гена *AtARL* способствует повышению уровня экспрессии генов экспансинов (см. раздел 8.2.3.). Именно поэтому, нами был проведен анализ уровня экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в исследуемых растениях, экспрессирующих участок гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации. Данный эксперимент показал, что уменьшение размеров органов и клеток у линий трансгенных растений 3 и 12 может быть связан со снижением уровня экспрессии некоторых экспансинов. Кроме того, полученные нами данные позволяют предполагать об участии экспансинов NtEXPA1 и NtEXPA4 в компенсаторном увеличении размеров клеток при уменьшении их количества, приходящегося на один орган из-за снижения уровня экспрессии гена *ARGOS*. Это является дополнительным подтверждением полученных нами ранее данных об участии экспансинов в компенсаторном увеличении размеров клеток в *35S::CLV3* растениях (см. раздел 7.1.2).

8.5. Клонирование и исследование гена *PnARGOS-LIKE* тополя черного

Так как гены белков с OSR-доменом могут быть использованы для получения трансгенных растений с повышенной продуктивностью, актуальным является вопрос поиска и изучения гомологов этих генов в геномах хозяйственно-

ценных растений (Wang et al., 2009a; Wang et al., 2009б; Guo et al., 2014). При этом особый интерес представляют древесные растения ввиду их высокой хозяйственной ценности. Из деревьев полностью секвенирован геном тополя *Populus trichocarpa*, однако, гены, кодирующие белки с OSR-доменом этого растения, пока остаются неизученными. В то же время в умеренной зоне России из тополей наибольшее распространение имеет другой вид этого дерева, а именно тополь черный *Populus nigra.* В связи с этим, основной целью дальнейшей нашей работы являлся поиск гомологов гена *ARGOS* тополя и изучение его роли при регуляции роста органов. В рамках данной работы нами был впервые клонирован гомолог гена *ARGOS P. nigra*, который получил название *PnARGOS-LIKE*. В первую очередь были созданы и проанализированы трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген *PnARGOS-LIKE*. Для получения трансгенных деревьев со сверхэкспрессией гена *PnARGOS-LIKE* была выбрана осина (*Populus tremula* L.), так как из различных видов тополей именно это растение характеризуется наибольшей легкостью обращения в культуре *in vitro*.

8.5.1. Определение филогенетического родства гена *PnARGOS-LIKE*, биоинформационный анализ его предсказанной аминокислотной последовательности и промоторной области

Исходя из предположения, что сходные по нуклеотидному составу гены могут выполнять одинаковые функции при регуляции роста и развития растений, нами при помощи программы MegAlign 7.1.0 (DNASTAR, США) был проведен филогенетический анализ 12 предполагаемых ортологов гена *PnARGOS-LIKE* некоторых представителей цветковых. Выравнивание нуклеотидных последовательностей было проведено методом CLUSTAL W. Наибольшей схожестью с геном *PnARGOS-LIKE* характеризовались гены *ARGOS-LIKE P. trichocarpa* (XM_006372243.1), *V. vinifera* (AM475052.1), *R. communis* (XM_002533293.1), *S. lycopersicum* (NM_001247750.1) и *S. tuberosum* (XM_006342385.1). Гены *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana* расположились на

филогенетическом древе на некотором отдалении от гена *PnARGOS-LIKE* (рис. 71), но все же ближе гена *OsARGOS-LIKE* риса.

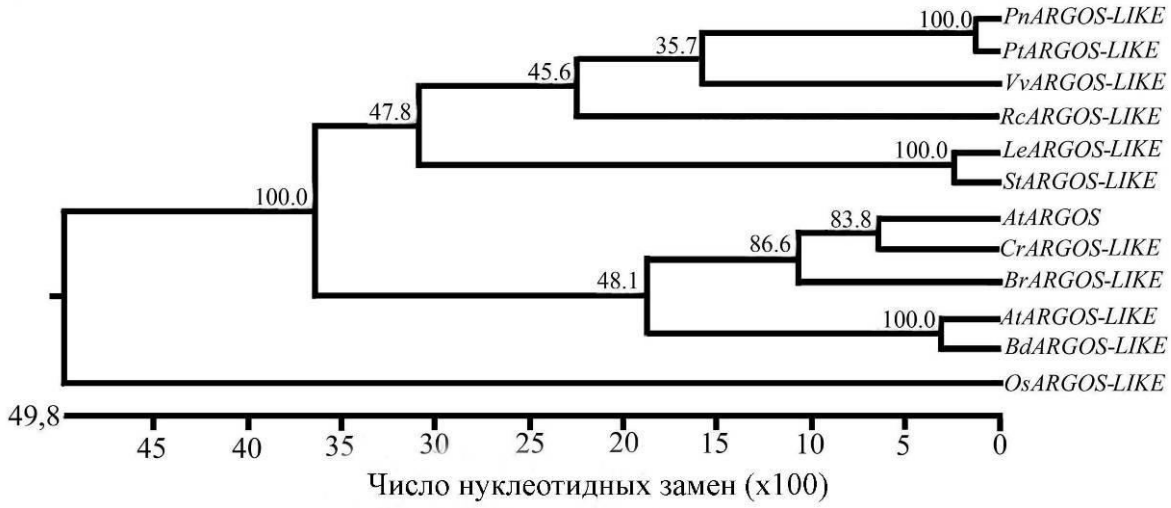


Рис. 71. Филогенетическое древо сходства гена *PnARGOS-LIKE P. nigra* с гомологичными генами некоторых цветковых растений, построенное при помощи программы MegAlign с бутстреп-поддержкой (Bootstrap trials=1000, seed=111). *PtARGOS* – ген *P. trichocarpa, VvARGOS-LIKE* – ген *V. vinifera, RcARGOS-LIKE* – ген *R. communis, LeARGOS-LIKE* – ген *S. lycopersicum, StARGOS-LIKE* – ген *S. tuberosum*, *CrARGOS-LIKE* – ген *Capsella rubella*, *BdARGOS-LIKE* – ген *B. divaricarpa, OsARGOS-LIKE* - ген *O. sativa.*

Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей белковых продуктов гомологов *PnARGOS-LIKE* показало, что этот ген наиболее близок к гену *PtARGOS-LIKE P. trichocarpa* (рис. 72). Между белками *PnARGOS-LIKE* и *PtARGOS-LIKE* было обнаружено лишь 7 замен аминокислот: лизина на аргинин в 7-м положении, аланина на серин в 15-м положении, треонина на аланин 19-м положении, глутаминовой кислоты на лизин в 23-м положении, валина на лейцин в 88-м положении, тирозина на метионин в 106-м положении, валина на цистеин в 107-м положении (рис. 72).



Рис. 72. Результаты выравнивания предсказанных аминокислотных последовательностей белковых молекул гомологов гена *PnARGOS-LIKE*. Серым выделены предполагаемые трансмембранные домены. Звездочками отмечены выявленные между белками PnARGOS-LIKE и PtARGOS-LIKE замены аминокислот.

Далее нами был проведен анализ предсказанной белковой молекулы PnARGOS-LIKE с использованием программ сервера I-TASSER на основе которых можно определять предполагаемую структуру и функции белковых молекул (Roy et al., 2010). Было показано, что белок PnARGOS-LIKE содержит три предполагаемые α-спирали (рис. 73а, г), остальная часть белковой молекулы главным образом состоит из так называемых «random coils» (рис. 73а). Часть белковой молекулы от 40 до 96 положения состоит, главным образом, из гидрофобных аминокислот (рис. 73б), что может свидетельствовать о трансмембранном расположении этой области (Cserzo et al., 1997). При помощи программы DAS (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS) был проведен поиск потенциальных трансмембранных доменов в исследуемом белке, причем таковых в PnARGOS-LIKE оказалось два, которые располагаются от 47-й до 70-й аминокислоты и от 76-й до 95-й аминокислоты (рис. 73в). Предполагаемая вторичная структура белка PnARGOS-LIKE показана на рисунке 73г. Основываясь на результатах анализа предсказанной вторичной структуры белка, можно предположить, что две α-спирали занимают трансмембранное положение

(Stangl, Schneider, 2015), тогда как третья короткая α-спираль располагается вне мембраны (рис. 73г).

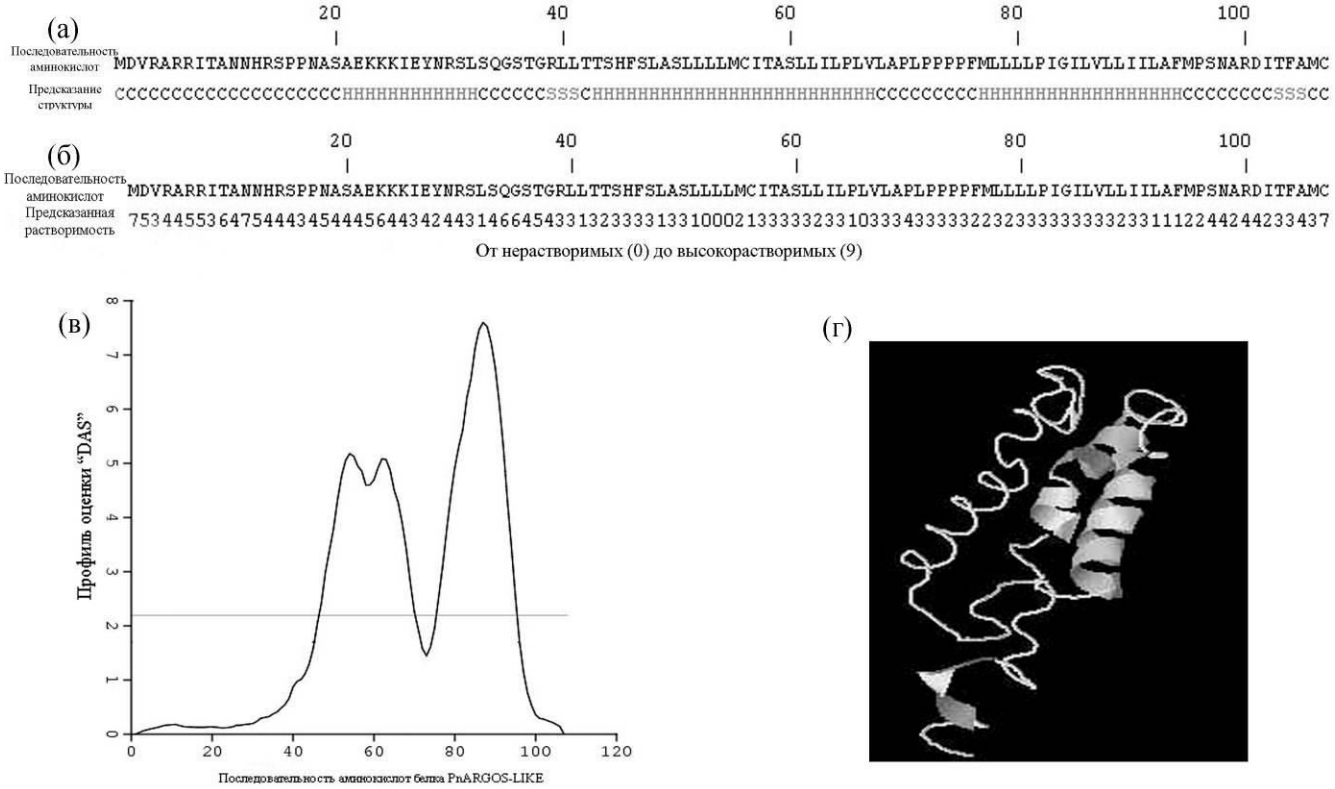


Рис. 73. Биоинформационный анализ предполагаемой белковой молекулы PnARGOS-LIKE: а – предсказание структуры белка при помощи программ ресурса I-TASSER, где C – «random coils»; H – α-спирали; S – β-цепи); б – предсказание растворимости аминокислотных остатков, где 0 – нерастворимые аминокислотные остатки, 9 – наиболее растворимые аминокислотные остатки; в – поиск трансмембранных доменов при помощи программы DAS (пики на графике означают высокую вероятность трансмембранной локализации двух участков белковой молекулы); г – один из вариантов предсказанной вторичной структуры белка PnARGOS-LIKE построенная при помощи программ ресурса I-TASSER.

Так как трансмембранные домены всех гомологов белка ARGOS высококонсервативны, можно предположить, что основой их функциональных различий, которые выявлены на примере *A. thaliana* (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006) является разнообразие N-концов данной группы белков. Поэтому нами было проведено выравнивание коротких 5'-участков открытых рамок считывания

анализируемых генов размером 150 пн. По результатам выравнивания ген *PnARGOS-LIKE* оказался ближе к гену *AtARL*, чем к гену *AtARGOS* (рис. 74). Исходя из этих данных, можно предположить, что по выполняемым функциям продукт гена *PnARGOS-LIKE* может оказаться ближе к белку AtARL *A. thaliana*, чем к AtARGOS.

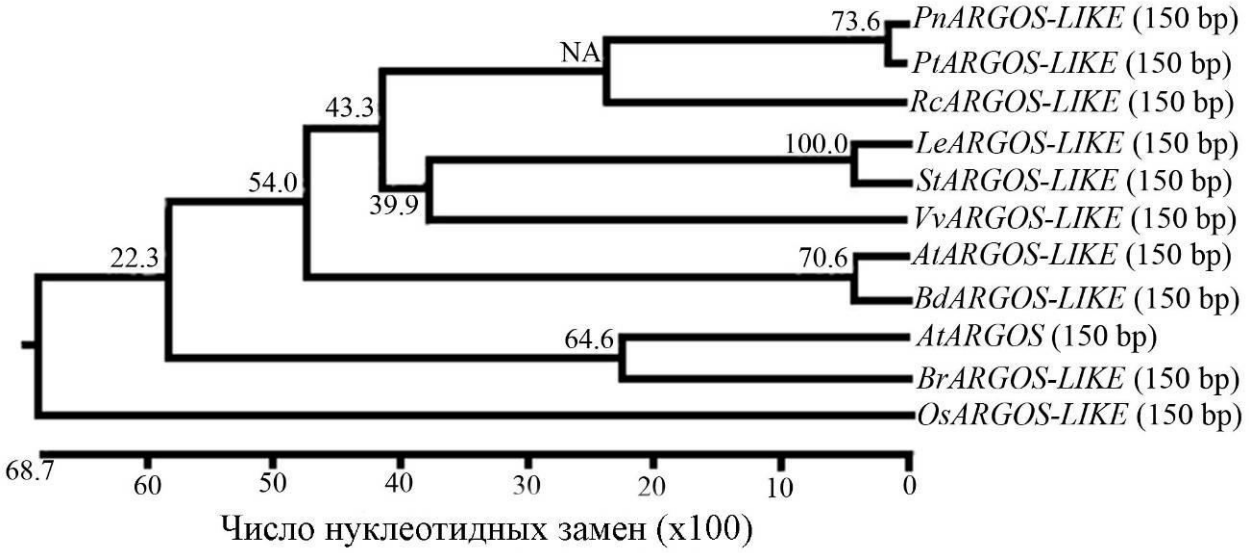


Рис. 74. Результаты филогенетического анализа 5'-концов гомологов гена *PnARGOS-LIKE* размером 150 пн. Представлено древо сходства нуклеотидных последовательностей, построенное при помощи программы Megalign с бутстреп-поддержкой (Bootstrap trials=1000, seed=111).

При исследовании функций гомологов гена *ARGOS* может оказаться полезным поиск цис-регуляторных элементов в предполагаемых промоторных участках (Feng et al., 2011). Однако на данный момент геном тополя черного не секвенирован. Поэтому нами был проведен анализ предполагаемого промоторного участка гена *PtARGOS-LIKE P. trichocarpa* размером 2 kb. Используя базу данных AtcisDB, созданную для *A. thaliana* (http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB) в анализируемом участке ДНК были обнаружены четыре GATA мотива, и по одному - G-box, I-box и ABRE-like мотива (рис. 75). Можно предположить, что в промоторе гена *PtARGOS-LIKE P.*

trichocarpa могло быть обнаружено больше цис-регуляторных элементов, если бы соответствующие базы данных были созданы и для тополя.

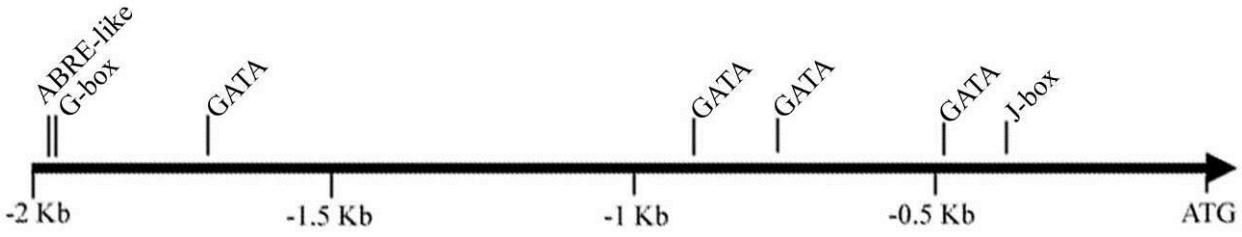


Рис. 75. Результаты поиска цис-регуляторных элементов предполагаемого промоторного участка гена *PtARGOS-LIKE* размером 2 kb.

8.5.2. Оценка содержания мРНК гена *PtrARGOS-LIKE* в различных органах осины и под действием экзогенных фитогормонов и NaCl

Так как в качестве модельного объекта в данном исследовании использовалась осина, для анализа профиля экспрессии гена *ARGOS-LIKE* тополя была использована культура *in vitro* этого дерева, а анализируемый ген получил название *PtrARGOS-LIKE* (от *P. tremula*). Праймеры, подобранные к нуклеотидной последовательности гена *PtARGOS-LIKE P. trichocarpa* (табл. 1) подошли и для ОТ-ПЦР анализа гена *PtrARGOS-LIKE.* Наиболее высокий уровень содержания мРНК гена *PtrARGOS-LIKE* нами был обнаружен в верхушках побегов, содержащих зачатки листьев и два наиболее молодых листочка (рис. 76а). Также высокий уровень экспрессии гена обнаруживался в молодых, интенсивно растущих листьях осины (рис. 76а). В завершивших рост зрелых листьях ген *PtrARGOS-LIKE* также экспрессировался, однако на более низком уровне, чем в молодых листьях. В то же время в каллусе содержание транскриптов гена *PtrARGOS-LIKE* было в 4 раза больше, чем в верхушках побегов (рис. 76а). Таким образом, нами было показано, что экспрессия гена *PtrARGOS-LIKE* ассоциирована с высоким уровнем клеточного деления и клеточного растяжения.

Исходя из того, что в регуляции роста и развития растений ключевую роль играют фитогормоны, мы провели исследование изменения содержания мРНК гена *PtrARGOS-LIKE* в ответ на экзогенную обработку различными

фитогормонами верхушек побегов и молодых листьев, так как именно в этих частях осины был наиболее высок уровень экспрессии изучаемого гена. В верхушках побегов содержание транскриптов гена *PtrARGOS-LIKE* существенно повышалось в ответ на 1-нафтилуксусную кислоту (рис. 76б). При этом уровень экспрессии исследуемого гена повышался в 6,2 раза по сравнению с контролем. Также уровень экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE* в верхушках побегов немного повышался под влиянием 6-бензиламинопурина. При этом в молодых листьях данный фитогормон не оказывал существенного влияния на уровень экспрессии *PtrARGOS-LIKE* (рис. 76в). В молодых листьях ауксин способствовал увеличению уровня содержания транскриптов *PtrARGOS-LIKE* в 2,4 раза. Интересно отметить, что в молодых листьях на уровень экспрессии гена положительное влияние оказывал также 24-эпибрассинолид (рис. 76в).

Белок ARGOS-LIKE является представителем небольшого семейства белков с OSR-доменом, участвующих в регуляции клеточного деления и роста клеток растяжением (Feng et al., 2011). В литературе обсуждается возможность вовлечения механизмов регуляции клеточного деления и клеточного растяжения в ответ на стрессовые факторы, вызывающие дефицит влаги (Huang et al., 2008; Choi et al., 2011; Han et al., 2012). К одним из наиболее распространенных стрессовых факторов относится засоление. Повышенное содержание соли в почве приводит к резкому снижению продуктивности растений (Кошкин, 2010) и таким образом может отрицательно влиять на размеры органов. Из данных NCBI GEO известно, что воздействие соли может способствовать повышению уровня экспрессии генов *AtARGOS* и *AtARL* (GDS3918/251436_at/ARGOS; GDS3927/267230_at/ARL) в *A. thaliana*. Поэтому представляло большой интерес исследование уровня экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE* под воздействием соли. В данной работе для исследования возможного участия гена *PtrARGOS-LIKE* в ответе на засоление мы поливали осины различными концентрациями NaCl и выдерживали их в течение 6 часов или 24 часов. Однако зафиксировать повышение уровня экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE* при воздействии соли нам не удалось. Уровень экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE* начинал снижаться уже через 6

часов инкубации в 570 мМ NaCl. Через 24 часа действия соли содержание транскриптов гена *PtrARGOS-LIKE* существенно снижалось при инкубации как в 180 мМ, так и в 570 мМ NaCl (рис. 76г).

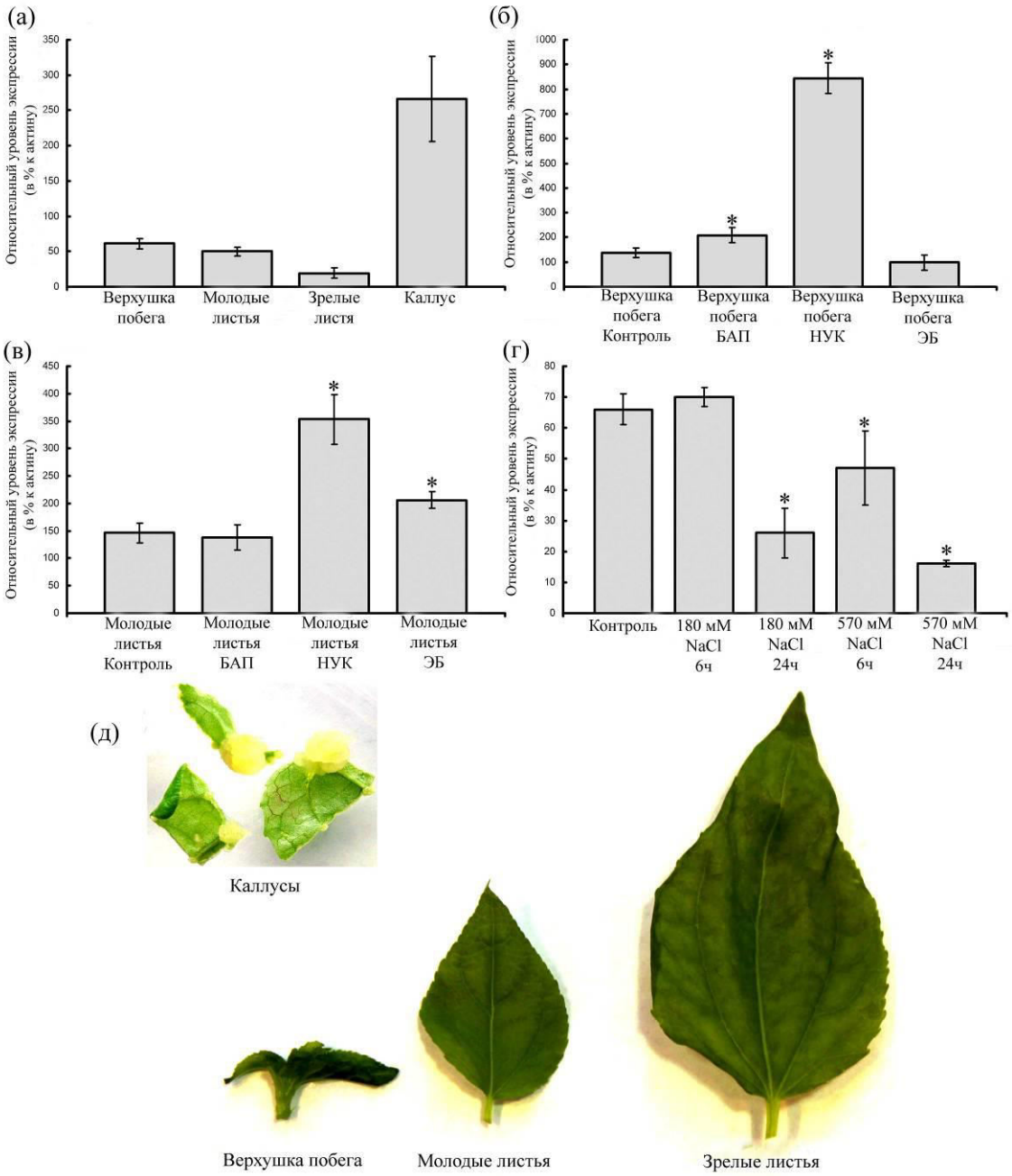


Рис. 76. Анализ уровня экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE* в различных органах осины и под действием экзогенных фитогормонов и NaCl: а - уровень экспрессии исследуемого гена в различных органах без экзогенной обработки; б - уровень экспрессии исследуемого гена в верхушках побегов под воздействием экзогенных фитогормонов; в - уровень экспрессии исследуемого гена в молодых листьях под

воздействием экзогенных фитогормонов; г - уровень экспрессии исследуемого гена в молодых листьях под воздействием NaCl; д – внешний вид органов и тканей осины, использованных в эксперименте по анализу уровня содержания транскриптов гена *PtrARGOS-LIKE.* (n=3; * – $p < 0,05$).

8.5.3. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE*

Нами был клонирован ген *PnARGOS-LIKE* тополя черного в векторе pCambia 1301. Используя полученную генно-инженерную конструкцию были проведены работы по агробактериальной трансформации табака. В итоге были получены 20 линий трансгенных растений, из которых 7 линий (2, 4, 6, 7, 14, 19 и 20), характеризующиеся наличием единичной копии трансгена *PnARGOS-LIKE* в геноме и относительно высоким уровнем его экспрессии (рис. 77а) были отобраны для дальнейшего морфологического анализа. Увеличение длины листьев было характерно для линий 2, 4, 14 и 20 (рис. 77б). Для линий 2, 14 и 20 было показано статистически достоверное увеличение, как длины листьев, так и их площади (рис. 77б, в). Наибольшая степень увеличения размеров листьев была характерна для линии 20, причем у этой линии увеличивались в среднем на 23% как длина, так и площадь листьев. Статистически достоверное увеличение высоты стебля было показано для линий 2, 4 и 20 (рис. 77г). Высота стебля у этих линий в среднем увеличивалась на 13% по сравнению с контролем (рис. 77г). Размеры цветков у опытных растений практически не отличались от контроля (рис. 77д). Размеры органов опытных растений могли увеличиваться как за счет возрастания числа клеток (Hu et al., 2003), так и за счет увеличения размеров отдельных клеток (Hu et al., 2006). Чтобы выяснить возможные механизмы увеличения размеров органов у опытных растений, нами были проведены исследования площади клеток нижнего эпидермиса листьев табака. Было показано, что все линии *35S::PnARGOS-LIKE* растений отличаются от контрольных растений статистически достоверным увеличением площади клеток эпидермиса листьев (рис. 77е, 78). В то же время, как и следовало ожидать, в трансгенных

35S::PnARGOS-LIKE растениях табака уменьшалось количество клеток, приходящихся на единицу площади листа (рис. 77ж). Исходя из литературных и полученных нами данных, мы предполагаем, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* в табаке влияет преимущественно на клеточное растяжение, способствуя, таким образом, пролонгации периода роста листьев (Hu et al., 2006).

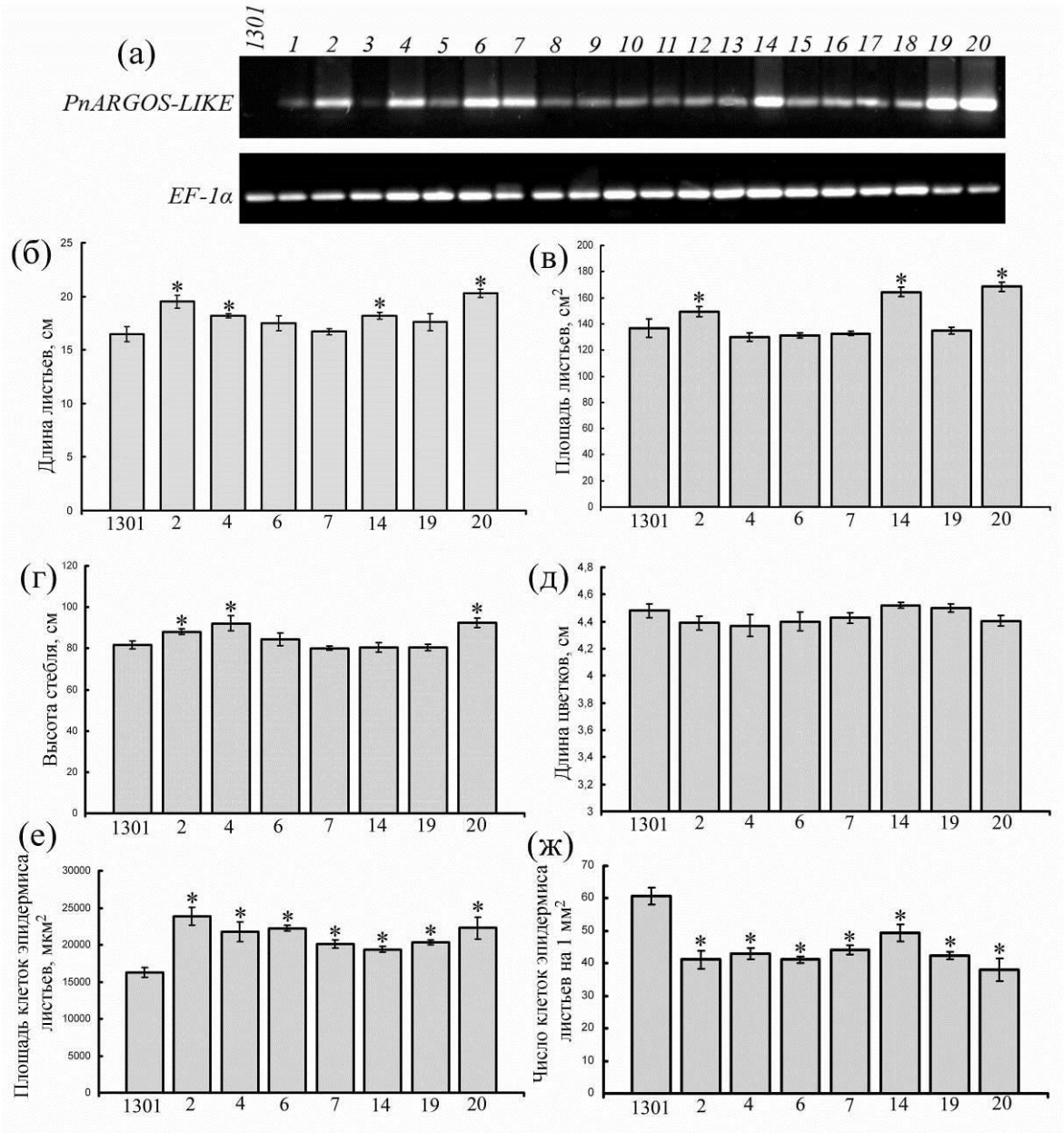
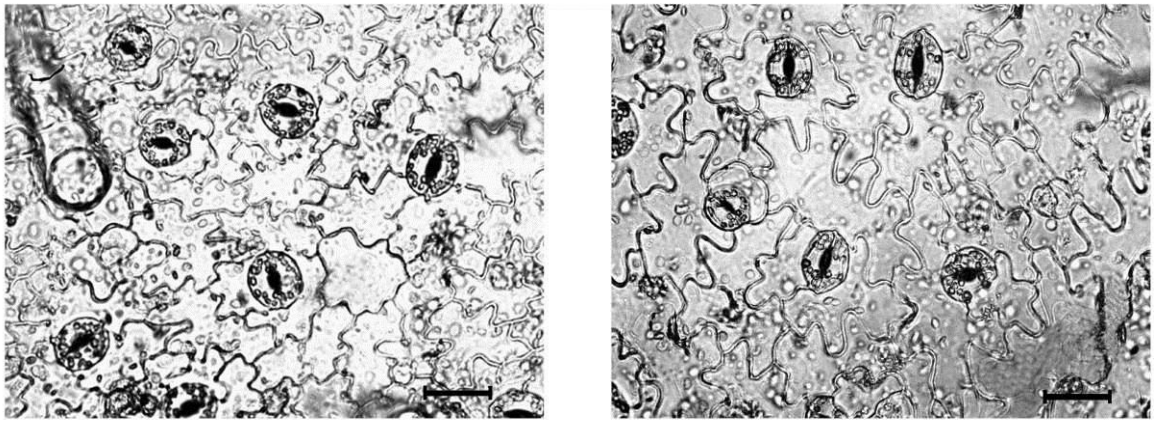


Рис. 77. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE*: а – результаты полуколичественной ОТ-ПЦР гена *PnARGOS-LIKE* в анализируемых растениях табака; б – длина листьев, см; в – площадь листьев, см^2; г – высота стебля, см; д – длина листьев, см; е – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, мкм^2; ж –

число клеток нижнего эпидермиса листьев, приходящихся на 1 мм^2 поверхности листа. (n=5; * – p < 0,05).



Контроль (1301) *35S::PnARGOS-LIKE*

Рис. 78. Сравнение клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных растений и трансгенных по гену *PnARGOS-LIKE* растений табака. Шкала 50 мкм.

Сверхэкспрессия гомологов гена *ARGOS* главным образом оказывает положительное влияние на рост надземных органов (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). Но в литературе имеются сведения о положительном влиянии продукта гена *OsARGOS* риса на рост корней *A. thaliana* (Wang et al., 2009a). Увеличение размеров корня может иметь практическое значение, например, для увеличения засухоустойчивости трансгенных растений (Кошкин, 2010) и как следствие для увеличения размеров органов в стрессовых условиях. В связи с этим, представляло большой интерес изучение влияния сверхэкспрессии гена *PnARGOS-LIKE* на длину корней. Для этого мы провели морфологический анализ 20-ти дневных проростков семи линий *35S::PnARGOS-LIKE* растений табака и контрольных растений. Во всех линиях опытных растений длина корней достоверно не изменялась по сравнению с контрольными растениями (рис. 79а). В то же время для линий 2, 4, 6 и 20 было показано увеличение длины гипокотилей по сравнению с контролем (рис. 79б).

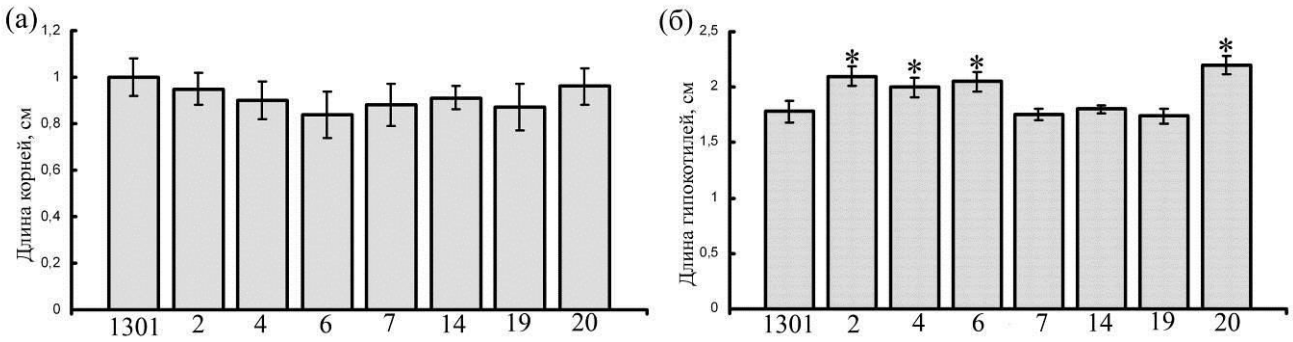


Рис. 79. Морфологический анализ 20-ти дневных проростков табака: а – длина корней, см; б – длина гипокотилей, см. (n=10; * – $p < 0,05$).

8.5.4. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений осины, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE*

В гетерологичной системе табака сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* способствовала увеличению размеров листьев и стебля. Однако при определении функций тех или иных генов более ценными могут оказаться данные полученные в гомологичной системе экспрессии (Wang et al., 2009a). Исходя из этого, нами было решено трансформировать апробированной на табаке конструкцией *35S::PnARGOS-LIKE* один из видов тополей. Так как в культуре *in vitro* из тополей легче всего работать с *P. tremula*, нами было решено получить трансгенные растения осины, сверхэкспрессирующие ген *PnARGOS-LIKE* тополя черного. В первую очередь при помощи *A. rhizogenes* были получены косматые корни осины (рис. 80а), трансгенные формы которых отбирали используя гистохимический метод определения активности β-глюкуронидазы (рис. 80б). Далее на трансгенных косматых корнях появлялись побеги (рис. 80в, г), которые пересаживали на среду МС для укоренения (рис. 80д). Для дальнейшей работы отбирались трансгенные растения осины, не имеющие фенотипа «косматый корень» и характеризующиеся высоким уровнем экспрессии репортерного гена *GUS* (рис. 80е). В результате проведенной работы из косматых корней было получено 28 трансгенных растений осины, растущих в культуре *in vitro*. Из этих растений к условиям почвы удалось акклиматизировать лишь 12 растений, которые выращивались в теплице при искусственном освещении (рис. 81).

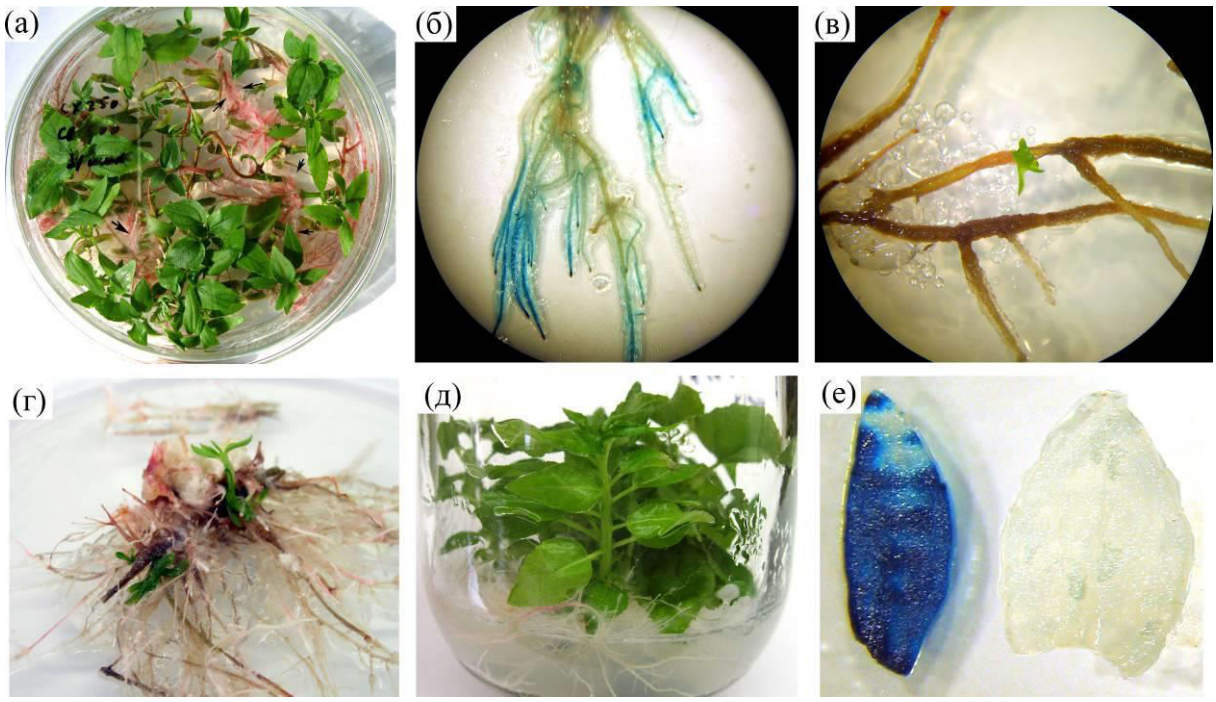


Рис. 80. Получение трансгенных растений осины, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE*: а – получение косматых корней осины; б – гистохимический анализ активности β-глюкуронидазы в косматых корнях; в, г – спонтанное побегообразование на трансгенных косматых корнях осины; д – укоренение трансгенных побегов и их отбор по фенотипу; е – гистохимический анализ активности β-глюкуронидазы в листьях (слева – лист трансгенного растения, справа – нетрансгенного).



Рис. 81. Внешний вид контрольных и трансгенных растений осины. Слева – контрольное растение осины дикого типа. Справа – трансгенное растение осины, с конститутивной экспрессией гена *PnARGOS-LIKE*.

Для дальнейшего морфологического анализа были отобраны 4 типичных трансгенных растения осины, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии гена *PnARGOS-LIKE* (рис. 82а). Другие четыре акклиматизированные трансгенные осины продолжают расти в условиях теплицы до достижения 5-летнего возраста, когда будет проведен очередной морфологический анализ (в 2019 году).

Для трех трансгенных осин из четырех проанализированных было характерно увеличение длины нижних листьев (рис. 82б). Также для двух трансгенных осин было характерно удлинение черешков нижних листьев (рис. 82г). В то же время размеры верхних листьев и их черешков у трансгенных растений существенно не изменялись (рис. 82в, д). В целом по высоте стебля контрольные и трансгенные растения различались мало (рис. 82з). Для всех проанализированных трансгенных растений осины было характерно уменьшение длины междоузлиев как в нижней части побега, так и в верхней его части (рис. 82е, ж). Соответственно у всех четырех проанализированных трансгенных осин было увеличено число листьев, приходящиеся на единицу длины побега (рис. 81, рис. 82и).

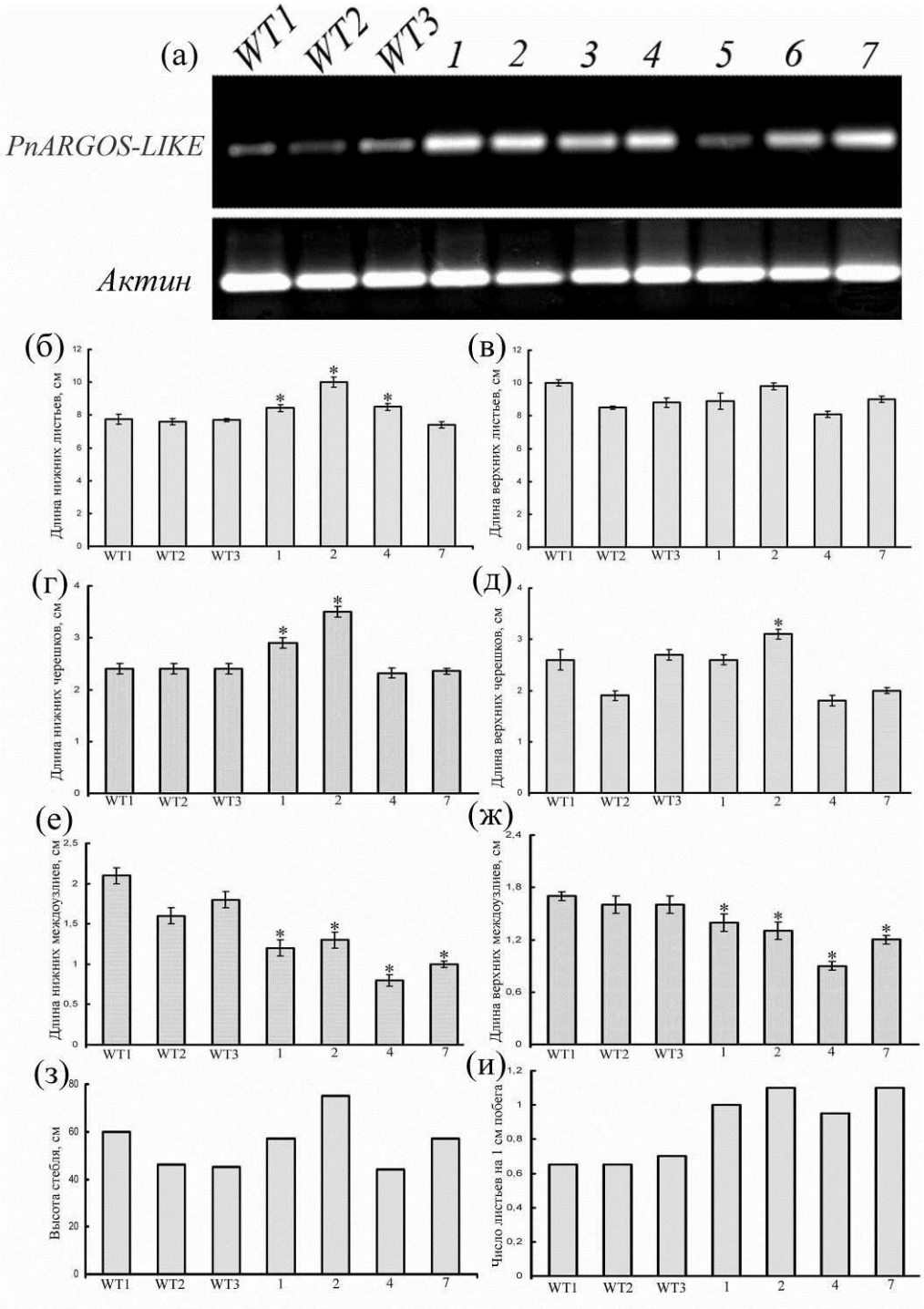


Рис. 82. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений осины, сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE*: а – результаты полуколичественной ОТ-ПЦР гена *PnARGOS-LIKE* в анализируемых растениях осины; б – длина нижних листьев, см; в – длина верхних листьев, см; г – длина нижних черешков, см; д – длина верхних черешков, см; е – длина нижних междоузлиев, см; ж – длина верхних междоузлиев, см; з – высота стебля, см; и –

число листьев, приходящихся на 1 см побега. WT1-WT3 – растения осины дикого типа, 1-7 – трансгенные растения осины. (* – $p < 0,05$).

Так как у трех из четырех проанализированных *35S::PnARGOS-LIKE* растений осины наблюдалось увеличение длины листьев, представлял большой интерес определение размеров клеток в этом органе у всех анализируемых растений осины. Было показано, что, по крайней мере, у двух трансгенных осин с увеличенными размерами листьев наблюдалось достоверное увеличение размеров отдельных клеток эпидермиса листьев (рис. 83). Таким образом, можно предположить, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* в гомологичных условиях также преимущественно оказывает влияние на клеточное растяжение.

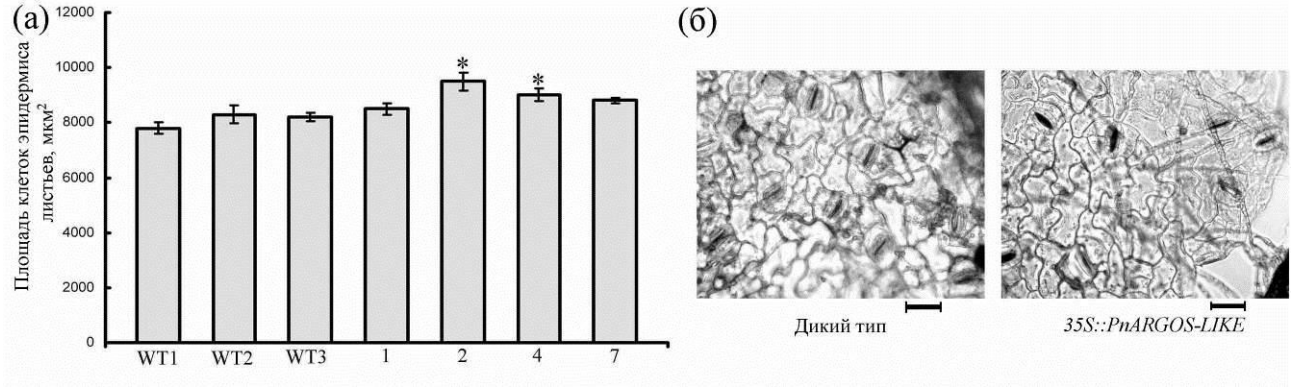


Рис. 83. Результаты анализа размеров клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных и опытных растений осины: а – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, мкм^2; WT1-WT3 – растения осины дикого типа, 1-7 – трансгенные растения осины; б - сравнение клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных растений и трансгенных по гену *PnARGOS-LIKE* растений осины. Шкала 50 мкм. (* – $p < 0,05$).

8.5.5. Обсуждение результатов

В рамках данной работы был впервые идентифицирован ген *PnARGOS-LIKE*, кодирующий один из OSR-белков тополя черного и гомологичный генам *AtARGOS* и *AtARL A. thaliana*. Известно, что предсказанные белки AtARGOS и AtARL выполняют разные функции (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006), поэтому мы предположили, что такие же гомологичные белки со схожими функциями могут

присутствовать и в тополе. Поэтому нами, в первую очередь, были проведены исследования с целью выяснения того, к какому из *OSR*-генов *A. thaliana* наиболее близок ген *PnARGOS-LIKE.* Однако по результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей *OSR*-генов удалось выяснить лишь то, что ген *PnARGOS-LIKE* близок как к гену *AtARGOS,* так и к гену *AtARL.* Это может свидетельствовать о том, что дивергенция функций *OSR*-генов происходила отдельно в каждой группе растений (Feng et al., 2011). Возможно, гены *AtARGOS* и *AtARL* образовались из одного предкового гена лишь в пределах семейства крестоцветных и только в этой группе растений начали выполнять разные функции. В то же время анализ 5'-концов *OSR*-генов показал, что ген *PnARGOS-LIKE* вероятно более близок к гену *AtARL A. thaliana,* хотя эта схожесть может быть связана не только с общностью происхождения, но и с выполнением похожих функций. Анализ предсказанной аминокислотной последовательности PnARGOS-LIKE показал, что в этом белке, как и у гомологов *A. thaliana* имеется два трансмембранных домена, которые высококонсервативны. Причем даже при сравнении неродственных растений в этом участке замены аминокислот не обнаруживаются.

Биоинформационный анализ промоторной области гена *PnARGOS-LIKE* позволил выявить лишь ABRE-like, G-box, GATA и Ibox мотивы. Столь малое количество обнаруженных мотивов связано с тем, что для тополя цис-регулируемые последовательности промоторов остаются практически неизвестными. Поэтому в нашей работе мы использовали лишь данные, полученные для *A. thaliana*. Наличие ABRE-like мотива в промоторе может говорить о вовлеченности белка PnARGOS-LIKE в ответ на абиотические факторы, вызывающие дефицит влаги (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Известно, что дефицит влаги в растениях могут вызвать такие стрессовые факторы как засуха, засоление и холод (Кошкин, 2010). Причем в ответ на воздействие этих стрессовых факторов в растениях повышается содержание АБК. АБК, в свою очередь, стимулирует экспрессию транскрипционных факторов bZIP, которые специфически взаимодействуют с ABRE-like мотивом, регулируя

активность различных генов (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Большинство транскрипционных факторов связанных с G-box мотивом также являются bZIP белками, содержащими домен «лейциновая застежка» (Ishige et al., 1999). Известно, что G-box белки вовлечены в регуляцию экспрессии генов под действием света, гипоксии, АБК (Ishige et al., 1999), метилжасмоната (Figueroa, Browse 2012), соли и засухи (Liu et al., 2014). О возможной вовлеченности гена *PnARGOS-LIKE* в ответ на дефицит влаги говорят также полученные нами экспериментальные данные об изменении уровня его экспрессии под воздействием соли. Судя по данным базы NCBI GEO, соль может способствовать повышению уровня экспрессии как гена *AtARGOS* (GDS3918/251436_at/ARGOS; GDS3927/251436_at/ARGOS), так и гена *AtARL* (GDS3927/267230_at/ARL). Однако нами получены данные лишь о снижении уровня экспрессии гена *PnARGOS-LIKE* под влиянием соли, тогда как повышение уровня экспрессии зафиксировать нам не удалось. Интересно отметить, что сверхэкспрессия *OSR*-гена *ZAR1 Z. mays* способствует увеличению не только урожайности, но и положительно влияет на засухоустойчивость трансгенных растений кукурузы (Guo et al., 2014). Исходя из этих данных, представляет большой интерес продолжение исследований участия *OSR*-генов в регуляции роста растений и размеров органов не только в нормальных условиях, но и при воздействии стрессовых факторов.

GATA транскрипционные факторы имеются как у животных, так и у растений и выполняют довольно широкий круг функций (Teakle et al., 2002). В растениях GATA факторы играют важную роль при регуляции развития, дифференцировки и контроле клеточной пролиферации (Behringer, Schwechheimer, 2015). Ibox мотив и связанные с ним транскрипционные факторы остаются малоизученными, однако известно, что этот мотив связан с генами, экспрессия которых регулируется светом (Giuliano et al., 1988).

Ген *ARGOS-LIKE* тополя преимущественно экспрессируется в молодых растущих органах, в которых высок как уровень клеточного деления, так и клеточного растяжения. В то же время наиболее высокий уровень экспрессии гена

PtrARGOS-LIKE обнаруживался в каллусе. Известно, что каллус состоит из недифференцированных и активно делящихся клеток, то есть каллус растет преимущественно за счет увеличения числа клеток. Однако в каллусе происходит также инициация клеточного растяжения и клетки каллуса определенное время растут до оптимальных размеров (Blackman, Overall, 1995). Поэтому, исходя из наших данных по анализу уровня экспрессии гена *PtrARGOS-LIKE,* можно предполагать, что его белковый продукт ассоциирован как с интенсивными клеточными делениями, так и с начальными стадиями клеточного растяжения.

