

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1:577.214.625:578.853

УЧАСТИЕ ГЕНОВ КСИЛОГЛЮКАНЭНДОТРАНСГЛИКОЗИЛАЗ
PtrXTH1 И *PnXTH1* В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ
К СТРЕСС-ФАКТОРАМ

© 2018 г. Б. Р. Кулуев¹, З. А. Бережнева,

А. В. Князев, Ю. М. Никоноров, А. В. Чемерис

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа

Поступила в редакцию 31.08.2016 г.

Проведен анализ уровня экспрессии гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в листьях осины *Populus tremula* L. дикого типа и при экзогенной обработке фитогормонами. Наиболее высокий уровень содержания транскриптов гена *PtrXTH1* был зарегистрирован в молодых интенсивно растущих листьях осины. В молодых листьях осины экспрессия гена *PtrXTH1* индуцировалась цитокининами, ауксинами и брассиностероидами. Содержание транскриптов гена *PtrXTH1* увеличивалось при конститутивной экспрессии гена *PnARGOS-LIKE*. Биоинформатический анализ предполагаемой промоторной области гена *PtXTH1* *P. trichocarpa* Torr. and A. Gray ex. Hook показал наличие цис-регуляторных элементов ассоциированных с регуляцией роста и стрессоустойчивости. Для определения роли исследуемого гена нами были также созданы трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *PnXTH1* (ортолог гена *PtrXTH1* из тополя черного *P. nigra*). Трансгенные растения табака характеризовались увеличением размеров листьев, сырого и сухого веса надземной части при нормальных условиях произрастания. При выращивании в условиях засоления и засухи трансгенные растения отличались повышенной стрессоустойчивостью благодаря поддержанию клеточного растяжения в корнях и стеблях на более высоком уровне и способности более эффективно сохранять влагу в листьях, чем растения дикого типа.

Ключевые слова: *Populus nigra* — *Populus tremula* — ксилоглюканэндотрансгликозилазы — ауксины — цитокинины — *ARGOS-LIKE* — рост клеток растяжением

DOI: 10.7868/S0015330318010037

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных ростовых параметров являются размеры органов, которые регулируются множеством внутренних и внешних факторов, причем многие внешние факторы могут являться стрессовыми для растений. В целом, рост органов растений контролируется двумя основными механизмами, а именно регуляцией клеточного деления и клеточного растяжения [1]. Расхождение микрофибрилл целлюлозы при клеточном растяжении достигается тремя основными механизмами: гидролизом части связующих гликанов эндогликаназами; разрезанием и новым сшиванием гликанов ксилоглюканэндотрансгликозилазами/гидролазами (ХТНs); а также нарушением водо-

родных связей между микрофибриллами целлюлозы и гликановыми цепями, которое осуществляется экспансинами [2–4].

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы (ХТНs) были охарактеризованы почти одновременно в двух лабораториях: S. Fry (Великобритания) и K. Nishitani (Япония) [5, 6]. Ферменты этой группы способны разрывать гликозидную связь в остове ксилоглюкана, соединяя фрагменты двух молекул между собой, при этом расщепляется гликозидная связь в молекуле донора, которая соединяется с невозстанавливающим концом молекулы акцептора. Причем этот же фермент может обладать и гидролазной активностью [7]. У двудольных ХТНs кодируется большим мультигенным семейством генов. Например, в полностью секвенированных геномах *Arabidopsis thaliana*, риса (*Oryza sativa*) и тополя (*Populus trichocarpa*) имеются 33, 29 и 41 открытых рамок считывания соответственно, и все они предположительно кодируют ферменты

¹Адрес для корреспонденции: Кулуев Булат Разяпович. 450054, Уфа, Проспект Октября 71, Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. Электронная почта: Kuluev@bk.ru

с ксилоглюканэндотрансгликозилазной активностью (ХЕТ) [8–10].

Повышенный уровень содержания мРНК ХТНс наблюдается при обработке растений экзогенными ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами, при этом происходит удлинение стеблей опытных растений за счет стимуляции роста клеток растяжением [11]. Взаимосвязь между активностью ХЕТ и клеточным растяжением была обнаружена в апикальном сегменте гипокотилей томатов, сверхэкспрессирующих ген *SIXTH1*, где удельная активность ХЕТ была выше в сравнении с контрольной линией [11]. В гипокотилиях трансгенных линий с пониженной экспрессией гена *SIXTH1* показатели общей растяжимости были ниже, чем в линиях дикого типа. Все это свидетельствует о том, что ХТНс участвуют в реструктуризации клеточной стенки в период интенсивного роста органов.

Несмотря на интенсивные исследования ХТНс, остается без ответа вопрос о функциональном значении в геномах растений большого количества генов, кодирующих эту группу ферментов. Возможно, каждый из них выполняет какую-то специфичную роль в растительном организме. Действительно ХТНс 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 [12]. Экспрессия гена *LeXET4* стимулируется гиббереллинами, а снижается при действии АБК, и его белковый продукт играет важную роль при разрыве семенной кожуры и начале прорастания семени. Другие гены томатов, например, *LeXET1* экспрессируется в активно растущих тканях и активируется ауксинами [13], а *LeXET2* экспрессируется в листьях и молодых плодах [12]. В литературе имеются также сведения об участии ХТНс в обеспечении устойчивости растений к дефициту влаги, вызванного засухой и засолением. Например, трансгенные растения томатов с конститутивной экспрессией гена *CaXTH3* перца характеризовались улучшенными параметрами роста корней при действии 100 мМ NaCl [14]. Конститутивная экспрессия гена *CaXTH3* оказывала влияние на пластичность клеточной стенки замыкающих клеток устьиц, что приводило к уменьшению размеров устьичной щели, а это, в свою очередь, способствовало повышению засухоустойчивости трансгенных растений томатов. Таким образом, из литературных данных следует, что гены ХТНс могут быть использованы для модификации ростовых параметров и стрессоустойчивости растений. Однако эти же литературные данные не дают ответа на вопрос о возмож-

ности использования генов ХТНс для повышения продуктивности растений.

