

На правах рукописи



Ганчева Мария Семеновна

ГЕНЫ *SLE* В РАЗВИТИИ КАРТОФЕЛЯ

Специальность: 03.02.07 Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2021

Диссертационная работа выполнена на кафедре генетики и биотехнологии биологического факультета Федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

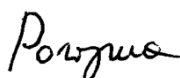
Научный руководитель:	Додуева Ирина Евгеньевна кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
Официальные оппоненты:	Долгов Сергей Владимирович доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» Богомаз Денис Игоревич кандидат биологических наук, доцент Института биомедицинских систем и биотехнологий
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится 29 сентября 2021 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д006.041.02 при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <https://www.vir.nw.ru/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан
«__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Елена Вячеславовна Рогозина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

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 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, а также регуляторы утолщения клубня. Такими регуляторами могут выступать пептидные гормоны *CLE*, которые у высших растений играют важнейшую роль в контроле разнообразных процессов развития – эмбриогенеза, активности меристем, растительно-микробных взаимодействий и ответа на факторы окружающей среды, а также в росте утолщением (Yamaguchi et al., 2016). Однако у картофеля семейство *CLE* 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. 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*, вовлеченные в ответ на нехватку воды
4. Выявить среди генов *CLE* картофеля регуляторы утолщения клубня
5. Осуществить поиск регуляторов экспрессии генов *CLE* у картофеля

Научная новизна

Данное исследование посвящено изучению роли генов *CLE* в развитии картофеля и образовании его клубней. Впервые было охарактеризовано семейство генов *CLE* у культурных и дикорастущих видов картофеля. 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.

Практическая и теоретическая значимость

Для выявления регуляторных компонентов и механизмов индукции клубнеобразования у картофеля был проведен поиск генов-кандидатов, которые могут стать мишенями для улучшения этой сельскохозяйственной культуры. В нашей работе были идентифицированы гены *CLE* картофеля, 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 генов *CLE* у культурных и дикорастущих видов картофеля, а также функциональной характеристике некоторых из 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 представлены на различных 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:

Грант РФФИ 18-34-00020 - “Изучение роли систем WOX-CLAVATA в развитии клубня у картофеля”, грант РФФИ 18-04-01017 - “Системы WOX-CLAVATA в регуляции развития запасющих органов растений”, грант РФФИ 20-316-80004 - “Изучение генетических механизмов образования флоэмы в клубне картофеля”, 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”.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 94 страницах, содержит 1 таблицу, 32 рисунка и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материала и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, благодарностей и 5 приложений.

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* L. и томата *Solanum lycopersicum* L., 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*).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе проведен анализ научной литературы, посвященной, прежде всего, развитию

клубня у картофеля – видоизмененного подземного побега, выполняющего функцию вегетативного размножения. Описаны структурные изменения, происходящие в растении, а также ключевые гены, вовлеченные в регуляцию клубнеобразования в зависимости от фотопериода, температуры и количества азота в среде. Также разобраны основные функции пептидных гормонов *CLE*, такие как поддержание меристем побега и корня, регуляция делений клеток камбия, контроль над дифференцировкой проводящих тканей и ответ на условия окружающей среды (Рис. 1).

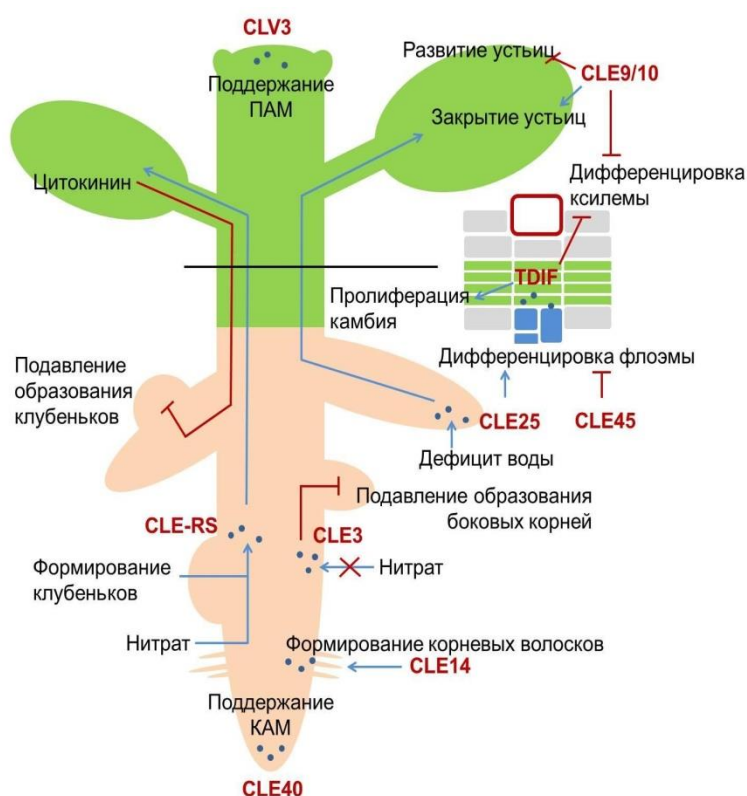


Рис.1. Некоторые функции пептидов *CLE* в развитии растений.

