

**Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
Кафедра генетики и биотехнологии**

На правах рукописи

Ганчева Мария Семеновна
ГЕНЫ *CLE* В РАЗВИТИИ КАРТОФЕЛЯ
Специальность: 03.02.07 Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Додуева Ирина Евгеньевна

**Санкт-Петербург
2021**

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования	5
Современное состояние исследований	5
Научная новизна диссертационной работы	6
Методы исследования и достоверность результатов исследования	6
Основные положения, выносимые на защиту	6
Практическая и теоретическая значимость работы	7
Апробация работы	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Клубнеобразование у картофеля	10
1.1.1. Фотопериодическая регуляция клубнеобразования у картофеля	11
Роль флориген-подобных белков в регуляции клубнеобразования у картофеля	12
Роль гомеодомен-содержащих ТФ в регуляции клубнеобразования у картофеля	14
Роль микроРНК в регуляции клубнеобразования у картофеля	15
1.1.2. Азотное питание	17
1.2. Пептидные фитогормоны CLE	21
1.2.1. Роль пептидов CLE в развитии апикальных меристем	22
1.2.2. Роль пептидов CLE в развитии проводящей системы	24
1.2.3. Роль пептидов CLE в ответе на внешние факторы	26
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1. Растительный материал и условия выращивания растений	30
2.2. Поиск генов <i>CLE</i> у картофеля, анализ последовательностей генов <i>CLE</i> и филогенетический анализ пептидов CLE	31
2.3. Анализ данных секвенирования РНК	32
2.4. Выделение РНК и получение кДНК	32
2.5. Выделение ДНК	33
2.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	33
2.7. ПЦР в реальном времени	34
2.8. Конструирование векторов	34
2.9. Трансформация бактерий	35
2.10. Трансформация растений с помощью <i>Agrobacterium rhizogenes</i> и <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.11. Анализ активности репортерных белков GUS и GFP	37

2.12. Гистологический анализ трансгенных растений картофеля	37
2.13. Дрожжевая одногибридная система	37
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1. Анализ последовательностей и экспрессии генов <i>CLE</i> у картофеля.	39
3.2. Поиск генов <i>CLE</i> участвующих в ответе на изменение содержания азота в среде.	42
3.2.1. Поиск гомологов генов <i>CLE</i> резуховидки, участвующих в ответе на азот.	42
3.2.2. Анализ экспрессии генов <i>CLE</i> картофеля в ответе на изменение содержания азота в среде.	43
3.2.3. Анализ активности промоторов генов <i>StCLE4</i> и <i>StCLE10</i> у картофеля.	45
3.2.4. Проверка взаимодействия ТФ BEL5 с промоторной областью гена <i>StCLE4</i> .	48
3.2.5. Изучение влияния измененного уровня экспрессии генов <i>StCLE4</i> и <i>StCLE10</i> на развитие картофеля.	51
3.3. Поиск генов <i>CLE</i> картофеля, участвующих в ответе на нехватку воды.	52
3.4. Поиск генов <i>CLE</i> , участвующих в утолщении клубня.	54
3.4.1. Поиск у картофеля гомологов генов <i>CLE</i> резуховидки, участвующих в росте утолщением.	54
3.4.2. Анализ экспрессии генов <i>CLE</i> в клубне картофеля.	55
3.4.3. Анализ активности промотора гена <i>StCLE8</i> у картофеля.	57
3.4.4. Изучение влияния сверхэкспрессии гена <i>StCLE8</i> на развитие картофеля.	59
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	67
5. ВЫВОДЫ	70
6. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	71
БЛАГОДАРНОСТИ	84
ПРИЛОЖЕНИЯ	85

ВВЕДЕНИЕ

Темой нашего исследования является изучение роли генов *CLE*, кодирующих мобильные сигнальные пептиды, в развитии картофеля, в частности - клубнеобразовании. Пептиды *CLE* (*CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related*) представляют собой мобильные компоненты высоко консервативных регуляторных модулей - систем *WOX-CLAVATA*, которые у высших растений играют важнейшую роль в регуляции разнообразных процессов развития – эмбриогенеза, активности меристем, растительно-микробных взаимодействий и ответов на факторы окружающей среды, а также в росте утолщением (Yamaguchi et al., 2016).

Известно множество культурных и дикорастущих видов картофеля. Родиной культурного картофеля является Южная Америка. Основным объектом нашей работы был *Solanum tuberosum* L. сорта Дезире. Кроме того, в исследованиях были использованы еще три диких и три культурных вида картофеля.

Клубнеобразование у картофеля сопряжено с серьезными морфологическими и биохимическими изменениями в над- и подземной частях растения. Клубни картофеля – это видоизмененные побеги, ось которых укорочена и сильно утолщена, а их ткани заполнены крахмалом. В норме клубни образуются на концах подземных побегов - столонов. На клубнеобразование влияет множество внешних факторов, таких как фотопериод, температура, азотное питание, наличие воды, а также внутренние факторы, такие как фитогормоны и углеводы. При совпадении условий, благоприятствующих образованию клубня, запускается сигнальный каскад, ведущий к инициированию клубней на концах столонов; рост столонов в длину прекращается и начинается рост утолщением. Утолщение клубня начинается в субапикальной зоне столона с активных делений клеток коры и сердцевин. Конечного размера клубни достигают благодаря активным делениям клеток перимедуллярной зоны – наружной части сердцевин. В результате образуется запасающий орган, который может пережидать неблагоприятные условия зимы и вновь прорасти весной.

Ранее был выявлен ряд регуляторов инициации и развития клубня у картофеля (Аксенова и др., 2012), тем не менее, роль пептидов *CLE* в клубнеобразовании ранее не изучалась. В связи с этим, **целью** нашего исследования стало изучение генов *CLE* у картофеля. В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить у картофеля гены *CLE*, провести анализ их последовательностей
2. Выявить среди генов *CLE* картофеля регуляторы ответа на изменение содержания азота в среде
3. Выявить гены *CLE* картофеля, вовлеченные в ответ на нехватку воды

4. Выявить среди генов *CLE* картофеля регуляторы утолщения клубня
5. Осуществить поиск регуляторов экспрессии генов *CLE* у картофеля

Актуальность темы исследования

Мировая тенденция развития сельского хозяйства в настоящее время направлена на повышение урожайности культурных растений с использованием технологий, которые наряду с высокой продуктивностью растений могут обеспечить безопасность пищевых продуктов и экологическую безопасность. В связи с этим, важный вклад в устойчивое развитие сельского хозяйства может внести выявление и использование генетических механизмов развития значимых признаков сельскохозяйственных растений.

Наше исследование посвящено выявлению генетических механизмов формирования клубня картофеля – важнейшего компонента питания человека и сельскохозяйственных животных. В настоящее время картофель занимает пятое место в мире среди источников энергии в питании человека после пшеницы, кукурузы, риса и ячменя. В связи с этим, изучение генетического контроля клубнеобразования у картофеля является актуальной задачей, решение которой может внести вклад в повышение урожайности картофеля за счет научно обоснованной селекции.

Несмотря на большое практическое значение, многие аспекты клубнеобразования у картофеля до сих пор не выяснены. Так, неизвестны регуляторы развития клубня в зависимости от факторов окружающей среды, таких, как азотное питание и нехватка воды, также слабо изучены регуляторы утолщения клубня. Наше исследование вносит вклад в решение этих вопросов.

Современное состояние исследований

К настоящему времени выявлен целый ряд регуляторов клубнеобразования у картофеля: фитохромы, гены-регуляторы цветения (Martínez-García et al., 2002), ряд мобильных сигналов, включая мРНК (Banerjee et al., 2006a, Mahajan et al., 2012, Ghate et al., 2017), микроРНК (Martin et al., 2009, Bhogale et al., 2014), а также фитогормоны (ауксины, цитокинины (ЦК) и гиббереллины) (Xu et al., 1998). Можно предположить, что и другие регуляторы развития растений могут принимать участие в формировании клубня у картофеля. Так, среди фитогормонов выделяется группа пептидных гормонов CLE, члены которой участвуют как в поддержании меристем растений, так и в ответе на различные факторы среды. Это семейство гормонов было обнаружено у большого количества видов растений, включая мхи, плауны,

папоротники и семенные растения (Yamaguchi et al., 2016; Hirakawa, Bowman, 2015). Однако у картофеля это семейство ранее не было охарактеризовано. Тем не менее, можно предположить, что пептиды CLE у картофеля могут регулировать как деления клеток в клубне, так и ответ на факторы окружающей среды. Действительно, пептиды CLE могут играть роль в формировании запасающих органов растений, что было ранее показано нами на примере запасающих корней (Gancheva et al., 2016; Ганчева и др., 2018). Выявление генов семейства *CLE* у картофеля и изучение их роли в клубнеобразовании было впервые проведено в данной работе.

Научная новизна диссертационной работы

Наше исследование посвящено изучению роли генов *CLE* в развитии картофеля и образовании его клубней. Впервые были охарактеризованы гены *CLE* как диких, так и культурных видов картофеля, проанализированы последовательности кодируемых ими белков. Для картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Дезире проведен анализ экспрессии генов в разных органах растений, а также анализ функций некоторых генов *CLE* в развитии растений. Среди генов *CLE* картофеля были впервые выявлены: 1). участники ответа на содержание азота в среде - гены *StCLE4* и *StCLE10*, 2). участник передачи сигнала о нехватке воды - ген *StCLE23*, и 3). регулятор делений клеток в проводящих пучках - ген *StCLE8*.

Таким образом, диссертационная работа характеризуется высокой степенью научной новизны.

Методы исследования и достоверность результатов исследования

В работе использованы различные молекулярно-генетические методы для анализа активности генов и изучения измененного уровня их экспрессии: полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени, клонирование генов, трансформация дрожжей, бактерий и растений, дрожжевая одногибридная система, методы микроскопии для анализа активности репортерных белков, а также статистические методы для проверки достоверности результатов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

У картофеля выявлено 42 гена *CLE*. Проанализированы последовательности генов *CLE* у трех диких и четырех культурных видов картофеля. Показано, что консенсусная последовательность доменов CLE картофеля отличается от последовательностей соответствующих доменов CLE резуховидки *Arabidopsis thaliana* и томата *Solanum lycopersicum*,

но также демонстрирует 6 наиболее консервативных аминокислот. Среди генов *CLE* у картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Дезире (*StCLE*) выявлены те, экспрессия которых ассоциирована с изменением содержания азота в среде (*StCLE4* и *StCLE10*), а также доступностью воды (*StCLE23*) и утолщением клубня (*StCLE8*).

Практическая и теоретическая значимость работы

Для выявления регуляторных компонентов и механизмов индукции клубнеобразования у картофеля был проведен поиск генов-кандидатов, которые могут стать мишенями для улучшения этой сельскохозяйственной культуры, а также для создания новых клубнеобразующих сортов растений, которые ранее клубни не образовывали. Выявлены гены, экспрессия которых ассоциирована с изменением содержания азота в среде (*StCLE4* и *StCLE10*), а также доступностью воды (*StCLE23*) и с утолщением клубня (*StCLE8*).

Теоретическая значимость результатов работы заключается в идентификации и анализе последовательностей генов семейства *CLE* у культурных и дикорастущих видов картофеля, а также функциональной характеристике некоторых генов *CLE* у *Solanum tuberosum* L., что представляет интерес для генетики развития растений.

Апробация работы

Результаты работы были опубликованы в международных и российских научных журналах и сборниках тезисов, а также были представлены на российских и международных конференциях: VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ (Санкт-Петербург, Россия, 2019); International Plant Growth Substances Association Conference (Париж, Франция, 2019); IX Съезд общества физиологов растений (Казань, Россия, 2019); International Association for Plant Biotechnology Congress (Дублин, Ирландия, 2018); VI Workshop on Plant Peptides and Receptors (Антекера, Испания, 2018); Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты (Томск, Россия, 2018).

Работа выполнялась при поддержке следующих грантов:

1. Грант РФФИ 18-34-00020 - "Изучение роли систем WOX-CLAVATA в развитии клубня у картофеля".
2. Грант РФФИ 18-04-01017 - "Системы WOX-CLAVATA в регуляции развития запасющих органов растений".

3. Грант РФФИ 20-316-80004 - “Изучение генетических механизмов образования флоэмы в клубне картофеля”.
4. Грант Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2020-922 от 16.11.2020 на создание и развитие Научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АК – аминокислота

ДД – длинный день

ИУК – индолил-уксусная кислота

КАМ – апикальная меристема корня

КД – короткий день

НУК – нафтилуксусная кислота

ПАМ – апикальная меристема побега

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ТФ – транскрипционный фактор

ЦК – цитокинины

CLE – CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related

NLP – NIN-like protein

NRE – nitrate-responsive element

NRT – nitrate transporter

TAC – tuber activation complex

WOX – WUSCHEL-RELATED HOMEBOX

Y1H – Yeast One-Hybrid Assay (дрожжевая одногибридная система)

1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клубнеобразование у картофеля

Клубнеобразование представляет собой процесс, имеющий место у растений различных порядков, таких как *Brassicales* (настурция клубненосная), *Oxalidales* (кислица клубненосная), *Asterales* (топинамбур), *Caryophyllales* (улюко), *Poales* (чуфа) и *Solanales* (картофель). При благоприятных условиях эти растения образуют специализированные запасающие органы, называемые клубнями.

Лучше всего изучено развитие клубня у картофеля (*S. tuberosum*). Клубни картофеля являются модифицированными подземными побегами, ось которых укорочена и сильно утолщена, а ткани заполнены крахмалом. В норме клубни образуются под землей на столонах. Столоны образуются из почек стебля и представляют собой побеги, но, в отличие от обычных побегов, столоны растут диагеотропически, имеют мелкие листья, а их кончики загнуты в крючок. В пазухах листьев столонов находятся спящие почки, которые у клубня называются глазками. Длина и количество столонов, а также их ветвление варьируют у разных генотипов картофеля и в зависимости от условий произрастания. После индукции клубнеобразования рост столонов в длину прекращается, и происходит субапикальное утолщение кончика столона, поскольку начинают делиться клетки коры и сердцевин. В это же время в столоне начинается накопление крахмала. Как только клубни достигают размера ~0,8 см, начинаются интенсивные клеточные деления в перимедуллярной зоне, которые продолжаются до тех пор, пока клубни не достигнут конечного размера (Xu et al. 1998). В итоге перимедуллярная зона составляет большую часть зрелого клубня и состоит из запасающих паренхимных клеток и проводящих тканей. Клубни картофеля запасают большое количество крахмала, содержат мало жира и столько же белка, сколько и у злаков, но с более сбалансированным составом незаменимых аминокислот (АК). Помимо этого, в клубнях содержится большое количество витамина С. В связи с высокой пищевой ценностью, а также с легкостью в выращивании, картофель стал четвертой по значимости сельскохозяйственной культурой, урожай которой по всему миру достигает в среднем 300 миллионов тонн в год.

В целом, анатомия клубня соответствует анатомии стебля: клубень включает в себя кору, внешнюю флоэму, камбий, ксилему, внутреннюю флоэму, запасающую паренхиму и сердцевину. В отличие от стебля, клубень содержит перидерму, большое количество паренхимных клеток и малое количество механических тканей – паренхимные клетки ксилемы не одревесневают, лубяные волокна также отсутствуют (Ефремов, 1958). Таким образом, можно выделить пять зон зрелого клубня: перидерма, кора, проводящий цилиндр, перимедуллярная

зона и сердцевина (Hayward, 1938). В утолщении клубня у картофеля камбий не принимает значимого участия: в клубне не формируется непрерывное кольцо камбия, а есть только прерывистые участки, формирующие небольшое количество проводящих элементов.

Наибольший вклад в утолщение клубня вносят деления клеток перимедуллярной зоны (Cutter, 1992). Перимедуллярная зона представляет собой внешнюю часть сердцевины, которая состоит из нескольких слоев более мелких, толстостенных и плотно расположенных клеток, чем клетки остальной сердцевины. Клетки перимедуллярной зоны долго сохраняют свою жизнедеятельность и выполняют функцию запасания питательных веществ: эта зона выражена в стеблях ряда многолетних растений, в особенности в древесных стволах. Однако, первой тканью, начинающей деления и осуществляющая утолщение столона, является сердцевина. Клетки сердцевины содержат меньшее количество крахмала, чем окружающие ее клетки перимедуллярной зоны, и на их фоне сердцевина выглядит более прозрачной (Hayward, 1938). Далее начинаются активные деления клеток в коре, перимедуллярной зоне и проводящем цилиндре (Hayward, 1938), в результате чего образуется зрелый клубень. Чтобы успешно запастись ассимилятами, идущие из листьев, в образующейся толще клеток клубня формируются дополнительные тяжи флоэмы. С развитием флоэмы также связано другое событие в жизни клубня картофеля – прорастание. Было обнаружено, что в период покоя флоэма почек клубня симпластически изолирована от флоэмы остальной части клубня и их соединение происходит при прорастании клубня (Viola et al., 2007).

Свет, температура и питательные вещества являются главными лимитирующими факторами, влияющих на рост растений, в том числе и картофеля. У картофеля короткий день (КД), низкие температуры и низкое содержание азота стимулируют клубнеобразование, в то время как длинный день (ДД), высокие температуры, а также внесение азотных удобрений подавляют образование клубней. Ниже мы рассмотрим влияние некоторых факторов на клубнеобразование у картофеля.

1.1.1. Фотопериодическая регуляция клубнеобразования у картофеля

Среди вышеперечисленных условий наиболее изученным является длина дня (или, если точнее, длина ночи) из-за наибольшего влияния на клубнеобразование. КД индуцирует клубнеобразование, хотя имеет место значительный разброс в степени его влияния на инициацию клубней для разных видов картофеля. Ранние сорта культурного картофеля не чувствительны к фотопериоду. Однако дикие виды, такие как *Solanum demissum* Lindl., не могут образовывать клубни при ДД (16 часов) (Ewing, Struik, 1992).

Роль флориген-подобных белков в регуляции клубнеобразования у картофеля

На картофеле было проведено большое количество исследований, посвященных поиску регуляторов клубнеобразования в ответ на КД. Так, стало известно, что некоторые регуляторы фотопериодического контроля цветения регулируют и фотопериодизм клубнеобразования (Рис. 1). Эксперименты по прививкам табака на картофель показали, что цветение и клубнеобразование регулируются сходными сигналами, которые возникают в листьях в ответ на благоприятную длину дня. В частности, флориген, который является мобильным сигналом цветения, также функционирует как индуктор клубнеобразования, тубериген (Чайлахян, 1984).

Основные гены, ответственные за фотопериодическую регуляцию развития (в основном – за контроль цветения в зависимости от длины дня), были выявлены при анализе мутантов резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* L. с нарушением сроков зацветания, а затем идентифицированы и у других видов покрытосеменных. Центральным регулятором развития в зависимости от фотопериода является ген *CONSTANS* (*CO*), который кодирует ТФ с доменом «цинковые пальцы». Ген *CO* экспрессируется в проводящих тканях листа, и уровень его экспрессии зависит от циркадных часов, изменяясь в течение суток: в начале дня уровень экспрессии *CO* минимален, затем он нарастает и достигает максимума к вечеру, после чего снова снижается. Экспрессия гена *CO* в течение дня регулируется с участием белка FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1 (*FKF1*), участвующего в рецепции синего света, и ядерного белка GIGANTEA (*GI*). Белки *FKF1* и *GI* формируют комплекс, опосредующий убиквитинирование и деградацию репрессора транскрипции гена *CO* – белка CYCLING DOF FACTOR 1 (*CDF1*) и, как следствие, повышение уровня экспрессии гена *CO* к вечеру (Putterill et al., 1995). Экспрессия генов *FKF1* и *GI* регулируется циркадными ритмами, накопление их продуктов наблюдается в вечернее время. Домен LOV (Light, Oxygen, or Voltage) белка *FKF1* способен поглощать синий свет, и предполагается, что активация этого домена под действием синего света стимулирует образование комплекса *FKF1-GI* и его связывание с транскрипционным репрессором *CDF1* (Imaizumi et al., 2005).

ТФ *CO* *A. thaliana* напрямую активирует экспрессию гена *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), кодирующего белок размером около 20 кДа, относящийся к семейству PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) и выполняющий функции флоригена (Kardailsky et al. 1999, Kobayashi et al. 1999). Флориген является универсальным мобильным сигналом, который образуется в листьях в ответ на изменение фотопериода (Чайлахян, 1984). Белок *FT* у резуховидки и его гомолог у риса, Heading date 3a (*Hd3a*), были идентифицированы как флоригены (Corbesier et al. 2007, Tamaki et al. 2007). Белки *FT/Hd3a* образуются в листьях после

индуцирующего действия изменения длины дня, после чего перемещаются в апикальную меристему побега (ПАМ), где активируют программу цветения (Corbesier et al. 2007, Jaeger и Wigge 2007, Mathieu et al. 2007, Tamaki et al. 2007). Как только FT попадает в ПАМ, он взаимодействует с ТФ семейства bZIP FD (FLOWERING LOCUS D), причем посредниками их взаимодействия являются белки-адапторы семейства 14-3-3, которые в данном случае выполняют роль рецепторов флоригена (Таока et al. 2011). Флориген риса Hd3a взаимодействует с белками 14-3-3 в цитоплазме и, после транспортировки в ядро, комплекс Hd3a/14-3-3 взаимодействует с ТФ OsFD1, образуя флориген-активирующий комплекс (Florigen Activating Complex, FAC), который активирует экспрессию гена *API* (*APETALA1*), ключевого регулятора развития цветка (Таока et al. 2011).

У картофеля есть четыре FT-подобных белка: SELF-PRUNING 3D (StSP3D), StSP6A, StSP5G и StSP5G-like. РНК-интерференция гена *StSP3D* не влияла на клубнеобразование ни при КД, ни при ДД, но задерживала цветение картофеля (Navarro et al. 2011), - таким образом, StSP3D является флоригеном картофеля, регулятором его цветения.

В свою очередь, StSP6A функционирует как тубериген (Navarro et al. 2011). Ген *StSP6A* экспрессируется в листьях при индуктивном для клубнеобразования КД (Navarro et al. 2011). Клубнеобразование задерживается при РНК-интерференции *StSP6A* и индуцируется при сверхэкспрессии *StSP6A* (Navarro et al. 2011). Так же, как и у риса, StSP6A и StFDL1a/b (FD-like) взаимодействуют с St14-3-3s *in vitro* и *in vivo* (в кончике столона), при этом St14-3-3 является необходимым для StSP6A-зависимой индукции клубнеобразования. Взаимодействуя, эти белки образуют комплекс, названный tuber activation complex (TAC) (Teo et al., 2017). Следует отметить, что экспрессия гена *StSP6A* подавляется ТФ CO: при снижении уровня экспрессии CO картофель образует клубни и при ДД, при этом экспрессия *StSP6A* возрастает, что говорит о наличии негативной регуляции экспрессии *StSP6A* со стороны CO. В то же время, сверхэкспрессия CO приводит к задержке клубнеобразования при индуктивном КД (Teo et al., 2017).

Было показано, что рецептор красного света, phyB, вовлечен в фотопериодический контроль развития клубней и, так же, как и в регуляции цветения, выступает как репрессор ответа. Растения с РНК-интерференцией гена *PHYB* способны образовывать клубни как при длинном, неиндуктивном, дне, так и на индуктивном КД (Jackson et al., 1998). При этом прививка такого растения на дикий тип также приводила к клубнеобразованию при ДД, что означает наличие передаваемого сигнала, который регулируется phyB (Jackson et al., 1998). Оказалось, что ТФ StCOL1/2 (*CONSTANS*-like), при ДД стабилизируется phyB и активирует экспрессию

генов *StSP5G* и *StSP5G-like*, также кодирующих флориген-подобные белки картофеля (Abelenda et al., 2016). Сайленсинг генов *StSP5G* или *StCOL* приводит к активации экспрессии гена *StSP6A*. Было предположено, что *StSP5G* ингибирует клубнеобразование при ДД благодаря подавлению экспрессии *StSP6A* (Abelenda et al., 2016).

Таким образом, у картофеля произошло разделение функций FT-подобных белков: *StSP3D* выполняет функцию флоригена, но его регуляция с помощью фотопериода пока что плохо изучена; *StSP6A* является туберигеном и образуется при КД, *StSP5G* и *StSP5G-like* являются антитуберигенами, так как подавляют экспрессию *StSP6A* при ДД.

Одомашнивание картофеля привело к появлению сортов с различными реакциями на длину дня, более того, у некоторых сортов формирование клубней нечувствительно к фотопериоду. Оказалось, что появление таких форм картофеля связано с появлением дефектных аллелей гена *StCDF1* (Kloosterman et al., 2013). Всего у картофеля обнаружено четыре аллели гена *StCDF1*: *StCDF1.1* (нормальная аллель), *StCDF1.2* (дефектная, в которой произошла вставка предположительно транспозона), *StCDF1.3* и *StCDF1.4* (дефектные, вставки 7 нуклеотидов). В связи с наличием вставок у аллелей *StCDF1.2-1.4* произошел сдвиг рамки считывания, в результате чего белок лишился третьего С-концевого домена в своей структуре. Этот домен отвечает за взаимодействие с другими белками, а точнее с комплексом StFKF1-StGI1, который в норме при связывании с StCDF1 запускал его убиквитинирование и протеасомную деградацию. При отсутствии С-концевого домена комплекс FKF1-GI не может связаться с StCDF1, StCDF1 не отправляется на деградацию, а репрессирует *StCOL1/2*, результатом чего является образование белка StSP6A вне зависимости от длины дня (Kloosterman et al., 2013). Дефектные аллели *StCDF1* не были обнаружены у картофеля, имеющего андийское происхождение (короткодневный картофель), но появляются с 1810 года в Европе - этот период связан с первыми интродукциями в Европу чилийских аборигенных сортов. Однако эти аллели не были обнаружены в чилийских видах того времени, в связи с чем можно предположить, что мутации возникли *de novo* в Европе и были “зафиксированы”, так как имели селекционное преимущество. Отсутствие адаптивных вставок в ген *StCDF1* у европейского картофеля 1650-1750 годов означает, что существуют и другие адаптивные гены, которые пока что не обнаружены (Gutaker et al., 2019).

Роль гомеодомен-содержащих ТФ в регуляции клубнеобразования у картофеля

Помимо StSP6A, мобильным сигналом, который, перемещаясь по флоэме в столон, активирует различные гены, участвующие в клубнеобразовании у картофеля, является транскрипт гена *StBEL5*, гомеобокс-содержащего гена семейства three-amino-acid-loop-extension

(TALE). КД, который является стимулятором клубнеобразования, вызывает экспрессию гена *StBEL5* в листьях и перемещение его транскриптов в кончик столона, усиливая клубнеобразование (Banerjee et al., 2006). В дополнение к экспрессии во флоэме листьев, черешках и корнях, *StBEL5* также экспрессируется в столонах при КД и ДД. Сверхэкспрессия гена *StBEL5* ассоциирована с увеличением биомассы корня, роста и урожая клубней (Banerjee et al., 2006; Lin et al., 2013).

Было показано, что при сайленсинге *CO* происходит увеличение уровня экспрессии *StBEL5*, а при сверхэкспрессии *CO* уровень экспрессии *StBEL5* падает (Abelenda et al., 2011). Следовательно, ТФ *CO* негативно регулирует как *StSP6A*, так и *StBEL5*, таким образом ингибируя клубнеобразование.

Известно, что у растений ТФ семейства BEL физически взаимодействуют с гомеодомен-содержащими ТФ Knotted1-like (KNOX) для контроля различных аспектов роста и развития растений (Müller et al., 2001; Smith and Hake, 2003; Rutjens et al., 2009; Hamant and Pautot, 2010). *StBEL5* также взаимодействует с ТФ семейства KNOX картофеля, - POTATO HOMEBOX 1 (POTH1). Было показано, что мРНК *POTH1* также мобильна и перемещается из листьев в столоны по флоэме (Mahajan et al., 2012), а сверхэкспрессия этого гена ведет к раннему образованию клубней в условиях *in vitro* (Rosin et al., 2003). Также у картофеля были выявлены РНК-связывающие белки (RNA-binding proteins (RBPs)), названные StPTB1 и StPTB6, которые обеспечивают движение по флоэме, а также стабильность мРНК *StBEL5* и *POTH1* (Mahajan et al., 2012; Cho et al., 2015).

Был выявлен ряд мишеней гетеродимера *StBEL5/POTH1* при клубнеобразовании. В субапикальной зоне столона *StBEL5/POTH1* связывается с промотором гена *GA20 OXIDASE 1* (*GA20ox1*), регулирующего образование активных форм гиббереллинов, через тандемный мотив TGAC и ингибирует его транскрипцию (Chen et al., 2004). Это приводит к снижению уровня гиббереллина в столоне, что является предпосылкой инициации клубня. Также BEL5 может принимать участие в регуляции экспрессии генов биосинтеза индолилуксусной кислоты (ИУК) (*YUCCA1a*) и ЦК (*IPT*) (Lin et al., 2013), которые также являются активными участниками развития клубня у картофеля. Помимо этого, в регуляторных участках генов *StSP6A* и *StCDF1* (см. выше) также обнаружены мотивы TGAC для связывания ТФ BEL, и было показано, что *StBEL5* может позитивно регулировать экспрессию этих генов (Sharma et al. 2016; Kondhare et al., 2019).

Роль микроРНК в регуляции клубнеобразования у картофеля

К числу регуляторов клубнеобразования также относятся микроРНК: miR156, miR172 и

SES. МикроРНК связываются со своей мишенью - мРНК какого-либо регуляторного гена - по принципу комплементарности и могут репрессировать трансляцию и индуцировать деградацию транскрипта-мишени. Таким образом, микроРНК вовлечены в регуляцию большого количества сигнальных путей, в том числе и в развитие клубней.