Нами было показано, что экспрессия гена *ARGOS-LIKE* тополя стимулируется, прежде всего, ауксинами. Однако в наиболее молодых листьях, где высок уровень клеточных делений, на экспрессию гена положительное влияние оказывал также БАП. А в органах старшего возраста, а именно в листьях, преимущественно растущих за счет клеточного растяжения, нами было показано увеличение уровня экспрессии гена *ARGOS-LIKE* тополя под влиянием ЭБ. Таким образом, можно сделать вывод, что экспрессия гена *ARGOS-LIKE* тополя контролируется цитокининами, ауксинами и брассиностероидами, что делает его более схожим с геном *AtARL A. thaliana* (табл. 9). Хорошо известно, что цитокинины, ауксины и брассиностероиды участвуют в регуляции как клеточного деления, так и клеточного растяжения (Tsukaya, Beemster 2006). Причем эти фитогормоны по-разному действуют на экспрессию *OSR*-генов (Feng et al., 2011). Однако, исходя из наших данных, следует, что чувствительность *OSR*-генов к тому или иному фитогормону может также зависеть и от возраста органа. В целом, исходя из результатов наших исследований, данных ресурса NCBI GEO и литературных данных мы предполагаем, что по особенностям регуляции экспрессии ген *ARGOS-LIKE* тополя ближе к гену *AtARL A. thaliana*, чем к генам *AtARGOS* и *OSR1* (таблица 9).

Таблица 9. Сравнение особенностей регуляции экспрессии *OSR*-генов *AtARGOS*, *AtARL*, *OSR1 A. thaliana* с геном *ARGOS-LIKE* тополя и осины (*PtrARL/PtARL*) под влиянием различных фитогормонов

Ген	Цитокинины	Ауксины	Брассиностероиды	Гиббереллины	АБК	Этилен
AtARGOS	Увеличение (Hu et al., 2006)	1. Увеличение (Hu et al., 2003) 2. Увеличение (GDS672/251436_at/ARGOS) 3. AuxRE мотив	1. Нет влияния (Hu et al., 2006) 2. Увеличение (GDS743/251436_at/ARGOS)	1. Нет влияния (Hu et al., 2006) 2. GARE мотив	1. Нет влияния (Hu et al., 2006) 2. Уменьшение (GDS1723/251436_at/ARGOS) 3. ABRE-like мотив	1. Нет влияния (Hu et al., 2006) 2. Увеличение (GDS414/251436_at/ARGOS) 3. ERE мотив
AtARL	Увеличение (Hu et al., 2006)	1. Увеличение (Hu et al., 2006) 2. Увеличение (GDS668/267230_at/ARL) 3. Уменьшение (GDS744/267230_at/ARL) 4. Нет AuxRE мотива	1. Увеличение (Hu et al., 2006) 2. Нет влияния (GDS743/267230_at/ARL)	1. Уменьшение (Hu et al., 2006) 2. GARE мотив	1. Уменьшение (Hu et al., 2006) 2. Уменьшение (GDS1723/267230_at/ARL) 3. ABRE-like мотив	1. Нет влияния (Hu et al., 2006) 2. Увеличение (GDS414/267230_at/ARL) 3. Нет ERE мотива
OSR1	Нет влияния (Feng et al., 2011)	1. Нет влияния (Feng et al., 2011) 2. Нет AuxRE мотива	Уменьшение (Feng et al., 2011)	1. Нет влияния (Feng et al., 2011) 2. GARE мотив	1. Уменьшение (Feng et al., 2011) 2. ABRE-like мотив	1. Увеличение (Feng et al., 2011) 2. ERE мотив
PtrARL/ PtARL	Увеличение	1. Увеличение 2. Нет AuxRE мотива	Увеличение	1. Неизвестно 2. Нет GARE мотива	1. Неизвестно 2. ABRE-like мотив	1. Неизвестно 2. Нет ERE мотива

У трансгенных растений табака сверхэкспрессирующих ген *PnARGOS-LIKE* увеличивались размеры листьев и стебля, тогда как размеры цветков оставались в пределах нормы. В то же время для *A. thaliana*, при сверхэкспрессии *OSR*-генов было характерно также увеличение размеров цветков (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011). Возможно, это связано с тем, что у табака размеры цветков находятся под более жестким генетическим контролем, повлиять на который гораздо сложнее, чем у *A. thaliana.*

Экспрессия некоторых *OSR*-генов обнаруживается в корнях (Qin et al., 2014), более того, сверхэкспрессия *OSR*-генов может оказывать положительное влияние на рост корней (Wang et al., 2009a; Qin et al., 2014). Однако судя по нашим данным, сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* не оказывала существенного влияния на длину корней, что сходно с данными, полученными для генов *AtARGOS* и *AtARL* (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). В гомологичных условиях ген *PnARGOS-LIKE* способствовал увеличению размеров листьев и черешков, однако длина стебля при этом не увеличивалась. Таким образом, можно предполагать, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* в тополе участвует, прежде всего, в регуляции роста листьев и черешков.

OSR-гены контролируют рост растений через влияние на клеточное деление и клеточное растяжение (Feng et al., 2011). Некоторые *OSR*-гены могут одновременно влиять на клеточное деление и растяжение (Wang et al., 2009a; Feng et al., 2011), тогда как другие избирательно влияют только на один из этих процессов (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Qin et al., 2014). Сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* способствовала увеличению размеров клеток эпидермиса листьев, как в табаке, так и в осине. Поэтому мы предполагаем, что ген *PnARGOS-LIKE* участвует, прежде всего, в регуляции клеточного растяжения. Учитывая, что уровень экспрессии исследуемого гена наиболее высок в каллусе, можно предполагать, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* участвует в регуляции начальных стадий клеточного растяжения. С другой стороны в трансгенных растениях осины было зафиксировано увеличение длины зрелых нижних листьев и черешков, которые прекратили свой рост. В то же время по размерам верхних интенсивно

растущих листьев трансгенные и контрольные деревья не отличались. Вероятнее всего это связано с тем, что продукт исследуемого гена повышает не скорость клеточного растяжения, а способствует его пролонгации, также как и продукт гена *AtARL* (Hu et al., 2006). Судя по всему, пролонгация клеточного растяжения при этом достигается за счет более длительного поддержания высокого уровня экспрессии целевого гена под контролем конститутивного 35S промотора.

Сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* способствовала уменьшению длины междоузлиев, то есть приводила к увеличению числа листьев, приходящихся на единицу длины стебля. Это означает, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* каким-то образом оказывает влияние на частоту закладки новых листовых зачатков. Известно, что инициацию зачатков листьев можно вызвать, помещая на поверхность верхушки побега бусинки сефакрила, содержащего экспансин гипокотилей огурца (Fleming et al., 1997). Это означает, что новые листовые зачатки появляются в тех участках, где происходит локальное ослабление клеточных стенок, которое может обеспечиваться не только экспансинами, но и ксилоглюканэндотрансгликозилазами (Miedes et al., 2010). В литературе имеются сведения о том, что сверхэкспрессия гомологов гена *ARGOS* может стимулировать экспрессию как экспансинов (Wang et al., 2009a), так и ксилоглюканэндотрансгликозилаз (Hu et al., 2006). В связи с этим, можно предполагать, что сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* также стимулирует экспрессию каких-то белков, обеспечивающих ослабление клеточной стенки. Однако для выяснения молекулярных механизмов передачи сигнала от фитогормонов через OSR-белки к экспансинам и ксилоглюканэндотрансгликозилазам, требуются дополнительные исследования.

В целом полученные нами данные указывают на важность продукта гена *PnARGOS-LIKE* в регуляции инициации зачатков листьев и роста листьев через контроль роста клеток растяжением.

8.6. Создание трансгенного рапса, сверхэкспрессирующего ген *AtARL* методом погружения цветков

Конститутивная экспрессия *OSR*-генов способствовала увеличению размеров органов у модельных трансгенных растений табака. Поэтому представляло большой интерес возможность испытания созданных нами и апробированных на табаке генно-инженерных конструкций на растениях, имеющих хозяйственное значение. Исходя из данных литературы следует, что *OSR*-гены могут быть использованы и в прикладных целях, для увеличения размеров надземных органов хозяйственно-ценных растений (Wang et al., 2009b; Guo et al., 2014).

Одним из перспективных для России культур, у которой используется вся надземная часть, является рапс. 25 из 32 одобренных к коммерческому возделыванию биотехнологических сортов рапса имеют устойчивость к гербицидам (James, 2014), что, в связи с быстрым формированием резистентности у сорных растений, позволяет повысить урожайность лишь в краткосрочной перспективе. В связи с этим становится все более актуальным поиск новых альтернативных подходов для повышения продуктивности рапса за счет его собственных внутренних ресурсов или привнесения различных трансгенов, которые могут оказывать влияние на параметры роста (Liu et al., 2015). Поэтому получение трансгенных растений рапса с увеличенными размерами стебля и листьев представляются весьма актуальными. Большинство работ с *OSR*-генами были проведены на модельном объекте *A. thaliana* (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006; Feng et al., 2011; Qin et al., 2014). В литературе имеются сведения о работах, проведенных на рисе (Wang et al., 2009b) и кукурузе (Guo et al., 2014). Однако фенотипические проявления повышенной экспрессии генов данной группы на примере рапса никогда не изучались, тогда как именно для этой культуры увеличение размеров листьев, стебля, цветков, плодов и семян особенно актуально, поскольку вся его надземная часть находит то или иное применение в различных отраслях промышленности. Судя по нашим данным, по морфологическому анализу трансгенных растений табака следовало, что наиболее существенно размеры органов опытных растений табака увеличиваются при

использовании генов *AtARGOS* и *AtARL* при сочетании с промотором ВМГ. Однако при использовании *AtARL* в качестве трансгена удалось получить гораздо больше линий трансгенных растений табака, чем при использовании гена *AtARGOS*. Таким образом, использование гена *AtARL* выглядело более предпочтительным для получения трансгенных хозяйственно-ценных растений. Исходя из вышесказанного, нами была поставлена задача получения трансгенных растений рапса, сверхэкспрессирующих ген *AtARL* под контролем промотора ВМГ.

На сегодняшний день наиболее распространённым методом получения трансгенного рапса является агробактериальная трансформация семядольных черешков (Moloney et al., 1989; Князев и др., 2010), и гипокотилей (Cardoza et al., 2003; Cardoza et al., 2006). Хотя за более чем десять лет использования данного метода частоту трансформации удалось повысить до 25%, он остаётся довольно сложным и ресурсоёмким из-за необходимости работы в культуре *in vitro*. Альтернативой является так называемый метод погружения цветков рапса в агробактериальную суспензию, осуществляемый *in vivo* (Wang et al., 2003). Этот метод был предложен как более экономичный и обеспечивающий большую производительность и впервые был применён ранее для получения трансгенного *A. thaliana* (Clough, Bent, 1998). Позднее метод стал применяться также для других растений, в том числе и рапса. Несмотря на частоту трансформации рапса на уровне всего лишь 2-3% (Li et al., 2010), отсутствие необходимости манипуляций в культуре *in vitro* позволяет получить больше трансгенных растений в более короткие сроки (Verma et al., 2008).

В рамках данной работы нами была проведена агробактериальная трансформация ярового рапса сортов «Hanna» и «Ратник» конструкцией гена *AtARL A. thaliana*, находящегося в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем конститутивного промотора ВМГ.

8.6.1. Получение трансгенных растений рапса методом погружения цветков и отбор предполагаемых трансгенных форм по фенотипу

Для трансформации рапс выращивали в условиях теплицы до стадии бутонизации и проводили агробактериальную трансформацию бутонов методом погружения. Затем растения доводили до стадии созревания семян, далее семена рапса собирали, сушили и через 5 месяцев периода покоя обрабатывали их селективным антибиотиком гигромицином в течение суток (см. раздел 4.38). Затем семена рапса проращивали в условиях почвы в климатокамере, а также при естественном освещении в теплице. Полностью зелёными оставались 10-15% проростков, содержащихся при искусственном освещении (рис. 84). Из них было отобрано для дальнейших экспериментов 66 растений сорта «Ратник» и 25 растений сорта «Hanna». У проростков в теплице изменений в цвете листьев практически не наблюдалось, что существенно усложняло отбор трансгенных форм. Здесь приходилось удалять наиболее плохо растущие проростки. Отобранные по зеленому цвету первых листьев растения в дальнейшем подвергались ПЦР-анализу.

Оказавшиеся трансгенными проростки сорта «Hanna» пересаживали в пятилитровые ёмкости и выращивали в условиях искусственного освещения (27°С, с освещенностью 140 ммоль на кв.м в сек и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота)) до стадии созревания семян. Трансгенные проростки сорта «Ратник» пересаживали в теплицу во второй неделе мая, поскольку предварительные опыты показали, что данный сорт не зацветает в тех же условиях искусственного освещения, применяемых нами для сорта «Hanna».

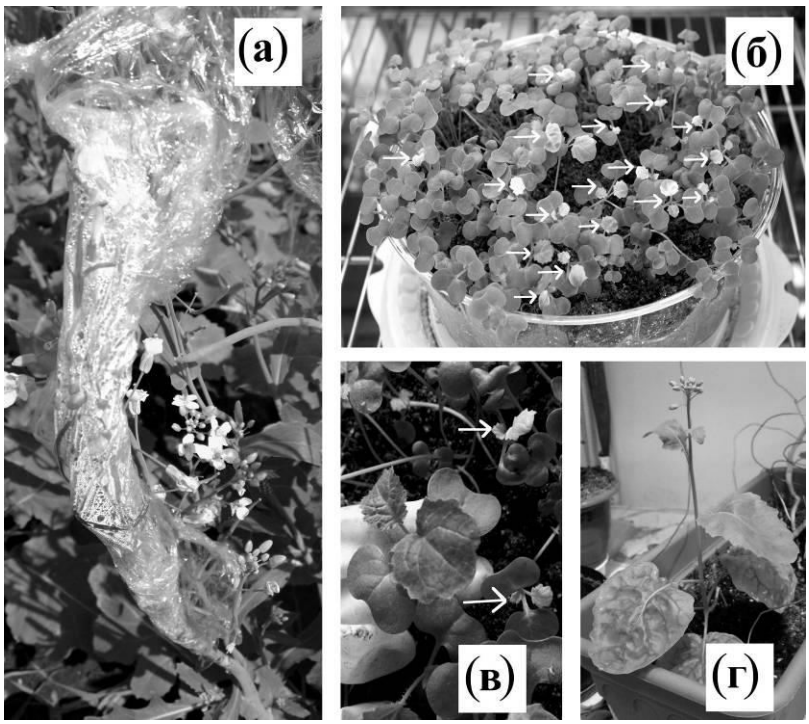


Рис. 84. Трансформация рапса методом погружения цветков: а - соцветие после инокуляции в агробактериальной суспензии; б, в - побеления первых настоящих листьев у нетрансгенных растений (показаны белыми стрелками); г - цветение трансгенного рапса сорта «Hanna» в условиях искусственного освещения.

8.6.2. Отбор трансгенных растений рапса методом ПЦР-анализа

Дальнейший отбор трансгенных растений проводили путем ПЦР-идентификации целевого гена *AtARL* и 35S промотора (данный промотор в Т-ДНК контролирует экспрессию гена гигромицинфосфотрансферазы). В контрольных нетрансгенных растениях рапса специфичные ампликоны при ПЦР не образовывались. Методом ПЦР в целом было проанализировано ДНК 115 растений отобранных по фенотипу на первом этапе работы: 90 растений сорта «Ратник» (из них 66 проращивались при искусственном освещении, а 24 — в теплице при естественном освещении) и 25 растений сорта «Hanna» (рис. 85). По причине сложности визуального отбора, из 24 растений, выращенных при естественном освещении, только 3 оказались трансгенными. Из всех проростков, полученных при искусственном освещении, трансгенными оказались 59 растений сорта «Ратник» и 20 сорта «Hanna». Таким образом, в условиях искусственного

освещения точность визуального выявления трансгенных проростков среди всходов рапса по цвету первых листьев составила более 80%, а при высаживании семян в открытый грунт точность снизилась до 13%. Всего с применением генно-инженерной конструкции гена *AtARL* с промотором ВМГ было получено 82 трансгенных растения, отобранных на первом этапе по фенотипу и на втором этапе путем ПЦР-идентификации целевого гена и 35S промотора.

После начала цветения трансгенные и контрольные растения подвергались морфологическому анализу.

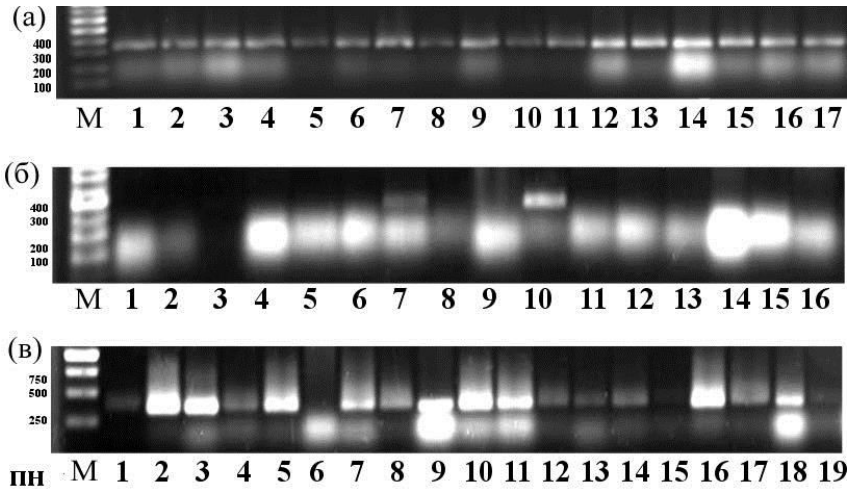


Рис. 85. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа (М - маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия)): а - 35S промотор (450 пн) в отобранных визуально растениях рапса, выращенных в условиях искусственного освещения; б - ген *AtARL* (386 пн) в отобранных визуально растениях рапса, выращенных в условиях естественного освещения; с – ПЦР-идентификация гена *AtARL* размером 386 пн в отобранных визуально растениях рапса, выращенных в условиях искусственного освещения.

8.6.3. Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген *AtARL A. thaliana*

Для морфологического анализа были выбраны растения сорта «Ратник» с относительно высоким уровнем экспрессии целевого гена *AtARL* (рис. 86), высаженные рассадой в теплице и доведённые до цветения и образования семян. В качестве контрольных, были использованы нетрансгенные растения рапса того

же сорта. Всего морфологическому анализу было подвергнуто 30 трансгенных растений сорта «Ратник». Сорт «Hanna» для морфологического анализа не использовался.

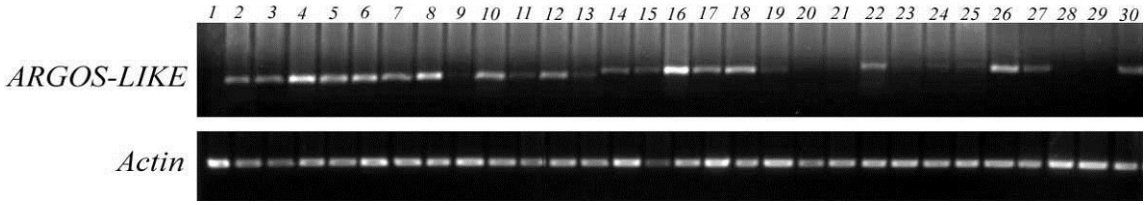


Рис. 86. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ уровня транскрипции целевого гена *AtARL* в трансгенных растениях сорта «Ратник»: 1 – контрольное нетрансгенное растение рапса сорта «Ратник»; 2-30 – трансгенные растения рапса, содержащие в геноме ген *AtARL A. thaliana.* 2-8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 26, 27, 30 – образцы принадлежащие растениям с высоким уровнем экспрессии гетерологичного гена *AtARL* – именно эти растения были отобраны для морфологического анализа.

В целом трансгенные растения рапса характеризовались увеличенными размерами вегетативных органов, в первую очередь, листьев и стебля. В наибольшей степени увеличивалась длина и ширина листьев (рис. 87а, б).

Размеры стебля контрольных растений (в среднем 85,6 см) находились в пределах средних значений для сорта «Ратник» (84-119 см), а у опытных растений были длиннее, чем у контрольных растений, в среднем на 27% (рис. 87в), максимальное же увеличение было характерно для растения №2 и составило 87% по сравнению с контролем. В целом длина стебля у 8 трансгенных растений превышали верхнюю границу нормы для сорта «Ратинк» - 119 см. Размеры листьев коррелировали с длиной стебля: например, в среднем длина листьев увеличивалась на 58%, а ширина листьев - на 40%, но у растений с наиболее длинными стеблями наблюдалось увеличение длины листьев на 125% и двукратное увеличение ширины листьев.

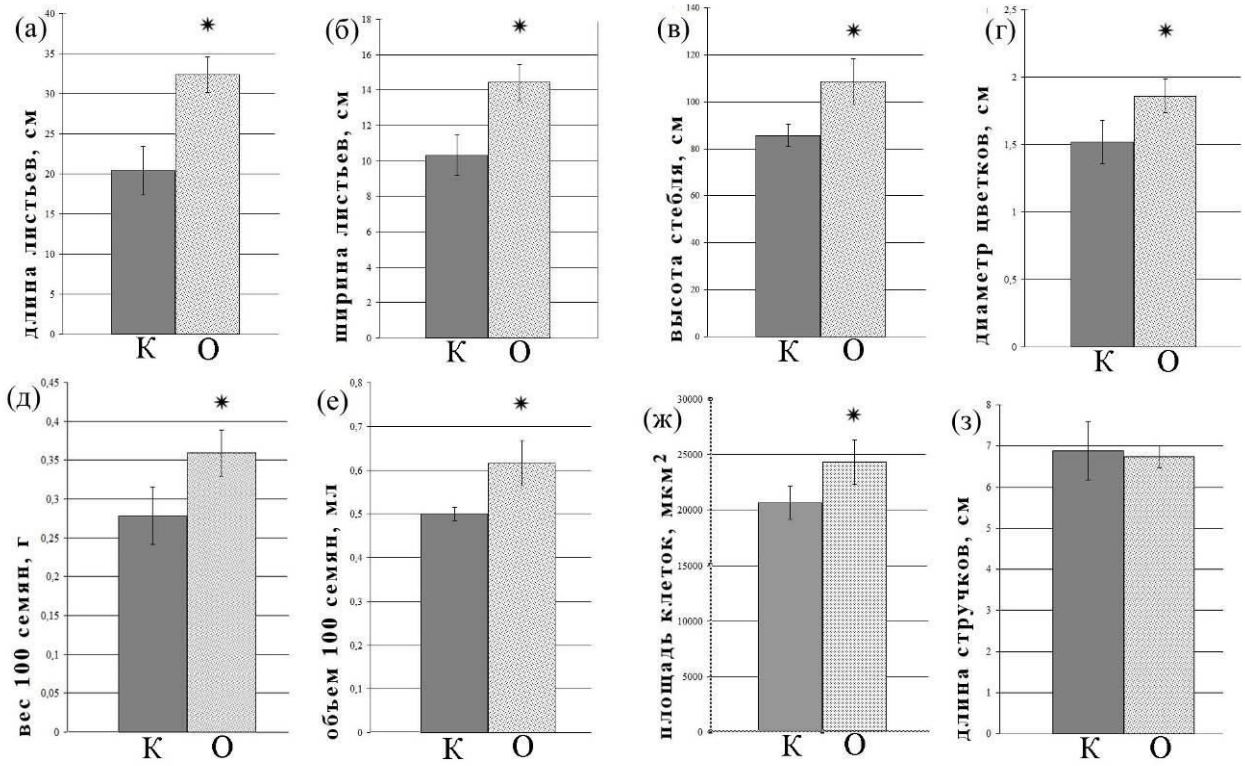


Рис. 87. Морфометрические параметры трансгенных и контрольных растений рапса сорта «Ратник»: а – длина листьев в период цветения; б – ширина листьев в период цветения; в – высота стебля; г – диаметр цветков; д – вес 100 семян; е – объем 100 семян; ж – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев; з – длина стручков. К – контрольные растения, О – опытные растения. (n=30, * – $p < 0,05$).

Для выяснения причины увеличения размеров органов, нами были проведены микроскопические исследования клеток нижнего эпидермиса листьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток (Hu et al., 2006), так и за счет стимулирования клеточного деления (Hu et al., 2003). Было показано, что увеличение размеров вегетативных органов не сопровождалось столь же существенным увеличением площади клеток нижнего эпидермиса листьев. В среднем размеры клеток увеличивались только на 18% (рис. 87ж), тогда как размеры листьев увеличивались более существенно (рис. 87а, б). При этом у растений с крупными размерами клеток (увеличенные на 68% по сравнению с

контролем) не всегда наблюдалось существенное изменение размеров стебля и листьев по сравнению с контролем (рис. 88). Таким образом, увеличение размеров органов у трансгенных растений рапса, вероятно, в большей степени было связано с увеличением количества клеток, однако определенное влияние оказывалось и на размеры клеток.

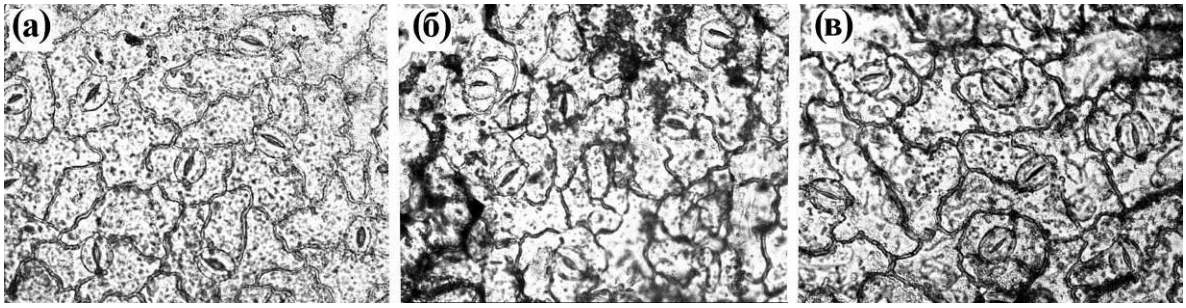


Рис. 88. Клетки нижнего эпидермиса листьев нетрансгенного (а) и трансгенного (б, в) рапса сорта «Ратник»: б – растение, в котором зафиксировано уменьшение размеров клеток; в – растение, в котором зафиксировано увеличение размеров клеток.

У трансгенных растений рапса также было зафиксировано увеличение диаметра венчика цветков, в среднем на 22% (рис. 87г), при этом у растений с наиболее крупными размерами стебля и листьев наблюдалось увеличение диаметра цветков в среднем на 38% (рис. 89).



Рис. 89. Сравнение размеров венчиков цветков рапса сорта «Ратник»: контрольного растения (а) и трансгенного растения №36 (б).

У трансгенных растений возрастали также вес и объем семян. Средний вес 100 семян рапса в зависимости от погодных условий составляет 0,28 ± 0,024 г (Гущина, Лыкова, 2011), что подтверждается для семян нетрансгенного рапса в

нашем исследовании. Средний вес семян трансгенных растений сорта «Ратник» составил 0,359 г, а у растения №18, характеризовавшегося наибольшим размером клеток нижнего эпидермиса листьев, но не отличавшегося увеличением размеров вегетативных органов, составил 0,47 г. Таким образом, конститутивная экспрессия гена *AtARL*, вероятно, может оказывать влияние не только на площадь клеток листьев, но и на размеры семян. В целом, у трансгенных растений рапса наблюдалось увеличение веса семян на 29% (рис. 87д) и их объема на 23% по сравнению с диким типом (рис. 87е). По длине стручков контрольные и трансгенные растения достоверно не различались (рис. 87з).

8.6.4. Обсуждение результатов

Сверхэкспрессия гена *AtARL* в гомологичных условиях способствовала увеличению размеров органов за счет стимуляции роста клеток растяжением (Hu et al., 2003). Конститутивная экспрессия того же гена в трансгенных растениях табака также способствовала увеличению размеров листьев и стебля за счет положительного влияния на рост клеток (см. раздел 8.2.3). В то же время ген *OsARGOS* риса, также кодирующий один из белков с OSR-доменом влияет одновременно как на клеточное деление, так и на рост клеток растяжением (Wang *et al*., 2009a). Причем в гомологичных условиях ген *OsARGOS* вообще не оказывал существенного влияния на размеры органов трансгенного риса. На примере трансгенных растений *A. thaliana* показано, что сверхэкспрессия гена *ARGOS* риса и пекинской капусты увеличивает уровень экспрессии генов, участвующих как в делении клеток, так и в регуляции и обеспечении клеточного растяжения (Wang et al**.,** 2009a; Wang et al., 2009b). В нашем исследовании было показано, что конститутивная экспрессия гена *AtARL* способствует увеличению размеров органов рапса за счет влияния как на клеточное растяжение, так и на клеточное деление. Причем по нашим данным следует, что размеры органов трансгенного рапса увеличивались в первую очередь, за счет увеличения количества клеток. Таким образом, исходя из наших и литературных данных, можно предположить, что фенотипическое проявление сверхэкспрессии генов,

кодирующих белки с OSR-доменом, зависит не только от гена, использованного в эксперименте, но и вида трансформированного растения. В целом изучение фенотипических проявлений сверхэкспрессии генов, кодирующих белки с OSR-доменом, свидетельствует о тесной взаимосвязи систем регуляции клеточного деления и роста клеток растяжением. Причем сами эти белки, судя по всему, принимают участие в координации клеточной пролиферации и клеточного растяжения при росте органов (Feng et al., 2011). Рассматривая в совокупности литературные и наши данные, можно сделать вывод, что *OSR*-гены в сочетании с конститутивными промоторами каулимовирусов могут быть использованы в качестве универсальных генно-инженерных конструкций, пригодных для трансформации хозяйственно-ценных растений с целью увеличения размеров их органов.

В рамках данной работы нами была использована альтернативная традиционным подходам методика трансформации рапса без использования стадии *in vitro*. Погружение цветков (floral dip) является перспективным методом получения новых биотехнологических сортов растений и имеет серьёзный потенциал для увеличения эффективности трансформации, что было показано нами на примере рапса. Различные модификации состава агробактериальной суспензии, вероятно, могут даже повысить успешность трансформации до уровня традиционных методов (агробактериальной трансформации семядольных черешков и гипокотилей) и даже превзойти их. Метод погружения цветков, видимо, подходит и для других видов растений, в частности, применялся для *A. thaliana* (Clough, Bent, 1998), хлопчатника (Zhang, Chen, 2012), амаранта (Munusamy et al., 2013) и др. Данный метод не требует высокого уровня квалификации и применения дорогостоящих реактивов. Эти преимущества метода погружения цветков могут сделать более дешёвыми и доступными для неспециализированных лабораторий не только создание трансгенных растений, относящихся к разным хозяйственно-ценным видам, но и проведение фундаментальных исследований в области функциональной геномики растений.

Таким образом, по нашим данным, метод погружения цветков может быть успешно использован для трансформации рапса сортов «Hanna» и «Ратник», однако для эффективного отбора трансгенных проростков необходимо соблюдение условий выращивания. Созданная нами генно-инженерная конструкция, состоящая из гена *AtARL* и промотора ВМГ, может быть использована для получения трансгенных растений рапса с увеличенными размерами листьев, стебля, цветков и семян. Предполагается, что созданные нами генно-инженерные конструкции с *OSR*-генами будут эффективны не только для рапса, но и для других растений. Исходя из этого, нами ведутся прикладные исследования по испытанию созданных нами генно-инженерных конструкций на трансгенных растениях, имеющих хозяйственное значение.

8.7. Заключение к главе 8

Исходя из наших и литературных данных, следует, что *OSR*-гены кодируют трансмембранные белки, которые преимущественно локализуются на эндоплазматическом ретикулуме и участвуют в трансдукции и передаче сигналов от фитогормонов к транскрипционным факторам. Данная группа белков не ассоциируются с каким-либо отдельным процессом, который влияет на размеры органов, например с клеточным делением, или ростом клеток растяжением. Очевидно, что OSR-белки участвуют в координации как клеточного деления, так и роста клеток растяжением и таким образом, контролируют размеры органов в целом. В то же время в каждом растении имеется несколько *OSR*-генов, которые эволюционно имеют общее происхождение, но их белковые продукты выполняют несколько различающиеся функции. Исходя из наших данных, следует, что в каждой группе растений такая дивергенция функций родственных белков могла происходить отдельно. Поэтому, основываясь лишь на данных, полученных на модельных объектах, точно нельзя предсказать, как фенотипически будет проявляться тот или иной *OSR*-трансген в различных растениях.

Экспрессия *OSR*-генов контролируется такими фитогормонами, как цитокинины, ауксины, брассиностероиды, гиббереллины, АБК и этилен. Эти

фитогормоны могут по-разному влиять на экспрессию *OSR*-генов, причем это зависит не только от конкретного гена, но и от возраста и типа органа, а также от условий среды. С повышением уровня экспрессии *OSR*-генов, видимо, увеличивается количество соответствующих белковых продуктов на мембранах и тем самым интенсивность сигналов, поступающих от фитогормонов повышается. Причем под влиянием OSR-белков наблюдается многократное повышение уровня экспрессии транскрипционных факторов, например, AP2-фактора ANT. Столь существенное влияние OSR-белков на транскрипционные факторы указывает на усиление сигнала на этом отрезке клеточного сигналинга. Далее транскрипционные факторы специфически взаимодействуют с промоторами генов, участвующих в регуляции клеточного деления, например, кодирующих циклины и циклин-зависимые протеинкиназы. Таким образом, OSR-белки могут влиять на относительно молодые и в основном недифференцированные клетки, стимулируя в них клеточные деления. Однако дифференцируясь, клетки постепенно теряют способность к делению, поэтому действие *OSR*-генов в данном случае, вероятно, ограничивается лишь зонами вокруг апикальных меристем, зачатков органов и молодых, только начинающих развиваться органов. Поэтому, несмотря на многократное повышение уровня экспрессии транскрипционных факторов под влиянием *OSR*-трансгенов во всех органах, их размеры увеличиваются не более чем в 2 раза.

Другой мишенью транскрипционных факторов, которые контролируются OSR-белками, являются промоторы генов, белковые продукты которых участвуют в обеспечении роста клеток растяжением. Здесь конечной целью фитогомормональных сигналов, передаваемых через OSR-белки, являются большие семейства белков экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. Экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы, в свою очередь, также по-разному регулируются OSR-белками, что говорит о существовании функциональных различий внутри этих групп белков (см. главу 9). В целом повышение уровня экспрессии экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз способствует разрыхлению и росту клеточной стенки. Однако рост клеток

растяжением, при этом, также, как и клеточные деления, не происходит бесконечно, даже при конститутивной экспрессии *OSR*-генов, так как структура клеточных стенок постепенно меняется, и она перестает быть чувствительной вначале к одним группам экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз, а затем и ко всем этим белкам в целом. Конечно, можно предположить, что также существуют системы обратной отрицательной связи между этими белками, обеспечивающими рост клеток растяжением и *OSR*-генами или фитогормонами, однако в литературе такие данные отсутствуют. Нам в свою очередь, также не удалось подтвердить эти предположения. Исходя из вышесказанного, становятся более понятными причины того, почему исследователи по всему миру не могут добиться двух-трехкратного увеличения размеров органов путем лишь увеличения уровня экспрессии *OSR*-генов, так как клетки растений только на определенных стадиях развития чувствительны к сигналам, стимулирующим клеточные деления или рост клеток растяжением.

Конститутивная экспрессия гена *AtARGOS* способствует увеличению размеров листьев, стебля и цветков в трансгенных растениях табака за счет стимуляции клеточного деления и роста клеток растяжением. Исходя из наших данных, следует, что продукт гена *AtARGOS* при этом оказывает влияние на гены, кодирующие транскрипционный фактор NtANTL и экспансины NtEXPA1 и NtEXPA4. Продукт гена *AtARL* в табаке оказывал позитивное влияние только на рост клеток растяжением через стимуляцию экспрессии генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*. В то же время в рапсе сверхэкспрессия гена *AtARL* способствовала увеличению количества клеток в органе. Из этого следует, что фенотипическое проявление сверхэкспрессии генов, кодирующих белки с OSR-доменом, зависит не только от гена, использованного в эксперименте, но и вида трансформированного растения. Большое значение, безусловно, имеет также тип промотора, который был использован в ходе работы. Нами было показано, что для увеличения размеров органов наиболее эффективными являются конститутивные промоторы, и в особенности промотор ВМГ.

Нами впервые был клонирован *OSR*-ген древесных растений, а именно ген *PnARGOS-LIKE* тополя черного. При его исследовании были получены данные, свидетельствующие о том, что в наиболее молодых органах экспрессия *OSR*-генов может регулироваться цитокининами, а в органах более старшего возраста более заметным становится влияние брассиностероидов. Также было показано, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* участвует в регуляции инициации зачатков листьев и контролирует рост клеток растяжением в листьях.

Конститутивная экспрессия *OSR*-генов оказывала более существенное влияние на размеры органов, чем ген *NtANTL*, продукт которого регулирует в основном клеточные деления (глава 7) и гены экспансинов, продукты которых обеспечивают рост клеток растяжением (глава 9). Это, видимо, связано с тем, что *OSR*-гены одновременно контролируют как деление клеток, так и их растяжение. Таким образом, *OSR*-гены кодируют уникальную группу белков, ассоциированных именно с регуляцией размеров органов.

Полученные нами в ходе работы генно-инженерные конструкции с *OSR*-генами могут быть использованы для увеличения размеров органов различных растений, то есть являются универсальными. Нами для дальнейших исследований была отобрана генно-инженерная конструкция, состоящая из гена *AtARL* и промотора ВМГ. Эта конструкция будет использована нами для трансформации хозяйственно-ценных растений с целью увеличения размеров их органов. Однако в гетерологичных условиях *OSR*-гены проявляли себя менее выражено, чем в гомологичных условиях. Поэтому существует определенный интерес в поиске ортологов и гомологов *OSR*-генов в геномах хозяйственно-ценных растений с целью их клонирования и создания на их основе трансгенных растений.

Глава 9. Роль генов, контролирующих рост клеток растяжением в регуляции размеров органов

В растениях размеры органов зависят не только от уровня клеточного деления, но и от размеров отдельных клеток. Большинство ростовых процессов растений регулируется через влияние на рост клеток растяжением. Рост растяжением является уникальной особенностью растительных клеток. Он контролируется множеством регуляторов и обеспечивается, в первую очередь, за счет поглощения воды центральной вакуолью и разрыхления компонентов клеточной стенки (Обручева, 2008а). Клеточная стенка состоит из микрофибрилл целлюлозы, связующих гликанов, пектина и структурных белков (Heredia et al., 1995). Ослабление связей между микрофибриллами целлюлозы осуществляется экспансинами (Cho, Cosgrove 2000), ксилоглюканэндотрансгликозилазами (Miedes et al., 2011) и эндогликаназами (Sukno et al., 2006). Для определения вклада генов, контролирующих рост клеток растяжением в регуляцию размеров органов, нами была поставлена цель изучить гены экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз.

9.1. Роль гена эндоксилоглюкантрансферазы *NtEXGT* при росте растений и регуляции размеров органов

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы (XTHs) были охарактеризованы почти одновременно в двух лабораториях: S. Fry (Великобритания) и K. Nishitani (Япония) (Smith, Fry, 1991; Nishitani, Tominaga, 1991). XTHs являются ферментами (Rose et al., 2002) и относятся к подсемейству гликозид-гидролаз семейства GH16 (http://www.cazy.org/fam/ GH16.html) (Cantarel et al., 2009). Ферменты этой группы способны заменять гликозидную связь в остове ксилоглюкана, соединяя фрагменты двух молекул между собой, при этом расщепляется гликозидная связь в молекуле донора и соединяется с невосстанавливающим концом молекулы акцептора. Причем этот же фермент может обладать и гидролазной активностью (Rose et al., 2002). У цветковых

растений XTHs обычно кодируется большим мультигенным семейством (Okazawa et al., 1993; Nishitani, 1997; Rose et al., 2002). Анализ баз данных нуклеотидных последовательностей позволил идентифицировать 33, 29 и 41 открытых рамок считывания потенциально кодирующих XTHs у *A. thaliana*, риса и тополя *P. trichocarpa*, соответственно (Yokoyama and Nishitani, 2000, 2001; Yokoyama et al., 2004; Geisler-Lee et al., 2006). Гены *XTHs* были также обнаружены у несеменных наземных растений и водорослей, что говорит об очень раннем возникновении этой группы ферментов в процессе эволюции (Vissenberg et al., 2003; Van Sandt et al., 2007a,b; Yokoyama et al., 2010) в результате выделения из единого семейства генов GH16 (Baumann et al., 2007).

Повышенный уровень содержания мРНК XTHs наблюдается при обработке растений экзогенными ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами, при этом происходит удлинение стеблей опытных растений за счет стимуляции роста клеток растяжением (Miedes et al., 2010). Взаимосвязь между активностью XET и клеточным растяжением была обнаружена в апикальном сегменте гипокотилей томатов, сверхэкспрессирующих ген *SlXTH1*, где удельная активность XET была выше в сравнении с контрольной линией (Miedes et al., 2010). В гипокотилях трансгенных линий с пониженной экспрессией гена *SlXTH1* показатели общей растяжимости были ниже, чем в линиях дикого типа.

В целом, продукты генов *XTHs* играют важную роль во всех процессах, когда требуется изменение архитектуры клеточной стенки: формирование корней (Vissenberg et al., 2005; Osato et al., 2006), удлинение стебля (Catala et al., 1997), развитие цветка (Hyodo et al., 2003), опадение лепестков (Singh et al., 2011), созревание плодов (Rose, Bennett, 1999), отложение вторичной клеточной стенки при развитии сосудов (Bourquin et al., 2002; Matsui et al., 2005). В литературе имеются также сведения об участии XTHs в обеспечении устойчивости растений к дефициту влаги, вызванного засухой и засолением (Choi et al., 2011). В первую очередь, это означает, что XTHs, вероятно, участвуют в регуляции и обеспечении роста растений при изменяющихся условиях среды. Однако в литературе имеется

весьма мало сведений об участии XTHs в регуляции роста при стрессовых условиях.

Модельным объектом во всех наших исследованиях в основном являлся табак, у которого на данный момент секвенированы два гена, относящихся к *XTHs*: эндоксилоглюкантрансферазы (*NtEXGT*; AB017025.1) и эндоксилоглюкантрасфераза-связанного белка (D86730.1), последний из которых был ранее использован для получения трансгенных растений томатов (Miedes et al., 2011). В то же время ген *NtEXGT* (AB017025.1) оставался до сих пор совсем без внимания. В связи с этим, основной целью нашей следующей работы являлось выяснение роли продукта гена *NtEXGT* в регуляции размеров органов и обеспечении роста. Также большой интерес представляло изучение роли продукта гена *NtEXGT* в клеточном ответе на стрессовые факторы, вызывающие дефицит влаги. Были поставлены задачи по определению уровня экспрессии исследуемого гена в различных органах, под влиянием экзогенных фитогормонов, стрессовых факторов, а также получение и анализ трансгенных растений табака, с конститутивной экспрессией гена *NtEXGT*.

9.1.1. Определение филогенетических связей гена *NtEXGT* с его гомологами из некоторых представителей двудольных

Нами при помощи программы MegAlign (DNASTAR, США) был проведен филогенетический анализ 15 предполагаемых ортологов гена *NtEXGT* некоторых представителей двудольных растений. Как и следовало ожидать, наибольшей схожестью по последовательности нуклеотидов с геном *NtEXGT* характеризовались соответствующие гены растений семейства пасленовых, а именно *XTHs* гены *Nicotiana tomentosiformis* (XM 009613022.1), *Nicotiana sylvestris* (XM 009801634.1), *S. lycopersicum* (D16456), *S. lycopersicum* (NM 001246929), *S. tuberosum* (XM 006344602), *S. lycopersicum* (NM 001247440.2), *S. lycopersicum* (AF186777). В группу наиболее близких к *NtEXGT* генов из других семейств растений также вошли соответствующие ортологи из *Actinidia deliciosa*, *Theobroma cacao*, *Populus tomentosa* и других. У *A. thaliana* к *NtEXGT* оказался

наиболее близким ген *AtEXGT A1*, который также известен под названием *AtXTH4* (Рис. 90). К сожалению, ближайшие гомологи гена *NtEXGT* пока остаются малоизученными, поэтому нельзя сделать предварительные предположения о возможной роли генов, представленных на рис 90.

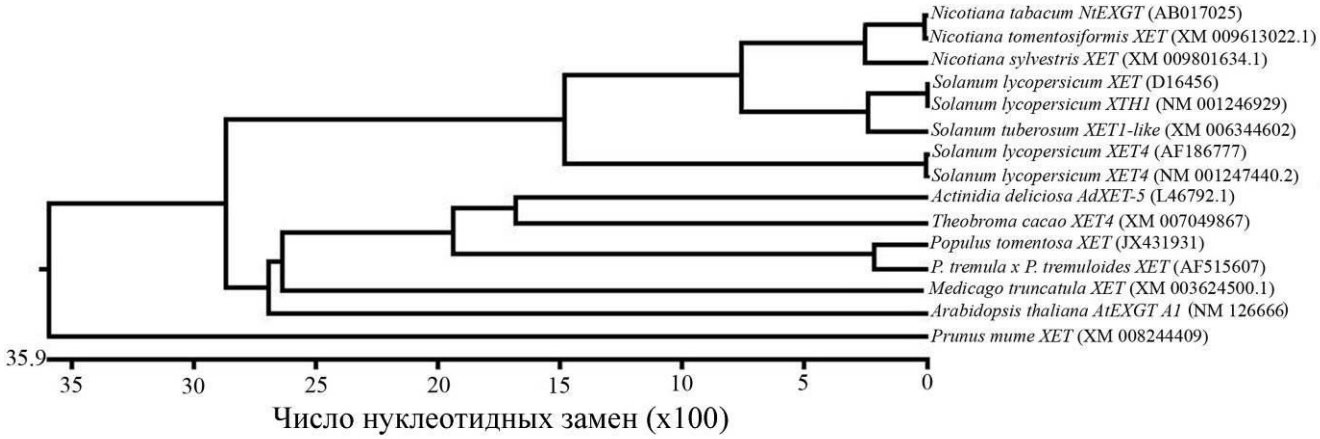


Рис. 90. Филогенетическое древо сходства гомологов генов *XTHs*, близких по последовательности нуклеотидов к гену *NtEXGT*, построенное с использованием бутстреп-поддержки (Bootstrap trials=1000, seed=111). Все значения бустреп-анализа на древе превышали 70.

9.1.2. Анализ уровня транскрипции гена *NtEXGT* в различных органах табака дикого типа

Наиболее высокий уровень экспрессии гена *NtEXGT* наблюдался в молодых листьях, растущих преимущественно за счет растяжения клеток (Рис. 91а). В то же время в листе №1 (Рис. 91б), где очень высока скорость клеточных делений, уровень экспрессии исследуемого гена был заметно ниже, чем в листьях старшего возраста. Резкое снижение содержания мРНК гена *NtEXGT* наблюдалось, начиная с 6-го листа, а в листьях расположенных ниже и прекративших рост, транскрипты исследуемого гена вовсе не детектировались. Однако в семядольных листьях мы также всегда детектировали, хотя и довольно низкое, содержание транскриптов гена *NtEXGT*. Относительно высокое содержание мРНК гена *NtEXGT* было обнаружено нами также в верхушках побегов, корнях и особенно в растущих цветках (рис. 91а).

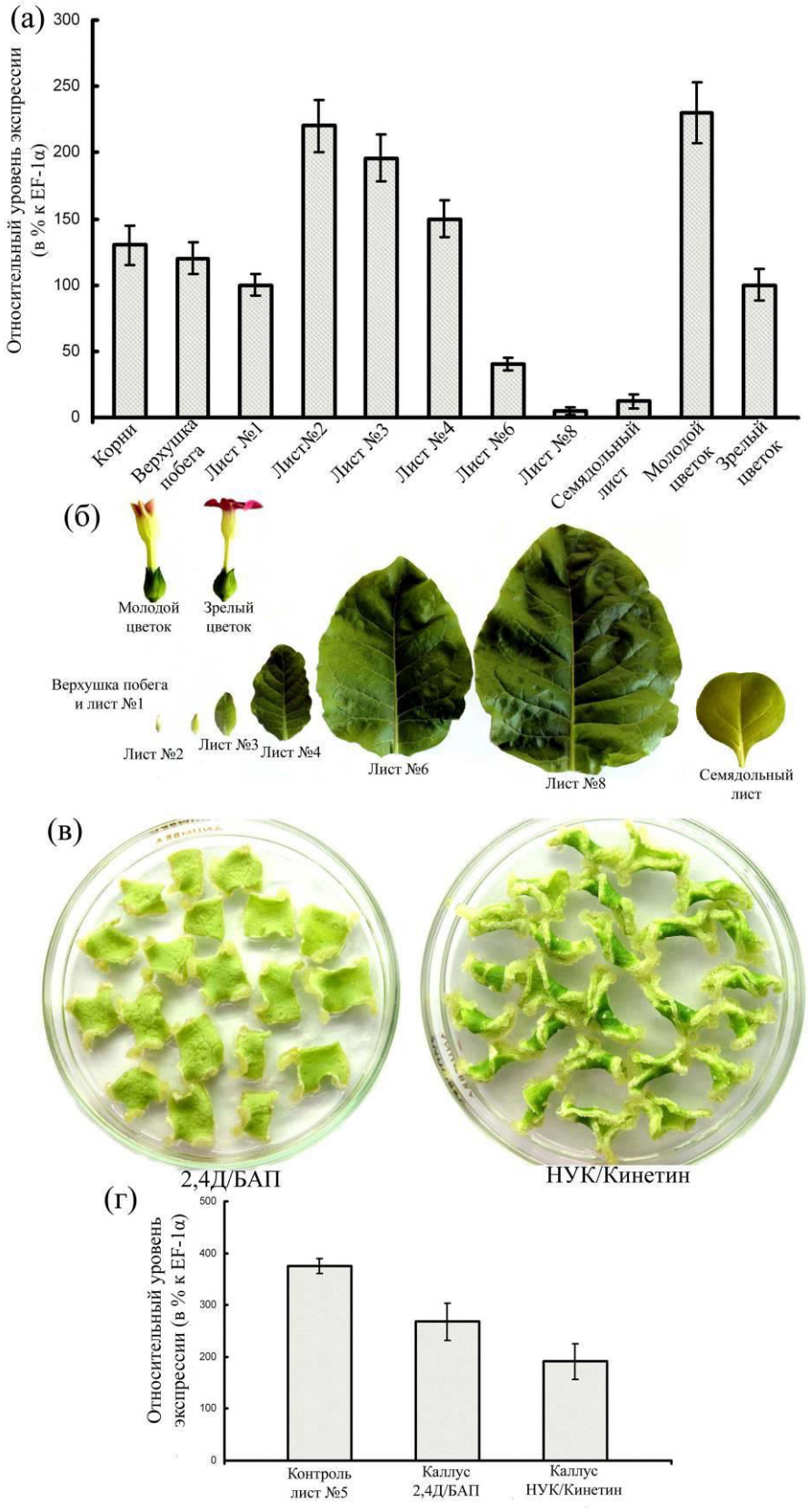


Рис. 91. а - количественный анализ уровня экспрессии гена *NtEXGT* в различных органах табака; б - внешний вид использованных в работе органов табака; в – каллусы, полученные из листьев №5 при помощи 2,4Д/БАП (слева) и НУК/Кинетин (справа); г - количественный анализ уровня экспрессии гена *NtEXGT* табака в листьях №5 и каллусе.

Таким образом, экспрессия гена *NtEXGT* тесно связана с молодыми растущими органами, в которых высок уровень именно клеточного растяжения, а не клеточных делений. Для дополнительного подтверждения данного предположения, нами были проведены исследования экспрессии гена *NtEXGT* в растущих листьях и каллусе (рис. 91в), полученном из этих листьев (лист №5). Хорошо известно, что каллус состоит из активно делящихся недифференцированных клеток, то есть рост каллуса происходит в основном за счет увеличения количества клеток. Наши предположения подтвердились, действительно в каллусе уровень экспрессии гена *NtEXGT* был ниже, чем в растущих растяжением листьях (рис. 91г). Полученные нами результаты еще раз доказывают, что продукт исследуемого гена необходим, прежде всего, для роста клеток растяжением. Однако, отметим, что в каллусе уровень экспрессии исследуемого гена тоже был довольно высоким, что может говорить о важности его белкового продукта для нормального роста недифференцированных делящихся клеток.

9.1.3. Анализ уровня транскрипции гена *NtEXGT* в различных органах табака дикого типа под влиянием экзогенных фитогормонов

При определении функций гена и его белкового продукта может оказаться полезным проведение анализа его уровня экспрессии под влиянием экзогенных фитогормонов. Исходя из этого, нами были проведены исследования изменений уровня экспрессии исследуемого гена в верхушке побега, в листьях № 2, 3, 5 и 8 под влиянием «ростовых» фитогормонов (то есть фитогормонов, преимущественно, участвующих в регуляции роста). В верхушке побега содержание мРНК гена *NtEXGT* незначительно повышалось только под влиянием ауксинов (рис. 92а), в то время как, другие фитогормоны почти не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого гена. Такое незначительное влияние экзогенных фитогормонов на уровень экспрессии гена *NtEXGT* в верхушках побега может объясняться наличием больших концентраций в этом органе эндогенных фитогормонов, высокой упорядоченностью и более жестким

контролем их циркуляции в АМП (Veit, 2009). В листьях №2 и №5 на экспрессию исследуемого гена положительное влияние оказывали все 4 группы использованных фитогормонов (рис. 92б, в). В листе №8 содержание транскриптов гена *NtEXGT* повышалось лишь под влиянием ауксинов. Таким образом, экспрессия гена *NtEXGT* остается доступной для стимуляции при помощи экзогенных фитогормонов, по крайней мере, до листа №8. В наших исследованиях рост листьев растяжением прекращался на уровне 7-8-го листа, поэтому можно предположить, что белковый продукт гена *NtEXGT* необходим от самых начальных, вплоть до последних стадий роста клеток растяжением.