Особый интерес представляет изучение генов ХТНс древесных растений, так как они могут быть применены в лесной биотехнологии для создания новых пород деревьев с улучшенными параметрами роста. Одним из модельных древесных растений является осина *Populus tremula* L., которая относительно легко подвергается агробактериальной трансформации. При этом геном одного из видов тополей, а именно тополя бальзамического (*Populus trichocarpa* Torr. and A. Gray ex. Hook), полностью секвенирован, что позволяет проводить функциональные исследования генов ХТНс этих древесных растений. Наиболее близким родственником этого вида тополя во флоре России является тополь черный *Populus nigra* L. В связи с этим, целью данной работы было выяснение возможной роли гена *PtXTH1* осины и его ортолога из тополя черного гена *PnXTH1* при росте и адаптации растений к стресс-факторам. Для этого нами была поставлена задача определить уровень экспрессии исследуемого гена в листьях разного возраста у осины дикого типа при экзогенной обработке фитогормонами и при конститутивной экспрессии гена *PnARGOS-LIKE*, кодирующего один из трансмембранных белков с OSR-доменом, участвующих в трансдукции фитогормональных сигналов [15]. Также была поставлена задача создать трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *PnXTH1* тополя черного и определить их основные морфометрические параметры при выращивании в нормальных условиях и при действии стрессовых факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей. Для поиска ближайших гомологов гена *PnXTH1* проводили филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания исследуемого гена и 31 гена ХТНс *Arabidopsis thaliana* при помощи программы MegAlign v. 7.1.0 (DNASTar, США). Для выравнивания использовали нуклеотидную последовательность гена *PtXTH1 Populus trichocarpa* (XM_006385804). Последовательности нуклеотидов генов ХТНс *A. thaliana* депонированы в базе данных TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). Для идентификации цис-регуляторных элементов предполагаемой промоторной области исследуемого гена была использована база данных AtcisDB (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB>). При этом для анализа был использован участок ДНК размером 3000 п.н., расположенный до АТГ-кодона открытой рамки считывания гена *PtXTH1 P. trichocarpa*. Нуклеотидная последовательность предполагаемой промо-

торной области исследуемого гена была взята из базы данных PtGDB (<http://www.plantgdb.org/PtGDB>).

Условия выращивания осины, экзогенная обработка фитогормонами, стрессовые воздействия. Перед экзогенной обработкой фитогормонами укоренившиеся побеги растущих *in vitro* растений осины пересаживали в почву и в течение 90 дней выращивали в условиях теплицы при +30 °С, освещенности около 140 мкмоль/(м²с) и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). Затем опрыскивали всю надземную часть растения раствором фитогормона с добавлением Tween-20 (0.1%). Использовали следующие концентрации фитогормонов: 6-бензиламинопурина (БАП) – 50 мкМ, α-нафтилуксусной кислоты (НУК) – 10 мкМ, 24-эпибрассинолида (ЭБ) – 1 мкМ. Контрольные растения опрыскивали 0.1% раствором Tween-20. Все эксперименты проводились в трех биологических повторностях (n = 3). Через 6 часов после опрыскивания верхушки побега, молодые и зрелые листья замораживали в жидком азоте.

Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Тотальную РНК из листьев исследуемых растений осины и табака выделяли с тризолом, первую цепь кДНК строили при помощи олиго(dT) праймера и MMuLV-ревертазы (NEB, США). В работе использовали осины дикого типа обработанные экзогенными фитогормонами, три линии трансгенных растений осины с конститутивной экспрессией гена *PnARGOS-LIKE* (JQ955606.1), полученные нами ранее [15], а также трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *PnXTH1*. Количественное определение содержания мРНК (после конверсии в кДНК) генов *PtrXTH1*, *PnARGOS-LIKE* и *PnXTH1* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве стандарта при работе с осинкой использовали мРНК актина (EF418792), а при работе с табаком мРНК фактора элонгации EF-1α (AF120093.1), уровень экспрессии которых принимали за 100%. Выбор этих референсных генов объясняется тем, что они, согласно литературным данным, показывают наибольшую стабильность уровня экспрессии в различных тканях осины и табака при разных условиях произрастания [16–18]. Реакцию амплификации проводили в 0.2 мл пробирках (AXYGEN, Inc., США) в объеме 25 мкл, используя стандартный набор (Синтол, Россия). Для количественного анализа содержания транскриптов генов *PtrXTH1* и *PnXTH1* использовали праймеры 5'-ttccaatcaaaaggttcatact-3' и 5'-atcatcggtccatagc-3'. ОТ-ПЦР генов *PnARGOS-LIKE*, актина и фактора

элонгации EF-1α проводили при помощи пар праймеров:

5'-gcaagtgcagagaaaaagaaa-3' /
5'-atgaaagccaagattatgagc-3',
5'-actggtattgtgttgattctgg-3' /
5'-agttgtatgtagtctcgtggatgc-3' и
5'-gaattgtactgtccctgtt-3' /
5'-ttgccaatctgtcctgaat-3' соответственно.

Все эксперименты проводились в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Генно-инженерные манипуляции. Ген *PnXTH1* был амплифицирован из геномной ДНК тополя черного при помощи HiFi ДНК-полимеразы (Кара Biosystems, USA) с использованием праймеров:

5'-cgtcttatgcgtgtcaaaaa-3' и
5'-taaatgtatccagcaccat-3'.

Размер амплифицированного участка ДНК генома тополя черного согласно теоретическим расчетам и результатам агарозного гель-электрофореза составил 2033 п.н., из которых 51 п.н. приходится на 5'-нетранслируемую область, 39 п.н. на 3'-нетранслируемую область и 1058 п.н. на 3 интрона. Теоретически рассчитанный размер открытой рамки считывания гена *PnXTH1* составляет 885 п.н., таким образом, целевой ген потенциально кодирует предполагаемый белок, состоящий из 295 аминокислотных остатков. Амплифицированный участок ДНК был клонирован и секвенирован с двух сторон (по 400 п.н.), что однозначно позволило его идентифицировать как ген *XTH1* тополя черного. При создании генно-инженерных конструкций использовали бинарный вектор pCambia 1301 (CAMBIA, Австралия) с селективным маркером устойчивости к гентамицину, в котором была клонирована искусственно созданная кассета, состоящая из 35S промотора [19] и сайта полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты. Модифицированную плазмиду расщепляли по сайту рестрикции *SmaI* и в полученном бинарном векторе клонировали ампликон гена *PnXTH1* размером 2033 п.н. По результатам ПЦР-анализа отбирали конструкцию, содержащую вставку целевого гена в смысловой ориентации по отношению к промотору. Целевую генно-инженерную конструкцию 35S::*PnXTH1* в составе бинарного вектора pCambia 1301 внедряли методом электропорации в клетки *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0.