Так, miR156 накапливается в столонах при КД, и ее сверхэкспрессия приводит к образованию клубней в надземной части растения картофеля (Bhogale et al., 2014). При сверхэкспрессии *miR156* в пазушных почках происходит снижение экспрессии генов, вовлеченных в сигналинг ИУК, брассиностероидов и стриголактонов и повышается уровень экспрессии генов, участвующих в транспорте или сигналинге ЦК, что ведет к подавлению апикального доминирования и росту столонов в пазухах листьев. В то же время miR156 подавляет образование клубней под землей, негативно влияя на экспрессию *miR172*, *StBEL5*, *StSP6A* и позитивно – на экспрессию *StCO* и *StSP5G* (Kumar et al., 2020).

В свою очередь, miR172 тоже регулирует экспрессию *StBEL5*, но является его позитивным регулятором (Martin et al., 2009). Так, при сверхэкспрессии *miR172* картофель образовывал клубни и при неиндуктивном ДД, но непосредственные мишени этой микроРНК все еще не выявлены.

Ген *suppressing expression of SP6A (SES)* кодирует предшественник микроРНК, мишенью которой является ген *StSP6A* (Lehretz et al., 2019). Эта микроРНК играет основную роль в температурозависимом контроле клубнеобразования. Сигналом о конце лета, наряду со снижением длины дня, также является понижение температуры, особенно в ночной период. Так, индукции клубней способствует температура ночью ниже 20°C и днем ниже 30°C (Ewing, 1995). Оказалось, что повышение температуры (29°C днем и 27°C ночью) вызывают снижение экспрессии гена *StSP6A*, кодирующего позитивный регулятор клубнеобразования (см. выше), в то время как экспрессия *SES* возрастает.

Таким образом, на данный момент выявлены два главных пути, регулирующих формирование клубня – через комплекс StBEL5/StKNOX (Hannapel et al., 2017) и через комплекс TAC, состоящий из StSP6A, StFDL1 и St14-3-3 (Teo et al., 2017) (Рис. 1). Кроме того, транскрипты генов, действующих в этих путях, являются мишенями микроРНК.

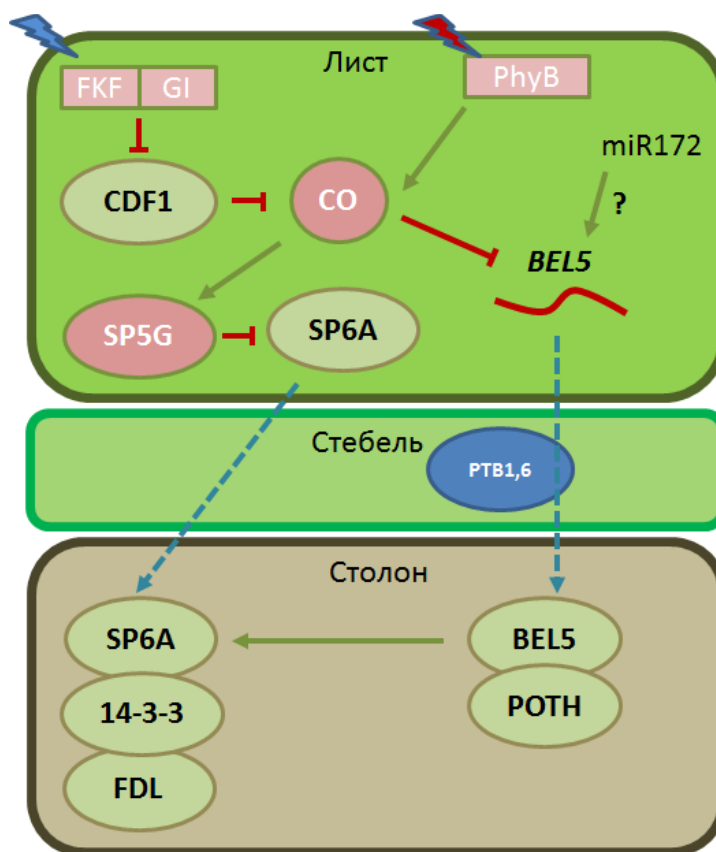


Рис. 1. Регуляторы клубнеобразования у картофеля. PhyB, рецептор красного света, стабилизирует ТФ CO, который активирует экспрессию гена *StSP5G*, являющийся негативным регулятором экспрессии *SP6A*. Рецептор синего света, FKF, связываясь с GI, отправляет ТФ CDF1 на деградацию, что ведет к образованию CO и подавлению экспрессии гена *SP6A*. В случае отсутствия негативных регуляторов экспрессии *SP6A*, а также благодаря позитивному влиянию ТФ BEL5, происходит транскрипция гена *SP6A*, и белок SP6A по флоэме поступает в столоны. В столонах SP6A взаимодействует с белками 14-3-3 и ТФ FDL, образуя комплекс ТАС (Tuberigene Activating Complex), который регулирует экспрессию генов, вовлеченных в образование клубня. BEL5 транскрибируется в листьях и в виде РНК с помощью белков PTB1,6 по флоэме попадает в столоны, где транслируется и, взаимодействуя с ТФ POTH, регулирует экспрессию генов, ответственных за образование клубня, в том числе *SP6A*.

1.1.2. Азотное питание

Еще одним важным фактором, влияющим на клубнеобразование у картофеля, является азотное питание. Так, удаление азот-содержащих веществ из раствора для гидропоники стимулировало образование клубней, а последующее добавление их в раствор вызывало повторный рост столонов (Ewing, 1995). Азот-зависимая регуляция клубнеобразования могла возникнуть из-за естественных колебаний содержания азота в почве, - к осени его количество

снижается, что может быть сигналом для картофеля образовывать клубни. В то же время, при постоянном росте растений в среде с более высоким содержанием азота (4 мМ, в качестве источника азота использовали NO_3^- и NH_4^+) по сравнению с малым содержанием азота (0,2 мМ) в условиях аэропоники было обнаружено значительное увеличение биомассы растений картофеля и основных ростовых показателей (высота растений, длина листа, ширина листа, сухой вес побегов и сухой вес корней), а также урожайности свежих клубней, общего содержания хлорофилла и азота (Tiwari et al., 2020).

Рост и продуктивность большинства растений, в том числе и картофеля, определяет эффективность всасывания азота корнями. Азот в почве может быть в виде нитратов, АК, белков и других азот-содержащих веществ. В хорошо аэрированных почвах происходит быстрая нитрификация, и поэтому основным источником азота для растений являются нитраты (Crawford and Forde, 2002). Нитраты легко растворяются и поэтому могут быстро перемещаться, в результате чего их концентрация в разных участках почвы может разниться в 100 раз (Lark et al., 2004), и растения должны приспосабливаться к таким условиям для оптимизации поглощения нитратов. Это достигается путем модификаций архитектуры корня, регулированием поглощения и транспорта нитратов, а также оптимизацией их метаболизма (Krapp et al., 2014). Эти процессы запускаются как сигналами из побега (Ruffel et al., 2011), так и непосредственным нитратным сигналингом в корнях (Miller et al., 2007).

У высших растений существует две системы поглощения нитрата из почвы: транспортная система с низкой афинностью (low-affinity transport system (LATS)), которая отвечает за поглощение нитрата при его высокой концентрации (более 1 мМ), и транспортная система с высокой афинностью (high-affinity transport system (HATS)), которая отвечает за поглощение нитрата при концентрациях между 1 мкМ и 1 мМ. Было показано, что белки, кодируемые четырьмя генными семействами, функционируют как нитратные транспортеры у резуховидки: NPF (nitrate transporter 1/peptide transporter family (NRT1/PTR), 53 гена), NRT2 (7 генов), CLC (chloride channels, 7 генов) и SLAC1/SLAH (slow anion channel-associated 1 homologues, 5 генов). Вместе эти 4 семейства содержат 73 гена, но только 35 детально охарактеризованы, и среди них 24 кодируют нитратные транспортеры (Krapp et al., 2014).

Белок NRT1.1 является первым из обнаруженных нитратных транспортеров растений, — он был идентифицирован в 1993 году и относится к большому семейству белков NPF (Tsai et al., 1993). Лишь для 16 из 53 NPF было показано функционирование как транспортеров нитрата. Нитратные транспортеры этого семейства имеют низкую афинность к нитрату за исключением NRT1.1 (NPF6.3), который вовлечен и в HATS, и в LATS. Помимо нитрата, белки NPF могут

транспортировать АК, пептиды, глюкозинолаты, ИУК и абсцизовую кислоту (АБК) (Krapp et al., 2014). Так, NRT1.1 регулирует ветвление корней, транспортируя и нитрат, и ауксин (Krouk et al., 2010). При низких содержаниях нитрата (0,25-0,5 мМ) NRT1.1 приобретает высокое сродство к нему и при этом транспортирует ауксин из примордиев боковых корней, чем тормозит их рост. В результате, корни не ветвятся, происходит активный рост главного корня в поисках обогащенных нитратом участков почвы. И, наоборот, при высоком содержании азота в среде (1-10 мМ нитрата) транспорт ауксина прекращается, что приводит к его накоплению в примordiaх боковых корней и дальнейшему активному ветвлению корней (Gojon et al 2011; Krouk et al., 2010). Транспорт нитрата NRT1.1 работает не только в примordiaх корней, но также в примordiaх листьев и цветков, а также участвует в поглощении нитрата ризодермой и транспорте через кору и эндодерму корня (Guo et al., 2001).

Все члены семейства NRT2 у резуховидки являются высокоаффинными нитратными транспортерами, и для них не были обнаружены иные субстраты, кроме нитрата. Мутация по гену *NRT2.1*, приводит к ветвлению корней при низкой концентрации нитрата (0,1 мМ). Сходный фенотип имеет другой мутант, по гену *NAR2.1*. Оказалось, что небольшие белки NAR2 (Okamoto et al., 2006; Orsel et al., 2006) необходимы для связывания с плазмалеммой всех NRT2 кроме NRT2.7. У резуховидки есть два гена NAR2, но только NAR2.1 является критичным для функционирования двухкомпонентной высокоаффинной системы поглощения нитрата (Orsel et al., 2006), для работы которой формируется комплекс, состоящий из двух субъединиц NRT2.1 и двух субъединиц NAR2.1 (Yong et al., 2010). Экспрессия *NRT2.1* индуцируется низкими концентрациями нитрата, светом и сахарами и репрессируется АК и NH_4^+ . Таким образом, поглощение нитрата корнями регулируется как азотным, так и углеродным статусом растений (Wirth et al., 2007).

У картофеля сверхэкспрессия гена нитратного транспортера, названного *StNPF1.11*, вызывала повышение содержания белка, а также хлорофилла в листьях, но урожайность клубней не изменялась (Klaassen et al., 2020). Также с помощью транскриптомного анализа обнаружены гены картофеля, кодирующие нитратные транспортеры и изменяющие уровень своей экспрессии в условиях низкого содержания азота в среде, однако функции этих генов на данный момент не изучены (Tiwari et al., 2020).

Мастер-регуляторами нитратного сигналинга являются NIN-подобные белки (NIN-like proteins, NLP) (Konoshi and Yanagisawa, 2013). Эти ТФ семейства RWP-RK (названного по консервативному мотиву Arg-Trp-Pro-X-Arg-Lys в своем составе) являются гомологами белков NIN (nodule inception) *Lotus japonicus*, которые вовлечены в ранние этапы азот-регулируемого

симбиоза между ризобиями и бобовыми растениями (Schauser et al., 1999). NLP содержат нитрат-чувствительный домен (nitrate signal-responsive domain) на N-конце, ДНК-связывающий домен типа RWP-RK в середине, и Phox и Bem1 (PB1) домен на C-конце. Нитрат-чувствительный домен отвечает за рецепцию нитрата; ДНК-связывающий домен RWP-RK присоединяется к нитрат-регулируемым цис-элементам (nitrate-responsive cis-elements, NRE) - последовательностям, обнаруженным в регуляторных областях различных генов, экспрессия которых регулируется нитратом (Konishi и Yanagisawa 2013). PB1 домен необходим для белок-белковых взаимодействий NLP друг с другом, а также участвует во взаимодействии NLP с TF TCP20 (teosinte branched1/cycloidea/proliferating cell factor1-20), который тоже является активным участником ответа на нитрат (Guan et al., 2017; Konishi, Yanagisawa, 2019).

NLP7, один из 9 членов семейства NLP у резуховидки, вовлечен в ответ на голодание по азоту – мутант по этому гену демонстрирует конститутивный фенотип, характерный для растений, выращенных при недостаточном азотном питании (размер листьев уменьшен, наблюдается задержка в росте и цветении) (Castaings et al., 2009). Белок NLP7 находится в ядрах многих тканей, вовлеченных в транспорт азота (в корневых волосках, растущих боковых корнях и проводящей системе). Однако голодание по азоту приводит к перемещению NLP7 из ядра в цитозоль. Внесение азота после голодания уже через считанные минуты приводит к обратной транспортировке NLP7 в ядро. При использовании лептомицина В, ингибитора экспорта из ядра, происходило ингибирование транспорта NLP7 в цитозоль при росте на среде, бедной по азоту. Это означает, что азот ингибирует экспорт NLP7 из ядра, что приводит к быстрому накоплению белка в ответ на сигнал (Marchive et al., 2013). Происходит это благодаря фосфорилированию серина 205 на N-конце NLP7 с помощью кальций-зависимых протеинкиназ CPK10/30/32 (Ca²⁺-sensor protein kinases, CPK), которые управляют первичным ответом на нитрат (Liu et al. 2017). С помощью метода ChIP-chip (chromatin immunoprecipitation-chip) было показано, что NLP7 связывается с регуляторными областями 851 гена в ответ на нитрат. Среди них были гены, вовлеченные в метаболизм азота и углерода, а также метаболизм гормонов и их транспорт (Marchive et al., 2013). При изучении авторегуляции клубенькообразования (autoregulation of nodulation, AON) у *Lotus japonicus* было обнаружено, что NLP, названный NITRATE UNRESPONSIVE SYMBIOSIS 1 (NRSYM1), активирует AON благодаря непосредственной регуляции экспрессии генов *CLE-RS2*, кодирующих пептидные гормоны CLE (Nishida et al, 2018).

У картофеля, однако, не были изучены белки NLP, а также их возможные мишени, - в том числе, пептиды CLE, которые могут принимать участие не только в ответ на содержание азота в

среде, но и в других процессах роста и развития.

1.2. Пептидные фитогормоны CLE

Особое место среди фитогормонов занимают регуляторные пептиды или пептидные фитогормоны, которые являются классом малых сигнальных молекул и обеспечивают межклеточное сообщение.

Гены, кодирующие пептидные фитогормоны, содержат сигнальный домен, один или несколько консервативных функциональных доменов и вариабельный домен между ними. Есть несколько классов пептидных гормонов: наиболее распространены малые (5-20 АК) посттрансляционно модифицируемые пептиды (ПТМП), огромную роль в созревании которых играют посттрансляционные модификации и протеолитический процессинг, и более крупные (примерно 50 АК) цистеин-богатые пептиды, у которых процесс созревания сопряжен с образованием дисульфидных мостиков (Ганчева и др., 2019).

Наиболее изученной группой пептидных фитогормонов является семейство пептидов CLE, относящееся к классу ПТМП. Члены этого семейства вовлечены во многие процессы развития растений, регулируя эмбриогенез, поддержание меристем побега и корня, деления клеток камбия, дифференцировку проводящих элементов, ответ на условия окружающей среды, взаимодействие с грибами и бактериями и т.д. (Yamaguchi et al., 2016).

Пептиды CLE выявлены у всех растений, начиная со мхов (Whitewoods et al., 2018). Так, у *Physcomitrella* были выявлены 7 генов *CLE*, мутации в некоторых из них вели к нарушениям роста гаметофора, связанных с регуляцией делений клеток при переходе от 2D-росту (ветвящиеся нитевидные протонемы) к 3D-росту (олиственные побеги (гаметофоры)) (Whitewoods et al., 2018), - то есть уже у мхов пептиды CLE играли ключевую роль в развитии.

На данный момент у модельного объекта генетики растения *A. thaliana* выявлено 32 гена *CLE* (*AtCLE*), кодирующих 27 пептидов (Cock и McCormick, 2001). Большинство этих генов экспрессируются в различных тканях, и каждая ткань растения экспрессирует хотя бы один ген *CLE* (Jun et al, 2010).

Для всех пептидов CLE характерна трансляция в виде белка-предшественника, состоящего из сигнального домена на N-конце, CLE домена на C-конце и вариабельного домена между ними. Основной функциональной частью предшественника является CLE домен, который имеет размер всего 12-13 АК: при созревании пептидов CLE он выщепляется из белка-предшественника, претерпевает модификации (гидроксисилирование и арабинозилирование остатков пролина) и выбрасывается в апопласт, - таким образом, зрелый пептид CLE

представляет собой модифицированный CLE домен (Yamaguchi et al., 2016).

Пептиды CLE являются лигандами для рецепторных киназ с лейцин-богатыми повторами, такими как CLAVATA1 (CLV1), которые расположены на мембранах клеток. Рецепторы пептидов CLE обычно состоят из внеклеточного домена, который осуществляет связывание пептида CLE на консервативные остатки лейцина, трансмембранного домена, заякоривающего эти рецепторы на плазматической мембране, и внутриклеточного домена, представляющего собой серин-треониновую киназу. Эти рецепторы могут функционировать только в виде как минимум димера, а иногда образуют комплексы из большего количества рецепторов (как гомо- так и гетеромультимеры). При связывании пептида CLE происходит перекрестное фосфорилирование киназных доменов рецепторов, что ведет к дальнейшей передаче сигнала, изученной все еще плохо. Однако известно, что одной из основных мишеней сигнального пути, активируемого CLV1-подобными рецепторами, является регуляция экспрессии генов *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX (WOX)*, кодирующих ТФ с гомеодоменом, которые в свою очередь регулируют огромное количество генов (Yamaguchi et al., 2016).

1.2.1. Роль пептидов CLE в развитии апикальных меристем

История изучения пептидов CLE началась с получения трех мутантов, имеющих увеличенную ПАМ в форме булавки и названных *clavata1-3*. Впоследствии оказалось, что мутации возникли в генах, кодирующих сильно отличающиеся белки – *CLV1* и *CLV2* кодируют рецепторные киназы, а *CLV3* - белок примерно в 100 АК. *CLV3* стал первым обнаруженным членом семейства CLE пептидов. Ген, кодирующий *CLV3*, экспрессируется только в меристеме побега или цветка (Fletcher et al, 1999). Созревают две формы пептида *CLV3* - первая состоит из 12 АК с гидроксипролином в 4 и 7 позициях (Kondo et al, 2006), вторая форма *CLV3* арабинозилируется и состоит из 13 АК, с гистидином в 13 позиции (Ohyama et al, 2009). Обе формы одинаково активны (Kim et al, 2017), и обе связываются с внеклеточным доменом рецептора *CLV1* (Ogawa et al, 2008). Наличие пролина в 9 положении и гистидина в 11 положении у *CLV3* коррелирует со стабильностью пептида *in vitro* и, скорее всего, важно для выполнения функций пептида (Hirakawa et al, 2017; Song et al, 2013).

Основной функцией пептида *CLV3* является ограничение экспрессии гена *WUSCHEL (WUS)*, кодирующего ТФ с гомеодоменом. *WUS*, один из 15 генов *WOX* резуховидки, экспрессируется в организующем центре ПАМ (Mayer et al, 1998), где репрессирует процессы дифференцировки клеток (Yadav et al, 2013) и регулирует передачу сигналов других гормонов, включая непосредственное репрессирование генов *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR*

(*ARR*) А типа, которые кодируют негативные регуляторы ответа на ЦК (Leibfried et al, 2005). Также, белок WUS перемещается по плазмодесмам и связывается с промотором гена *CLV3*, позитивно влияя на его экспрессию (Daum et al, 2014). Члены семейства HAIRY MERISTEM (HAM), относящиеся к ТФ с GRAS доменами, взаимодействуют с WUS в организующем центре и действуют как кофакторы в регуляции гомеостаза ПАМ (Zhou et al, 2015). miRNA171 снижает экспрессию *HAM* во внешних слоях ПАМ и, в свою очередь, позитивно регулируется специфичными для эпидермиса ТФ ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1 и PROTODERMAL FACTOR 2, таким образом создавая концентрационный градиент HAM в ПАМ (Han et al, 2020). Активность HAM в организующем центре не позволяет WUS регулировать экспрессию *CLV3* во внутренних слоях ПАМ, позволяя WUS активировать *CLV3* только в клетках, где белки HAM отсутствуют (Zhou et al, 2018). Таким образом, система CLV3-WUS представляет собой динамическую систему с негативной обратной связью, которая регулирует процессы делений клеток в ПАМ.

Рецепцию CLV3 в ПАМ осуществляет комплекс рецепторов. Основной рецептор CLV1 формирует гомодимер, который связывает CLV3 во внутренних клетках меристемы (Ogawa et al, 2008). Помимо него, гетеродимер CLV2 и CORYNE (CRN) также участвует в рецепции CLV3 (Bleckmann et al, 2010; Zhu et al, 2010). При отсутствии CLV1 рецепторные киназы BAM1-3 (BARELY ANY MERISTEM) и RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2) также могут связывать CLV3 (DeYoung et al, 2006, 2008, Shimizu et al, 2015). Корецепторами CLV1, RPK2, CLV2/CRN выступают LRR-RK CLAVATA3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASES (CIKs) (Hu et al, 2018).

Помимо *CLV3*, в ПАМ у резуховидки экспрессируются гены *CLE16*, *CLE17* и *CLE27* (Jun et al, 2010), однако при нормальных условиях их экспрессия не влияет на активность ПАМ, что означает либо их избыточность, либо вовлеченность в регуляцию ПАМ при каких-то определенных условиях (Gregory et al, 2018).

В развитии корней пептиды CLE также принимают непосредственное участие. Более того, все пептиды CLE были разделены на две группы в зависимости от влияния на рост корня: те пептиды, которые вызывают преждевременную терминацию апикальной меристемы корня (КАМ) и в результате приводят к укорочению корня, отнесены к группе А, а те, которые не влияют на развитие корня, - к группе В (Whitford et al, 2008).

Пептид CLE40 является близким гомологом CLV3 и вовлечен в контроль деления и дифференцировки стволовых клеток колумеллы (Hobe et al., 2003; Stahl et al., 2009). Рецепторами пептида CLE40 являются CLV1 и ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4), которые

формируют гомо- и гетеродимерные комплексы (Stahl et al., 2009, 2013; Richards et al., 2015). Предполагается, что CLE40 подавляет экспрессию *WOX5* для регулирования популяции стволовых клеток в КАМ (Richards et al., 2015), однако этот регуляторный путь изучен намного хуже, чем в ПАМ.

Пептид CLE14 тоже регулирует некоторые аспекты развития корня. При нормальных условиях *CLE14* экспрессируется в эпидермисе корня, включая корневой чехлик и корневые волоски (Meng и Feldman, 2010). Обработка пептидом CLE14 вызывала развитие дополнительных корневых волосков благодаря снижению экспрессии гена *GLABRA2* (*GL2*), который кодирует негативный регулятор образования корневых волосков (Hayashi et al, 2018). Помимо этого, экспрессия *CLE14* индуцируется в коре, эндодерме и стеле первичной КАМ при низком содержании фосфатов (Gutierrez-Alanis et al, 2017). Рецепторами CLE14 выступают CLV2/CRN и PEP1 RECEPTOR 2 (PEPR2), а мишенями являются гены *SHORT ROOT* (*SHR*), *SCARECROW* (*SCR*) и *WOX5* - их экспрессия снижается при обработке пептидом CLE14 (Gutierrez-Alanis et al, 2017).

1.2.2. Роль пептидов CLE в развитии проводящей системы

Помимо контроля активности апикальных меристем, пептиды CLE вовлечены в регуляцию роста утолщением, которое осуществляется главным образом за счет делений клеток латеральной меристемы – камбия, клетки которого при периклиналильных делениях дают начало клеткам-предшественницам флоэмы и ксилемы.

У резуховидки регуляторами активности камбия являются гены *CLE41* и *CLE44*, которые экспрессируются в клетках флоэмы и кодируют пептид, названный TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION FACTOR (TDIF) (Ito et al, 2006). Пептид TDIF выходит в апопласт и взаимодействует с рецептором TDIF RECEPTOR (TDR)/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY) на поверхности клеток камбия (Etchells и Turner, 2010; Fisher и Turner, 2007; Hirakawa et al, 2008). Корецептором TDR/PXY выступает белок SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 (SERK1) (Zhang et al., 2016).

Мишенью действия неизученного сигнального пути, индуцируемого пептидами TDIF, является ген *WOX4*, ответственный за пролиферацию камбиальных клеток (Etchells et al, 2013). Помимо этого, при рецепции пептидов CLE41/44 рецептором TDR/PXY происходит высвобождение белка BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) семейства Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), который репрессирует ТФ BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) и приводит к ингибированию дифференцировки клеток камбия в клетки ксилемы (Kondo and

Fukuda, 2015). Также недавно было обнаружено, что путь TDIF–TDR ингибирует активность белка семейства GSK3 BIN2-LIKE 1 (BIL1), который негативно регулирует пролиферацию клеток прокампия через регуляцию ответа на ЦК и ИУК (Han et al, 2018). BIL1 фосфорилирует ИУК-регулируемый ТФ MONOPTEROS (MP), что приводит к ограничению его взаимодействия с транскрипционным репрессором BODENLOS (Schlereth et al, 2010). Это приводит к MP-зависимой активации экспрессии генов, кодирующих негативные регуляторы ЦК сигналинга, *ARR7* и *ARR15*, которые снижают активность камбия. Ингибирование активности BIL1 с помощью TDIF–TDR снижает эффект MP на экспрессию *ARR* и, следовательно, приводит к активации деления клеток камбия (Schlereth et al, 2010).

Помимо регуляции *WOX4*, TDIF–TDR также позитивно регулируют экспрессию гена *WOX14* (Etchells et al, 2013). ТФ WOX14 индуцирует экспрессию гена *TARGET OF MONOPTEROS 6 (TMO6)*, кодирующего ауксин-регулируемый ТФ семейства DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION (DOF). В свою очередь, WOX14 и TMO6 влияют на экспрессию гена *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 4 (LBD4)*, кодирующего ТФ и вовлеченного в развитие проводящих тканей (Smit et al, 2020).

Кроме того, было показано участие некоторых других пептидов CLE в развитии ксилемы. Так, гены *CLE9* и *CLE10* экспрессируются в клетках-предшественниках ксилемы (Jun et al, 2010; Qian et al, 2019). Пептиды CLE9/10, связываясь с рецепторами BAM, подавляют периклинальные деления клеток-предшественниц ксилемы. Также эти пептиды вовлечены в формирование и функционирование клеток устьиц. Рецепторами в этой регуляции выступают рецепторная киназа HAESA-LIKE 1 (HSL1) и корецептор SERK1 (Qian et al, 2019). Связывание лиганда и рецептора приводит к фосфорилированию и дестабилизации ТФ SPEECHLESS (SPCH), который положительно влияет на деления клеток, которые в дальнейшем дифференцируются как замыкающие клетки устьиц (Qian et al, 2019) - таким образом, CLE9/10 выступают негативными регуляторами делений этих клеток. Помимо этого, CLE9 стимулирует закрытие устьиц через АБК-зависимый путь, активируя киназу OPEN STOMATA 1 (OST1) и анионный канал SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 (SLAC1). Также, закрытие устьиц с помощью CLE9/10 ассоциировано с повышением уровней перекиси водорода и оксида азота, а также с активностью протеинкиназ MPK3 и MPK6, которые предположительно работают в АБК-независимом пути (Zhang et al, 2019).

Кроме того, среди пептидов CLE *Arabidopsis* были выявлены регуляторы развития флоэмы - CLE25 и CLE45. CLE45 является негативным регулятором, который ингибирует дифференцировку флоэмы благодаря взаимодействию с рецепторами BAM3 и CLV2/CRN

(Depuydt et al. 2013; Hazak et al. 2017). CLE25 позитивно регулирует дифференцировку ситовидных элементов (СЭ) – мутация в гене *CLE25* приводила к задержке формирования клеток флоэмы, вызывая торможение флоэмного транспорта, в результате чего фотоассимиляты не транспортировались, а накапливались в листьях, что приводило к укорочению корней и снижению биомассы растения. Рецепторами CLE25 в процессе развития флоэмы выступают CLE-RESISTANT RECEPTOR KINASE (CLERK) и CLV2/CRN (Ren et al., 2019). В целом, сигнальный каскад, запускаемый CLE25 через рецепторный комплекс CLERK-CLV2, необходим для инициации флоэмы, а тогда как связывание CLE45 с рецепторным комплексом BAM3-CLV2/CRN негативно влияет на дифференцировку флоэмы. При этом CLE-зависимый контроль развития флоэмы взаимодействует с другими путями регуляции дифференцировки СЭ: так, ТФ BREVIS RADIX играет негативную роль контроле активности комплекса BAM3-CLV2/CRN, в то время как ТФ OCTOPUS позитивно влияет на комплекс CLERK-CLV2 (Ren et al., 2019). Баланс между путями, запускаемыми CLE25 и CLE45, может координировать инициацию и дифференцировку СЭ.

С контролем активности камбия и развитием проводящей системы растения тесно связаны процессы вторичного роста или роста утолщением, которые играют центральную роль в формировании запасующих органов, таких, как корнеплоды и некоторые виды клубней. Ранее нами была изучена роль генов *CLE* в развитии запасующего корня у редиса (*Raphanus sativus*) (Gancheva et al., 2016; Ганчева и др., 2018). Было показано, что экспрессия некоторых генов *CLE*, в частности, *RsCLE41* и *RsCLE19*, повышается при развитии запасующего корня, при этом экспрессия *RsCLE41* была локализована в камбиальной зоне и флоэме, а экспрессия *RsCLE19* – во вторичной ксилеме. Сверхэкспрессия *RsCLE41* или обработка растений пептидом CLE41 приводила к активации камбия, нарушению упорядоченности стелы, подавлению дифференцировки одревесневающих элементов ксилемы и аномальному разрастанию проводящих пучков стебля. Напротив, сверхэкспрессия *RsCLE19* или обработка растений пептидом CLE19 вызывала повышение количества одревесневающих элементов ксилемы. Предполагается, что гены *RsCLE41* и *RsCLE19* принимают участие в формировании запасующего корня ксилемного типа, характерного для редиса.