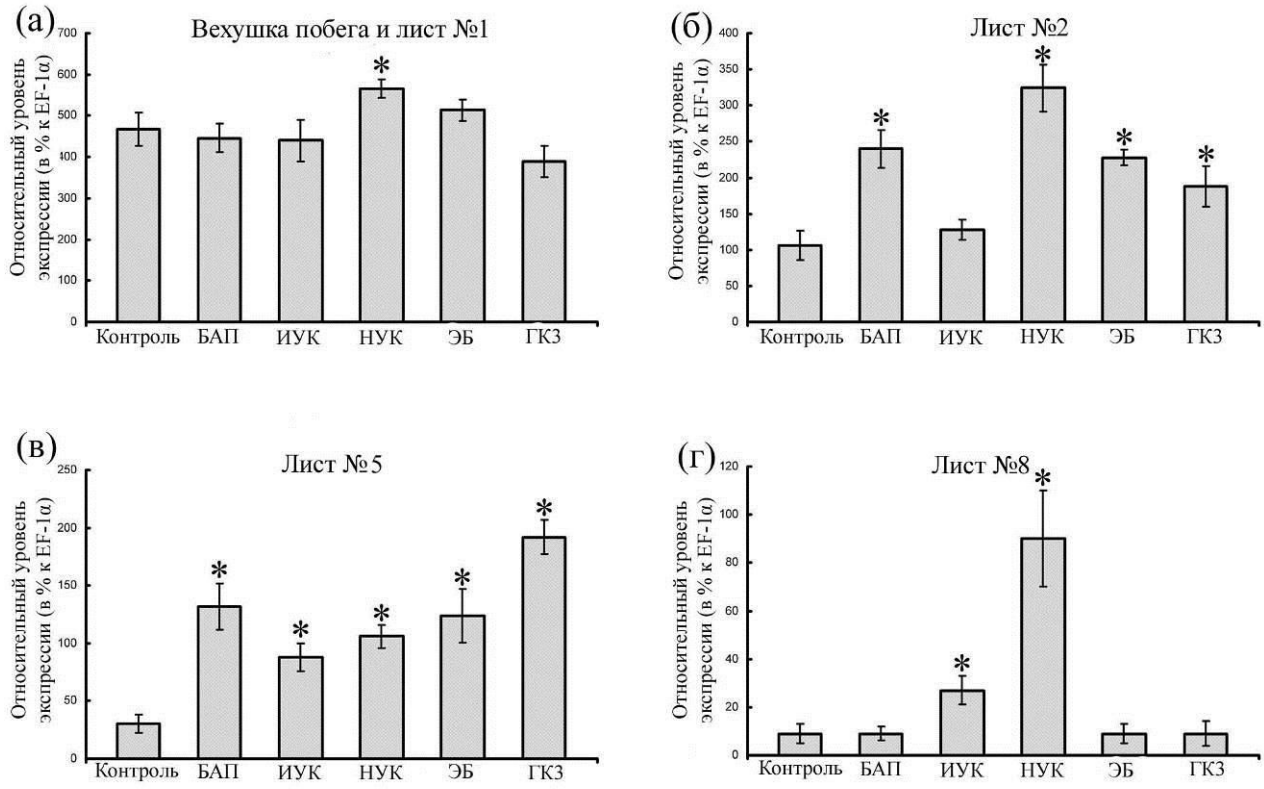


Рис. 92. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXGT* в верхушке побега с листом №1 (а), в листе №2 (б), в листе №5 (в) и в листе №8 (г) в ответ на экзогенную обработку фитогормонами. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

Из генов *XTHs A. thaliana* к *NtEXGT* по нуклеотидному составу наиболее близок ген *AtXTH4* (рис. 90). По данным ресурса NCBI GEO экспрессия гена *AtXTH4* повышается под влиянием ауксинов (GDS744/266215_at/XTH4), а у

мутантов arf6 и arf8 содержание транскриптов гена *AtXTH4* снижено по сравнению с контролем (GDS1408/266215_at/XTH4). Отметим также, что брассиностероиды повышали экспрессию гена *AtXTH4* (GDS743/266215_at/XTH4), а брассинозол, наоборот, уменьшал уровень экспрессии данного гена (GDS3823/266215_at/XTH4). Таким образом, опираясь на наши экспериментальные данные, а также на данные ресурса NCBI GEO, можно говорить о том, что ауксины и брассиностероиды играют важную роль в регуляции экспрессии генов *XTHs* и, в частности, гена *NtEXGT*.

9.1.4. Анализ изменений уровня транскрипции гена *NtEXGT* под влиянием избыточной NaCl, холода, кадмия и «стрессовых» фитогормонов

Одним из наиболее распространенных факторов среды, вызывающих дефицит влаги для растений, является избыточное содержание NaCl в почве (Кошкин, 2010). В таких условиях рост растений обычно прекращается за счет снижения уровней клеточного деления и роста клеток растяжением. В то же время известно, что уровень экспрессии генов *XTHs* и экспансинов связан с адаптацией растений к экологическим стрессам через регулирование роста клеток растяжением (Gao et al., 2010; Choi et al., 2011). Также в литературе имеются сведения о повышении соле- и засухоустойчивости у трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих гены *XTHs* (Choi et al., 2011; Han et al., 2013). Исходя из этих литературных данных, нами было решено провести анализ уровня экспрессии гена *NtEXGT* под влиянием повышенного содержания в среде NaCl, а также других стрессовых факторов, вызывающих дефицит влаги.

При выращивании табака дикого типа на гидропонике, было показано, что уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышается при содержании NaCl в среде от 20 мМ и поднимается дальше, по крайней мере, в течение первых двух часов инкубации до достижения содержания соли в 350 мМ, что превышает летальную концентрацию для табака (Binzel et al., 1985). Однако при дальнейшем повышении концентрации соли до 850 мМ и увеличении времени инкубации, содержание мРНК исследуемого гена снижается (рис. 93а). Согласно данным

ресурса NCBI GEO, при действии 100мМ NaCl в листьях *A. thaliana* также наблюдается существенное увеличение уровня экспрессии гена *AtXTH4* (GDS3927/266215_at/XTH4 и GDS3918/266215_at/XTH4), что соотносится с нашими экспериментальными данными.

Интересно отметить, что в листьях табака, росших на почве и не поливавшихся в течение всего лишь двух дней, уровень содержания транскриптов гена *NtEXGT* был выше в среднем в 1,6 раза, чем в листьях табака, росших на гидропонике (рис. 93б), что может свидетельствовать об участии XTHs в регуляции устойчивости к стрессам, вызванным не только избытком NaCl, но и дефицитом влаги в целом.

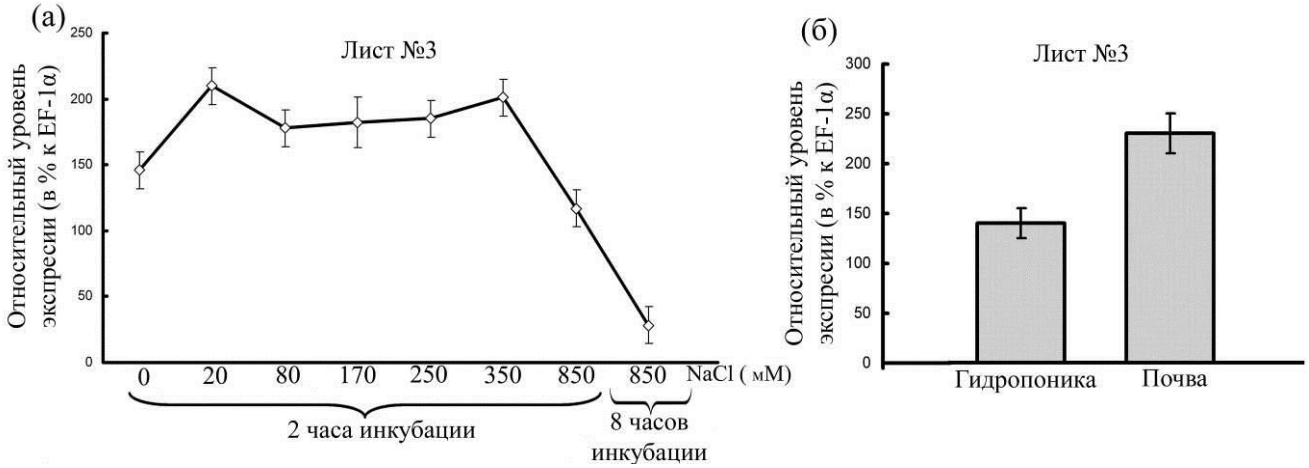


Рис. 93. а – изменения уровня экспрессии гена *NtEXGT* в листе №3 под влиянием NaCl; б - изменения уровня экспрессии исследуемого гена в листе №3 при выращивании табака на гидропонике и почве.

Не менее актуальным стрессовым фактором, вызывающим дефицит влаги, является холод (Кошкин, 2010). Нами были проведены определения содержания транскриптов гена *NtEXGT* в различных частях табака при воздействии низкой положительной температуры +10ºС. Через 3 часа воздействия холода, уровень экспрессии гена *NtEXGT* немного повышался лишь в листе №3, тогда как в других органах оставался почти неизменным (рис. 94а). Однако через 8 часов воздействия холода содержание мРНК гена *NtEXGT* существенно возрастало в верхушке побега, в листьях №2, 3 и 5. Наиболее существенное изменение уровня

экспрессии исследуемого гена наблюдалось в листе №3, где он увеличился в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 94а).

Исходя из того, что уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышался примерно в одинаковой степени при действии соли, засухи и холода, мы предположили, что основной причиной этих изменений был дефицит влаги. Для подтверждения этих предположений, мы решили использовать стрессовый фактор, который нарушает не только водный обмен, но может оказывать негативное воздействие непосредственно на сам фермент эндоксилоглюкантрансферазу. Согласно литературным данным к таким абиотическим факторам можно отнести, например, тяжелые металлы и в частности кадмий (Scebba et al., 2006; Grzyb et al., 2012), который по актуальности проблемы устойчивости к тяжелым металлам занимает среди них, безусловно, первое место. При воздействии кадмия содержание транскриптов гена *NtEXGT* в листьях табака также повышалось (рис. 94б), как и при действии соли, засухи и холода. Но в отличие от этих стрессовых факторов, при воздействии которых уровень экспрессии исследуемого гена повышался от 1,5 до 6 раз, при кадмиевом стрессе содержание транскриптов гена *NtEXGT* повышалось в 9 раз (рис. 94б). Эти данные возможно объясняются тем, что кадмий оказывает более существенное воздействие на белок NtEXGT, чем холод, засуха или NaCl и для компенсации этого негативного влияния растение, вероятно, вынуждено в большей степени увеличивать уровень экспрессии гена *NtEXGT*.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что при дефиците влаги, вызванном различными стрессовыми факторами, активность эндоксилоглюкантрансферазы уменьшается, потому что как и большинство ферментов этот белок работает лишь в водной среде. В ответ на это в растениях активируется сигнальная система, направленная на повышение уровня экспрессии белка NtEXGT, что, видимо, способно компенсировать падение его активности и поддерживать некоторое время процессы роста клеток растяжением на нормальном уровне. Однако при длительном воздействии стрессовых факторов, вероятнее всего, включается система, направленная на уменьшение уровня

экспрессии гена *NtEXGT* (рис. 93а), так как продолжать рост при таких условиях становится для растения уже не выгодным.

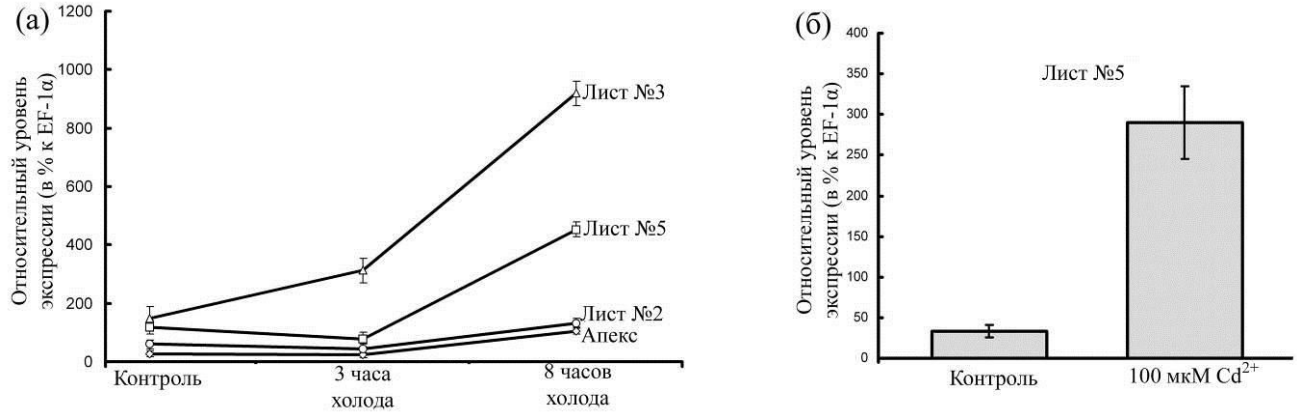


Рис. 94. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXGT* при воздействии температуры +10ºС (а); изменения уровня экспрессии исследуемого гена при воздействии кадмия (б). Апекс – верхушка побега с листом №1.

В регуляцию клеточных ответов к стрессовым факторам, вызывающим дефицит влаги и в частности к высокому содержанию NaCl в среде, вовлечена АБК (Novikova et al., 2010, Gao et al., 2010). Хорошо известно, что при действии NaCl, в листьях повышается уровень содержания АБК (Кошкин, 2010), которая, возможно стимулирует через систему клеточной сигнализации экспрессию гена *NtEXGT*. Для проверки этого предположения нами был проведен анализ изменений содержания транскриптов исследуемого гена под влиянием АБК.

Для доказательства того, что стресс-индуцированное накопление транскриптов *NtEXGT* может быть преимущественно ассоциированным с АБК, нами было решено использовать еще один «стрессовый» фитогормон – метилжасмонат (МеЖ). Хорошо известно, что МеЖ в основном вовлечен в регуляцию у растений устойчивости к биотическим стрессам (Santino et al., 2013). Однако в литературе имеются сведения и о положительном влиянии МеЖ на устойчивость растений к солевому стрессу (Yoon et al., 2009), поэтому нельзя было заранее исключать участия этого фитогормона в регуляции экспрессии гена *NtEXGT* при действии стрессовых факторов.

В верхушке побега, при обработке растений «стрессовыми» фитогормонами, уровень содержания транскриптов исследуемого гена не изменялся (рис. 95а), что может быть связано с высоким содержанием цитокининов и ауксинов в АМП (Veit, 2009). Однако в третьем от верхушки побега листе уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышался под влиянием АБК почти в 2 раза (рис. 95б). Отметим, что полученные результаты вполне соотносятся с данными, полученными при действии NaCl (рис. 93а), причем в обоих случаях для анализа был использован именно лист №3.

В то же время, в 5-м от верхушки побега листе АБК уже не стимулировал экспрессию гена *NtEXGT*. Эти данные могут объясняться меньшей интенсивностью ростовых процессов в листе №5, по сравнению с 3-м от верхушки побега листом. Возможно, при действии даже малых концентраций NaCl, рост 5-го листа прекращается раньше, в то время как 3-й лист некоторое время продолжает рост за счет повышенного уровня экспрессии генов XTHs и экспансинов (см. раздел 9.2). В листе №5 экспрессию гена *NtEXGT* повышал МеЖ (рис. 95б), однако степень увеличения содержания его транскриптов была незначительной. Отметим, что в литературе имеются сведения об увеличении уровня экспрессии гена экспансина *TaEXPB23* при одновременном воздействии солевого стресса и МеЖ (Han et al., 2012). Исходя из этих и наших экспериментальных данных, можно предположить, что метилжасмонат как и АБК принимает участие в регуляции устойчивости к солевому стрессу через поддержание роста клеток растяжением на нормальном уровне.

Интересно отметить, что по данным базы AGRIS (http://arabidopsis.med.ohio-state.edu) в промоторе гена *AtXTH4 A. thaliana* (At4g06850), который является наиболее близким гомологом гена *NtEXGT*, имеется один ABRE-подобный мотив CACGTGTA. Известно, что данный мотив вовлечен в ответ клетки на дефицит влаги (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Наличие ABRE-мотива в промоторе гена *AtXTH4* может говорить об участии АБК в регуляции его экспрессии и может являться дополнительным подтверждением полученных нами экспериментальных данных. Однако, эти данные не могут служить доказательством АБК-зависимой

регуляции, для этого требуются соответствующие исследования промотора гена *NtEXGT*, который на данный момент, к сожалению, не секвенирован.

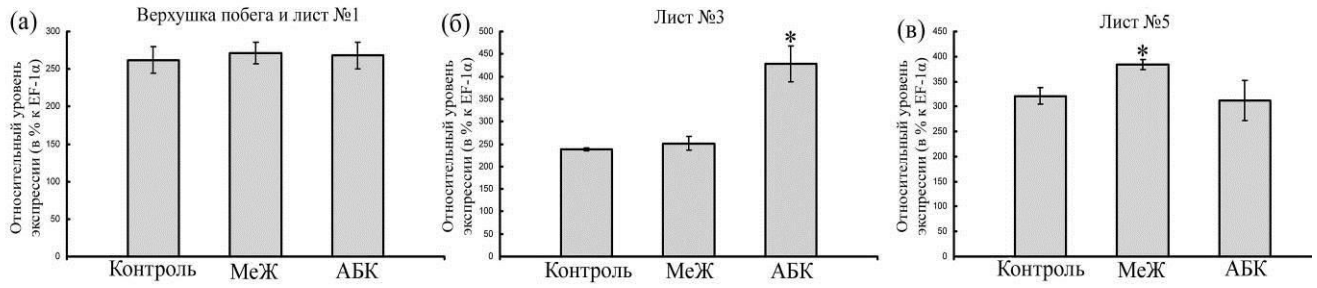


Рис. 95. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXGT* под влиянием стрессовых фитогормонов в верхушке побега (а), листе №3 (б) и листе №5 (в). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

9.1.5. Участие генов *AtARGOS*, *AtARL* и *NtANTL* в регуляции экспрессии гена *NtEXGT*

Определенная роль в регуляции роста клеток растяжением и, особенно в координации процессов клеточного деления и растяжения, отводится белкам с OSR-доменом (см. главу 8). На данный момент изучены только 4 гена *A. thaliana*, кодирующие белки данной группы: *OSR1, OSR2, AtARGOS* и *AtARL* (Qin et al., 2014). Ауксин-индуцибельный белок AtARGOS принимает участие в регуляции экспрессии транскрипционных факторов AINTEGUMENTA (Hu et al., 2003), AtGRF1 и экспансина AtEXPA10 (Wang et al., 2009а; Wang et al., 2009б). Брассиностероид-индуцибельный белок AtARL, в свою очередь, регулирует экспрессию гена *TCH4* (*AtXTH22*), кодирующего одну из ксилоглюканэндотрансгликозилаз *A. thaliana* (Hu et al., 2006).

Исходя из этих литературных данных, нами для изучения молекулярных механизмов регуляции размеров органов ранее были получены трансгенные растения с эстрадиол-индуцибельной экспрессией генов *AtARGOS, AtARL* (см. раздел 8.3), а также гена *NtANTL*. В связи с этим, было решено определить содержание мРНК гена *NtEXGT* под влиянием сверхэкспрессии этих трех генов.

В результате индуцибельной экспрессии гена *AtARGOS* в цветках трансгенных растений содержание транскриптов гена *NtEXGT* не повышалось (рис. 96а). В то же время индуцибельная экспрессия гена *AtARL* способствовала заметному повышению уровня экспрессии гена *NtEXGT* (рис. 96а). Таким образом, были подтверждены данные, полученные нами ранее при изучении индуцибельной экспрессии *OSR*-генов (см. раздел 8.3.2), однако тогда для исследования было использовано лишь по одному растению для каждого из генов. Отметим, что в данной работе выборка составила уже 3 растения, а в качестве референсного гена был использован *EF-1α*, а не ген α-тубулина. В целом, наши экспериментальные данные подтверждают имеющиеся в литературе сведения, что продукт гена *ARGOS* участвует, преимущественно, в регуляции клеточного деления (Hu et al., 2003), тогда как продукт гена *ARL* контролирует клеточное растяжение (Hu et al., 2006). При индуцибельной экспрессии гена *NtANTL* содержание транскриптов гена *NtEXGT* не изменялось ни в верхушке побега, ни в листьях (рис. 96б). Таким образом, можно предполагать, что транскрипционный фактор NtANTL не принимает участия в регуляции экспрессии гена *NtEXGT*.

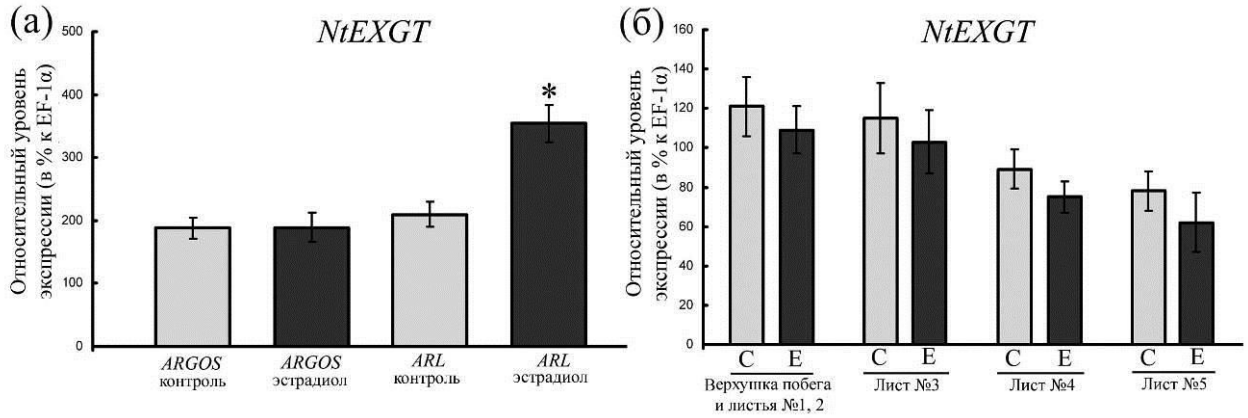


Рис. 96. Изменения в содержании транскриптов гена *NtEXGT* под влиянием эстрадиол-индуцибельной экспрессии генов *AtARGOS, AtARL* и *NtANTL*: а - влияние индуцибельной экспрессии генов *AtARGOS, AtARL A. thaliana* на уровень содержания транскриптов гена *NtEXGT* в цветках трансгенных растений; б - влияние индуцибельной экспрессии гена *NtANTL* табака на уровень содержания транскриптов гена *NtEXGT* в верхушке побега и листьях трансгенных растений. С – контроль, Е – эстрадиол. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

9.1.6. Морфологический анализ трансгенных растений, сверхэкспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT*

Для того, чтобы доказать участие продукта гена *NtEXGT* в обеспечении роста клеток растяжением, нами были проведены работы по созданию трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT*. Из 21 полученной нами линии трансгенных растений с конститутивной экспрессией кДНК формы гена *NtEXGT* для морфологического анализа были отобраны семь линий растений под номерами 2, 3, 4, 8, 10, 12 и 17, характеризующиеся единичной копией трансгена в геноме и относительно высоким уровнем его экспрессии. По размерам листьев и цветков контрольные и опытные растения не различались (рис. 97а, б, г). Морфологический анализ выявил лишь небольшое уменьшение высоты стебля у опытных растений табака, что могло быть связано с уменьшением периода вегетации (рис. 97в, 98а). Несмотря на отсутствие изменений в размерах листьев и цветков, некоторые линии опытных растений отличались достоверным увеличением размеров отдельных клеток, составляющих данные органы, что может быть связано с активностью продукта гена *NtEXGT* (рис. 98б, г). Таким образом, было показано, что продукт гена *NtEXGT* действительно может оказывать положительное влияние на рост клеток растяжением. Несмотря на увеличение размеров клеток, видимо, благодаря функционированию компенсаторных механизмов, направленных, в данном случае, на уменьшение количества клеток, размеры органов трансгенных растений оставались в пределах нормы. По всем остальным морфометрическим параметрам трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие кДНК форму гена *NtEXGT* не отличались от контрольных растений.

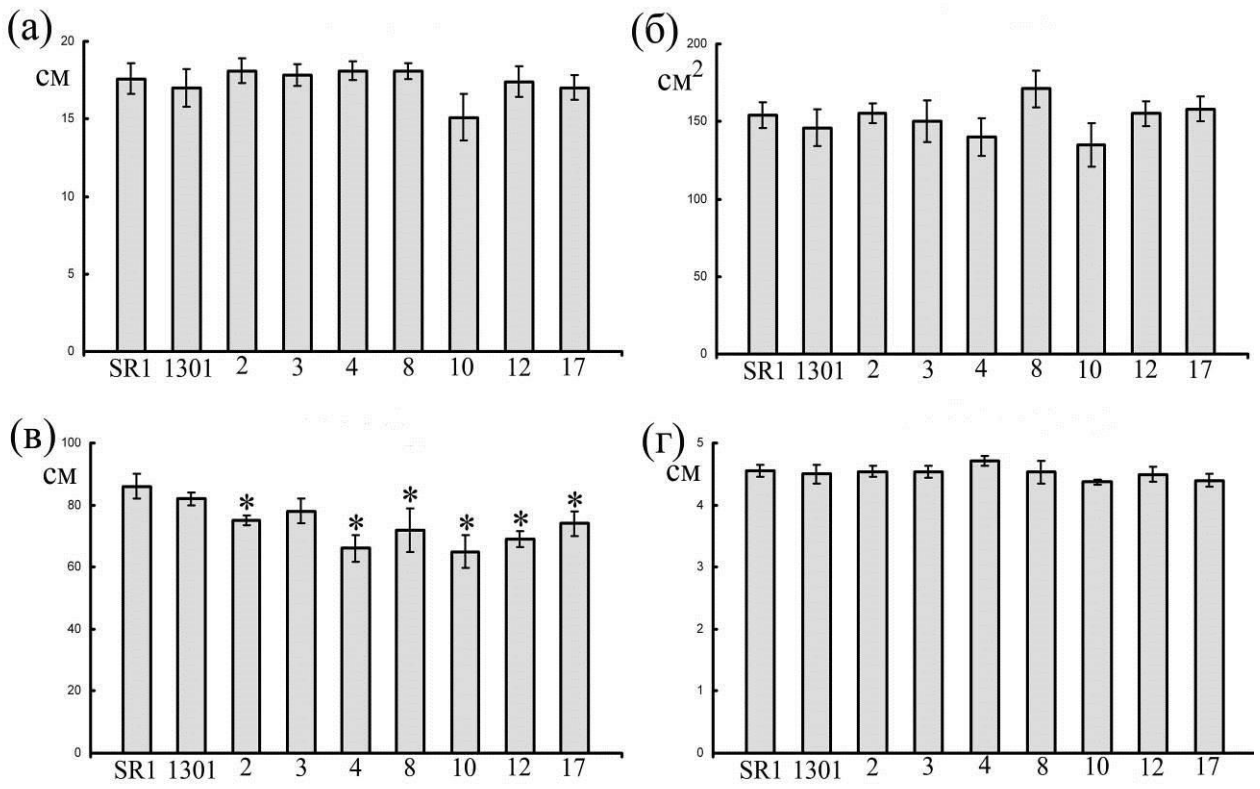


Рис. 97. Морфометрические параметры трансгенных растений табака конститутивно экспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT*: а – длина листьев, б – площадь листьев, в – высота стебля, г – длина цветков. SR1 – контрольные растения дикого типа, 1301 – контрольные растения, содержащие в геноме Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена, 2-17 – линии трансгенных растений. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

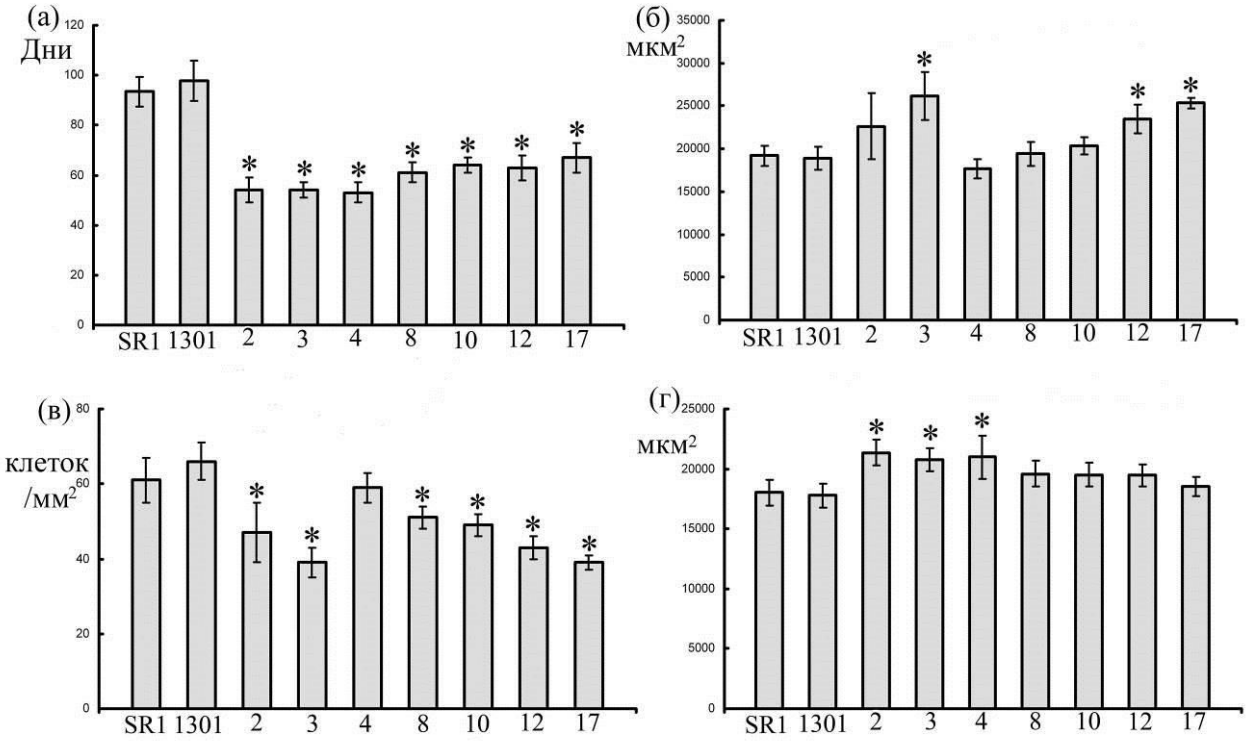


Рис. 98. Морфологическая характеристика трансгенных растений табака конститутивно экспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT*: а – время цветения после пересадки на почву, б – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, в – число клеток эпидермиса на 1мм^2, г – площадь клеток наружного эпидермиса лепестков. SR1 – контрольные растения дикого типа, 1301 – контрольные растения, содержащие в геноме Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена, 2-17 – линии трансгенных растений. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

9.1.7. Морфологический анализ трансгенных растений, сверхэкспрессирующих геномную форму гена *NtEXGT*

Одной из прикладных задач нашего исследования было получение трансгенных растений табака с увеличенными размерами органов. Однако конститутивная экспрессия кДНК формы гена *NtEXGT* не оказывала существенного влияния на морфометрические параметры трансгенных растений. Это могло быть связано не только с функционированием компенсаторных механизмов, но и с наличием замен нуклеотидов в целевом гене или другими мутациями в генно-инженерной конструкции. Поэтому нами было решено

получить трансгенные растения табака с повышенным уровнем экспрессии гена *NtEXGT,* используя другую генно-инженерную конструкцию.

В генной инженерии растений до сих пор остается без ответа вопрос, как будут отличаться между собой трансгенные растения, сверхэкспрессирующие кДНК форму целевого гена и геномную его форму. В связи с этим нами было решено получить трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие геномную форму гена *NtEXGT*.

Из 28 линий трансгенных растений с конститутивной экспрессией геномной формы гена *NtEXGT*, 13 линий под номерами 1, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 24 и 25, характеризующиеся единичной копией трансгена в геноме и относительно высоким уровнем его экспрессии были отобраны для морфологического анализа. Длина листьев достоверно увеличивалась по сравнению с контролем у линий 7, 17, 21 и 25 (рис. 99а), причем степень увеличения составила в среднем 24% у линии 17. Достоверное увеличение площади листьев было характерно для линий 15, 17 и 22 (рис. 99б). Наибольшим изменением площади листьев также характеризовалась линия 17, а степень увеличения в среднем составила 19% по сравнению с контролем. По высоте стебля, также как и в случае с кДНК формой гена *NtEXGT*, большинство линий отличилось уменьшением их размеров (рис. 99в). Зацветали трансгенные растения также, как и в случае с кДНК формой целевого гена, немного раньше контрольных растений (рис. 99д). При этом ни одна линия не отличилась изменением размеров цветка (рис. 99г). Микроскопический анализ выявил, что многие линии трансгенных растений характеризуются увеличением размеров клеток эпидермиса листьев и лепестков (рис. 99е). Исходя из этого, можно предположить, что основной причиной увеличения размеров листьев у трансгенных растений было увеличение размеров отдельных клеток. При этом, несмотря на стимулирование роста клеток в лепестках, пропорционального увеличения размеров венчика не происходило. Увеличение размеров клеток, вероятнее всего, вызвано функционированием продукта гена *NtEXGT,* так как хорошо известно, что ферменты XTHs способны стимулировать клеточное растяжение (Miedes et al., 2011). Таким образом, путем

получения трансгенных растений была доказана функциональная полноценность предполагаемого белка NtEXGT.

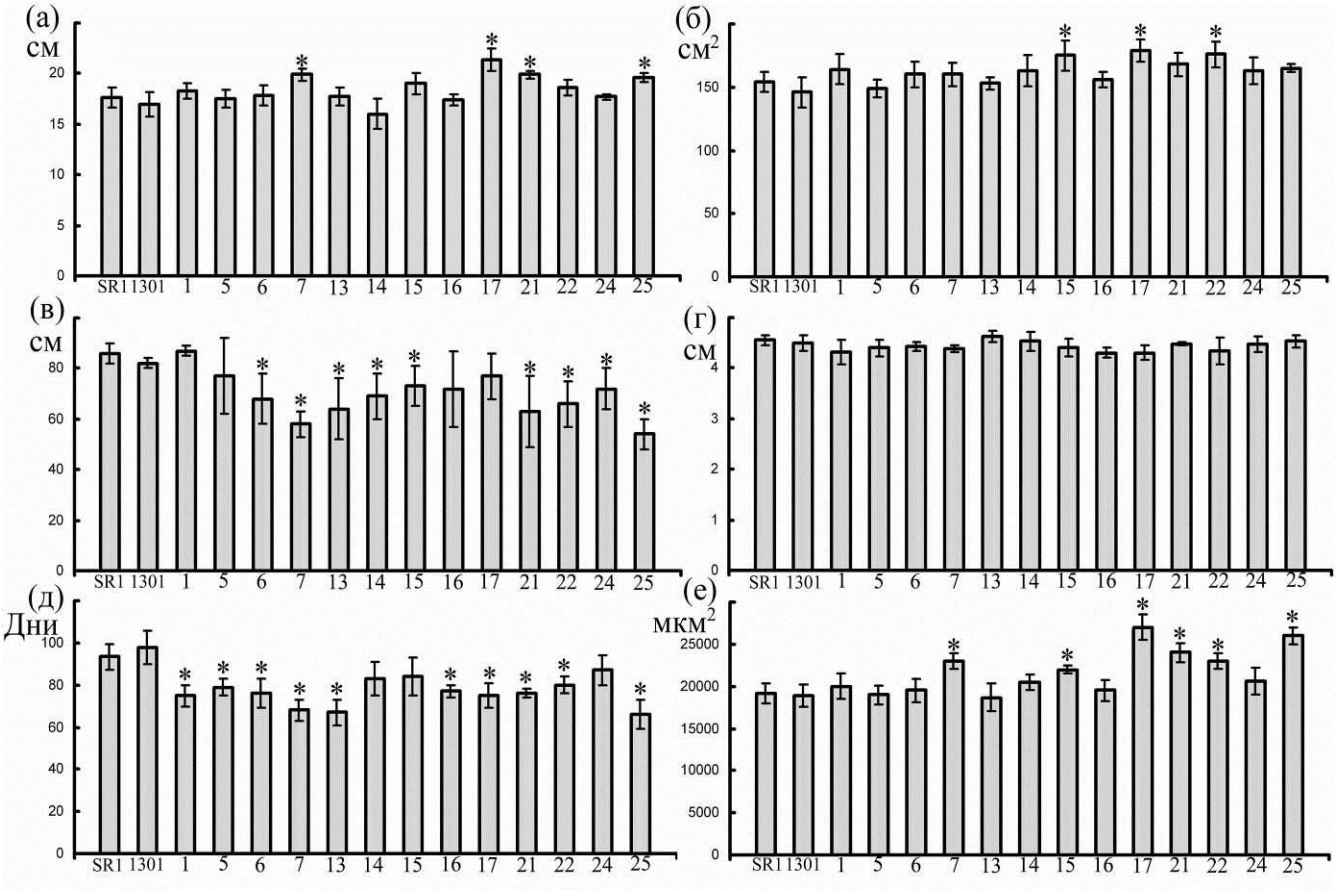


Рис. 99. Морфологическая характеристика трансгенных растений табака, конститутивно экспрессирующих геномную форму гена *NtEXGT*: а – длина листьев, б – площадь листьев, г – высота стебля, д – длина цветков, е – время цветения, ж – площадь клеток наружного эпидермиса лепестков. SR1 – контрольные растения дикого типа, 1301 – контрольные растения, содержащие в геноме Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена, 1-25 – линии трансгенных растений. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

9.1.8. Изменения длины корней трансгенных по гену *NtEXGT* растений табака при действии NaCl

Исходя из наших экспериментальных данных следует, что экспрессия гена *NtEXGT* может изменяться при кратковременных внешних воздействиях (рис. 93, 94). Эта особенность регуляции экспрессии исследуемого гена может быть

полезна при росте корней. Дело в том, что в результате высокой скорости роста клеток корня они попадают в очаги с локальным засолением, что требует соответствующей быстрой реакции растений, необходимой для поддержания клеточного растяжения на нормальном уровне в условиях резкого снижения доступности воды (Веселов и др., 2008). Более того, усиление роста корней является одним из механизмов ответа растения на дефицит влаги (Кошкин, 2010), так как увеличение размеров корня может способствовать достижению растением глубоко залегающих водоносных слоев почвы. В связи с этим, изначально большее содержание продукта гена *NtEXGT* в растении могло способствовать улучшению параметров роста корней в условиях дефицита влаги. Исходя из этого, представляло большой интерес изучение роста корней трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXGT* при воздействии стрессовых факторов, вызывающих дефицит влаги. В данной работе нами был проведен эксперимент по выращиванию проростков контрольных растений (SR1 и 1301) и опытных растений восьми линий на среде МС, содержащей 50 мМ NaCl (рис. 100а). Лишь одна из этих линий трансгенных растений, сверхэкспрессирующих кДНК форму гена *NtEXGT*, отличилась существенным удлинением корней, по сравнению с контролем (рис. 100б). В случае с трансгенными растениями, сверхэкспрессирующими геномную форму гена *NtEXGT*, все анализируемые растения характеризовались более длинными корнями, чем у контрольных растений (рис. 100б). Например, у линии 6 корни были длиннее в среднем на 150%, по сравнению с контролем. Что примечательно, при отсутствии стрессового фактора, длина корней между контролем и опытными растениями достоверно не различалась.

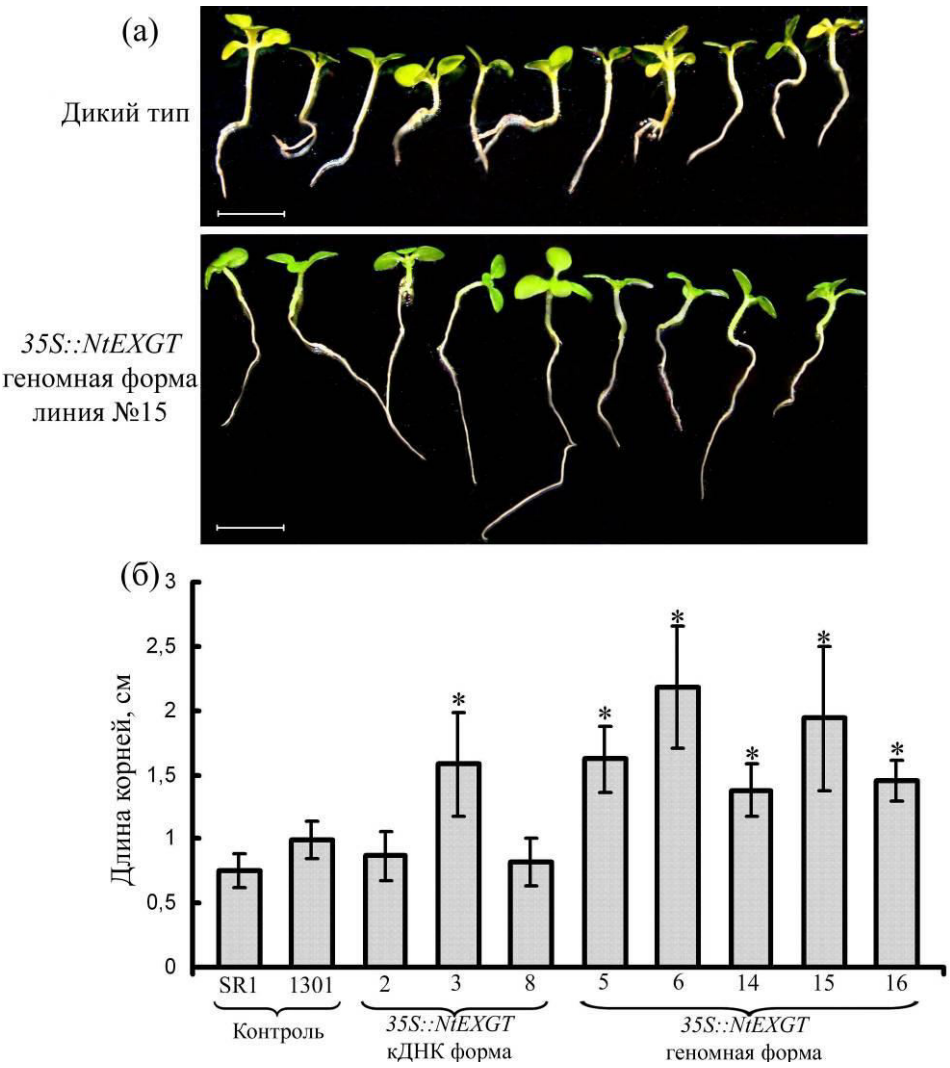


Рис. 100. Длина корней трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген *NtEXGT* при действии NaCl: а - проростки контрольной линии (SR1) и линии 15 через 10 дней проращивания на среде МС, содержащей 50мМ NaCl; б – длина корней контрольных и опытных растений через 10 дней проращивания на среде МС с 50мМ NaCl. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=15; * – $p < 0,05$).

9.1.9. Обсуждение результатов

Ген *NtEXGT* кодирует один из ксилоглюканэндотрансгликозилаз/гидролаз (XTHs) *N. tabacum* и, судя по нашим данным, является ортологом гена *AtXTH4 A. thaliana.* На данный момент ближайшие гомологи гена *NtEXGT* остаются неизученными. Из литературы известно лишь то, что содержание мРНК гена

AtXTH4 повышается под влиянием 1 мкМ брассинолида (Yokoyama, Nishitani, 2001), причем схожие данные нами получены и для гена *NtEXGT*.

Наибольшее содержание мРНК гена *NtEXGT* было характерно для всех органов, интенсивно растущих за счет клеточного растяжения. Исходя из этого, мы предполагаем, что продукт гена *NtEXGT* не является органоспецифичным и участвует в обеспечении клеточного растяжения как в надземной части растения, так и в корнях. О повышении содержания мРНК генов *XTHs* при обработке растений экзогенными ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами хорошо известно (Miedes et al., 2010). Нами же получены данные о том, что уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышается не только под влиянием перечисленных выше фитогормонов, но и при экзогенной обработке цитокининами. Цитокинины принимают участие в регуляции клеточного растяжения (Ron'zhina, 2003), оказывают положительное влияние на экспрессию экспансинов (Downes, Crowell, 1998), однако о влиянии этой группы фитогормонов на уровень экспрессии генов *XTHs* до сих пор имелось мало сведений (Bhargava et al., 2013). Необходимо отметить, что при регуляции экспрессии гена *NtEXGT* особую роль, видимо, играют ауксины, которые повышали уровень содержания транскриптов исследуемого гена во всех анализируемых органах.

Уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышался под влиянием продукта гена *AtARL* и не зависел от уровня экспрессии генов *AtARGOS* и *NtANTL*. Исходя из литературных (Hu et al., 2006) и полученных нами данных, можно предположить, что одним из посредников между брассиностероидами и генами *XTHs* является белок ARL. Несмотря на то, что некоторые транскрипционные факторы, участвующие в регуляции клеточного растяжения, уже известны (Ikeda et al., 2012), особенности регуляции экспрессии генов *XTHs* остаются в основном неизученными. Поэтому нами были начаты исследования в этом направлении, и в рамках настоящего исследования, нами было показано, что, по крайней мере, NtANTL, не является транскрипционным фактором гена *NtEXGT*.

Содержание транскриптов гена *NtEXGT* повышалось в одинаковой степени при действии NaCl, засухи и холода. Все эти стрессовые факторы вызывают дефицит влаги (Кошкин, 2010), поэтому мы предположили, что уровень экспрессии гена *NtEXGT* компенсаторно повышается из-за падения активности фермента NtEXGT в условиях недостатка воды. Отметим, что в литературе имеются сведения о повышении уровня экспрессии экспансинов под влиянием избыточной NaCl (Schipper et al., 2002; Han et al., 2012; Zorb et al., 2013), однако о повышении уровня экспрессии генов *XTHs* в условиях солевого стресса пока имеется очень мало данных (Dong et al., 2011). Ранее также выдвигались предположения, что гены *XTHs* могут принимать участие в обеспечении роста растений в условиях холодового стресса (Purugganan et al., 1997). Нами же было показано, что при действии холода уровень экспрессии гена *NtEXGT* заметно увеличивается, что соотносится с данными литературы (Xu et al., 1996). В связи с этими данными, можно предполагать, что XTHs участвуют в обеспечении роста растений при действии низких положительных температур. В то же время известно, что для ферментов XTHs температурным оптимумом является диапазон 19-37ºC (Maris et al., 2009), поэтому эта группа белков едва ли может эффективно обеспечивать рост клеток растяжением при температурах ниже +10ºC.

Под влиянием кадмия содержание транскриптов гена *NtEXGT* повышалось в гораздо большей степени, чем при действии других стрессовых факторов. Можно предположить, что кадмий способствовал не только развитию дефицита влаги, но и негативно влиял непосредственно на саму структуру фермента NtEXGT, что приводило к компенсаторному увеличению уровня его экспрессии. Действительно, в литературе имеются сведения о снижении активности ферментов при выращивании растений при высоких концентрациях кадмия (Scebba et al., 2006), также известно о негативном воздействии кадмия на структуру ферментов (Grzyb et al., 2012). В то же время, необходимо иметь в виду, что при действии соли, засухи, холода и кадмия растения начинают испытывать окислительный стресс (Кошкин, 2010), что также может способствовать уменьшению активности фермента NtEXGT.

Наибольшие изменения уровня экспрессии гена *NtEXGT* под влиянием стрессовых факторов были характерны для 3-го от верхушки побега листа. Именно в этих листьях повышению содержания транскриптов гена *NtEXGT* способствовал АБК. Исходя из этого и данных литературы (Кошкин, 2010; Gao et al., 2010), можно предполагать, что при воздействии стрессовых факторов именно АБК стимулирует экспрессию гена *NtEXGT*.

Вопреки нашим ожиданиям, конститутивная экспрессия гена *NtEXGT* не способствовала существенному увеличению размеров органов или улучшению параметров роста трансгенных растений при отсутствии стрессовых факторов. Нами были использованы две разные генно-инженерные конструкции, и было получено большое количество линий трансгенных растений, многие из которых фенотипически почти не отличались от табаков дикого типа. Исходя из этих данных, мы делаем вывод, что полученные нами генно-инженерные конструкции не могут быть рекомендованы для увеличения размеров органов трансгенных растений.

Трансгенные растения *35S::NtEXGT* характеризовались повышенной солеустойчивостью благодаря поддержанию клеточного растяжения в корнях на нормальном уровне при действии нелетальных концентраций NaCl. В литературе имеется множество данных о положительном влиянии сверхэкспрессии белков, участвующих в обеспечении клеточного растяжения на солеустойчивость, однако большинство сведений относится к экспансинам. Например, у трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *TaEXPB23* наблюдалась повышенная по сравнению с контролем устойчивость к NaCl, которая достигалась путем повышения способности задержания воды и снижения осмотического потенциала (Han et al., 2012). Трансгенные линии *A. thaliana* с повышенной экспрессией гена *RhEXPA4* имели наиболее приспособленный к дефициту влаги фенотип за счет коротких стеблей, волнистых листьев и компактного соцветия, в то время как линии растений с пониженной экспрессией исследуемого гена имели нормальный фенотип, подобный дикому типу растений (Lu et al., 2013). Что касается генов *XTHs*, то известно, что трансгенные растения

томатов, сверхэкспрессирующие ген *CaXTH3 Capsicum annuum*, характеризовались повышенной солеустойчивостью за счет более длительного сохранения в эксплантах листьев хлорофилла от разрушения и поддержания растяжения корней на нормальном уровне при воздействии NaCl (Choi et al., 2011). Таким образом, нами были получены данные, весьма схожие с результатами Choi с соавторами. В целом, проведенное нами исследование свидетельствует о важности продукта гена *NtEXGT* для обеспечения роста клеток растяжением, как в нормальных условиях, так и в условиях действия стрессовых факторов.

9.2. Роль генов экспансинов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* при регуляции роста и размеров органов табака

К наиболее важным белкам, обеспечивающим рост клеток растяжением, относятся экспансины, в связи с чем эта группа белков все чаще становится объектом исследования в области молекулярной биологии и физиологии растений. Экспансины – это неферментативные белки, способствующие разрыву водородных связей между полимерами клеточной стенки, приводящему к ее релаксации, поступлению воды в центральную вакуоль и увеличению размера клетки (Lee et al., 2001). Данные о том, что экспансины играют важную роль при росте и развитии растений при изменяющихся условиях среды, подтолкнуло исследователей к поиску их генов в разных видах растений, определению их роли в регуляции клеточного растяжения и изучению влияния эктопической экспрессии данных генов на размеры органов и параметры роста растений.

Количество генов экспансинов носит видоспецифический характер, например, в геноме *A. thaliana* идентифицировано 38 генов экспансинов (Li et al., 2002), в рисе (*O. sativa)* обнаружено 28 α- и β-экспансинов (Shin et al., 2005), а в томате (*L. esculentum*) найдено 12 генов экспансинов (Arru et al., 2008). На данный момент остается неясным функциональное значение наличия такого большого количества генов экспансинов в геномах растений. Путем использования трансгенных технологий выявлены корреляции между экспрессией генов

экспансинов и ростом растительных органов (Cho et al., 2000; Choi et al., 2003; Pien et al., 2001; Lee et al., 2003). Эксперименты показали, что изменяя экспрессию отдельных генов экспансинов, можно получить трансгенные растения с измененными размерами вегетативных органов. Хотя исследования генов экспансинов ведутся довольно интенсивно, основные механизмы регуляции экспрессии отдельных генов до сих пор не раскрыты. Известно, что экспрессия экспансинов связана с развитием запрограммированного ответа на стресс путем изменения структуры клеточной стенки (Han et al., 2012). Дефицит влаги, который вызывается такими стрессовыми факторами, как засоление, засуха и холод (Кошкин, 2010), представляет собой серьезную угрозу для сельского хозяйства, так как большинство сельскохозяйственных культур не способно произрастать при действии этих стрессовых факторов. При засолении почвы в листьях и корнях солеустойчивых растений происходит увеличение концентрации ауксинов и АБК. Эти гормональные приспособления создают благоприятные условия для стимуляции экспрессии экспансинов и поддержания ростовых процессов у устойчивых растений в условиях действия стрессового фактора (Zorb et al., 2013). Важно отметить то, что экспрессия экспансинов может изменяться при кратковременных внешних воздействиях. Это указывает на их важную роль в тех быстрых изменениях растяжимости клеточной стенки, которые необходимы растениям для обеспечения роста при изменяющихся условиях среды.

Определение функций тех или иных генов экспансинов, а также молекулярных механизмов регуляции их экспрессии открывает широкие возможности практического применения этих знаний в генной инженерии и биотехнологии растений.

Одним из наиболее удобных модельных объектов генетической инженерии при создании трансгенных растений является табак (*Nicotiana tabacum* L.). На данный момент геном табака не секвенирован, однако, у него идентифицировано шесть генов экспансинов (Link, Cosgrove, 1998), функции которых оставались до сих пор невыясненными. Определение функций данных генов экспансинов могло бы внести ясность в особенности регуляции клеточного растяжения и влияния

этого процесса на размеры органов. В практическом плане большой интерес представляет также изучение экспансинов тополя, так как это пока единственное древесное растение, геном которого секвенирован полностью, а функции большинства его генов до сих пор не раскрыты. К тому же различные виды тополя, в частности, осина (*P. tremula* L.), являются модельными объектами в лесной биотехнологии при создании трансгенных деревьев с измененным уровнем экспрессии различных генов. Однако гены экспансинов тополя будут рассмотрены отдельно в разделе 9.3. Целью же настоящего исследования было изучение вклада отдельных генов экспансинов табака в регуляцию клеточного растяжения при росте органов растений и создание трансгенных растений табака с измененными размерами органов.