Получение трансгенных растений табака, морфологическая характеристика и условия выращивания растений. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 получали методом агробактериальной трансфор-

мации листовых дисков, высеченных из листьев трехмесячных растений [19]. Отбор трансгенных растений проводился по результатам гистохимического анализа активности репортерного гена *GUS* и ПЦР-анализа на наличие 35S промотора, маркерных генов и целевого гена. После получения семян трансгенных растений они высевались на селективную среду МС. Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному средству семян и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 -квadrat по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов. Морфологический анализ проводили на трансгенных растениях второго поколения предварительно выращенных на селективной среде с гигромицином для элиминации нетрансгенных вариантов. Для анализа отбирались линии трансгенных растений, характеризующиеся относительно высоким уровнем содержания мРНК трансгена *PnXTH1*. Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом ("Терра вита", Россия) в условиях теплицы при температуре +30 °C с освещенностью около 140 мкмоль/(м² с) и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). В качестве контрольных использовали нетрансгенные растения табака сорта Petit Navana линии SR1, выращенные на среде МС без добавления антибиотиков и акклиматизированные к условиям почвы. Определение длины и площади листьев производили в период цветения. Для каждой линии было отобрано по пять растений, у которых измеряли три нижних листа в длину (второй, третий и четвертый листья). Длину стебля, сырой и сухой вес надземной части определяли также в период цветения, у каждого растения также измеряли длину пяти цветков.

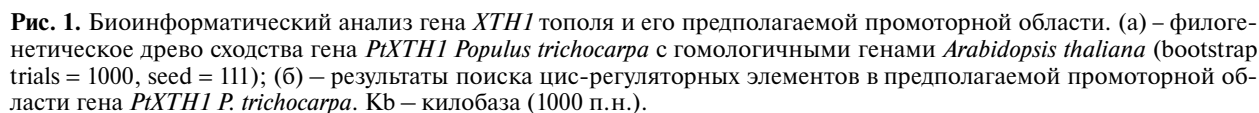
Оценка ростовых параметров трансгенных растений при воздействии засоления, засухи и холода. Трансгенные растения проращивали в климатостатах Binder (Германия) при температуре +25 °C, освещенности около 140 мкмоль/(м² с) и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри и, по прошествии 10 дней, определяли пророст корней при норме и действии 100 мМ NaCl. 20-дневные трансгенные проростки продолжавшие расти на горизонтально-ориентированных чашках Петри переносили на почву и выращивали их в теплице. Для определения солеустойчивости, трансгенные

растения выращивали в нормальных условиях в теплице в сосудах с почвой объемом 450 мл в течение 20 дней. Затем опытные растения в течение двух недель 4 раза (по два раза в неделю) поливали 50 мл 2% раствора NaCl, при этом в почве достигалась концентрация NaCl 150 мМ. Контрольные растения поливали аналогичным объемом дистиллированной воды. Морфологический анализ проводили через 30 дней после начала опыта по внесению соли. Для определения ростовых параметров трансгенных растений при действии низких положительных температур растения выращивали на почве в течение 12 дней в вегетационных сосудах объемом 250 мл в теплице, затем часть растений переносили в климатостат Sanyo MIR-154 (Япония) с температурой +12 °C. Все растения поливали дистиллированной водой три раза в неделю (объем — 20 мл). Через 20 дней определяли сырой и сухой вес надземной части трансгенных растений. Опыты по воздействию засухи начинали через 22 дня выращивания в теплице при нормальных условиях в вегетационных сосудах с почвой объемом 450 мл. Контрольные растения продолжали поливать 3 раза в неделю, тогда как опытные растения поливали лишь один раз в неделю (объем воды — 50 мл). Через 30 дней определяли сырой и сухой вес надземной части трансгенных растений. Часть трансгенных растений в течение 20 дней не поливали и определяли у них относительное содержание воды RWC (relative water content) [14]. Для оценки скорости потери воды листьями, у трансгенных растений вырезали 7-й лист, помещали его в термостат на +45 °C и проводили его взвешивание через каждый час в течение четырех часов, результаты выражали в процентах к изначальному весу листа. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск генов Arabidopsis thaliana гомологичных гену PnXTH1 и особенности регуляции их экспрессии по данным NCBI GEO

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности ортологов гена *PnXTH1* из *P. trichocarpa* (XM_002304589), *P. alba* (JX431932), *P. tomentosa* (KM267529), гибридной осины *P. tremula* x *P. tremuloides* (ген *PttXET16A*, AF515607), однако в этих родственных тополи черному растениях исследуемый ген остается малоизученным. Лишь про ген *PttXET16A* известно, что он кодирует ХТН,



были начаты исследования лишь двух из них: EF194052 и L46792, однако, их роль в регуляции роста и стрессоустойчивости остается неизученной.

В различных биологических базах данных, например таких, как EMBL (www.ebi.ac.uk) и NCBI GEO (<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 многих ХТНс *A. thaliana*. Данная информация является весьма полезной при изучении гомологичных генов ХТНс в других растениях. В связи с этим, была поставлена задача определить наиболее близких гомологов гена *PnXTH1* в геноме *A. thaliana*. Филогенетический