Пептиды *CLV3* и *CLE40* участвуют в поддержании апикальных меристем

побега и корня, соответственно. CLE14 вовлечен в формирование корневых волосков. У бобовых в присутствии азота и при образовании азотфиксирующих клубеньков экспрессируются гены *CLE-RS*, после чего кодируемые ими пептиды поступают по ксилеме в листья, где индуцируют образование цитокинина, который подавляет дальнейшее образование клубеньков. При дефиците 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 развитии которой участвует еще один пептид CLE, CLE45. Закрытие устьиц, а также их образование, контролируют пептиды CLE9/10. Пролиферацию камбия и дифференцировку ксилемы регулируют пептиды CLE, относящиеся к небольшой группе TDIF.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия выращивания растений

В исследовании использован картофель *Solanum tuberosum* сорта Дезире, любезно предоставленный Всероссийским институтом генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова. Для поддержания картофеля в условиях *in vitro* растения выращивали на среде Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige and Skoog, 1962) с 10 г/л сахарозы при температуре 23°C и фотопериоде 16 часов день/ 8 часов ночь. Для изучения влияния азота на экспрессию и активность промоторов генов *CLE* применяли модифицированную среду Мурасиге-Скуга с 10 г/л сахарозы, в качестве источника азота содержащую 10мМ KNO₃ и NH₄Cl; в среде без азота вместо них использовали 10 мМ KCl, концентрации всех остальных элементов были урезаны вдвое.

В эксперименте по изучению влияния нехватки воды на экспрессию генов *CLE* растения картофеля, выращенные в условиях *in vitro*, аккуратно извлекали из среды, промывали и на сутки оставляли в дистиллированной воде; далее часть растений извлекали из воды на 4 часа.

Штаммы микроорганизмов

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* (штамм Top10), *Agrobacterium tumefaciens* (штамм AGL1), *Agrobacterium rhizogenes* (штамм Arqua), а также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y2H Gold).

Анализ последовательностей

Поиск генов *CLE* производили в геномных сборках семи видов картофеля (*S. tuberosum* group *Phureja* (GCA_009849755.1), *S. bukasovii* Juz. et Rybin. (GCA_009849815.1), *S. verrucosum* Schltdl. (GCA_900185145.1), *S. commersonii* Dunal. (GCA_001239805.1), *S. curtilobum* Juz. et Buk. (GCA_009849645.1), *S. juzepczukii* Juz. et Buk. (GCA_009849685.1), *S. ajanhuiri* Juz. et Buk. (GCA_009849805.1)) с использованием алгоритмов BLASTP, BLASTN или TBLASTN баз данных SpudDB (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>) и NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов и белков CLE *Arabidopsis thaliana* и томата. Филогенетические деревья были построены на основании выравнивания аминокислотных последовательностей белков CLE 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 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.

Анализ данных секвенирования РНК

Для оценки накопления транскриптов генов *StCLE* 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, пластидной и рибосомальной ДНК и технических

последовательностей использовали программу bbdutk из набора программ bbttools (v. 37.23) (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbttools/>). Значения TPM (transcripts per million) для генов *StCLEs* для различных тканей были посчитаны с помощью алгоритма kallisto (Bray et al., 2016). В качестве референса использовали сборку 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 (<http://www.r-project.org/>).

Количественный анализ экспрессии генов

РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen). ДНКазную обработку проводили с помощью набора реактивов RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, США). Для постановки обратной транскрипции использовали набор реактивов RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США). Для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя Eva Green (Синтол, Россия). 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 уровнем экспрессии референсного гена убиквитина. Статистическую обработку полученных результатов, а также построение графиков осуществляли в программах R или Microsoft Excel.

Выделение ДНК и ПЦР

Выделение ДНК из растений проводили с помощью метода с применением цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) (Murray, Thompson, 1980). Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора реактивов и колонок Plasmid Miniprep Kit (Евроген, Россия). Из геля фрагменты ДНК выделяли с помощью набора реактивов и колонок Cleanup Mini (Евроген, Россия).

Реакции ПЦР для генотипирования растений и проверки наличия вставки в вектор проводили с Taq-полимеразой (Евроген, Россия). Для амплификации генов, предназначенных для конструирования векторов, вместо Taq-полимеразы использовали высокоточную полимеразу Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, США). Для визуализации результатов ПЦР использовали электрофорез в 1% агарозном геле. В гель для визуализации ДНК добавляли 0.1% интеркалирующего красителя - бромистого этидия или SYBR Safe (Invitrogen, США).

Конструирование векторов

Для клонирования последовательностей ДНК использовали систему Gateway (Invitrogen, США). ПЦР-фрагменты, полученные при амплификации геномной ДНК картофеля, 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, США). Постановку BP- и LR-клонажных реакций проводили по протоколу производителя.

Агробактериальная трансформация картофеля

Для получения растений с трансгенными корнями применяли трансформацию *A. rhizogenes*. 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.

Для получения полностью трансгенных растений картофеля проводили трансформацию листовых эксплантов с помощью *A. tumefaciens* по протоколу, описанному в диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук Колачевской О.О. (2015).

Анализ активности репортерных белков

Детекцию активности репортерного гена *GUS* (Glucuronidase) осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Sigma-Aldrich, США). Фиксацию образцов с репортерным геном *GFP* (Green Fluorescent Protein) проводили по методике, описанной Ilina et al., 2018, детекцию активности GFP проводили в синем свете (длина волны 483 нм). Работа по приготовлению и анализу срезов была проведена в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Дрожжевая одногибридная система

Для изучения взаимодействия ДНК-белок использовали метод дрожжевой одногибридной системы. Трансформацию дрожжей проводили по методу, описанному Gietz и Schiestl (2007). Эксперименты с использованием дрожжевой одногибридной системы проводили согласно Davies (2013).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ последовательностей и экспрессии генов *CLE* у картофеля.

Ранее, Goad с соавторами обнаружили 21 ген, предположительно кодирующий пептиды CLE, в геноме 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. 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, которые присутствуют почти у всех проанализированных видов картофеля, однако ген, названный нами *CLE42*, не найден в геноме *S. tuberosum* group *Phureja*, хотя присутствует у всех остальных проанализированных нами видов картофеля (Ганчева и др., 2021). Дикий вид *S. commersonii*, в природе растущий вне ареалов произрастания культурных видов картофеля (Юзепчук, Букасов, 1929), демонстрирует наибольшие отличия последовательностей белков CLE от других изученных видов картофеля.