9.2.1. Определение филогенетических связей генов экспансинов табака с их гомологами из *A. thaliana*, томатов и тополя

Нами был проведен анализ нуклеотидных последовательностей шести генов экспансинов табака *NtEXPA1-NtEXPA6* с целью выяснения их филогенетических связей с генами экспансинов томатов (12 генов), *A. thaliana* (25 генов) и гибридной осины *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (5 генов). Томат был использован для анализа, так как это единственный представитель семейства пасленовых, у которого довольно интенсивно ведутся исследования генов экспансинов. Гибридная осина была выбрана потому, что из тополей в GenBank имелись нуклеотидные последовательности генов экспансинов именно этого дерева. Важно было также определить схожесть генов экспансинов табака с гомологичными генами модельного растения *A. thaliana*, так как гомология в последовательности нуклеотидов могла указывать на выполнение одинаковых функций. Отметим, что у *A. thaliana* к моменту начала наших исследований было уже изучено несколько генов экспансинов, к тому же сведения о генах *A. thaliana* доступны через различные базы данных, что могло помочь нам интерпретировать полученные в ходе исследования генов табака результаты.

В ходе проведенного нами анализа было выяснено, что наиболее близкими по нуклеотидному составу к гену *NtEXPA1* являются гены *AtEXPA11*, *AtEXPA17* и *AtEXPA12 A. thaliana*, а также гены *LeEXPA11* и *LeEXPA8 Solanum lycopersicum* (рис. 101). Гены *NtEXPA1* и *NtEXPA2* отличались друг от друга лишь по нескольким нуклеотидным заменам и поэтому в литературе приводятся предположения, что они являются ортологами или аллельными вариантами одного и того же гена, происходящих от двух родительских растений *Nicotiana sylvestris* и *Nicotiana tomentosiformis* (Link, Cosgrove, 1998). Действительно, табак является тетраплоидом, который возник при гибридизации *N. sylvestris* и *N. tomentosiformis* (Yukawa et al., 2006), поэтому эти предположения могут оказаться небеспочвенными. Очень близким к генам *NtEXPA1* и *NtEXPA2* оказался ген *NtEXPA3* (рис. 101), поэтому можно было предполагать, что все эти три гена экспансинов, вероятнее всего, выполняют в табаке схожие функции. Исходя из этого, нами было решено изучить только один из генов данной группы, а именно ген *NtEXPA1*, предполагая, что тем самым будут определены предполагаемые функции всех трех генов.

Наибольшей схожестью по последовательности нуклеотидов с геном *NtEXPA4* характеризовались гены *AtEXPA1*, *AtEXPA10*, *AtEXPA15 A. thaliana*, *LeEXPA5* и *LeEXPA10 S. lycopersicum,* а также *PttEXPA3* и *PttEXPA4* гибридной осины. Ген *NtEXPA5* вошел в группу, состоящую из генов *AtEXPA2*, *AtEXPA8 A. thaliana* и *LeEXPA2 S. lycopersicum* (рис. 101). Ген *NtEXPA6* оказался в обособленной группе и наибольшей схожестью с ней характеризовались гены *AtEXPA6 A. thaliana, LeEXPA9* и *LeEXPA18 S. lycopersicum,* а также *PttEXPA1* и *PttEXPA5* гибридной осины.

Отметим, что до начала наших исследований гены экспансинов табака уже подвергались филогенетическому анализу (Gray-Mitsumune et al., 2004), наряду с генами экспансинов многих других растений. Авторами было показано, что гены экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA2* и *NtEXPA3* относятся к субгруппе D, *NtEXPA4* относится к субгруппе C, *NtEXPA5* к субгруппе B, *NtEXPA6* к субгруппе A.

Так как гены *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* располагаются на древе в разных субгруппах, можно предполагать, что в табаке они выполняют несколько разные функции. Исходя из этого, нами в дальнейшей работе было решено исследовать все эти четыре гена экспансина, для выяснения возможного вклада каждого из них в регуляцию роста растений и размеров органов. Планировалось исследовать также несколько генов экспансинов тополя, для этого были отобраны два гена, которые на древе расположились друг от друга довольно далеко, при этом имели предполагаемых ортологов в геноме табака. Таковыми были выбраны ген *PttEXPA1*, схожий с геном *NtEXPA6* и ген *PttEXPA3*, схожий с геном *NtEXPA4* (см. раздел 9.3). В целом, исходя из данных проведенного филогенетического анализа, можно было предполагать, что ген *NtEXPA1* является ортологом гена *AtEXPA11,* ген *NtEXPA4* – ортологом генов *AtEXPA1*, *AtEXPA10* или *AtEXPA15,* ген *NtEXPA5* – ортологом генов *AtEXPA2* или *AtEXPA8,* ген *NtEXPA6* – ортологом гена *AtEXPA6*. Из перечисленных генов *A. thaliana* на момент начала наших исследований были начаты работы лишь по изучению генов *AtEXPA1* (Гао и др., 2010) и *AtEXPA10* (Cho, Cosgrove, 2000), в то время как гены *AtEXPA8, AtEXPA11* и *AtEXPA15* к 2015 году остаются неисследованными.

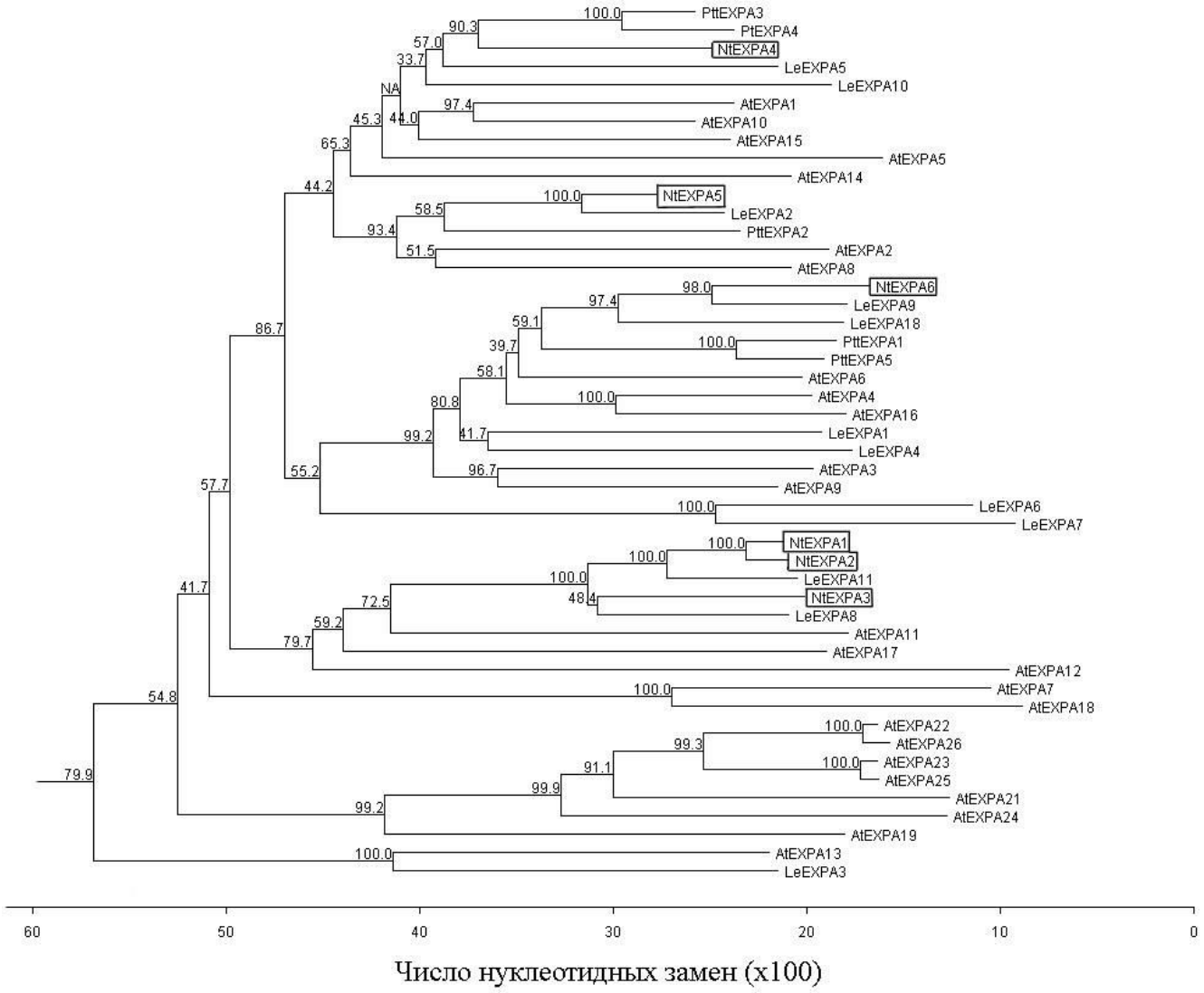


Рис. 101. Филогенетическое древо сходства генов экспансинов табака с гомологами из *A. thaliana*, *S. lycopersicum* и *P. tremula* x *P. tremuloides,* построенное с использованием бутстреп-поддержки (Bootstrap trials=1000, seed=111).

9.2.2. Анализ уровня транскрипции генов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* в различных органах табака дикого типа

Исходя из результатов филогенетического анализа, можно предполагать, что гены экспансинов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* выполняют различающиеся функции. В первую очередь это может быть связано с тем, что каждый из этих экспансинов функционирует, преимущественно, на разных стадиях клеточного растяжения. В результате наших более ранних исследований,

было показано (см. главу 7), что в верхушке побега и первых двух листьях, расположенных возле верхушки побега довольно высок уровень клеточных делений, но происходит также инициация клеточного растяжения, а листья расположенные ниже, растут в основном только за счет увеличения размеров клеток. Именно поэтому представляло большой интерес определение уровня экспрессии генов экспансинов табака в листьях, имеющих разный возраст. В первую очередь был проведен анализ уровня экспрессии генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5.* Наиболее высокий уровень экспрессии генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* был детектирован в листьях №2 и №3, которые, судя по всему, наиболее интенсивно растут за счет клеточного растяжения (рис. 102а, б, в). В листьях №6 и семядольных листьях уровень экспрессии всех трех генов был довольно низким, что, видимо, является отражением прекращения роста листа табака на 6-7-м уровне от верхушки побега. Отличие между генами *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* заключалось в том, что уровень экспрессии первого из них резко уменьшался уже в листе №5, тогда как два последних гена в этом листе экспрессировались еще на довольно высоком уровне (рис. 102а, б, в). Отметим также, что в листе №6 уровень содержания транскриптов гена *NtEXPA5* был выше, чем у генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*. В целом, в листьях табака наиболее высокий уровень содержания транскриптов был характерен для гена *NtEXPA4*, затем гена *NtEXPA5,* наименьший уровень экспрессии был характерен для гена *NtEXPA1*. Но еще более низкий уровень экспрессии был выявлен для гена *NtEXPA6* (рис. 102г). Этот ген экспрессировался лишь в верхушке побега и в трех листьях, расположенных возле него. Причем уже в листе №3 уровень экспрессии гена *NtEXPA6* резко падал и в листьях расположенных ниже, совсем не детектировался. Таким образом, в целом, по уровню содержания транскриптов в листьях гены экспансинов табака расположились в следующий ряд: *NtEXPA4* > *NtEXPA5* > *NtEXPA1* > *NtEXPA6,* где последний характеризовался наименьшим уровнем транскрипции.

Одной из задач данной работы была также попытка разделения функций генов экспансинов по различным стадиям клеточного растяжения. Судя по нашим

данным, в верхушке побега и листе №1 табака, где высок уровень клеточных делений, происходят начальные стадии роста клеток растяжением, связанные с инициацией этого процесса, а в листьях №5 и №6 - последние стадии, тогда как листья, расположенные ниже совсем перестают расти. Действительно, по крайней мере, для корней было показано, что клеточное растяжение инициируется уже на уровне меристематических клеток (Козлова и др., 2012). Исходя из этого, гипотетический ряд генов экспансинов табака, по стадиям роста клеток растяжением выглядит так: *NtEXPA6 – NtEXPA1 – NtEXPA4 – NtEXPA5,* где первый преимущественно участвует на начальных стадиях клеточного растяжения, а ген *NtEXPA5* - на последних стадиях.

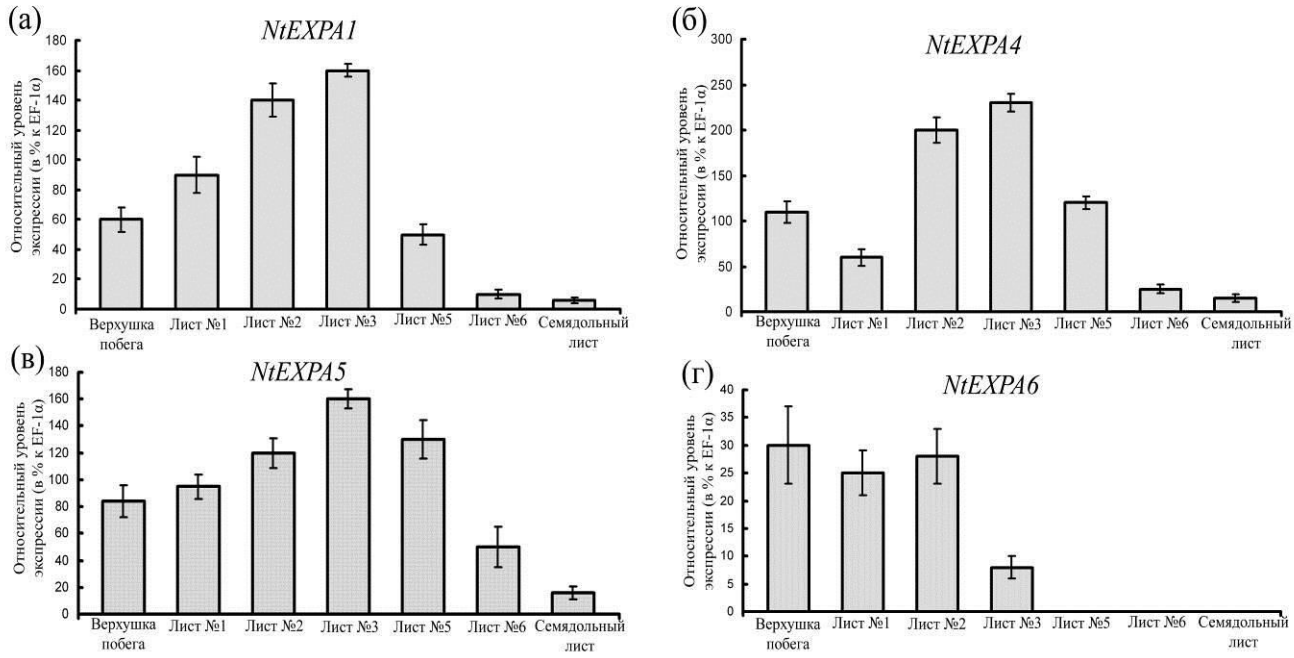


Рис. 102. Количественный анализ уровня экспрессии генов *NtEXPA1*(а), *NtEXPA4* (б), *NtEXPA5* (в) и *NtEXPA6* (г) в органах табака различного возраста.

Хорошо известно, что каллус состоит из недифференцированных клеток и характеризуется высоким уровнем клеточных делений. Но судя по данным литературы (Blackman, Overall, 1995) можно предполагать, что в каллусе также происходят начальные стадии клеточного растяжения, связанные с инициацией этого процесса. Поэтому значительный интерес представляло определение уровня

экспрессии генов экспансинов табака в листьях и каллусе, полученном из этого листа. Уровень экспрессии генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* в каллусе действительно уменьшался, по сравнению с листом №5, что является отражением уменьшения уровня роста клеток растяжением (рис. 103). Однако уровень экспрессии этих генов при этом уменьшался не очень значительно, так как для анализа был взят лист №5, в котором содержание транскриптов генов экспансинов изначально было не самым высоким (рис. 102). Что касается гена *NtEXPA6*, то как и в предыдущем исследовании транскрипты данного гена в листе №5 не обнаруживались, однако в каллусе его уровень экспрессии был даже выше, чем у генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* (рис. 103). Отметим, также, что в каллусе, по сравнению с листом №5 наиболее значительно падал уровень экспрессии гена *NtEXPA5*, менее значительно гена *NtEXPA4*, а содержание транскриптов гена *NtEXPA1* изменялось в наименьшей степени (рис. 103). Таким образом, исходя из данных этого исследования, можно также привести тот же гипотетический ряд: *NtEXPA6 – NtEXPA1 – NtEXPA4 – NtEXPA5*, где первые два гена отвечают за начальные стадии роста клеток растяжением, а гены *NtEXPA4* и *NtEXPA5* за последующие стадии роста клеток растяжением. Можно было бы предположить, что в этом гипотетическом ряду экспансинов, они располагаются в сторону уменьшения размеров белка: NtEXPA6 (?) → NtEXPA1 (257 а.о) → NtEXPA4 (250 а.о) → NtEXPA5 (207 а.о). Однако на данный момент ген *NtEXPA6* остается секвенированным не полностью, и делать однозначные выводы нельзя. Действительно, к примеру, размер ближайшего к NtEXPA6 экспансина LeEXPA9 составляет 258 а.о. и можно предполагать, что их размеры ненамного отличаются.

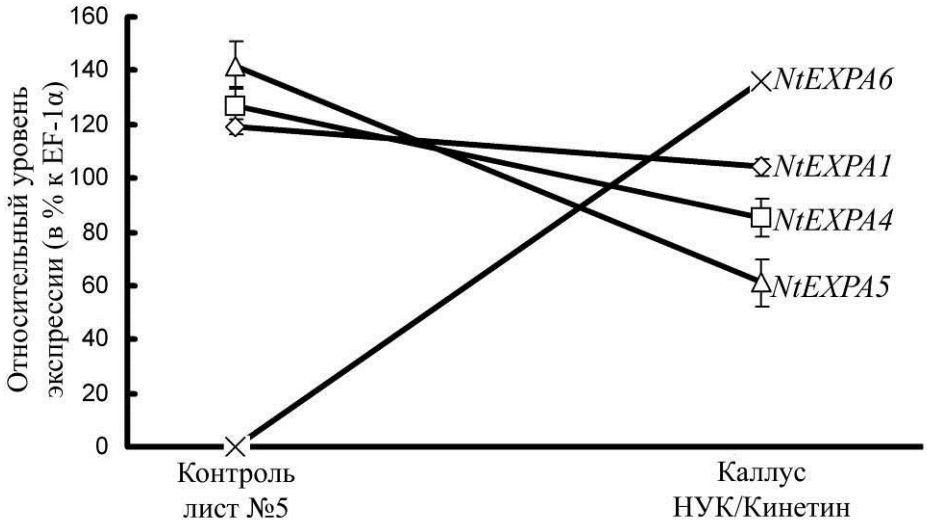


Рис. 103. Количественный анализ уровня экспрессии генов экспансинов табака в листьях №5 и каллусе, полученном из этого листа.

В литературе имеются сведения о том, что некоторые экспансины экспрессируются преимущественно в корнях, то есть являются корнеспецифичными (Lee et al., 2002; Lee et al, 2003; Lin et al., 2011). Все исследуемые нами гены экспансинов в надземной части растения экспрессировались, но представляло определенный интерес проведение сравнительного анализа их экспрессии в корнях и листьях табака. В ходе проведенного исследования, было показано, что уровень транскрипции генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* в корнях гораздо ниже, чем в листьях №3 (рис. 104). В то же время, из этих трех генов уровень транскрипции гена *NtEXPA1* уменьшался в корнях в меньшей степени, чем генов *NtEXPA4* и *NtEXPA5.* Наиболее интересные данные были получены для гена *NtEXPA6*. Было показано, что уровень его транскрипции в корнях выше, чем в листьях №3 (рис. 104). Отметим, что в корнях содержание транскриптов гена *NtEXPA6* было сравнимо с его содержанием в верхушке побега и листьях №2 (рис. 102г). Таким образом, нами было показано, что уровень экспрессии гена *NtEXPA6* наиболее высок в каллусе, верхушке побега и в корнях. В целом, ни один из исследуемых нами генов экспансинов не может быть назван корнеспецифичным. Это, видимо, связано с тем, что все 6 секвенированных генов экспансинов табака были

выделены из суспензионной культуры клеток, полученной из листьев (Link, Cosgrove, 1998). В то же время, учитывая данные о большом количестве генов экспансинов в геномах секвенированных растений, большинство генов экспансинов табака остаются пока неидентифицированными и среди них могут оказаться и корнеспецифичные варианты.

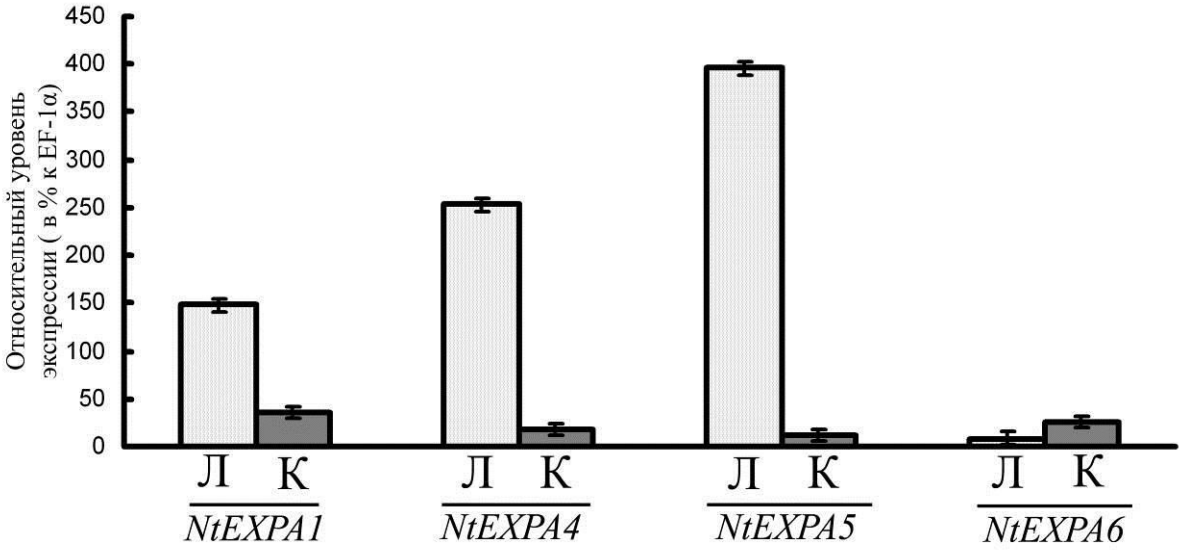


Рис. 104. Количественный анализ уровня экспрессии генов экспансинов табака в листьях №3 и в корнях. Л – листья, К – корни.

9.2.3. Изменения уровня транскрипции генов экспансинов табака в ответ на экзогенную обработку цитокининами, ауксинами, брассиностероидами и гиббереллинами

Приблизить к пониманию вклада исследуемых генов в обеспечение роста, может определение их уровня транскрипции в различных органах растения в ответ на экзогенную обработку фитогормонами, которые согласно данным литературы участвуют в регуляции их экспрессии (см. главу 3). Исходя из того, что уровень экспрессии генов экспансинов табака изменялся в процессе развития листьев (рис. 102), мы предположили, что при обработке экзогенными фитогормонами изменения содержания их транскриптов также могут отличаться в зависимости от возраста органа. Поэтому нами было проведено исследование

уровня транскрипции генов экспансинов отдельно в верхушке побега с листом №1, листе №2, листе №5 и листе №8. Отметим, что, например, в листьях №5 наблюдается довольно высокий уровень содержания эндогенных цитокининов и ауксинов (рис. 18, глава 7), однако несмотря на это, уровень экспрессии экспансинов в этом листе резко снижался (рис. 102). Согласно нашим предварительным данным, в листе №8 уровень экспрессии генов экспансинов был еще более низким или совсем не детектировался. Однако представляло интерес, способны ли экзогенные фитогормоны стимулировать экспрессию генов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6* в листьях №8, то есть в листьях, полностью прекративших свой рост. Ответ на этот вопрос имел не только значение для фундаментальных исследований, но и прикладной аспект, касающийся возможности использования экзогенных фитогормонов в качестве биостимуляторов роста органов.

Анализ показал, что в верхушке побега уровень экспрессии гена *NtEXPA1* под влиянием экзогенных фитогормонов увеличивается незначительно, при этом стимулирующим эффектом обладали БАП, НУК и ЭБ (рис. 105а). В листьях №2 и №5 цитокинины, ауксины и гиббереллины способствовали увеличению содержания транскриптов гена *NtEXPA1,* тогда как брассиностреоиды, наоборот, уменьшали уровень экспрессии данного гена (рис. 105б, в). В листьях №8 уровень экспрессии гена *NtEXPA1* был очень низким и не повышался даже под влиянием экзогенных фитогормонов (рис. 105 г).

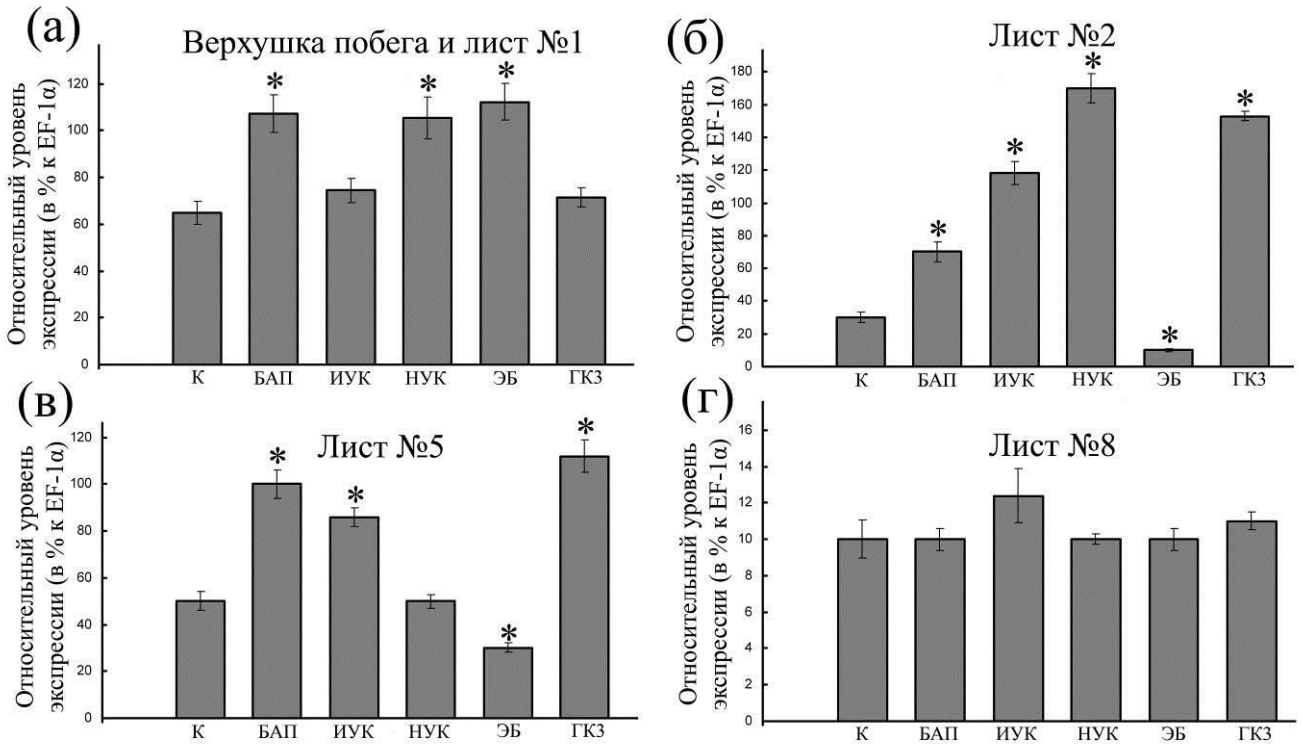


Рис. 105. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXPA1* в ответ на экзогенную обработку фитогормонами в верхушке побега с листом №1 (а), листе №2 (б), листе №5 (в) и листе №8 (г). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

Уровень экспрессии гена *NtEXPA4* существенно увеличивался в ответ на экзогенную обработку цитокининами во всех проанализированных органах табака (рис. 106). Содержание транскриптов гена *NtEXPA4* также повышалось, но менее существенно, под влиянием экзогенных ауксинов и гиббереллинов во всех проанализированных органах (рис. 106). Таким образом, в отличие от гена *NtEXPA1,* ген *NtEXPA4* оставался доступным для стимуляции его экспрессии даже в листьях, прекративших свой рост. Брассиностероиды лишь немного увеличивали уровень содержания трансркиптов гена *NtEXPA4* только в листьях №5 и №8 (рис. 106). В целом, эти данные в чем-то совпали с нашими более ранними результатами, полученными при исследовании трансгенных растений *35S::CLV3* (рис. 22). В связи с полученными данными, можно делать выводы, что ген *NtEXPA4* является преимущественно цитокинин-индуцируемым.

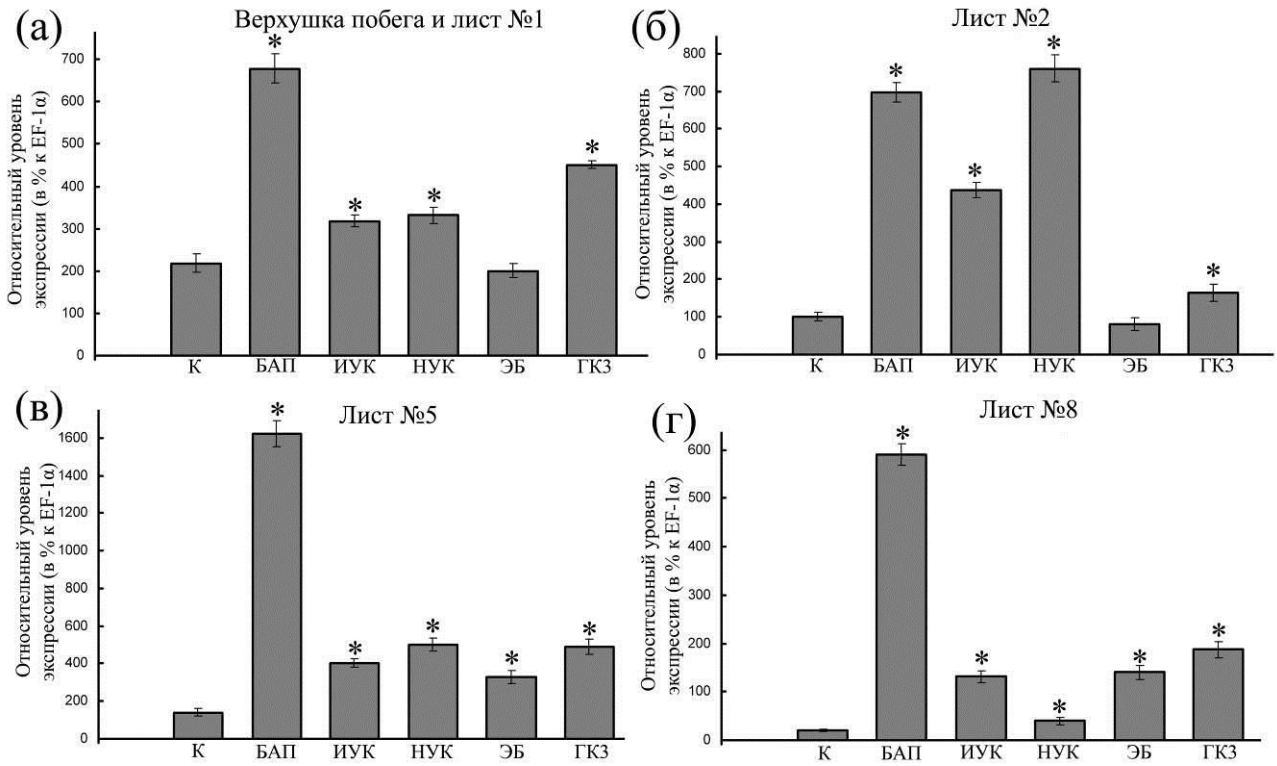


Рис. 106. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXPA4* в ответ на экзогенную обработку фитогормонами в верхушках побега с листом №1 (а), листьях №2 (б), листьях №5 (в) и листьях №8 (г). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

В верхушке побега уровень экспрессии гена *NtEXPA5* в ответ на экзогенные фитогормоны изменялся незначительно (рис. 107а). Брассиностероиды, при этом, способствовали уменьшению уровня экспрессии гена *NtEXPA5.* В листе №2 экспрессию гена *NtEXPA5* стимулировали цитокинины и ауксины (рис. 107б), тогда как в листьях №5 и №8 кроме этих фитогормонов, стимулирующим эффектом обладали также гиббереллины (рис. 107 в, г). Таким образом, экспрессия гена *NtEXPA5* также как и гена *NtEXPA4,* оставалась доступной для стимуляции фитогормонами даже в листьях, полностью прекративших свой рост. Интересно отметить, что наибольшее влияние на уровень экспрессии всех трех генов экспансинов гиббереллины оказывали в листе №5 (рис. 105в, 106в, 107в).

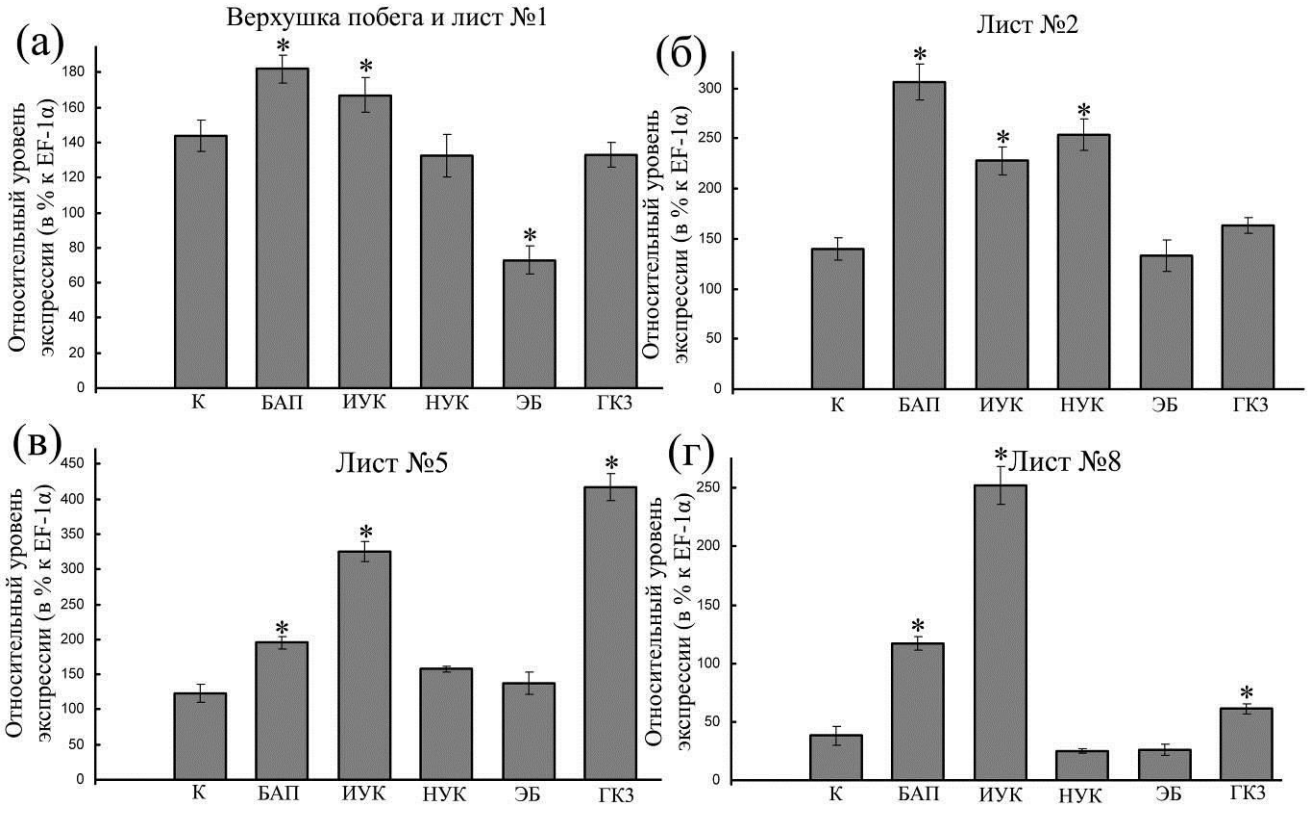


Рис. 107. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXPA5* в ответ на экзогенную обработку фитогормонами в верхушках побега с листом №1 (а), листьях №2 (б), листьях №5 (в) и листьях №8 (г). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

Ген *NtEXPA6,* как и в нашем предыдущем исследовании (рис. 102г), экспрессировался на низком уровне в верхушках побега и листьях №2, а в листьях №5 и №8 его транскрипты совсем не детектировались. В ответ на экзогенную обработку фитогормонами уровень экспрессии гена *NtEXPA6* повышался в верхушке побега и листьях №2 при использовании цитокининов и ауксинов (рис. 108). В листьях №5 и №8 транскрипты гена *NtEXPA6* не обнаруживались даже при экзогенной обработке фитогормонами. В ответ на обработку 24-эпибрассинолидом в листе №2 уровень экспрессии гена *NtEXPA6* снижался.

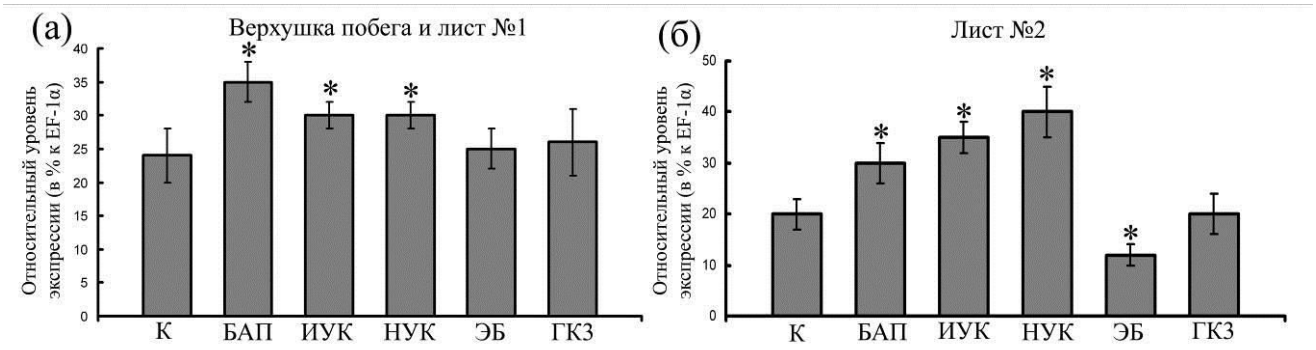


Рис. 108. Изменения уровня экспрессии гена *NtEXPA6* в ответ на экзогенную обработку фитогормонами в верхушках побега с листом №1 (а) и листьях №2 (б). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

9.2.4. Анализ изменений уровня транскрипции генов экспансинов под влиянием избыточной NaCl, холода и «стрессовых» фитогормонов

По аналогии с исследованием гена *NtEXGT*, была поставлена задача изучить уровень экспрессии генов экспансинов в ответ на действие NaCl, низких положительных температур и «стрессовых» фитогормонов (см. раздел 9.1.4).

При выращивании табака дикого типа на гидропонике, было показано, что уровень экспрессии генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* повышается при содержании NaCl в среде от 20 мМ, по крайней мере, в течение первых двух часов инкубации. Причем увеличение уровня экспрессии исследуемых генов было зафиксировано и при более высоких концентрациях NaCl, даже при содержании соли в 350 мМ, что превышает летальную концентрацию для табака (Binzel et al., 1985). Однако при действии еще более высокой концентрации соли (850 мМ) уровень экспрессии генов экспансинов уже не повышался, а даже начинал снижаться (рис. 109). В то же время, уровень экспрессии гена *NtEXPA6* практически не зависел от содержания соли в среде, по крайней мере, в течение первых двух часов инкубации (рис. 109).

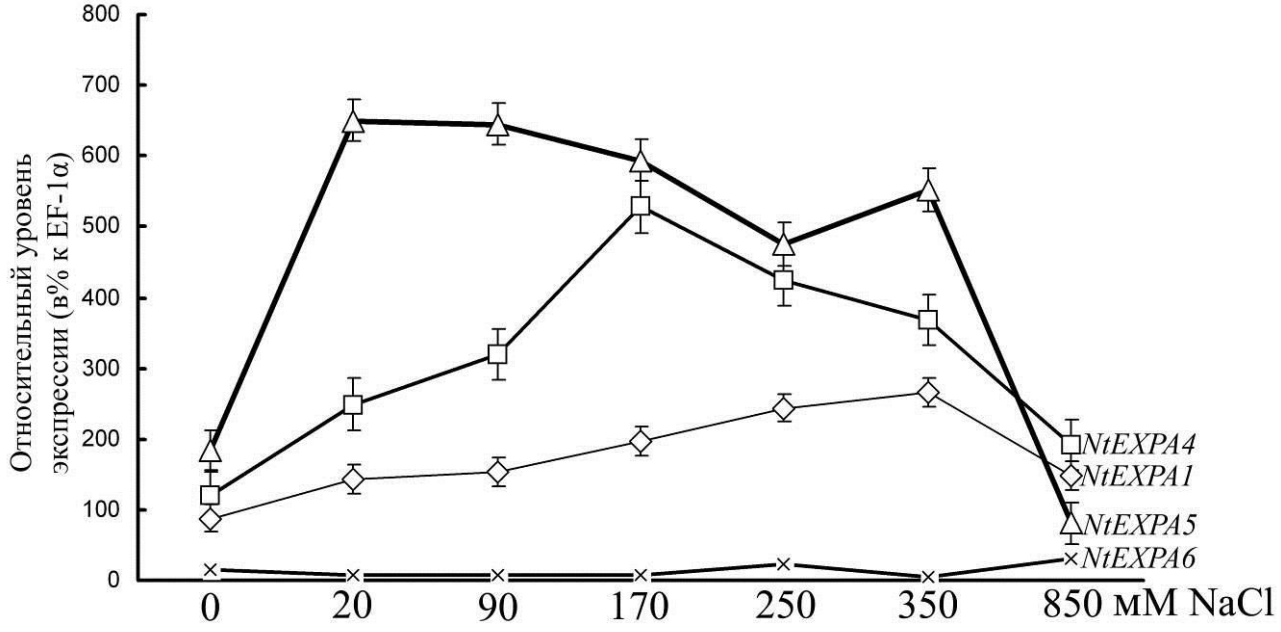


Рис. 109. Изменения уровня экспрессии генов экспансинов табака в листьях №3 в ответ на двухчасовую инкубацию в NaCl в условиях гидропоники.

Интересно отметить, что в листьях табака, росших на почве и не поливавшихся в течение 2 дней, уровень содержания транскриптов генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* был больше в среднем в 2 раза, чем в листьях табака, росших на гидропонике (рис. 110), что может свидетельствовать об участии экспансинов в регуляции устойчивости к стрессам, вызванным не только избытком NaCl, но и дефицитом влаги в целом. В то же время, уровень экспрессии генов *NtEXPA5* и *NtEXPA6* при выращивании на почве не повышался при сравнении с данными, полученными на гидропонике.

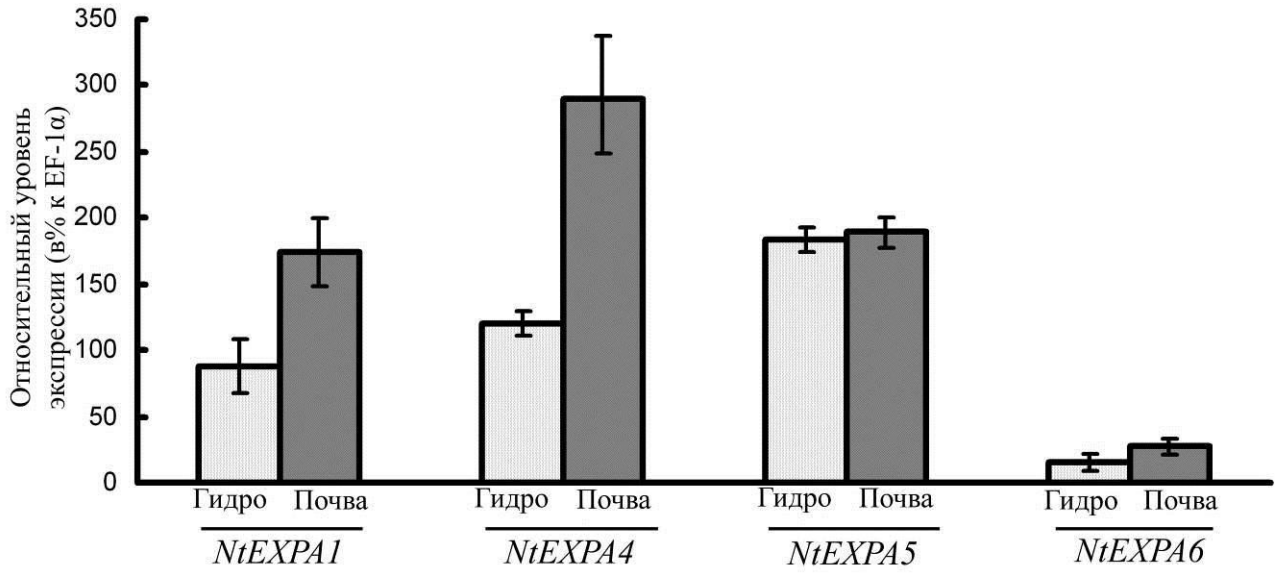


Рис. 110. Изменения уровня экспрессии генов экспансинов в листьях №3 при выращивании табака на гидропонике и почве. Гидро – гидропоника.

Далее нами были проведены определения содержания транскриптов генов экспансинов табака в листьях №3 при воздействии низкой положительной температуры +10ºС. Так как ранее на примере гена *NtEXGT* наиболее существенные изменения в уровне его экспрессии нами были выявлены при воздействии холода в течение 8-ми часов (рис. 94), в данной работе было решено использовать именно такое время инкубации. Итак, через 8 часов действия холода в листьях №3 существенно повышался уровень экспрессии всех исследуемых генов экспансинов (рис. 111). При этом наиболее существенно (в среднем в 4 раза) возрастало содержание транскриптов генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*.

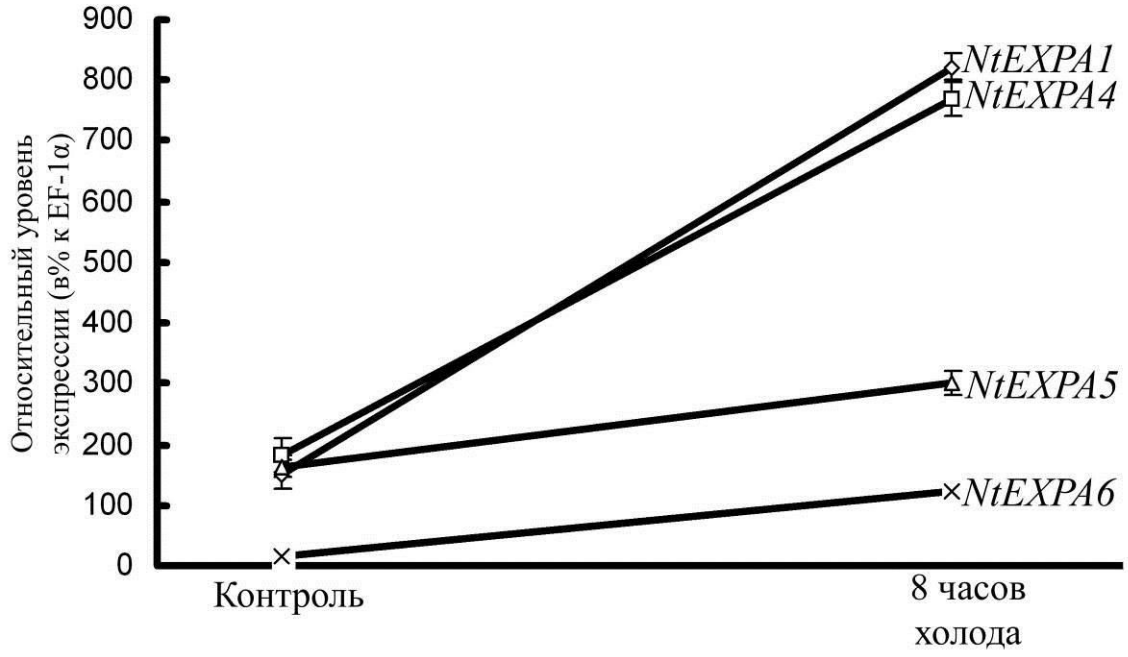


Рис. 111. Изменения уровня экспрессии генов экспансинов при воздействии температуры +10ºС в течение 8 часов в листьях №3.

Исходя из того, что уровень экспрессии генов экспансинов повышался примерно в одинаковой степени при действии соли, засухи и холода, мы предполагаем, что основной причиной этих изменений является дефицит влаги. Действительно в литературе имеются сведения о том, что при действии всех этих трех стрессовых факторов ограничивается, прежде всего, доступ к влаге (Кошкин, 2010). Более того, в литературе также имеются сведения об увеличении уровня экспрессии генов экспансинов при действии соли и засухи (Schipper et al., 2002; Han et al., 2012; Zorb et al., 2013). Однако все эти неблагоприятные факторы среды объединяет еще и окислительный стресс (Кошкин, 2010). Поэтому увеличение уровня экспрессии генов экспансинов при действии неблагоприятных факторов среды может быть связано с противодействием окислительному стрессу. Например, при окислительном стрессе повышается содержание в клетке свободных радикалов (Кошкин, 2010), которые, возможно, негативно влияют на экспансины, способствуя их быстрому разрушению. Поэтому растению приходится компенсировать действие данного стрессового фактора путем

повышения уровня экспрессии различных белков, в том числе экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз (см. раздел 9.1).

В регуляцию клеточных ответов к стрессовым факторам, вызывающим дефицит влаги, и в частности, к высокому содержанию NaCl в среде, вовлечена АБК (Novikova et al., 2009, Gao et al., 2010). Хорошо известно, что при действии засухи, ПЭГ-индуцированного водного дефицита, NaCl и холода в листьях многократно повышается уровень содержания АБК (Plant et al., 1991; Dunlap, Binzel, 1996), которая, возможно и стимулирует через систему клеточной сигнализации экспрессию генов экспансинов. Для проверки этого предположения нами был проведен анализ изменений содержания транскриптов исследуемого гена под влиянием АБК. Для доказательства того, что стресс-индуцированное накопление транскриптов генов экспансинов может быть преимущественно ассоциированным с АБК, нами было решено использовать еще один «стрессовый» фитогормон – метилжасмонат (МеЖ).

Для количественного анализа был взят лист №3, так как нами было показано, что именно в этом листе наблюдается наиболее обильное содержание транскриптов генов экспансинов (рис. 102). Проведенный анализ показал, что содержание транскриптов генов экспансинов под влиянием экзогенного МеЖ в листьях №3 достоверно не изменяется ни в сторону увеличения, ни в сторону уменьшения (рис. 112). При действии экзогенной АБК в листьях №3 повышается уровень экспрессии генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* (рис. 112а, б. в). Итак, именно в листе №3 содержание транскриптов генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* повышалось под влиянием соли, засухи, холода и экзогенной АБК, что наталкивает на мысль, что все эти изменения связаны между собой. В то же время уровень экспрессии гена *NtEXPA6* под влиянием экзогенной АБК, наоборот снижался (рис. 112г), к тому же напомним, что уровень экспрессии этого гена при действии соли и засухи не изменялся. Необходимо, отметить, что в данном случае профиль экспрессии гена *NtEXPA6* поразительно напоминает таковой у гена *NtANTL*, который также экспрессируется в самых молодых органах, не реагирует на стрессовые факторы и уровень его экспрессии также снижался под влиянием

АБК (см. раздел 7.2.1). Возможно, это связано с тем, что продукт гена *NtEXPA6,* также как и транскрипционный фактор NtANTL функционирует в основном в меристематических, недифференцированных клетках.

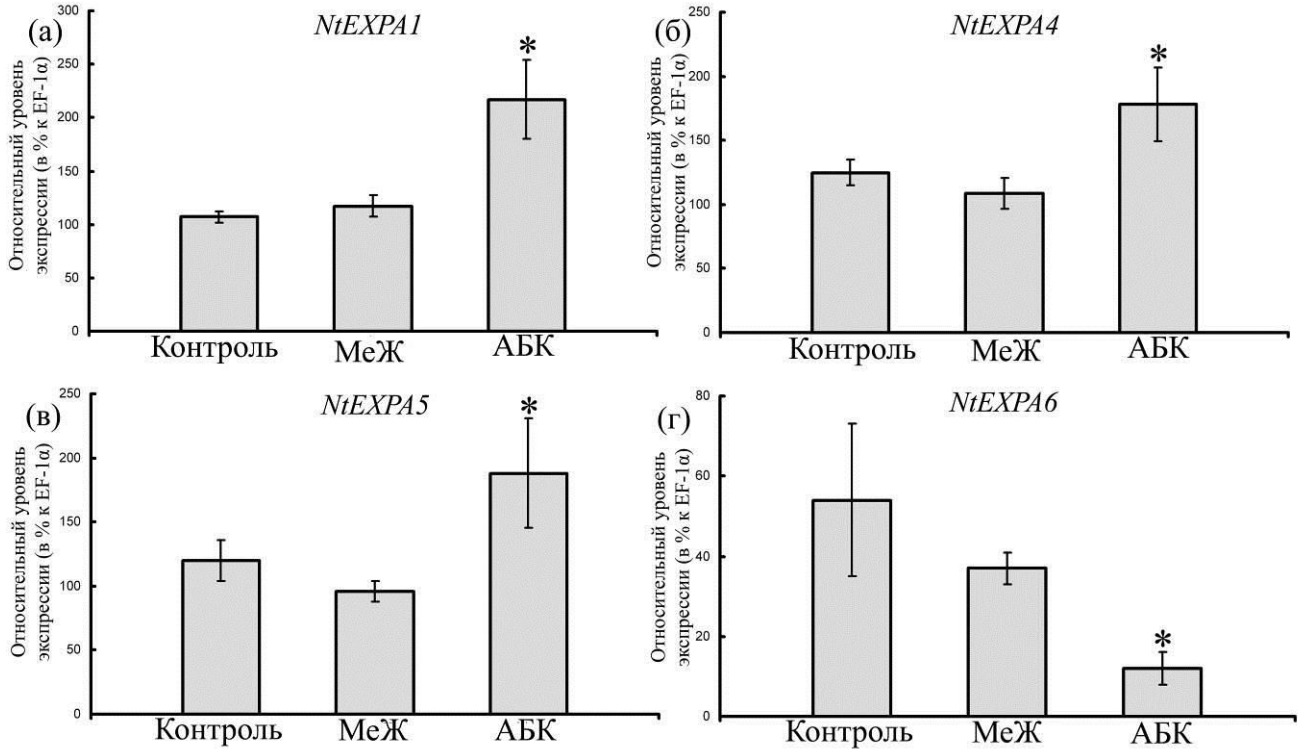


Рис. 112. Изменения уровня экспрессии генов экспансинов под влиянием стрессовых фитогормонов в листьях №3. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=3; * – $p < 0,05$).