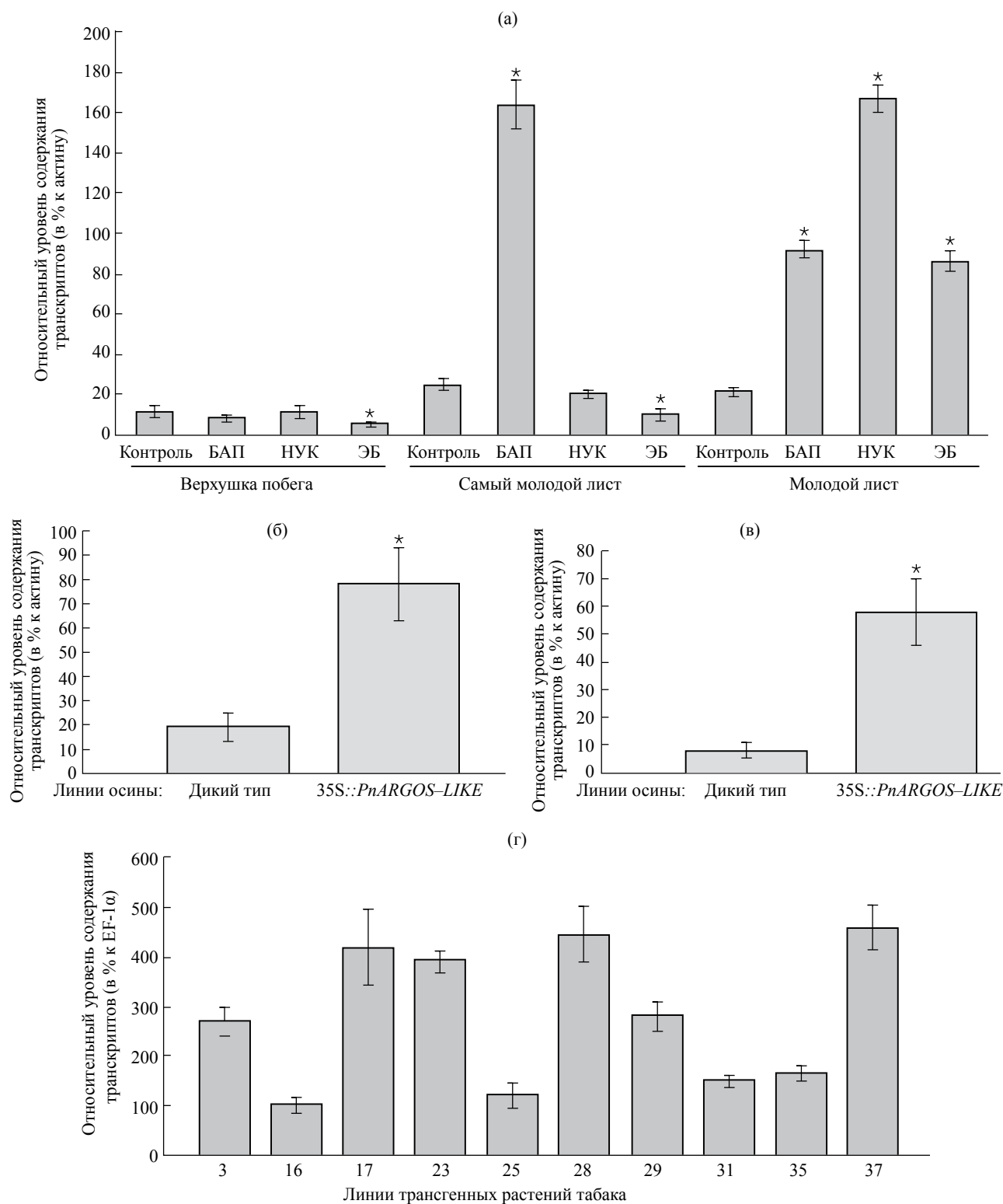


Рис. 2. Профиль экспрессии гена *XTH1* в осине и трансгенных растениях табака. (а) – результаты анализа содержания транскриптов гена *PtrXTH1* осины в листьях разного возраста и при обработке 6-бензиламинопурином (БАП), α -нафтилуксусной кислотой (НУК) и 24-эпибрассинолидом (ЭБ) в растениях осины дикого типа; (б) – содержание транскриптов гена *PnARGOS-LIKE* в молодых листьях осины дикого типа и трансгенных растений осины 35S::*PnARGOS-LIKE*; (в) – содержание транскриптов гена *PtrXTH1* в молодых листьях осины дикого типа и трансгенных растений осины 35S::*PnARGOS-LIKE*; (г) – результаты анализа содержания транскриптов гена *PnXTH1* в молодых листьях трансгенных растений табака трансформированных конструкцией 35S::*PnXTH1*. n = 3. * – p < 0.01.

анализ нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания генов *XTHs A. thaliana* и гена *PnXTH1* тополя показал, что исследуемый нами ген наиболее близок к генам *AtXTH5* (*ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE A4, EXGT-A4*) и *AtXTH4* (*ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE A1, EXGT-A1*) (рис. 1 а).

Цис-регуляторные элементы предполагаемой промоторной области ортолога гена PnXTH1 из P. trichocarpa

Транскрипция генов *XTHs*, как и любых других генов находится под контролем, прежде всего, промотора. В связи с этим, полезная информация о механизмах регуляции экспрессии исследуемых генов может быть получена путем анализа цис-регуляторных элементов промоторной области. У осины и тополя черного промоторы гена *XTH1* не секвенированы. Из тополей геном полностью секвенирован только у *P. trichocarpa*, в связи с этим, был проведен анализ предполагаемого промоторного участка гена *XTH1 P. trichocarpa*. В анализируемом участке ДНК были обнаружены 6 элементов GATA [21]; 6 элемента BS IN AG [22], 3 элемента W-box [23], 3 элемента AtMYC2 [24]. В промоторном участке гена *XTH1* также были выявлены по одному цис-элементу AtMYB2, SORLIP1, Ibox, BOXII, ABRE-like и ATB2 (рис. 1 б).

Содержание транскриптов гена PtrXTH1 осины дикого типа в листьях различного возраста и при экзогенной обработке фитогормонами

После компьютерного анализа нами было проведено исследование профиля экспрессии гена *PtrXTH1* осины дикого типа в листьях различного возраста и при экзогенной обработке фитогормонами. Максимальный уровень экспрессии гена *PtrXTH1* был зафиксирован в самых молодых, интенсивно растущих листьях осины (рис. 2 а). Относительно низкий уровень содержания транскриптов гена *PtrXTH1* был обнаружен в верхушке побега, состоящей из апикальной меристемы и зачатков листьев. В верхушке побега при экзогенной обработке фитогормонами уровень содержания транскриптов исследуемого гена не повышался, в то время как brassinosteroids способствовали уменьшению уровня экспрессии гена *PtrXTH1* (рис. 2 а). В наиболее молодых листьях цитокинины существенно увеличивали уровень экспрессии гена *PtrXTH1*, а brassinosteroids напротив, достоверно уменьшали содержание транскриптов исследуемого гена (рис. 2 а). В молодых листьях старшего возраста все три использованные для экзогенной обработки фитогормона способствовали увеличению содержания транскриптов гена *PtrXTH1*.

Причем наибольшее влияние оказывали ауксины, которые увеличивали уровень экспрессии гена *PtrXTH1* в 8 раз по сравнению с контролем (рис. 2 а).

Участие гена PnARGOS-LIKE в регуляции экспрессии гена PtrXTH1

Ранее нами у тополя черного был клонирован и изучен ген *PnARGOS-LIKE*, кодирующий один из белков с OSR-доменом, участвующий в инициации зачатков листьев и росте листьев за счет растяжения клеток [15]. В отличие от гена *PtrXTH1* наиболее высокий уровень экспрессии данного гена был обнаружен не в молодых листьях, а в верхушке побега. Экспрессия гена *PnARGOS-LIKE* также как и гена *PtrXTH1* индуцировалась цитокининами и ауксинами (при использовании тех же концентраций фитогормонов). Так как белки с OSR-доменом участвуют в трансдукции фитогормонального сигнала и, вероятно, являются посредниками при передаче сигнала от фитогормонов к *XTHs* [25], изучение уровня экспрессии гена *PtrXTH1* при сверхэкспрессии гена *PnARGOS-LIKE* представляет большой интерес. Для проведения этого анализа были использованы полученные нами ранее трансгенные растения осины с конститутивной экспрессией гена *PnARGOS-LIKE* [15]. Эксперименты были проведены на молодых листьях трансгенной осины, в которых уровень экспрессии гена *ARGOS-LIKE* был в 4 раза выше, чем в растениях дикого типа (рис. 2 б). При этом одновременно детектировались уровни мРНК трансгена *PnARGOS-LIKE* тополя черного и его гомолога хозяйского гена *PtrARGOS-LIKE* осины, так как праймеры подходили для обоих видов тополей. В тех же листьях осины при сверхэкспрессии гена *PnARGOS-LIKE* было обнаружено увеличение содержания транскриптов гена *PtrXTH1* в 7 раз (рис. 2 в). Таким образом, нами было показано, что сверхэкспрессия гена *PnARGOS-LIKE* способствует существенному увеличению содержания транскриптов гена *PtrXTH1*.