1.2.3. Роль пептидов CLE в ответе на внешние факторы

Помимо участия в контроле активности меристем, гисто- и органогенезе растений, пептиды CLE играют важнейшую роль в координации развития растений в зависимости от факторов окружающей среды

Недавно было обнаружено, что пептид CLE25 является еще и сигналом, вырабатываемым при дефиците воды, идущим от корней к листьям и вызывающим закрытие устьиц путем регулирования накопления АБК (Takahashi et al., 2018). У мутанта по гену *CLE25* была снижена экспрессия гена *NINE CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3 (NCED3)*, который кодирует ключевой фермент синтеза АБК в листьях в условиях нехватки воды. Рецепторами пептида CLE25 в листьях выступают протеинкиназы BAM: их активность необходима для запуска сигнала о дефиците воды пептидом CLE25. Таким образом, пара CLE25-BAM функционирует как модуль для передачи сигнала из корней в побег при регуляции ответа на нехватку воды (Takahashi et al., 2018).

Также было показано, что экспрессия некоторых генов *CLE* регулируется с помощью азота. Так, у резуховидки при 30 минутах обработки нитратом после голодания по азоту возрастал уровень экспрессии *CLE2*, в то время как экспрессия *CLE1*, *CLE4* и *CLE7* после 3 часов нехватки азота снижалась (de Bang et al., 2017). Пептиды CLE1 - CLE7 у резуховидки участвуют в регуляции образования боковых корней: так, сверхэкспрессия *CLE3* ингибирует развитие боковых корней (Araya et al., 2014).

Однако лучше всего изучено участие пептидов CLE этой группы в регуляции клубенькообразования у бобовых растений в зависимости от содержания азота в среде. Так как при наличии азота растения не образуют клубеньки, то возник вопрос, как же регулируется этот процесс. Оказалось, что в присутствии азота начинается экспрессия определенных генов *CLE*, далее пептиды CLE транспортируются в листья по ксилеме, где взаимодействуют со своими рецепторами, что запускает сигнал, идущий обратно в корень и блокирующий образование клубеньков (Okamoto et al., 2016).

У лядвенца было показано, что активация нитрат-регулируемых *CLE*, в частности *LjCLE-RS2*, осуществляется с участием транскрипционного фактора NRSYM1 (NITRATE UNRESPONSIVE SYMBIOSIS 1), относящегося к семейству NLP. Мутант *nrsym1* способен образовывать клубеньки при высоких концентрациях нитрата (Nishida et al., 2018). В результате нитратной обработки и инокуляции уровень экспрессии *NRSYM1* не меняется, что может свидетельствовать о наличии посттрансляционных модификаций, которые NRSYM1 претерпевает в результате обработки растения нитратом (Nishida et al., 2018).

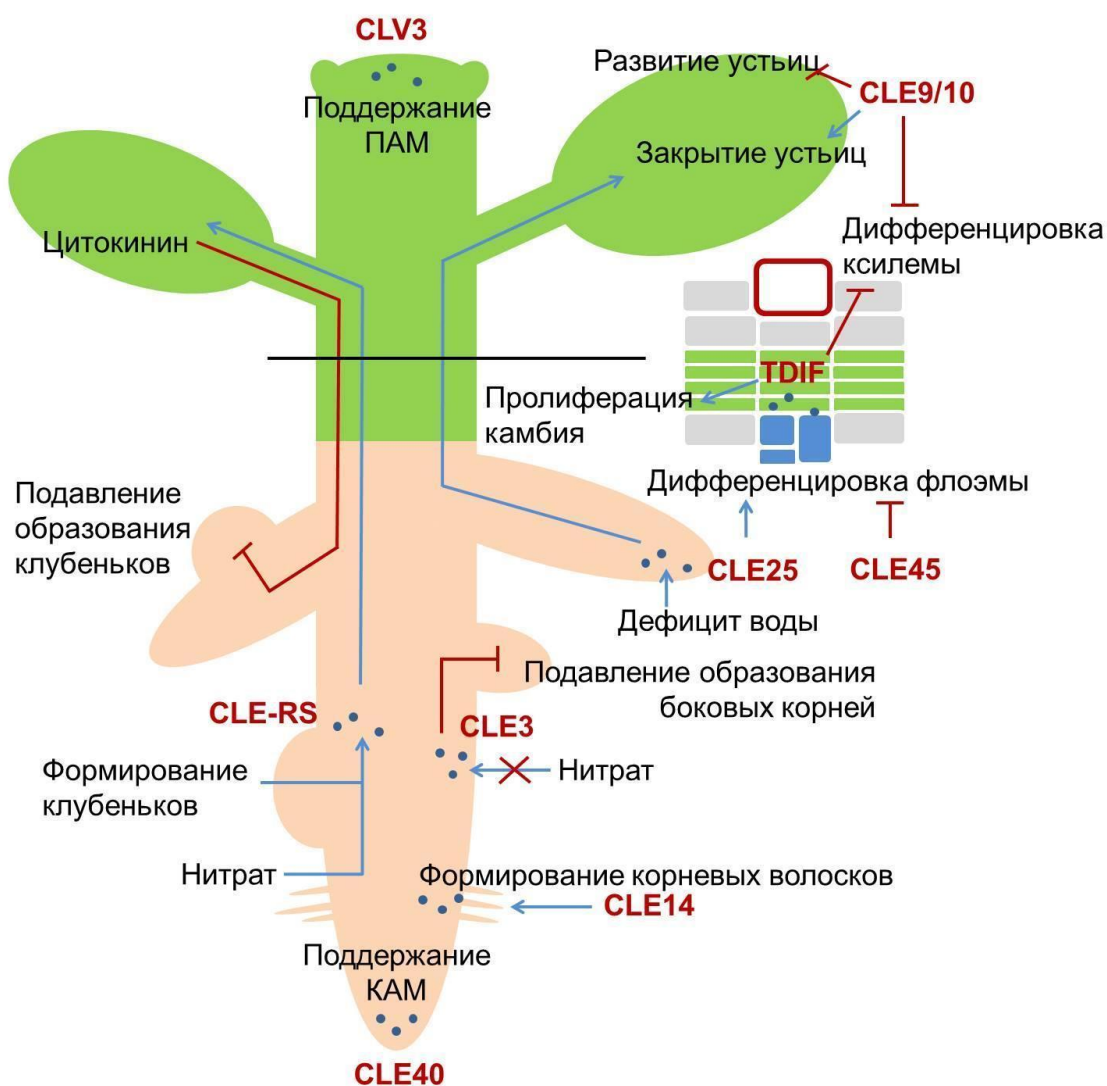


Рис.2. Некоторые функции пептидов CLE в развитии растений. Пептиды CLV3 и CLE40 участвуют в поддержании ПАМ и КАМ, соответственно. CLE14 вовлечен в формирование корневых волосков. У бобовых, в присутствии азота и при образовании азотфиксирующих клубеньков экспрессируются гены *CLE-RS*, после чего пептиды поступают по ксилеме в листья, где индуцируют образование ЦК, который подавляет дальнейшее образование клубеньков. В случае отсутствия нитрата, образуется пептид CLE3, который локально подавляет образование боковых корней. При нехватке воды начинается экспрессия гена *CLE25*, пептид CLE25 поступает по ксилеме в листья и вызывает закрытие устьиц. Также, пептид CLE25 вовлечен в дифференцировку флоэмы, в судьбе которой принимает еще один пептид CLE, CLE45. Закрытие устьиц, а также их образование, контролируют пептиды CLE9/10.

Таким образом, пептиды CLE регулируют развитие различных тканей растения, а также участвуют в передаче сигналов окружающей среды (Рис. 2). Однако, несмотря на их важность

для растений и их активное исследование, пептиды CLE все еще не изучены у целого ряда растений.

У объекта нашего исследования - картофеля *S. tuberosum* - Goad с соавторами (2016) идентифицировали 24 гена, предположительно кодирующих пептиды CLE, но последовательности этих генов не были охарактеризованы, и их функции в развитии не изучались. Для картофеля характерно образование клубней - процесс, в котором пептиды CLE могут принимать активное участие - однако, ранее их функция в этом процессе не была исследована. Образование клубней сопряжено с процессами вторичного утолщения подземного модифицированного побега (столона), этот процесс контролируется целым рядом средовых факторов, в том числе – доступностью азотного питания (см. выше). В связи с этим, наше исследование направлено на выявление пептидов CLE, регулирующих инициацию клубнеобразования в зависимости от средовых факторов (доступность азотного питания и воды), а также утолщение клубня картофеля.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал и условия выращивания растений

В исследовании был использован картофель *Solanum tuberosum* L. сорта Дезире, любезно предоставленный Всероссийским институтом генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова. Клубни данного сорта употребляются в пищу, урожайность клубней высокая, кожура клубней красная, а мякоть – светло-желтая. Сорт среднеспелый, с периодом созревания около 90 дней. Сорт Дезире часто используется в исследованиях картофеля, так как его легко трансформировать (Van Eck 2017).

В условиях *in vitro* растения картофеля выращивали на среде Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige and Skoog, 1962) с 10 г/л сахарозы (Таблица 1) при температуре 23°C и фотпериоде 16 часов день/ 8 часов ночь. Для индукции клубнеобразования двухузловые черенки картофеля высаживали на среду Мурасиге-Скуга (MS) с 80 г/л сахарозы и содержали в темноте.

Для изучения влияния азота на экспрессию генов *CLE* в условиях *in vitro* использовали модифицированную среду Мурасиге-Скуга, описанную в статье Ohkubo et al., 2017, где в качестве источника азота использовали 10мМ KNO₃ и NH₄Cl; в среде без азота вместо них использовали 10 мМ KCl, концентрации всех остальных элементов были снижены вдвое (Таблица 1). Такими же средами, но без сахарозы и агара поливали растения, высаженные в вермикулит, в эксперименте по оценке влияния содержания азота на клубнеобразование.

В эксперименте по изучению влияния нехватки воды на экспрессию генов *CLE* в корнях растения картофеля, выращенные в условиях *in vitro*, аккуратно извлекали из среды, промывали дистиллированной водой и на сутки оставляли в дистиллированной воде. Далее часть растений извлекали из воды на 4 часа (после 4 часов у них начинали проявляться признаки увядания).

Таблица 1. Компоненты среды MS (pH 5,6).

Компоненты		Среда MS (1 л)	Модифици- рованная среда MS с азотом (1 л)	Модифици- рованная среда MS без азота (1 л)
Макросоли	KNO ₃	1,9 г	1 г	-
	NH ₄ NO ₃	1,65 г	-	-
	NH ₄ Cl	-	0,8 г	-

	KCl	-	-	0,75
	CaCl ₂	0,332 г	0,166 г	0,166 г
	MgSO ₄ x7H ₂ O	0,37 г	0,185 г	0,185 г
	KH ₂ PO ₄	0,17 г	0,085 г	0,085 г
Микросоли	H ₃ BO ₃	6,2 мг	3,1 мг	3,1 мг
	MnSO ₄ x4H ₂ O	22,3 мг	11,15 мг	11,15 мг
	ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6 мг	4,3 мг	4,3 мг
	CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025 мг	0,0125 мг	0,0125 мг
	CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025 мг	0,0125 мг	0,0125 мг
	KJ	0,83 мг	0,415 мг	0,415 мг
	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25 мг	0,125 мг	0,125 мг
Fe-хелат	FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8 мг	13,9 мг	13,9 мг
	Na ₂ EDTAx2H ₂ O	37,8 мг	18,9 мг	18,9 мг
Витамины	Никотиновая кислота	0,5 мг	0,25 мг	0,25 мг
	Пиродоксин	0,5 мг	0,25 мг	0,25 мг
	Тиамин	0,5 мг	0,25 мг	0,25 мг
Другое	Мезоинозит	0,1 г	0,05 г	0,05 г
	Сахароза	10 г	5 г	5 г
	Агар	8 г	8 г	8 г

2.2. Поиск генов *CLE* у картофеля, анализ последовательностей генов *CLE* и филогенетический анализ пептидов *CLE*

Поиск генов *CLE* производился в геномных сборках разных видов картофеля:

культурных видов *S. tuberosum* group *Phureja* (GCA_009849755.1), *S. curtilobum* Juz. et Buk. (GCA_009849645.1), *S. juzepczukii* Juz. et Buk. (GCA_009849685.1), *S. ajanhuiri* Juz. et Buk. (GCA_009849805.1), и диких видов *S. bukasovii* Juz. et Rybin. (GCA_009849815.1), *S. verrucosum* Schltdl. (GCA_900185145.1), *S. commersonii* Dunal. (GCA_001239805.1) с использованием алгоритмов BLASTP, BLASTN и TBLASTN баз данных SpudDB (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>) и NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по нуклеотидным и АК последовательностям генов и белков CLE *A. thaliana* и *S. lycopersicum*. Филогенетические деревья были построены на основании выравнивания АК последовательностей белков CLE резуховидки, томата и картофеля с помощью алгоритма Muscle из программы MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar et al., 2016) методом ближайшего соседа (Saitou и Nei, 1987) со стандартными настройками и бутстрепом 1000 (Felsenstein, 1985). Для визуализации 12 АК доменов CLE была использована программа MEME (<http://meme-suite.org/>). Анализ последовательностей ДНК осуществляли с помощью программ ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/appe/>), Vector NTI 10 (Thermo Scientific), SnapGENE (<https://www.snapgene.com/>), UGENE (<http://ugene.net/ru/>) и MEGA7. Расположение генов *StCLE* на хромосомах картофеля было визуализировано с помощью программы MapInspect (<http://www.softsea.com/download/MapInspect.html>).

2.3. Анализ данных секвенирования РНК

Для оценки накопления транскриптов генов *StCLE* в разных органах растений картофеля использовались данные секвенирования РНК картофеля *S. tuberosum* group *Phureja*, полученные из проекта NCBI PRJEB2430. Контроль качества ридов осуществляли в программе FASTQC (v. 0.11.5) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Для фильтрации ридов от последовательностей митохондриальной, плазмидной и рибосомальной ДНК и технических последовательностей использовали программу bbdut из набора программ bbtools (v. 37.23) (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>). Значения TPM (transcripts per million) для генов *StCLEs* для различных тканей были посчитаны с помощью алгоритма kallisto (Bray et al., 2016). В качестве референса использовалась сборка транскриптома картофеля *S. tuberosum* group *Phureja* DM_1-3_516_R44 v6.1 из базы данных SpudDB (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu>). Для построения тепловой карты экспрессии генов картофеля использовали функцию heatmap.2 из пакета R.

2.4. Выделение РНК и получение кДНК

Для выделения тотальной РНК из тканей картофеля растительный материал растирали

пестиком в ступке в жидком азоте, после чего проводили экстракцию РНК с помощью реагента Trizol (Invitrogen), очистку хлороформом и перереосаждение изопропанолом. Осадок РНК трижды промывали холодным 80% этиловым спиртом и высушивали в ламинаре на льду. ДНКазную обработку РНК проводили с помощью набора RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific) по протоколу производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Scientific) и в соответствии с показаниями прибора рассчитывали необходимое количество РНК для постановки обратной транскрипции (в каждой пробе использовали 300 нг РНК). Для постановки обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) по протоколу производителя.

2.5. Выделение ДНК

ДНК из растений картофеля для дальнейшей амплификации с целью клонирования генов выделяли с помощью цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) (Murray, Thompson, 1980).

Для генотипирования трансгенных растений применяли упрощенный метод выделения ДНК: в микропробирке растирали растительный материал пестиком, добавляли 500 мкл буфера для экстракции (200mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS), смешивали переворачиванием 5 минут и центрифугировали при 12000 об/мин 5 минут. 300 мкл супернатанта отбирали в новую микропробирку, добавляли 300 мкл изопропанола и инкубировали при комнатной температуре 10 минут с последующим центрифугированием 10 минут на 12000 об/мин. Осадок ДНК промывали 70% этанолом и высушивали под током воздуха в ламинаре, затем растворяли в 30 мкл воды.

2.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Праймеры для амплификации генов картофеля были подобраны с использованием программы Vector NTI (Invitrogen). Последовательности праймеров приведены в приложениях 3 и 4. Реакции ПЦР для генотипирования растений и проверки наличия вставки в вектор проводили с Taq-полимеразой (Евроген) по инструкции производителя. Для амплификации генов, предназначенных для конструирования векторов, вместо Taq-полимеразы использовали высокоточную полимеразу Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) с использованием протокола производителя.

Для визуализации результатов ПЦР использовали электрофорез в 1% агарозном геле. В гель добавляли 0,1% интеркалирующий краситель - бромистый этидий или SYBR Safe (Invitrogen) для визуализации ДНК. В каждую лунку наносили 4-20 мкл ПЦР-смеси и 3 мкл 4X

буфера для нанесения проб (Евроген). Для определения размера ПЦР-фрагментов в первую лунку наносили маркер длин ДНК 100+ или 1kb (Евроген). Целевой фрагмент выделяли из геля с помощью набора реактивов и колонок Cleanup Mini (Евроген) по прилагаемому протоколу.

2.7. ПЦР в реальном времени

Количественную оценку уровней экспрессии генов производили с помощью метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), который позволяет оценить относительный уровень экспрессии изучаемого гена по отношению к уровню экспрессии референсного гена. В качестве референсного гена был выбран ген убиквитина, который характеризуется стабильным уровнем экспрессии в разных тканях растений (Czechowski et al., 2005). В работе был использован набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя Eva Green (Синтол). Были использованы следующие условия ПЦР: 1 цикл - 10 сек при 94°C; 45 циклов - 15 сек при 94°C, 30 сек при 52°C и 30 сек при 72°C, затем поэтапное повышение температуры от 72°C до 95°C с шагом 5 сек по 0,5°C. Последовательности праймеров приведены в приложении 3. Реакции ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad); данные по расчету пороговых циклов (Ct) были получены с помощью программы CFX-Manager (BioRad), входящей в стандартное программное обеспечение прибора.

Оценку экспрессии генов для каждой пробы проводили в трех аналитических повторностях, данные по которым затем усредняли. Обработку результатов проводили с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Данные количественной оценки экспрессии генов представляли в относительных единицах, рассчитанных при сравнении с уровнями экспрессии референсного гена убиквитина. Каждый эксперимент проводили как минимум в трех биологических повторностях, в каждой повторности 3-4 растения. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе R (<http://www.r-project.org/>).

2.8. Конструирование векторов

Для клонирования последовательностей ДНК использовали систему Gateway (Invitrogen, США). ПЦР-фрагменты, полученные при амплификации геномной ДНК картофеля с праймерами, перечисленными в приложении 4, встраивали в вектора ввода с помощью смеси вирусных рекомбиназ BP-клоназы (Invitrogen) с дальнейшим переклонированием в вектора назначения с помощью смеси вирусных рекомбиназ LR-клоназы (Invitrogen). Постановку BP- и LR-клонажных реакций проводили по протоколу производителя.

Для получения векторов для сверхэкспрессии, кодирующие последовательности генов клонировали в вектор ввода pDONR221, после чего переклонировали в вектора назначения, содержащие промотор 35S вируса мозаики цветной капусты - pK7WG2D (для получения полностью трансгенных растений) или pB7WG2D (для получения растений с трансгенными корнями).

Для дрожжевой одногибридной системы промоторные области генов были клонированы в вектор ввода pDONR207 с дальнейшим переклонированием в вектор pHisLeu, содержащим маркеры для селекции по гистидину и лейцину; кодирующие последовательности генов транскрипционных факторов были клонированы в вектор pDONR207 и затем переклонированы в вектор pDEST22, содержащим маркер для селекции по триптофану, с активаторным доменом, который необходим для активации экспрессии репортерного гена. Вектора были любезно предоставлены профессором Hilary Rogers из университета Кардиффа.

Для изучения активности промоторов генов, вовлеченных в ответ на содержание азота в среде, промоторные области генов были клонированы в вектор pDONR221, а затем переклонированы в pBGWFS7, содержащий репортерный ген *GUS*.

Для изучения активности промоторов генов, предположительно вовлеченных в утолщение клубня, их промоторные области были клонированы в вектор pDONRP4-1R. Далее проводили мультиклональную реакцию для вектора pDONRP4-1R, содержащего промоторные области изучаемых генов, а также вектора, несущего репортерный ген GFP с сигналом ядерной локализации (GFP- NLS), вектора, содержащего терминатор транскрипции T35S, и вектора назначения pHm43GW.

Генетические конструкции, полученные в этой работе, перечислены в приложении 5.

2.9. Трансформация бактерий

Полученными конструкциями были трансформированы химические компетентные клетки *Escherichia coli* штамма Top10, полученные по протоколу Sambrook et al., 2006. Фасовку компетентных клеток (100 мкл) размораживали во льду 10 минут. К размороженным клеткам добавляли клональную смесь, затем пробирку инкубировали во льду в течение 30 минут, встряхивая каждые 10 минут, после чего прогревали при 42°C 30 секунд с последующим инкубированием во льду в течение 5 минут. Далее добавляли 600 мкл жидкой среды LB и инкубировали в течение часа в шейкере термостате при температуре 37°C, после чего бактерии высевали на селективную твердую среду LB с антибиотиком. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение ночи.

Электротрансформация штаммов *Agrobacterium rhizogenes* Arqua и *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 или GV3101 была проведена следующим образом: в электрокомпетентные клетки агробактерий добавляли плазмидную ДНК (100 нг) и инкубировали 10 мин на льду. Далее перемещали смесь в кювету для электропоратора Micro Pulser (BioRad) и подвергали воздействию электрического импульса (2500 V, 4 мсек). На льду добавляли 0,6 мл жидкой среды LB, переносили смесь в чистую пробирку и инкубировали в шейкере-термостате 2 часа при 28°C, после чего рассеивали на твердую среду LB с селективным антибиотиком и инкубировали при 28°C два дня. Проверку выросших колоний на наличие целевой вставки осуществляли с помощью ПЦР.

Выделение плазмидной ДНК из колоний *E. coli* и *Agrobacterium* проводили с помощью набора Plasmid Miniprep Kit (Евроген). Наличие необходимой вставки в векторах назначения было проверено с помощью ПЦР, рестрикции и секвенирования. Реакции секвенирования проводили в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

2.10. Трансформация растений с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и *Agrobacterium tumefaciens*

Для получения растений с трансгенными корнями использовали штаммы *A. rhizogenes*, несущие конструкции или для сверхэкспрессии генов *CLE* или для анализа активности промоторов генов *CLE*, вовлеченных в ответ на азот. Стебель двухузлового черенка надрезали скальпелем и наносили на срез культуру *A. rhizogenes*. Далее кокультивировали растения с бактериями 48 часов на среде MS, после чего пересаживали черенки на среду MS с добавлением цефотаксима (500 mg/L) для устранения бактерий. Через 12-14 дней, когда развивались трансгенные бородатые корни, растения либо пересаживали в вермикулит для изучения влияния сверхэкспрессии на клубнеобразование, либо корни растений отрезали для детекции активности *GUS*. Проверка корней на трансгенность была проведена с помощью детекции свечения репортера GFP, ген которого имеется в использованных векторах назначения.

Для получения полностью трансгенных растений картофеля, несущих конструкцию для сверхэкспрессии или анализа активности промоторов генов, вовлеченных в утолщение клубня, листья картофеля трансформировали с помощью *A. tumefaciens*. Трансформацию проводили по протоколу, описанному в диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук Колачевской О.О. (2015). Листья картофеля отрезали, надсекали и переносили в чашку Петри с 30 мл жидкой (без агара) среды MS с 16 г/л глюкозы. На чашку брали по 15 листьев, добавляли 100 мкл ночной культуры агробактерий и перемешивали в течение 15 мин, после чего

инкубировали при комнатной температуре 48 часов в темноте. Далее для образования каллусов листья надрезами вниз переносили на среду MS с 16 г/л глюкозы и 5 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП, 500 мг/л цефотаксима, 25 мг/л гигромицина или 200 мг/л канамицина и инкубировали при 27°C в течение 7 дней. После этого для образования побегов экспланты с каллусами переносили на среду MS с 16 г/л глюкозы и с 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л GA, 500 мг/л цефотаксима, 25 мг/л гигромицина или 200 мг/л канамицина и инкубировали при 21°C при длинном дне и пересаживали каждые 9-10 дней на свежую среду до появления побегов. Как только у побегов образовались корни, их отрезали от каллуса и пересаживали на среду MS с 10 г/л сахарозы без гормонов, с 500 мг/л цефотаксима. Наличие вставки проверяли с помощью генотипирования и анализа экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ.

2.11. Анализ активности репортерных белков GUS и GFP

Анализ активности промоторов генов *CLE* осуществляли с помощью детекции активности репортерных белков. Детекцию активности репортерного гена *GUS* осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Sigma-Aldrich, США), инкубируя растительные ткани 1,5-4 часа в буфере для GUS-окрашивания (NaPO_4 – буфер (pH 7,0), 0,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,5 mM X-Gluc в DMSO) при 37°C. Фиксацию образцов с GFP для микроскопии проводили по методике, описанной Ilina et al., 2018.

2.12. Гистологический анализ трансгенных растений картофеля

Срезы стеблей, столонов и клубней делали ручную бритвой, либо помещали в 2% агарозные блоки и получали срезы с помощью микротомы с вибрирующим лезвием Leica VT1200S. Срезы изучали и фотографировали с помощью полуавтоматизированного флуоресцентного микроскопа DM4000B. Срезы растений со сверхэкспрессией генов *CLE* окрашивали 1% сафранином. Обработку изображений проводили с использованием программы ImageJ. Работа по приготовлению и анализу срезов была проведена в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

2.13. Дрожжевая одногибридная система

Для изучения взаимодействия ДНК-белок использовали метод дрожжевой одногибридной системы, для которой трансформацию дрожжей проводили по методу, описанному Gietz и Schiestl (2007). Клетки *S. cerevisiae* (штамм Y2H Gold (Clontech), любезно предоставленный коллегами из Государственного Университета Оклахомы (США)) высевали на

чашку с твердой средой YPD (pH 6,0) (10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона, 20 г глюкозы, 20 г агара в 1 литре дистиллированной воды) из стока и выращивали при 30°C в течение 3 дней. Одну колонию помещали в жидкую среду YPD (без агара) и инкубировали при 30°C на шейкере (200 об/мин) в течение ночи. На следующий день 2-3 мл ночной культуры помещали в 10 мл жидкой среды YPD и инкубировали при 30°C на шейкере (200 об/мин) в течение 2-4 часов. Культуру осаждали центрифугированием в течение 2 минут при скорости 4000 об/мин, супернатант сливали. Осадок ресуспендировали в 700 мкл 0,1 М ацетата лития. Из получившейся суспензии брали по 60 мкл на каждую трансформацию.

Эксперименты с использованием дрожжевой одногибридной системы проводили согласно Davies (2013). Для трансформации к 60 мкл суспензии клеток *S. cerevisiae* добавляли плазмиды (по 500 нг), содержащие кодирующую последовательность транскрипционного фактора и промоторную область гена, 20 мкл балластной ДНК (5 мг/мл) и 276 мкл раствора для трансформации (240 мкл 50% полиэтиленгликоль, 36 мкл 1М ацетат лития), тщательно перемешивали и инкубировали в течение 30 минут при 30°C. Затем пробирку помещали на водяную баню с температурой 42°C на 20 минут. После этого пробирку центрифугировали при скорости 5000 об/мин в течение 30 секунд, убирали супернатант, добавляли 100 мкл стерильной воды, ресуспендировали осадок и высевали на чашку с селективной средой и выращивали на твердой селективной среде DDO для отбора трансформантов (pH=5,9) (1,74 г смеси Yeast nitrogen base (Sigma), 5 г (NH₄)₂SO₄, 20 г глюкозы, 20 г агара, 0,68 г смеси “Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without leucine and tryptophan” (Sigma, Y0750) в 1 литре дистиллированной воды). Чашки инкубировали в течение 3 дней при 30°C. Полученные колонии ресуспендировали в 50 мкл воды, измеряли их плотность с помощью iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad), разводили водой для достижения одинаковой плотности, исходя из наименьшей и высевали на селективные среды: TDO (DDO, но вместо смеси Y0750 без триптофана и лейцина - смесь Y2146 без триптофана, лейцина и гистидина) с различной концентрацией 3-Amino-1,2,4- triazole (3-AT). Для каждого варианта использовалось минимум три колонии.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ последовательностей и экспрессии генов *CLE* у картофеля.

Ранее, Goad с соавторами обнаружили 21 ген, предположительно кодирующие пептиды CLE у картофеля *Solanum tuberosum* group *Phureja* (StCLE) (Goad et al., 2016). С помощью баз данных SpudDB и NCBI по гомологии с генами резуховидки и томата в геноме картофеля *S. tuberosum* group *Phureja* DM-1-3 516R44 нами был идентифицирован 41 ген *CLE*, среди которых двадцать не упоминались в работе Goad с соавторами (приложение 1).

Мы также произвели поиск генов *CLE* у других видов картофеля - трех диких видов (*S. bukasovii* Juz. et Rybin., *S. verrucosum* Schltdl., *S. commersonii* Dunal.) и трех культурных (*S. curtilobum* Juz. et Buk., *S. juzepczukii* Juz. et Buk., *S. ajanhuiri* Juz. et Buk.). Мы выявили 42 гена *CLE*, которые присутствуют почти у всех проанализированных видов картофеля, однако ген, названный нами *CLE42*, не найден в геноме *S. tuberosum* group *Phureja*, хотя имеется у всех остальных проанализированных нами видов картофеля (Ганчева и др., 2021). Анализируя АК последовательности отдельных белков CLE у разных видов картофеля, мы обнаружили высокий процент их сходства между собой (78-98% идентичных АК), причем присутствуют как полностью идентичные АК последовательности (например, белки CLE39 у пяти из семи проанализированных видов идентичны), так и варианты, когда идентичных последовательностей среди видов нет. Среди всех проанализированных видов картофеля у *S. commersonii* в белках CLE присутствует большее число уникальных АК, которых нет у других видов. Этот дикий вид картофеля отличается от остальных взятых в анализ видов местом произрастания: он растет вне ареалов произрастания культурных видов картофеля и, скорее всего, не входит в число их предков (Юзепчук, Букасов, 1929).