9.2.5. Влияние индуцибельной экспрессии гена *AtARL* на изменение уровня транскрипции генов экспансинов табака

Ранее у *A. thaliana* был выделен и изучен ген *AtARL*, продукт которого регулирует клеточное растяжение (см. главу 8). Под влиянием внешнего воздействия наиболее существенно менялся уровень транскрипции генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*. Поэтому нам было интересно исследовать, как повышенная экспрессия гена *AtARL* способна влиять на уровень транскрипции генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*. В связи с этим, нами были созданы трансгенные растения табака, с индуцибельной экспрессией гена *AtARL* под контролем XVE-эстрадиол-индуцибельной системы (Zuo et al., 2000). Экзогенный эстрадиол запускал экспрессию гена *AtARL* и, соответственно, способствовал увеличению размеров

клеток и вегетативных органов трансгенных растений табака (см. раздел 8.3). Используя ОТ-ПЦР в реальном времени, мы определили уровень содержания мРНК генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в данных растениях. Было установлено, что в пятом от верхушки побега листе (лист №5) уровень экспрессии гена *NtEXPA1* повышался в 1,7 раза, а гена *NtEXPA4,* наоборот, снижался в 1,2 раза под влиянием индуцибельной экспрессии гена *AtARL* (рис. 113).

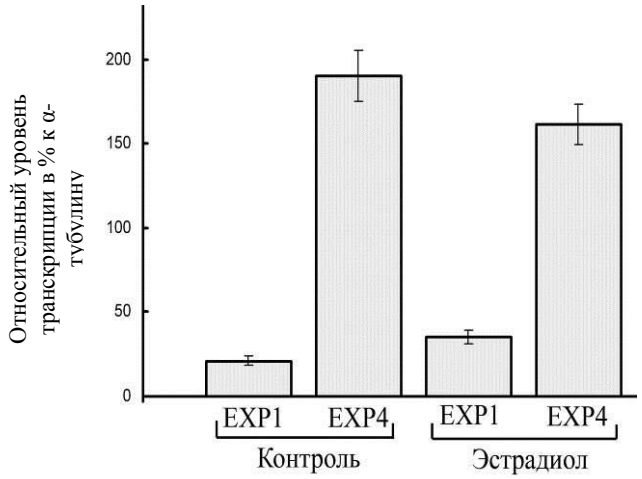


Рис. 113. Уровень транскрипции генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* при индуцибельной экспрессии гена *AtARL.* EXP1 – *NtEXPA1,* EXP4 – *NtEXPA4.* Контроль – растения, обработанные раствором ДМСО (0,1%) и сильвета (0,05%%) без эстрадиола. Эстрадиол – растения, обработанные 5 мкМ раствором эстрадиола (0,1% ДМСО, 0,05% сильвет)

Полученные нами данные очередной раз подтверждают, что гены экспансинов и белков с OSR-доменом взаимосвязаны в системе клеточной сигнализации. Из литературных данных следует, что повышенный уровень экспрессии гена *AtARL* может способствовать стимуляции экспрессии генов экспансинов (Wang et al., 2009b). Однако вопреки ожиданиям, *AtARL* увеличивал уровень экспрессии одного экспансина и уменьшал его у другого экспансина. Это говорит о существовании более сложных взаимоотношений между экспансинами и белками с OSR-доменом в системе клеточной сигнализации. Таким образом, два исследованных нами гена экспансина имеют, вероятнее всего, разные по строению промоторы и действительно, скорее всего, выполняют различные функции при регуляции роста органов табака. Напомним, что ген *AtARL* является

брассиностероид-индуцибельным (Hu et al., 2006). Это может говорить о том, что брассиностероиды регулируют экспрессию генов экспансинов через OSR-белки. В наших исследованиях понижать уровень экспрессии генов экспансинов был способен лишь 24-эпибрассинолид (рис. 105, 107), все остальные фитогормоны или повышали уровень экспрессии генов экспансинов или не оказывали на него влияние. В случае с индуцибельной экспрессией гена *AtARL* нами также были получены данные о снижении уровня экспрессии одного из генов экспансинов. Исходя из этих данных, можно предполагать, что брассиностероиды совместно с OSR-белками задействованы в более тонкой регуляции экспрессии экспансинов, в отличие от цитокининов, ауксинов и гиббереллинов, которые были способны лишь повышать уровень экспрессии генов экспансинов.

9.2.6. Получение и морфологический анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA1*

Для определения влияния исследуемых экспансинов на рост клеток растяжением и доказательства функциональной полноценности их генов, нами была поставлена задача создания трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией генов экспансинов. В первую очередь были созданы трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA1* под контролем промотора ВМГ.

В целях создания трансгенных растений в векторе pCambia1301, содержащей промотор ВМГ и сайт 35S PolyA, была клонирована геномная копия гена *NtEXPA1*. Процедура клонирования гена *NtEXPA1* была аналогичной той, что описана в разделе 8.2.4. При помощи полученной генно-инженерной конструкции была проведена трансформация табака. В целом было получено 26 линий трансгенных растений табака, из которых для морфологического анализа были отобраны линии под номерами 1, 6, 7, 8, 11, 13, 15 и 20 с подтвержденным повышенным уровнем экспрессии целевого гена. Удлинение листьев было

характерно для линий 1, 7, 15 и 20 (рис. 114а), причем степень увеличения длины листьев достигла 30% по сравнению с контролем для линии 7 (рис. 114а). По площади листьев также многие трансгенные растения характеризовались их увеличением, в среднем, от 7% у линии 13 до 51% у линии 7 (рис. 114б). Достоверное увеличение высоты стебля было зафиксировано для линий 1, 7 и 11 (рис. 114в). Причем высота стебля трансгенных растений была в среднем на 23% выше стебля контрольных растений (для линии 7). Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA1* не способствовала увеличению размеров цветков (рис. 114г). Наоборот, для линий 1 и 8, где была высокая активность транскрипции этого гена, было зафиксировано достоверное уменьшение длины венчика цветков. По размерам семенных коробочек контрольные и опытные растения достоверно не различались.

Для выяснения возможных причин морфологических изменений были проведены измерения площади клеток эпидермиса листьев контрольных и трансгенных растений (рис. 114д). Было показано, что у растений линий 1, 7, 11, 15 и 20 размер клеток эпидермиса листьев по сравнению с контролем увеличен (рис. 114д). Увеличение размеров клеток положительно коррелировало с изменением в размерах листьев. В связи с этим можно предположить, что основной причиной такого явления была стимуляция роста клеток растяжением продуктом гена *NtEXPA1*. Площадь клеток эпидермиса цветков у опытных растений также возрастала по сравнению с контролем (рис. 114е), однако соответствующего увеличения размеров цветков не происходило, что может являться отражением функционирования в растениях компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение количества клеток в органе и препятствующих существенным изменениям размеров цветка.

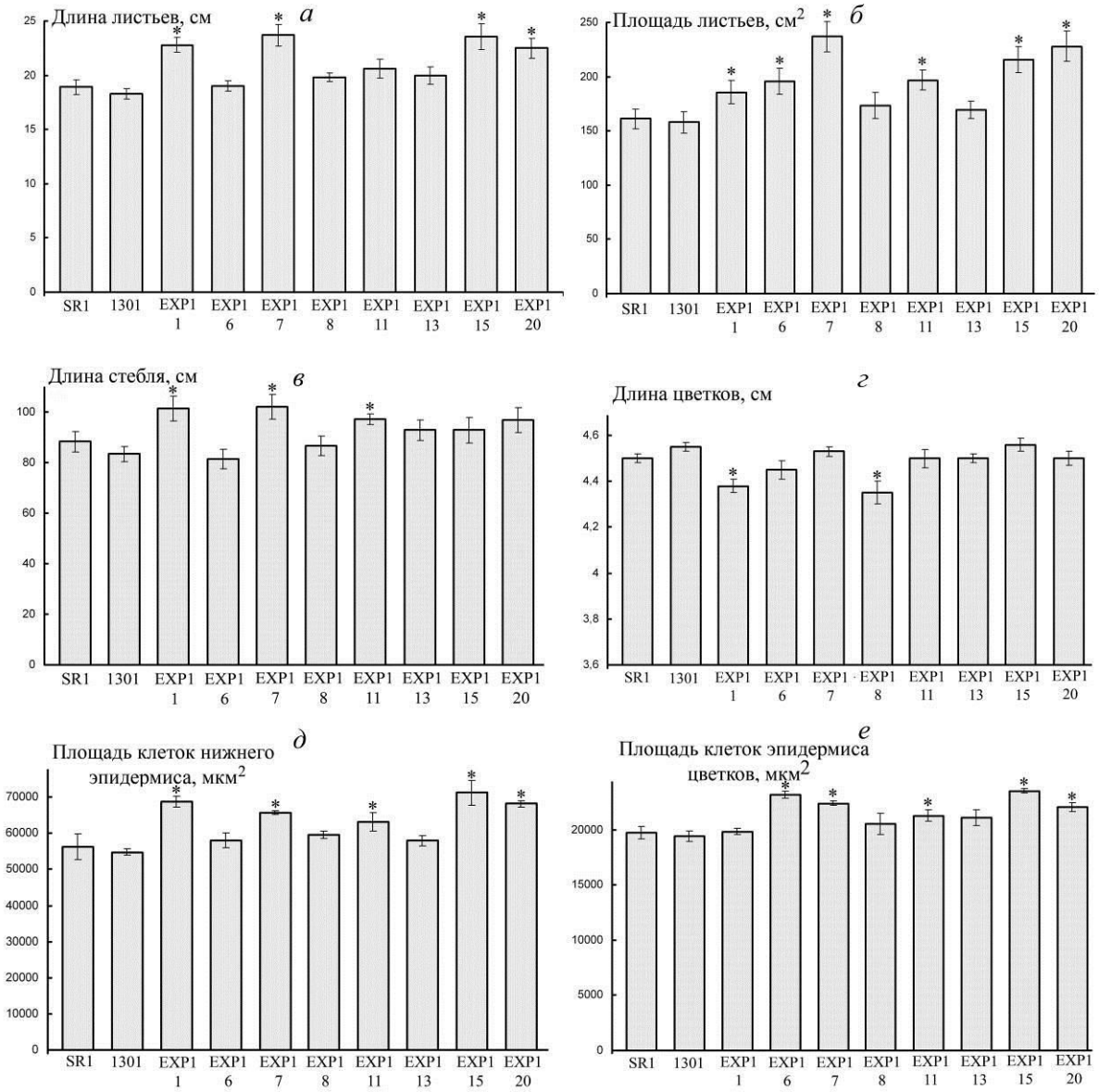


Рис. 114. Морфометрические параметры трансгенных растений табака, с повышенной экспрессией гена *NtEXPA1*: SR1 – контрольные растения табака дикого типа; 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. EXP1/1 – 20 – линии опытных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA1*. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5. * – $p < 0,05$).

В дальнейшем была поставлена задача клонирования генов *NtEXPA4* и *NtEXPA5*, однако первый из них нам не удалось клонировать. В то же время нами была клонирована геномная форма гена *NtEXPA5*, поэтому была поставлена

задача получить и провести анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5.*

9.2.7. Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* в трансгенных растениях табака

Для амплификации гена *NtEXPA5* табака была использована нуклеотидная последовательность под номером AF049354 из GenBank. Размер ампликона гена *NtEXPA5* составил около 1000 пн (рис. 115).

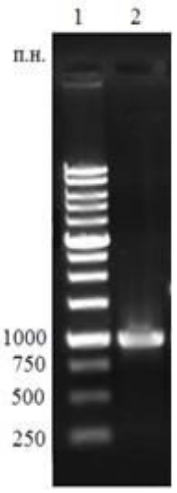


Рис. 115. Электрофореграмма результатов амплификации гена *NtEXPA5*: 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн (Сибэнзим, Россия), 2 – ампликон гена *NtEXPA5* размером около 1000 пн.

Данный ампликон был клонирован в фагмидном Т-векторе pKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемой и не содержит замен нуклеотидов. Далее в вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования. Ген *NtEXPA5* был вырезан из вектора pKRX по сайту *Bse*PI и обработан Т4 ДНК-полимеразой для формирования «тупых» концов. После этого по сайту рестрикции *Sma*I было осуществлено ненаправленное клонирование целевого гена в бинарном векторе pCambia 1301. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, NtEXPF и NtEXPR (табл. 1). Из целевых генно-

инженерных конструкций исследуемого гена в бинарном векторе pCambia 1301 нарабатывались специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35SCambF/NtEXPR, NtEXPF/1301R, 35SCambF/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/NtEXPF, NtEXPR/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *NtEXPA5*. После полной проверки полученный бинарный вектор с геном *NtEXPA5*, находящийся под контролем 35S промотора, был введен в клетки *A. tumefaciens*. Агробактериальный клон, содержащий вектор pCambia 1301 с целевым геном в сенс-ориентации, был использован для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получения трансгенных растений.

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевой генно-инженерной конструкцией с геном *NtEXPA5* было отобрано 15 первичных побегов. На каждой стадии трансформации и регенерации трансгенных побегов определяли активность репортерного гена *GUS*. В результате проведенной работы на селективной среде с гигромицином укоренились 8 растений, причем все они показали активность репортерного гена *GUS* в листьях.

Из этих растений шесть были успешно акклиматизированы к условиям почвы и отобраны для дальнейшей работы. Таким образом, было получено 6 линий трансгенных растений с номерами 4, 5, 6, 8, 12 и 15. Из первых четырех отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *NtEXPA5* и 35S промотора. Было показано, что все 4 отобранные растения содержат в своем геноме, как целевой ген, так и 35S промотор. Экспрессия гена *NtEXPA5* в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР, при этом в контрольных растениях уровень экспрессии был заметно ниже. Размер ампликона при ОТ-ПЦР составил около 379 пн, что совпадает с теоретически ожидаемым размером (рис. 116).

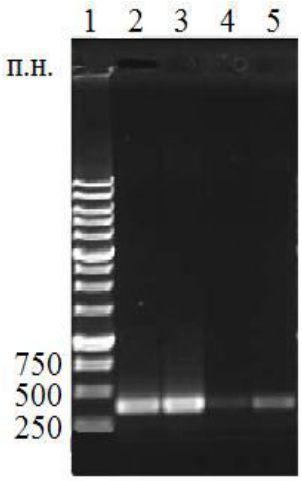


Рис. 116. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5*; 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн (Сибэнзим, Россия), 2 – 3 – ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* размером около 379 пн из трансгенных растений (2 – линия №4, 3 – линия №5); 4 – 5 – ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* из контрольных растений.

Семена шести линий трансгенных растений второго поколения были высеяны на селективную среду, где только растения линий №4, 5 и 6 показали классическое соотношение выживших и погибших 3:1, что предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена.

По пять растений, отобранных линий, были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (pCambia 1301 №5).

Через 30 и 45 дней после акклиматизации к почве опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев. В период цветения листья опытных растений были длиннее на 10 – 22% по сравнению с контролем. Площадь листьев трансгенных растений также увеличивалась, по сравнению с контролем в среднем на 10-30%, в зависимости от линии (табл. 10). По длине стебля опытные растения были заметно выше контрольных, и разница составила для линий №4 и №6 в среднем 24%, а для линии №5 – 46%. По длине цветков различия между опытными и контрольными растениями были незначительными, и составили в среднем от 1% для линии №4 и до 9% для линий №5 и №6 (табл. 10). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не отличались (рис. 118).

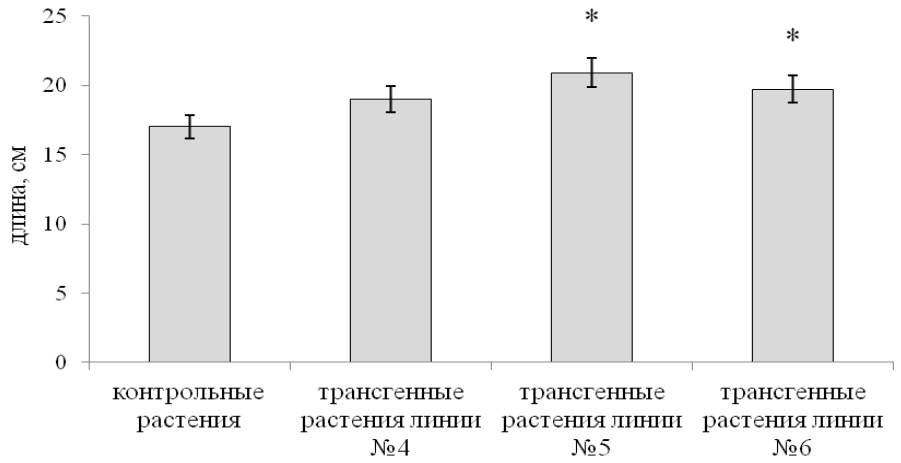


Рисунок 117. Длина листьев трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака в период цветения. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

Таблица 10. Морфометрические параметры трансгенных растений табака поколения T_1, с повышенной экспрессией гена *NtEXPA5*

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 1301 №5	Линии трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*		
		pCambia 1301 NtEXPA5 №4	pCambia 1301 NtEXPA5 №5	pCambia 1301 NtEXPA5 №6
Длина листьев через 30 дней, см	3,6 ± 0,4	2,7 ± 0,5	3,5 ± 0,3	4,4 ± 0,5
Через 45 дней, см	10,3 ± 1,2	7,4 ± 0,9	7,7 ± 0,3	8,9 ± 0,5
В период цветения, см	17,2 ± 0,6	**19,0 ± 0,1***	**20,9 ± 0,2***	**19,7 ± 0,2***
Площадь трех нижних листьев, $см^2$	148,0 ± 3,1	**162,7 ± 3,9***	178,5 ± 6,2*	178,0 ± 3,4*
Высота стебля, см	78,0 ± 3,0	**96,5 ± 0,5***	**113,5 ± 2,1***	**96,6 ± 1,9***
Длина цветка, см	4,49 ± 0,02	4,55 ± 0,03	**4,90 ± 0,03***	**4,88 ± 0,07***
Площадь клеток эпидермиса листьев, $мкм^2$	17600 ± 913	**24342 ± 114***	**23303 ± 158***	**19041 ± 261***
Число клеток эпидермиса листьев на 1 $мм^2$	71,5 ± 2,8	**41,1 ± 0,2***	**44,1 ± 2,5***	**52,3 ± 0,8***

* – $p < 0,05$.

Для выяснения причин увеличения размеров органов трансгенных растений, нами были проведены микроскопические исследования клеток нижнего эпидермиса листьев (рис. 118).

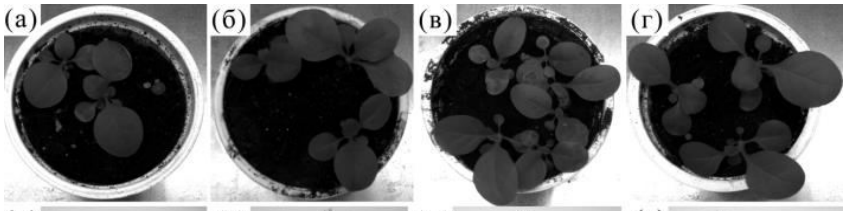
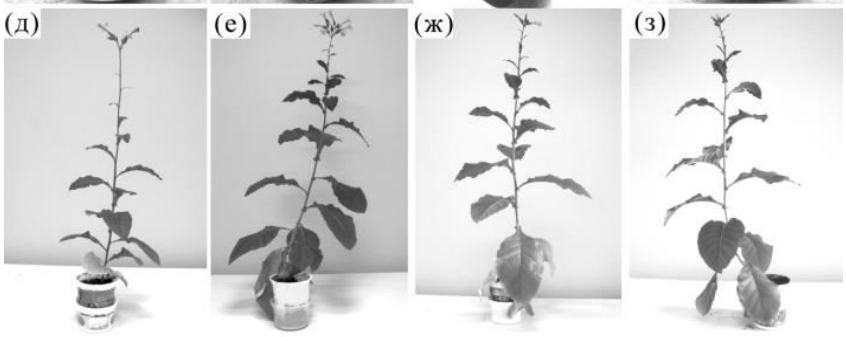
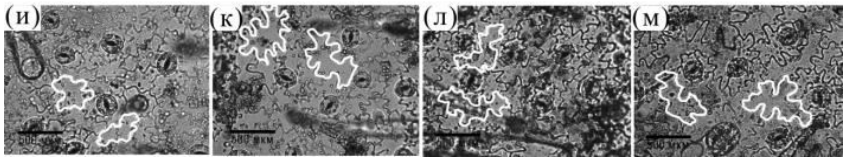
30 дней после пересадки на почву из среды МС				
Период цветения				
Клетки нижнего эпидермиса листьев (увеличение 200х)				
	контроль	трансгенные растения с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5*		
		линия 4	линия 5	линия 6

Рисунок 118. Внешний вид трансгенных растений табака и микрофотографии клеток нижнего эпидермиса листьев.

Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет увеличения их количества. Изменение размеров отдельных клеток листьев наблюдали ранее на трансгенных по гену *NtEXPA1* растениях табака. Трансгенные по гену *NtEXPA5* растения, в отличие от контрольных растений, также характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев. При этом у линии №4 клетки были больше в среднем на 57%, у линии №5 – на 51%, а у линии №6 – на 23% крупнее, чем у контрольных растений (табл. 10, рис. 118, 119). Из полученных данных видно, что размеры клеток у опытных растений увеличивались в гораздо большей степени,

чем размеры отдельных органов. Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев и эпидермиса цветков. Например, клетки мезофилла листьев по сравнению с контролем были крупнее в среднем на 20 – 40%, а размеры клеток эпидермиса цветков лишь на 10 – 15%. То есть сверхэкспрессия гена *NtEXPA5*, в первую очередь, оказывала влияние на величину клеток листьев, а размеры клеток эпидермиса цветков изменялись в меньшей степени.

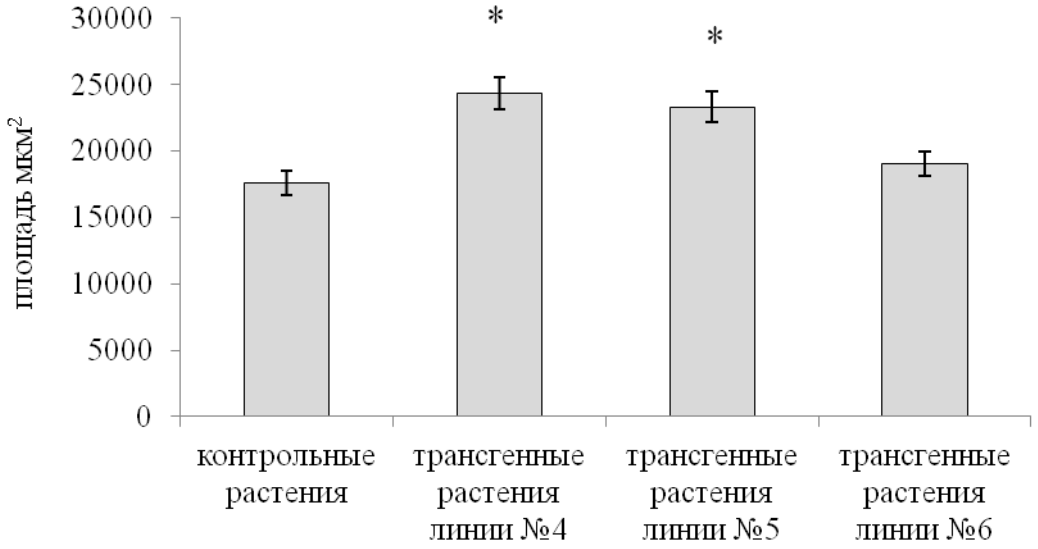


Рисунок 119. Сравнительный анализ площади клеток нижнего эпидермиса листьев трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

9.2.8. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации

Ген *NtEXPA4* не удалось клонировать, поэтому для доказательства его функциональной полноценности была поставлена задача амплифицировать короткий участок этого гена для последующего получения трансгенных растений табака с уменьшенным уровнем его экспрессии. Так как одной из прикладных задач данного исследования было получение трансгенных растений с

уменьшенными размерами органов, было решено создать универсальную генно-инженерную конструкцию, которая будет функционировать не только на табаке. Исходя из этого, был проведен поиск консервативных участков генов экспансинов, схожих по нуклеотидной последовательности с геном *NtEXPA4*. Для этого были выровнены последовательности генов *NtEXPA4, AtEXPA10, PttEXPA3* и *NtEXPA5*. В результате проведенной работы был обнаружен один участок, размером 227 пн, который характеризовался наибольшим уровнем консервативности (рис. 120). Далее были подобраны праймеры для амплификации этого фрагмента у гена *NtEXPA4* и в ходе проведенной работы он был клонирован в бинарном векторе pCambia 1301 в антисмысловой ориентации. Полученные в ходе работы генно-инженерные конструкции были внедрены в клетки *A. tumefaciens*.

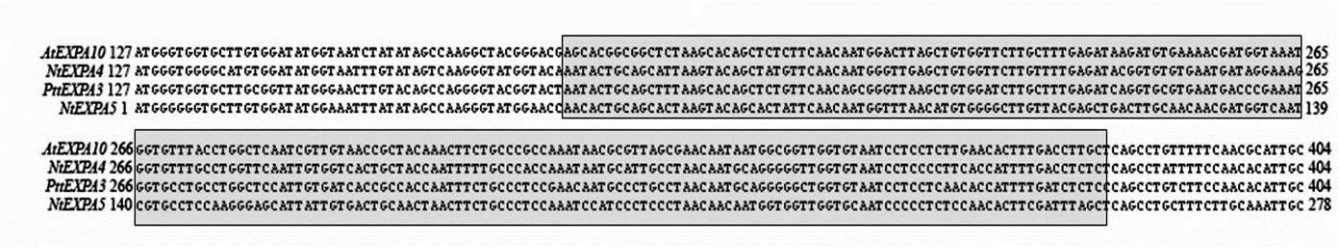


Рис. 120. Результаты выравнивания открытых рамок считывания генов *NtEXPA4, AtEXPA10, PttEXPA3* и *NtEXPA5*. Серым цветов выделен наиболее консервативный участок генов экспансинов, который у гена *NtEXPA4* был клонирован в бинарном векторе pCambia 1301.

При использовании вектора pCambia 1301 с фрагментом гена *NtEXPA4* после трансформации было получено 43 побега, из которых на селективной среде укоренились 20 растений. После ПЦР-анализа и анализа экспрессии репортерного гена *GUS* из этих 20-ти растений были отобраны лишь 12. Из них выжили и были акклиматизированы к условиям почвы 10 растений под номерами: 1, 5, 15, 19, 27, 29, 30, 31, 35 и 36. Семена этих растений рассевали на селективной среде с

гигромицином и расщепление 3:1 было показано для линий 5, 15, 19, 27, 29 и 30. Эти растения акклиматизировали к условиям почвы, выращивали до стадии цветения и проводили их морфологический анализ. Часть трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации характеризовалась статистически достоверным уменьшением размеров органов (рис. 121), причем в первую очередь это было характерно для линий 15, 19 и 29. По длине листьев опытные растения отличались уменьшением этих органов у линии 15 на 12%, у линии 19 на 13%, а у линии 29 на 14% (рис. 121а). По площади листьев эти же линии отличались уменьшением по сравнению с контролем в среднем на 19, 11 и 16% соответственно (рис. 121б). По высоте стебля лишь линии 15 и 27 характеризовались уменьшением на 24 и 33% соответственно (рис. 121в). По длине цветка было зафиксировано уменьшение для линии 5 на 5%, линии 15 на 6%, линии 19 на 4%, линии 27 на 2%, линии 29 на 5% и у линии 30 на 3% (рис. 121г). В ходе наблюдений было замечено, что цветки у некоторых опытных растений уменьшались не только в длину, но и в диаметре (лимб венчика) (рис. 122). По длине коробочек опытные растения статистически отличались от контрольных растений только у линии 15 (рис. 121д).

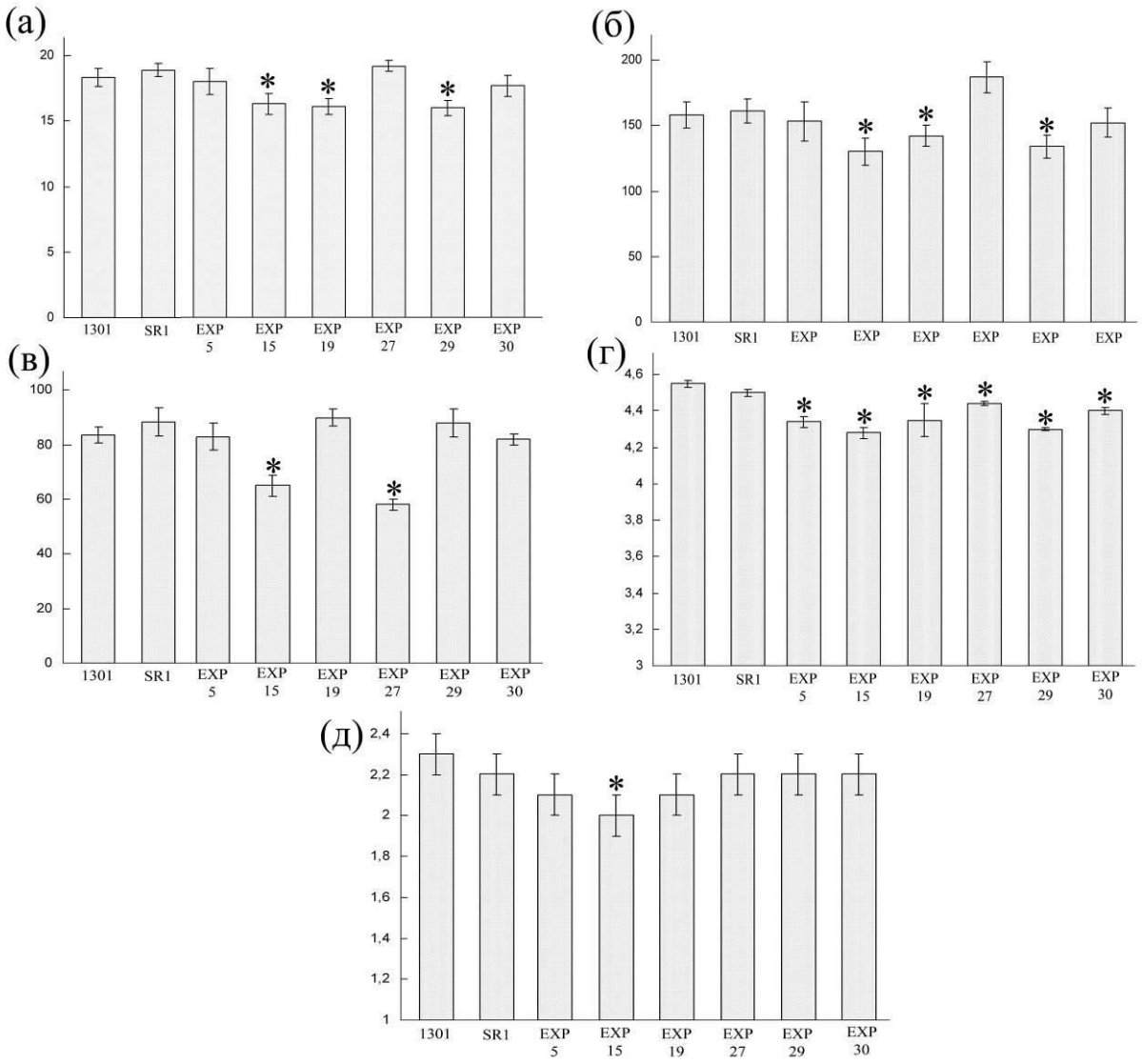


Рис. 121. Морфометрические параметры трансгенных растений, экспрессирующих участок гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации и контрольных растений: а – длина листьев в период цветения, см; б – площадь листьев в период цветения, см^2; в – высота стебля в период цветения, см; г – длина цветков, см; д – длина коробочек, см. 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. EXP5-30 – линии опытных растений табака, экспрессирующие фрагмент гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации. (n=5; * – $p < 0,05$).



Рис. 122. Цветки контрольных и опытных растений, экспрессирующих фрагмент гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации: а – цветок контрольных растений табака дикого типа; б – цветок трансгенного растения табака линии 15.

Для выяснения причин уменьшения размеров органов, нами были проведены измерения размеров клеток эпидермиса листьев и цветков исследуемых растений. Было показано, что опытные растения, экспрессирующие фрагмент гена *NtEXPA4,* характеризуются различными размерами клеток эпидермиса листьев, в зависимости от линии (рис. 123а). Линии, отличающиеся уменьшением размеров органов, характеризовались также и уменьшением размеров клеток эпидермиса листьев (рис. 123а). Размеры клеток уменьшались у линии 15 на 25%, у линии 19 на 16% и у линии 29 на 21%, по сравнению с контрольными растениями. Линии трансгенных растений, у которых размеры органов оставались в пределах нормы, наоборот, отличались увеличением размеров клеток нижнего эпидермиса листьев (рис. 123а). Например, у линии 30 размеры клеток увеличивались на 37% по сравнению с контролем. Что касается размеров клеток наружного эпидермиса цветков, то все трансгенные растения, экспрессирующие участок гена *NtEXPA4* характеризовались незначительным их уменьшением, по сравнению с контролем в среднем на 12% (рис. 123б). Этим они отличались от трансгенных растений, экспрессирующих фрагмент гена *AtARGOS* в антисмысловой ориентации, у части которых наблюдалось увеличение размеров клеток эпидермиса цветков (рис. 69).

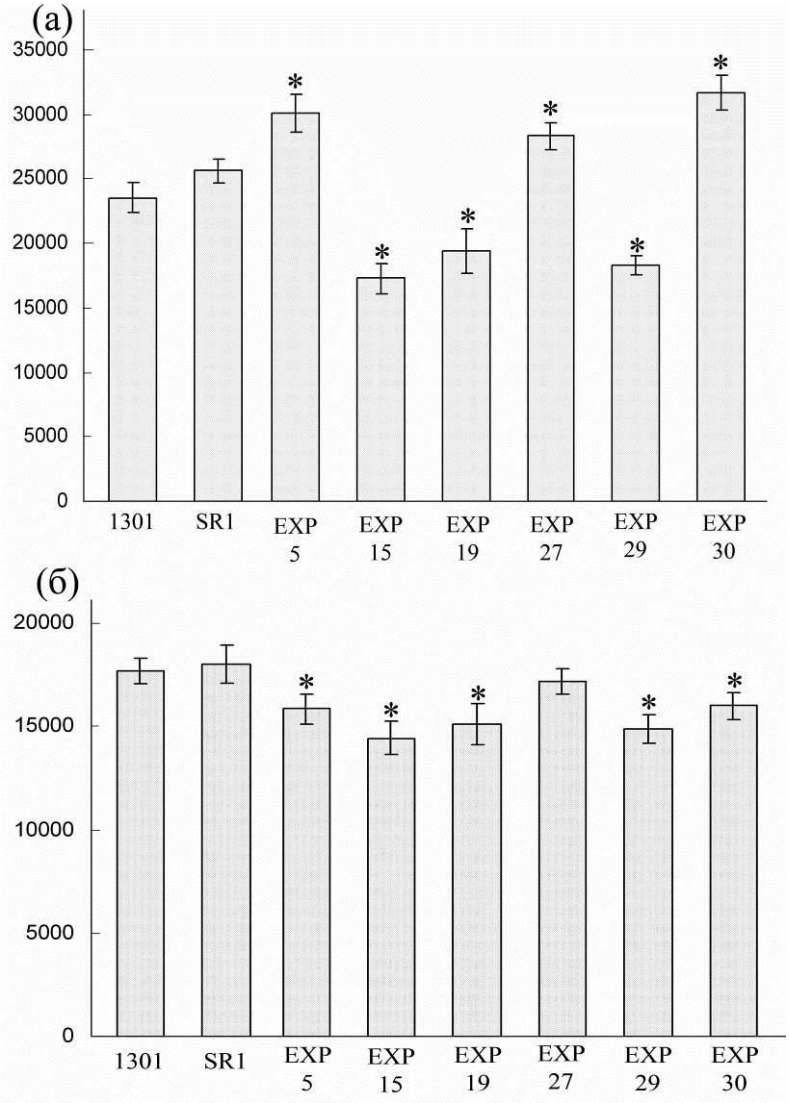


Рис. 123. Сравнительный анализ размеров клеток эпидермиса листьев и лепестков контрольных и опытных растений: а – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев табака, мкм^2; б - площадь клеток наружного эпидермиса цветков табака, мкм^2. 1301 и SR1 – контрольные растения. EXP5-30 – линии опытных растений. (n=5; * – $p < 0,05$).

9.2.9. Обсуждение результатов

Ген *NtEXPA1* является предполагаемым ортологом гена *AtEXPA11*. В различных биологических базах данных, например таких, как EMBL Европейского института биоинформатики (www.ebi.ac.uk) и NCBI GEO Национального центра биотехнологической информации (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) депонируются результаты анализа экспрессии различных генов *A. thaliana* выполненных при помощи ДНК-микрочипов. В этих

базах данных имеются сведения о регуляции экспрессии большинства α-экспансинов *A. thaliana*. Данная информация может оказаться полезной при изучении гомологичных генов экспансинов в других растениях. Исходя из данных EMBL/NCBI GEO, гомологичный гену экспансина *NtEXPA1* ген *AtEXPA11* экспрессируется преимущественно в верхней части стебля, цветках, листьях и корнях. Наименьший уровень экспрессии для этого гена был обнаружен у основания стебля и в семенах. Ауксины здесь также, как и в случае с геном *NtEXPA1*, способствовали повышению уровня экспрессии гена *AtEXPA11*. Брассиностероиды в некоторых экспериментах повышали, особенно при совместном использовании с глюкозой, а в других понижали уровень экспрессии данного экспансина. Таким образом, в базах данных также имеются сведения о снижении уровня экспрессии гомологов гена *NtEXPA1* под влиянием брассиностероидов, что соотносится с нашими результатами. Нами было показано, что сигналы от брассиностероидов к генам экспансинов могут частично поступать через OSR-белок ARL, который, как оказалось, также может, как повышать уровень экспрессии генов экспансинов, так и снижать его. Таким образом, нами было показано, что тонкая регуляция экспрессии генов экспансинов может осуществляться брассиностероидами через OSR-белки.

Тот факт, что уровень экспрессии гена *NtEXPA1* начинает снижаться уже в листе №5 и то, что в каллусе его уровень экспрессии тоже довольно высокий, вероятнее всего, говорит о том, что продукт этого гена принимает участие, преимущественно, на начальных стадиях клеточного растяжения. Разделение функций экспансинов по участию на различных стадиях клеточного растяжения может быть связано с тем, что в процессе роста клеточной стенки постоянно меняется состав и структура полисахаридов (Gibeaut et al., 2005) и для их эффективного разделения требуются разные экспансины. Действительно в литературе имеются данные о существовании специфичных для различных стадий растяжения полисахаридов клеточной стенки (Carpita, 1996), более того, показано, что структура полисахаридов клеточной стенки, если сравнивать их при инициации и на последних стадиях клеточного растяжения, отличается (Козлова и

др., 2012). Можно предположить, что на начальных стадиях клеточного растяжения, например, может потребоваться более сильная дезорганизация микрофибрилл целлюлозы в клеточной стенке (Гао и др., 2010), на других стадиях может на первый план выходить проблема увеличения количества водородных связей между ксилоглюканами и микрофибриллами целлюлозы, которые могут быть разделены только в результате более длительных по времени процессов, осуществляемыми другими экспансинами. В любом случае, на каждой стадии клеточного растяжения, скорее всего, требуется множество экспансинов, но состав их, видимо, постепенно меняется.

Наиболее близкими к гену *NtEXPA4* являются гены *AtEXPA1*, *AtEXPA10* и *AtEXPA15 A. thaliana.* Согласно данным ресурса NCBI GEO, уровень экспрессии гена *AtEXPA1* также повышается при обработке ауксинами и цитокининами (ИУК и зеатином). Брассиностероиды чаще всего не влияют на экспрессию данного гена, однако при совместном его использовании с глюкозой содержание мРНК гена *AtEXPA1* возрастает. Таким образом, сведения о позитивном влиянии брассиностероидов на экспрессию гомологов гена *NtEXPA4* по данным ДНК-микрочипов тоже имеются. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *AtEXPA1* наблюдается в гипокотилях, молодых листьях, цветках и побеге в целом. Меньшее содержание мРНК данного экспансина зафиксировано в корнях и основании стебля. Ген *AtEXPA10* интенсивно экспрессируется в молодых черешках и жилках листьев, семядолях, стручках, а также в цветоножках. В течение первых 20-ти минут после обработки ИУК экспрессия гена *AtEXPA10* снижается, однако через 40 минут его экспрессия начинает возрастать. Таким же образом на ИУК реагирует ген *AtEXPA15,* однако при совместном использовании ауксинов с глюкозой экспрессия обоих генов только повышается. В свою очередь зеатин, а также глюкоза способствуют повышению уровня экспрессии генов *AtEXPA10* и *AtEXPA15.* Для гена *AtEXPA15* показано повышенное содержание его мРНК в листьях и цветках и сниженная экспрессия в стеблях. Что касается гиббереллинов, в базе данных NCBI GEO, к сожалению, не удалось найти данные

о влиянии этой группы фитогормонов на уровень экспрессии генов *AtEXPA1*, *AtEXPA10* и *AtEXPA15*.

В целом, судя по нашим данным, ген *NtEXPA4* кодирует экспансин, функционирующий от начальных, вплоть до последних стадий клеточного растяжения. Ген *NtEXPA4* индуцируется преимущественно цитокининами, может негативно регулироваться OSR-белками и остается доступным для стимуляции экспрессии фитогормонами вплоть до листа №8, хотя при отсутствии экзогенных фитогормонов экспрессия гена *NtEXPA4* в этом листе почти не детектировалась.

Во втором и пятом от верхушки побега листьях все группы фитогормонов, кроме брассиностероидов, стимулировали экспрессию генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*. В листьях №5, растущих исключительно за счет клеточного растяжения, брассиностероиды снижали уровень экспрессии гена *NtEXPA1* и повышали его у гена *NtEXPA4*. Исходя из этих данных, можно предположить, что в период интенсивного роста клеток растяжением необходимость в экспансине NtEXPA1 уменьшается и для нормального расхождения микрофибрилл целлюлозы требуется повышение содержания продукта гена *NtEXPA4*. Индуцибельная экспрессия гена *AtARL* в листе №5 способствовала повышению уровня экспрессии гена *NtEXPA1,* что как бы возвращает ту ситуацию, которая была характерна для верхушки побега и листа №1 растений табака дикого типа. В связи с этим предполагается, что продукт гена *AtARL* видимо также участвует в инициации перехода к клеточному растяжению, как и продукт гена *NtEXPA1*. Необходимо отметить, что ЭБ в листе №5 не повышал экспрессию гена *NtEXPA1* и не снижал уровень экспрессии гена *NtEXPA4* (рис. 105. 106). В то же время индуцируемый данным фитогормоном продукт гена *AtARL* (Feng et al., 2011) повышал уровень экспрессии гена *NtEXPA1* и снижал его у гена *NtEXPA4*. Это позволяет предположить, что регуляция чувствительности экспансинов NtEXPA1 и NtEXPA4 к фитогормонам в системе клеточной сигнализации происходит на уровне, расположенном до OSR-белка ARL.

Исходя из результатов филогенетического анализа, ортологами гена *NtEXPA5* могут быть как ген *AtEXPA2,* так и ген *AtEXPA8*. Из данных NCBI GEO

следует, что ген *AtEXPA2* экспрессируется на высоком уровне в листьях, стебле и цветках *A. thaliana* и уровень его экспрессии повышается при экзогенной обработке ИУК, что соотносится с нашими данными. Более того, в мутантах по ауксиновому сигналингу *arf2*, наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *AtEXPA2.* Что касается гена *AtEXPA8,* то его уровень экспрессии повышался под влиянием ауксинов и был снижен у мутантов *arf6/arf8*. Ингибитор биосинтеза брассиностероидов брассинозол снижал уровень экспрессии гена *AtEXPA8.*

Судя по нашим данным, ген *NtEXPA5* кодирует экспансин, необходимый для длительного роста клеток растяжением вплоть до последних стадий клеточного растяжения. Индуцируется данный экспансин, преимущественно, ауксинами и цитокининами.

Регуляция экспрессии многих экспансинов ауксинами хорошо известна (Jung et al., 2010), однако данные о влиянии цитокининов на экспрессию экспансинов в литературе встречаются гораздо реже. Например было показано, что цитокинины способствуют стабилизации молекулы мРНК гена *Cim1*, кодирующего один из β-экспансинов сои (Downes, Crowell, 1998). Однако по нашим данным цитокинины все же способны влиять и на транскрипцию генов, кодирующих экспансины. В то же время влияние ауксинов на экспрессию исследуемых экспансинов было более существенным, чем в случае использования других фитогормонов. Экспрессия экспансинов может индуцироваться не только ауксинами и цитокининами, но и брассиностероидами (Park et al., 2010), гиббереллинами (Azeez et al., 2010), этиленом (Trivedi, Nath, 2004) и некоторыми другими фитогормонами. Экспрессия исследованных нами экспансинов в основном индуцировалась ауксинами, меньшее влияние на них оказывали цитокинины, гиббереллины и брассиностероиды. С учетом наших и литературных данных можно заключить, что гены *NtEXPA1* и *NtEXPA5,* в основном, являются ауксин-индуцибельными, а ген *NtEXPA4* - цитокинин-индуцибельным, причем все эти три гена, судя по всему, являются листоспецифичными.

В отличие от экспансинов NtEXPA1, NtEXPA4 и NtEXPA5, продукт гена *NtEXPA6* скорее всего является минорным белком, причем как и NtEXPA1, он

необходим только в молодых органах, характеризующихся началом перехода к росту растяжением. Экспрессия гена *NtEXPA6* также как и в случае с геном *NtEXPA1*, блокируется 24-эпибрассинолидом в листе №2. В то же время говорить однозначно, что это связано с тем, что экспансин NtEXPA6 нужен только для инициации клеточного растяжения в молодых органах, тоже нельзя, так как в верхушке побега брассиностероиды не стимулировали экспрессию исследуемого гена. Здесь можно сказать лишь о том, что брассиностероидами осуществляется, по видимому, более тонкая и сложная регуляция экспрессии экспансинов и в зависимости от стадии развития органа, эта группа фитогормонов может способствовать как увеличению (Park et al., 2010), так и уменьшению уровня экспрессии экспансинов (данные NCBI GEO). Согласно результатам наших исследований, ауксины и цитокинины обладали только стимулирующим эффектом на экспрессию гена *NtEXPA6*, что соответствует литературным данным, относящимся к другим экспансинам (Jung et al., 2010). В то же время из литературы хорошо известно о тесном взаимодействии сигнальных путей брассиностероидов, ауксинов и цитокининов (Nemhauser et al., 2004; Yuldashev et al., 2012) и полученные нами результаты поднимают вопрос о том, на каком уровне происходят эти взаимодействия и каковы их молекулярные механизмы. Интересно отметить, что листья старшего возраста, чем второй от верхушки побега лист, вовсе перестают быть доступными для стимуляции транскрипции в них гена *NtEXPA6* под влиянием экзогенной обработки фитогормонами, что говорит о существовании эпигенетических механизмов регуляции экспрессии экспансинов. Интересно отметить, что схожие данные нами были получены для гена *NtEXPA1,* экспрессия которого не стимулировалась экзогенными фитогормонами в листе №8.

В целом, продукт гена *NtEXPA6*, вероятнее всего, ассоциирован с ростом молодых недифференцированных клеток и функционирует как в верхушке побега, так и в корнях, но в отличие от первых трех изученных генов экспансинов не является листоспецифичным.

В литературе имеются сведения о повышении уровня экспрессии экспансинов под влиянием избыточной NaCl (Schipper et al., 2002; Han et al., 2012; Zorb et al., 2013). Однако необходимость в экспансинах возрастает не только при избытке в среде NaCl (Гао и др., 2010), но и при дефиците влаги, вызванном нейтральным осмотиком ПЭГ (Sabirzhanova et al., 2005). Действительно ранее было показано, что при низкой концентрации влаги в почве наблюдается повышение уровня экспрессии гена *ZmEXP1* кукурузы (Веселов и др., 2008), при этом быстрое возрастание транскрипционной активности этого гена предшествует возобновлению роста клеток листа растяжением в условиях недостаточности воды. Таким образом, экспансины принимают участие в адаптации растений к стрессам, вызванным дефицитом влаги и, судя по всему, обеспечивают рост растяжением, как при нормальных условиях, так и при действии неблагоприятных факторов среды. Причем при действии последних, потребность в экспансинах существенно возрастает, что выражается в увеличении уровня их экспрессии.

Действительно, при действии соли уровень экспрессии генов экспансинов табака, кроме гена *NtEXPA6*, повышался. Причем наиболее резко на действие соли реагировал ген *NtEXPA5*, в меньшей степени ген *NtEXPA4* и меньше всего на соль реагировал ген *NtEXPA1*. Таким образом, можно составить ряд генов экспансинов по степени чувствительности к действию соли: *NtEXPA6 – NtEXPA1 – NtEXPA4 – NtEXPA5,* причем этот ряд поразительно напоминает тот ряд, где эти гены располагались по разным стадиям клеточного растяжения (см. раздел 9.2.2.). Исходя из этого ряда, можно предполагать, что в соль-индуцированном повышении уровня экспрессии задействованы, в основном экспансины, обеспечивающие длительное поддержание процесса роста клетки растяжением.

Отметим, что на действие засухи и холода в наибольшей степени реагировали экспансины NtEXPA1 и NtEXPA4. Исходя из полученных нами данных, можно предполагать, что экспансины табака могут способствовать росту растений при действии засухи и холода. В литературе имеются сведения о вовлечении экспансинов в индуцированный засухой рост клеток растяжением (Zhao et al., 2011). Более того, сверхэкспрессия гена *TaEXPB23* способствовала

повышению уровня засухоустойчивости трансгенных растений табака (Li et al., 2011). В то же время о возможном участии экспансинов в ответе на действие холода в литературе встречается довольно редко. Например, было показано, что холодоустойчивый сорт хлопчатника содержит в волокнах большее количество экспансинов, чем чувствительный к холоду сорт (Zheng et al., 2012). Исходя из наших и литературных данных, можно предполагать, что при действии засухи и холода потребность в экспансинах для обеспечения нормального роста возрастает, что выражается в увеличении уровня экспрессии соответствующих генов. Однако при более длительном воздействии или при действии более сильных стрессовых факторов, вероятнее всего, уровень экспрессии генов экспансинов снижается (рис. 109). Напомним, что снижение уровня экспрессии при действии соли нами было показано ранее при исследовании гена *PtrARGOS-LIKE* (см. раздел 8.5.2) и гена *NtEXGT* (см. раздел 9.1.4).

Наибольшие изменения уровня экспрессии генов экспансинов под влиянием стрессовых факторов были характерны для 3-го от верхушки побега листа. Именно в этих листьях повышению содержания транскриптов генов *NtEXPA1, NtEXPA4* и *NtEXPA5* способствовала АБК. Исходя из этого и данных литературы (Кошкин, 2010; Gao et al., 2010, Novikova et al., 2010) можно предполагать, что при воздействии стрессовых факторов именно АБК стимулирует экспрессию генов экспансинов. Действительно, ранее было показано, что при действии ПЭГ-6000 в колеоптилях пшеницы накапливается АБК и возрастает уровень экспрессии экспансинов (Zhao et al., 2012). Также был изучен ген *RhEXPA4*, экспрессия которого индуцируется АБК, засухой и солью, более того, трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие данный ген характеризовались повышенной засухо- и солеустойчивостью (Lu et al., 2013).

Трансгенные по гену *NtEXPA1* растения табака характеризовались увеличением, прежде всего, размеров листьев и стебля, что еще раз подтверждает участие продукта данного гена в регуляции роста побега и доказывает функциональную полноценность продукта исследуемого гена. Сверхэкспрессия экспансинов чаще всего способствует увеличению размеров органов (Cho,

Cosgrove 2000; Gray-Mitsumune et al., 2008), однако имеются данные и о негативном влиянии экспансинов на рост растений (Гао и др., 2010). Повышенная экспрессия гена *NtEXPA1* негативно сказывалась лишь на росте цветков, а размеры листьев и стебля практически у всех линий при этом увеличивались.

В целом, конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* также приводила к увеличению размеров листьев, но при этом у анализируемых растений наиболее существенно увеличивалась все же длина стебля. Отсюда можно сделать вывод о том, что конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5*, в большей степени влияет именно на рост стебля в длину, и в чуть меньшей степени на рост листьев. Повышенная экспрессия гена *NtEXPA5*, практически, мало влияла на рост цветков, что может объясняться компенсаторным влиянием других путей генетического контроля размеров цветков у табака. Повышенный уровень экспрессии гена *NtEXPA5* мог привести и к уменьшению размеров органов за счет излишней дезорганизации микрофибрилл целлюлозы в клеточной стенке (Гао и др., 2010), однако большинство проанализированных нами трансгенных растений характеризовались увеличением размеров всех вегетативных органов или, по крайне мере, соответствием с контрольными растениями.