Из литературных данных известно, что пептиды CLE образуются из более крупного предшественника, содержащего сигнальный домен на N-конце, вариабельный домен и CLE домен на C-конце, который выщепляется, претерпевает модификации и становится зрелым пептидом CLE. Мы обнаружили, что, 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 консенсусных последовательностей доменов CLE резуховидки и томата, но также содержит 6 наиболее консервативных аминокислот (R₁, P₄, G₆, P₇, P₉ и H₁₁) (Рис. 2А).

(А)

(Б)

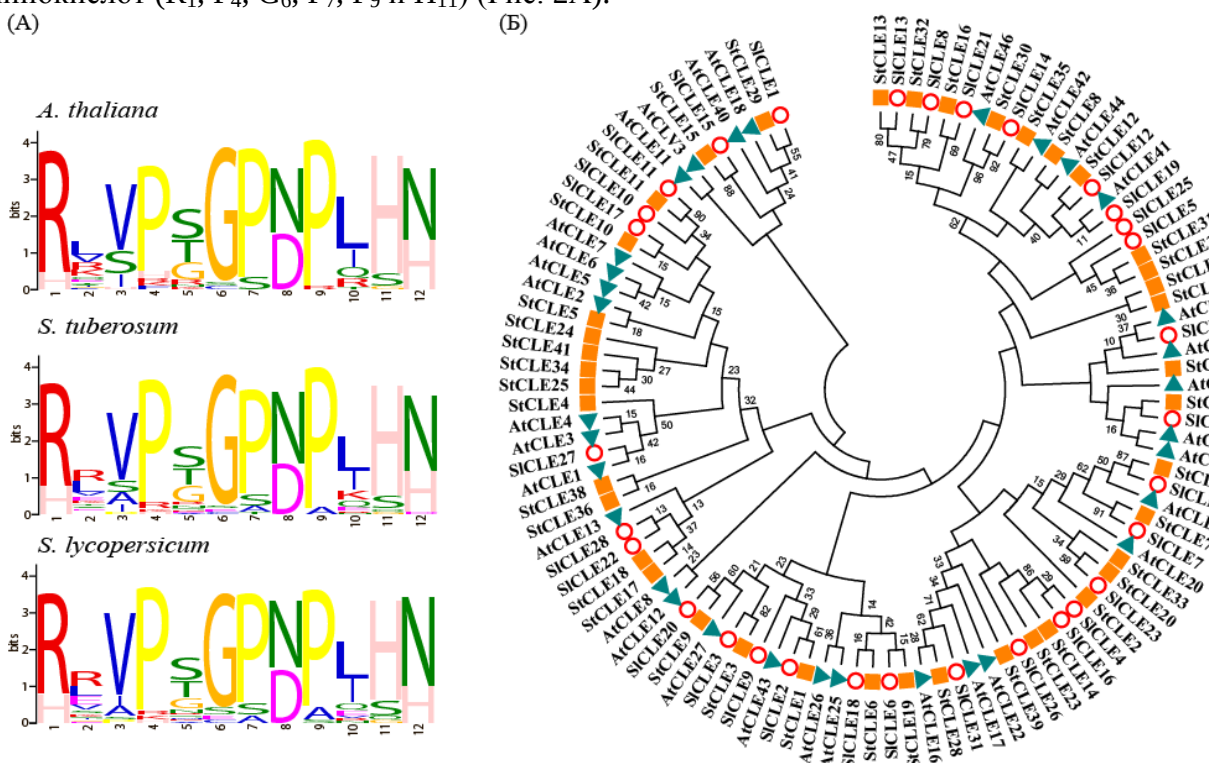


Рис. 2. Анализ последовательностей белков CLE картофеля. А - Консенсусные

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).

Мы провели анализ экспрессии генов *StCLE* в апексе побега, цветке, листе, черешке, стебле, столоне, клубне (молодом и зрелом) и корне картофеля *S. tuberosum* group *Phureja*, используя данные по транскриптому из базы данных NCBI (Рис. 3). 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 во всех 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 на высоком уровне почти во всех тканях растения. Десять генов (*StCLE1*, -7, -8, -16, -17, -19, -28, -33, -37 и -39) характеризуются тканеспецифичной экспрессией - так, ген *StCLE8* экспрессируется на высоком уровне в апексе, столоне, клубне и корне, но имеет низкий уровень экспрессии в цветке, листе, черешке и стебле.