Как и гены *CLE* других растений, гены *CLE* картофеля содержат последовательности сигнального домена на N-конце, варибельного домена и CLE домена на C-конце. Так же, как и у резуховидки и томата (Zhang et al., 2014; Gancheva et al., 2021), у картофеля все гены *CLE* содержат только один домен CLE. Консенсусная последовательность домена CLE картофеля отличается от последовательностей доменов CLE *A. thaliana* и томата (*Solanum lycopersicum*), но также демонстрирует 6 наиболее консервативных АК (R₁, P₄, G₆, P₇, P₉ и H₁₁) (Рис. 3). Для гена *StCLE14* было обнаружено наличие двух изоформ, что связано с наличием второго интрона у изоформы 2 (Рис. 4).

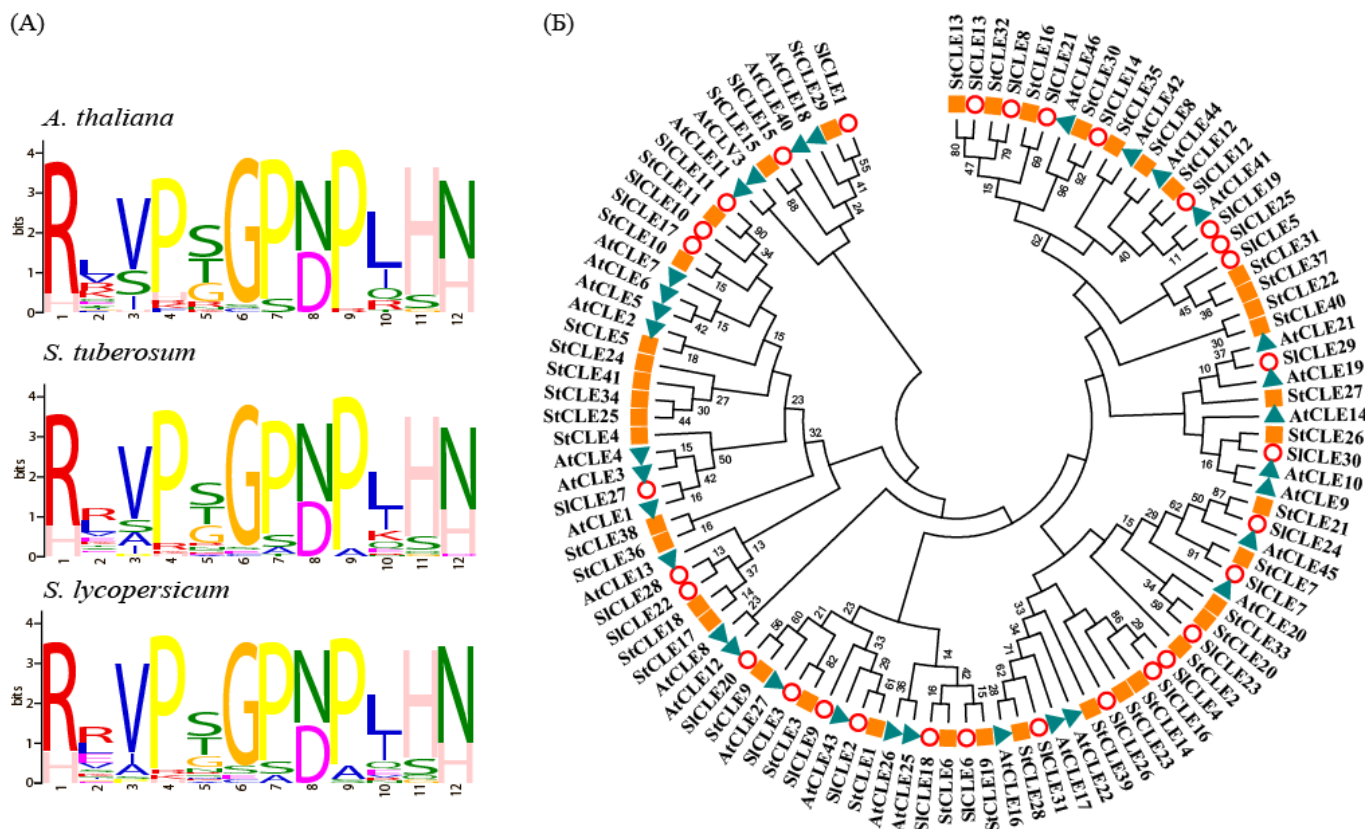


Рис. 3. Анализ последовательностей пептидов CLE и филогенетическое дерево белков CLE. А - Консенсусные последовательности CLE доменов *A. thaliana*, *S. lycopersicum* и *S. tuberosum* построенные в программе MEME. Б – филогенетическое дерево семейств белков *A. thaliana* (зеленые треугольники), *S. lycopersicum* (красные кружки) и *S. tuberosum* (оранжевые квадраты), построенное в программе MEGA7 с помощью алгоритма Muscle с использованием АК последовательностей белков CLE.



Рис. 4. Две изоформы LOC107060359 (*StCLE14*) из базы данных NCBI, отличающиеся количеством интронов.

Несмотря на то, что у *S. tuberosum* мы выявили 41 ген *CLE*, они кодируют всего 37 пептидов CLE (Gancheva et al., 2021). Связано это с тем, что АКП CLE доменов у некоторых белков идентичны (например, у CLE8 и CLE12). Однако у других видов картофеля найдено еще 20 доменов CLE, которых нет у *S. tuberosum*. Все эти домены имеют сходство с доменами CLE белков *S. tuberosum*, но отличаются от них на 1-4 АК (приложение 2).

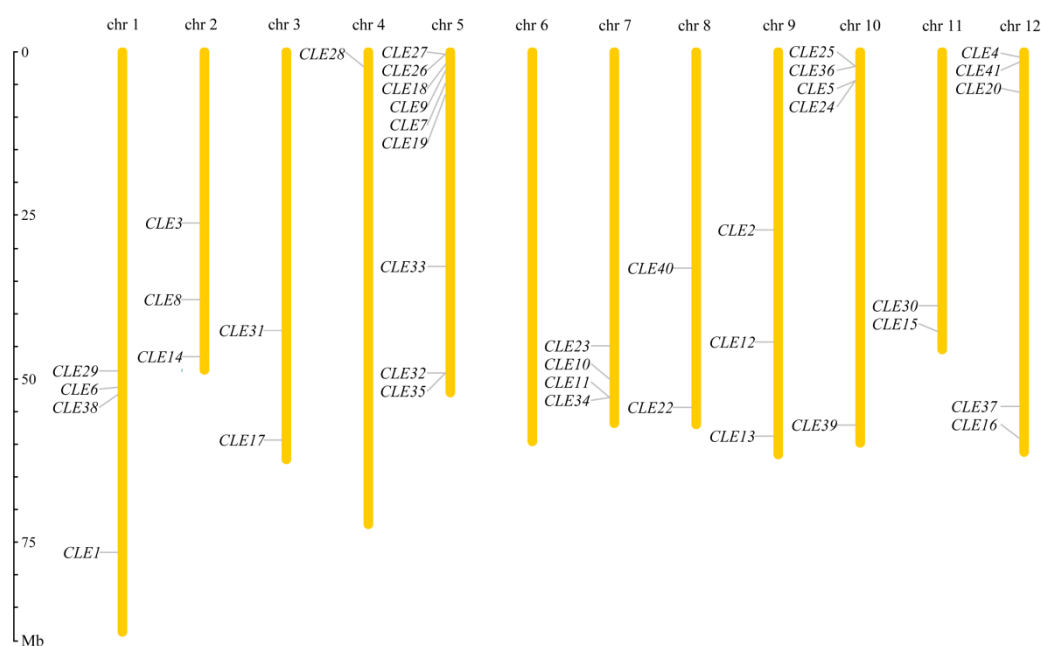


Рис. 5. Расположение генов *CLE* на хромосомах картофеля *S. tuberosum* group *Phureja*.

Далее мы проанализировали распределение генов *StCLE* на хромосомах картофеля *S. tuberosum* group *Phureja* и обнаружили, что они располагаются на всех 12 хромосомах картофеля, за исключением хромосомы 6 (Рис. 5). Мы обнаружили, что гены *StCLE26* и *StCLE27* расположены очень близко друг к другу (в пределах 4000 п.н.) и имеют сходные последовательности (88% сходства), что позволяет предположить, что они, возможно, возникли в результате дупликации.

Мы провели анализ экспрессии генов *StCLE* в апексе побега, цветке, листе, черешке, стебле, столоне, клубне (молодом и зрелом) и корне, используя данные по транскриптому *S. tuberosum* group *Phureja* из базы данных NCBI (Рис. 6). Четырнадцать генов (*StCLE2*, -5, -10, -15, -18, -25, -27, -29, -32, -34, -35, -38, -40 и -41) были исключены из схемы, так как их транскрипты не были обнаружены в проанализированных тканях. Двенадцать генов *StCLE* (*StCLE3*, -4, -6, -11, -14, -20, -21, -22, -24, -26, -31 и -36) демонстрируют низкий уровень экспрессии или отсутствие экспрессии в большинстве проанализированных тканей картофеля. Пять других генов (*StCLE9*, -12, -13, -23 и -30), наоборот, экспрессируются во всех тканях на высоком уровне. Десять генов (*StCLE1*, -7, -8, -16, -17, -19, -28, -33, -37 и -39) характеризуются тканеспецифичным характером экспрессии, - так, ген *StCLE8* экспрессируется на высоком уровне в апексе, столоне, клубне и корне, но имеет низкий уровень экспрессии в цветке, листе, черешке и стебле.

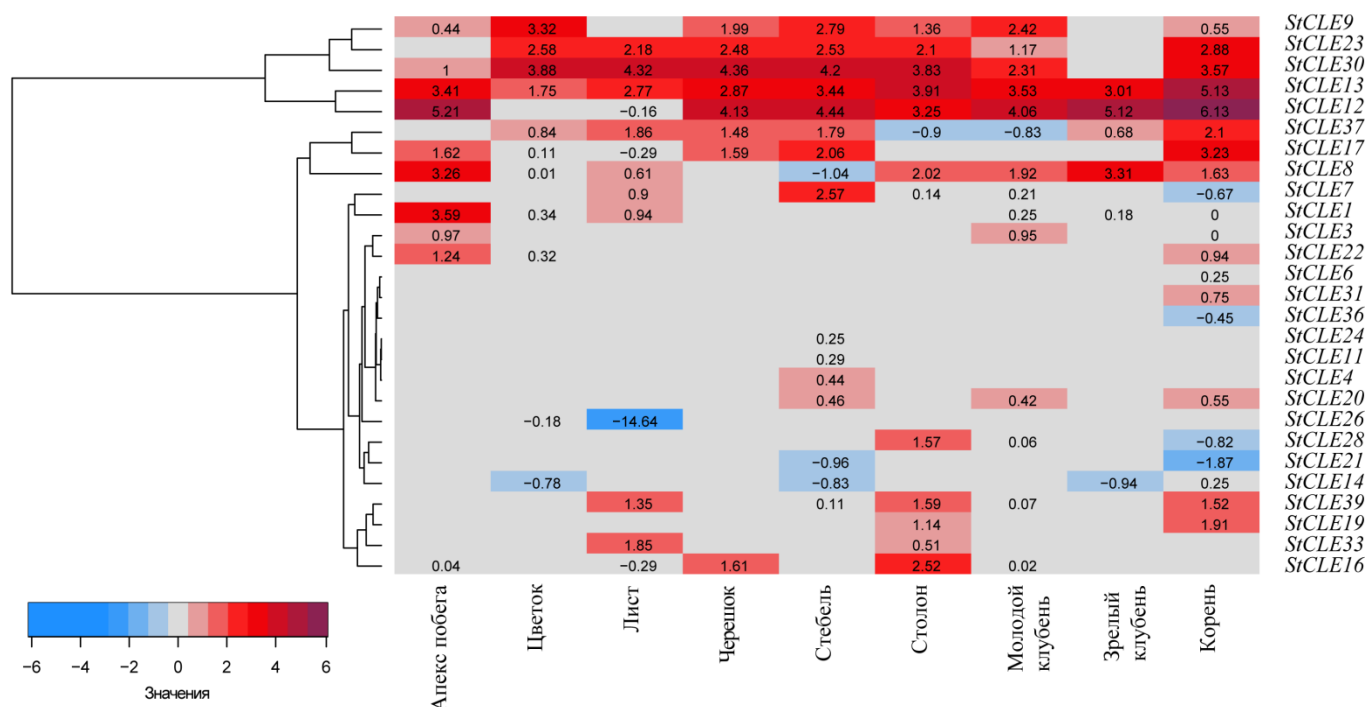


Рис. 6. Значения Log2 TPM (Transcripts Per Million) для генов *CLE* картофеля. Тепловая карта построена с помощью функции `heatmap.2` программы R. Серым цветом обозначены Log2 TPM равные 0.

3.2. Поиск генов *CLE* участвующих в ответе на изменение содержания азота в среде.

3.2.1. Поиск гомологов генов *CLE* резуховидки, участвующих в ответе на азот.

Так как для картофеля содержание азота в среде является одним из факторов, регулирующих развитие клубня, мы стали искать среди генов *CLE* картофеля гомологи генов *CLE* резуховидки, участвующих в ответе на изменение содержания азота в среде: по литературным данным, к таковым относятся *AtCLE1-7* (Araya et al., 2014; de Bang et al., 2017). Для решения этой задачи было построено филогенетическое дерево методом ближайшего соседа по АК последовательностям белков *CLE* *A. thaliana*, *S. lycopersicum* и *S. tuberosum* (Рис. 3). У картофеля были выявлены предполагаемые гомологи генов резуховидки, которые вовлечены в ответ на азот (*StCLE4*, -5, -10, -11, -24, -25, -34, -41) (Рис. 3, 7).

StCLE11	R	V	A	P	Q	G	P	D	A	Q	H	H
StCLE24	R	V	A	P	G	G	P	D	P	K	H	H
StCLE10	R	V	A	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
AtCLE7	R	F	S	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
AtCLE5	R	V	S	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
AtCLE6	R	V	S	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
StCLE5	R	L	A	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
AtCLE2	R	L	S	P	G	G	P	D	P	Q	H	H
AtCLE3	R	L	S	P	G	G	P	D	P	R	H	H
AtCLE4	R	L	S	P	G	G	P	D	P	R	H	H
AtCLE1	R	L	S	P	G	G	P	D	P	R	H	H
StCLE4	R	L	S	P	D	G	P	D	P	R	H	H
StCLE25	R	L	S	P	G	G	P	D	P	K	H	H
StCLE34	R	L	S	P	G	G	P	D	P	K	H	H
StCLE41	R	N	S	P	G	G	P	D	P	K	H	H

Рис. 7. Фрагмент выравнивания CLE доменов белков CLE *A. thaliana* и *S. tuberosum*, предположительно участвующих в ответе на азот, сделанного с помощью программы Ugene.

3.2.2. Анализ экспрессии генов *CLE* картофеля в ответе на изменение содержание азота в среде.

Для генов *StCLE5*, *-10*, *-25*, *-34*, *-41* отсутствуют данные TPM (Transcripts Per Million) в изучаемых тканях, а для *StCLE4*, *-11*, *-24* показано накопление транскриптов в стебле (Рис.6). Мы решили проанализировать экспрессию генов *StCLE* в корнях при различном содержании азота в среде. Для этого мы использовали среды, описанные в статье Ohkubo et al., 2017 - модифицированную среду Мурасиге-Скуга с 5г/л сахарозы, где в качестве источника азота использовались 10мМ KNO₃ и 10мМ NH₄Cl, а в среде без азота вместо них использовали 10 мМ KCl, все остальные элементы были урезаны вдвое (½ MS10 KNO₃ NH₄Cl или ½ MS10 KCl).

Исходно картофель выращивали в условиях *in vitro* на среде Мурасиге-Скуга с содержанием сахарозы 10г/л (MS10). Растения черенковали на двухузловые черенки и помещали на среды без азота или с азотом и растили до образования корней (12-14 дней). Далее растения пересаживали на среды следующим образом: растения, растущие на среде с азотом, пересаживали на среды с азотом и без азота; растения, растущие на среде без азота, пересаживали на среды с азотом и без азота. Через 48 часов корни обрезали и анализировали экспрессию генов *StCLE* с помощью ПЦР-РВ.

Количественный анализ экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ показал, что уровни экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* значимо снижаются при пересадке растений со среды с азотом на среду без азота и возрастают при пересадке со среды без азота на среду с азотом (Рис. 8, 9). Уровни экспрессии гена *StCLE11* при изменении концентрации азота в среде достоверно не изменялись (Рис. 8, 9). Уровень экспрессии гена *StCLE5* значимо изменялся только при пересадке растений со среды без азота на среду с азотом (Рис. 9).

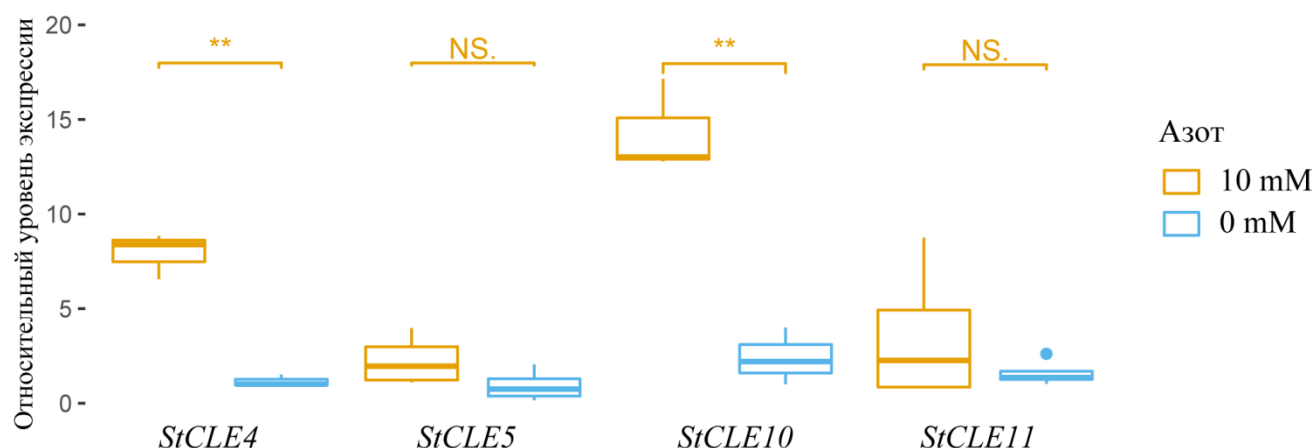


Рис.8. Относительный уровень экспрессии генов *StCLE4*, *StCLE10*, *StCLE5*, *StCLE11* при пересадке растений со среды с азотом (10 mM) на среду с азотом (10 mM) и без азота (0 mM). NS. - Not Significant (не значимые различия, $p > 0,05$); ** - $p < 0,01$. Данные представлены по 4 биологическим повторностям.

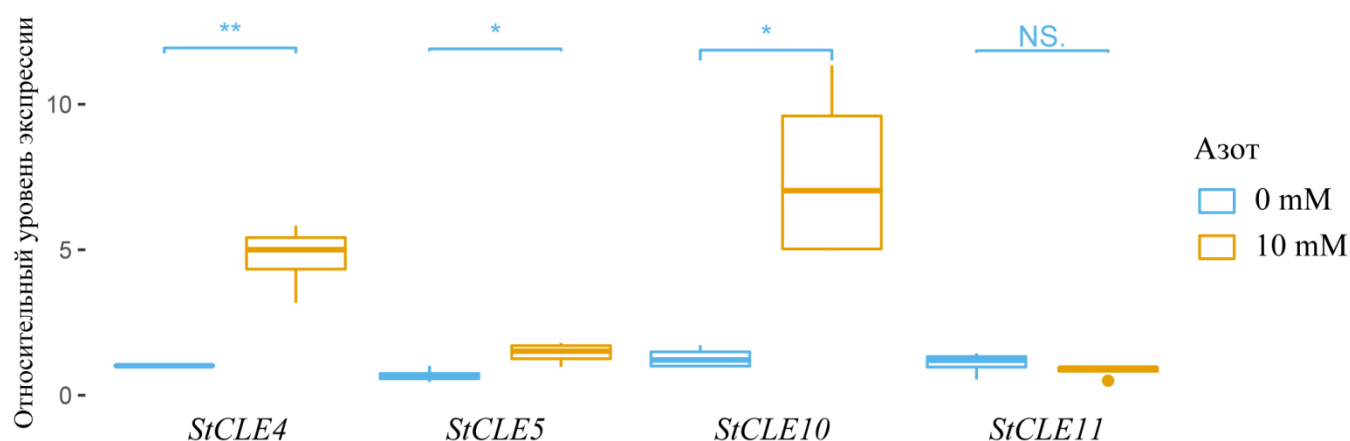


Рис. 9. Относительный уровень экспрессии генов *StCLE4*, *StCLE10*, *StCLE5*, *StCLE11* при пересадке растений со среды без азота (0 mM) на среду без азота (0 mM) и с азотом (10 mM). NS. - Not Significant (не значимые различия, $p > 0,05$); ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. Данные представлены по 4 биологическим повторностям.

В работе Tiwari и соавторов (2020) был проведен транскриптомный анализ корней, побегов и столонов картофеля, растущих в условиях аэропоники с различным содержанием азота (4 мМ и 0,2 мМ, в качестве источника азота использовали NO_3^- и NH_4^+). Среди дифференциально экспрессирующихся генов в этой работе присутствует ген *StCLE10*, экспрессия которого возрастала в присутствии азота, что согласуется с нашими данными. Однако изменение экспрессии гена *StCLE4* в работе Tiwari и соавторов не было обнаружено. Это может быть связано со временем обработки азотом (в работе Tiwari и соавторов картофель выращивали 30 дней на средах с различным содержанием азота).

Таким образом, кандидатами на роль регуляторов ответа на азот у картофеля являются гены *StCLE4* и *StCLE10*, АК последовательность CLE-домена которых отличается всего на 1 АК от последовательностей домена CLE белков резуховидки, которые вовлечены в ответ на азот.

3.2.3. Анализ активности промоторов генов *StCLE4* и *StCLE10* у картофеля.

Для анализа активности промоторов генов *StCLE4* и *StCLE10* были выделены промоторные области этих генов (3 и 1.7 тысячи нуклеотидов до старт-кодона, соответственно). Далее промоторные области генов *StCLE4* и *StCLE10* были помещены перед геном *GUS* (Рис. 10). Таким образом, в случае посадки ТФ на промоторы генов *StCLE4* и *StCLE10*, которые в норме активируют их экспрессию, благодаря встроенной конструкции происходила экспрессия репортерного гена *GUS*. Ген *GUS* кодирует фермент глюкуронидазу, обуславливающий синее окрашивание при взаимодействии со специфическим субстратом (Van den Eede et al., 1992).

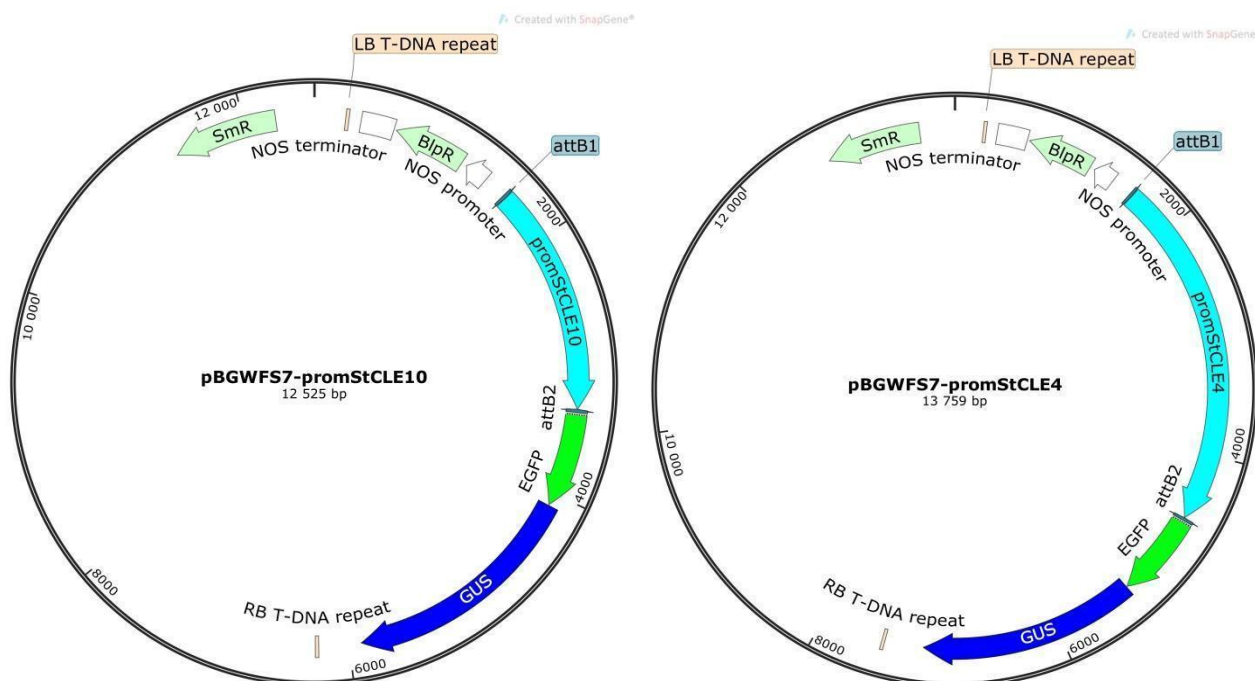


Рис. 10. Карты векторов для анализа активности промоторов генов *StCLE4* и *StCLE10*, содержащие репортерный ген *GUS* под контролем изучаемых промоторов (prom*StCLE4* и prom*StCLE10*). Карты построены в программе SnapGene.

Мы трансформировали растения картофеля полученными конструкциями с помощью *A. rhizogenes* для получения композитных растений с трансгенными корнями. Такой вариант трансформации позволяет получить растения с большим количеством трансгенных корней уже через две недели после трансформации и не требует частых пересадок. Трансформированные растения выращивали на среде с азотом (10мМ KNO₃ и 10мМ NH₄Cl) и без азота (10мМ KCl). Мы показали, что промоторы генов *StCLE4* и *StCLE10* более активны при росте растений на среде азотом (Рис. 11, 12), что согласуется с данными об экспрессии этих генов в присутствии азота в среде. Промоторы обоих генов были активны в центральном цилиндре корня картофеля, предположительно – в проводящих тканях.

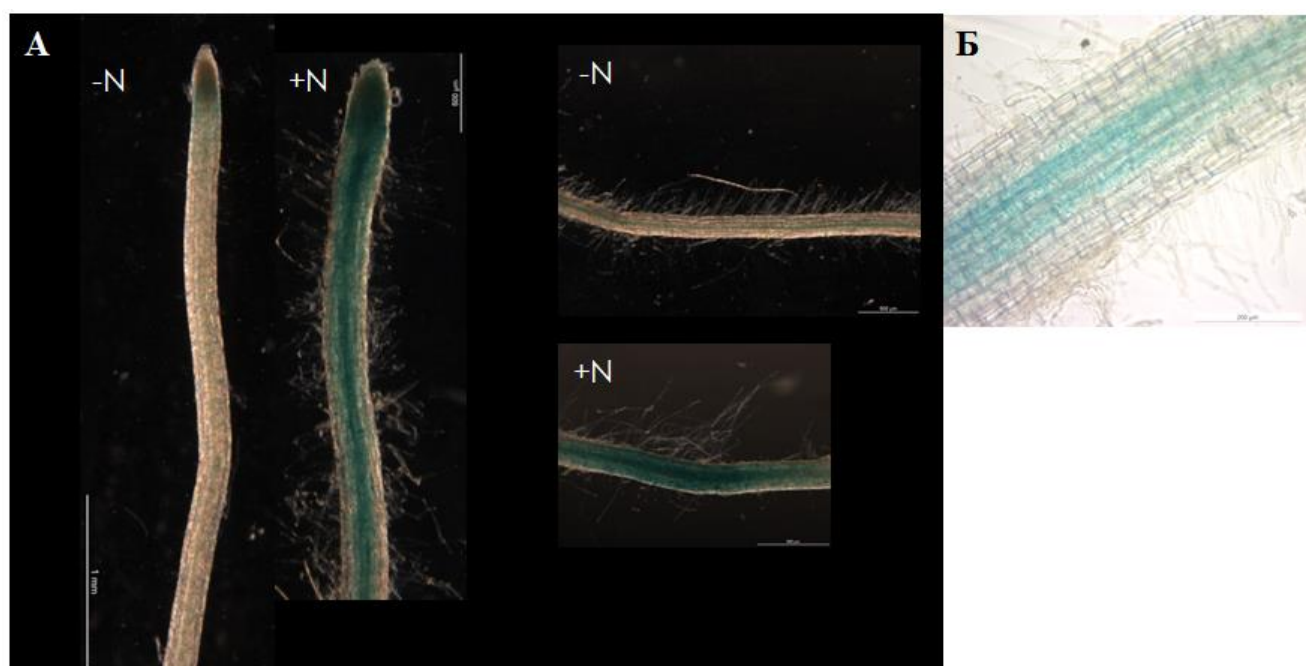


Рис. 11. Анализ активности промотора гена *StCLE4* в корнях картофеля при разной концентрации азота в среде (корни были получены путем трансформации растений картофеля штаммом *A. rhizogenes*, несущим репортерный ген *GUS* под промотором *StCLE4*). А - Активность промоторной области гена *StCLE4* в корнях картофеля, растущего на среде с азотом (+N) и без азота (-N). Б - Срез трансгенного корня картофеля, растущего на среде с азотом. Промотор активен в центральном цилиндре корня.