Как и предполагалось, все полученные трансгенные растения отличались увеличением размеров клеток эпидермиса. В среднем размеры клеток увеличивались на 25 – 55%, при этом листья у анализируемых растений увеличивались лишь на 10 – 20%. Это говорит о том, что в листьях трансгенных растений происходило компенсаторное уменьшение количества клеток, что способствовало сохранению размеров органов близких к размерам органов контрольных растений (рис. 118). Однако механизмы функционирования данного уменьшения количества клеток для нас остаются не совсем понятными. Отметим, что мы проводили определение содержания фитогормонов в трансгенных по гену *NtEXPA5* (данные не представлены) и эти растения не отличались от контрольных по содержанию цитокининов, ауксинов и АБК. Доказать уменьшение уровня экспрессии транскрипционного фактора NtANTL нам также не удалось (данные не представлены). По крайней мере, очевидно, что количество клеток в органе

снижается за счет уменьшения уровня клеточных делений и, опираясь на данное предположение, необходимо продолжать исследования в этом направлении.

У трансгенных по гену *NtEXPA5* растений были увеличены размеры листьев на 10-20%, а стебля на 24-46% в зависимости от линии. При сверхэкспрессии гена *NtEXPA1*, наоборот, листья увеличивались в большей степени (до 51%), по сравнению со стеблем (до 23%). Возможно, эти данные связаны с тем, что экспансин NtEXPA1 нужен в первую очередь для инициации роста листьев, а в стеблях несколько возрастает роль других экспансинов, например, NtEXPA5. Тот факт, что трансгенные по гену *NtEXPA5* растения табака не отличались от контрольных на начальных стадиях роста растений (через 30 и 45 дней после акклиматизации к условиям почвы) еще раз подтверждает наши предположения о преимущественном участии экспансина NtEXPA5 в пролонгировании роста клеток.

Ранее нами были получены трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена *AtARL A. thaliana* (см. раздел 8.2.3). Аналогично результатам, полученному по гену *NtEXPA1* (рис. 113), продукт гена *AtARL* способствовал накоплению мРНК гена *NtEXPA5* в листьях трансгенных растений по сравнению с контролем (см. рис. 58). Эти данные еще раз доказывают участие продукта гена *AtARL* в системе регуляции клеточного растяжения. Вероятнее всего продукт гена *AtARL* является посредником в передаче сигнала от фитогормонов к экспансинам.

Результаты наших исследований показывают, что гены *NtEXPA1* и *NtEXPA5* могут быть применены для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов, в частности, для увеличения размеров листьев и стебля. Однако применение этих генов ограничивается компенсаторными механизмами в растениях, направленных на поддержание размеров органов близких к норме. Для преодоления этих трудностей нужно пробовать использовать тканеспецифичные и индуцибельные промоторы вместо конститутивных, а также, стимулировать биосинтез транскрипционных факторов, регулирующих клеточное деление,

уровень экспрессии которых в трансгенных по экспансинам растениях, может быть снижен по сравнению с контролем.

Три линии трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации, характеризовались уменьшением размеров органов за счет уменьшения размеров отдельных клеток. Согласно литературным данным, эти морфологические особенности трансгенных растений действительно могут быть обусловлены снижением уровня экспрессии гена *NtEXPA4,* так как экспансины принимают участие в клеточном растяжении (Link, Cosgrove, 1998; Шарова, 2007). Интересно отметить, что отличительная особенность гена *NtEXPA4* перед геном *ARGOS* (см. раздел 8.4) в этой работе проявилась в способности первого воздействовать на длину стебля. Судя по всему, органы у трансгенных по участку гена *NtEXPA4* растений табака уменьшались не только за счет уменьшения размеров клеток, но и уменьшения их количества, приходящегося на один орган. Именно поэтому, линии опытных растений, у которых размеры органов не изменялись, характеризовались увеличением размеров отдельных клеток. В данном случае компенсаторный механизм, влияющий на клеточное растяжение, может быть обусловлен функционированием других экспансинов в листьях табака. Интересно отметить, что в цветках всех опытных растений экспрессирующих фрагмент гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации наблюдалось уменьшение размеров клеток. Это означает, что размеры цветков, например, у линий 27 и 30 достигали нормы за счет стимулирования клеточного деления, в котором может принимать участие и ген *ARGOS*. К сожалению, гены *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* у табака не секвенированы и проверить уровень их экспрессии в трансгенных растениях пока невозможно. В случае с цветками, в отличие от листьев, ни у одной линии не происходило компенсаторного увеличения размеров клеток, что может говорить о большом значении экспансина NtEXPA4 в регуляции клеточного растяжения в цветках. В листьях же, вероятно, функционируют и другие экспансины, которые могут продублировать функцию NtEXPA4.

Необходимо отметить, что экспрессия участка гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации не привела к значительному уменьшению размеров органов у трансгенных растений, например, в 2-3 раза по сравнению с контролем. Возможно, для этого необходимо использовать другие подходы, используемые при блокировании экспрессии у растений. В то же время, созданная нами генно-инженерная конструкция все же может быть применена для получения трансгенных растений с уменьшенными размерами органов, однако для достижения более ощутимого результата, видимо, потребуются тщательный отбор соответствующих линий и, возможно, применение методов селекции.

9.3. Конститутивная экспрессия гена *AtEXPA10 A. thaliana* в трансгенных растениях табака

В среднем, степень увеличения размеров органов у трансгенных растений с конститутивной экспрессией генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* достигала всего лишь 51% по сравнению с контролем. Большинство полученных линий трансгенных растений, при этом, характеризовались меньшей степенью увеличения размеров органов. Возможно, это связано с тем, что клеточная стенка восприимчива к экспансинам только на короткое время, что может нивелировать действие трансгена. Однако незначительное фенотипическое проявление трансгена и блокирование его экспрессии может быть обусловлено и косупрессией. Одной из причин косупрессии является высокая схожесть нуклеотидных последовательностей трансгена и гена хозяйской клетки (Дейнеко и др., 2014). Видимо, при помощи системы РНК-интерференции растения поддерживают на нормальном уровне экспрессию различных генов. При условии экспрессии целевого гена в гомологичных условиях в клетках, видимо, включается система инактивирования трансгенов на транскрипционном или посттранскрипционном уровнях (Дейнеко и др., 2014). Поэтому можно предположить, что в условиях гетерологичной экспрессии целевых генов система РНК-сайленсинга будет срабатывать реже из-за меньшей схожести нуклеотидных последовательностей трансгена с генами хозяйской клетки. Исходя из этого, дальнейшая наша работа

была связана с исследованием экспрессии экспансинов в гетерологичных условиях. В первую очередь, нами была поставлена задача по клонированию гена экспансина *AtEXPA10 A. thaliana*, повышенная экспрессия которого, по литературным данным, способствовала увеличению размеров органов (Cho, Cosgrove, 2000). Планировалось получить трансгенные растения табака, с повышенной экспрессией гена *AtEXPA10*, с целью выяснения эффективности экспрессии данного экспансина в гетерологичных условиях.

9.3.1. Амплификация и клонирование гена *AtEXPA10*

Для подбора праймеров и амплификации гена *AtEXPA10 A. thaliana* была использована нуклеотидная последовательность под номером NM_102440.3 из GenBank. Из тотальной ДНК *A. thaliana* при помощи соответствующих праймеров AtEXPAF и AtEXPAR (табл. 1) амплифицировали полноразмерную копию гена *AtEXPA10* размером около 1000 пн (рис. 124).

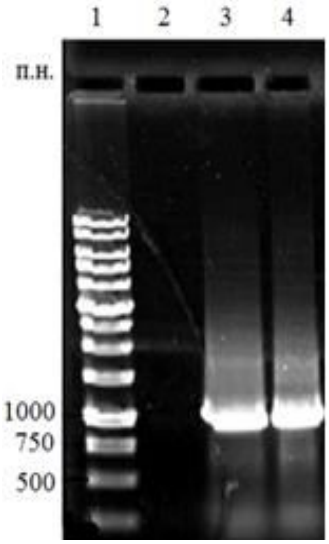


Рис. 124. Электрофореграмма ампликона гена *AtEXPA10*; 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн (Сибэнзим, Россия); 2 – контроль; 3, 4 – ампликоны гена *AtEXPA10* размером около 1000 пн.

Целевой ампликон был клонирован в векторе pKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия

гена полностью совпадает с теоретически ожидаемой последовательностью и не содержит нуклеотидных замен.

При создании генно-инженерных конструкций использовали вектор pCambia 1301. Для поиска целевого клона использовали пару праймеров 35SCambF и 1301R, которые при амплификации давали специфический ПЦР-продукт размером 918 пн Ген *AtEXPA10* был вырезан из вектора pKRX по сайту *Bse*PI и обработан Т4 ДНК-полимеразой для формирования «тупых» концов. Модифицированный вектор pCambia 1301 был расщеплен по сайту рестрикции *Sma*I. После проведенных процедур в этом векторе осуществили ненаправленное клонирование гена *AtEXPA10*. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, AtEXPAF и AtEXPAR (табл. 1). Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания пар праймеров 35SCambF/AtEXPAR и 35SCambF/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/AtEXPAF амплификация проходила только в случае антисмысловой ориентации целевых генов. Кроме этого, для проверки полученных генно-инженерных конструкций использовали рестрикционный анализ и секвенирование. После полной проверки полученные генно-инженерные конструкции были внедрены в клетки *A. tumefaciens*. Скрининг целевых клонов в агробактериях осуществляли при помощи ПЦР-анализа с праймерами AtEXPAF/AtEXPAR. Агробактериальные клоны, содержащие вектор pCambia 1301 с геном *AtEXPA10* в сенс-ориентации, были использованы для экспериментов по трансформации листовых дисков табака.

9.3.2. Получение трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *AtEXPA10*

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевой генно-инженерной конструкцией с геном *AtEXPA10* было отобрано 44 первичных побега. Из этих побегов укоренились на селективной среде 13 растений, у 10 из которых обнаружилась активность репортерного гена *GUS* в листьях. Из этих

растений шесть были успешно акклиматизированы к условиям почвы и отобраны для дальнейшей работы.

Из отобранных растений табака была выделена тотальная ДНК и проведен анализ на наличие гена *AtEXPA10* и 35S промотора. Было показано, что все шесть отобранных растений содержат в своем геноме, как ген *AtEXPA10 A. thaliana*, так и 35S промотор. Экспрессия целевого гена в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР (рис. 125). Размер ампликона составил около 750 пн, что совпадает с теоретически ожидаемым размером.

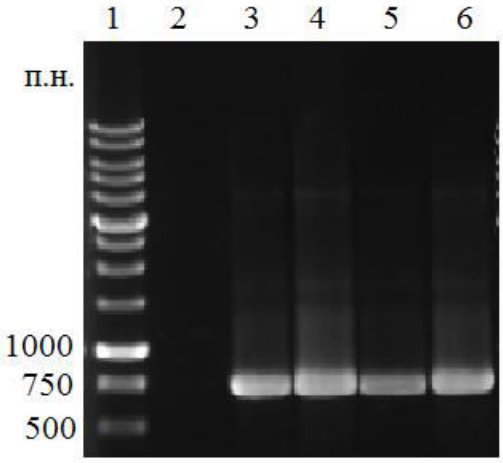


Рис. 125. Электрофореграмма результатов ОТ–ПЦР гена *AtEXPA10*: 1 - маркер молекулярной массы 1 kb (Сибэнзим, Россия); 2 - контрольные растения табака; 3 - 6 - трансгенные растения табака.

9.3.3. Морфологический анализ трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *AtEXPA10*

Семена шести трансгенных по гену *AtEXPA10* линий табака были посеяны на селективной среде МС (Murashige et al., 1962), а через 20 дней их проростки были акклиматизированы к условиям почвы. Уже на первых стадиях развития пять из шести линий трансгенных растений заметно опережали по росту вегетативных органов контрольные растения, содержащие Т-ДНК пустого вектора pCambia 1301 (без целевого гена).

Через 30 дней после пересадки на почву трансгенные растения опережали контрольные растения по длине листьев на 85%, через 45 дней на 83%, через 60

дней на 41%, во время цветения на 33%. Площадь листьев трансгенных растений была больше, чем у контрольных в среднем на 43%, высота стебля на 29%, длина цветка всего лишь на 9%, сырая масса растения на 41% (табл. 11). В целом, наиболее заметным было увеличение размеров листьев у трансгенных растений по сравнению с контрольными растениями (рис. 126). Визуальной разницы между размерами цветков контрольных и опытных растений не наблюдалось.

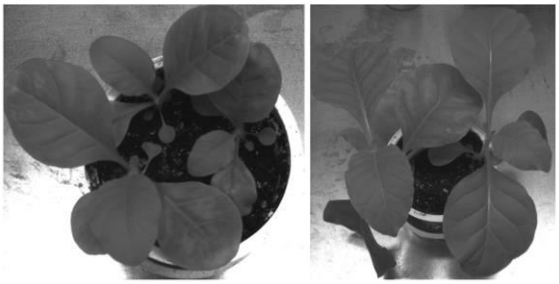
30 дней после пересадки на почву из среды МС		
45 дней после пересадки на почву		
Период цветения		
	Контроль (Т-ДНК pCambia 1301)	Трансгенные растения с конститутивной экспрессией гена *AtEXPA10*

Рис. 126. Внешний вид контрольного и *35S::AtEXPA10* растений табака.

Таблица 11. Морфометрические параметры 6-ти линий трансгенных растений поколения T_1, экспрессирующих ген *AtEXPA10*, и контрольных растений в зависимости от стадии развития

	Трансгенные растения, номер линии						Контрольные растения		
Параметр	7	9	34	39	40	43	1	2	3
Длина листьев, см									
30 дней	9,7±0,4	8,3±0,6	9,7±0,9	10,8±0,6	9,3±0,8	3,2±0,1	4,5±0,2	4,8±0,3	4,6±0,1
45 дней	13,0±0,4	14,2±0,6	14,0±0,2	13,0±0,4	12,0±0,5	5,2±0,2	5,3±0,2	7,3±0,6	6,8±0,4
60 дней	15,3±0,2	15,0±0,4	15,5±0,2	14,3±0,6	17,0±0,4	9,3±0,6	10,7±0,4	11,0±1,0	9,0±0,3
В период цветения	17,7±0,2	18,7±0,2	19,7±0,2	15,3±0,4	17,0±0,4	15,4±0,4	12,1±0,1	16,0±0,3	11,0±0,4
Площадь листьев, $см^2$	127,7±5,5	161,3±5,8	154,3±4,6	98,7±4,2	126,3±7,5	105,6±3,6	66,6±2,0	120,3±3,7	86,0±4,4
Высота стебля, см	85,0±4,3	87,0±3,7	96,3±2,2	94,5±3,3	95,0±0,6	76,5±3,6	77,2±1,2	62,2±2,3	68,0±1,4
Длина цветка, см	4,67±0,02	4,63±0,04	4,63±0,02	4,83±0,02	4,65±0,10	4,23±0,05	4,30+0,10	4,20±0,06	4,30±0,10
Масса растения, г	33,2±3,1	48±2,4	55±3,5	33±4,8	36±1,1	24±2,0	18±3,3	36±2,0	29±1,5

С целью более наглядного представления полученных результатов приводим гистограмму, в которой отражены длина листьев анализируемых растений табака в разные периоды развития (рис. 127). Из рис. 127 видно, что разница в размерах листьев у опытных растений с контрольными, была наибольшей на начальных стадиях развития.

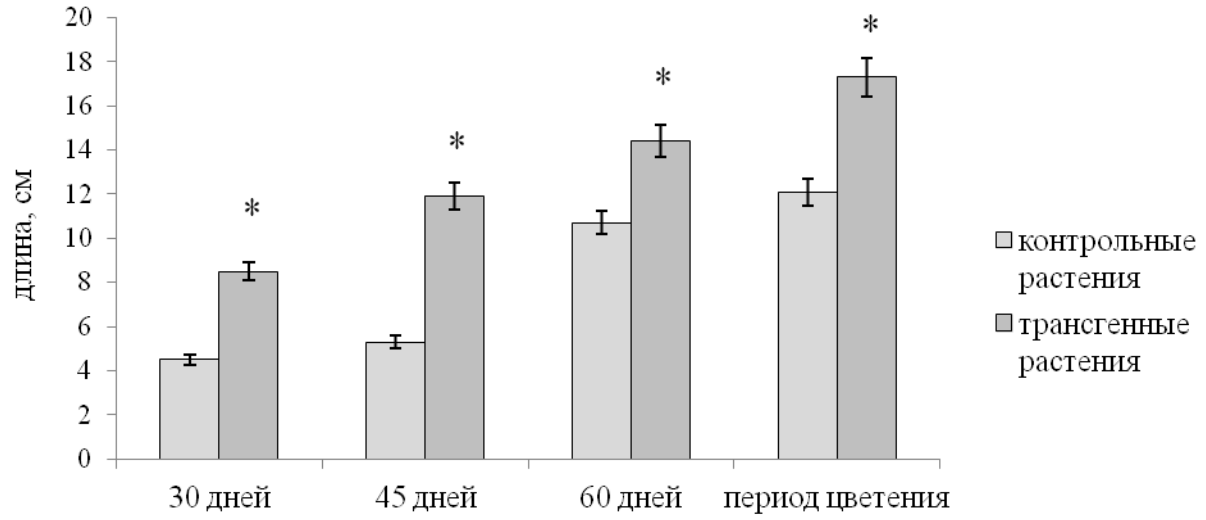


Рис. 127. Сравнительный анализ длины листьев трансгенных линий с контрольными растениями в ходе онтогенеза. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. (n=5; * – $p < 0,05$).

При изучении влияния сверхэкспрессии гена *AtEXPA10* на площадь клеток нижнего эпидермиса листьев использовались методы микроскопического анализа. Для определения приблизительного количества клеток в эпидермисе площадь листа делили на среднюю площадь клеток. Затем делили число клеток на площадь листа и получали приблизительное значение плотности, которую представили в виде числа клеток на 1 мм^2 листовой поверхности. Площадь отдельно взятых клеток эпидермиса листьев трансгенных по гену *AtEXPA10* растений в среднем была больше на 18%, а средняя площадь листьев больше на 43%, чем у контрольных растений (рис. 128). Плотность клеток нижнего эпидермиса листа контрольных растений в среднем составила 64 клетки на 1 мм^2, а для трансгенных растений по гену *AtEXPA10* 57 клеток/мм^2.

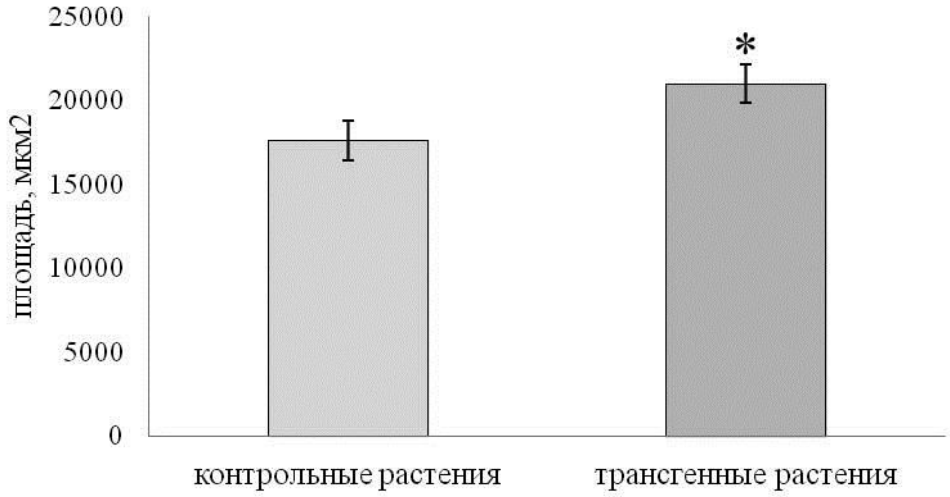


Рис. 128. Сравнительный анализ площади клеток листьев трансгенных линий с контрольными растениями. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; $p < 0,05$).

9.3.4. Обсуждение результатов

В результате проведенных исследований нами было показано ощутимое влияние повышенной экспрессии гена *AtEXPA10* на размеры вегетативных органов трансгенных растений табака. Несмотря на то, что данный ген был выделен из *A. thaliana*, он также оказался эффективным в трансгенных растениях табака. Повышенная экспрессия данного гена, в целом, проявилась так же, как и в *A. thaliana* (Cho et al., 2000), однако этот ген в меньшей степени влиял на размеры цветков, что также может объясняться либо низкой активностью 35S промотора в цветках, либо компенсаторным влиянием других путей генетического контроля размеров цветков у табака. Как уже отмечалось, повышенная экспрессия некоторых экспансинов может приводить к уменьшению размеров органов растений (Гао и др., 2010), однако большинство полученных нами линий растений с геном *AtEXPA10* характеризовались только увеличенными размерами всех вегетативных органов. Следует отметить, что ген *AtEXPA10* в табаке, также как и в *A. thaliana*, в основном влиял на размеры клеток, хотя абсолютное количество клеток в крупных листьях трансгенных растений было заметно больше, чем в более мелких листьях контрольных растений. Трансгенные по гену *AtEXPA10*

растения *A. thaliana* по размеру листьев были больше контрольных растений только на 18% (Cho et al., 2000), в наших же исследованиях листья трансгенных растений табака во время цветения были больше на 43%, чем листья контрольных растений. В первую очередь это может объясняться тем, что табак по размеру намного больше *A. thaliana* и состоит из большего количества клеток, поэтому даже небольшие изменения размеров клеток могут выражаться в виде более значительного изменения конечных размеров органов. В то же время, это может быть связано с отсутствием косупрессии трансгена в гетерологичной системе экспрессии.

Конститутивная экспрессия гена *AtEXPA10* в отличие от генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5*, способствовала большему увеличению размеров органов на ранних стадиях развития растения, что может быть связано с тем, что продукт гена *AtEXPA10* принимает участие на начальных стадиях клеточного растяжения. С другой стороны, ген *AtEXPA10* более близок к гену *NtEXPA4,* который по нашим данным функционирует на всех стадиях роста клеток растяжением. Исходя из этого, можно предположить, что более существенное увеличение размеров органов на начальных стадиях развития растения связано, в большей степени, отсутствием косупрессии.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что ген *AtEXPA10* может быть предложен в качестве целевого для создания трансгенных растений с увеличенными размерами листьев, причем он может оказаться более эффективным в неродственных *A. thaliana* растениях. Однако применение данного гена, также как и других генов экспансинов, ограничивается как компенсаторными механизмами, которые направлены на поддержание нормальных размеров органов, так и коротким периодом чувствительности полисахаридов клеточной стенки к действию экспансинов.

9.4. Клонирование и исследование генов экспансинов тополя черного (*P. nigra*)

В молекулярно-генетических исследованиях древесных растений тополь был выбран в качестве модельной системы из-за относительной компактности его генетического материала, который в 50 раз меньше генома сосны и содержит 485 миллионов пар оснований (Tuskan et al., 2006). С целью достижения точных результатов его геном был секвенирован многократно, однако, многие гены тополя, до сих пор остаются неизученными, поэтому наше внимание привлекли гены экспансинов именно этого модельного объекта. К тому же следует отметить, что из древесных растений наиболее легко трансформируются агробактериями и хорошо регенерируют именно различные виды тополя, в особенности осина.

Таким образом, дальнейшее исследование предполагало изучение гомологов генов экспансинов *PttEXPA1* и *PttEXPA3* гибридной осины (*Populus tremula* L.× *P. tremuloides* Michx) из тополя черного (*Populus nigra* L.), названных нами *PnEXPA1* и *PnEXPA3*, и определение их влияния на рост органов табака. За основу в данном исследовании были взяты именно гены экспансинов гибридной осины, так как у этого растения к началу наших работ исследуемые гены были уже опубликованы в GenBank в виде отдельных нуклеотидных последовательностей сопроводаемыми подробными аннотациями. Предполагалось, что повышенная экспрессия данных генов, как и в случае с геном *AtEXPA10*, будет способствовать увеличению размеров листьев, стеблей и цветков трансгенных растений табака.

9.4.1. Конститутивная экспрессия гена *PnEXPA1* в трансгенных растениях табака

Амплификация и клонирование гена *PnEXPA1*

Для амплификации гена экспансина *PnEXPA1* использовалась последовательность нуклеотидов из GenBank под номером AY4350991 из генома осины *P. tremula*. × *P. tremuloides*. Из геномной ДНК тополя черного при помощи прямого и обратного праймеров (табл. 1) была амплифицирована полноразмерная копия гена размером около 2000 пн (рис. 129).

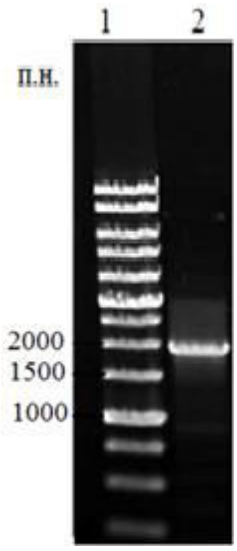


Рис. 129. Электрофореграмма ампликона гена *PnEXPA1*: 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн (Сибэнзим, Россия); 2 – ампликон гена *PnEXPA1* размером около 2000 пн.

Ампликон был клонирован в векторе pKRX и секвенирован, анализ нуклеотидной последовательности показал отсутствие замен нуклеотидов. Целевой ген *PnEXPA1* был вырезан из вектора pKRX по сайту *Bse*PI и обработан T4 ДНК-полимеразой для формирования «тупых» концов. В бинарный вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I осуществили ненаправленное клонирование целевого гена за 3'-концом 35S промотора. Поиск клонов осуществляли при помощи праймеров 35SCambF, 1301R, PnEXPAF и PnEXPAR. Из целевых генно-инженерных конструкций нарабатывались специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих праймеров: 35SCambF/PnEXPAR, PnEXPAF/1301R, 35SCambF/1301R, при сочетании 35SCambF/PnEXPAF, PnEXPAR/1301R амплификация проходила при антисмысловой ориентации гена *PnEXPA1*.

Получение трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PnEXPA1*

Бинарный вектор, содержащий ген *PnEXPA1* под контролем 35S промотора, был внедрен в клетки *A. tumefaciens* и далее была произведена агробактериальная

трансформация листовых дисков табака. В результате трансформации было получено 63 растения, из которых на укоренение было отобрано 26. Успешно укоренились 19 растений, которые окрашивались в синий цвет при инкубации в субстрате x-gluc.

Из отобранных растений была выделена тотальная РНК и проведена ОТ-ПЦР, результаты которой показали наличие экспрессии целевого гена в трансгенных растениях. Размер ампликона совпал с теоретически ожидаемым и составил 789 пн (рис. 130).

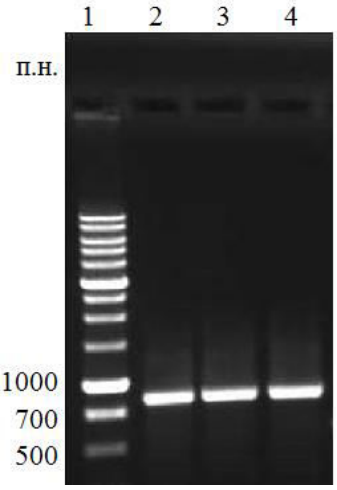


Рис. 130. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР гена *PnEXPA1*: 1 – маркер молекулярной массы 1 kb (Сибэнзим, Россия); 2 – 4 – результаты ОТ-ПЦР трансгенных растений табака.

Морфологический анализ трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PnEXPA1*

Семена шести трансгенных по гену *PnEXPA1* линий табака в течение 20-ти дней проращивали на селективной среде МС, а затем были пересажены на почву. В период выращивания на среде МС видимой разницы между опытными и контрольными растениями не наблюдалось. Во время выращивания на почве было замечено, что, по крайней мере, три линии трансгенных растений под номерами 9, 17 и 26 отличались увеличенными размерами листьев, по сравнению с контрольными растениями. Через 30 дней после акклиматизации трансгенные

растения в среднем опережали контрольные растения по длине листьев на 58%, через 45 дней на 60%, через 60 дней на 26%, в период цветения на 21% (рис. 131; табл. 12).

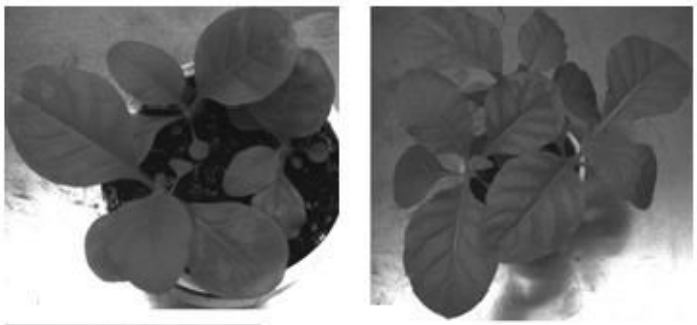
30 дней после акклиматизации		
45 дней после акклиматизации		
Период цветения		
	контроль	трансгенные растения с конститутивной экспрессией гена *PnEXPA1*

Рис. 131. Внешний вид контрольного, а также трансгенного растения табака с повышенной экспрессией гена *PnEXPA1*.

Таблица 12. Морфометрические параметры трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена *PnEXPA1*

	Длина листьев через 30 дней, см	Длина листьев через 45 дней, см	Длина листьев через 60 дней, см	Длина листьев в период цветения, см	Высота стебля в период цветения, см	Длина цветков, см	Площадь листьев, $см^2$	Масса растения в период цветения, г
Контроль 1301	4,5 ± 0,4	5,7 ± 0,4	10,7 ± 0,8	14,1 ± 0,2	74±5	4,3 ± 0,1	93,6 ± 2	21±4
35S::PnEXPA1 № 9	9,7 ± 0,4	11,5 ± 0,9	16,2 ± 0,4	19,0 ± 0,6	90±4	4,8 ± 0,1	159,7 ± 3,3	36±7
35S::PnEXPA1 № 17	8 ± 0	9,6 ± 0,6	14 ± 0,4	16,4 ± 0,3	83±4	4,5 ± 0,2	110,3 ± 4,3	28±5
35S::PnEXPA1 № 26	3,7 ± 0,2	6,3 ± 0,4	10,3 ± 0,4	15,6 ± 0,5	82±2	4,6 ± 0,1	112,8 ± 7,6	24±3

Площадь листьев трансгенных растений была больше, чем у контрольных в среднем на 36%, высота стебля на 15%, длина цветка на 8%, сырая масса на 38%. Также следует отметить, что количество цветков у трансгенных растений было больше, чем у контрольных. Цветение контрольных и опытных растений происходило примерно в одно и то же время, а именно через 95-110 дней после пересадки на почву. По остальным морфологическим характеристикам и фенотипическим признакам опытные растения практически не отличались от контрольных растений. На рисунке 132 приводится гистограмма для более наглядного представления об увеличении длины листьев у трансгенных растений *35S::PnEXPA1* в разные периоды развития растения.

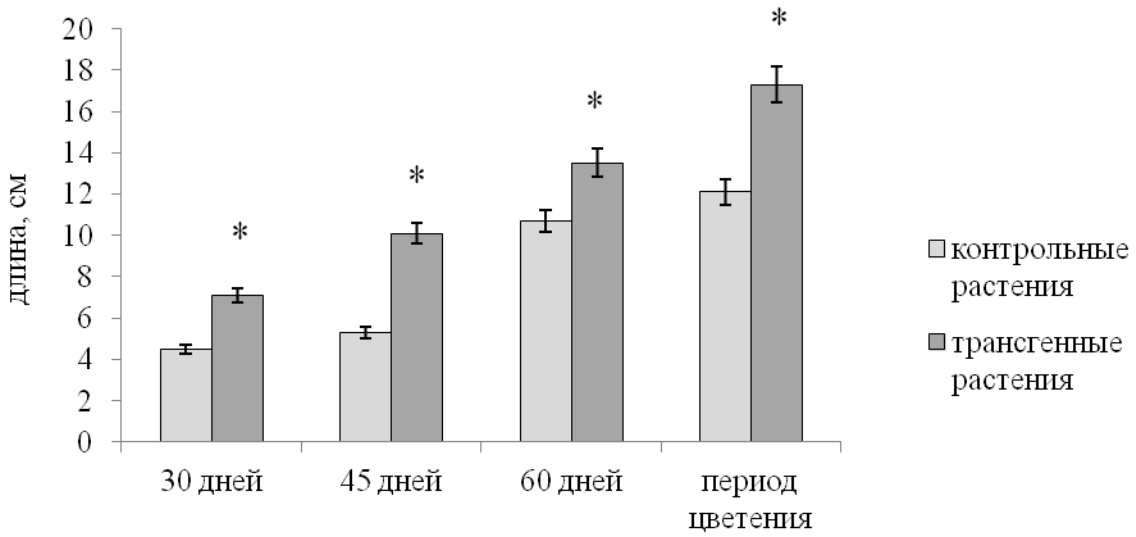


Рис. 132. Сравнительный анализ длины листьев трансгенных линий с контрольными растениями на разных стадиях развития. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Для определения влияния повышенной экспрессии гена *PnEXPA1* на размеры клеток было проведено исследование площади клеток нижнего эпидермиса листьев опытных растений (рис. 133). Исследования показали, что средняя площадь листьев у растений *35S::PnEXPA1* была больше на 37%, а средняя площадь клеток эпидермиса листьев увеличивалась на 53% (рис. 134).

Также у трансгенных по гену *PnEXPA1* растений плотность клеток нижнего эпидермиса листа составила около 40 клеток на 1 мм^2 по сравнению с контрольными растениями, где плотность составила в среднем 64 клетки на 1 мм^2.

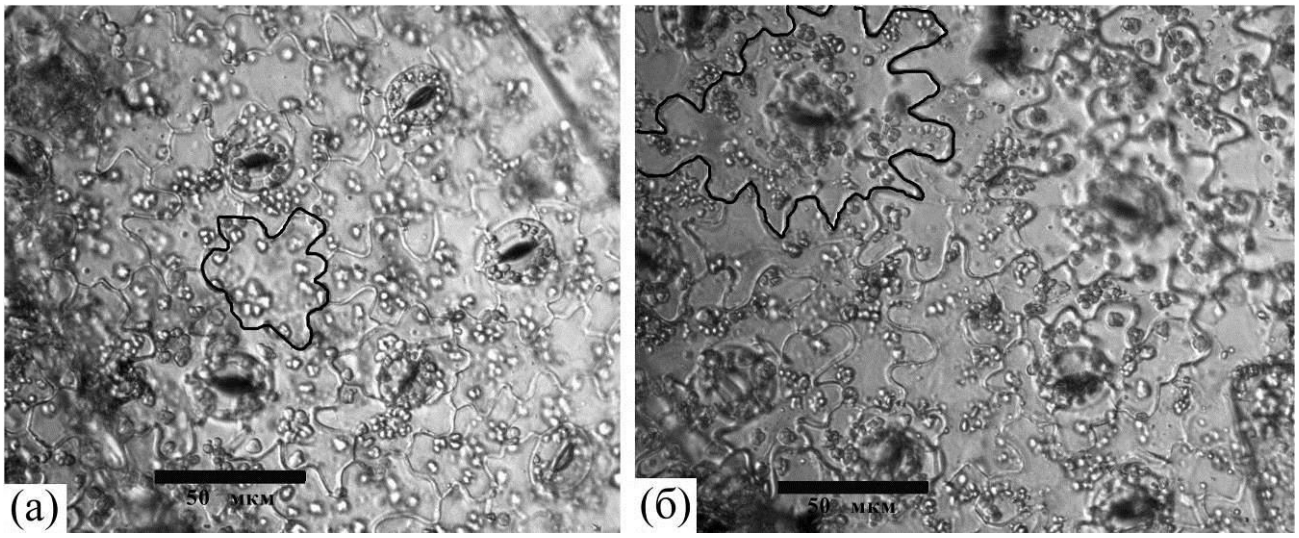


Рис. 133. Площадь клеток нижнего эпидермиса листьев: а − контрольные растения; б – опытные растения с повышенной экспрессией гена *PnEXPA1* (увеличение 200×). Шкала 50 мкм.

Для определения размеров клеток мезофилла листа были сделаны гистологические срезы листьев шести опытных и трех контрольных растений. Измерения площади клеток палисадного мезофилла опытных растений показали такое же увеличение их размеров по сравнению с клетками эпидермиса. При этом площадь клеток палисадного мезофилла у трансгенных растений с повышенной экспрессией гена *PnEXPA1* была больше на 49%, чем у контрольных растений. Размеры клеток губчатого мезофилла трансгенных растений были больше контрольных, примерно на 20 − 25%.

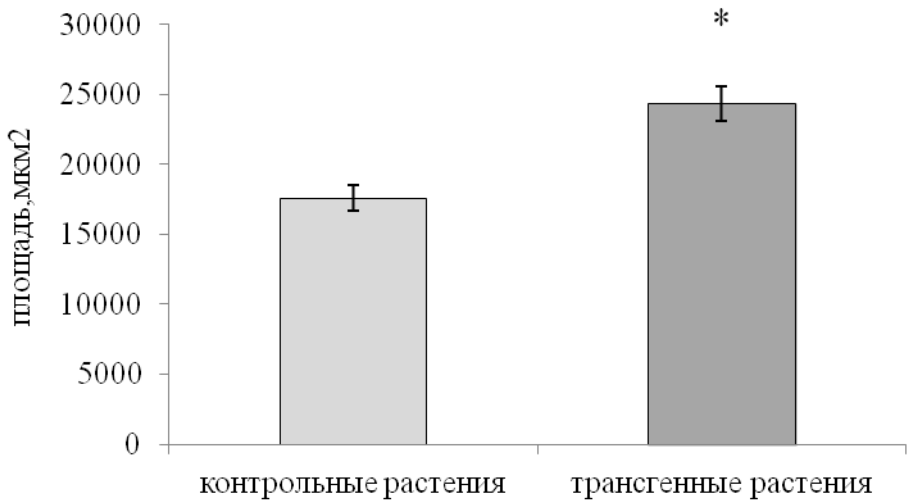


Рис. 134. Сравнительный анализ площади клеток нижнего эпидермиса листьев трансгенных линий с конститутивной экспрессией гена *PnEXPA1*. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Подсчет количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у опытных и контрольных растений, показал, что трансгенные растения являются диплоидными и несут, как и контрольные, от 14 до 20 хлоропластов на устьичную клетку (Малецкий и др., 2013, Монахос и др., 2014). Данный анализ свидетельствует о том, что увеличение площадей клеток и размеров вегетативных органов трансгенных растений обусловлено, вероятнее всего, повышенной экспрессией гена экспансина *PnEXPA1*, а не увеличенной плоидностью опытных растений.

Обсуждение результатов

В отличие от гена *AtEXPA10,* в случае с геном *PnEXPA1* размеры клеток были еще больше, а их количество на единицу площади листовой поверхности, наоборот, только уменьшалось. Хотя следует отметить, что в трансгенных растениях с большими размерами листьев абсолютное количество клеток эпидермиса тоже увеличивалось.

Отметим, что шведскими исследователями еще до начала наших

исследований были получены трансгенные растения осины с повышенной экспрессией гена *PttEXPA1* (Gray-Mitsumune et al., 2008), являющегося ортологом гена *PnEXPA1*. Трансгенные растения осины характеризовались удлинением междоузлий и листьев, что обуславливалось в основном увеличением размеров клеток. Также было показано, что наибольший уровень экспрессии данного гена приходится на камбиальную зону. Видимо, этот экспансин участвует в основном в растяжении молодых и недифференцированных клеток. Необходимо напомнить, что ген *PttEXPA1* наиболее близок по нуклеотидной последовательности с геном *NtEXPA6* и нами было также показано, что экспансин NtEXPA6 тоже участвует в основном в обеспечении растяжения недифференцированных клеток (рис. 103). Было установлено, что продукт гена *PttEXPA1* в трансгенной осине стимулировал увеличение диаметра клеток волокон и небольшое удлинение длины сосудов древесины (Gray-Mitsumune et al., 2008). Результаты наших исследований также показали увеличение размеров вегетативных органов табака, основной причиной которого является увеличение размеров клеток.

Ген *PnEXPA1* может быть использован для увеличения размеров листьев и стебля в гетерологичных условиях и полученная нами в ходе этой работы генно-инженерная конструкция может быть рекомендована для применения в генной инженерии хозяйственно-ценных растений.

9.4.2. Конститутивная экспрессия гена *PnEXPA3* в трансгенных растениях табака

Амплификация и клонирование гена *PnEXPA3*

При подборе праймеров для амплификации гена *PnEXPA3* тополя черного (*P. nigra*) использовалась нуклеотидная последовательность из GenBank под номером AY435101.1 из генома гибридной осины *P. tremula* × *P. tremuloides*. Участок ДНК, содержащий ген *PnEXPA3*, был амплифицирован из геномной ДНК тополя черного при помощи соответствующих праймеров (табл. 1), причем, размер ампликона составил около 1500 пн (рис. 135).

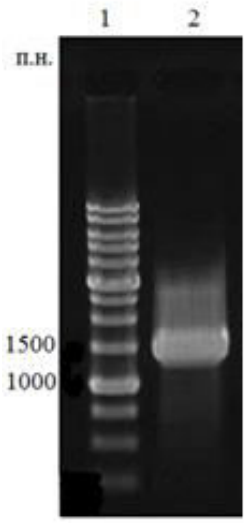


Рис. 135. Электрофореграмма ампликона гена *PnEXPA3*: 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн (Сибэнзим, Россия); 2 – ампликон гена *PnEXPA1* размером около 1500 пн.

Ампликон был клонирован в векторе pKRX и секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия гена совпадает с теоретически ожидаемой. Далее ген *PnEXPA3* был вырезан из вектора pKRX по сайту *Bse*PI и обработан T4 ДНК-полимеразой для формирования «тупых» концов. После этого по сайту рестрикции *Sma*I было осуществлено ненаправленное клонирование целевого гена в бинарных векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1, где предполагалась его сверхэкспрессия под контролем 35S промотора. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевого гена осуществляли при помощи праймеров 35SCambF, 1301R, PnEXPAF и PnEXPAR (табл. 1). Специфичные ампликоны нарабатывались при ПЦР в случае сочетания праймеров 35SCambF/ PnEXPAR, PnEXPAF/1301R, 35SCambF/1301R. После полной проверки полученные бинарные векторы с геном *PnEXPA3* были внедрены в агробактерии. Клоны, содержащие векторы с целевым геном в сенс-ориентации использовались для агробактериальной трансформации табака и получения трансгенных растений.

Получение трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *PnEXPA3*

В ходе трансформации листовых дисков табака генно-инженерной

конструкцией pCambia1301/PnEXPA3 были получены только три линии растений, однако они не использовались в дальнейшем исследовании из-за отсутствия расщепления при выращивании сеянцев на среде с селективным антибиотиком. С генно-инженерной конструкцией pCambia1305.1/PnEXPA3 было получено 16 первичных трансгенных побегов, девять из которых были акклиматизированы к условиям почвы. Из данных растений была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *PnEXPA3* и 35S промотора. Также был проведен ОТ-ПЦР с целью выявления транскриптов целевого гена в трансгенных растениях (рис. 136).

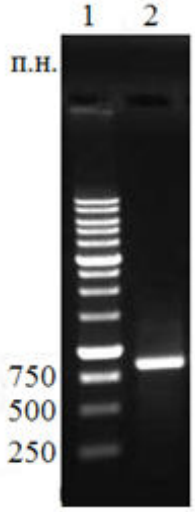


Рис. 136. Электрофореграмма результатов ОТ – ПЦР гена *PnEXPA3*: 1 – маркер молекулярной массы 250 – 10000 пн. (Сибэнзим, Россия); 2 – ампликон кДНК-копии гена *PnEXPA3* размером 770 пн.

Показано, что все девять растений содержат целевой ген и 35S промотор. Для линий 4, 5, 7 и 9 было показано классическое расщепление 3:1 и детектируемый методом полуколичественной ОТ-ПЦР уровень экспрессии гена *PnEXPA3*. От этих растений были собраны семена с целью получения второго поколения трансгенных растений и проведения морфологического анализа.

Морфологический анализ трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *PnEXPA3*

Семена трех линий растений второго поколения были высеяны на селективную среду, а затем пересажены на почву. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного

вектора без целевого гена (pCambia 1301). По длине листьев трансгенные и контрольные растения после пересадки на почву практически не различались ни через 30, ни 45 дней, ни в период цветения (табл. 13).

По площади листьев трансгенные растения также не превышали контрольные растения (рис. 137). В то же время по высоте стебля опытные растения были заметно выше контрольных, и разница составила для линии №5 – 23%, линии №7 – 20%, линии №9 – 26%. По длине цветка различий также не наблюдалось.

Таблица 13. Морфометрические параметры контрольных растений и трансгенных растений табака поколения T_1 с повышенной экспрессией гена *PnEXPA3*

Параметры	Линия контрольных растений pCambia 1301	Линии трансгенных растений, с повышенной экспрессией гена *PnEXPA3*		
		pCambia 1305.1 *PnEXPA3* №5	pCambia 1305.1 *PnEXPA3* №7	pCambia 1305.1 *PnEXPA3* №9
Длина листьев, см				
30 дней	4,6 ± 0,4	6,2 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,7 ± 0,3
45 дней	11,3 ± 0,8	11,4 ± 0,3	10,1 ± 0,5	9,1 ± 0,3
В период цветения	17,3 ± 0,2	16,4 ± 0,9	18,2 ± 0,4	16, 0 ± 0,5
Площадь трех самых крупных листьев, $см^2$	147,0 ± 3,0	134,5 ± 7,8	146,0 ± 5,1	136,5 ± 5,0
Высота стебля, см	81,0 ± 3,0	**99,5 ± 1,2***	**96, 8 ± 0,9***	**102,3 ± 4,1***
Длина цветка, см	4,49 ± 0,01	4,55 ± 0,11	4,45 ± 0,05	4,45 ± 0,06
Площадь клеток эпидермиса листьев, $мкм^2$	17600 ± 913	**24857 ± 1491***	**25227 ± 725***	**28941 ± 2808***
Число клеток эпидермиса листьев на 1 $мм^2$	66,2 ± 3,6	**41,0 ± 2,6***	**40,1 ± 0,9***	**36,5 ± 3,5***
Время цветения, дней после акклиматизации	107,8 ± 2,4	110,5 ± 1,2	117,7 ± 4,2	103,0 ± 1,8

* – $p < 0,05$

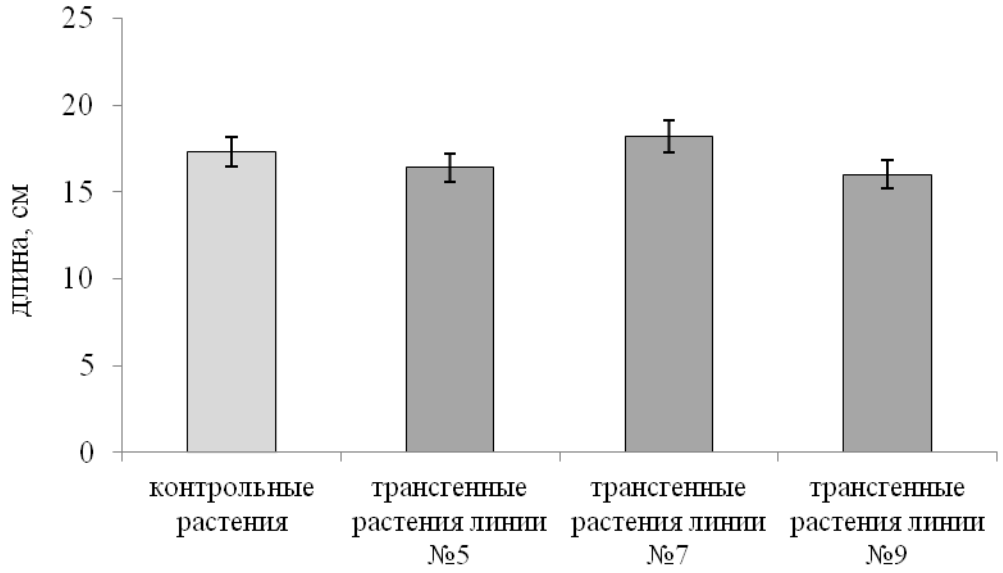


Рис. 137. Сравнительный анализ длины листьев трансгенных линий pCambia1305.1/PnEXPA3 с контрольными растениями. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; p > 0,05).

Для выяснения влияния экспрессии гена *PnEXPA3* на размеры клеток, нами были проведены микроскопические исследования клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных и опытных растений. Трансгенные по гену *PnEXPA3* растения в отличие от контрольных характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев (рис. 138, 139). При этом у линии №5 клетки в среднем были больше на 60%, линии №7 на 62%, линии №9 на 74% крупнее, чем у контрольных растений (табл. 13).

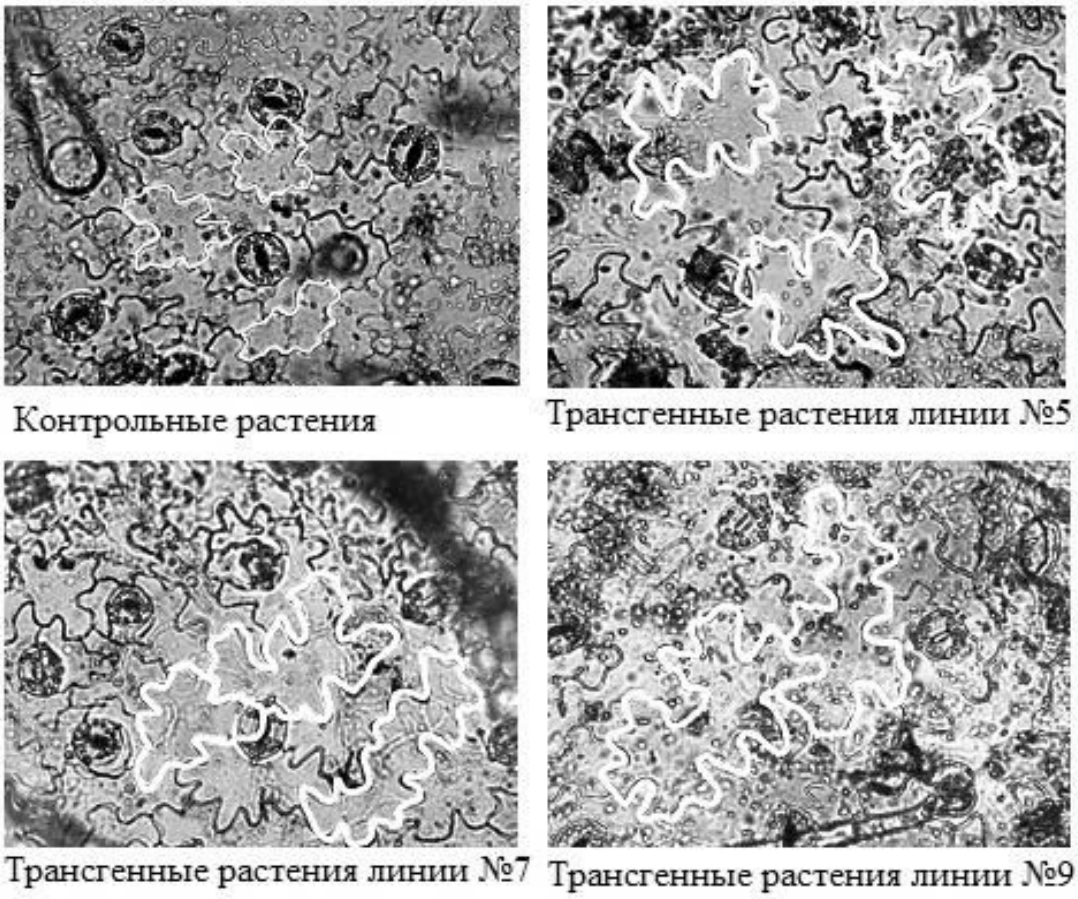


Рис. 138. Площади клеток нижнего эпидермиса листьев трансгенных по гену *PnEXPA3* растений табака (увеличение 200×).

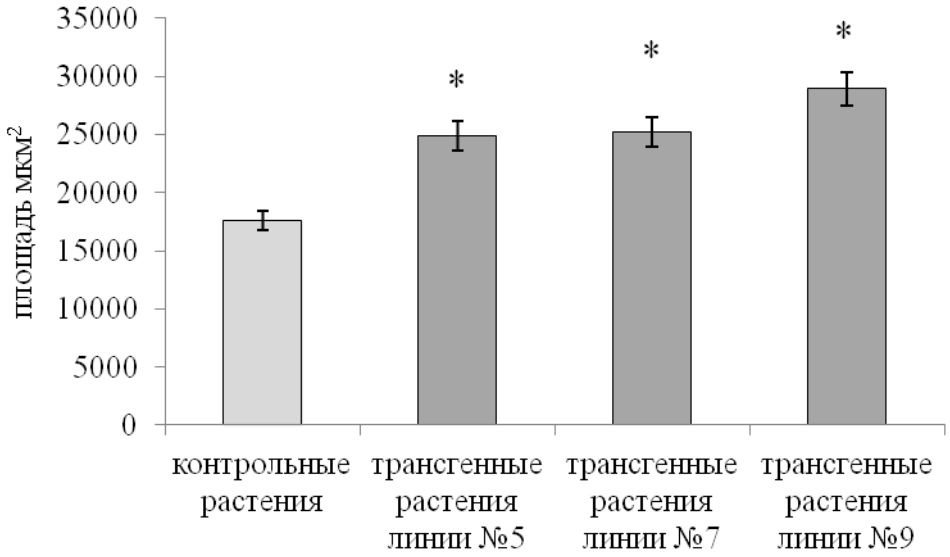


Рис. 139. Сравнительный анализ площади клеток нижнего эпидермиса листьев трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *PnEXPA3*. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (n=5; * – $p < 0,05$).