Молекулярный и морфологический анализ трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена PnXTH1

Важная информация о роли генов *PtrXTH1* и *PnXTH1* может быть получена путем создания трансгенных растений и морфологического анализа этих растений. Нами были проведены работы по трансформации табака и получены 37 линий трансгенных растений, трансгенность которых была доказана при помощи ПЦР-анализа, гистохимического анализа активности репортерного белка β-глюкуронидазы и анализа расщепления призна-

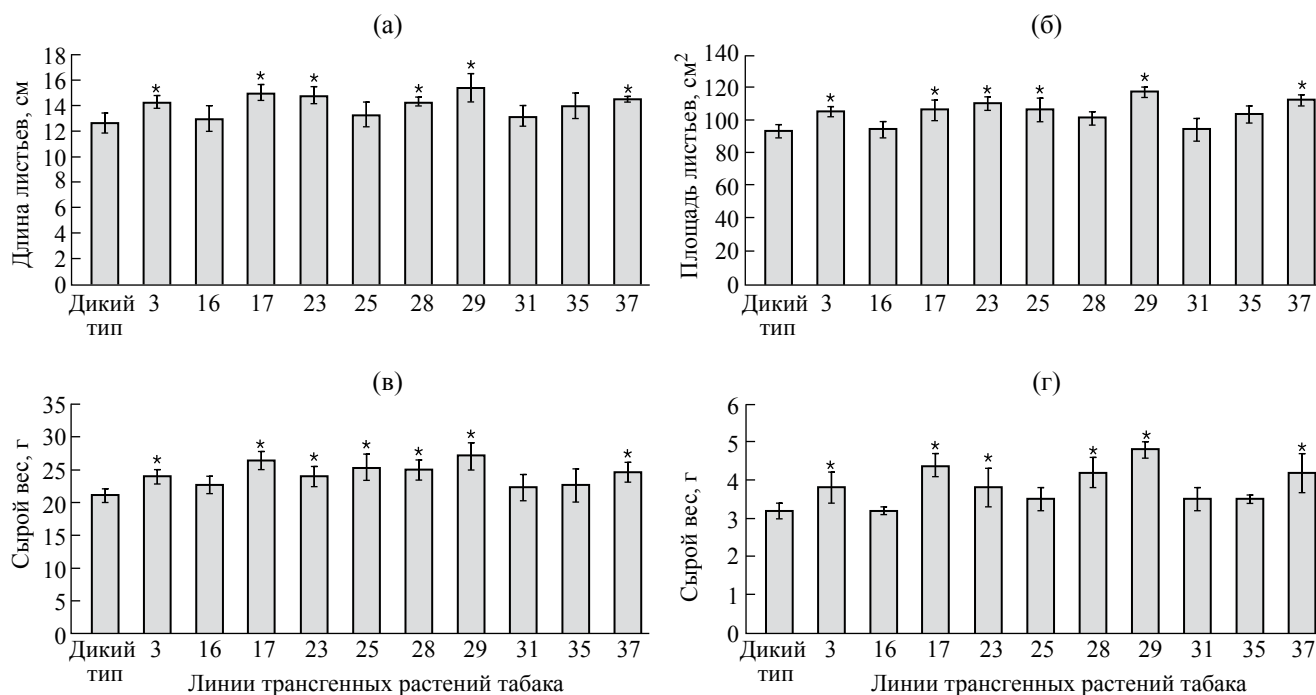


Рис. 3. Морфометрические параметры трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *PnXTH1* в нормальных условиях произрастания. (а) — длина листьев; (б) — площадь листьев; (в) — сырой вес надземной части; (г) — сухой вес надземной части. $n = 5$. * — $p < 0.01$.

ка устойчивости к селективному агенту гигромицину. Далее был проведен анализ содержания транскриптов гена *PnXTH1* в трансгенных растениях. Его стабильно детектируемый в серии экспериментов уровень экспрессии был обнаружен в линиях 3, 16, 17, 23, 25, 28, 29, 31, 35 и 37. При этом наиболее высокие уровни мРНК трансгена были характерны для линий 3, 17, 23, 28, 29 и 37 (рис. 2г). Все 10 линий трансгенных растений табака со стабильной экспрессией трансгена были отобраны для дальнейшего морфологического анализа. В период цветения достоверное увеличение длины листьев было характерно для линий 3, 17, 23, 28, 29 и 37 (рис. 3 а). Степень увеличения длины листьев достигала в среднем 22% по сравнению с контролем для линии 29. По площади листьев также некоторые линии трансгенных растений характеризовались их достоверным увеличением в среднем от 13% у линии 3 до 26% у линии 29 (рис. 3 б). По высоте стебля и длине цветков контрольные и трансгенные растения достоверно не различались. Для линий 3, 17, 23, 25, 28, 29 и 37 было характерно также увеличение сырого веса, причем для линии 17 степень увеличения этого параметра по сравнению с контролем составила в среднем 25% (рис. 3 в). Конститутивная экспрессия гена *PnXTH1* также способствовала увеличению сухого веса в шести линиях трансгенных растений, причем степень увеличения для линии 29 составила

в среднем 50% (рис. 3 г). Таким образом, конститутивная экспрессия гена *PnXTH1* способствовала увеличению сырого и сухого веса надземной части растений, в основном, за счет стимуляции роста листьев. Более того, в трансгенных растениях была обнаружена корреляция степени морфологических изменений с уровнем экспрессии гена *PnXTH1* (рис. 2 г).