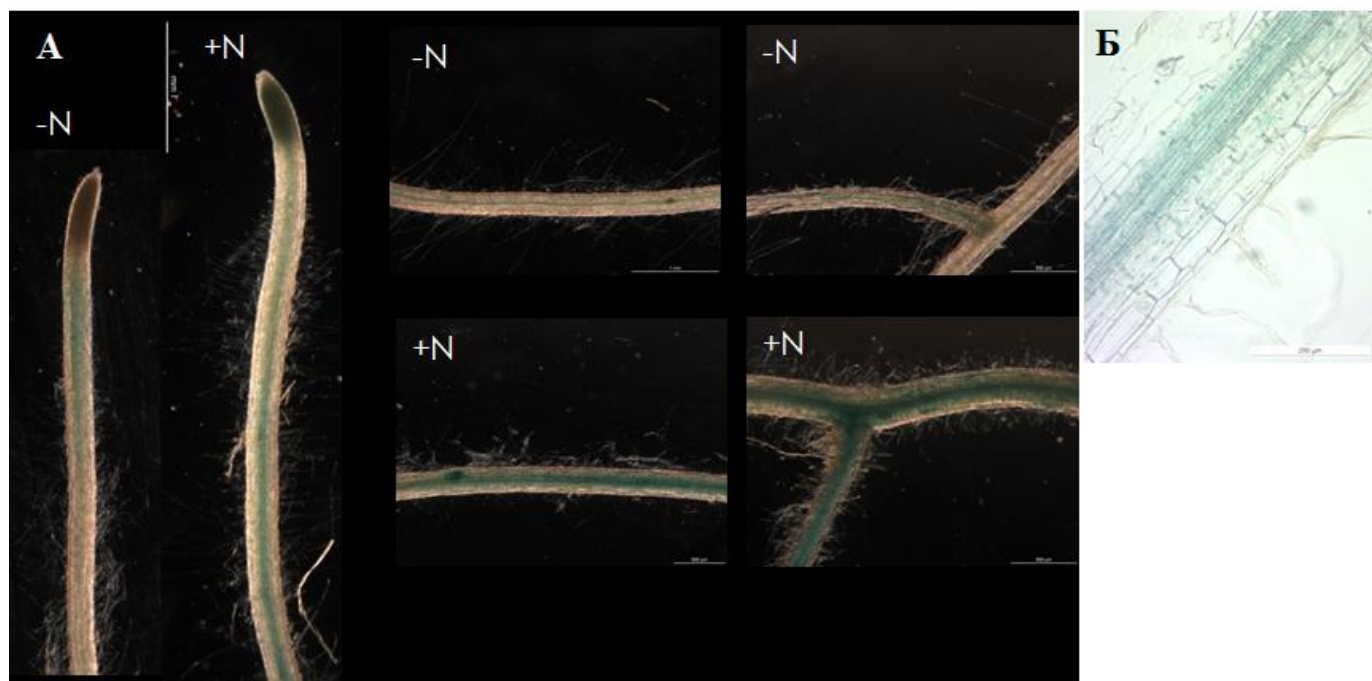


Рис. 12. Анализ активности промотора гена *StCLE10* в корнях картофеля при разной концентрации азота в среде (корни были получены путем трансформации растений картофеля штаммом *A. rhizogenes*, несущим репортерный ген *GUS* под промотором *StCLE10*). А - Активность промоторной области гена *StCLE10* в корнях картофеля, растущего на среде с азотом (+N) и без азота (-N). Б - Срез трансгенного корня картофеля, растущего на среде с азотом. Промотор активен в центральном цилиндре корня.

Таким образом, анализ активности промоторов генов *StCLE4* и *StCLE10* в трансгенных корнях картофеля подтвердил наши данные об активации экспрессии этих генов в ответ на повышение концентрации азота. У резуховидки гены *AtCLE1*, *AtCLE3*, *AtCLE4* и *AtCLE7*, гомологичные *StCLE4* и *StCLE10*, экспрессируются, напротив, при голодании по азоту. Они экспрессируются в перицикле корня, а сигнальный каскад, запускаемый пептидами *AtCLE1*, *AtCLE3*, *AtCLE4* и *AtCLE7* приводит к подавлению образования боковых корней (Araya et al., 2015). Это в свою очередь приводит к возникновению длинных неветвящихся корней, характерных для растений, которые выращиваются в условиях нехватки азота. В то же время, в исследовании Ma et al. (2020), напротив, *AtCLE3* не реагировал на добавление азота (3 mM KNO_3), а уровни экспрессии генов *AtCLE1*, *AtCLE2*, *AtCLE4*, *AtCLE5*, *AtCLE6* и *AtCLE7* возрастали. В связи с этим вопрос о функциях генов *AtCLE1–CLE7* в ответе на содержание азота остается открытым.

В то же время у бобовых растений пептиды CLE участвуют в негативной регуляции развития азотфиксирующих клубеньков. Так, у *Lotus japonicus* CLE-ROOT SIGNAL 2 (*LjCLE-*

RS2) экспрессируется в случае наличия азота в среде, пептид *LjCLE-RS2* по ксилеме поступает в побег и запускает сигнал, ингибирующий образование клубеньков (Okamoto et al., 2009). При этом ген *LjCLE-RS2* является близким гомологом *AtCLE1–AtCLE7*.

По нашим данным, гомологи генов *AtCLE1-7* у картофеля либо не реагировали на изменение количества азота в среде (*StCLE5*, *StCLE11*), либо повышали уровни экспрессии в присутствии азота (*StCLE4*, *StCLE10*). Возрастание экспрессии гена *StCLE10* на среде с азотом также подтверждается данными по анализу транскриптома картофеля при росте в условиях аэропоники на среде с азотом (Tiwari et al., 2020).

Так как образование клубней зависит от содержания азота в среде (его избыток негативно сказывается на развитии клубней), то имеет смысл изучить вовлеченность регуляторов клубнеобразования в азотный сигналинг. В работе Sharma et al. 2016 был проанализирован транскриптом столонов картофеля, в которых была индуцирована экспрессия гена *BEL5*, кодирующего ТФ - позитивный регулятор клубнеобразования. В случае экспрессии *BEL5* происходило накопление транскриптов большого количества генов, в том числе *StCLE4*: относительный уровень его транскрипции повышался в 5,38 раз ($p=0,0068$). Известно, что сайтами посадки *BEL5* являются тандемные последовательности TGAC, которые присутствуют в промоторной области гена *StCLE4*.

3.2.4. Проверка взаимодействия ТФ *BEL5* с промоторной областью гена *StCLE4*.

Для проверки предположения о том, что *BEL5* непосредственно регулирует транскрипцию гена *StCLE4*, мы использовали метод дрожжевой одноклеточной системы (Yeast One-Hybrid Assay (Y1H)). Метод состоит во взаимодействии ТФ, к которому присоединен активирующий домен, с изучаемым промотором, под которым стоит дрожжевой промотор и репортерный ген (*HIS3*). В случае взаимодействия ТФ-ДНК, активирующий домен попадает на дрожжевой промотор и запускает экспрессию репортерного гена, в результате чего наблюдается рост дрожжей на селективной среде без гистидина (TDO). Однако даже без взаимодействия ТФ-ДНК репортерный ген *HIS3* может экспрессироваться на низком уровне, что связано с взаимодействием дрожжевых белков с промоторной последовательностью. Чтобы нивелировать этот эффект, в среду добавляется ингибитор биосинтеза гистидина - 3-Amino-1,2,4- triazole (3-AT). Его концентрация рассчитывается для каждой конструкции отдельно, и обычно проверку взаимодействия осуществляют на ряде концентраций ингибитора для оценки силы взаимодействия ТФ и промоторной области (Davies 2013).

Были созданы конструкции, несущие кодирующую последовательность *StBEL5* (Рис. 13) и промоторные участки генов *StCLE4* и *StSP6A* (Рис. 14).

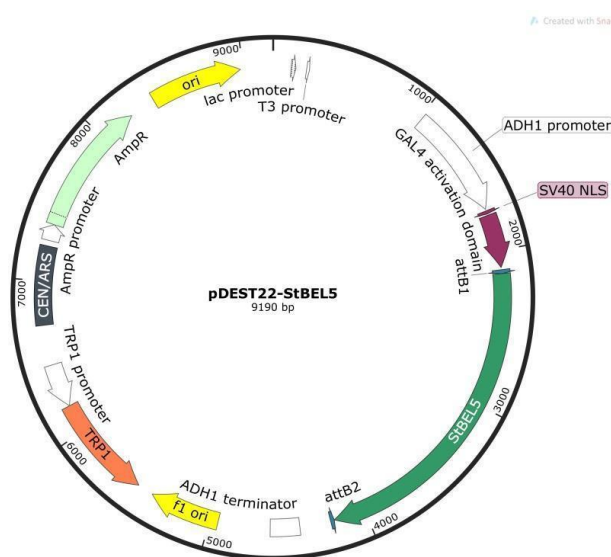


Рис. 13. Карта вектора для изучения взаимодействия ТФ-ДНК с помощью дрожжевой одногибридной системы, содержащий кодирующую последовательность *StBEL5*. Карты построены в программе SnapGene.

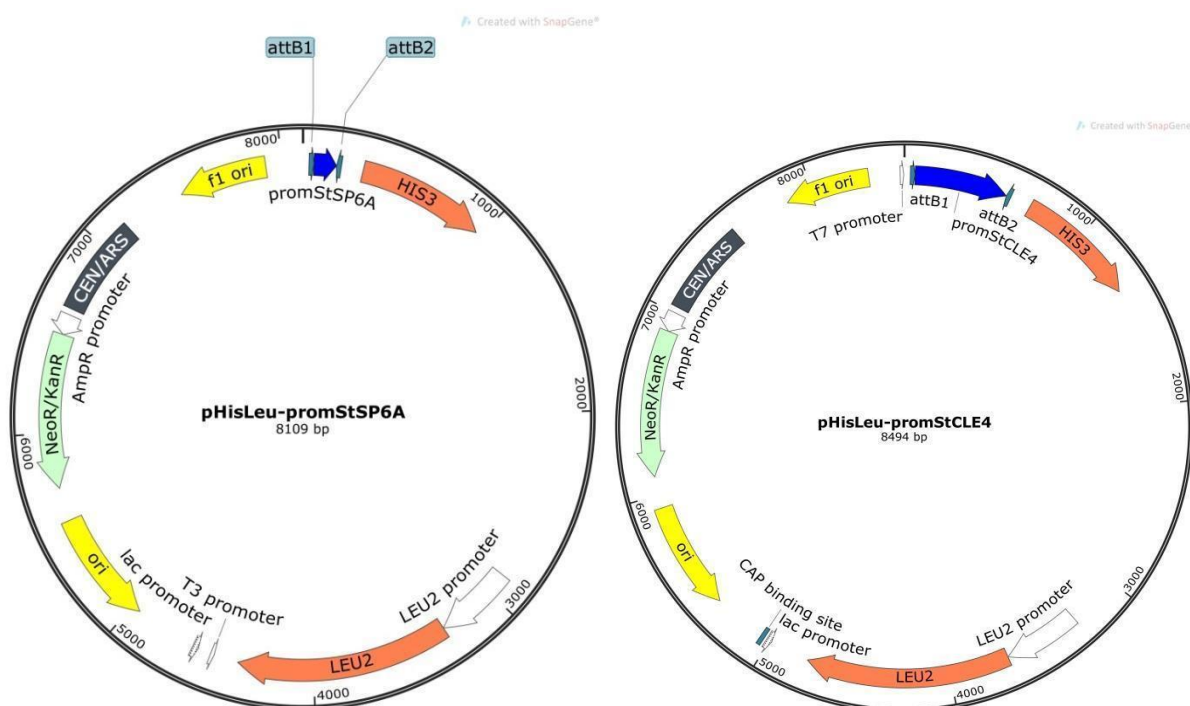


Рис. 14. Карты векторов для изучения взаимодействия ТФ-ДНК с помощью дрожжевой одногибридной системы, содержащие промоторные участки генов *StSP6A* (promStSP6A) и *StCLE4* (promStCLE4). Карты построены в программе SnapGene.

В качестве положительных контролей были выбраны пары ТФ NAM и промотор гена *LHY* (promLHY), взаимодействие которых ранее уже было показано с помощью Y1H (Davies, 2013), а также ТФ StBEL5 и промотор гена *StSP6A* (promStSP6A), взаимодействие которых было показано с помощью метода сдвига электрофоретической подвижности (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) (Sharma et al., 2016). В качестве отрицательных контролей использовались плазмиды pDEST22 и pHisLeu без вставок.

В нашем эксперименте по Y1H было подтверждено взаимодействие ТФ StBEL5 и промоторной области *StSP6A* и ТФ NAM с промотором гена *LHY*, однако взаимодействия StBEL5 с промоторной областью *StCLE4* не было обнаружено (Рис. 15). Таким образом, исходя из результатов нашего анализа, ТФ StBEL5 напрямую не регулирует экспрессию гена *StCLE4*.

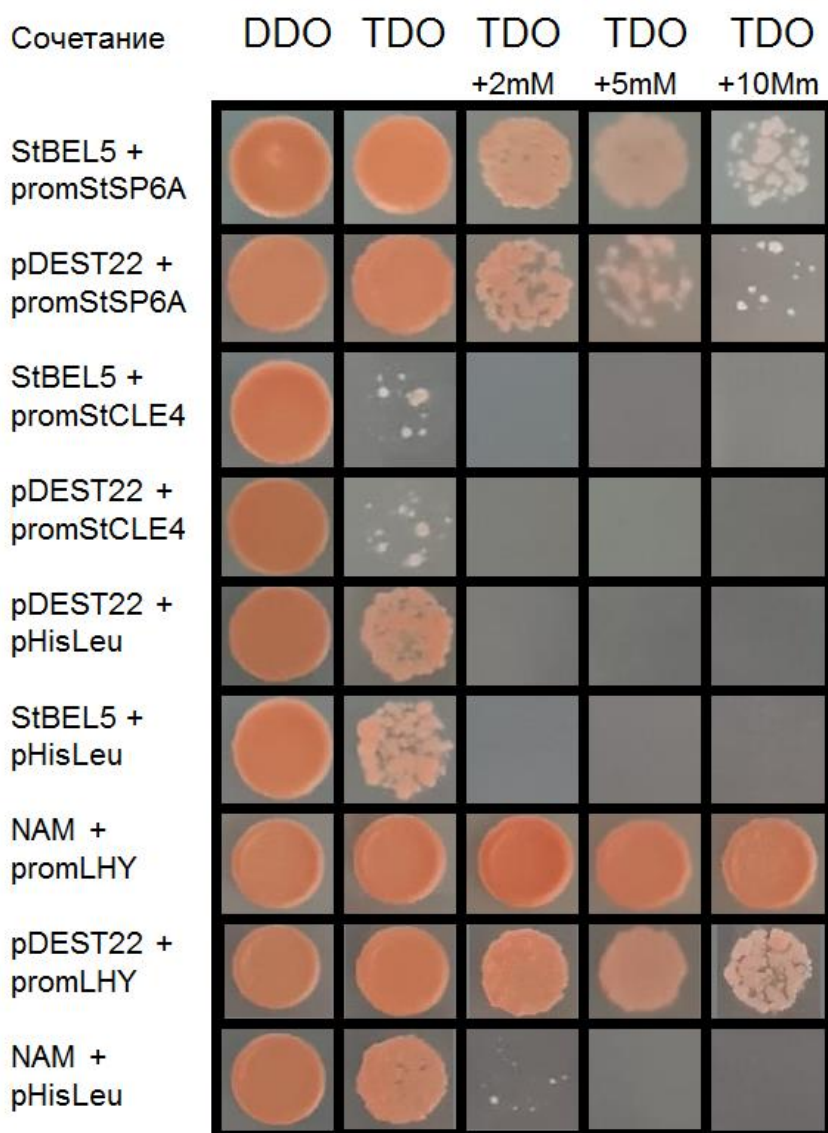


Рис. 15. Проверка взаимодействия ТФ BEL5 с промоторной областью гена *StCLE4* (promStCLE4) с помощью дрожжевой одногибридной системы. Дрожжи выращивали на средах

DDO и TDO с различными концентрациями ингибитора биосинтеза гистидина 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) - 2мМ, 5мМ и 10мМ.

3.2.5. Изучение влияния измененного уровня экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* на развитие картофеля.

Для дальнейшего изучения функций генов *StCLE4* и *StCLE10* были созданы конструкции, в которых гены *StCLE4* и *StCLE10* находились под конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты (Рис. 16). Такой промотор обеспечивает возрастание экспрессии находящихся под ним генов в сотни раз во всех трансформированных тканях растения.

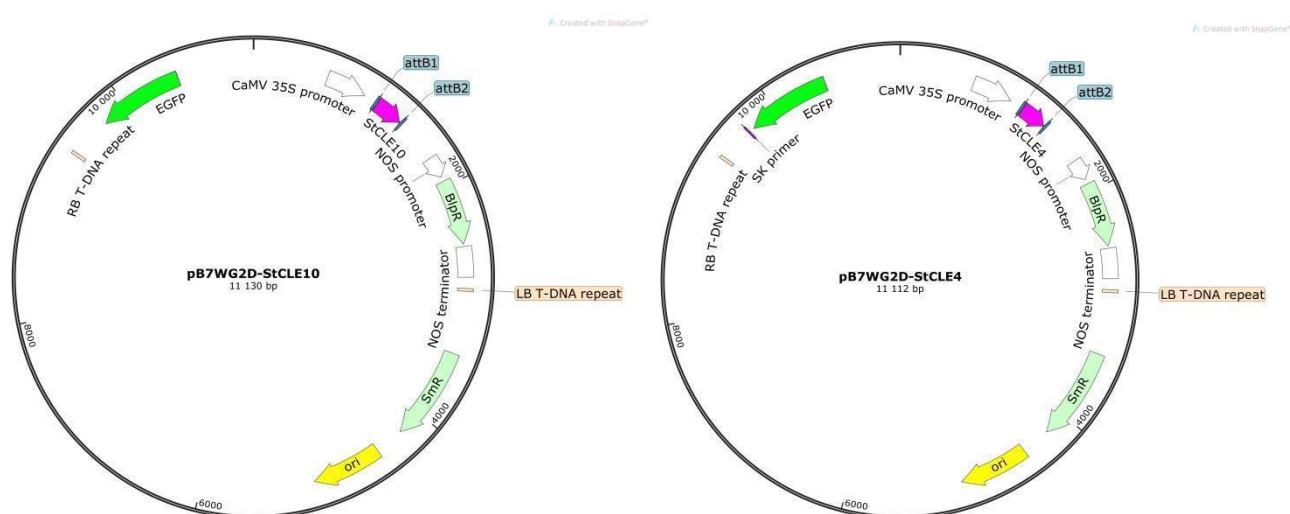


Рис. 16. Карты векторов для сверхэкспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10*, содержащие кодирующие последовательности изучаемых генов под контролем 35S промотора. Карты построены в программе SnapGene.

В результате трансформации черенков картофеля штаммами *A. rhizogenes*, несущими конструкции *35S::StCLE4* и *35S::StCLE10*, были получены растения с трансгенными корнями. В качестве контроля использовались растения, трансформированные конструкцией для сверхэкспрессии *GUS*. Далее эти растения с трансгенными корнями были перенесены на среды без азота и помещены в темноту для индукции клубнеобразования. Отсутствие азота является триггером образования клубней у картофеля, однако сверхэкспрессия генов *StCLE4* и *StCLE10*, как мы полагали, должна была тормозить клубнеобразование, так как они являются сигналом о наличии азота. Однако даже у контрольных растений развитие клубней было очень редким событием. Мы предположили, что это связано с особенностью трансформации — при трансформации растений с помощью *A. rhizogenes* образуются так называемые бородачатые корни

— из каллуса образуется большое количество корней, что может негативно влиять на развитие клубней. Вследствие этого, мы начали трансформацию листьев картофеля с помощью *A. tumefaciens*, но на данный момент регенерация растений еще не началась, поэтому мы не можем изучить влияние измененного уровня экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* на образование клубней.

3.3. Поиск генов *CLE* картофеля, участвующих в ответе на нехватку воды.

Нехватка воды у картофеля приводит к уменьшению роста побегов и урожая клубней – в связи с задержкой инициирования клубней, снижением количества и веса клубней. У резуховидки известен пептид CLE, который участвует в передаче сигнала о дефиците воды - это AtCLE25 (Takahashi et al., 2018). Исходя из филогенетического анализа, близкими по АК последовательности пептидами у картофеля являются пептиды *StCLE6* и *StCLE19*, при этом, как и у резуховидки, транскрипты *StCLE19* были обнаружены во флоэме (Lin et al., 2015), в развитии в которой он может, как и AtCLE25, принимать участие.

В связи с этим мы поставили эксперимент по изучению влияния нехватки воды на экспрессию генов *StCLE*. Оказалось, что уровни экспрессии генов *StCLE19* и *StCLE6* не изменяются при нехватке воды, однако другой ген, *StCLE23*, резко повышал уровень своей экспрессии при дефиците воды (Рис. 17).

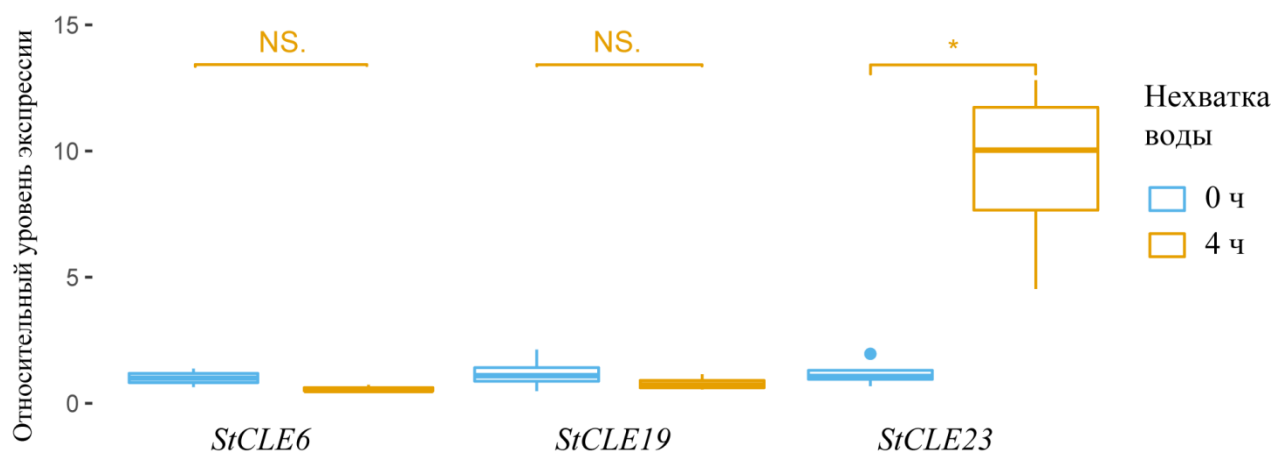


Рис. 17. Изменение относительного уровня экспрессии генов *StCLE6*, *-19*, *-23* в условиях нехватки воды по сравнению с контролем. Данные представлены по 4 биологическим повторностям. График построен с использованием функции boxplot в программе R. * - $p < 0,05$.

Итак, нам удалось выявить те гены, экспрессия и активность промоторов которых ассоциирована с изменением условий окружающей среды, критичных для клубнеобразования: наличием азота в среде и доступностью воды.

Азот для картофеля является важным элементом, необходимым для нормального роста растения, его избыток негативно сказывается на урожайности картофеля. В то же время, азот может выполнять сигнальную функцию для картофеля: истощение запаса азота в почве может являться одним из сигналов о необходимости образовывать клубни для переживания неблагоприятных условий. Согласно полученным нами данным, в передачу такого сигнала могут быть вовлечены пептиды *StCLE4* и *StCLE10*, так как уровни экспрессии кодирующих их генов повышаются в ответ на азот. Выяснить это поможет получение полностью трансгенных растений картофеля со сверхэкспрессией генов *StCLE4* и *StCLE10*. Можно предположить, что так же, как и у бобовых растений, *StCLE4* и *StCLE10* могут перемещаться по ксилеме в листья и регулировать экспрессию индукторов клубнеобразования, таких как SP6A и BEL5. С другой стороны, эти пептиды могут оказаться и регуляторами развития боковых корней, как это происходит у резуховидки.

Интересно, что ТФ BEL5 по данным Sharma с соавторами (2016) может регулировать экспрессию гена *StCLE4*. Прямое взаимодействие ТФ BEL5 с промоторной областью *StCLE4* не подтвердилось в нашей работе, но регуляция происходит не непосредственно, а через другой ТФ, экспрессия которого регулируется BEL5. Дальнейшие исследования позволят ответить на эти вопросы.

Также мы обнаружили ген, экспрессия которого ассоциирована с нехваткой воды у картофеля: экспрессия гена *StCLE23* возрастала в 10 раз в условиях дефицита воды. В мы планируем изучить участие пептида *StCLE23* в развитии растений картофеля и клубнеобразовании.

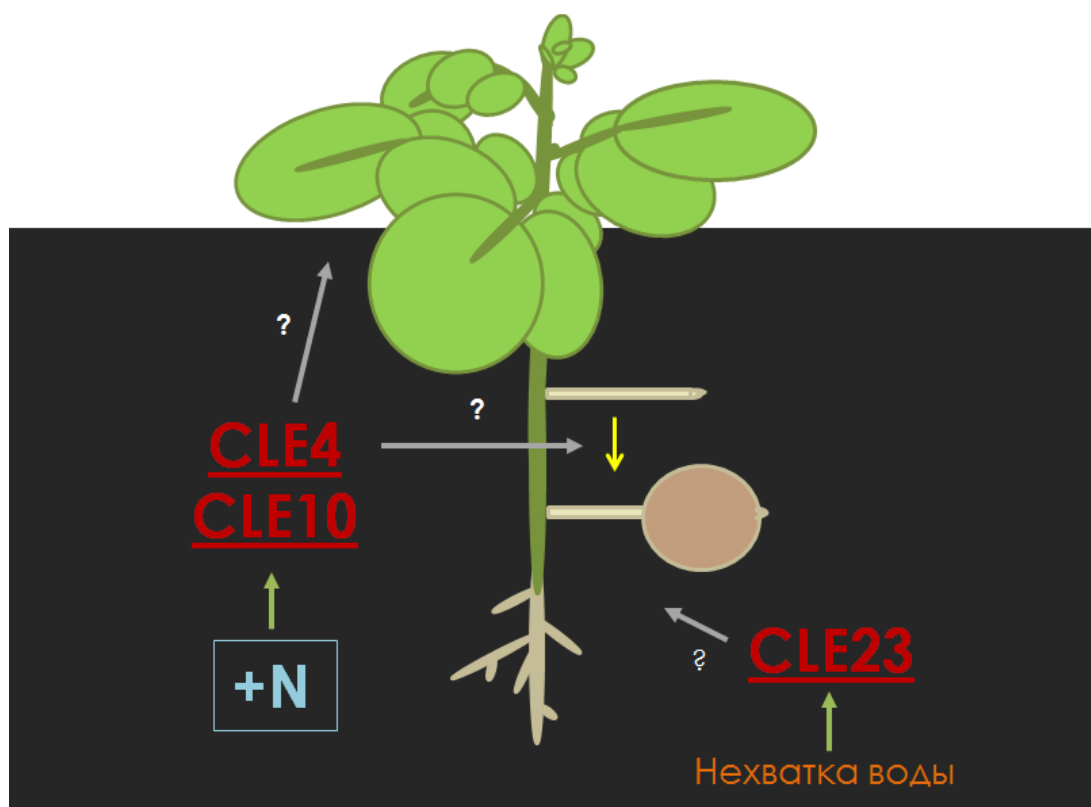


Рис. 18. Предполагаемая схема ответа картофеля на содержание азота и воды в среде с помощью пептидов CLE. Наличие азота в среде вызывает образование пептидов CLE4 и CLE10, которые могут быть вовлечены в клубнеобразование. Нехватка воды приводит к образованию пептида CLE23.

3.4. Поиск генов *CLE*, участвующих в утолщении клубня.

3.4.1. Поиск у картофеля гомологов генов *CLE* резуховидки, участвующих в росте утолщением.

При анализе последовательностей генов *StCLE* у картофеля были выявлены гомологи генов резуховидки, участвующих в росте утолщением (*StCLE8*, *StCLE12*) (Рис. 3). CLE-домены пептидов *StCLE8* и *StCLE12* оказались идентичны пептиду TDIF резуховидки *AtCLE41/AtCLE44* (Рис. 19). В настоящее время имеются данные об участии пептидов группы TDIF в утолщении побегов и корней, в частности – при формировании стволов древесных растений (Yue et al., 2020) и при развитии запасющих корней (Gancheva et al., 2016; Ганчева и др., 2018). В связи с этим, мы предположили, что пептиды *StCLE8* и *StCLE12* могут участвовать в регуляции роста утолщением при формировании клубня картофеля.

AtCLE44	H	E	V	P	S	G	P	N	P	I	S	N
AtCLE41	H	E	V	P	S	G	P	N	P	I	S	N
StCLE8	H	E	V	P	S	G	P	N	P	I	S	N
StCLE12	H	E	V	P	S	G	P	N	P	I	S	N
StCLE13	H	E	V	P	S	G	A	N	P	E	S	N
StCLE16	H	S	V	P	S	G	P	N	P	E	S	N

Рис. 19. Фрагмент выравнивания CLE доменов TDIF-подобных белков CLE, сделанного с помощью программы Ugene. Домены белков StCLE8 и StCLE12 идентичны доменам AtCLE41 и AtCLE44.

3.4.2. Анализ экспрессии генов *CLE* в клубне картофеля.

Если сравнивать количество транскриптов *StCLE* в молодом клубне и зрелом клубне, то выделяются гены *StCLE8*, *StCLE12* и *StCLE13*, экспрессия которых выше в зрелом клубне (Рис.6). В связи с тем, что CLE домены белков StCLE8 и StCLE12 идентичны CLE доменам AtCLE41 и AtCLE44, у резуховидки участвующих в утолщении, а также в связи с повышением их экспрессии в процессе утолщения клубня, для дальнейшего анализа мы выбрали гены *StCLE8* и *StCLE12*.