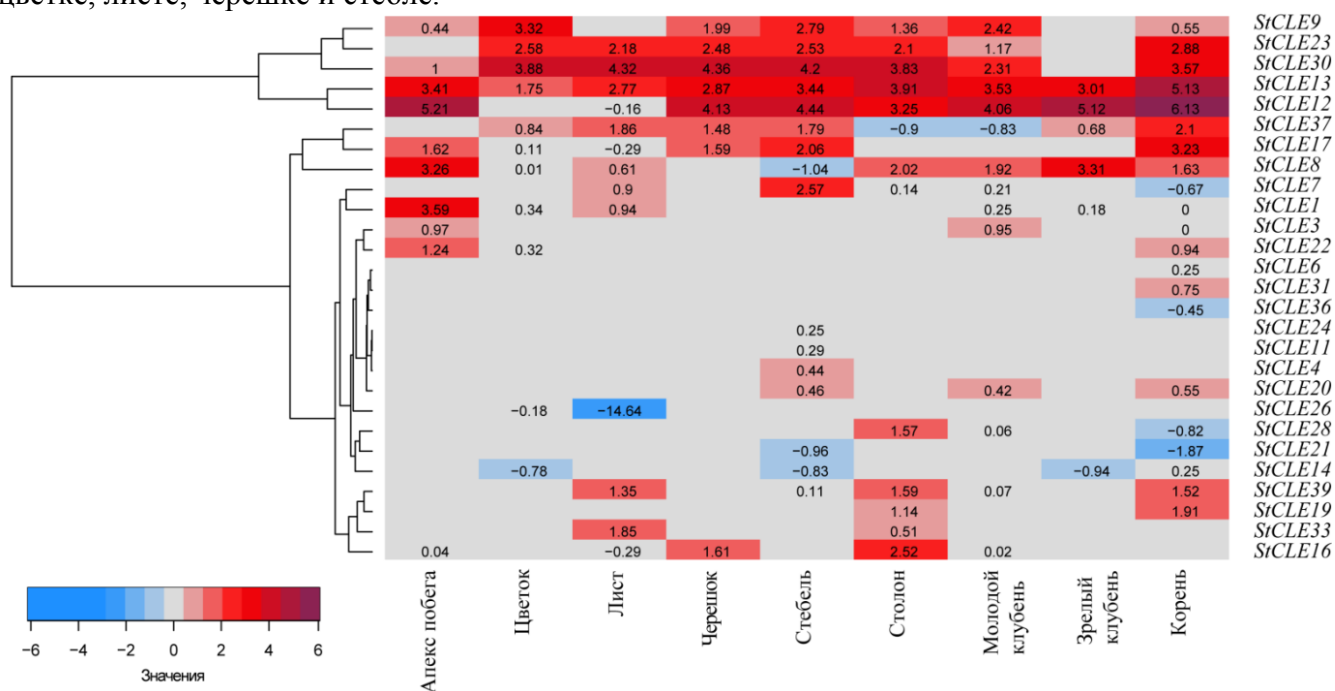


Рис.3. Log2 значения TPM (Transcripts Per Million) для генов *CLE* картофеля. Серым цветом обозначены TPM равные 0.

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

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

Для картофеля содержание азота в среде является одним из факторов, регулирующим развитие клубня: его избыток негативно сказывается на развитии клубней (Ewing, 1995). С помощью филогенетического анализа мы выявили у картофеля предполагаемые гомологи генов резуховидки *AtCLE1-7*, которые вовлечены в ответ на азот - *StCLE4*, -5, -10, -11, -24, -25, -34, -41 (Рис. 2Б).

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

На следующем этапе мы проанализировали экспрессию генов *StCLE* в корнях растений, растущих на средах с азотом и без него. Количественный анализ экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ показал, что уровни экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* значительно 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. 4, 5). Уровень экспрессии гена *StCLE5* значительно изменялся только при пересадке растений со среды без азота на среду с азотом (Рис. 5).

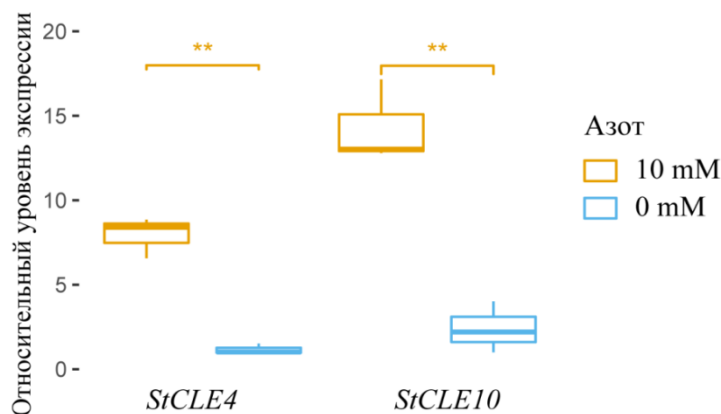


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* при пересадке растений со среды с азота на среду без азота. **, $p < 0,01$.

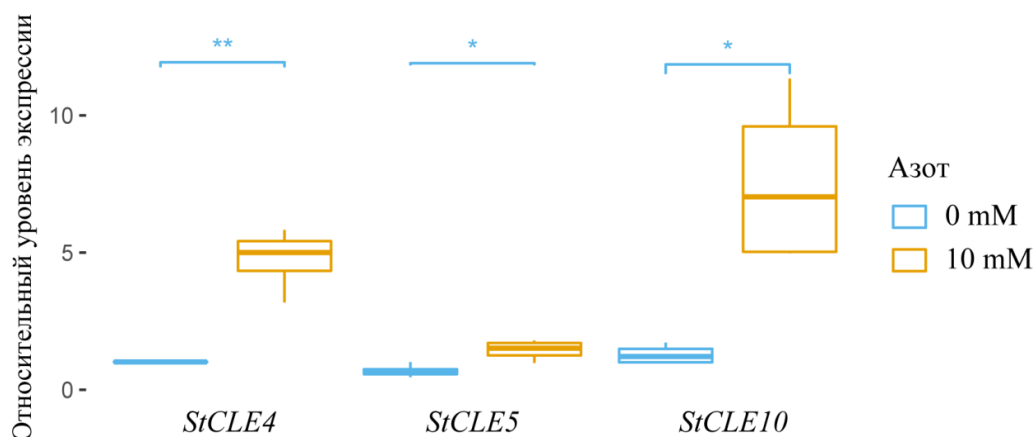
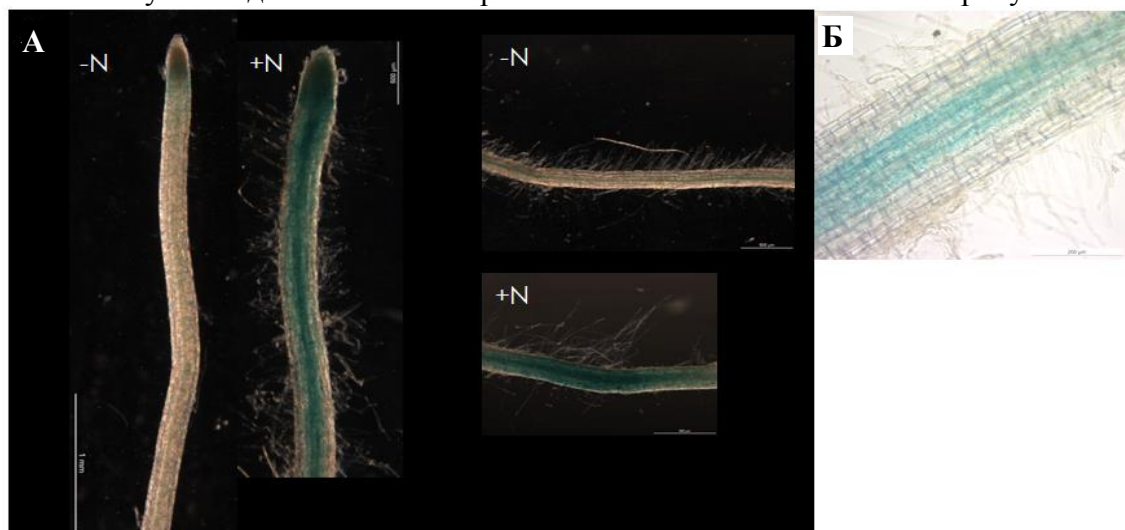