Ростовые параметры трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена PnXTH1 при действии стрессовых факторов

Длина корней при выращивании в вертикально-ориентированных чашках Петри была проанализирована у 7 линий трансгенных растений табака. В нормальных условиях длина корней трансгенных растений у всех линий была увеличена по сравнению с диким типом. Однако еще большая разница в длине корней между контрольными и трансгенными растениями была обнаружена при действии 100 мМ NaCl (рис. 4 а). Например, у линии 37 длина корней при засолении была в среднем на 142% больше, чем у растений дикого типа. У контрольных растений при выращивании на среде со 100 мМ NaCl длина корней оставалась такой же, как при отсутствии соли. В то же время у всех трансгенных растений при действии соли длина корней существенно увеличивалась, например, у линии 37 в среднем на 55% (рис. 4а). При

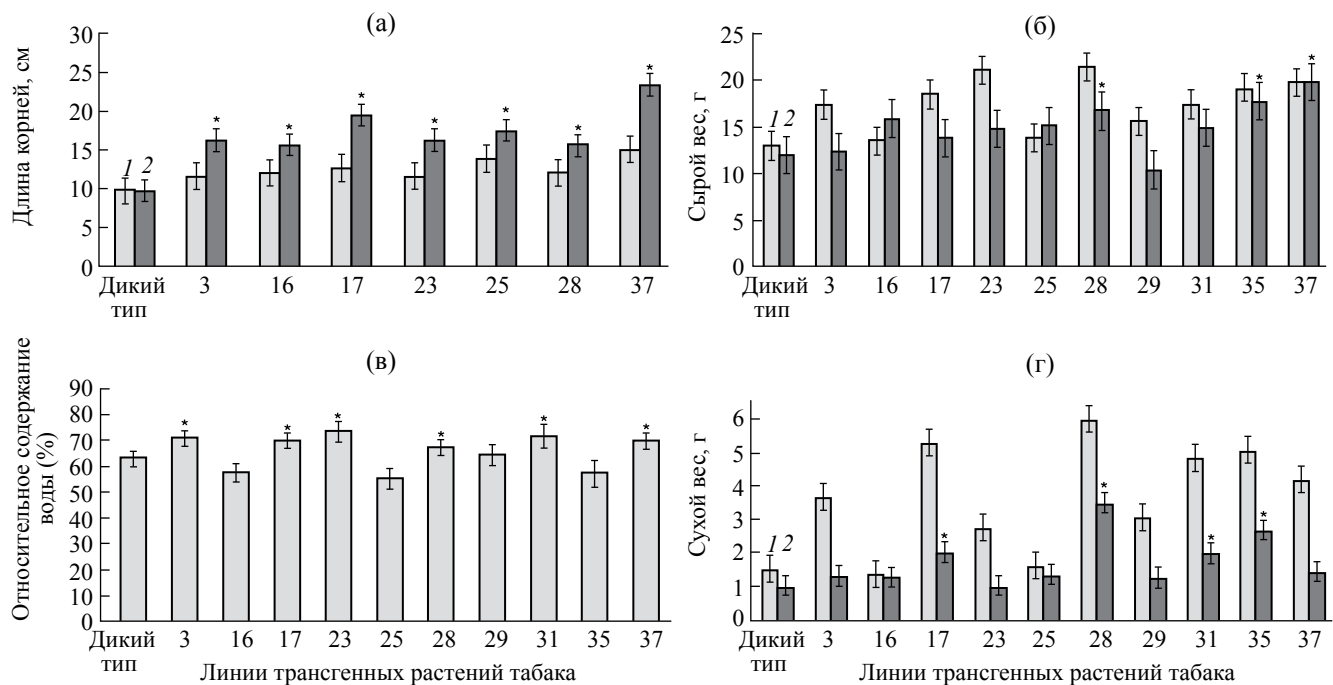


Рис. 4. Морфометрические параметры трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *PnXTH1* при действии стрессовых факторов. (а) – длина корней при выращивании в вертикально-ориентированных чашках Петри при действии 100 мМ NaCl; (б) – сырой вес надземной части при выращивании в почве в условиях засоления (150 мМ NaCl); (в) – относительное содержание воды (RWC) в побегах после 20-дневной засухи; (г) – сухой вес надземной части при выращивании в почве в условиях засоления (150 мМ NaCl). 1 – контрольные растения, 2 – растения, выросшие в условиях засоления. n = 5. * – p < 0.01.

выращивании на почве в условиях засоления, как у контрольных, так и у большинства проанализированных 10 линий трансгенных растений уменьшалась высота стебля. Степень уменьшения высоты стебля при засолении была наибольшей у растений дикого типа и составила 41%, тогда как, например, у линии 28 высота стебля уменьшалась в среднем лишь на 19%, чем у растений той же линии, выращенных в нормальных условиях. Следует отметить, что у линий 35 и 37 при засолении высота стебля не уменьшалась по сравнению с растениями тех же линий, растущих в нормальных условиях. Длина и площадь листьев при действии NaCl достоверно не изменялась ни у контрольных, ни и у трансгенных растений табака. В целом по размерам листьев растения дикого типа и 35S:: *PnXTH1* растения табака при засолении не отличались между собой. Увеличение сырого веса при выращивании в условиях засоления было характерно для линий 28, 35 и 37 (рис. 4 б), что вероятнее всего связано с улучшенными, по сравнению с контролем, параметрами роста стебля у трансгенных растений. Сухой вес при засолении достоверно увеличивался у линий 17, 28, 31 и 35 (рис. 4 г).

При 20-дневном выращивании в условиях низких положительных температур (+12 °C) сырой вес у растений дикого типа уменьшался в среднем на 62%, по сравнению с теми же растениями, выращенными

в отсутствие стрессовых факторов. У проанализированных трансгенных растений в условиях холода сырой вес также снижался на 60–70% в зависимости от линии, лишь для линии 37 было характерно уменьшение сырого веса на 38%. Сухой вес у контрольных растений при действии +12 °C уменьшался в среднем на 50%, по сравнению с нормальными условиями. У трансгенных растений сухой вес при этих условиях уменьшался от 50% у линии 37 до 75% у линии 35. Таким образом, ни одна из линий трансгенных растений табака повышенной продуктивностью при действии холода не характеризовалась, лишь у линии 37 наблюдалось увеличение сырого веса по сравнению с растениями дикого типа.

Далее нами были оценены ростовые параметры трансгенных растений при длительном действии засухи. Было показано, что сырой вес как контрольных, так и трансгенных растений при 30-дневном действии засухи уменьшается примерно в 2 раза по сравнению с теми же растениями, выращенными в отсутствие стрессовых факторов. Примерно в такой же степени уменьшался и сухой вес всех проанализированных растений. В целом, по степени изменения сырого и сухого веса при действии засухи трансгенные растения существенно не отличались от растений дикого типа. В то же время следует отметить, что трансгенные растения линий 17, 23, 28 и 37 набирали больше сухого веса в условиях засухи, чем растения

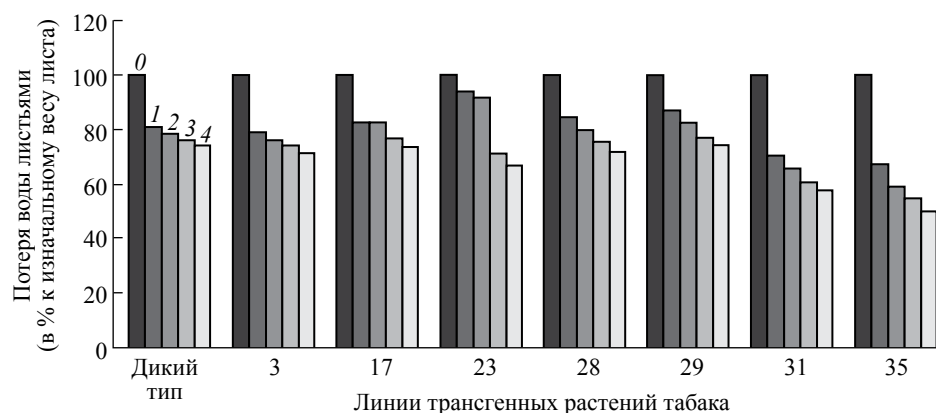


Рис. 5. Результаты анализа скорости потери воды листьями табака. *PnXTH1/3–35* — линии трансгенных растений табака. 0 — вес листа сразу после отсечения (принят за 100%), 1 — вес листа в процентах к изначальному весу через 1 час инкубации при +45 °С, 2 — через 2 часа инкубации, 3 — через 3 часа после инкубации, 4 — через 4 часа после инкубации.