Первой задачей было определить ткань клубня, в которой экспрессируются гены *StCLE8* и *StCLE12*. Для этого клубень был разделен на 7 зон, примерно соответствующих разным слоям тканей, в которых были измерены относительные уровни экспрессии генов *StCLE8* и *StCLE12*. Зоны 1 и 2 соответствуют перидерме и коре, зона 3 - камбию, проводящим элементам и внешней части перимедуллярной зоны, зоны 4-6 - перимедуллярной зоне, зона 7 - сердцевине (Рис. 20). Наибольший уровень экспрессии ген *StCLE8* демонстрировал в третьей зоне, где находятся проводящие пучки с камбием, ксилемой и флоэмой, а также в зонах 4-6 (перимедуллярная зона), где располагаются паренхимные запасающие клетки, а также развивается внутренняя флоэма для снабжения клеток фотоассимилятами. Наименьший уровень экспрессии *StCLE8* демонстрировал в перидерме, коре и сердцевине (зоны 1, 2, 7) (Рис. 21). Ген *StCLE12* наоборот, на высоком уровне экспрессировался в коре, и по мере продвижения к сердцевине его экспрессия только снижалась (Рис. 21).

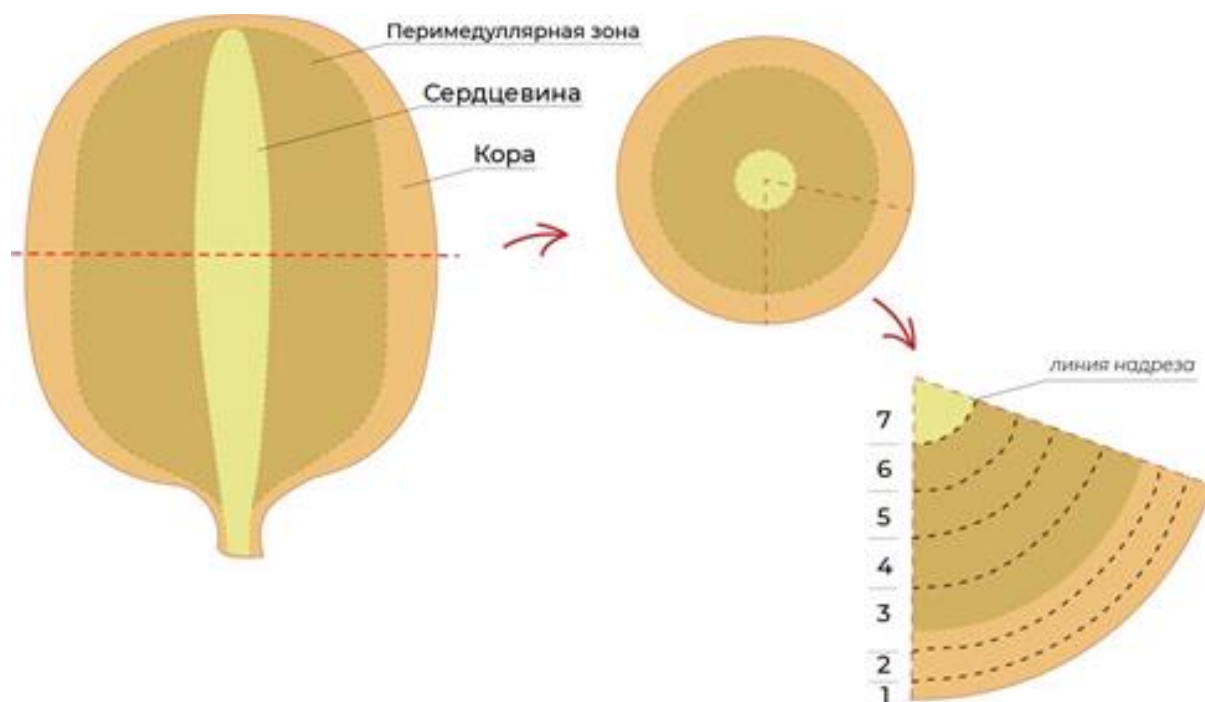


Рис. 20. Части клубня картофеля, взятые для анализа экспрессии генов *StCLE* и генов, кодирующих маркеры разных тканей растений.

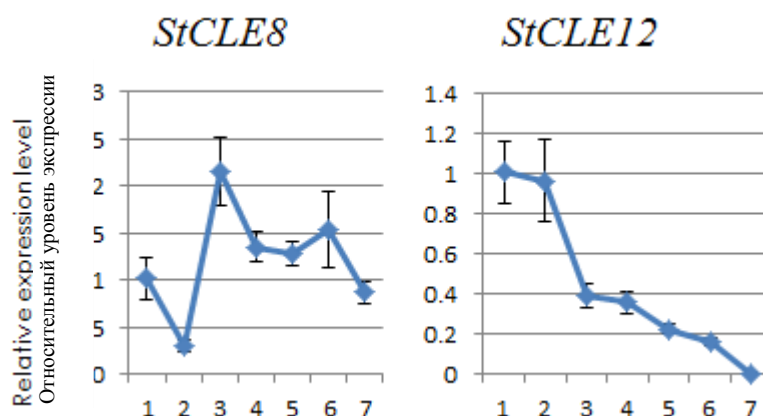


Рис. 21. Относительный уровень экспрессии генов *StCLE8* и *StCLE12* в частях клубня, соответствующих 1 - внешней части коры, 2 - внутренней части коры, 3 - зоне камбия, проводящих элементов и внешней части перимедуллярной зоны, 4,5,6 - перимедуллярной зоне, 7 - сердцевине. Представлены данные по трем аналитическим повторностям. Планки погрешностей указывают стандартные отклонения. График построен в Microsoft Excel.

Также был проведен корреляционный анализ в программе R (`corr.test, method = "spearman"`) для поиска взаимосвязи экспрессии генов *StCLE8* и *StCLE12* с экспрессией маркеров различных тканей клубня. В качестве маркера ксилемы были взяты гены *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6* (PGSC0003DMT400009136) и 7 (PGSC0003DMT400067086) (*VND6* и

7), кодирующие ТФ - регуляторы дифференцировки ксилемы; ген *CYCLINB1* (*CYCB1*) (PGSC0003DMT400018480), вовлеченный в клеточный цикл, был использован как маркер делящихся клеток камбия; ген *SUCROSE TRANSPORTER 2* (*SUC2*) (PGSC0003DMT400023804), кодирующий работающий во флоэме транспортер сахарозы - как маркер флоэмы (Malinowski et al., 2012). Оказалось, что характер экспрессии гена *StCLE8* коррелирует с экспрессией гена *SUC2* (коэффициент корреляции - 0.7194805, $p=0.0003496$) (Рис. 22), что позволяет предположить, что местом экспрессии гена *StCLE8* является флоэма, как это было показано для его гомологов - генов *AtCLE41/44* резуховидки. В то же время, выявить корреляцию с каким-либо геном-маркером ткани для *StCLE12* не удалось. Таким образом, *StCLE8* был выбран кандидатом на роль регулятора утолщения клубня у картофеля. *StCLE12* требует дальнейшего изучения, но уже не в рамках этой диссертационной работы.

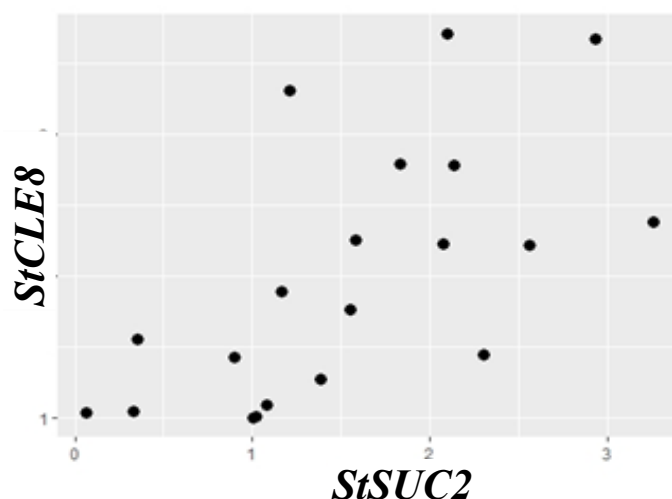


Рис. 22. График корреляции экспрессии генов *StCLE8* и *StSUC2*, построенный в программе R. Используются данные по четырем биологическим повторностям.

3.4.3. Анализ активности промотора гена *StCLE8* у картофеля.

Для анализа активности промотора гена *StCLE8*, который предположительно участвует в утолщении клубня, была выделена промоторная область этого гена в ~1800 нуклеотидов: от конца гена, находящегося перед геном *StCLE8*, и до старт-кодона самого гена *StCLE8*. Мы поместили эту промоторную область в вектор pHm43GW перед геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP) с сигналом ядерной локализации (NLS) (Рис. 23). Таким образом, в клетках, в которых активен промотор гена *StCLE8*, мы видели флуоресцирующие зеленым ядра.

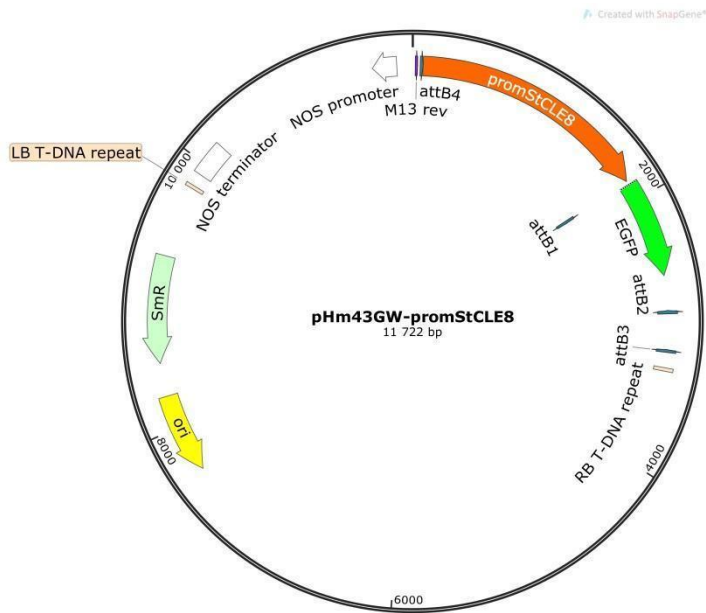


Рис. 23. Карта вектора для анализа активности промотора гена *StCLE8*, содержащий репортерный ген *GFP*. Карта построена в программе SnapGene.

Для анализа активности промотора *StCLE8* в клубне были получены полностью трансгенные растения картофеля благодаря трансформации листьев с помощью штамма *A. tumefaciens*, содержащего конструкцию pHm43GW-prom*StCLE8*. У таких растений мы обнаружили активность промотора гена *StCLE8* как в клубнях, так и в столонах (Рис. 24). В столонах сигнал GFP детектируется в клетках, сопровождающих сосуды ксилемы, а в клубне - в клетках перимедуллярной зоны, находящихся в основном в ее периферической части. Известно, что перимедуллярная зона выполняет главенствующую роль в развитии клубня, и деления клеток в ней продолжают до тех пор, пока клубень не достигнет своего окончательного размера (Xu et al., 1998). Клубень в итоге по большей части состоит из клеток перимедуллярной зоны, включающей в себя запасные паренхимные клетки, а также тяжёлые флоэмы, которые необходимы для обеспечения клеток фотоассимилятами, активно поступающими из листьев. Гомолог *StCLE8* – *AtCLE41/AtCLE44* резуховидки выполняет роль регулятора делений клеток камбия - меристемы, обеспечивающей рост утолщением. Обнаружение активности промотора гена *StCLE8* в клетках, находящихся на периферии перимедуллярной зоны клубня картофеля, позволяет предположить, что пептид *StCLE8* мог взять на себя функцию регулятора делений этой зоны.

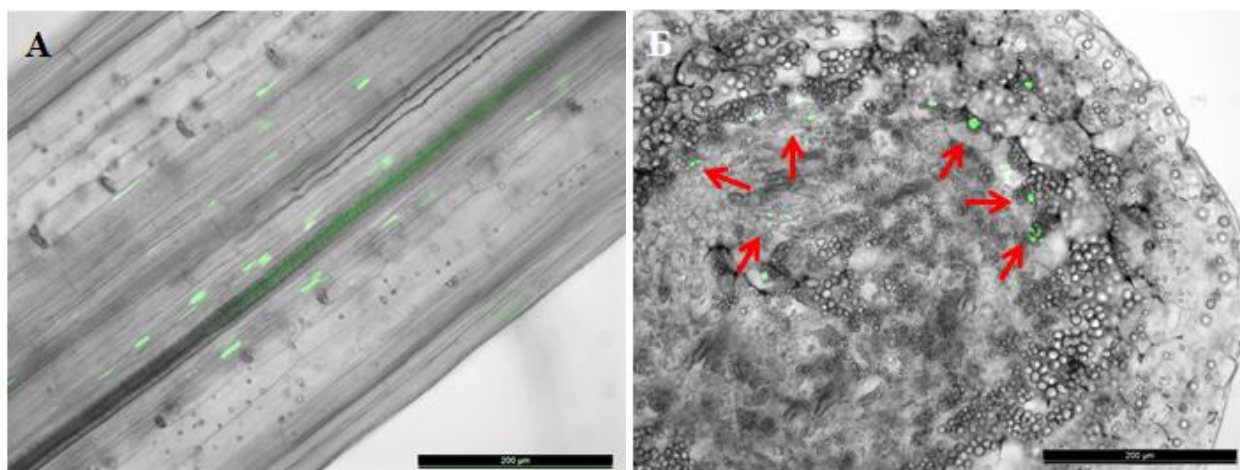


Рис. 24. Анализ активности промотора гена *StCLE8* в столоне и клубне трансгенных растений картофеля (растения были получены путем трансформации растений картофеля *A. tumefaciens*, несущим репортерный ген *GFP* с сигналом ядерной локализации под промотором *StCLE8*). А – Продольный срез столона картофеля. Б - Поперечный срез клубня картофеля. Стрелками указаны ядра, в которых детектирован сигнал GFP.

3.4.4. Изучение влияния сверхэкспрессии гена *StCLE8* на развитие картофеля.

Для дальнейшего изучения функций гена *StCLE8* была создана конструкция, в которой ген *StCLE8* помещался под контроль конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (Рис. 25). Такой промотор обеспечивает возрастание экспрессии находящихся под ним генов в сотни раз во всех трансформированных тканях растения.

Конструкцией 35S::*StCLE8* трансформировали листья картофеля с помощью *A. tumefaciens*. Были получены растения-регенеранты, проведено их генотипирование с помощью ПЦР и поставлена ПЦР-РВ для анализа уровня экспрессии перенесенного гена. Для большинства растений-регенерантов было выявлено наличие вставки (Рис. 26), однако не для всех было показано увеличение экспрессии гена *StCLE8*, что, возможно, связано с различным местом вставок этих конструкций в геном растений. В связи с этим, дальнейший отбор производился на основе ПЦР-РВ. Наиболее высокие уровни экспрессии *StCLE8* демонстрировали регенеранты под номерами 8#1, 8#4 и 8#27 (Рис. 27).

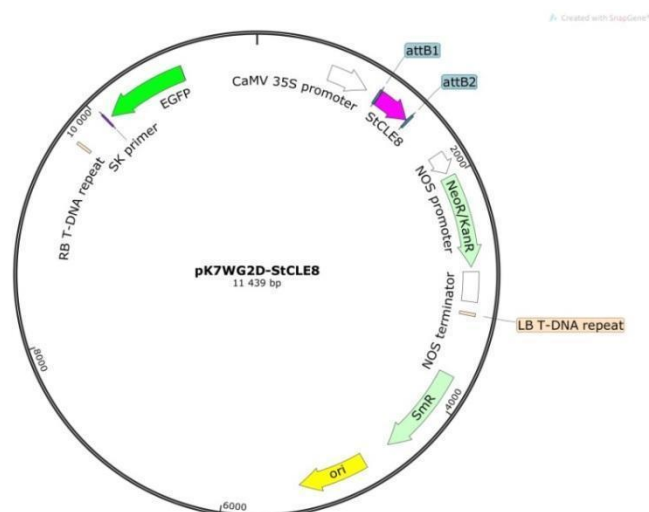


Рис. 25. Карта вектора для изучения эффекта сверхэкспрессии гена *StCLE8*, содержащий кодирующую последовательность изучаемого гена под контролем 35S промотора. Карта построена в программе SnapGene.

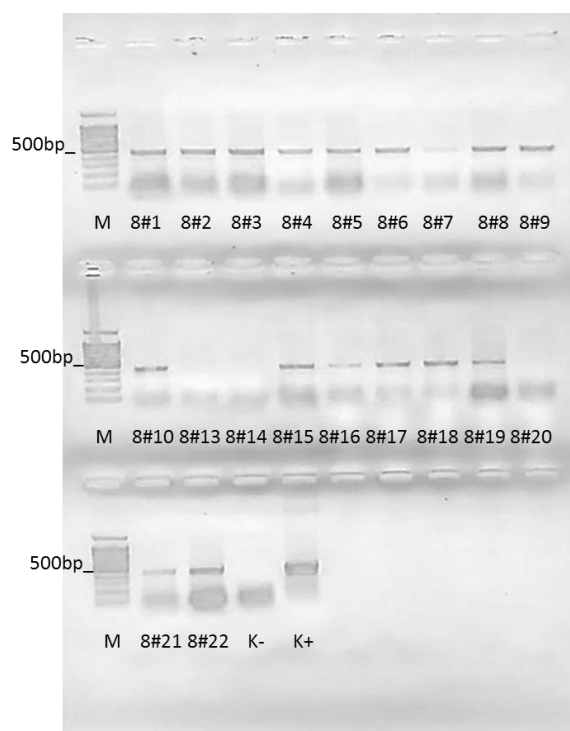


Рис. 26. Фотография результатов электрофореза (цвета инвертированы) генотипирования растений, полученных с помощью трансформации конструкциями 35S::*StCLE8* (8#номер регенеранта). Размер фрагмента для конструкции 35S::StCLE8 – 447 bp (использовались праймеры StCLE8F+T35SR). «М» - маркер длин ДНК 100+, «K-» - отрицательный контроль (использовалась ДНК нетрансформированных растений), «K+» - положительный контроль (использовалась конструкция 35S::StCLE8).

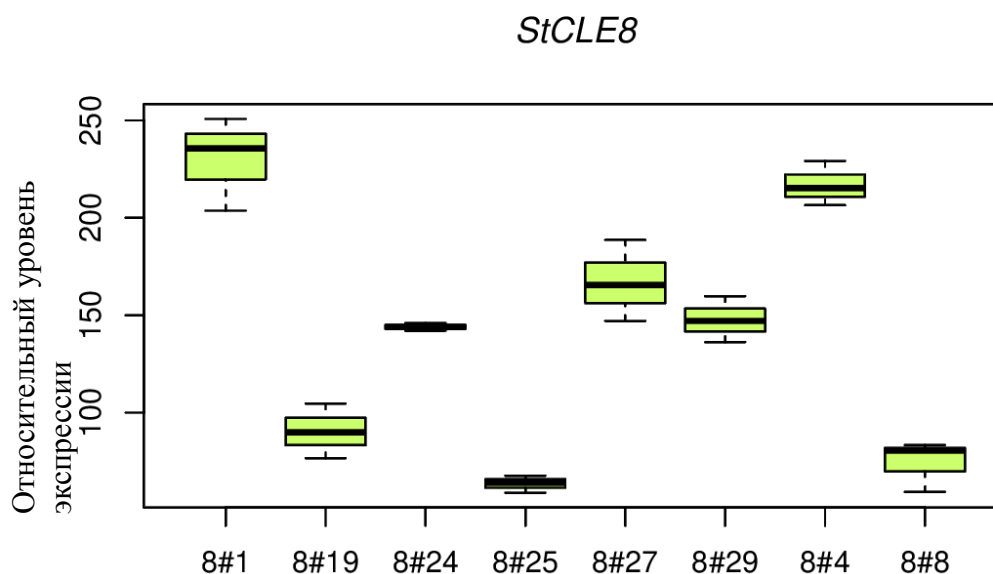


Рис. 27. Относительные уровни экспрессии гена *StCLE8* в растениях, несущих вставку *35S::StCLE8* (8# номер регенеранта) по сравнению с экспрессией в контрольных растениях. В качестве референсного гена использовался ген актина или убиквитина. В качестве материала были взяты верхушки растений ~1 см, растущих *in vitro*. Представлены данные по трем аналитическим повторностям. Графики построены с использованием функции `boxplot` в программе R.

Все растения со сверхэкспрессией *StCLE8* демонстрировали разрастание проводящих пучков в побеге (Рис. 28), как это было ранее показано при сверхэкспрессии генов, кодирующих CLE пептиды группы TDIF, у резуховидки (Smit et al., 2020; Etchells и Turner, 2010) и редиса (Gancheva et al., 2016; Ганчева и др., 2018). Пучки разрастаются из-за активных делений клеток камбия, деления которых при сверхэкспрессии *StCLE8* происходят неупорядоченно, в сравнении с четко ориентированными периклинальными делениями клеток камбия в контроле. Как и у резуховидки и редиса, у картофеля изменения при сверхэкспрессии гена, кодирующего пептид TDIF, коснулись только проводящих пучков, что вероятно связано с рецепторами этих пептидов - TDR, которые расположены на мембранах клеток камбия. Также при сверхэкспрессии *StCLE8* пропадают одревесневшие клетки паренхимы как в ксилеме, так и во флоэме; сходный эффект наблюдался на редисе при сверхэкспрессии гена *RsCLE41*, кодирующего пептид TDIF (Gancheva et al., 2016; Ганчева и др., 2018).

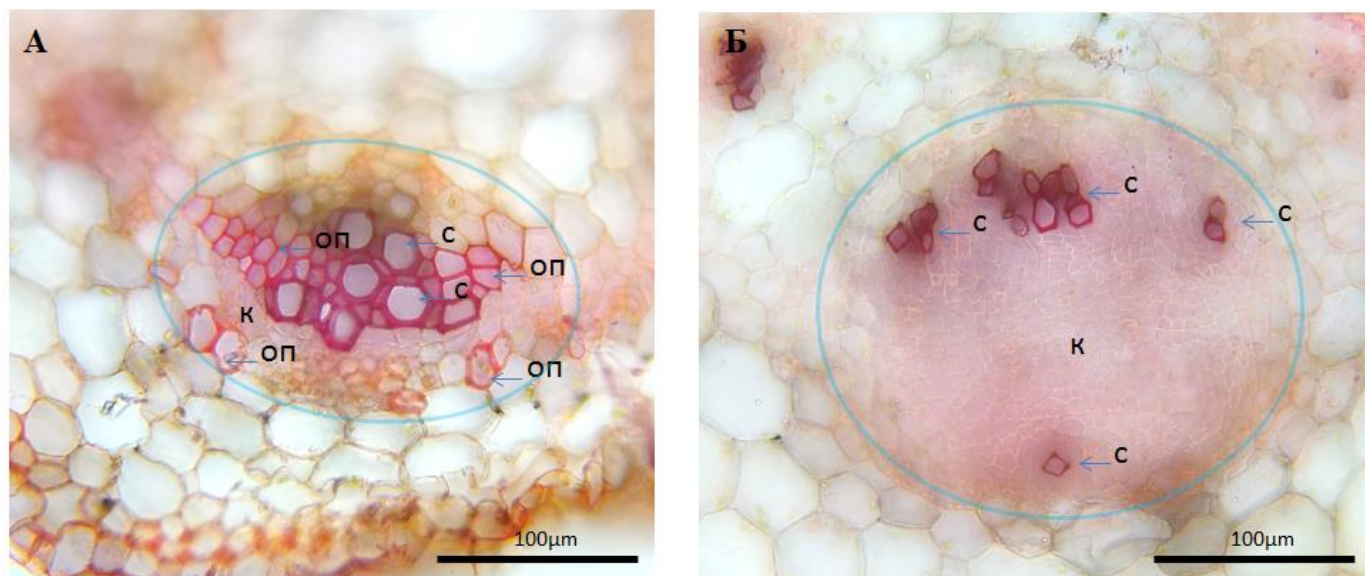


Рис. 28. Разрастание проводящих пучков в стебле картофеля со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (регенерант 8#24) (Б) по сравнению с контролем (А). Проводящие пучки обведены голубой линией. с - сосуды, оп - одревесневшая паренхима, к - камбий.

Общий вид растений со сверхэкспрессией *StCLE8* также отличался от контроля (Рис. 29): трансгенные растения формировали нерассеченные темно-зеленые листья, характеризовались замедленным ростом и более поздним формированием клубней. Помимо этого, у трансгенных растений наблюдалось активное образование столонов и клубней в узлах, а длина междоузлий увеличена (Рис. 29, 30). Вместе с тем, масса клубней у растений со сверхэкспрессией гена *StCLE8* была значимо меньше, чем у контрольных (Рис. 30). Однако сравнение анатомического строения клубней контрольных растений и растений со сверхэкспрессией *StCLE8* оказалось затруднено – в клубне паренхимные клетки ксилемы и флоэмы не одревесневают, не формируется кольцо камбия, а делящиеся ткани (кора, сердцевина и перимедуллярная зона) делятся во всех плоскостях. Все это затрудняет оценку влияния сверхэкспрессии *StCLE8* на эти ткани. В итоге, в клубнях трансгенных растений было установлено лишь разрастание проводящих пучков и деформация клеток покровной ткани - перидермы (Рис. 31). Вероятно, за счет нарушения строения перидермы клубни трансгенных растений, в отличие от контрольных, сморщивались при длительном хранении (Рис. 29 В, Г). В целом, можно заметить, что почти все события, происходящие при утолщении клубня, напоминают развитие проводящего пучка со сверхэкспрессией *StCLE8* – неупорядоченные деления клеток и отсутствие одревесневшей паренхимы.

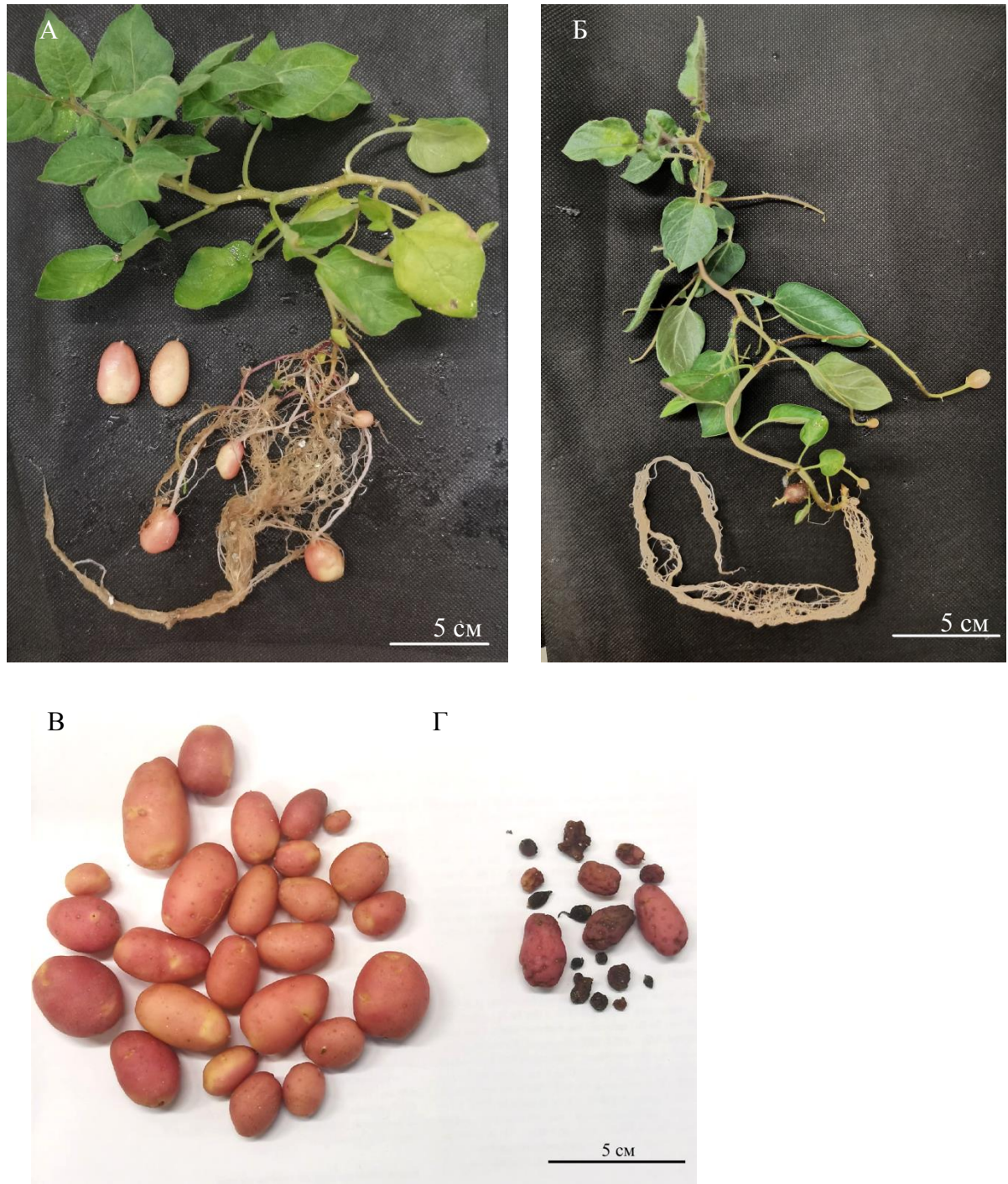


Рис. 29. Внешний вид контрольного растения (А) и растения со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (регенерант 8#24) (Б). Внешний вид клубней контрольных растений картофеля (В) и растений со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (Г) спустя месяц хранения.