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов *StCLE4*, *StCLE5* и *StCLE10* при пересадке растений со среды с азота на среду без азота. **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

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

Для анализа активности промоторов генов *StCLE4* и *StCLE10* были выделены промоторные участки этих генов (3 и 1.7 тысячи нуклеотидов до старт-кодона, соответственно). Далее промоторные области генов *StCLE4* и *StCLE10* были помещены в вектор pBGWFS7 перед геном *GUS*, кодирующим фермент глюкуронидазу, который обуславливает синее окрашивание при взаимодействии со специфическим субстратом (Van den Eede et al., 1992).

Мы трансформировали растения картофеля полученными конструкциями с помощью *A. rhizogenes* для получения композитных растений с трансгенными корнями. Трансформированные растения выращивали на среде с азотом и без азота. Мы показали, что промоторы анализируемых генов более активны при росте растений на среде азотом (Рис. 6), что согласуется с данными об экспрессии генов *StCLE4* и *StCLE10* в присутствии азота в среде.



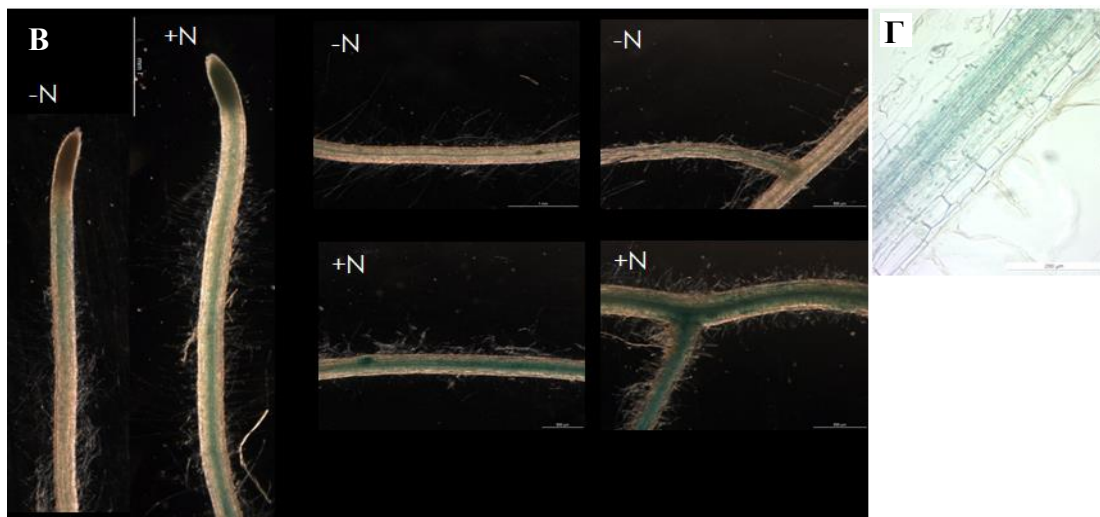


Рис. 6. Анализ активности промоторов генов *StCLE4* (А, Б) и *StCLE10* (В, Г) в корнях картофеля. А, В - Корни картофеля, растущего на среде с азотом (+N) и без азота (-N). Б, Г - Срезы корней картофеля, растущего на среде с азотом. Промоторы активны в проводящем цилиндре корня.

Итак, 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. Активность промоторов обоих генов была выявлена в центральном цилиндре корня, предположительно – в проводящих тканях.

Так как образование клубней зависит от содержания азота в среде, то имело смысл изучить вовлеченность регуляторов клубнеобразования в азотный сигналинг. В работе Sharma et al. 2016 был проведен транскриптом столонов картофеля, в которых была индуцирована экспрессия гена *BEL5*, кодирующего транскрипционный фактор (ТФ), стимулирующий клубнеобразование. В случае экспрессии *BEL5* происходило накопление транскриптов большого количества генов, в том числе *StCLE4*, в промоторной области которого обнаружены сайты посадки *BEL5* - tandemные последовательности TGAC.