дикого типа при тех же условиях. Это означает, что перечисленные линии трансгенных растений характеризуются большей продуктивностью при засухе, чем контрольные растения.

Способность трансгенных растений расти в условиях засухи может быть обусловлена более эффективным сохранением воды в тканях и органах [14]. Для проверки этого предположения нами было оценено относительное содержание воды (RWC) в анализируемых растениях. Достоверное увеличение этого показателя по сравнению с растениями дикого типа было зафиксировано у линий 3, 17, 23, 28, 31 и 37 (рис. 4 в), что во многом совпадает с данными по увеличению сухого веса при засухе. Растения теряют воду в первую очередь за счет транспирации через устьица. Чтобы оценить скорость транспирационных потерь воды нами были проведены измерения изменений веса отрезанных листьев при действии тепла. Медленнее чем растения дикого типа теряли вес листья трансгенных растений линий 17, 23, 28 и 29 (рис. 5), что во многом совпадает с данными по накоплению сухого веса при засухе и увеличению показателя RWC.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *PnXTH1* кодирует один из ксилоглюканэндотрансгликозилаз тополя черного, ортологи которого обнаруживаются в геномах осины и тополя бальзамического. Из генов *XTHs* *A. thaliana* наиболее близкими по нуклеотидной последовательности к гену *PnXTH1/PtrXTH1* являются гены *AtXTH4* и *AtXTH5*. В промоторном участке гена *XTH1* тополя нами было обнаружено 6 элементов связывания с транскрипционными факторами GATA, которые играют важную роль в развитии, дифференцировке и в регуляции клеточной пролиферации [21]. В промоторе гена

XTH1 тополя было также обнаружено 6 цис-регуляторных элементов BS IN AG, которые связаны с гомеодоменсодержащим транскрипционным фактором BELLINGER участвующим в регуляции дифференциации сосудов, филлотаксиса, развитии цветков и плодов. Было показано, что этот трансфактор контролирует экспрессию множества белков, участвующих, прежде всего, в регуляции растяжения клеточной стенки [26], однако о его влиянии на экспрессию *XTHs* пока не сообщалось. С цис-элементом W-box, которых в промоторе гена *XTH1* тополя три, связано многочисленное семейство транскрипционных факторов WRKY вовлеченных в регуляцию роста и развития растений, а также в ответ растений на биотические и абиотические стрессовые факторы [27]. Также нами в промоторе исследуемого гена были обнаружены цис-элементы транскрипционных факторов *AtMYC2* и *AtMYB2*, которые контролируют экспрессию засухо- и АБК-индуцируемых генов [24], что может свидетельствовать о вовлеченности гена *XTH1* тополя в ответ на стрессовые воздействия. Наличие ABRE-мотива в промоторе также говорит о возможной вовлеченности белка *XTH1* в ответ на абиотические стрессовые факторы, вызывающие дефицит влаги [28]. Необходимо отметить, что для получения более достоверных данных по цис-регуляторным элементам требуется проведение сравнительного анализа предполагаемого промоторного участка у нескольких видов тополеи, но на данный момент его нуклеотидная последовательность у других видов рода *Populus* не секвенирована.

О повышении содержания мРНК генов *XTHs* при обработке растений экзогенными ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами хорошо известно [11]. Нами же получены данные о том, что уровень транскрипции гена *PnXTH1* в наиболее молодых листьях повышается только под влиянием

цитокининов. Цитокинины принимают участие в регуляции клеточного растяжения [29], оказывают положительное влияние на экспрессию экспансинов [30], однако о влиянии этой группы фитогормонов на уровень экспрессии генов *XTHs* пока имеется меньше сведений. В листьях старшего возраста наибольшее влияние на экспрессию исследуемого гена оказывали экзогенные ауксины. Исходя из данных NCBI GEO, гомологичные гену *PnXTH1* гены *AtXTH4* и *AtXTH5* также индуцировались ауксинами (GDS744 / 250214_at; GDS744 / 266215_at; GDS671 / 17540_s_at; GDS668 / 250214_at; GDS668 / 266215_at). Однако следует отметить, что при регуляции экспрессии гена *PnXTH1* особую роль, видимо, играют именно цитокинины, которые повышали уровень содержания транскриптов исследуемого гена именно в тех листьях, в которых изначально был высок уровень его экспрессии. Брассиностероиды способствовали снижению уровня экспрессии исследуемого гена в верхушке побега и в наиболее молодых листьях, тогда как в листьях старшего возраста увеличивали уровень экспрессии гена *PnXTH1*. Необходимо отметить, что обработка ингибитором биосинтеза брассиностероидов брассинозолом способствовала уменьшению уровня экспрессии генов *AtXTH4* и *AtXTH5* (GDS3823 / 250214_at; GDS3823 / 266215_at). Можно предположить, что брассиностероидами, в отличие от других фитогормонов, осуществляется более тонкая регуляция экспрессии генов *XTHs* и, в зависимости от стадии развития клеток, они могут как увеличить, так и уменьшить уровень транскрипции исследуемого гена. Ранее на табаке также было показано, что экзогенные брассиностероиды в зависимости от возраста листа могут как увеличивать, так и уменьшать уровень экспрессии экспансинов [30]. Сигналы от фитогормонов к генам *XTHs* могут поступать при участии белков с OSR-доменом [25]. Ранее нами было показано, что под влиянием ауксинов, цитокининов и брассиностероидов повышается уровень экспрессии гена *PnARGOS-LIKE*, кодирующего один из белков с OSR-доменом осины [15]. В настоящей работе нами показано, что увеличение уровня экспрессии гена *PnARGOS-LIKE* тополя черного в 4 раза способствует 7-кратному повышению уровня содержания транскриптов гена *PnXTH1*. Исходя из этих данных, можно предположить, что продукт гена *PnARGOS-LIKE* является посредником между фитогормонами и *XTHs*, и одной из функций данного белка с OSR-доменом, вероятно, является усиление фитогормонального сигнала.