Подсчет количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у опытных и контрольных растений, показал, что трансгенные растения являются диплоидными и несут, как и контрольные, от 14 до 20 хлоропластов на устьичную клетку (Малецкий и др., 2013, Монахос и др., 2014). Данный анализ свидетельствует о том, что увеличение площадей клеток и размеров вегетативных органов трансгенных растений обусловлено, вероятнее всего, повышенной экспрессией гена экспансина *PnEXPA3*, а не увеличенной плоидностью опытных растений (Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003).

Обсуждение результатов

Изначально предполагалось, что конститутивная экспрессия гена *PnEXPA3* в трансгенных растениях табака будет в первую очередь стимулировать рост листьев, так как этот ген тополя наиболее близок к гену *AtEXPA10 A. thaliana*. Известно, что сверхэкспрессия гена *AtEXPA10* способствует увеличению размеров листьев у трансгенных растений *A. thaliana* (Cho, Cosgrove, 2000). Однако вопреки

ожиданиям, по размерам листьев трансгенные *35S::PnEXPA3* и контрольные растения практически не отличались. Интересно отметить, что стебли у трансгенных по гену *PnEXPA3* растений табака были больше, чем у контрольных растений и сравнимы с трансгенными по генам *AtEXPA10* и *PnEXPA1* растениями табака (см. разделы 9.3 и 9.4.1). Отсюда можно сделать вывод о том, что конститутивная экспрессия гена *PnEXPA3* в первую очередь стимулирует именно рост стебля в длину, а на рост листьев оказывает гораздо меньшее влияние. Все полученные трансгенные растения отличались увеличением размеров клеток эпидермиса листьев. В среднем размеры клеток увеличивалась на 60%, при этом размеры листьев у анализируемых растений оставались в пределах нормы. В связи с этими данными можно предположить, что сверхэкспрессия экспансинов негативно влияет на уровень экспрессии различных транскрипционных факторов, стимулирующих клеточное деление, при этом сигнальными молекулами могут оказаться различные фитогормоны и белки с OSR-доменом (Feng et al., 2011). Однако в литературе такие сведения отсутствуют и для проверки этих предположений требуются дополнительные исследования.

Таким образом, ген *PnEXPA3* может быть использован в генной инженерии с целью стимуляции клеточного растяжения и создания трансгенных растений с увеличенными размерами стебля.

9.5. Заключение к главе 9

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы и экспансины в растениях кодируются множеством генов, причем они отличаются друг от друга по паттерну экспрессии во времени и пространстве и выполняемым функциям при росте и развитии растения.

Ген *NtEXGT* кодирует один из ксилоглюканэндотрансгликозилаз/гидролаз (XTHs) *N. tabacum* и является ортологом гена *AtXTH4 A. thaliana.* Наиболее высокий уровень экспрессии гена *NtEXGT* обнаруживается в молодых цветках и молодых листьях, расположенных рядом с верхушкой побега. В интенсивно растущих за счет клеточного растяжения листьях экспрессию гена *NtEXGT*

индуцируют цитокинины, ауксины, брассиностероиды и гиббереллины. Ауксины способны стимулировать экспрессию гена *NtEXGT* даже в листьях, прекративших свой рост, тогда как другие фитогормоны на это не способны. Сигналы от фитогормонов к гену *NtEXGT* поступают, в том числе, через OSR-белок ARL, однако дальнейший путь внутриклеточного сигнала остается неизвестным. Продукт гена *NtANTL* не коэкспрессируется с геном *NtEXGT* и потому не может являться транскрипционным фактором исследуемого гена.

Уровень экспрессии гена *NtEXGT* повышается в ответ на воздействие NaCl, засухи, холода и кадмия, при этом сигналы к исследуемому гену поступают через АБК. Эти данные свидетельствуют об участии продукта гена *NtEXGT* в обеспечении роста клеток растяжением в условиях воздействия стрессовых факторов. Трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXGT* мало отличаются фенотипически от растений дикого типа и характеризуются лишь уменьшением высоты стебля и более быстрым переходом к фазе цветения. Клетки листьев и цветков трансгенных растений увеличиваются по сравнению с контрольными растениями, при этом размеры самих органов часто остаются в пределах нормы. У трансгенных растений табака с повышенной экспрессией гена *NtEXGT* наблюдается повышенная по сравнению с контролем устойчивость к NaCl, которая проявляется более высокими показателями роста корней в условиях солевого стресса.

Нами впервые были проведены исследования четырех генов экспансинов табака: *NtEXPA1*, *NtEXPA4, NtEXPA5* и *NtEXPA6*, которые относятся к разным субгруппам и выполняют разные функции в процессе роста и развития растения. Гены *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* являются в основном листоспецифичными и экспрессируются только в первых шести от верхушки побега листьях, тогда как ген *NtEXPA6* только в первых трех. В листьях прекративших свой рост гены экспансинов табака не экспрессируются. Наиболее высокий уровень транскриптов гена *NtEXPA6* был обнаружен в тканях с высоким содержанием недифференцированных клеток, а именно в каллусе, верхушке побега и корнях. В целом, исследуемые гены составляют следующий ряд: *NtEXPA6 – NtEXPA1 –*

NtEXPA4 – NtEXPA5, где первые два гена отвечают за начальные стадии роста клеток растяжением, а последние два за последующие стадии роста клеток растяжением.

В верхушке побега экзогенные фитогормоны оказывают незначительное влияние на уровень экспрессии генов экспансинов. В наиболее интенсивно растущих растяжением листьях все группы фитогормонов, кроме брассиностероидов, стимулировали экспрессию генов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5.* Эффект брассиностероидов на экспрессию генов экспансинов зависел от номера листа и эта группа фитогормонов, в отличие от остальных, была способна как повышать, так и снижать содержание транскриптов исследуемых генов. Судя по всему, часть внутриклеточных сигналов от брассиностероидов к экспансинам поступает через OSR-белки. Однако регуляция чувствительности тех или иных экспансинов к фитогормонам происходит не только на уровне OSR-белков, но и на уровнях, расположенных выше. В целом, гены *NtEXPA1* и *NtEXPA5* являются ауксин-индуцибельными, а ген *NtEXPA4,* преимущественно цитокинин-индуцибельным. Экспрессия гена *NtEXPA6*, также преимущественно контролируется ауксинами и цитокининами, однако в листьях, расположенных ниже листа №3 экспрессия данного гена не может быть простимулирована экзогенными фитогормонами. Схожие данные были получены для гена *NtEXPA1,* и это предполагает функционирование эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов экспансинов.

Уровень экспрессии генов экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* повышается в ответ на воздействие NaCl, засухи и холода, при этом сигналы к исследуемым генам поступают через АБК. Экспрессия гена *NtEXPA6* при воздействии тех же абиотических факторов практически не изменяется, а в ответ на АБК содержание транскриптов данного гена уменьшается. Полученные экспериментальные данные говорят о вовлеченности экспансинов в ответ растений на стрессовые факторы и, более того, свидетельствуют в пользу участия этой группы белков в обеспечении роста при изменяющихся условиях среды.

Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA1* способствует увеличению размеров, прежде всего листьев, тогда как трансген *NtEXPA5* большее влияние оказывает на длину стебля. В обоих случаях увеличение размеров органов коррелировало с увеличением размеров отдельных клеток. В то же время, в растениях функционирует компенсаторный механизм, направленный на уменьшение количества клеток в листьях, что способствует менее существенному увеличению размеров этого органа. Молекулярные механизмы данного компенсаторного механизма остаются на данный момент неисследованными. Снижение уровня экспрессии гена *NtEXPA4* способствует уменьшению размеров листьев, стебля и цветков за счет уменьшения размеров отдельных клеток.

Сверхэкспрессия генов экспансинов *AtEXPA10* и *PnEXPA1* в гетерологичных условиях, а именно в трансгенных растениях табака, способствовала более существенному увеличению размеров органов, чем при использовании генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5.* Трансгены *AtEXPA10* и *PnEXPA1* большее влияние оказывали на размеры листьев, тогда как конститутивная экспрессия гена *PnEXPA3* способствовала увеличению длины стебля. Конститутивная экспрессия генов *AtEXPA10* и *PnEXPA1,* в отличие от генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5*, способствовала большему увеличению размеров органов на ранних стадиях развития растения, что может быть связано с тем, что продукты генов *AtEXPA10* и *PnEXPA1* принимают участие на начальных стадиях клеточного растяжения.

Результаты наших исследований показывают, что гены *AtEXPA10* и *PnEXPA1* могут быть предложены в качестве целевых для создания трансгенных растений с увеличенными размерами листьев, причем они могут оказаться более эффективными в неродственных *A. thaliana* растениях. В целом, полученные нами генно-инженерные конструкции на основе генов *NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5, AtEXPA10, PnEXPA1* и *PnEXPA3* могут быть использованы для получения трансгенных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов. Однако необходимо учитывать, что степень изменения размеров органов едва ли превысит 1,5 раза по сравнению с контролем.

Часть 4. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, в ходе всей работы рассматривалась небольшая часть клеточной сигнализации, участвующей в регуляции размеров органов, общая схема которой приводится на рисунке 140. В ответ на определенные воздействия повышается содержание активных форм фитогормонов, которые взаимодействуют со своими рецепторами, причем именно на этом уровне, видимо, обеспечивается специфичность сигнала за счет регуляции компетентности клеток к восприятию этого сигнала. Далее сигналы частично поступают к белкам с OSR-доменом, где происходит трансдукция сигнала по направлению стимуляции клеточного деления или же роста клеток растяжением. После белков с OSR-доменом происходит амплификация сигнала, и он поступает к таким транскрипционным факторам, как ANT, которые запускают экспрессию генов, продукты которых участвуют в обеспечении клеточного деления или роста клеток растяжением (рис. 140).



Рис. 140. Общая схема рассмотренной в ходе работы части клеточной сигнализации, вовлеченной в регуляцию размеров органов растений.

Одна из прикладных задач данной работы заключалась в увеличении или уменьшении размеров органов растений путем изменения уровня экспрессии генов *ANT*, *OSR*, экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. В целом в рамках всей работы было создано и апробировано на табаке 93 целевых генно-инженерных конструкции. Для морфологического анализа было использовано 346 линий трансгенных растений табака второго поколения. На рисунке 141 представлены обобщенные результаты морфологического анализа листьев, стебля и цветков основных групп трансгенных растений табака. Наибольшая степень увеличения длины листьев в среднем на 39%, была характерна для трансгенных растений табака, содержащих генно-инженерную конструкцию *ВМГ::AtARL* (рис. 141а). Наибольшая степень уменьшения длины листьев была характерна для трансгенных растений с пониженной экспрессией гена *NtANTL,* причем для одной из линий, содержащих конструкцию 1301/Reg1A, разница в среднем составила 83% (рис. 141а). Высоту стебля удалось уменьшить в среднем на 38% для одной из линий, которая экспрессировала участок гена *NtANTL* как в сенс-ориентации, так и в антисенс-ориентации, то есть содержащая конструкцию *35S::NtANTLi* (рис. 141б). Наибольшая степень увеличения высоты стебля в среднем на 46% наблюдалась у одной из линий, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*, содержащих конструкцию *35S::NtEXPA5* (рис. 141б). Размеры цветков удавалось уменьшать в среднем на 13% у линий с пониженной экспрессией гена *NtANTL*, содержащих конструкцию 1301/Reg1A (рис. 141в). Наибольшая степень увеличения длины цветка была характерна для трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *AtARGOS* под контролем промотора ВМГ (рис. 141в). Одинаково положительно на размеры всех трех параметров роста влиял ген *AtARL* совместно с промотором ВМГ, поэтому для дальнейших работ по трансформации хозяйственно-ценных культур была отобрана генно-инженерная конструкция *ВМГ::AtARL.* Данная конструкция была уже апробирована нами на рапсе (см. раздел 8.6), в будущем же планируется использовать его и для трансформации других важных культур, в которых увеличение размеров листьев и стебля является экономически целесообразным.

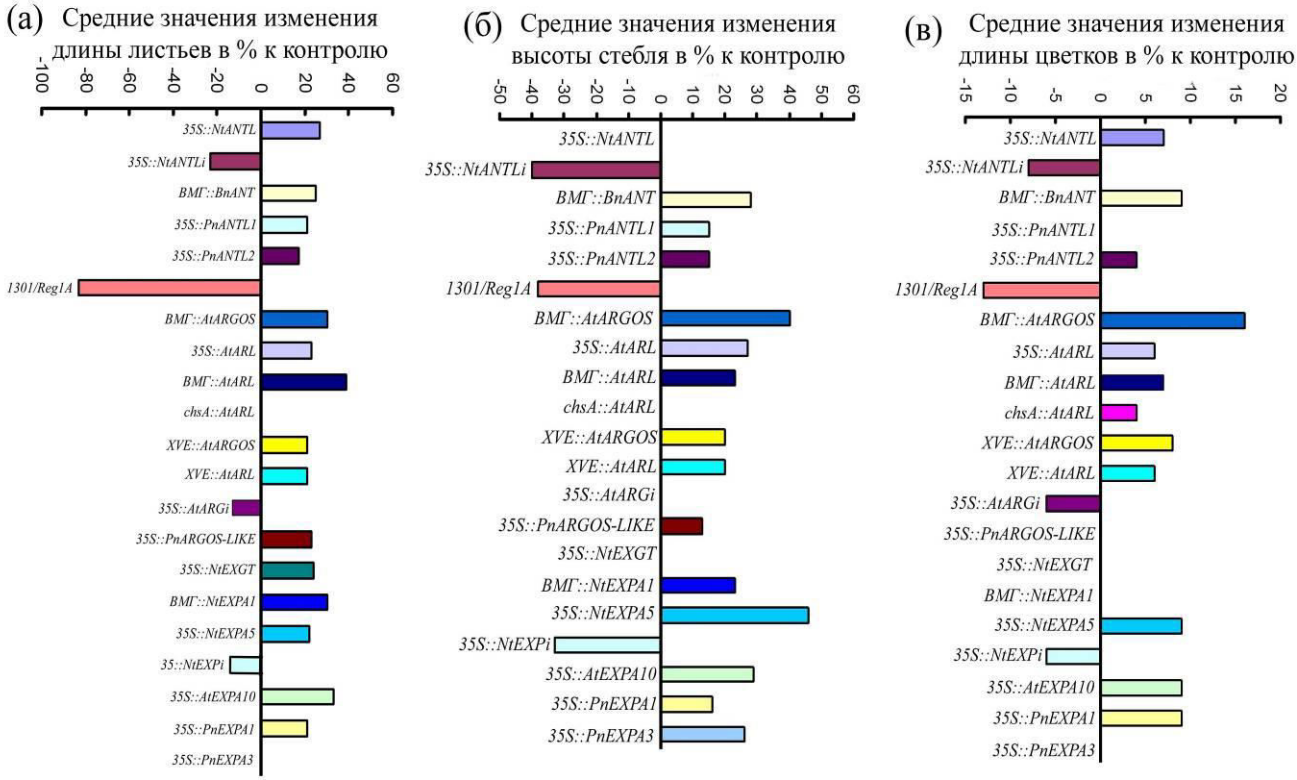


Рис. 141. Средние значения изменения длины листьев (а), высоты стебля (б) и длины цветков (в) в % к контролю (по сравнению с растениями табака дикого типа и трансгенными растениями табака, содержащими Т-ДНК вектора pCambia 1301 без целевого гена).

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Установлено, что промотор вируса мозаики георгина в трансгенных растениях табака характеризуется большей активностью, чем классический 35S промотор, что выражается в виде возрастания уровня транскрипции целевых генов, а также более существенным влиянием последних на фенотип.

2. Конститутивная экспрессия гена *CLAVATA3* в трансгенных растениях табака способствует уменьшению числа клеток в растущих органах, при этом в листьях увеличивается концентрация цитокининов, которые стимулируют экспрессию генов, кодирующих экспансин NtEXPA4 и эндоксилоглюкантрансферазу NtEXGT, которые, в свою очередь, обеспечивают компенсаторный рост клеток растяжением.

3. Выявлено, что экспрессия транскрипционного фактора AINTEGUMENTA обнаруживается только в зонах с высоким содержанием недифференцированных клеток и регулируется цитокининами, ауксинами и брассиностероидами, причем сигналы от фитогормонов к нему поступают через белковые продукты *OSR*-генов, после которых происходит трансдукция и амплификация сигнала. Транскрипционный фактор AINTEGUMENTA контролирует клеточные деления в верхушках побегов и молодых листьях совместно с циклинами и циклин-зависимыми протеинкиназами и участвует в регуляции роста клеток растяжением через стимуляцию экспрессии генов экспансинов.

4. Показано, что *OSR*-гены кодируют группу белков, ассоциированных с регуляцией размеров органов в целом, так как одновременно контролируют деление клеток, инициацию клеточного растяжения и участвуют в поддержании роста клеток растяжением путем регуляции экспрессии транскрипционного фактора AINTEGUMENTA, экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. Экспрессия *OSR*-гена *ARGOS-LIKE* тополя преимущественно контролируется ауксинами, причем этот ген участвует в регуляции размеров органов через влияние на рост клеток растяжением.

5. Наиболее высокий уровень содержания транскриптов гена эндоксилоглюкантрансферазы *NtEXGT* обнаруживается в молодых цветках и

листьях, расположенных рядом с верхушкой побега. В интенсивно растущих за счет клеточного растяжения листьях экспрессию гена *NtEXGT* индуцируют цитокинины, ауксины, брассиностероиды и гиббереллины. Содержание транскриптов гена *NtEXGT* повышается в ответ на воздействие NaCl, засухи, холода, кадмия и АБК. Трансгенные растения табака, с конститутивной экспрессией гена *NtEXGT* характеризуются высокими показателями роста корней в условиях солевого стресса. Совокупность полученных данных свидетельствует об участии продукта гена *NtEXGT* в обеспечении роста клеток растяжением, как в нормальных условиях, так и при воздействии стрессовых факторов.

6. Установлено, что гены экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* являются листоспецифичными и экспрессируются только в первых шести от верхушки побега листьях под контролем цитокининов, ауксинов, брассиностероидов и гиббереллинов. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *NtEXPA6* обнаруживается в тканях с высоким содержанием недифференцированных клеток, при этом транскрипция данного гена контролируется ауксинами и цитокининами.

7. Показано, что воздействие фитогормонов на транскрипцию генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз зависит от возраста листа. Установлено, что часть сигналов от фитогормонов к экспансинам и ксилоглюканэндотрансгликозилазам поступает через продукты *OSR*-генов, однако регуляция чувствительности исследуемых генов к фитогормонам происходит на вышерасположенных уровнях клеточного сигналинга.

8. Содержание транскриптов генов экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* повышается в ответ на воздействие NaCl, засухи, холода и АБК. Экспрессия гена *NtEXPA6* при воздействии тех же абиотических факторов не изменяется, а в ответ на АБК содержание транскриптов данного гена уменьшается. Совокупность полученных экспериментальных данных свидетельствует о вовлеченности экспансинов NtEXPA1, NtEXPA4 и NtEXPA5 в ответ растений на стрессовые факторы и об их участии в обеспечении роста при изменяющихся условиях среды.

9. Показано, что конститутивная экспрессия генов *NtANTL, BnaX.ANT.b, PnANTL2* и *AtARGOS* в трансгенных растениях табака способствует увеличению размеров органов за счет влияния как на клеточное деление, так и на рост клеток растяжением. Трансгены *PnANTL1, AtARGOS-LIKE*, *PnARGOS-LIKE, NtEXGT, NtEXPA1, NtEXPA5, PnEXPA1* и *PnEXPA3* также способствуют увеличению размеров органов табака, но за счет стимуляции роста клеток растяжением.

10. Наибольшая степень увеличения длины и площади листьев в среднем на 39 и 60% соответственно, была характерна для трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *AtARGOS-LIKE* под контролем промотора вируса мозаики георгина. Растения рапса, трансформированные данной генно-инженерной конструкцией, характеризовались увеличением длины листьев и веса семян в среднем на 58 и 29% соответственно.

11. Показано, что для увеличения длины стебля табака наиболее эффективной является генно-инженерная конструкция *35S::NtEXPA5*, причем при ее использовании, длина стебля у одной из линий увеличивалась в среднем на 46%. Сверхэкспрессия всех использованных в работе трансгенов в меньшей степени влияла на размеры цветков, и максимальная степень увеличения длины данного органа, составившая в среднем 16%, была выявлена у одной из линий трансгенных растений табака сверхэкспрессирующих ген *AtARGOS* под контролем промотора вируса мозаики георгина.

12. Наибольшая степень уменьшения размеров органов была характерна для трансгенных растений табака с пониженной экспрессией гена *NtANTL*, причем для одной из линий было показано уменьшение длины листьев, высоты стебля и длины цветков в среднем на 83, 38 и 13% соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюм, Я.Б. Влияние фитогормонов на цитоскелет растительной клетки / Я.Б. Блюм, Ю.А. Красиленко, А.И. Емец // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – №4. – С. 557-573.

2. Богунов, Ю.В. Идентификация вируса мозаики георгины молекулярно-биологическими методами / Ю.В. Богунов // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – № 1. – С. 184-185.

3. Веселов, Д.С. Изменения экспрессии гена экспансина, содержания ИУК и скорости растяжения клеток листа растений кукурузы при засолении / Д.С. Веселов, И.Б. Сабиржанова, Б.Е. Сабиржанов, А.В. Чемерис // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – №1. – С. 108-113.

4. Гао, К. Специфическая роль ATEXP1 при росте и адаптации растений Arabidopsis к стрессу / К. Гао, К. Лю, И.Т. Лю // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – № 2. – С. 245-253.

5. Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка, как динамичная система / Т.А. Горшкова – М.: Наука. – 2007. – 429с.

6. Горшкова, Т.А. Формирование надмолекулярной структуры растительной клеточной стенки / Т.А. Горшкова, П.В. Микшина, О.П. Гурьянов, С.Б. Чемикосова // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – С. 196-213.

7. Гущина, В.А. Изменение урожайности и качества маслосемян ярового рапса в зависимости от приемов возделывания и погодных условий / В.А. Гущина, А.С. Лыкова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 80. – №. 6. – С. 9-12.

8. Дейнеко, Е.В. Генетическая инженерия растений / Е.В. Дейнеко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – №1. – С. 125-137.

9. Додуева, И.Е. CLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем / И.Е. Додуева, Е.В. Юрлова, М.А. Осипова, Л.А. Лутова // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – № 1. – С. 17-31.

10. Зверева, С.Д. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования / С.Д. Зверева, Г.А. Романов // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – №3. – С. 479-488.

11. Князев, А.В. Генетическая трансформация рапса (Brassica napus l.) сорта Hanna с помощью *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 / А.В. Князев, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – №. 5. – С. 49-54.

12. Козлова, Л.В. Распределение и структура глюкана со смешанным типом связей на разных стадиях растяжения клеток корня кукурузы / Л.В. Козлова, А.В. Снегирева, Т.А. Горшкова // Физиология растений. – Т. 59. – № 3. – 2012. – С.376-385.

13. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е.И. Кошкин – Москва: Дрофа. – 2010. – 638с.

14. Красиленко, Ю.А. Функциональная роль оксида азота у растений / Ю.А. Красиленко, И.А. Емец, Я.Б. Блюм // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – № 4. – С. 483-494.

15. Кулаева, О.Н. Новый тип рецепторов, вызывающий включение гормон-зависимой генетической программы через разрушение ее рецепторов / О.Н. Кулаева, А.В. Демиденко // Сборник «Клеточная сигнализация». Казань: Изд-во «Фэн» Академии наук РТ. – 2010. – С. 46-55.

16. Ломин, С.Н. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов / С.Н. Ломин, Д.М. Кривошеев, М.Ю. Стеклов, Д.И. Осолодкин, Г.А. Романов // Acta Naturae. – 2012. – Т. 4. – № 3. – С. 34–48.

17. Лутова, Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Н.А. Проворов, О.Н. Тиходеев – СПб.: Наука. – 2000.

18. Лутова, Л.А. Морфогенез растений и экспрессия основных регуляторных генов на примере развития цветка / Л.А. Лутова // Экологическая генетика. – 2005. – Т. 3. – С. 26-37.

19. Малецкий, С.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в популяциях замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / С.И.

Малецкий, С.С. Юданов, Е.И. Малецкая // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – №1. – С. 72-79.

20. Медведев, С.С. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов / С.С. Медведев, Е.И. Шарова // Журнал Сибирского федерального университета. – 2010. – Т. 3. – №2. – С. 109-129.

21. Монахос, С.Г. Связь плоидности с числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфиплоидных видов *Brassica* / С.Г. Монахос, М.Л. Нгуен, А.В. Безбожная, Г.Ф. Монахос // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – №5. – С. 44-54.

22. Новикова, Г.В. Пролиферация клеток растений и ее регуляторы / Г.В. Новикова, А.В. Носов, Н.С. Степанченко, А.А. Фоменков, А.С. Мамаева, И.Е. Мошков // Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – №4. – С. 529-536.

23. Обручева, Н.В. Поступление воды как фактор растяжения клеток / Н.В. Обручева // Украинский Ботанический журнал – 2008а. – Т. 65. – №4. – С. 596-603.

24. Обручева, Н.В. Растяжение клеток как неотъемлемая составляющая роста наземных растений / Н.В. Обручева // Онтогенез. – 2008б. – Т. 39. – №1. – С. 15-27.

25. Осипова, М.А. Роль транскрипционных факторов WOX и KNOX в развитии и опухолеобразовании у растений / М.А. Осипова, Е.А. Долгих, Л.А. Лутова // Экологическая генетика. – 2006. – Т. 4. – С. 3-9.

26. Платонова, Т.А. Действие жасмоновой кислоты на растяжение клеток апикальных меристем клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) / Т.А. Платонова, А.С. Евсюнина, Н.П. Кораблева // Агрохимия. – 2009. – №7. – С. 44-47.

27. Романов, Г.А. Как цитокинины действуют на клетку / Г.А. Романов // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – №2. – С. 295-319.

28. Роньжина, Е.С. Регуляция цитокининами деления и растяжения клеток мезофилла в онтогенезе *Cucurbita pepo* / Е.С. Роньжина // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – № 5. – С. 722-732.

29. Рукавцова, Е.Б. Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений / Е.Б. Рукавцова, В.В. Алексеева, Я.И. Бурьянов // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36. – №2. – С. 159-169.

30. Рэфф, Р. Эмбрионы, гены и эволюция: Пер. с англ. / Р. Рэфф, Т. Кофмен – М.: Мир, 1986. – 404 с., ил.

31. Серегин, И.В. Распределение цинка по тканям корня проростков кукурузы и его действие на рост / И.В. Серегин, А.Д. Кожевникова, В.В. Грачев, Е.И. Быстрова, В.Б. Иванов // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – С. 85-94.

32. Тарчевский, И.А. Метаболизм растений при стрессе (избранные труды) / И.А. Тарчевский – Казань: Фэн. – 2001. – 448с.

33. Цыганкова, В.А. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены биосинтеза ауксинов и ауксин-регулируемые гены, контролирующие деление и растяжение клеток растений / В.А. Цыганкова, Л.А. Галкина, Л.И. Мусатенко, К.М. Сытник // Биополимеры и клетка. – 2005. – Т. 21. – №2. – С. 107-133.

34. Черкасский, Е.С. Адаптация вируса мозаики георгин к циннии и получение антисывороток для серологической диагностики / Е.С. Черкасский // Доклады Академии наук СССР. – 1965. – Т. 165. – № 3. – С. 696-698.

35. Чуб, В.В. Рост и развитие растений / В.В. Чуб // Физиология растений – М.: Издательский центр «Академия». – 2005. – С. 416-508.

36. Шакина, Л.А. Генетические, молекулярные и гуморальные механизмы, регулирующие эндоцикл / Л.А. Шакина, В.Ю. Страшнюк // Генетика. – 2011. – Т. 47. – № 10. – С. 13-22.

37. Шакирова, Ф.М. Сигналинг фитогормонов / Ф.М. Шакирова // Сборник «Клеточная сигнализация» – Казань: Изд-во «Фэн» Академии наук РТ. – 2010. – С. 56–67.

38. Шапигузов, А.Ю. Аквапорины: строение, систематика и особенности регуляции / А.Ю. Шапигузов // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – № 1. – С. 1-11.

39. Шарова, Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений / Е.И. Шарова // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – № 6. – С. 805-819.

40. Шпаков, А.О. Хемосигнальные системы растений / А.О. Шпаков // Цитология. – 2009. – Т. 51. – № 9. – С. 721-734.

41. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие. — 2-е изд., испр. и доп. / С.Н. Щелкунов – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. – 2004. – 496с.

42. Яковлева, В.Г. Взаимоотношения между салицилатным и жасмонатным сигнальными путями у растений / В.Г. Яковлева, А.М. Егорова // Сборник «Клеточная сигнализация». – Казань: Изд-во «Фэн» Академии наук РТ. – 2010. – С. 68-80.

43. Achard, P. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis / P. Achard, A. Gusti, S. Cheminant, M. Alioua, S. Dhondt, F. Coppens, G.T. Beemster, P. Genschik // Curr Biol. – 2009. – V. 19 – P. 1188-1193.

44. Aida, M. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche / Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.-S., Amasino R., Scheres B. // Cell. – 2004. – V. 119. – P. 109-120.

45. Aldington, S. Structure-activity relationships of biologically active oligosaccharides / S. Aldington, G.J. McDougall, S.C. Fry // Plant, Cell and Environment. – 2006. – V. 14. – P. 625-636.

46. Aljanabi, S.M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / S.M. Aljanabi, I. Martinez // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 4692-4693.

47. Amano, Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis / Y. Amano, H. Tsubouchi, H. Shinohara, M. Ogawa, Y. Matsubayashi // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – V. 104. – P. 18333-18338

48. Anastasiou, E. Control of plant organ size / E. Anastasiou, M. Lenhard // Plant Cell Monogr. – 2008. – V.10. – L. Bogre and G. Beemster: Plant Growth Signaling. – P. 25-45.

49. Araya, T. CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner / T. Araya, M. Miyamoto, J. Wibowo, A. Suzuki, S. Kojima, Y.N. Tsuchiya, S. Sawa, H. Fukuda, N. von Wiren, H. Takahashi // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – V. 111. – P. 2029-2034.

50. Aronen, T. Seasonal changes in the transient expression of a 35S CaMV-GUS gene construct introduced into Scots pine buds / T. Aronen, A. Hontola, H. Laukkanen, H. Haggman // Tree Physiology. – 1995. – V. 15. – P. 65-70.

51. Arru, L. Effect of sugars on auxin-mediated *LeEXPA2* gene expression / L. Arru, S. Rognoni, A. Poggi, E. Loreti // Plant Growth Regul. – 2008. – V. 55. – P. 11-20.

52. Aslam, U. Identification and characterization of plasma membrane aquaporins isolated from fiber cells of *Calotropis procera* / U. Aslam, A. Khatoon, H.M. Cheema, A. Bashir // J Zhejiang Univ Sci B. – 2013. – V. 14. – P. 586-595.

53. Aoyama, T. A Glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants / T. Aoyama, N.H. Chua // Plant J. – 1997. – V. 11. – P. 605-612.

54. Aoyama, T. AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens* / T. Aoyama, Y. Hiwatashi, M. Shigyo, R. Kofuji, M. Kubo, M. Ito, M. Hasebe // Development. – 2012– V. 139 – P. 3120-3129.

55. Ariel, F.D. The true story of the HD-Zip family / F.D. Ariel, P.A. Manavella, A. Carlos, C.A. Dezar, R.L. Chan // Trends Plant Sci. – 2007. – V.12. – P. 419-426.

56. Azeez, A. The gladiolus *GgEXPA1* is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence / A. Azeez, A.P. Sane, S.K. Tripathi // Postharvest Biology and Technology. – 2010. – V. 58. – P. 48-56.

57. Bai, M.-Y. A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling

pathways in *Arabidopsis* / M.-Y. Bai, M. Fan, E. Oh, Z.Y. Wang // Plant Cell. – 2012. – V. 24. – P. 4917-4929.

58. Baumann, M.J. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism / M.J. Baumann, J.M. Eklof, G. Michel, A.M. Kallas, T.T. Teeri, M. Czjzek, H. Brumer // Plant Cell. – 2007 – V. 19 – P. 1947-1963.

59. Barrero, R.A. Over-expression of *Arabidopsis CAP* causes decreased cell expansion leading to organ size reduction in transgenic tobacco plant / R.A. Barrero, M. Umeda, S. Yamamura, H. Uchimiya // Annals of Botany. – 2003. – V. 91. – P. 599-603.

60. Barrero, J.M. A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development / J.M. Barrero, P. Piqueras, M. Gonzalez-Guzman, R. Serrano, P.L. Rodriguez, M.R. Ponce, J.L. Micol // J Exp Bot. – 2005 – V. 56 – P. 2071-2083.

61. Beard, R.A. Heat reduces nitric oxide production required for auxin-mediated gene expression and fate determination in tree tobacco guard cell protoplasts / R.A. Beard, D.J. Anderson, J.L. Bufford, G. Tallman // Plant Physiol. – 2012. – V. 159. – P. 1608-1623.

62. Behringer, C. B-GATA transcription factors - insights into their structure, regulation, and role in plant development / C. Behringer, C. Schwechheimer // Front Plant Sci. – 2015 – V. 23. – P. 90.

63. Benfey, P.N. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains / P.N. Benfey, L. Ren, N.H. Chua // EMBO. – 1990. – V. 9. – P. 1685-1696.

64. Bhargava, A. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-seq in Arabidopsis / A. Bhargava, I. Clabaugh, J.P. To, B.B. Maxwell, Y.H. Chiang, G.E. Schaller, A. Loraine, J.J. Kieber // Plant Physiol. – 2013. – V. 162. – P. 272-294.

65. Bhattacharyya, S. Analysis of cis-sequence of subgenomic transcript promoter from the Figwort mosaic virus and comparison of promoter activity with the cauliflower

mosaic virus promoters in monocot and dicot cells / S. Bhattacharyya, N. Dey, I.B. Maiti // Virus Research. – 2002. – V. 90. – P. 47-62.

66. Bhullar, S. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping / S. Bhullar, S. Chakravarthy, S. Advani, S. Datta, D. Pental, P.K. Burma // Plant Physiol. – 2003. – V. 132. – P. 988-998.

67. Binzel, M.L. Adaptation of tobacco cells to NaCl / M.L. Binzel, P.M. Hasegawa, A.K. Handa, A. Ray, R.A. Bressan // Plant Physiol. – 1985. – V. 79. – P. 118-125.

68. Blackman, L.M. Electric fields affect the orientation of cortical microtubules and cell expansion in pea callus / L.M. Blackman, R.L. Overall // Protoplasma. – 1995. – V. 189. – P. 256-266.

69. Blasco, M.A. Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage phi 29 DNA polymerase / M.A. Blasco, A. Bernad, L. Blanco, M. Salas // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266. – P. 7904-7909.

70. Boucheron, E. Ectopic expression of Arabidopsis *CYCD2* and *CYCD3* in tobacco has distinct effects on the structural organization of the shoot apical meristem / E. Boucheron, J.H.S. Healy, C. Bajon // J. Exp. Bot. – 2005. – V. 56. – P. 123-134.

71. Bourquin, V. Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues / V. Bourquin, N. Nishikubo, H. Abe, H. Brumer, S. Denman, M. Eklund, M. Christiernin, T.T. Teeri, B. Sundberg, E.J. Mellerowicz // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 3073-3088.

72. Boutilier, K. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth / K. Boutilier, R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C.-M. Liu, A.A.M. van Lammeren, B.L.A. Miki, J.B.D. Custers, M.M. Lookeren Campagne // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 1737-1749.

73. Bradford, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.

74. Brand, U. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by *CLV3* activity / U. Brand, J.C. Fletcher, M. Hobe, E.M. Meyerowitz, R. Simon // Science. – 2000. – V. 289. – P. 617-619.

75. Buchanan, M. Endo-(1,4)-β-glucanase gene families in the grasses: temporal and spatial co-transcription of orthologous genes / M. Buchanan, R.A. Burton, K.S. Dhugga, A.J. Rafalski, S.V. Tingey, N.J. Shirley, G.B. Fincher // BMC Plant biol. – 2012. – V. 12. – P. 1471-2229.

76. Burk, D.H. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation / D.H. Burk, B. Liu, R. Zhong, W.H. Morrison, Z.H. Ye // Plant Cell. – 2001. – V. 13. – P. 807-827.

77. Burssens, S. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana* / S. Burssens, K. Himanen, B. van de Cotte, T. Beeckman, M. Van Montagu, D. Inze, N. Verbruggen // Planta. – 2000. – V. 211. – P. 632-640.

78. Busov, V.B. Genes for control of plant stature and form / V.B. Busov, A.M. Brunner, S.H. Strauss // New phytologist. – 2008. – V. 177. – P. 589-607.

79. Cantarel, B.L. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics / B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – P. 233–238.

80. Cardoza, V. Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants / V. Cardoza, C.N. Stewart Jr // Plant cell reports. – 2003. – V. 21. – P. 599-604.

81. Cardoza, V. Canola (*Brassica napus* L.) / V. Cardoza, C.N. Stewart Jr // Agrobacterium protocols, Humana Press. – 2006. – P. 257-266.

82. Carpita, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses / N.C. Carpita // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 47. – P. 445-476.

83. Catala, C. Auxin-regulation and spatial localization of an endo-1,4-b-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls / C. Catala, J.K.C. Rose, A.B. Bennett // Plant J. – 1997. – V. 12. P. 417-426.

84. Catala, C. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth / C. Catala, J.K.C. Rose, A.B. Bennett // Plant Physiol.– 2000. – V. 122. – P. 527-534.

85. Cebolla, A. The mititic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargment in plants / A. Cebolla, J.M. Vinardell, E. Kiss, B. Olah, F. Roudier, A. Kondorosi, E. Kondorosi // EMBO. – 1999. – V. 18. – P. 4476-4484.

86. Chan, R.L. Homeoboxes in plant development / R.L. Chan, G.M. Gago, C.M. Palena, D.H. Gonzalez // Biochim Biophys Acta. – 1998. – V. 1442. – P. 1-19.

87. Chan, J. Identification of a MAP65 isoform involved in directional expansion of plant cells / J. Chan, G. Mao, A. Smertenko, P.J. Hussey, M. Naldrett, A. Bottrill, C.W. Lloyd // FEBS letters. – 2003. – V. 534. – P. 161-163.

88. Chaumont, F. Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation / F. Chaumont, F. Barrieu, E.M. Herman, M.J. Chrispeels // Plant Physiol. – 1998. – V. 117. – P. 1143-1152.

89. Chen, F. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination / F. Chen, H. Nonogaki, K.J. Bradford // J. Exp Bot. – 2002. – V. 53. – P. 215-223.

90. Chen, X. A MicroRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development / X. Chen // Science. – 2004. – V. 26. – P. 2022-2025.

91. Chen, B. Cloning and expression level analysis of two *BnaANT* candidate genes in *Brassica napus* / B. Chen, T. Wang, H. Wang, Y. Li, X. Yan, L. Wang, W. Wei // Agricultural Sciences in China. – 2010. – V. 9. – P. 488-496.

92. Chen, W. Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1 / W. Chen, X. Yin, L. Wang, J. Tian, R. Yang, D. Liu, Z. Yu, N. Ma, J. Gao // Plant Mol Biol. – 2013. – V. 83. – P. 219-233.

93. Cheniclet, C. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth / C. Cheniclet, W.Y. Rong, M. Causse, N. Frangne, L. Bolling, J.P. Carde, J.P. Renaudin // Plant Physiol. – 2005. – V. 139. – P. 1984-1994.

94. Chilley, P.M. The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling / P.M. Chilley, S.A. Casson, P. Tarkowski, N. Hawkins, K.L. Wang, P.J. Hussey, M. Beale, J.R. Ecker, G.K. Sandberg, K. Lindsey // Plant Cell. – 2006. – V. 18. – P. 3058-3072.

95. Cho, H.T. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* / H.T. Cho, D.J. Cosgrove // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. – V. 97. – P. 9783-9788.

96. Choat, B. Vascular function in grape berries across development and its relevance to apparent hydraulic isolation / B. Choat, G.A. Gambetta, K.A. Shackel, M.A. Matthews // Plant Physiol. – 2009. – V. 151. – P. 1677-1687.

97. Choi, D. Whole genome analysis of the *OsGRF* gene family encoding plant-specific putative transcription activators in rice (*Oryza sativa*) / D. Choi, J.H. Kim, H. Kende // Plant Cell Physiol. – 2004. – V. 45. – P. 897-904.

98. Choi, J.Y. Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang) / J.Y. Choi, Y.S. Seo, S.J. Kim, W.T. Kim, J.S. Shin // Plant Cell Rep. – 2011. V. 30. P. 867-877.

99. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal Biochem. – 1987. – V. 162. – P. 156-159.

100. Clark S.E. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis / S.E. Clark, R.W. Williams, E.M. Meyerowitz // Cell. – 1997. – V. 89. – P. 575-585.

101. Clewell, D.B. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form / D.B. Clewell, D.R. Helinski // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – V. 62. P. 1159-1166.

102. Clough, S.J. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Clough, A.F. Bent //The plant Journal – 1998. – V. 16. – P. 735-743.

103. Coen, E.S. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development / E.S. Coen, E.M. Meyerowitz // Nature. – 1991. – V. 353. – P. 31-37.

104. Cohen, S. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria – genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA / S. Cohen, A. Chang, L. Hsu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972. – V. 69. – P. 2110-2114.

105. Colmer, T.D. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O2 deficiency in *Rumex palustris* / T.D. Colmer, A.J. Peeters, C.A. Wagemaker, W.H. Vriezen, A. Ammerlaan, L.A. Voesenek // Plant Mol Biol. – 2004. – V. 56. – P. 423-437.

106. Comai, L. Novel and useful properties of chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements / L. Comai, P. Moran, D. Maslyar // Plant Mol Biol. – 1990. – V. 15. – P. 373-381.

107. Cosgrove, D.J. Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents / D.J. Cosgrove, P.A. Bedinger, D.M. Durachko // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – P. 6559-6564.

108. Cosgrove, D.J. Cell wall loosening by expansins / D.J. Cosgrove // Plant Physiol. – 1998. – V. 118. – P. 333-339.

109. Cosgrove, D.J. Expansive growth of plant cell walls / D.J. Cosgrove // Plant Physiol Biochem. – 2000. – V. 38. – P. 109-124.

110. Cosgrove, D.J. Plant cell walls: Wall-associated kinases and cell expansion / D.J. Cosgrove // Curr Biol. – 2001. – V. 11. – P. R558-R559.

111. Cserzo, M. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method / M. Cserzo, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, A. Elofsson // Prot. Eng. – 1997. – V. 10. – 673-676.

112. D'Agostino, I.B. Molecular mechanisms of cytokinin action / I.B. D'Agostino, J.J. Kieber // Curr Opin Plant Biol. – 1999. – V. 2 – P. 359-364.

113. Da Silva, E.A. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* «Rubi») seed germination / E.A. Da Silva, P.E. Toorop, H.W. Hilhorst // Ann Bot. – 2008. – V. 102. – P. 425-433.

114. Dahl, M. The D-Type alfalfa cyclin gene cycMs4 complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle / M. Dahl, I. Meskiene, L. Bogre, D.T.C. Ha, I. Swoboda, R. Hubmann, H. Hirt, E. Heberle-Bors // The Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1847-1857.

115. Dal Santo, S. *PhEXPA1*, a *Petunia hybrida* expansin, is involved in cell wall metabolism and in plant architecture specification / S. Dal Santo, M. Fasoli, E. Cavallini, G.B. M. Tornielli, Pezzotti, S. Zenoni // Plant Signal Behav. – 2011. – V. 6. – P. 2031-2034.

116. Danielson, J.A. Unexpected complexity of the aquaporins gene family in moss *Physcomitrella patens* / J.A. Danielson, U. Johanson // BMC Plant Biol. – 2008. – V. 8. – P. 1-16.

117. Darley, C.P. The molecular basis of plant cell wall extension / C.P. Darley, A.M. Forrester, S.J. McQueen-Mason // Plant Mol Biol. – 2001. – V. 47. – P. 179-195.

118. Dash, M. The *AINTEGUMENTA* genes, *MdANT1* and *MdANT2*, are associated with the regulation of cell production during fruit growth in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) / M. Dash, A. Malladi // BMC Plant Biol. – 2012. – V. 12. – P. 98.

119. De Bodt, S. And then there were many: MADS goes genomic / S. De Bodt, J. Raes, Y. Van de Peer, G. Theissen // Trends Plant Sci. – 2003. – V. 8. – P. 475-483.

120. De Folter, S. Trans meets cis in MADS science / S. De Folter, G.C. Angenent // Trends Plant Sci. – 2006. – V. 11. – P. 224-231.

121. De Jager, S.M. Retinoblastoma proteins in plants / S.M. De Jager, J.A. Murray // Plant Mol Biol. – 1999. – V. 41. – P. 295-299.

122. De Mesa, M.C. The CaMV 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants / M.C. De Mesa, N. Santiago-Domenech, F. Pliego-Alfago, M.A. Quesada, J.A. Mercado // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 23. – P. 32.

123. De Kochko, A. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses / A. De Kochko, B. Verdaguer, N. Taylor, R. Carcamo, R.N. Beachy, C. Fauquet // Arch. Virol. – 1998. – V. 143. – P. 945-962.

124. De Veylder, L. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis / L. De Veylder, T. Beeckman, G.T.S. Beemster, L. Krols, F. Terras, I.

Landrieu, E. Van Der Schueren, S. Maes, M. Naudts, D. Inze // The Plant Cell. – 2001. – V. 13. – P. 1653-1668.

125. Delgado-Benarroch, L. FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus* / L. Delgado-Benarroch, B. Causier, J. Weiss, M. Egea-Cortines // Planta. – 2009. – V. 229. – P. 1219-1229.

126. Delmas, F. The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner / F. Delmas, J. Petit, J. Joubes, M. Seveno, T. Paccalet, M. Hernould, P. Lerouge, A. Mouras, C. Chevalier // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 348-360.

127. Den Boer, B.G.W. Triggering the cell cycle in plants / B.G.W. Den Boer, J.A.H. Murray // Trends Cell Biol. – 2000. – V. 10. – 245-250.

128. Dewitte, W. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-Type cyclin CYCD3 / W. Dewitte, C. Riou-Khamlichi, S. Scofield, J.M. Healy, A. Jacqmard, N.J. Kilby, J.A.H. Murray // Plant Cell. – 2003. – V. 15. – P. 79-92.

129. Dey, N. Structure Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants / N. Dey, I.B. Maiti // Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 40. – P. 771-782.

130. Dinneny, J.R. A genetic framework for fruit patterning in Arabidopsis thaliana / J.R. Dinneny, D. Weigel, M.F. Yanofsky // Development. – 2005. – V. 132. – P. 4687-4696.

131. Dodsworth, S. A Diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem / S. Dodsworth // Developmental Biology. – 2009. – V. 336. – P. 1-9.

132. Doerner, P. Control of root growth and development by cyclin expression / P. Doerner, J.E. Jorgensen, R. You, J. Steppuhn, C. Lamb // Nature. – 1996. – V. 380. – V. 520-523.

133. Donelly, E.T. The effect of ascorbate and alphatocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human

spermatozoa / E.T. Donelly, N. McClure, S.E. Lewis // Mutagenesis. – 1999. – V. 14. – P. 505-512.

134. Dong, J. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses / J. Dong, Y. Jiang, R. Chen, Z. Xu, X. Gao // Afr J Biotechnol. – 2011. – V. 10 P. 17424-17434.

135. Doonan, J.H. Functional evolution of cyclin-dependent kinases / J.H. Doonan, G. Kitsios // Mol. Biotechnol. – 2009. – V. 42. – P. 14-29.

136. Downes, B.P. Cytokinin regulates the expression of a soybean beta-expansin gene by a post-transcriptional mechanism / B.P. Downes, D.N. Crowell // Mol Biol. – 1998. – V. 37. – P. 437-444.

137. Drews, G.N. Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product / G.N. Drews, J.L. Bowman, E.M. Meyerowitz // Cell. – 1991. – V. 65. – P. 991-1002.

138. Dubois, F. The Petunia *tra1* gene controls cell elongation and plant development, and mediates responses to cytokinins / F. Dubois, D. Bui Dang Ha, R.S. Sangwan, J. Durand // Plant J. – 1996. – V. 10. – P. 47-59.

139. Dunlap, J.R. NaCI reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid / J.R. Dunlap, M.L. Binzel // Plant Physiol. – 1996. – V. 112. – P. 379-384.

140. Elliott, R.C. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth / R.C. Elliott, A.S. Betzner, E. Huttner, M.P. Oakes, W.Q. Tucker, D. Gerentes, P. Perez, D.R. Smyth // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 155-168.

141. Elumalai, R.P. A mutation in the Arabidopsis *KT2/KUP2* potassium transporter gene affects shoot cell expansion / R.P. Elumalai, P. Nagpal, J.W. Reed // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 119-131.

142. Eshed, Y. Establishment of polarity in lateral organs of plants / Y. Eshed, S.F. Baum, L.V. Perea, J.L. Bowman // Curr. Biol. – 2001. – V. 11. – P. 1251-1260.

143. Eshed, Y. Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by *KANADY* and *YABBY* activities / Y. Eshed, A. Izhaki, S.F. Baum, S.K. Floyd, J.L. Bowman // Development. – 2004. – V. 131. – P. 2997-3006.

144. Esteban, J.A. Fidelity of phi 29 polymerase / J.A. Esteban, M. Salas, L. Blanco // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 2719-2726.

145. Fang, R.X. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the CaMV 35S promoter in transgenic plants / R.X. Fang, F. Nagy, S. Sivasubramaniam, N.H. Chua // Plant Cell. – 1989. – V. 1. – P. 141-150.

146. Feng, J.X. An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP transcription factor gene family / J.X. Feng, D. Liu, Y. Pan, W. Gong, L.G. Ma, J.C. Luo, X.W. Deng, Y.X. Zhu // Plant Mol Biol. – 2005. – V. 59. – P. 853-868.

147. Feng, G. Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL / G. Feng, Z. Qin, J. Yan, X. Zhang, Y. Hu // New Phytologist. – 2011. – V. 191. – P. 635-646.

148. Feng, Z. LBD29 regulates the cell cycle progression in response to auxin during lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* / Z. Feng, X. Sun, G. Wang, H. Liu, J. Zhu // Ann Bot. – 2012. – V. 110. – P. 1-10.

149. Figueroa, P. The Arabidopsis JAZ2 promoter contains a G-Box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins / P. Figueroa, J. Browse // Plant Cell Physiol. – 2012. – V. 53. – P. 330-343.

150. Fleming, A.J. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin / A.J. Fleming, S. McQueen-Mason, T. Mandel, C. Kuhlemeier // Science. – 1997. – V. 276. – P. 1415-1418.

151. Frankova, L. Trans-α-xylosidase, a widespread enzyme activity in plants, introduces (1→4)-α-D-xylobiose side-chains into xyloglucan structures / L. Frankova, S.C. Fry // Phytochemistry. – 2012. – V. 78. – P. 29-43.

152. Fritze, K. Developmental and UV light regulation of the snapdragon chalcone synthase promoter / K. Fritze, D. Staiger, I. Czaja, R. Walden, J. Schell, D. Wing // Plant Cell. – 1991. – V. 3. – P. 893-905.

153. Frizzi, A. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology / A. Frizzi, S. Huang // Plant Biotechnol J. – 2010. – V. 8. – P. 655-677.

154. Fry, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells / S.C. Fry // New Phytologist. – 2004. – V. 161. – P. 641-675.

155. Fu, Z.Q. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants / Z.Q. Fu, S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S.H. Spoel, Y. Tada, N. Zheng, X. Dong // Nature. – 2012. – V. 16. – P. 228-232.

156. Futterer, J. Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA / J. Futterer, K. Gordon, H. Sanfacon, J.-M. Bonneville, T. Hohn // EMBO. – 1990. – V. 9. – P. 1697-1707.

157. Gao, L. Isolation of a fruit ripening-related tonoplast aquaporin (*GjTIP*) gene from *Gardenia jasminoides* / L. Gao, Y. Guo // Physiol Mol Biol Plants. – 2013. – V. 19. – P. 555-561.

158. Gao, X. Specific roles of *AtEXPA1* in plant growth and stress adaptation / X. Gao, K. Liu, Y.T. Lu // Rus J Plant Phys. – 2010. – V. 57. – P. 241-246.

159. Garmendia, C. The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme / C. Garmendia, A. Bernad, J. Esteban, L. Blanco, M. Salas // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267. – P. 2594-2599.

160. Geilfus, C.M. β-expansins are divergently abundant in maize cultivars that contrast in their degree of salt resistance / C.M. Geilfus, C. Neuhaus, K.H. Muhling, C. Zorb // Plant Signal Behav. – 2011. – V. 6. – P. 1279-1281.

161. Geisler-Lee, J. Poplar carbohydrateactive enzymes. Gene identification and expression analyses / J. Geisler-Lee, M. Geisler, P.M. Coutinho, B. Segerman, N. Nishikubo // Plant Physiol. – 2006. – 140. – P. 946-962.

162. Geitmann, A. The rheological properties of the pollen tube cell wall // Sexual plant reproduction and biotechnological applications / A. Geitmann // Ed. M. Cresti. – Springer. – 1999. – P. 283-302.

163. Gibeaut D.M. Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles / D.M. Gibeaut, M. Pauly, A. Bacic, G.B. Fincher // Planta. – 2005. – V. 221. – P. 729-738.

164. Giuliano, G. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene / G. Giuliano, E. Pichersky, V.S. Malik, M.P. Timko, P.A. Scolnik, A.R. Cashmore // Proc Natl Acad Sci USA. – 1988. – V. 85. P. 7089-7093.

165. Goncalves, S. Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis / S. Goncalves, J. Cairney, J. Maroco, M.M. Oliveira, C. Miguel // Planta. – 2005. – V. 222. – P. 556-563.

166. Gonzalez, N. David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops? / N. Gonzalez, G.T. Beemster, D. Inze // Curr Opin Plant Biol. – 2009. – V. 12. – P. 157-164.