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

Для проверки предположения о том, что ТФ *BEL5* непосредственно регулирует транскрипцию гена *StCLE4*, мы использовали метод дрожжевой одногибридной системы (Yeast One-Hybrid Assay (Y1H)). Для ее проведения были созданы конструкции, несущие кодирующую

последовательность *StBEL5* и промоторные участки генов *StCLE4* и *StSP6A*. В качестве положительного контроля использовали промотор гена *StSP6A* (prom*StSP6A*), взаимодействие которого с ТФ *BEL5* было показано с помощью метода сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) (Sharma et al., 2016). В качестве отрицательных контролей использовались плазмиды pDEST22 и pHisLeu без вставок.

В нашем эксперименте было подтверждено взаимодействие ТФ *StBEL5* с промотором *StSP6A*, однако взаимодействия *StBEL5* с промоторной областью *StCLE4* не было обнаружено (Рис. 7). Таким образом, исходя из результатов нашего анализа, ТФ *StBEL5*, вероятно, напрямую не регулирует экспрессию гена *StCLE4*.

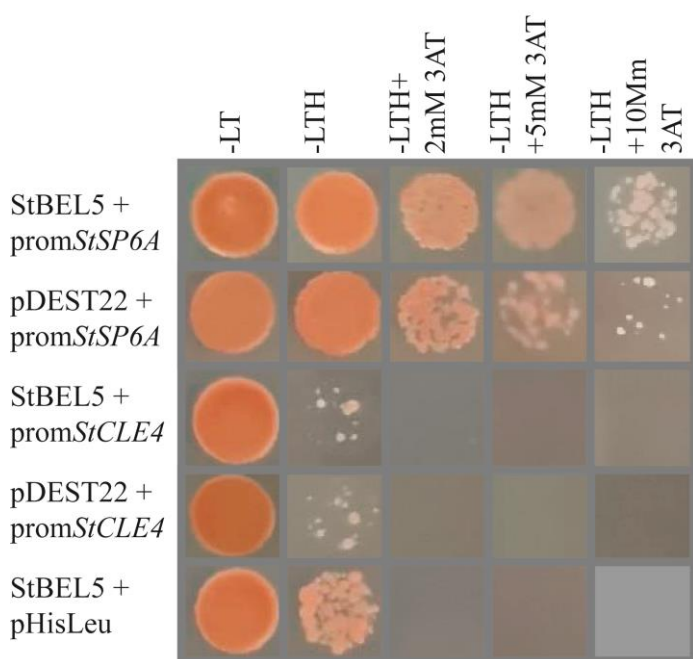
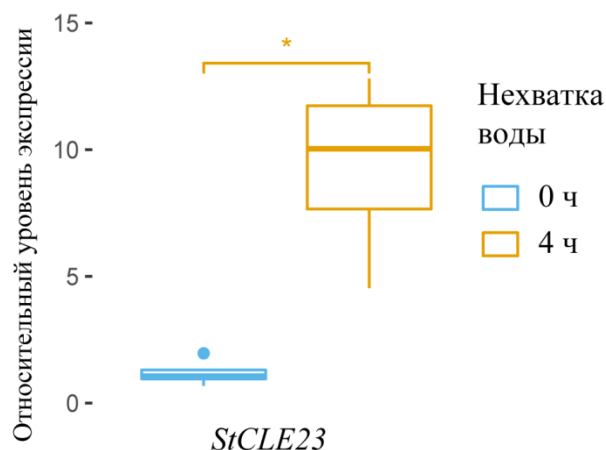


Рис. 7. Проверка взаимодействия ТФ BEL5 с промоторной областью гена *StCLE4* (prom*StCLE4*) с помощью Y1H. Дрожжи выращивали на средах DDO и TDO с различными концентрациями ингибитора биосинтеза гистидина - 3-Amino-1,2,4- triazole (3-AT) - 2мМ, 5мМ и 10мМ.

Поиск генов *CLE* участвующих в ответе на нехватку воды.

Нехватка воды у картофеля приводит к уменьшению роста побегов, урожая клубней – в связи с задержкой инициирования клубней, снижению количества и веса клубней. Мы обнаружили ген, экспрессия которого ассоциирована с нехваткой воды у картофеля: экспрессия *StCLE23* возрастала в 10 раз в условиях дефицита воды (Рис. 8).

Рис. 8. Относительный уровень экспрессии гена *StCLE23* в условиях дефицита воды. *, $p < 0,05$.



Поиск генов *CLE* участвующих в утолщении клубня.

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

При анализе последовательностей генов *StCLE* у картофеля были выявлены гомологи генов *AtCLE41* и *AtCLE44* резуховидки, участвующих в росте утолщением, в числе которых ген *StCLE8*. CLE-домен пептида *StCLE8* оказался идентичен пептиду TDIF резуховидки, который является продуктом генов *AtCLE41* и *AtCLE44*. 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 запасяющих корней (Gancheva et al., 2016). Также, по транскриптомным данным мы обнаружили накопление транскриптов гена *StCLE8* в ходе развития клубня (Рис. 3). В связи с этим, мы предположили, что пептид *StCLE8* может участвовать в регуляции роста утолщением при формировании клубня картофеля.

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

Для анализа активности промотора гена *StCLE8* была выделена промоторная область этого гена в ~1800 нуклеотидов. Мы поместили эту промоторную область в вектор pHm43GW перед геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP) с сигналом ядерной локализации. Таким образом, в клетках, в которых активен промотор гена *StCLE8*, мы видели флуоресцирующие зеленым ядра.