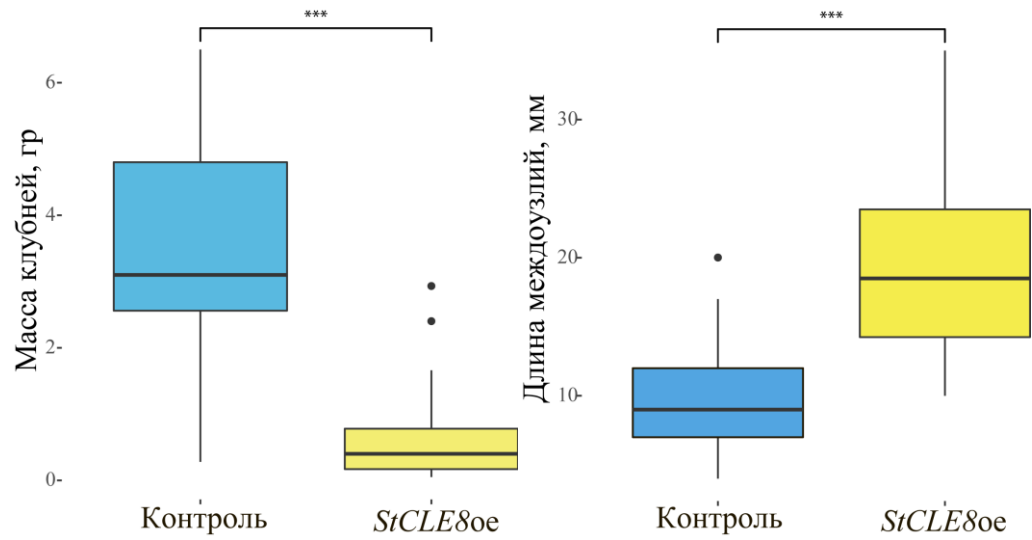


Рис. 30. Масса клубней и длина междоузлий контрольных растений со сверхэкспрессией *GUS* и растений со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (*StCLE8oe*). *** - $p < 0,001$.

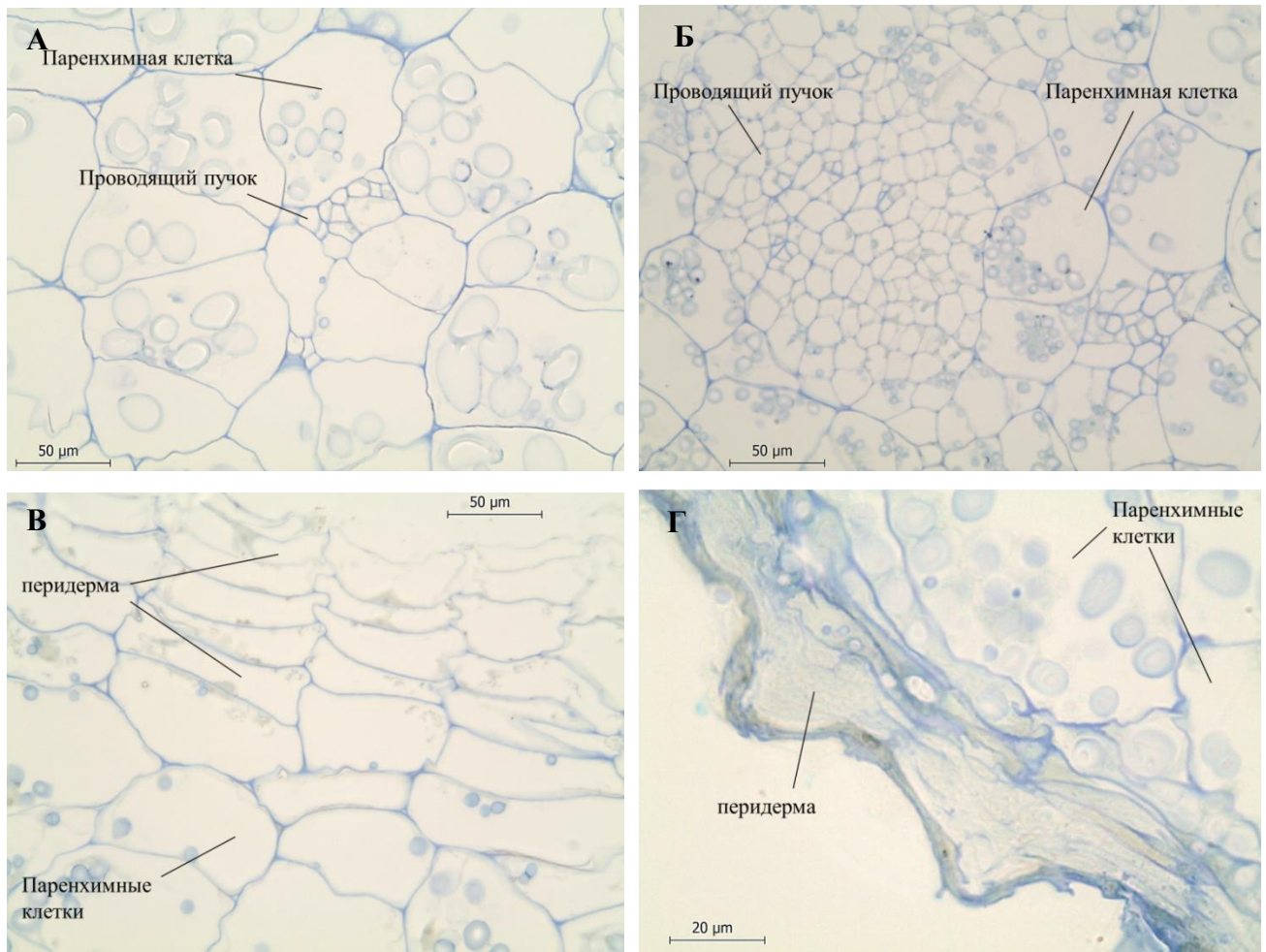


Рис. 31. Формирующиеся проводящие пучки в перимедуллярной зоне контрольного растения (А) и растения со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (Б). Перидерма клубней картофеля у контрольного растения (В) и растения со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (Г).

Итак, данные, полученные при анализе эффекта сверхэкспрессии гена *StCLE8* на развитие картофеля, подтверждают наше предположение о роли этого гена как регулятора деления клеток камбия: сверхэкспрессия *StCLE8* действительно вызывала разрастание проводящих пучков в стебле картофеля (в ~1,7 раз у регенеранта 8#24) и клубне картофеля. Вместе с тем, полученные нами эффекты сверхэкспрессии *StCLE8*, такие как замедление развития растений и снижение массы клубня, свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия этого гена в целом растении не является способом увеличения урожайности картофеля.

Итак, в нашей работе была впервые изучена роль пептидов CLE в клубнеобразовании у картофеля: были проанализированы последовательности генов *StCLE*, их экспрессия в разных тканях растений и при различных условиях; среди генов *StCLE* идентифицированы регуляторы утолщения клубня, а также возможные регуляторы ответа картофеля на увеличение уровня азота в почве и нехватку воды.

К числу основных достижений диссертационной работы можно отнести следующее:

1. Проведен анализ последовательностей пептидов CLE четырех культурных и трех диких видов картофеля. Также как у резуховидки и у томатов, в последовательностях белков CLE картофеля присутствует только один домен CLE. Консенсусная последовательность домена CLE картофеля отличается от последовательностей доменов CLE резуховидки и томата, но также демонстрирует 6 наиболее консервативных аминокислот.
2. С помощью ПЦР-РВ показано повышение уровней экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* на средах с азотом, уровня экспрессии гена *StCLE23* при нехватке воды и *StCLE8* при утолщении клубня.
3. Созданы конструкции для анализа эффекта сверхэкспрессии и активности промоторов генов *StCLE4*, *StCLE10* и *StCLE8*, а также конструкции для изучения взаимодействия ТФ StBEL5 с промоторами генов *StSP6A* и *StCLE4* с помощью дрожжевой одногибридной системы.
4. Проведен анализ активности промоторов генов *StCLE4*, *StCLE10* и *StCLE8*. Установлено, что промоторы генов *StCLE4* и *StCLE10* активны в проводящем цилиндре корня, и их активность выше в корнях растений, растущих на среде с азотом, по сравнению с растениями, растущих

на среде без азота. Промотор гена *StCLE8* активен в проводящих тканях столона и клубня.

5. Получены полностью трансгенные растения картофеля, содержащие конструкцию для сверхэкспрессии *StCLE8*. У трансформантов формируются проводящие пучки, разросшиеся из-за увеличенного количества клеток камбия, камбий не упорядочен, клетки ксилемной и флоэмной паренхимы не одревесневают, междоузлия удлинены, активно образуются столоны и снижен вес клубней.
6. С помощью дрожжевой одногибридной системы показано, что транскрипционный фактор BEL5 не взаимодействует с промотором гена *StCLE4*.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы изучали вовлеченность пептидов CLE в три процесса — регуляцию утолщения клубня картофеля, ответ на нехватку воды и на содержание азота в среде (Рис. 32).

В первую очередь, мы идентифицировали 42 гена картофеля, кодирующих пептиды CLE и присутствующих почти у всех проанализированных видов картофеля, как диких, так и культурных. Мы обнаружили гены, как очень похожие между собой у разных видов, так и имеющие значительные межвидовые различия. Так, в генах *S. commersonii*, предположительно, происходило наибольшее количество уникальных замен, что привело к серьезным отличиям его CLE от таковых у прочих видов картофеля. Связано это, возможно, с тем, что *S. commersonii* растет вне ареалов произрастания культурных видов картофеля и, вероятно, не входит в число предков культурного картофеля. Также мы выяснили, что у некоторых видов картофеля происходили замены в домене CLE, которые могли повлиять на функции соответствующих пептидов. Тем не менее, консенсусная последовательность пептидов CLE картофеля хоть и не идентична последовательностям резуховидки и томата, но содержит 6 наиболее консервативных аминокислот.

С помощью филогенетического анализа и сравнения АК последовательностей пептидов CLE по гомологии с генами резуховидки нами выявлены возможные участники утолщения клубня (StCLE8 и StCLE12) и ответа на азот (StCLE4, -5, -10, -11, -24, -25, -34, -41).

Мы предположили участие пептида StCLE8 в регуляции делений клеток клубня, на основании увеличения уровня экспрессии этого гена при утолщении клубня, а также наличия активности промотора гена *StCLE8* в клубне и влияния сверхэкспрессии *StCLE8* на разрастание проводящих пучков. Наличие у картофеля еще одной активно делящейся латеральной меристемы, перимедуллярной зоны, позволяет предположить, что деление ее клеток может регулироваться так же, как деление клеток камбия, так как эта зона пронизана сосудами флоэмы, в которой могут образовываться пептиды CLE группы TDIF. Тем не менее, мы выяснили, что сверхэкспрессии одного гена *StCLE8* недостаточно для повышения урожайности картофеля — напротив, сверхэкспрессия этого гена приводит к нарушениям развития растений и снижению массы клубней. Вероятно, для получения ожидаемого эффекта повышения экспрессии *StCLE8* на урожайность картофеля требуется более точное воздействие, например, активация экспрессии *StCLE8* в отдельных тканях клубня в результате помещения его под тканеспецифичный промотор (например, под промотор одного из генов, активных преимущественно в перимедуллярной зоне клубня).

Гены *StCLE4* и *StCLE10*, по нашим данным, экспрессируются в ответ на наличие азота в

среде, их промоторы в стеле корня активны в присутствии азота и, возможно, эти гены вовлечены в регуляцию клубнеобразования благодаря передаче сигнала о содержании азота в среде. Гомологи *StCLE4* и *StCLE10* у резуховидки и у бобовых растений активно вовлечены в передачу сигнала о наличии азота в среде, но если у резуховидки эти пептиды действуют локально, регулируя образование боковых корней, то у бобовых растений они вовлечены в системный ответ, отвечающий за образование азотфиксирующих клубеньков. Обнаруженные нами гены *StCLE4* и *StCLE10* могут быть вовлечены в ответ на азот любым вышеперечисленным способом, и дальнейшие исследования позволят понять их роль в развитии картофеля.

Для картофеля снижение концентрации азота в почве является сигналом о приближении неблагоприятных условий и известно, что внесение азота тормозит клубнеобразование. В связи с этим мы предположили вовлеченность азотного сигналинга в систему регуляции клубнеобразования. Ранее не изучалось участие индукторов клубнеобразования, таких как BEL5 и SP6A, в регуляции образования клубня в зависимости от азота, однако в работе Tiwari et al. (2020) в таблицах с дифференциально экспрессирующимися генов показано, что экспрессия *BEL5* возрастает в побеге при 4мМ содержании азота в среде по сравнению с 0,2 мМ. Данных о том, как этот ген экспрессируется при избыточном содержании азота, нет. Тем не менее, в работе Sharma et al. (2016) было показано, что BEL5 индуцирует экспрессию *StCLE4*. Однако с помощью дрожжевой одногибридной системы мы не выявили взаимодействия BEL5 с промоторной областью гена *StCLE4*, что не исключает наличие не прямой, а опосредованной регуляции его экспрессии с участием ТФ BEL5. Тем не менее, вопрос о функции *StCLE4* остается открытым, как и вопрос о вовлеченности BEL5 в реакцию картофеля на содержание азота в среде.

Помимо содержания азота в среде, важным фактором, регулирующим развитие картофеля, является оводненность почв. Нехватка воды негативно сказывается на росте растения, а также на клубнеобразовании. Среди генов *CLE* картофеля мы выявили тот, экспрессия которого возрастает в условиях дефицита воды. Кодированный им пептид, *StCLE23*, так же, как *AtCLE25* у резуховидки, может выступать в качестве сигнала, идущего из корня в лист и вызывающего закрытие устьиц для сохранения воды.

Многие вопросы, изучаемые в этой работе, требуют продолжения исследования. Так, прежде всего, остается вопрос, будет ли влиять сверхэкспрессия генов *StCLE4* и *StCLE10* на клубнеобразование. Даже если такое влияние будет замечено, то нужно будет показать, что пептиды *StCLE4* и *StCLE10* перемещаются из корней, а не действуют локально, регулируя,

например, развитие корней, как это происходит у резуховидки. Помимо этого, дальнейшего изучения требует вопрос об участии ТФ BEL5 в азотном сигналинге и в регуляции экспрессии генов *StCLE*. Также остается открытым вопрос об участии *StCLE8* в регуляции деления клеток перимедуллярной зоны клубня; интерес представляет и поиск регуляторов экспрессии гена *StCLE8*. Обнаруженное нами увеличение уровня экспрессии *StCLE23* в условиях нехватки воды тоже требует дальнейшего изучения. В целом, интерес представляет вопрос, насколько регуляторные сети, изученные на других объектах и обнаруженные нами у картофеля, видоизменены и включены в регуляцию клубнеобразования.

Полученные результаты в перспективе могут быть использованы для улучшения урожайности картофеля путем научно обоснованной селекции, а также для создания новых клубнеобразующих сортов растений, которые ранее клубни не образовывали.

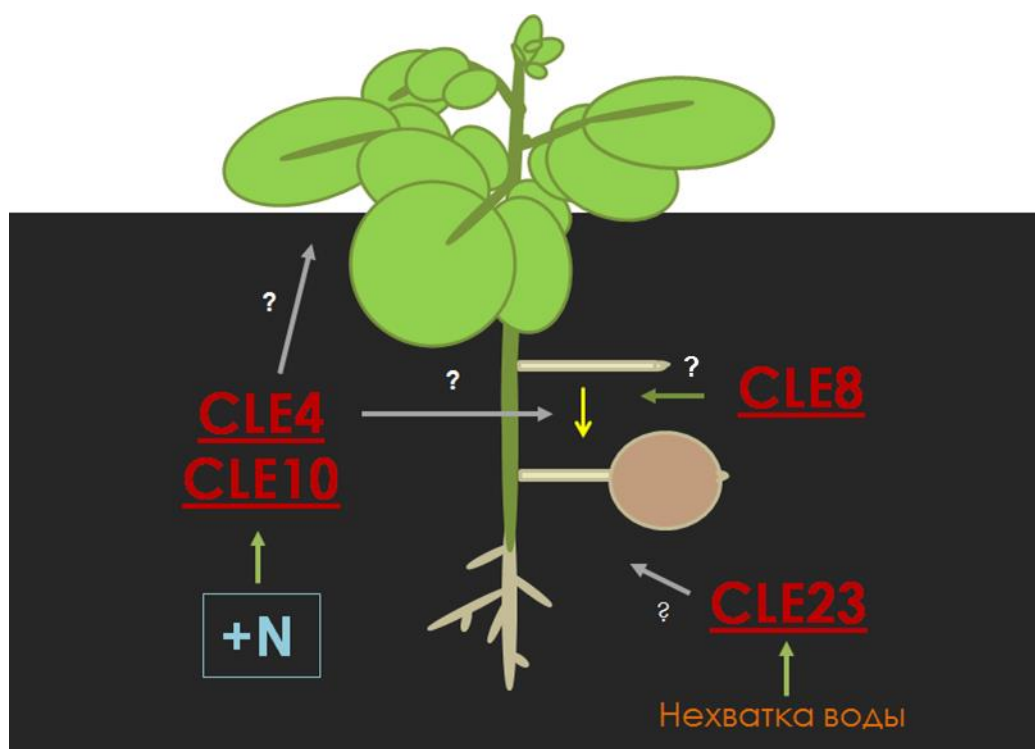


Рис. 32. Предполагаемая схема регуляции развития клубня у картофеля с помощью пептидов CLE. Пептиды CLE4 и CLE10 образуются в ответ на наличие азота в среде и могут влиять на клубнеобразование. Пептид CLE8 участвует в утолщении клубня. Пептид CLE23 образуется в ответ на нехватку воды.

5. ВЫВОДЫ

1. В геномах картофеля выявлено 42 гена *CLE*. В последовательностях белков CLE картофеля присутствует только один домен CLE. Консенсусная последовательность доменов CLE картофеля отличается от консенсусных последовательностей доменов CLE резуховидки и томата, но также демонстрирует 6 наиболее консервативных аминокислот.
2. Промоторы генов *Solanum tuberosum StCLE4* и *StCLE10* активны в проводящих тканях корня картофеля, и их активность увеличивается в ответ на повышение уровня азота в среде.
3. Экспрессия гена *StCLE23* возрастает в корне картофеля в условиях дефицита воды.
4. Ген *StCLE8* экспрессируется в тканях клубня, ответственных за утолщение: проводящих пучках и перимедуллярной зоне. Его экспрессия возрастает при утолщении клубня. Сверхэкспрессия гена *StCLE8* вызывает разрастание проводящих пучков стебля вследствие увеличенного количества слоев камбия, нарушение упорядоченного строения проводящих пучков, подавление одревеснения ксилемной и флоэмной паренхимы, образование столонов и клубней в узлах и снижение массы клубней.
5. Не выявлено взаимодействие транскрипционного фактора BEL5 с промоторной областью гена *StCLE4*.

6. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенова НП, Константинова ТН, Голяновская СА, Сергеева ЛИ, Романов ГА. Гормональная регуляция клубнеобразования у картофеля. Физиология растений. 2012;.59(4):491-508.
2. Ганчева МС, Додуева ИЕ, Лутова ЛА. Роль пептида CLE41 в развитии запасающей паренхимы корня у представителей рода *Raphanus*. Физиология растений. 2018;65:279-293.
3. Ганчева МС, Лосев МР, Гурина АА, Полюшкевич ЛО, Додуева ИЕ, Лутова ЛА. Полиморфизм последовательностей генов CLE картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(6).
4. Ганчева МС, Маловичко ЮВ, Полюшкевич ЛО, Додуева ИЕ, Лутова ЛА. Пептидные гормоны растений. Физиология растений. 2019;66(2):83–103.
5. Ефремов СИ. Анатомия картофеля. Орел. 1958. 234 с.
6. Колачевская ОО. Влияние гена биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифического промотора на клубнеобразование картофеля *in vitro*. Диссертация кандидата биологических наук. Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН. Москва. 2015.
7. Чайлахян МХ. Фотопериодическая и гормональная регуляция клубнеобразования у растений. Наука. 1984, 69 с.
8. Юзепчук СВ., Букасов СМ. К вопросу о происхождении картофеля. Труды Всесоюзного съезда по генетике, селекции и семеноводству. Ленинград. 1929;3:593 – 611.
9. Abelenda JA, Cruz-Oró E, Franco-Zorrilla JM, Prat S. Potato StCONSTANS-like1 Suppresses Storage Organ Formation by Directly Activating the FT-like StSP5G Repressor. Curr Biol. 2016;26(7):872-881. doi:10.1016/j.cub.2016.01.066
10. Abelenda JA, Navarro C, Prat S. From the model to the crop: genes controlling tuber formation in potato. Curr Opin Biotechnol. 2011;22(2):287-292. doi:10.1016/j.copbio.2010.11.013
11. Araya T, Miyamoto M, Wibowo J, et al. CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(5):2029-2034. doi:10.1073/pnas.1319953111
12. Araya T, von Wirén N, Takahashi H. CLE peptides regulate lateral root development in response to nitrogen nutritional status of plants. Plant Signal Behav. 2014;9(7):e29302. doi:10.4161/psb.29302
13. Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ. Dynamics of a mobile

- RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell*. 2006;18(12):3443-3457. doi:10.1105/tpc.106.042473
14. Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK. MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol*. 2014;164(2):1011-1027. doi:10.1104/pp.113.230714
 15. Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Simon R. Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol*. 2010;152(1):166-176. doi:10.1104/pp.109.149930
 16. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol*. 2016; 34: 525–527. doi:10.1038/nbt.3519
 17. Castaings L, Camargo A, Pocholle D, et al. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis. *Plant J*. 2009;57(3):426-435. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03695.x
 18. Chen H, Banerjee AK, Hannapel DJ. The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga2ox1*. *Plant J*. 2004;38(2):276-284. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02048.x
 19. Cho SK, Sharma P, Butler NM, et al. Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with StBEL5 RNA. *J Exp Bot*. 2015;66(21):6835-6847. doi:10.1093/jxb/erv389
 20. Cock JM, McCormick S. A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiol*. 2001;126(3):939-942. doi:10.1104/pp.126.3.939
 21. Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*. 2007;316(5827):1030-1033. doi:10.1126/science.1141752
 22. Crawford NM, Forde BG. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0011. doi:10.1199/tab.0011
 23. Cutter, E. G. Structure and development of the potato plant. *The Potato Crop*. 1992. P. 65–161. doi:10.1007/978-94-011-2340-2_3
 24. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2005 Sep;139(1):5-17. doi: 10.1104/pp.105.063743
 25. Daum G, Medzihradszky A, Suzaki T, Lohmann JU. A mechanistic framework for noncell

- autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(40):14619-14624. doi:10.1073/pnas.1406446111
26. Davies S. E. W. Transcription factor interactions at the promoter of the Arabidopsis circadian clock gene LHY. PhD thesis, University of Warwick. 2013.
 27. de Bang TC, Lay KS, Scheible WR, Takahashi H. Small peptide signaling pathways modulating macronutrient utilization in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2017;39:31-39. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.005
 28. Depuydt S, Rodriguez-Villalon A, Santuari L, Wyser-Rmili C, Ragni L, Hardtke CS. Suppression of Arabidopsis protophloem differentiation and root meristem growth by CLE45 requires the receptor-like kinase BAM3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):7074-7079. doi:10.1073/pnas.1222314110
 29. DeYoung BJ, Bickle KL, Schrage KJ, Muskett P, Patel K, Clark SE. The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. *Plant J*. 2006;45(1):1-16. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02592.x
 30. Deyoung BJ, Clark SE. BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with CLAVATA signaling. *Genetics*. 2008;180(2):895-904. doi:10.1534/genetics.108.091108
 31. Etchells JP, Provost CM, Mishra L, Turner SR. WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*. 2013;140(10):2224-2234. doi:10.1242/dev.091314
 32. Etchells JP, Turner SR. The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development*. 2010;137(5):767-774. doi:10.1242/dev.044941
 33. Ewing EE, Struik PC. Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. *Hortic. Rev*. 1992. 14:89–198
 34. Felsenstein J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution*. 1985;39(4):783-791. doi:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
 35. Fisher K, Turner S. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol*. 2007;17(12):1061-1066. doi:10.1016/j.cub.2007.05.049
 36. Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science*. 1999;283(5409):1911-1914. doi:10.1126/science.283.5409.1911

37. Gancheva MS, Dodueva IE, Lebedeva MA, Tvorogova VE, Tkachenko AA, Lutova LA. Identification, expression, and functional analysis of CLE genes in radish (*Raphanus sativus* L.) storage root. BMC Plant Biol. 2016 Jan 27;16 Suppl 1(Suppl 1):7. doi: 10.1186/s12870-015-0687-y
38. Gancheva M, Dodueva I, Lebedeva M, Lutova L. *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE)* Gene Family in Potato (*Solanum tuberosum* L.): Identification and Expression Analysis. *Agronomy*. 2021; 11(5):984. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050984>
39. Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc. 2007; 2: 31-4
40. Goad DM, Zhu C, Kellogg EA. Comprehensive identification and clustering of CLV3/ESR-related (CLE) genes in plants finds groups with potentially shared function. New Phytol. 2017;216(2):605-616. doi:10.1111/nph.14348
41. Gregory EF, Dao TQ, Alexander MA, Miller MJ, Fletcher JC. The signaling peptide-encoding genes CLE16, CLE17 and CLE27 are dispensable for Arabidopsis shoot apical meristem activity. PLoS One. 2018;13(8):e0202595. Published 2018 Aug 16. doi:10.1371/journal.pone.0202595
42. Guan P, Ripoll JJ, Wang R, et al. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(9):2419-2424. doi:10.1073/pnas.1615676114
43. Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. Plant Cell. 2001 Aug;13(8):1761-77. doi: 10.11054/tpc.010126. PMID: 11487691; PMCID: PMC139138
44. Gutaker RM, Weiß CL, Ellis D, et al. The origins and adaptation of European potatoes reconstructed from historical genomes. Nat Ecol Evol. 2019;3(7):1093-1101. doi:10.1038/s41559-019-0921-3
45. Gutiérrez-Alanís D, Yong-Villalobos L, Jiménez-Sandoval P, et al. Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. Dev Cell. 2017;41(5):555-570.e3. doi:10.1016/j.devcel.2017.05.009
46. Hamant O, Pautot V. Plant development: a TALE story. C R Biol. 2010;333(4):371-381. doi:10.1016/j.crv.2010.01.015

47. Han H, Liu X, Zhou Y. Transcriptional circuits in control of shoot stem cell homeostasis. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;53:50-56. doi:10.1016/j.pbi.2019.10.004
48. Han S, Cho H, Noh J, et al. BIL1-mediated MP phosphorylation integrates PXY and cytokinin signalling in secondary growth. *Nat Plants.* 2018;4(8):605-614. doi:10.1038/s41477-018-0180-3
49. Hannapel DJ, Banerjee AK. Multiple Mobile mRNA Signals Regulate Tuber Development in Potato. *Plants (Basel).* 2017;6(1):8. Published 2017 Feb 10. doi:10.3390/plants6010008
50. Hayashi N, Tetsumura T, Sawa S, Wada T, Tominaga-Wada R. CLE14 peptide signaling in Arabidopsis root hair cell fate determination. *Plant Biotechnol (Tokyo).* 2018;35(1):17-22. doi:10.5511/plantbiotechnology.18.0122a
51. Hayward H. E. The Structure of Economic Plants. *Soil Science* 48. 1938. P. 358.
52. Hazak O, Brandt B, Cattaneo P, et al. Perception of root-active CLE peptides requires CORYNE function in the phloem vasculature. *EMBO Rep.* 2017;18(8):1367-1381. doi:10.15252/embr.201643535
53. Hirakawa Y, Bowman JL. A Role of TDIF Peptide Signaling in Vascular Cell Differentiation is Conserved Among Euphyllophytes. *Front Plant Sci.* 2015 Nov 26;6:1048. doi:10.3389/fpls.2015.01048
54. Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, et al. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15208-15213. doi:10.1073/pnas.0808444105
55. Hirakawa Y, Torii KU, Uchida N. Mechanisms and Strategies Shaping Plant Peptide Hormones. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(8):1313-1318. doi:10.1093/pcp/pcx069
56. Hobe M, Müller R, Grünwald M, Brand U, Simon R. Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev Genes Evol.* 2003;213(8):371-381. doi:10.1007/s00427-003-0329-5
57. Hu C, Zhu Y, Cui Y, et al. A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell homeostasis. *Nat Plants.* 2018;4(4):205-211. doi:10.1038/s41477-018-0123-z
58. Ilina EL, Kiryushkin AS, Semenova VA, Demchenko NP, Pawlowski K, Demchenko KN. Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of Cucurbita pepo: is auxin a key player?. *Ann Bot.* 2018;122(5):873-888. doi:10.1093/aob/mcy052
59. Ilina EL, Kiryushkin AS, Semenova VA, Demchenko NP, Pawlowski K, Demchenko KN. Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of Cucurbita pepo: is

- auxin a key player?. *Ann Bot.* 2018;122(5):873-888. doi:10.1093/aob/mcy052
60. Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science.* 2005 Jul 8;309(5732):293-7. doi: 10.1126/science.1110586
 61. Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, et al. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science.* 2006;313(5788):842-845. doi:10.1126/science.1128436
 62. Jackson SD, James P, Prat S, Thomas B. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization. *Plant Physiol.* 1998;117(1):29-32. doi:10.1104/pp.117.1.29
 63. Jaeger KE, Wigge PA. FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2007;17(12):1050-1054. doi:10.1016/j.cub.2007.05.008
 64. Jun J, Fiume E, Roeder AH, et al. Comprehensive analysis of CLE polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2010;154(4):1721-1736. doi:10.1104/pp.110.163683
 65. Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, et al. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science.* 1999;286(5446):1962-1965. doi:10.1126/science.286.5446.1962
 66. Kim HJ, Wu CY, Yu HM, Sheen J, Lee H. Dual CLAVATA3 Peptides in Arabidopsis Shoot Stem Cell Signaling. *J Plant Biol.* 2017;60(5):506-512. doi:10.1007/s12374-017-0083-2
 67. Klaassen MT, Dees DCT, Garrido RM, et al. Overexpression of a putative nitrate transporter (StNPF1.11) increases plant height, leaf chlorophyll content and tuber protein content of young potato plants. *Funct Plant Biol.* 2020;47(5):464-472. doi:10.1071/FP19342
 68. Kloosterman B, Abelenda JA, Gomez Mdel M, et al. Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature.* 2013;495(7440):246-250. doi:10.1038/nature11912
 69. Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science.* 1999;286(5446):1960-1962. doi:10.1126/science.286.5446.1960
 70. Kondhare KR, Vetal PV, Kalsi HS, Banerjee AK. BEL1-like protein (StBEL5) regulates CYCLING DOF FACTOR1 (StCDF1) through tandem TGAC core motifs in potato. *J Plant Physiol.* 2019;241:153014. doi:10.1016/j.jplph.2019.153014
 71. Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, et al. A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science.* 2006;313(5788):845-848. doi:10.1126/science.1128439
 72. Kondo Y, Fukuda H. The TDIF signaling network. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;28:106-110.