Конститутивная экспрессия гена *PnXTH1* в трансгенных растениях табака способствовала увеличению размеров листьев, сырого и сухого веса надземной части растений. Причем степень увеличения параметров роста коррелировала с уровнем

содержания транскриптов целевого гена. Из полученных данных следует, что при нормальных условиях произрастания продукт исследуемого гена принимает участие в большей степени в процессах роста листьев, тогда как увеличения размеров других органов в трансгенных растениях табака не зафиксировано.

Трансгенные растения *35S::PnXTH1* характеризовались более высокими параметрами роста корней и стебля при действии соли, чем растения дикого типа. В литературе имеется множество данных о положительном влиянии сверхэкспрессии белков, участвующих в обеспечении клеточного растяжения на солеустойчивость, однако большинство сведений относится к экспансинам. Что касается генов *XTHs*, то известно, что трансгенные растения томатов, сверхэкспрессирующие ген *CaXTH3*, характеризовались повышенной солеустойчивостью за счет более длительного сохранения хлорофилла от разрушения и поддержания растяжения корней на нормальном уровне при воздействии NaCl [14]. Засухоустойчивость этих трансгенных растений томата обеспечивалась за счет уменьшения ширины устьичной щели, что способствовало снижению потерь транспирационной воды. Трансгенные растения табака *35S::PnXTH1* также характеризовались повышенной способностью задерживать воду в листьях. Однако каков механизм этой особенности трансгенных растений остается неизвестным. Согласно литературным данным повышение способности трансгенных растений задерживать воду в листьях может достигаться как за счет уменьшения размеров устьичной щели, так и за счет уменьшения количества устьиц на единицу площади листа [14].

Итак, ген *XTH1* тополя кодирует индуцируемую цитокининами и ауксинами ксилоглюканэндо-трансглюкозилазу, вовлеченную в обеспечение роста листьев и стебля, а также в адаптацию растений к засолению и засухе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonzalez N., Vanhaeren H., Inze D. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 332–340.
2. Inouhe M., Nevins D.J. Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleoptiles by antibodies specific for cell wall glucanases // Plant Physiol. 1991. V. 96. P. 426–431.
3. Eklof J.M., Brumer H. The *XTH* gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 456–466.
4. Dal Santo S., Fasoli M., Cavallini E., Tornielli G.B., Pezzotti M., Zenoni S. PhEXPA1, a *Petunia hybrida* expansin, is involved in cell wall metabolism and in plant

- architecture specification // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. P. 2031–2034.
5. *Smith R.C., Fry S.C.* Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures // *Biochem. J.* 1991. V. 15. P. 529–535.
 6. *Nishitani K., Tominaga R.* In vitro molecular weight increase in xyloglucan by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis* // *Physiol. Plantarum.* 1991. V. 82. P. 490–497.
 7. *Rose J.K.C., Braam J., Fry S.C., Nishitani K.* The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglycosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature // *Plant Cell Physiol.* 2002. V. 43. P. 1421–1435.
 8. *Yokoyama R., Nishitani K.* 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* // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 1025–1033.
 9. *Yokoyama R., Rose J.K., Nishitani K.* A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1088–1099.
 10. *Geisler-Lee J., Geisler M., Coutinho P.M., Segerman B., Nishikubo N.* Poplar carbohydrateactive enzymes. Gene identification and expression analyses // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 946–962.
 11. *Miedes E., Zarra I., Hoson T., Herbers K., Sonnewald U., Lorences E.P.* Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility // *Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 196–203.
 12. *Chen F., Nonogaki H., Bradford K.J.* A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglucosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 215–223.
 13. *Catala C., Rose J.K.C., Bennett A.B.* Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 527–534.
 14. *Choi J.Y., Seo Y.S., Kim S.J., Kim W.T., Shin J.S.* 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) // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 867–877.
 15. *Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonov Y.M., Chemeris A.V.* The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // *Biologia Plantarum.* 2016. V. 60. P. 513–522.
 16. *Zhang H., Yin W., Xia X.* Calcineurin B-Like family in *Populus*: comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment // *Plant Growth Regul.* 2008. V. 56. P. 129–140.
 17. *Schmidt G.W., Delaney S.K.* Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress // *Mol. Genet. Genomics.* 2010. V. 283. P. 233–241.
 18. *Wang Y., Chen Y., Ding L., Zhang J., Wei J., Wang H.* Validation of reference genes for gene expression by quantitative real-time RT-PCR in stem segments spanning primary to secondary growth in *Populus tomentosa* // *PLoS One.* 2016. V. 14. e0157370. doi: 10.1371/journal.pone.0157370.
 19. *Кулуев Б.Р., Сафиулина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В.* Морфологический анализ трансгенных растений табака экспрессирующих ген *PnEXPA3* тополя черного // *Онтогенез.* 2013. Т. 44. С. 166–173.
 20. *Bourquin V., Nishikubo N., Abe H., Brumer H., Denman S., Eklund M., Christiernin M., Teeri T.T., Sundberg B., Mellerowicz E.J.* Xyloglucan endotransglucosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 3073–3088.
 21. *Behringer C., Schwechheimer C.* B-GATA transcription factors – insights into their structure, regulation, and role in plant development // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00090.
 22. *Bao X., Franks R.G., Levin J.G., Liu Z.* Repression of AGAMOUS by BELLINGER in floral and inflorescence meristems // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 1478–1489.
 23. *Yu D., Chen C., Chen Z.* Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 1527–1540.
 24. *Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K.* Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 1859–1868.
 25. *Hu Y., Poh H., Chua N.* The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // *Plant J.* 2006. V. 47. P. 1–9.
 26. *Etchells J.P., Moore L., Jiang W.Z., Prescott H., Capper R., Saunders N.J., Bhatt A.M., Dickinson H.G.* A role for BELLINGER in cell wall development is supported by loss-of-function phenotypes // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 13. doi: 10.1186/1471-2229-12-212.
 27. *Yang Y., Chi Y., Wang Z., Zhou Y., Fan B., Chen Z.* Functional analysis of structurally related soybean GmWRKY58 and GmWRKY76 in plant growth and development // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 21. doi: 10.1093/jxb/erw252.
 28. *Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.* Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. V. 3. P. 217–223.
 29. *Ron'zhina E.S.* Cytokinin-regulated mesophyll cell division and expansion during development of *Cucurbita pepo* leaves // *Rus. J. Plant Physiol.* 2003. V. 50. P. 646–655.
 30. *Кулуев Б.Р., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В.* Роль генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в регуляции клеточного растяжения при росте листьев табака // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 5. С. 560–569.