Мы обнаружили активность промотора гена *StCLE8* и в клубнях, и в столонах картофеля (Рис. 9). В столонах сигнал GFP детектируется в клетках, сопровождающих сосуды ксилемы, а в клубне - в клетках перимедуллярной зоны и в клетках, находящихся на периферии перимедуллярной зоны. Согласно литературным данным, основную роль в формировании клубня картофеля играет перимедуллярная зона, деления в которой продолжают до тех пор, пока клубень не достигнет своего окончательного размера (Xu et al., 1998). Гомолог *StCLE8* у резуховидки выполняет роль регулятора делений клеток камбия - меристемы, обеспечивающей рост утолщением. Обнаружение активности промотора гена *StCLE8* в клетках перимедуллярной зоны клубня картофеля позволяет предположить, что пептид *StCLE8* мог взять на себя функцию регулятора делений этой зоны.

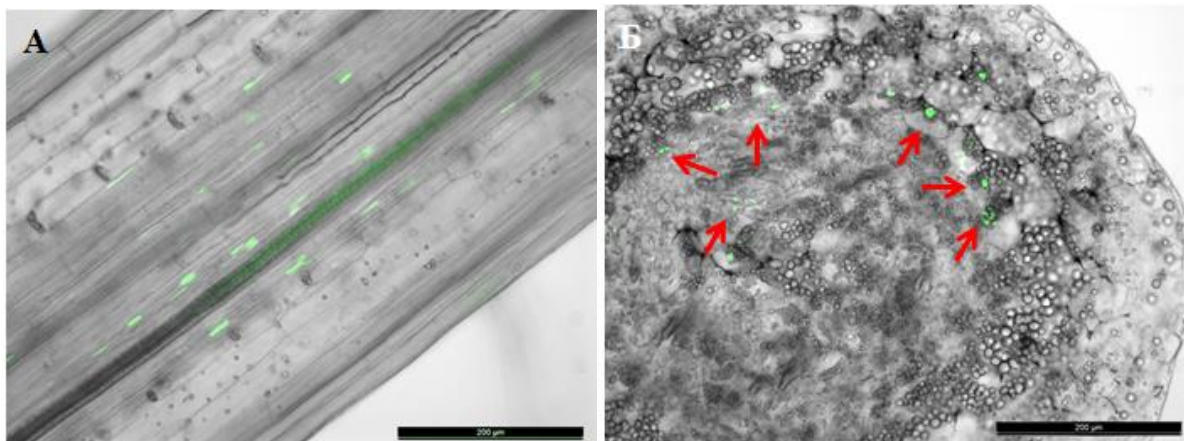


Рис. 9. Анализ активности промотора гена *StCLE8* в столоне и клубне трансгенных растений картофеля. А – Продольный срез столона картофеля. Б - Поперечный срез клубня картофеля. Стрелками указаны ядра, в которых детектирован сигнал GFP.

4. Изучение влияния измененного уровня экспрессии гена *StCLE8* на развитие картофеля.

Для изучения функций гена *StCLE8* его поместили в вектор pK7WG2D под контроль конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. Такой промотор обеспечивает возрастание экспрессии находящихся под ним генов в сотни раз во всех трансформированных тканях растения. При трансформации картофеля штаммом *A. tumefaciens*, несущим такую конструкцию, были получены растения со сверхэкспрессией *StCLE8*: наиболее высокие уровни экспрессии *StCLE8* демонстрировали растения под номерами 8#1, 8#4 и 8#27 (Рис. 10).

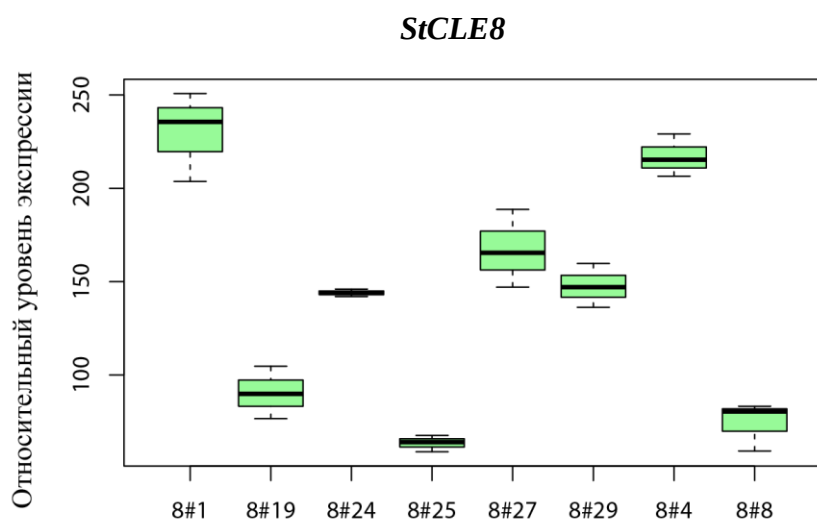


Рис. 10. Относительные уровни экспрессии гена *StCLE8* в растениях, несущих вставку 35S::*StCLE8* (8# номер растения) по сравнению с экспрессией в контрольных растениях. В качестве материала были взяты верхушки растений ~1см, растущих *in vitro*.

Все растения со сверхэкспрессией *StCLE8* демонстрировали разрастание проводящих пучков в побеге (Рис. 11), как это было ранее показано при сверхэкспрессии генов, кодирующих CLE пептиды группы TDIF, на резуховидке (Smit et al., 2020; Etchells и Turner, 2010) и редисе (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 видимые изменения при сверхэкспрессии гена, кодирующего пептид TDIF, коснулись только проводящих пучков, что вероятно связано с рецепторами этих пептидов, 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).