- doi:10.1016/j.pbi.2015.10.002
73. Konishi M, Yanagisawa S. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat Commun.* 2013;4:1617. doi:10.1038/ncomms2621
 74. Konishi M, Yanagisawa S. The role of protein-protein interactions mediated by the PB1 domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression. *BMC Plant Biol.* 2019;19(1):90. Published 2019 Feb 28. doi:10.1186/s12870-019-1692-3
 75. Krapp A, David LC, Chardin C, et al. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2014;65(3):789-798. doi:10.1093/jxb/eru001
 76. Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM. Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol.* 2010;11(12):R123. doi:10.1186/gb-2010-11-12-r123
 77. Krouk G, Ruffel S, Gutiérrez RA, et al. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.* 2011;16(4):178-182. doi:10.1016/j.tplants.2011.02.004
 78. Kumar A, Kondhare KR, Vetel PV, Banerjee AK. PcG Proteins MSI1 and BMI1 Function Upstream of miR156 to Regulate Aerial Tuber Formation in Potato. *Plant Physiol.* 2020;182(1):185-203. doi:10.1104/pp.19.00416
 79. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
 80. Lark RM, Milne AE, Addiscott TM, Goulding KWT, Webster CP, O'Flaherty S. Scale- and location-dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties, an analysis using wavelets. *European Journal of Soil Science.* 2004. 55, 611–627
 81. Lehretz GG, Sonnewald S, Hornyik C, Corral JM, Sonnewald U. Post-transcriptional Regulation of FLOWERING LOCUS T Modulates Heat-Dependent Source-Sink Development in Potato. *Curr Biol.* 2019;29(10):1614-1624.e3. doi:10.1016/j.cub.2019.04.027
 82. Leibfried A, To JP, Busch W, et al. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature.* 2005;438(7071):1172-1175. doi:10.1038/nature04270
 83. Lin T, Sharma P, Gonzalez DH, Viola IL, Hannapel DJ. The impact of the long-distance transport of a BEL1-like messenger RNA on development. *Plant Physiol.* 2013;161(2):760-772. doi:10.1104/pp.112.209429
 84. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

85. Mahajan A, Bhogale S, Kang IH, Hannapel DJ, Banerjee AK. The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Mol Biol.* 2012;79(6):595-608. doi:10.1007/s11103-012-9931-0
86. Malinowski R, Smith JA, Fleming AJ, Scholes JD, Rolfe SA. Gall formation in clubroot-infected *Arabidopsis* results from an increase in existing meristematic activities of the host but is not essential for the completion of the pathogen life cycle. *Plant J.* 2012 Jul;71(2):226-38. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04983.x. Epub 2012 May 14. PMID: 22394393.
87. Marchive C, Roudier F, Castaings L, et al. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat Commun.* 2013;4:1713. doi:10.1038/ncomms2650
88. Martin A, Adam H, Díaz-Mendoza M, Zurczak M, González-Schain ND, Suárez-López P. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development.* 2009;136(17):2873-2881. doi:10.1242/dev.031658
89. Mathieu J, Warthmann N, Küttner F, Schmid M. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 2007;17(12):1055-1060. doi:10.1016/j.cub.2007.05.009
90. Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell.* 1998;95(6):805-815. doi:10.1016/s0092-8674(00)81703-1
91. Meng L, Feldman LJ. CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis*. *Planta.* 2010;232(5):1061-1074. doi:10.1007/s00425-010-1236-4
92. Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot.* 2007;58(9):2297-2306. doi:10.1093/jxb/erm066
93. Motte H, Vanneste S, Beeckman T. Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annu Rev Plant Biol.* 2019 Apr 29;70:465-488. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100423
94. Müller J, Wang Y, Franzen R, Santi L, Salamini F, Rohde W. In vitro interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of *Knox* gene function. *Plant J.* 2001;27(1):13-23. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01064.x
95. Muñoz García MN, Stritzler M, Capiati DA. Heterologous expression of *Arabidopsis* ABF4 gene in potato enhances tuberization through ABA-GA crosstalk regulation. *Planta.*

- 2014;239(3):615-631. doi:10.1007/s00425-013-2001-2
96. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15:473–479
 97. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(19):4321-4325. doi:10.1093/nar/8.19.4321
 98. Navarro C, Abelenda JA, Cruz-Oró E, et al. Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*. 2011;478(7367):119-122. Published 2011 Sep 25. doi:10.1038/nature10431
 99. Nishida H, Tanaka S, Handa Y, et al. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*. 2018;9(1):499. Published 2018 Feb 5. doi:10.1038/s41467-018-02831-x
 100. Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y. Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*. 2008;319(5861):294. doi:10.1126/science.1150083
 101. Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y. Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*. 2008;319(5861):294. doi:10.1126/science.1150083
 102. Ohyama K, Shinohara H, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Chem Biol*. 2009;5(8):578-580. doi:10.1038/nchembio.182
 103. Okamoto M, Kumar A, Li W, et al. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol*. 2006;140(3):1036-1046. doi:10.1104/pp.105.074385
 104. Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol*. 2009 Jan;50(1):67-77. doi: 10.1093/pcp/pcn194
 105. Okamoto S, Tabata R, Matsubayashi Y. Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2016;34:35-40. doi:10.1016/j.pbi.2016.07.009
 106. Orsel M, Chopin F, Leleu O, et al. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol*. 2006;142(3):1304-1317. doi:10.1104/pp.106.085209
 107. Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*. 1995 Mar 24;80(6):847-57. doi: 10.1016/0092-8674(95)90288-0
 108. Qian P, Song W, Yokoo T, et al. Author Correction: The CLE9/10 secretory peptide regulates

- stomatal and vascular development through distinct receptors. *Nat Plants*. 2019;5(2):238. doi:10.1038/s41477-018-0347-y
109. Ren SC, Song XF, Chen WQ, Lu R, Lucas WJ, Liu CM. CLE25 peptide regulates phloem initiation in *Arabidopsis* through a CLERK-CLV2 receptor complex. *J Integr Plant Biol*. 2019;61(10):1043-1061. doi:10.1111/jipb.12846
 110. Richards S, Wink RH, Simon R. Mathematical modelling of WOX5- and CLE40-mediated columella stem cell homeostasis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 2015;66(17):5375-5384. doi:10.1093/jxb/erv257
 111. Rosin FM, Hart JK, Horner HT, Davies PJ, Hannapel DJ. Overexpression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. *Plant Physiol*. 2003;132(1):106-117. doi:10.1104/pp.102.015560
 112. Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM. Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(45):18524-18529. doi:10.1073/pnas.1108684108
 113. Rutjens B, Bao D, van Eck-Stouten E, Brand M, Smeekens S, Proveniers M. Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant J*. 2009;58(4):641-654. doi:10.1111/j.1365-3113X.2009.03809.x
 114. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
 115. Sambrook, J.; Russell, D. W. Preparation and Transformation of Competent *E. Coli* Using Calcium Chloride. *Cold Spring Harb Protoc* 2006, pdb.prot3932. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3932>.
 116. Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*. 1999;402(6758):191-195. doi:10.1038/46058
 117. Schlereth A, Möller B, Liu W, et al. MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature*. 2010;464(7290):913-916. doi:10.1038/nature08836
 118. Sharma P, Lin T, Hannapel DJ. Targets of the StBEL5 Transcription Factor Include the FT Ortholog StSP6A. *Plant Physiol*. 2016;170(1):310-324. doi:10.1104/pp.15.01314
 119. Shimizu N, Ishida T, Yamada M, et al. BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide-triggered growth inhibition in *Arabidopsis* root. *New Phytol*. 2015;208(4):1104-1113. doi:10.1111/nph.13520

120. Smit ME, McGregor SR, Sun H, et al. A PXY-Mediated Transcriptional Network Integrates Signaling Mechanisms to Control Vascular Development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2020;32(2):319-335. doi:10.1105/tpc.19.00562
121. Smith HM, Hake S. The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the Arabidopsis inflorescence. *Plant Cell*. 2003;15(8):1717-1727. doi:10.1105/tpc.012856
122. Song XF, Guo P, Ren SC, Xu TT, Liu CM. Antagonistic peptide technology for functional dissection of CLV3/ESR genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2013;161(3):1076-1085. doi:10.1104/pp.112.211029
123. Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2019-2025. doi:10.1038/nprot.2006.286
124. Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, et al. Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr Biol*. 2013;23(5):362-371. doi:10.1016/j.cub.2013.01.045
125. Stahl Y, Simon R. Is the Arabidopsis root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4?. *Plant Signal Behav*. 2009;4(7):634-635. doi:10.4161/psb.4.7.8970
126. Takahashi F, Suzuki T, Osakabe Y, et al. A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*. 2018;556(7700):235-238. doi:10.1038/s41586-018-0009-2
127. Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*. 2007;316(5827):1033-1036. doi:10.1126/science.1141753
128. Taoka K, Ohki I, Tsuji H, et al. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*. 2011;476(7360):332-335. Published 2011 Jul 31. doi:10.1038/nature10272
129. Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka KI. Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. *Plant Cell Physiol*. 2017;58(2):365-374. doi:10.1093/pcp/pcw197
130. Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka KI. Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. *Plant Cell Physiol*. 2017;58(2):365-374. doi:10.1093/pcp/pcw197
131. Tiwari JK, Buckseth T, Zinta R, et al. Transcriptome analysis of potato shoots, roots and stolons under nitrogen stress. *Sci Rep*. 2020;10(1):1152. Published 2020 Jan 24.

- doi:10.1038/s41598-020-58167-4
132. Van den Eede G, Deblaere R, Goethals K, Van Montagu M, Holsters M. Broad host range and promoter selection vectors for bacteria that interact with plants. *Mol Plant Microbe Interact*. 1992 May-Jun;5(3):228-34. doi: 10.1094/mpmi-5-228
 133. Van Eck J. Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. *Curr Opin Biotechnol*. 2018 Feb;49:35-41. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.012
 134. Viola R, Pelloux J, van der Ploeg A, et al. Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant Cell Environ*. 2007;30(8):973-983. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01692.x
 135. Whitewoods CD, Cammarata J, Nemec Venza Z, et al. CLAVATA Was a Genetic Novelty for the Morphological Innovation of 3D Growth in Land Plants [published correction appears in *Curr Biol*. 2020 Jul 6;30(13):2645-2648]. *Curr Biol*. 2018;28(15):2365-2376.e5. doi:10.1016/j.cub.2018.05.068
 136. Whitford R, Fernandez A, De Groodt R, Ortega E, Hilson P. Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(47):18625-18630. doi:10.1073/pnas.0809395105
 137. Wirth J, Chopin F, Santoni V, et al. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2007;282(32):23541-23552. doi:10.1074/jbc.M700901200
 138. Xin Xu, Dick Vreugdenhil, André A.M. van Lammeren. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation, *Journal of Experimental Botany*, Volume 49, Issue 320, March 1998, Pages 573–582, <https://doi.org/10.1093/jxb/49.320.573>
 139. Xu X, van Lammeren AA, Vermeer E, Vreugdenhil D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiol*. 1998;117(2):575-584. doi:10.1104/pp.117.2.575
 140. Xu X, Vreugdenhil D, van Lammeren AAM. 1998. Cell division and cell enlargement during potato tuber formation: a comparison of in vitro and in vivo tuber development. *J. Exp. Bot.* V. 49, p573–82
 141. Yadav RK, Perales M, Gruel J, et al. Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Mol Syst Biol*. 2013;9:654. doi:10.1038/msb.2013.8
 142. Yamaguchi YL, Ishida T, Sawa S. CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *J Exp Bot*. 2016;67(16):4813-4826. doi:10.1093/jxb/erw208
 143. Yong Z, Kotur Z, Glass AD. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate

- transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 2010;63(5):739-748. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04278.x
144. Yue J, Yang H, Yang S, Wang J. TDIF overexpression in poplars retards internodal elongation and enhances leaf venation through interaction with other phytohormones. *Tree Physiol.* 2020 Jan 1;40(1):60-72. doi: 10.1093/treephys/tpz126
 145. Zhang H, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):407-9. doi: 10.1126/science.279.5349.407
 146. Zhang L, Shi X, Zhang Y, et al. CLE9 peptide-induced stomatal closure is mediated by abscisic acid, hydrogen peroxide, and nitric oxide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 2019;42(3):1033-1044. doi:10.1111/pce.13475
 147. Zhou X, Guo Y, Zhao P, Sun MX. Comparative Analysis of WUSCHEL-Related Homeobox Genes Revealed Their Parent-of-Origin and Cell Type-Specific Expression Pattern During Early Embryogenesis in Tobacco. *Front Plant Sci.* 2018;9:311. Published 2018 Mar 8. doi:10.3389/fpls.2018.00311
 148. Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, et al. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature.* 2015;517(7534):377-380. doi:10.1038/nature13853
 149. Zhu Y, Wan Y, Lin J. Multiple receptor complexes assembled for transmitting CLV3 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 2010;5(3):300-302. doi:10.4161/psb.5.3.10790

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарна своей семье – Людмиле Михайловне Менделюк, Ирине Владимировне Ганчевой, Семену Ананьевичу Ганчеву и Александру Семеновичу Ганчеву – без чьей поддержки и помощи написание этой диссертации было бы невозможно. За доверие и поддержку благодарю заведующую лабораторией генной и клеточной инженерии растений СПбГУ Людмилу Алексеевну Лутову. Я признательна своему научному руководителю, Ирине Евгеньевне Додуевой, за безграничное терпение, чуткое руководство и помощь в подготовке текстов. Спасибо Варваре Евгеньевне Твороговой за консультирование, дружескую поддержку и обучение новым методам. Благодарю Марию Александровну Лебедеву за обсуждение работы и советы. Спасибо Людмиле Олеговне Полюшкевич за помощь в проведении экспериментов. Особую благодарность выражаю Алексею Сергеевичу Кирюшкину за ценные и мудрые советы. Спасибо сотрудникам кафедры ботаники СПбГУ, Анатолию Александровичу Паутову и Елене Геннадьевне Крыловой, за срезы клубней картофеля и помощь в интерпретации данных. Благодарю всех сотрудников лаборатории генной и клеточной инженерии растений за теплую и вдохновляющую атмосферу в нашем коллективе.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Дерево и выравнивание уникальных пептидов CLE картофеля.
2. Таблица белков CLE картофеля (*Solanum tuberosum* L.)
3. Таблица использованных в работе праймеров для ПЦР-РВ и генотипирования.
4. Таблица использованных в работе праймеров для создания конструкций.
5. Таблица конструкций, полученных в этой работе

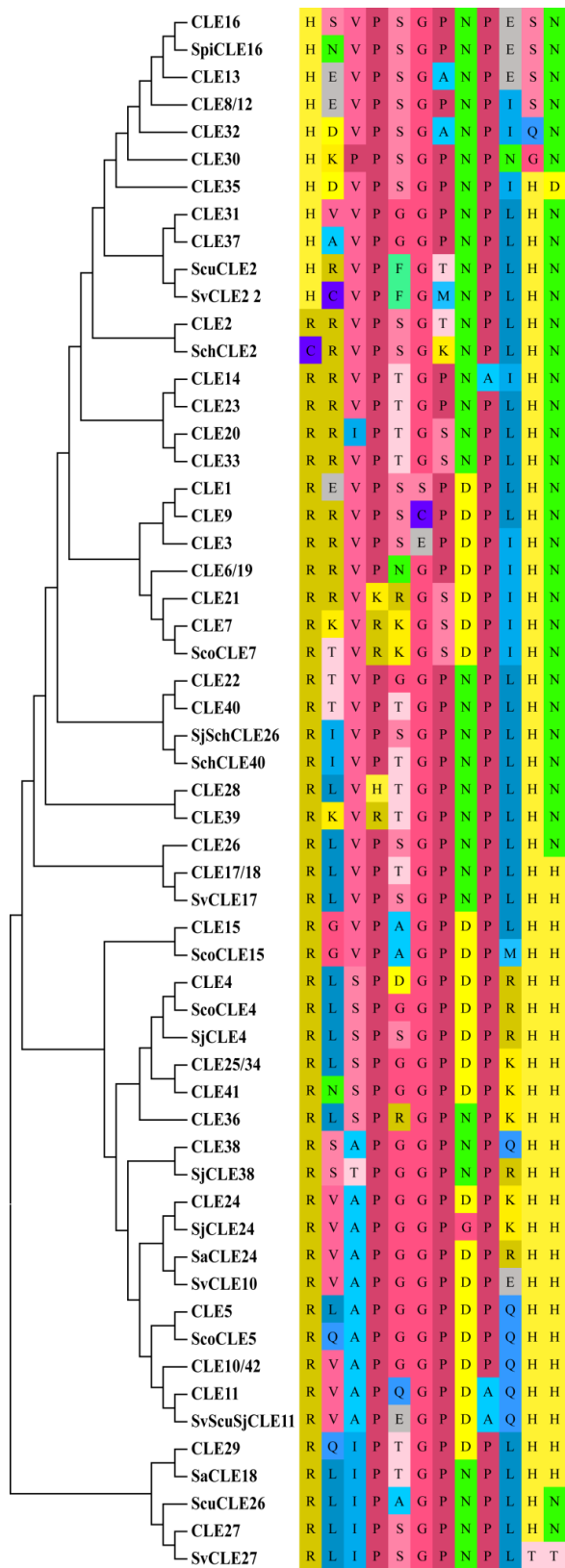
Приложение 1.

Белок	Длина белка	CLE домен (12 AK)	ID гена	Хр.	Расположение на хромосоме
StCLE1	82	REVPSSPDPLHN	PGSC0003DMT400073656	1	76502504. .76502665
StCLE2	84	RRVPSGTNPLHN	PGSC0003DMT400080884	9	27200192. .27200443
StCLE3	98	RRVPSEPDPIHN	PGSC0003DMT400017770	2	26140030. .26140323
StCLE4	75	RLSPDGPDPHH	PGSC0003DMT400039832	12	293859. .294083
StCLE5	84	RLAPGGPDPQHH	PGSC0003DMT400068491	10	4377265. .4377516
StCLE6	94	RRVPNGPDPIHN	PGSC0003DMT400010739	1	51263493. .51264719
StCLE7	84	RKVRKGS DPIHN	PGSC0003DMT400047493	5	4796391. .4796642
StCLE8	100	HEVPSGPNPISN	PGSC0003DMT400035554	2	37852409. .37852708
StCLE9	74	RRVPSCPDPLHN	PGSC0003DMT400037789	5	2899364. .2899585
StCLE10	81	RVAPGGPDPQHH	PGSC0003DMT400051434	7	49991791. .49992033
StCLE11	82	RVAPQGPDAQHH	PGSC0003DMT400032374	7	52803005. .52803250
StCLE12	87	HEVPSGPNPISN	PGSC0003DMT400072001	9	44340291. .44340551
StCLE13	91	HEVPSGANPESN	PGSC0003DMT400076296	9	58717397. .58717669
StCLE14	164/ 144	RRVPTGPNAIHN	LOC107060359 (transcript variant X1/X2)	2	46575951. .46576635
StCLE15	94	RGVPAGPDPLHH	PGSC0003DMT400096696	11	42705457. .42706328
StCLE16	94	HSVPSGPNPESN	PGSC0003DMT400043465	12	59064916. .59065197
StCLE17	94	RLVPTGPNPLHH	PGSC0003DMT400014567	3	59324312. .59324593
StCLE18	111	RLVPTGPNPLHH	PGSC0003DMT400002168	5	1875716. .1876048
StCLE19	109	RRVPNGPDPIHN	PGSC0003DMT400058287	5	6541558. .6544343
StCLE20	74	RRIPTGSNPLHN	PGSC0003DMT400074196	12	6140728. .6140949
StCLE21	95	RRVKRGSDPIHN	PGSC0003DMT400059683	0 ¹	21590902. .21591186
StCLE22	83	RTVPGGPNPLHN	PGSC0003DMT400007921	8	54331313. .54331561
StCLE23	86	RRVPTGPNPLHN	PGSC0003DMT400001860	7	44919284.

					.44919541
StCLE24	84	RVAPGGPDPKHH	NA	10	4380462. .4380211
StCLE25	72	RLSPGGPDPKHH	NA	10	2174779. .2174564
StCLE26	112	RLVPSGPNPLHN	NA	5	339408. .339073
StCLE27	112	RLIPSGPNPLHN	NA	5	335363. .335028
StCLE28	92	RLVHTGPNPLHN	NA	4	2220249. .2220524
StCLE29	76	RQIPTGPDPLHH	NA	1	48763550. .48763982
StCLE30	96	HKPPSGPNPNGN	NA	11	38794449. .38793990
StCLE31	66	HVVPGGPNPLHN	NA	3	42579723. .42579526
StCLE32	92	HDVPSGANPIQN	NA	5	49069616. .49069891
StCLE33	68	RRVPTGSNPLHN	NA	5	32787677. .32787474
StCLE34	72	RLSPGGPDPKHH	NA	7	52815885. .52816100
StCLE35	82	HDVPSGPNPIHD	NA	5	49073572..4 9073817
StCLE36	72	RLSPRGPNPKHH	NA	10	2186108. .2185893
StCLE37	86	HAVPGGPNPLHN	NA	12	54180840. .54181097
StCLE38	115	RSAPGGPNPQHH	NA	1	52405220. .52404876
StCLE39	91	RKVRTGPNPLHN	NA	10	57034821. .57035093
StCLE40	89	RTVPTGPNPLHN	NA	8	33034721. .33034987
StCLE41	114	RNSPGGPDPKHH	NA	12	1536448. .1536107

¹unanchored superscaffold

Приложение 2.



Приложение 3.

UBI	F	CCAGTTTTACAAGGTTGATGATTC
	R	AGCCCACATTTACCACAATAGTG
Actin	F	AGAGGTTCCGTTGCCCAG
	R	CACCACTGAGAACAATGTTACCA
StCLE1	F	ATGGAGCAAGATAACAACAACATTAA
	R	GATGAGGGCACTTCTCTATTGAC
StCLE2	F	CCCAAAATGCCAGTTCCG
	R	GTTATGGAGAGGATTCGTGCC
StCLE3	F	CTGCTGAGATTTTAGTAAAGCCTG
	R	GAATGCCTTTCTGTTTCTATTATCC
StCLE4	F	TGGCTAGTGCTTCTAGGTTTTTG
	R	CGAGGATCAGGTCCGTCAGG
StCLE5	F	CAAAGGCAAATAATTCAATAGCAA
	R	CCAGTCTATCTTCATCCACCAAT
StCLE6	F	GGTTAGTGTCTTGGAGAATAGAGG
	R	CATGTGGTTGATGAGAATTTCCC
StCLE7	F	ATGGTTTTTCATTAGTAACAAGACATTT
	R	CCTTTAAGCATACGCCTACTCG
StCLE8	F	TATCTCATTACTTACTATCTTCTTCTTTCTTG
	R	ACTCAAAGGTTTGGGAATGTTCT
StCLE9	F	CAGTGGCATTATCGGAAACAA
	R	TGTTGTCGTGTAATAAAGCGGTA
StCLE10	F	CGGATTTAGCCTAACGGAGATTG
	R	GAGTGATGTTGAGGGTCAGGTCCA
StCLE11	F	ACTTGTACTCATGTTACTATGTATGTTGATT
	R	TTGCCCTTCTTTTGTAATACTCC

StCLE12	F	AATCTTTTCTTTACTTCATTACCCTTTTCTT
	R	CCACCATATTCTGCTTGATTTTTTG
StCLE13	F	CTTCTTCTCTTCATTTGGTTACTCAT
	R	ACTGTAGTCGTGGTCATGGTTGT
StCLE14	F	GGCTTTCTTGGGTGCTCTTG
	R	CATACCTTTCAGTTTGTGTTATCTTCC
StCLE15	F	GCTCCTGTGAAACCCCTAAAC
	R	CTTAGGTTTCTTAGGACTAGCACCA
StCLE16	F	TCAACTACTACCACAACCACCATTA
	R	TGGACTCGGGATTTGGACC
StCLE17	F	ATTGCTATCGTCTTCTGTCTTATTCAT
	R	CGTAGGAACTAGGCGTTTTTCG
StCLE18	F	GGGCTTAAAGGTTCCCTCATGTAATATG
	R	CGGCTGGCTCGTAGACATC
StCLE19	F	GTATTTGTTTGGTTATTGTTGGTTGA
	R	TATGGCTTAATGTTGAGTTTTCCTTT
StCLE20	F	CAGCGGCAAGAAAATCACAA
	R	AAAGGGTTTGATCCAGTGGG
StCLE21	F	TCGGGTCTTGTCAACTCAGC
	R	CACTCTTCTTTTGTGTTGATTGATTG
StCLE22	F	TTCGTTAGTCAATTATCAAGTTGTAGAA
	R	ATTGTGAAGTGGATTTGGTCCTC
StCLE23	F	CCCATTTCCCCGTCCATAC
	R	TGTCGGACTCAAAATCTCTAGCAAT
T35S	R	TGAGCGAAACCCTATAAGAACCCTA
GFP	F	AAGTTCATCTGCACCACCG
StSUC2	F	TGGCTAAGGAGGTTTTTCGGT
	R	GGCAAAGAGAAGCAAGGCAC

StVND6	F	ACATCAATGGAAGCAGCCG
	R	CTCTATCACTCAGCAAAAGCAACA
StVND7	F	AAGGATGGGTGGTATGTAGGG
	R	GGCTATCAAGTTGTGGGAGGT
StCYCB1	F	AGCCGAGAGTGAGACAAGAGTTC
	R	ATTCCACAGCGAGGTAGCG

Приложение 4.

promStCLE8	F	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGTAATGAAG AGGCTGGTATGAACTTT	for pDONRP4-1R
	R	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGTTTACAAGT GATGATGAGAGGCTAGAAA	
promStCLE12	F	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGCACAAAA AAAATCAAGATACTTCCCT	for pDONRP4-1R
	R	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGGCAATAATA ATTTGATTGAAAAAATAATAACAC	
promStCLE4	F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCAT AAATCCCTAACATAGGTAAATAAT	for pDONR221
	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAATT CTTGAATAATTAATGATATATATCTAAGGTT	
promStCLE10	F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CACAACTAAGAAGATGGTGGATG	for pDONR221
	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTTTGATGATGAATTAGCCATGT	
StCLE12	F	GTACAAAAAAGCAGGCTATGGCAACATTTAAGTC ACAATCTTTT	for pDONR221
	R	GTACAAGAAAGCTGGGTTTACCGGTTTGATATAGG ATTTGGAC	
StCLE8	F	GTACAAAAAAGCAGGCTATGACTCTCTACAACATT ATCTCATTACTTACTATCT	for pDONR221
	R	GTACAAGAAAGCTGGGTTTACCTATTTGAAATTGG ATTTGGACC	
StCLE10	F	GTACAAAAAAGCAGGCTATGTTACTAATCCTCTTC	for pDONR221

		ATGATTATTTTCTT	
	R	GTACAAGAAAGCTGGGTCTAGTTAGTTGGAGGCA AAGAGTGATG	
StCLE4	F	GTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTAGTGCTTCTAG GTTTTTGTT	for pDONR221
	R	GTACAAGAAAGCTGGGTCTAGTGATGTCGAGGAT CAGGTCC	
promStSP6A for Y1H	F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGA TGAGTTTTTACTATGC	for pDONR207
	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGA AGAACTACAATCATAGTG	
StBEL5 for Y1H	F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTA CTATCAAGGAACCTCGG	for pDONR207
	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATG TTCCTAGATTACCTG	
promStCLE4 for Y1H	F	GGGGACAAGT TTGTACAAAAAAGCAGGCT TAACACTCCTATAAAGCAAGAACTC	for pDONR207
	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAATT CTTGAATAATTAATGATATATATCTAAGGTT	

Приложение 5.

ДНК для встраивания в вектор	Вектор ввода	Вектор назначения	Название конечной конструкции	Назначение
StCLE8 cds	pDONR221	pK7WG2D	pK7WG2D-StCLE8	Изучение влияния сверхэкспрессии гена <i>StCLE8</i> на развитие клубня
StCLE4 cds	pDONR221	pB7WG2D	pB7WG2D-StCLE4	Изучение влияния сверхэкспрессии гена <i>StCLE4</i> на клубнеобразование
StCLE10 cds	pDONR221	pB7WG2D	pB7WG2D-StCLE10	Изучение влияния сверхэкспрессии гена <i>StCLE10</i> на клубнеобразование
promStCLE8	pDONRP4-P1R	pHm43GW	pHm43GW-promStCLE8	Анализ активности промоторной области гена <i>StCLE8</i>
promStCLE10	pDONR221	pBGWFS7	pBGWFS7-promStCLE10	Анализ активности промоторной области гена <i>StCLE10</i>
promStCLE4	pDONR221	pBGWFS7	pBGWFS7-promStCLE4	Анализ активности промоторной области гена <i>StCLE4</i>
StBEL5 cds	pDONR207	pDEST22	pDEST22-StBEL5	Изучение взаимодействия ТФ-ДНК с помощью дрожжевой одногибридной системы
promStSP6A	pDONR207	pHisLeu	pHisLeu-promStSP6A	Изучение взаимодействия ТФ-ДНК с помощью дрожжевой одногибридной системы