167. Gonzalez, N. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion / N. Gonzalez, H. Vanhaeren, D. Inze // Trends Plants Sci. – 2012. – V. 17. – P. 332-340.

168. Graham, D.E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses / D.E. Graham // Anal. Biochem. – 1978. – V. 78. – P. 673-678.

169. Gray-Mitsumune, M. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the alpha-expansin gene family / M. Gray-Mitsumune, E.J. Mellerowicz, H. Abe, J. Schrader, A. Winzell, F. Sterky, K. Blomqvist, S. McQueen-Mason, T.T. Teeri, B. Sundberg // Plant Physiol. – 2004. – V. 135. – P. 1552-1564.

170. Gray-Mitsumune, M. Ectopic expression of a wood-abundant expansin PttEXPA1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen / M. Gray-Mitsumune, K. Blomquist, S. McQueen-Mason, T.T. Teeri, B. Sundberg, E.J. Mellerowicz // Plant Biotechnol J. – 2008. – V. 6. – P. 62-72.

171. Grzyb, J. Cadmium inhibitory action leads to changes in structure of ferredoxin: NADP(+) oxidoreductase / J. Grzyb, M. Gagos, B. Mysliwa-Kurdziel, M. Bojko, W.I. Gruszecki, A. Waloszek, K. Strzałka // J Biol Phys. – 2012. – V. 38. – P. 415-428.

172. Guo, A.Y. Plant TFDB: a comprehensive plant transcription factor database / A.Y. Guo, X. Chen, G. Gao, H. Zhang, Q.H. Zhu, X.C. Liu, Y.F. Zhong, X. Gu, K. He, J. Luo // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36. – P. 966-969.

173. Guo, M. Maize *ARGOS1* (*ZAR1*) transgenic alleles increase hybrid maize yield / M. Guo, M.A. Rupe, J. Wei, C. Winkler, M. Goncalves-Butruille, B.P. Weers, S.F. Cerwick, J.A. Dieter, K.E. Duncan, R.J. Howard, Z. Hou, C.M. Loffler, M. Cooper, C.R. Simmons // J Exp Bot. – 2014. – V. 65. – P. 249-260.

174. Haas, M. Cauliflower mosaic virus: still in the news / M. Haas, M. Bureau, A. Geldreich, P. Yot, M. Keller // Molecular Plant Pathology. – 2002. – V. 3. – P. 419-429.

175. Haecker, A. Cell-cell signaling in the shoot meristem / A. Haecker, T. Laux // Plant Biology – 2001. – V. 4. – P. 441-446.

176. Hake, S. Plant morphogenesis and *KNOX* genes / S. Hake, N. Ori // Nat Genet. – 2002. – V. 31. – P. 121-122.

177. Han, Y. A novel chalcone synthase gene from *Phalaenopsis orchid* that alters floral morphology in transgenic tobacco plants / Y. Han, F. Ming, J. Wang, M.M. Ye, D.L. Shen // Plant Mol Biol Rep. – 2005. – V. 23. – P. 193-194.

178. Han, Y. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation / Y. Han, A. Li, F. Li., M. Zhao, W. Wang // Plant Physiol Biochem. – 2012. – V. 54. – P. 49-58.

179. Han, Y. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants / Y. Han, W. Wang, J. Sun, M. Ding, R. Zhao, S. Deng, F. Wang, Y. Hu, Y. Wang, Y. Lu, L. Du, Z. Hu, H. Diekmann, X. Shen, A. Polle, S. Chen // J Exp Bot. – 2013. – V. 64. – P. 4225-4238.

180. Hasegawa, A. The complete sequence of soybean chlorotic mottle virus DNA and the identification of a novel promoter / A. Hasegawa, J. Verver, A. Shimada, M. Saito, R. Goldbach, A. Van Kammen, K. Miki, M. Kameya-Iwaki, T. Hibi // Nucleic Acids Res. – 1989. – V. 17. – P. 9993-10013.

181. Haruta, M. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion / M. Haruta, G. Sabat, K. Stecker, B.B. Minkoff, M.R. Sussman // Science. – 2014. – V. 24. – P. 408-411.

182. Harvengt, P. Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg^{2+}-dependent and Ca^{2+}-regulated kinase / P. Harvengt, A. Vlerick, B. Fuks, R. Wattiez, J.M. Ruysschaert, F. Homble // Biochem. J. – 2000. – V. 352. – P. 183-190.

183. He, J.-X. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses / J.-X. He, Y. Sun, S. Gampala, N. Gendron, C.Q. Sun, Z.Y. Wang // Science. – 2005. – V. 307. – P. 1634-1638.

184. Healy, J.M.S. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact *in vivo* with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled / J.M.S. Healy, M. Menges, J.H. Doonan, J.A.H. Murray // J Biol Chem. – 2001. – P. 276. – 7041-7047.

185. Heredia, A. Composition of plant cell walls / A. Heredia, A. Jimenez, R. Guillen // Z Lebensm Unters Forsch. – 1995.– V. 200. – P. 24-31.

186. Hirano, H.-Y. Isolation of the *DROOPING LEAF* gene that regulates carpel development and midrib formation in rice / H.-Y. Hirano, T. Yamaguchi // Gamma Field Symp. – 1999. – V. 38. – P. 245-252.

187. Hohn, T. Reverse transcription in CaMV / T. Hohn, B. Hohn, P. Pfeiffer // Trends Biol. Sci. – 1985. – V. 8. – P. 205-209.

188. Holmberg, N. Sterol C-24 Methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed / N. Holmberg, M. Harker, C.L. Gibbard, A.D. Wallace, J.C. Clayton, S. Rawlins, A. Hellyer, R. Safford // Plant Physiol. – 2002. – V. 130. – P. 303-311.

189. Holmberg, N. Co-expression of N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and C24-sterol methyltransferase type 1 in transgenic tobacco enhances carbon flux towards end-product sterols / N. Holmberg, M. Harker, A.D. Wallace, J.C. Clayton, C.L. Gibbard, R. Safford // Plant J. – 2003. – V. 36. – P. 12-20.

190. Holst, K. Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic Arabidopsis plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation / K. Holst, T. Schmulling, T. Werner // Plant Physiol. – 2011. – V. 168. – P. 1328-1334.

191. Holtorf, H. Plant functional genomics / H. Holtorf, M.C. Guitton, R. Reski // Naturwissenschaften. – 2002. – V. 89. – P. 235-249.

192. Honma, T. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs / T. Honma, K. Goto // Nature. – 2001. – V. 409. – P. 525-529.

193. Horiguchi, G. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana / G. Horiguchi, G.T. Kim, H. Tsukaya // Plant J. – 2005. – V. 43. – P. 68-78.

194. Horsch, R.B. A simple and general method for transferring genes into plants / R.B. Horsch, J.E. Fry, N. Hoffmann, D. Eicholz, S.G. Rogers, R.T. Fraley // Science. – 1985. – V. 227. – P. 1229-1231.

195. Horstman, A. AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks / A. Horstman, V. Willemsen, K. Boutilier, R. Heidstra // Trends Plant Sci. – 2014. – V. 19. – P. 146-157.

196. Horvath, B.M. EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants / B.M. Horvath, Z. Magyar, Y. Zhang // EMBO. – 2006. – V. 25. – P. 4909-4920.

197. Howell, S.H. Molecular genetics of plant development / S.H. Howell // Cambridge University Press – Cambridge UK. – 1998 – 365p.

198. Hu, Y. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis / Y. Hu, F. Bao, J. Li // Plant J. – 2000. – V. 24. – P. – 693-701.

199. Hu, Y. The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size / Y. Hu, Q. Xie, N. Chua // Plant Cell. – 2003. – V. 15. – P. 1951-1961.

200. Hu, Y. The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth / Y. Hu, H.M. Poh, N.H. Chua // Plant. – 2006. – V. 47. – P. 1-9.

201. Huang, Y.W. Increased expression of the rice C-type cyclin-dependent protein kinase gene, Orysa;*CDKC;1*, in response to salt stress / Y.W. Huang, W.S. Tsay, C.C. Chen, C.W. Lin, H.J. Huang // Plant Physiol Biochem. – 2008. – V. 46. – P. 71-81.

202. Hull, R. Genome organization of retroviruses and retroelements: evolutionary considerations and implications / R. Hull // Semin Virol. – 1992. – V. 3. – P. 372-382.

203. Huntley, R. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins / R. Huntley, S. Healy, D. Freeman, P. Lavender, S. de Jager, J. Greenwood, J. Makker, E. Walker, M. Jackman, Q. Xie, A.J. Bannister, T. Kouzarides, C. Gutierrez, J.H. Doonan, J.A. Murray // Plant Mol Biol. – 1998. – V. 37. – P. 155-169.

204. Hwang, D. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein mgfp-5 in *Escherichia coli* / D. Hwang, H. Yoo, J. Jun, W. Moon, H. Cha // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 3352-3359.

205. Hyodo, H. Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, *XTH9*, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana* / H. Hyodo, S. Yamakawa, Y. Takeda, M. Tsuduki, A. Yokota, K. Nishitani, T. Kohchi // Plant Mol Biol. – 2003. – V. 54. – P. 473-482.

206. Ikeda, M. Arabidopsis WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning / M. Ikeda, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi // Plant Cell. – 2009. – V. 21. – P. 3493-3505.

207. Ikeda, M. A triantagonistic basic helix-loop-helix system regulates cell elongation in Arabidopsis / M. Ikeda, S. Fujiwara, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi // Plant Cell. – 2012. – V. 24. – P. 4483-4497.

208. Ikeuchi, M. Plant callus: mechanisms of induction and repression / M. Ikeuchi, K. Sugimoto, A. Iwase // Plant Cell. – 2013. – V. 25. – P. 3159-3173.

209. Ingram, G.C. Keeping it together: co-ordinating plant growth / G.C. Ingram, R. Waites // Curr Opin Plant Biol. – 2006. – V.9. – P. 12-20.

210. Inouhe, M. Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases / M. Inouhe, D.J. Nevins // Plant Physiol. 1991. – V. 96. – P. 426-431.

211. Ishige, F. A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants / F. Ishige, M. Takaichi, R. Foster, N.H. Chua, K. Oeda // Plant J. – 1999. – V. 18. – P. 443-448.

212. Ivashuta S. RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development / S. Ivashuta, J. Liu, J. Liu, D.P. Lohar, S. Haridas, B. Bucciarelli, K.A. VandenBosch, C.P. Vance, M.J. Harrison, J.S. Gantt // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – P. 2911-2921.

213. James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013 / C. James // ISAAA Brief. ISAAA: Ithaca, NY. – 2014. – No. 46.

214. Jasinski, S. KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities / S. Jasinski, P. Piazza, J. Craft, A. Hay, L. Woolley, I. Rieu, A. Phillips, P. Hedden, M. Tsiantis // Curr Biol. – 2005. – V. 15. – P. 1560-1565.

215. Jefferson, R. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system / R. Jefferson // Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – V. 5. – P. 387-405.

216. Jobling, S.A. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments / S.A. Jobling, C. Jarman, M.M. Teh, N. Holmberg, C. Blake, M.E. Verhoeyen // Nature Biotech. – 2002. – V. 21. – P. 77-80.

217. Jung J. Expression of multiple expansin genes is associated with cell expansion in potato organs / J. Jung, E.M. O'Donoghue., P.P. Dijkwel // Plant Science. – 2010. – V. 179. – P. 77-85.

218. Kerstetter, R.A. The specification of leaf identity during shoot development / R.A. Kerstetter, R.S. Poethig // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 1998. – V. 14. – P. 373-398.

219. Kerstetter, R.A. *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis* / R.A. Kerstetter, K. Bollman, R.A. Taylor, K. Bomblies, R.S. Poethig // Nature. – 2001. – V. 411. – P. 706-709.

220. Kieber, J.J. Cytokinins / J.J. Kieber, G.E. Schaller // Arabidopsis Book. – 2014. – 12:e0168.

221. Kikuchi, M. An effective shuffling method using single-stranded DNA / M. Kikuchi, K. Ohnini, S. Harayama // Gene. – 2000. – V. 243. – P. 133-137.

222. Kim, S.Y. Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible / S.Y. Kim, G.D. May, W.D. Park // Plant Mol Biol. – 1994. – V. 26. – P. 603-615.

223. Kim, J.H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis / J.H. Kim, D. Choi, H. Kende // Plant J. – 2003. – V. 36. – P. 94-104.

224. Kim, S. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family / S. Kim, P.S. Soltis, K. Wall, D.E. Soltis // Mol. Biol. Evol. – 2006a. – V. 23. – P. 107-120.

225. Kim, S.Y. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling / S.Y. Kim, M. Sivaguru, G. Stacey // Plant Physiol. – 2006b. – V. 142. – P. 984-992.

226. Klucher, K.M. The *AINTEGUMENTA* gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2* / K.M. Klucher, H. Chow, L. Reiser, R.L. Fischer // Plant Cell. – 1996. – V. 8. P. 137-153.

227. Kozera, B. Reference genes in real-time PCR / B. Kozera, M. Rapacz // J Appl Genet. – 2013. – V. 54. – P. 391-406.

228. Krizek, B.A. Ectopic expression of AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs / B.A. Krizek // Dev Genet. – 1999. – V. 25. – P. 224-236.

229. Krizek, B.A. AINTEGUMENTA utilizes a mode of DNA recognition distinct from that used by proteins containing a single AP2 domain / B.A. Krizek // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 1859-1868.

230. Krizek, B.A. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide / B.A. Krizek, J.C. Fletcher // Nature. – 2005. – V. 6. – P. 688-698.

231. Krizek, B.A. *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* act redundantly to regulate Arabidopsis floral growth and patterning / B.A. Krizek // Plant Physiol. – 2009. – V. 150. – P. 1916-1929.

232. Krizek, B.A. *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* regulate auxin-mediated flower development in Arabidopsis / B.A. Krizek // BMC Res Notes. – 2011. – V. 4. – P. 176.

233. Ku, S.J. Overexpression of IAA1 with domain II mutation impairs cell elongation and cell division in inflorescences and leaves of Arabidopsis / S.J. Ku , J.Y. Park, S.B. Ha , J. Kim // Plant Physiol. – 2009. – V. 166. – P. 548-553.

234. Lam, E. Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants / E. Lam, P.N. Benfey, P.M. Gilmartin, R.-X. Fang, N. H. Chua // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86. – P. 7890-7894.

235. Lam, E. Analysis of tissue-specific elements in the CaMV 35S promoter / E. Lam // Results Problems Cell Differentiation. – 1994. – V. 20. – P. 181-196.

236. Latchman, D.S. Transcription factors: an overview / D.S. Latchman // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 1997. – V. 29. – P. 1305-1312.

237. Lee, Y. Expansins: ever-expanding numbers and functions / Y. Lee, D. Cho, H. Kende // Curr Opin Plant Biol. – 2001. – V. 4. – P. 527-532.

238. Lee, Y. Expression of α-expansin and expansin-like genes in deepwater rice / Y. Lee, H. Kende // Plant Physiol. – 2002. – V. 130. – P. 1396-1405.

239. Leibfried, A. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators / A. Leibfried, J.P. To, W. Busch, S. Stehling,

A. Kehle, M. Demar, J.J. Kieber, J.U. Lohmann // Nature. – 2005. – V. 438. – P. 1172-1175.

240. Lenhard, M. The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation / M. Lenhard, G. Jurgens, T. Laux // Development. – 2002. – V. 129. – P. 3195-3206.

241. Leyser, H.M. Arabidopsis auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1 / H.M. Leyser, C.A. Lincoln, C. Timpte, D. Lammer, J. Turner, M. Estelle // Nature. – 1993. – V. 364. – P. 161-164.

242. Li, Y. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin / Y. Li, C.P. Darley // Plant Physiol. – 2002. – V. 128. – P. 3854-3864.

243. Li, J. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets / J. Li, X. Tan, F. Zhu, J. Guo // International Journal of Biology. – 2010. – V. 2. – P. 127.

244. Li, F. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco / F. Li, S. Xing, Q. Guo, M. Zhao, J. Zhang, Q. Gao, G. Wang, W. Wang // J Plant Physiol. – 2011. – V. 168. – P. 960-966.

245. Lin, J.-J. Electrotransformation of Agrobacterium, in methods in molecular biology. 47. Nickoloff J.A., ed. / J.-J. Lin // Humana Press. – 1995. – Totowa, NJ. – V. 171.

246. Lin, C. Root hair-specific EXPANSIN A7 is required for root hair elongation in Arabidopsis / C. Lin, H.S. Choi, H.T. Cho // Mol Cells. – 2011. – V. 31. – P. 393-397.

247. Link, B.M. Acid-growth response and α-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco / B.M. Link, D.J. Cosgrove // Plant Physiol. – 1998. – V. 118. – P. 907-916.

248. Liszkay, A. Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, and $^{\cdot}OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth / A. Liszkay, E. Zalm, P. Schopfer // Plant Physiol. – 2004. – V. 136. – P. 3114-3123.

249. Liu, Z. Regulatory mechanisms for floral organ identity specification in Arabidopsis thaliana / Z. Liu // Development. – 2008. – V. 5. – P. 533-547.

250. Liu, Y. OsDOG, a gibberellin-induced A20/AN1 zinc-finger protein, negatively regulates gibberellin-mediated cell elongation in rice / Y. Liu, Y. Xu, J. Xiao, Q. Ma, D. Li, Z. Xue, K. Chong // Plant Physiol. – 2011. – V. 168. – P. 1098-2007.

251. Liu, C. Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination / C. Liu, T. Fukumoto, T. Matsumoto, P. Gena, D. Frascaria, T. Kaneko, M. Katsuhara, S. Zhong, X. Sun, Y. Zhu, I. Iwasaki, X. Ding, G. Calamita, Y. Kitagawa // Plant Physiol Biochem. – 2013. – V. 63. – P. 151-158.

252. Liu, C. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice / C. Liu, B. Mao, S. Ou, W. Wang, L. Liu, Y. Wu, C. Chu, X. Wang // Plant Mol Biol. – 2014. – 84. – P. 19-36.

253. Liu, F. Enhanced seed oil content by overexpressing genes related to triacylglyceride synthesis / F. Liu, Y. Xia, L. Wu, D. Fu, A. Hayward, J. Luo, X. Yan, X. Xiong, P. Fu, G. Wu, C. Lu // Gene. – 2015. – V. 557. – P. 163-171.

254. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_T$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – V. 25. – P. 402-408.

255. Lobe, C.G. Transcription factors and mammalian development / C.G. Lobe // Current Topics in Developmental Biology. – 1992. – V. 27. – P. 351-383.

256. Locascio, A. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction / A. Locascio, M.A. Blazquez, D. Alabadi // Curr Biol. – 2013. –V. 6. – P. 804-809.

257. Locatelli, F. Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount / F. Locatelli, C. Vannini, E. Magnani, I. Corragio, M. Bracale // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 865-871.

258. Lockhart, B.E.L. Evidence for a double-stranded circular DNA genome in a second group of plant viruses / B.E.L. Lockhart // Phytopathology. – 1990. – V. 80. – P. 127-131.

259. Losa, A. Genetic interaction between *ANT* and the ovule identity genes *SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) and *SHP2* / A. Losa, M. Colombo, V. Brambilla, L. Colombo // Sex Plant Reprod. – 2010. – V. 23. – P. 115-121.

260. Lu, P. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to Arabidopsis / P. Lu, M. Kang, X. Jiang, F. Dai, J. Gao, C. Zhang // Planta. – 2013. – V. 237. – P. 1547-1559.

261. Lyznik, L. Stable Co-Transformation of maize protoplasts with *gusA* and *Neo* genes / L. Lyznik, R. Ryan, S. Rithie, T. Hodges // Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 13. – P. 151-161.

262. Magyar, Z. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division / Z. Magyar, L. De Veylder, A. Atanassova, L. Bako, D. Inze, L. Bogre // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – P. 2527-2541.

263. Maiti, I.B. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (Flt) promoter containing single or double enhancer domains / I.B. Maiti, S. Gowda, J. Kiernan, S.K. Ghosh, R.J. Shepherd // Transg. Research. – 1997. – V. 6. – P. 143-156.

264. Manchado-Rojo, M. Validation of *Aintegumenta* as a gene to modify floral size in ornamental plants / M. Manchado-Rojo, J. Weiss, M. Egea-Cortines // Plant Biotechnol J. – 2014. – V. 12. – P. 1053-1065.

265. Maris, A. Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins ofArabidopsis and their effect on root growth and cell wall extension / A. Maris, D. Suslov, S.C. Fry, J.P. Verbelen, K. Vissenberg // J Exp Bot. – 2009. – V. 60. – P. 3959-3972.

266. Marsch-Martinez, N. *BOLITA*, an Arabidopsis *AP2/ERF*-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways / N. Marsch-Martinez, R. Greco, J.D. Becker, S. Dixit, J.H. Bergervoet, A. Karaba, S. de Folter, A. Pereira // Plant Mol Biol. – 2006. – V. 62. – P. 825-843.

267. Mason, M.G. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis / M.G. Mason, D.E. Mathews, D.A. Argyros, B.B.

Maxwell, J.J. Kieber, J.M. Alonso, J.R. Ecker, G.E. Schaller // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – P. 3007-3018.

268. Matsui, A. AtXTH27 plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements / A. Matsui, R. Yokoyama, M. Seki, T. Ito, K. Shinozaki, T. Takahashi, Y. Komeda, K. Nishitani // Plant J. – 2005. – V. 42. – P. 525-534.

269. McConnell, J.R. Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis / J.R. McConnell, M.K. Barton // Development – 1998. – V. 125. – P. 2935-2942.

270. McConnell, J.R. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots / J.R. McConnell, J. Emery, Y. Eshed, N. Bao, J. Bowman, M.K. Barton // Nature. – 2001. – V. 411. – P. 709-713.

271. McCuistion, F. Identifying polyploids of various cucurbits by stomatal guard cell chloroplasts number / F. McCuistion, G.W. Elmstrom // Proc. Fla. State Hort. Soc. – 1993. – V. 106. – 155-157.

272. McQueen-Mason, S. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants / S. McQueen-Mason, D.M. Durachko, D.J. Cosgrove // Plant Cell. – 1992. – V. 4. – P. 1425-1433.

273. Menges, M. Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity / M. Menges, J.A.H. Murray // The Plant Journal. – 2002. – V. 30. – P. 203-212.

274. Miedes, E. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility / E. Miedes, I. Zarra, T. Hoson, K. Herbers, U. Sonnewald, E.P. Lorences // J Plant Physiol. – 2011. – V. 168. – P. 196-203.

275. Meijer, M. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle / M. Meijer, J.A.H. Murray // Plant Mol Biol. – 2000. – V. 43. – P. 621-633.

276. Mitsuhara, I. Efficient promoter cassettes for enhancer expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants / I. Mitsuhara, M. Ugaki, H. Hirochika // Plant Cell Physiol. – 1996. – V. 37. – P. 49-59.

277. Mizukami, Y. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis / Y. Mizukami, R.L. Fischer // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. – V. 97. – P. 942-947.

278. Mizukami Y. A matter of size: developmental control of organ size in plants / Y. Mizukami // Curr Opin Plant Biol. – 2001. – V.4. – P. 533-539.

279. Mizumoto, K. Altered expression of wheat AINTEGUMENTA homolog, WANT-1, in pistil and pistil-like transformed stamen of an alloplasmic line with *Aegilops crassa* cytoplasm / K. Mizumoto, H. Hatano, C. Hirabayashi, K. Murai, S. Takumi // Dev Genes Evol. – 2009. – P. 175-187.

280. Moloney, M.M. High efficiency transformation of *Brassica napus* using Agrobacterium vectors / M.M. Moloney, J.M. Walker, K.K. Sharma // Plant Cell Reports – 1989. – V. 8. – P. 238-242.

281. Munusamy, U. Female reproductive system of Amaranthus as the target for Agrobacterium-mediated transformation / U. Munusamy, S.N.A. Abdullah, M.A. Aziz, H. Khazaai // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – V. 4. – P. 188-192.

282. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

283. Nath, U. Genetic control of surface curvature / U. Nath, B.C. Crawford, R. Carpenter, E. Coen // Science. – 2003. – V. 299. – P. 1404-1407.

284. Nemhauser, J.L. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis / J.L. Nemhauser, T.C. Mockler, J. Chory // PLoS Biol. – 2004. – V. 2. – E258.

285. Ng, M. Function and evolution of the plant MADS-box gene family / M. Ng, M.F. Yanofsky // Nature Reviews Genetics. – 2001. – V. 2. – P. 186-195.

286. Nicol, F. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-β-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis / F. Nicol, I. His, A. Jauneau, S. Vernhettes, H. Canut, H. Hofte // EMBO. – 1998. – V. 17. – P. 5563-5576.

287. Nieuwland, J. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco / J. Nieuwland, R. Feron, B. Huisman // Plant Cell. – 2005. – V.17. – P. 2009-2019.

288. Nishikubo, N. Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar—a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees / N. Nishikubo, T. Awano, A. Banasiak // Plant Cell Physiol. – 2007. – V. 48. – P. 843-855.

289. Nishitani K. *In vitro* molecular weight increase in xyloglucan by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis* / K. Nishitani, R. Tominaga // Physiol Plant. – 1991. –V. 82. – P. 490-497.

290. Nishitani, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls / K. Nishitani // Int Rev Cytol. – 1997. – V. 173. – P. 157-206.

291. Noad, R.J. Expression of functional elements inserted into the 35S promoter region of infectious cauliflower mosaic virus replicons / R.J. Noad, D.S. Turner, S.N. Covey // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 1123-1129.

292. Nole-Wilson, S. DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA / S. Nole-Wilson, B.A. Krizek // Nucleic Acids Res. – 2000. – V.28. – P. 4076-4082.

293. Nole-Wilson, S. *AINTEGUMENTA-like* (*AIL*) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states / S. Nole-Wilson, T.L. Tranby, B.A. Krizek // Plant Mol. Biol. – 2005. – V. 57. – P. 613-628.

294. Nole-Wilson, S. AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with *YABBY* genes / S. Nole-Wilson, B.A. Krizek // Plant physiol. – 2006. – V. 141. – P. 977-987.

295. Novikova, G.V. At the beginning of the route: ABA perception and signal transduction in plants / G.V. Novikova, N.S. Stepanchenko, A.V. Nosov, I.E. Moshkov // Russ J Plant Physiol. – 2009. – V. 56. – P. 727-741.

296. Novikova, G.V. Plant cell proliferation and its regulators / G.V. Novikova, A.V. Nosov, N.S. Stepanchenko, A.A. Fomenkov, A.S. Mamaeva, I.E. Moshkov // Russ J Plant Physiol. – 2013. – V. 60. – P. 500-506.

297. Oakenfull, E.A. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression / E.A. Oakenfull, C. Riou-Khamlichi, J.A.H. Murray // Philosophical Transactions: Biological Sciences, Royal Society, London. – 2002. – V. 357. – P. 749-760.

298. Odell, J.T. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter / J.T. Odell, F. Nagy, N.H. Chua // Nature. – 1985. – V. 313. – P. 810-812.

299. Okamoto-Nakazato, A. A brief note on the study of yieldin, a wall-bound protein that regulates the yield threshold of the cell wall / A. Okamoto-Nakazato // Plant Research. – 2002. – V. 115. – P. 309-313.

300. Okazawa, K. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls / K. Okazawa, Y. Sato, T. Nakagawa, K. Asada, I. Kato, E. Tomita, K. Nishitani // J Biol Chem. – 1993. – V. 268. – P. 25364-25368.

301. Omirulleh, S. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize / S. Omirulleh, M. Abraham, M. Golovkin, I. Stefanov, M.K. Karabaev, L. Mustardy, S. Morocz, D. Dubits // Plant Mol. Biol. – 1993. – V. 21. – P. 415-428.

302. Osato, Y. A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: a functional analysis using RNAi plants / Y. Osato, R. Yokoyama, K. Nishitani // J Plant Res. – 2006. – V. 119. – P. 153-162.

303. Ossowski, S. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs / S. Ossowski, R. Schwab, D. Weigel // Plant J. – 2008. – V. 53. – P. 674-690.

304. Park, C.H. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* / C.H. Park, T.W. Kim, S.H. Son // Phytochemistry. – 2010. – V. 71. – P. 380-387.

305. Park, Y.B. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *xxt1/xxt2* mutant of Arabidopsis / Y.B. Park, D.J. Cosgrove // Plant Physiol. 2011. – V. 158. – P. 465-475.

306. Pattanaik, S. Isolation of full-length transcript promoter from the strawberry vein banding virus (SVBV) and expression analysis by protoplasts transient assays and in transgenic plants / S. Pattanaik, N. Dey, S. Bhattacharyya, I. Maiti // Plant Science. – 2004. – V. 167. – P. 427-438.

307. Pauli, S. The cauliflower mosaic virus extends into the transcribed region / S. Pauli, H.M. Rothnie, G. Chen, X. He, T. Hohn // Virology. – 2004. – V. 78. – P. 12120-12128.

308. Pien, S. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape / S. Pien, J. Wyrzykowska, S. Cheryl Smart, A. Fleming // Proc Natl Acad Sci USA. – 2001. – 98. – P. 11812-11817

309. Plant, A.L. Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic Acid-induced gene of tomato / A.L. Plant, A. Cohen, M.S. Moses, E.A. Bray // Plant Physiol. – 1991. – V. 97. – P. 900-906.

310. Powell, A.E. Control of organ size in plants / A.E. Powell, M. Lenhard // Curr Biol. – 2012. – V. 22. – P. 360-367.

311. Prez-Rodriguez, P. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database / P. Prez-Rodriguez, D.M. Riao-Pachn, L.G.G. Corra, S.A. Rensing, B. Kersten, B. Mueller-Roeber // Nucleic Acids Res. – 2010. – V. 38. – P. 822-827.

312. Purugganan, M.M. The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance / M.M. Purugganan, J. Braam, S.C. Fry // Plant Physiol. – 1997. – V. 115. – P. 181-190.

313. Qin, Z. The Arabidopsis ORGAN SZE RELATED 2 is involved in regulation of cell expansion during organ growth / Z. Qin, X. Zhang, X. Zhang, G. Feng, Y. Hu // BMC Plant Biology. – 2014. – V. 14. – P. 349.

314. Rayle, D. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well / D. Rayle, R.E. Cleland // Plant Physiol. – 1992. – V. 99. – P. 1271-1274.

315. Reiser, L. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes / L. Reiser, P. Sanchez-Baracaldo, S. Hake // Plant Mol Biol. – 2000. – V. 42. – V. 151-166.

316. Remans, T. Functional promoter analysis using an approach based on an in vitro evolution strategy / T. Remans, C. P. L. Grof, P.R. Ebert // Biotecniques. – 2005. – V. 38. – P. 209-216.

317. Riechmann, J.L. DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS / J.L. Riechmann, M. Wang, E.M. Meyerowitz // Nucleic Acids Res. – 1996. – V. 24. – P. 3134-3141.

318. Riechmann, J.L. Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins *AP1, AP3, PI*, and *AG* is independent of their DNA-binding specificity / J.L. Riechmann, E.M. Meyerowitz // Molecular Biology of the Cell. – 1997. – V.8. – P. 1243-1258.

319. Riechmann, J.L. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes / J.L. Riechmann, J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B.K. Sherman, G. Yu // Science. – 2000. – V. 290. – P. 2105-2110.

320. Riechmann, J.L. Transcriptional regulation: a genomic overview / J.L. Riechmann // Arabidopsis Book. – 2002. – 1:e0085.

321. Rieu, I. Isolation and expression analysis of a tobacco *AINTEGUMENTA* ortholog (*NtANTL*) / I. Rieu, M. Bots, C. Mariani, K.A. Weterings // Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46. – P. 803-805.

322. Riou-Khamlichi, C. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin / C. Riou-Khamlichi, R. Huntley, A. Acqmard, J.A.H. Murray // Science. – 1999. – V. 283. – P. 1541-1544.

323. Ron'zhina E.S. Cytokinin-regulated mesophyll cell division and expansion during development of *Cucurbita pepo* leaves / E.S. Ron'zhina // Rus J Plant Physiol. – 2003. – V. 50. – P. 646-655.

324. Rose, J.K.C. Co-operative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening / J.K.C. Rose, A.B. Bennett // Trends Plant Sci. – 1999. – V. 4. – P. 176-183.

325. Rose, J.K.C. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature / J.K.C. Rose, J. Braam, S.C. Fry, K. Nishitani // Plant Cell Physiol. – 2002. – V. 43. P. 1421-1435.

326. Roy, A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction / A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang // Nature Protocols. – 2010. – V. 5. – P. 725-738.

327. Sabirzhanova, I.B. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility inosmotically stressed maize plants / I.B. Sabirzhanova, B.E. Sabirzhanov, A.V. Chemeris, D.S. Veselov, G.R. Kudoyarova // Plant Physiol Biochem. – 2005. – V. 43. – P. 419-422.

328. Sablowski, R. Plant stem cell niches: from signalling to execution / R. Sablowski // Curr Opin Plant Biol. – 2011. – V. 14. – P. 4-9.

329. Sakuma, Y. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression / Y. Sakuma, Q. Liu, J.G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. –V. 290. – P. 998-1009.

330. Salmi, M.L. Current status and proposed roles for nitric oxide as a key mediator of the effects of extracellular nucleotides on plant growth / M.L. Salmi, G. Clark, S.J. Roux // Front Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 1-7.

331. Samac, D.A. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*) / D.A. Samac, M. Tesfaye, M. Dornbusch, P. Saruul, S.J. Temple // Transgenic Research. – 2004. – V. 13. – P. 349-361.

332. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis // Cold Springer Harbor: Cold Springer Harbor Lab. – 1989. – 1626 p.

333. Sampedro, J. The expansin superfamily / J. Sampedro, D.J. Cosgrove // Genome Biol. – 2005. – V. 6. – P. 242.1-242.11.

334. Sanders, P.R. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants / P.R. Sanders, J.A. Winter, A.R. Barnason S.G. Rogers, R.T. Fraley // Nucleic Acids Res. – 1987. – V. 14. – P. 1543-1558.

335. Sanger, M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and regulated mannopine synthase promoter / M. Sanger, S. Daubert, R.M. Goodman // Plant Mol Biol. – 1990. – V. 14. – P. 433-443.

336. Santino, A. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses / A. Santino, M. Taurino, S. De Domenico, S. Bonsegna, P. Poltronieri, V. Pastor, V. Flors // Plant Cell Rep. – 2013. V. 32. P. 1085-1098.

337. Sawa, S. *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains / S. Sawa, K. Watanabe, E. Goto, E. Kanaya, E.H. Morita, K. Okada // Genes Dev. – 1999a. – V. 13. – P. 1079-1088.

338. Sawa, S. *FILAMENTOUS FLOWER* controls the formation and development of Arabidopsis inflorescences and floral meristems / S. Sawa, T. Ito, Y. Shimura, K. Okada // Plant Cell. – 1999b. – V. 11. – P. 69-86.

339. Scebba, F. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis* / F. Scebba, I. Arduini, L. Ercoli, L. Sebastiani // Biol Plant. – 2006. – V. 50. – P. 688-692.

340. Schmidt, G.W. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress / G.W. Schmidt, S.K. Delaney // Mol Genet Genomics. – 2010. V. 283. P. 233-241.

341. Sealey, P.G. Gel electrophoresis of DNA / P.G. Sealey, E.M. Southern // In: gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach. IRL Press. Oxford. – 1982. – P. 39-76.

342. Siegfried, K.P. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis / K.P. Siegfried, Y. Eshed, S.F. Baum, D. Otsuga, G.N. Drews, J.L. Bowman // Development. – 1999. – V. 126. – P. 4117-4128.

343. Setiady, Y.Y. Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay / Y.Y. Setiady, M. Sekine, N. Hariguchi, T. Yamamoto, H. Kouchi, A. Shinmyo // Plant J. – 1995. – V. 8. – P. 949-957.

344. Scofield S. The *KNOX* gene *SHOOT MERISTEMLESS* is required for the development of reproductive meristematic tissues in Arabidopsis / S. Scofield, W. Dewitte, J.A. Murray // Plant J. – 2007. – V. 50. – P. 767-781.

345. Shabala, S. Plant stress physiology / S. Shabala // Publisher: CABI. – 2012. – P. 161.

346. Shakirova, F.M. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity / F.M. Shakirova, A.R. Sakhabutdinova, M.V. Bezrukova, R.A. Fatkhutdinova, D.R. Fatkhutdinova // Plant Science. – 2003. – V. 164. – P. 317-322.

347. Shakirova, F.M. Wheat germ agglutinin regulates cell division in wheat seedlings roots / F.M. Shakirova, A.R. Kildibekova, M.V. Bezrukova, A.M. Avalbaev // Plant Growth Regul. – 2004 – V. 42. P. 175-180.

348. Shigyo, M. Analysis of gymnosperm two- AP2-domain-containing genes / M. Shigyo, M. Ito // Dev. Genes Evol. – 2004. – V. 214. – P. 105-114.

349. Shin, J.H. Characterization and transcriptional expression of the alpha-expansin gene family in rice / J.H. Shin, D.H. Jeong, M.C. Park, G. An // Mol Cells. – 2005. – V. 20. – P. 210-218.

350. Shinohara, H. Arabinosylated glicopeptide hormones: new insights into CLAVATA3 structure / H. Shinohara, Y. Matsubayashi // Curr Opin Plant Biol. – 2010. – V. 13. – P. 515-519.

351. Shinozaki, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways / K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // Curr Opin Plant Biol. – 2000. – V. 3. – P. 217-223.

352. Shpak, E.D. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation / E.D. Shpak, C.T. Berthiaume, E.J. Hill, K.U. Torii // Development. – 2004. – V. 131. – P. 1491-1501.

353. Schipper, O. Expansins in the bryophyte *Physcomitrella patens* / O. Schipper, D. Schaefer, R. Reski, A. Flemin // Plant Mol Biol. – 2002. – V. 50. – P. 789-802.

354. Singh, A.P. Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes, *RbXTH1* and *RbXTH2* / A.P. Singh, S.K. Tripathi, P. Nath, A.P. Sane // J Exp Bot. – 2011. – V. 62. – P. 5091-5103.

355. Sloan, J. Phased control of expansin activity during leaf development identifies a sensitivity window for expansin-mediated induction of leaf growth / J. Sloan, A. Backhaus, R. Malinowski, S. McQueen-Mason, A.J. Fleming // Plant Physiol. – 2009. – V. 151. – P. 1844-1854.

356. Smart, L.B. Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated / L.B. Smart, F. Vojdani, M. Maeshima, T.A. Wilkins // Plant Physiol. – 1998. – V. 116. – P. 1539-1549.

357. Smith, R.C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures / R.C. Smith, S.C. Fry // Biochem J. – 1991. V. 15. P. 529-535.

358. Smith, H.M. Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity / H.M. Smith, I. Boschke, S. Hake // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 9579-9584.

359. Son, S.H. Ethylene negatively regulates EXPA5 expression in Arabidopsis thaliana / S.H. Son, S.C. Chang, C.H. Park, S.K. Kim // Physiologia Plantarum. – 2012. – V. 144. – P. 254-262.

360. Song, S. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene / S. Song, T. Qi, C. Wasternack, D. Xie // Curr Opin Plant Biol. – 2014. – V. 21. – P. 112-119.

361. Stangl, M. Functional competition within a membrane: Lipid recognition vs. transmembrane helix oligomerization / M. Stangl, D. Schneider // Biochim Biophys Acta. – 2015 – V. 1848. – P. 1886-1896.

362. Stemmer, W.P.C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling / W.P.C. Stemmer // Nature. – 1994a. – V. 8. – P. 389-391.

363. Sugimoto-Shirasu, K. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants / K. Sugimoto-Shirasu, K. Roberts // Curr Opin Plant Biol. – 2003. – V. 6. – P. 544-553.

364. Sukno, S. Expression and regulation of the *Arabidopsis thaliana* cell endo-1,4-β-glucanase gene during compatible plant-nematode interactions / S. Sukno, O. Shimerling, J. McCuiston // J. Nematol. – 2006. – V. 38. – P. 354-361.

365. Sunilkumar, G. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP / G. Sunilkumar, L. Mohr, E. Lopata-Finch, C. Emani, K.S. Rathore // Plant Mol Biol. – 2002. – V. 50. – P. 463-474.

366. Teakle, G.R. Arabidopsis thaliana GATA factors: organization, expression and DNA-binding characteristics / G.R. Teakle, I.W. Manfield, J.F. Graham, P.M. Gilmartin // Plant Mol Biol. – 2002. – V. 50. – P. 43-57.

367. Topping, J.F. Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in Arabidopsis / J.F. Topping, K. Lindsey // Plant Cell. – 1997. – V. 9. – P. 1713-1725.

368. Trivedi, P.K. MaEXP1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit / P.K. Trivedi, P. Nath // Plant Science. – 2004. – V. 167. – P. 1351-1358.

369. Trotochaud, A.E. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and rho-related protein / A.E. Trotochaud, T. Hao, G. Wu, Z. Yang, S.E. Clark // Plant Cell. – 1999. – V. 11. – P. 393-406.

370. Tsukaya, H. Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants / H. Tsukaya, G.T. Beemster // J. Plant Res. – 2006. – V. 119. – P. 1-4.

371. Turner, D.S. Roles of the promoter and multiple overlapping domains in the pathogenicity of the pararetrovirus cauliflower mosaic virus / D.S. Turner, D.G. McCallum, S.N. Covey // J. Virol. – 1996. – V. 70. – P. 4514-4521.

372. Tuskan, G.A. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) / G.A. Tuskan, S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann // Science. – 2006. – V. 313. – P. 1596-604.

373. Tyagi, A.K. Plant genes and their expression / A.K. Tyagi // Current science. – 2001. – V. 80. – P. 161-169.

374. Ulmasov, T. Dimerization and DNA binding of auxin response factors / T. Ulmasov, G. Hagen, T.J. Guilfoyle // Plant J. – 1999. – V. 19 – P. 309-319.

375. Umeda, M. A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in Arabidopsis / M. Umeda, C. Umeda-Hara, H. Uchimiya // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 13396-13400.

376. Vandepoele, K. Detecting the undetectable: uncovering duplicated segments in Arabidopsis by comparison with rice / K. Vandepoele, C. Simillion, Y. Van de Peer // Trends Genet. – 2002. – V. 18. – P. 606-608.

377. Van der Fits, L. Comparison of the activities of CaMV 35S and FMV 34S promoter derivatives in *Catharantus roseus* cells transiently and stably transformed by particle bombardment / L. Van der Fits, J. Memelink // Plant Mol. Biol. – 1997. – V. 33. – P. 943-946.

378. Van der Meer, I.M. Promoter analysis of the chalcone synthase (*chsA*) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression / I.M. Van der Meer, C.E. Spelt, J.N. Mol, A.R. Stuitje // Plant Mol Biol. – 1990. – V. 15. – V. 95-109.

379. Van Sandt, V.S.T. Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) is encoded by a multigene family in the primitive vascular land plant *Selaginella kraussiana* / V.S.T. Van Sandt, Y. Guisez, J.-P. Verbelen, K. Vissenberg // Plant Biol. – 2007a. – V. 9. – P. 142-146.

380. Van Sandt, V.S.T., Stieperaere H., Guisez Y., Verbelen J.-P., Vissenberg K. XET activity is found near sites of growth and cell elongation in bryophytes and some green algae: new insights into the evolution of primary cell wall elongation / V.S.T. Van Sandt, H. Stieperaere, Y. Guisez, J.-P. Verbelen, K. Vissenberg // Ann Bot. – 2007b. – V. 99. – P. 39-51.

381. Veit, B. Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem / B. Veit // Plant Mol Biol. – 2009. – V. 69. – P. 397-408.

382. Verdaguer, B. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter / B. Verdaguer, A. de Kochko, R.N. Beachy, C. Fauquet // Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 31. – P. 1129-1139.

383. Verdonk, J.C. Flower-specific expression of the *Agrobacterium tumefaciens* isopentenyltransferase gene results in radial expansion of floral organs in *Petunia hybrida* / J.C. Verdonk, K. Shibuya, H.M. Loucas, T.A. Colquhoun, B.A. Underwood, D.G. Clark // Plant Biotechnol J. – 2008. – V. 6. – P. 694-701.

384. Verma, S.S. A simplified floral dip method for transformation of *Brassica napus* and *B. carinata* / S.S. Verma, V. Chinnusamy, K.C. Bansa // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. – 2008. – V. 17. – P. 197-200.

385. Vissenberg, K. Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays* / K. Vissenberg, V.S.T. Van Sandt, S.C. Fry, J.-P. Verbelen // J Exp Bot. – 2003. – V. 54. – P. 335-344.

386. Vissenberg, K. Differential expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction / K. Vissenberg, M. Oyama, Y. Osato, R. Yokoyama, J.-P. Verbelen, K. Nishitani // Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46. – V. 192-200.

387. Volkov, V. Water permeability differs between growing and non-growing barley leaf tissues / V. Volkov, C. Hachez, M. Moshelion, X. Draye, F. Chaumont, W. Fricke // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58. – P. 377-390.

388. Waites, R. The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in Antirrhinum / R. Waites, H.R. Selvadurai, I.R. Oliver, A. Hudson // Cell. – 1998. – V. 93. – P. 779-789.

389. Waites, R. The Handlebars gene is required with Phantastica for dorsoventral asymmetry of organs and for stem cell activity in Antirrhinum / R. Waites, A. Hudson // Development. – 2001. – V. 128. – P. 1923-1931.

390. Wang, Y. Identification of a novel plant Promoter Using a Potyvirus Infectious Clone / Y. Wang, V. Gaba, D. Wolf, X. Xia, A. Zelcer, A. Gal-On // Virus Genes. – 2000a. – V. 20. – P. 11-17.

391. Wang, H. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology / H. Wang, Y. Zhou, S. Gilmer, S. Whitwill, L.C. Fowke // Plant J. – 2000b. – V. 24. – P. 613-623.

392. Wang, W.C. Development of a novel Agrobacterium-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants / W.C. Wang, G. Menon, G. Hansen // Plant cell reports. – 2003. – V. 22. – P. 274-281.

393. Wang, G. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins / G. Wang, H. Kong, Y. Sun, X. Zhang, W. Zhang, N. Altman, C.W. de Pamphilis, H. Ma // Plant Physiol. – 2004. – V. 135. – P. 1084-1099.

394. Wang, B. Expression of rice *OsARGOS* gene in Arabidopsis promotes cell division and expansion and increases organ size / B. Wang, Y. Sang, J. Song, X.Q. Gao, X. Zhang // J. Genet. Genomics. – 2009a. – V. 36. – P. 31-40.

395. Wang, B. Ectopic expression of a chinese cabbage *BrARGOS* gene in Arabidopsis increases organ size / B. Wang, X. Zhou, F. Xu, J. Gao // Transgenic Res. – 2009b. – V. 19. – P. 461-472.

396. Wang, X. F-box proteins regulate ethylene signaling and more / X. Wang, H. Kong, H. Ma // Genes Dev. – 2009c. – V. 15. – P. 391-396.

397. Wang, L. Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and Arabidopsis root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively / L. Wang, X.R. Li, H. Lian, D.A. Ni, Y.K. He, X.Y. Chen, Y.L. Ruan // Plant Physiol. – 2010. – V. 154. – P. 744-756.

398. Wang, G. Overexpression of two cambium-abundant Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) α-expansin genes *ClEXPA1* and *ClEXPA2* affect growth and development in transgenic tobacco and increase the amount of cellulose in stem cell walls / G. Wang, Y. Gao, J. Wang, L. Yang, R. Song, X. Li, J. Shi // Plant Biotechnol. – 2011. – V. 9. – P. 486-502.

399. Wang, J.J. Cleavage of INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28 mRNA by MicroRNA847 upregulates auxin signaling to modulate cell proliferation and lateral organ growth in Arabidopsis / J.J. Wang, H.S. Guo // Plant Cell. – 2015. – V. 27. – P. 574-590.

400. Weigel, D. Activation of floral homeotic genes in Arabidopsis / D. Weigel, E.M. Meyerowitz // Science. – 1993. – V. 261. – P. 1723-1726.

401. Weiss, J. Genetic control of floral size and proportions / J. Weiss, L. Delgado-Benarroch, M. Egea-Cortines // Int J Dev Biol. – 2005. – V. 49. – P. 513-525.

402. Wessler, S.R. Homing into the origin of the *AP2* DNA binding domain / S.R. Wessler // Trends Plant Sci. – 2005. – V. 10. – P. 54-56.

403. Williams, R.W. Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif / R.W. Williams // Bioessays. – 1998. – V. 20. – P. 280-282.

404. Xing, S.C. The involvement of an expansin gene *TaEXPB23* from wheat in regulating plant cell growth / S.C. Xing, F. Li, Q.F. Guo, X.-X. Liu, W. Zhao // Biol Plant. – 2009. – V. 53. – P. 429-434.

405. Xu, W. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase / W. Xu, M.M. Purugganan, D.H. Polisensky, D.M. Antosiewicz, S.C. Fry, J. Braam // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1555-1567.

406. Xu, W. The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression / W. Xu, P. Campbell, A.K. Vargheese, J. Braam // Plant J. – 1996. – V. 9. – P. 879-889.

407. Xu, G. Duplication and divergence of floral MADS-box genes in grasses: evidence for the generation and modification of novel regulators / G. Xu, H. Kong // Journal of Integrative Plant Biology. – 2007. – V. 49. – P. 927-939.

408. Yamada, T. AINTEGUMENTA homolog expression in gnetum (Gymnosperms) and implications for the evolution of ovulate axes in seed plants / T. Yamada, Y. Hirayama, R. Imaichi, M. Kato // Evol Dev. – 2008. – V. 10. – P. 280-287.

409. Yamaguchi T., Nagasawa N., Kawasaki S., Matsuoka M., Nagato Y., Hirano H.Y. The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib

development in *Oryza sativa* / T. Yamaguchi, N. Nagasawa, S. Kawasaki, M. Matsuoka, Y. Nagato, H.Y. Hirano // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P. 500-509.

410. Yang, S.H. Characterization of genes encoding ABA 8'-hydroxylase in ethylene-induced stem growth of deepwater rice (*Oryza sativa*) / S.H. Yang, D. Choi // Biochem Biophys Res Commun – 2006. – V. 350. – P. 685-690.

411. Yennawar, N. H. Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a β-expansin and group-1 pollen allergen from maize / N. H. Yennawar, L.C. Li // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – V. 103. – P. 14664-14671.

412. Yokoyama, R. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis // R. Yokoyama, K. Nishitani // Plant Cell Physiol. – 2001. – V. 42. – P. 1025-1033.

413. Yokoyama, R. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis / R. Yokoyama, J.K. Rose, K. Nishitani // Plant Physiol. – 2004. – V. 134. – P. 1088-1099.

414. Yokoyama, R. Biological implications of the occurrence of 32 members of the XTH (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) family of proteins in the bryophyte *Physcomitrella patens* // R. Yokoyama, Y. Uwagaki, H. Sasaki, T. Harada, Y. Hiwatashi, M. Hasebe, K. Nishitani // Plant J. – 2010. – V. 64. – P. 645-656.

415. Yoon, J.Y. Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean / J.Y. Yoon, M. Hamayun, S.K. Lee, I.J. Lee // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2009. V. 12. P. 63-68.

416. Yukawa, M. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirmsthat the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum* / M. Yukawa, T. Tsudzuki, M. Sugiura // Mol Genet Genomics. – 2006. – V. 275. – P. 367-373.

417. Yuldashev, R. Cytokinin oxidase is involved in the regulation of cytokinin content by 24-epibrassinolide in wheat seedlings / R. Yuldashev, A. Avalbaev, M. Bezrukova, L. Vysotskaya, V. Khripach, F. Shakirova // Plant Physiol Biochem. – 2012. – V. 55. – P. 1-6.

418. Zhang, T. Cotton pistil drip transformation method / T. Zhang, T. Chen // Methods Mol Biol. – 2012. – V. 847. – P. 237-243.

419. Zhao, H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination / H. Zhao, F.H. Arnold // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 1307-1308.

420. Zhao, M.R. xpansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat / M.R. Zhao, F. Li, Y. Fang, Q. Gao, W. Wang // Protoplasma. – 2011. – V. 248. – P. 313-323.

421. Zhao, M.R. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat / M.R. Zhao, Y.Y. Han, Y.N. Feng, F. Li, W. Wang // Plant Cell Rep. – 2012. – V. 31. – P. 671-685.

422. Zheng, M. Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to low temperature stress / M. Zheng, Y. Wang, K .Liu, H. Shu, Z. Zhou // J Plant Physiol. – 2012. – V. 169. – 399-409.

423. ZhiMing, Y. Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice / Y. ZhiMing, K. Bo, W. H. Xiao, L. ShaoLei, B. YouHuang, D. WoNa, C. Ming, C. Hyung-Taeg, W. Ping // Plant J. – 2011. – V. 66. – P. 725-734.

424. Zhu, T. Toward elucidating the global gene expression patterns of developing *Arabidopsis*: Parallel analysis of 8 300 genes by a high-density oligonucleotide probe array / T. Zhu, P. Budworth, B. Han, D. Brown, H-S. Chang, G. Zou, X. Wang // Plant Physiology and Biochemistry. – 2001. – V. 39. – P. 221-242.

425. Zhu, Y. Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis / Y. Zhu, Y. Wang, R. Li, X. Song, Q. Wang, S. Huang, J. Bo Jin, C.M. Liu, J. Lin // Plant J. – 2010. – V. 61. – P. 223-233.

426. Zorb, C. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance / C. Zorb, C.M. Geilfus, K.H. Muhling, J. Ludwig-Muller // J Plant Physiol. – 2013. – V. 170. – P. 220-224.

427. Zuo, J. Technical advance: an estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants / J. Zuo, Q.W. Niu, N.H. Chua // Plant J. – 2000. – V. 24. – P. 265-273.

428. Zykwinska, A. Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged / A. Zykwinska, J.-F. Thibaul, M.C., Ralet // J Exp Bot. – 2007. – V. 58. – P. 1795-1802.