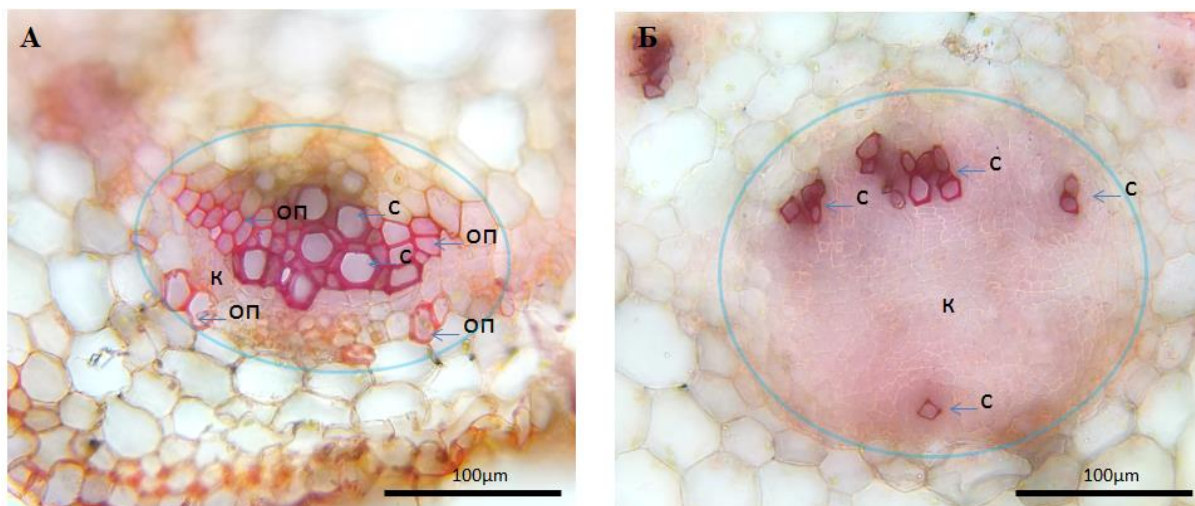


Рис. 11. Разрастание проводящих пучков в стебле картофеля со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (регенерант 8#24) (Б) по сравнению с контролем (А). Проводящие пучки обведены голубой линией. с - сосуды, оп - одревесневшая паренхима, к - камбий. Срезы растений окрашены 1% сафранином.

Общий вид растений со сверхэкспрессией *StCLE8* также отличался от контроля (Рис. 12): 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 увеличивалась (Рис. 12, 13). Вместе с тем, масса клубней у растений со сверхэкспрессией гена *StCLE8* была значимо меньше, чем у контрольных (Рис. 13). В клубнях трансгенных растений также было выявлено разрастание проводящих пучков (Рис. 14). 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.

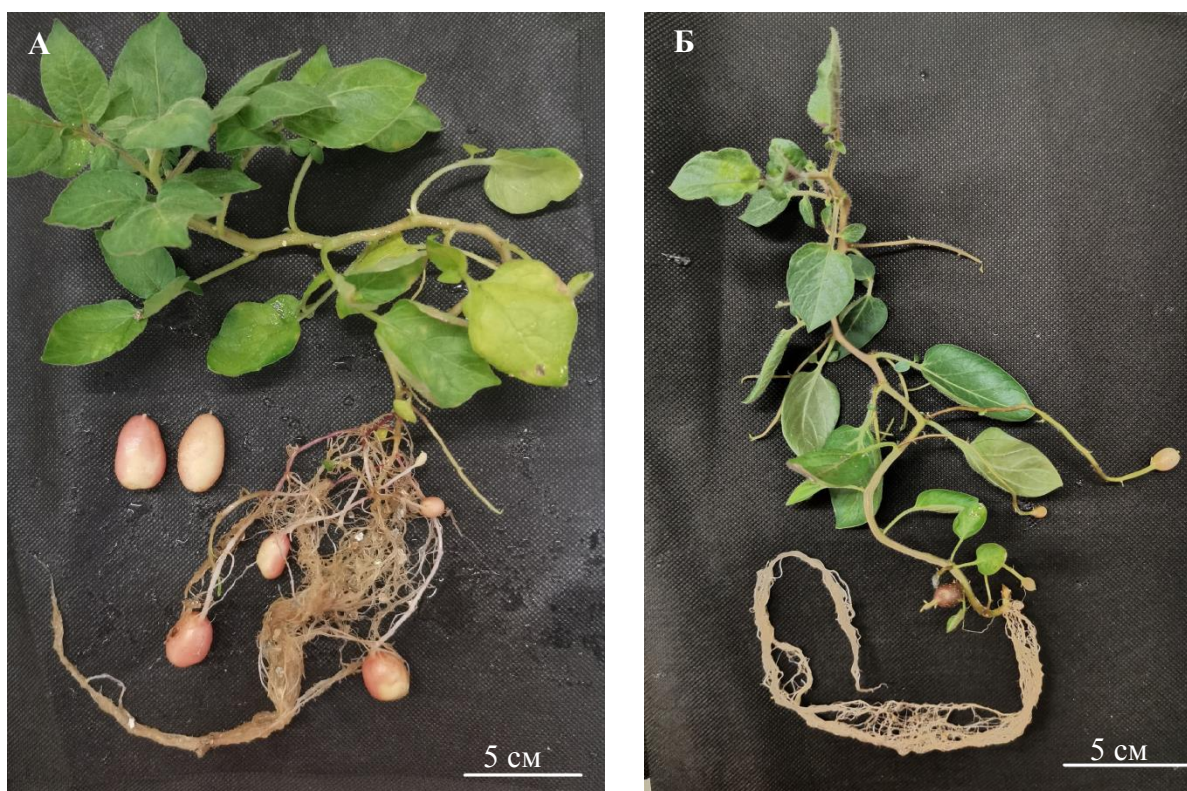


Рис. 12. Внешний вид контрольного растения (А) и растения со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (регенерант 8#24) (Б).

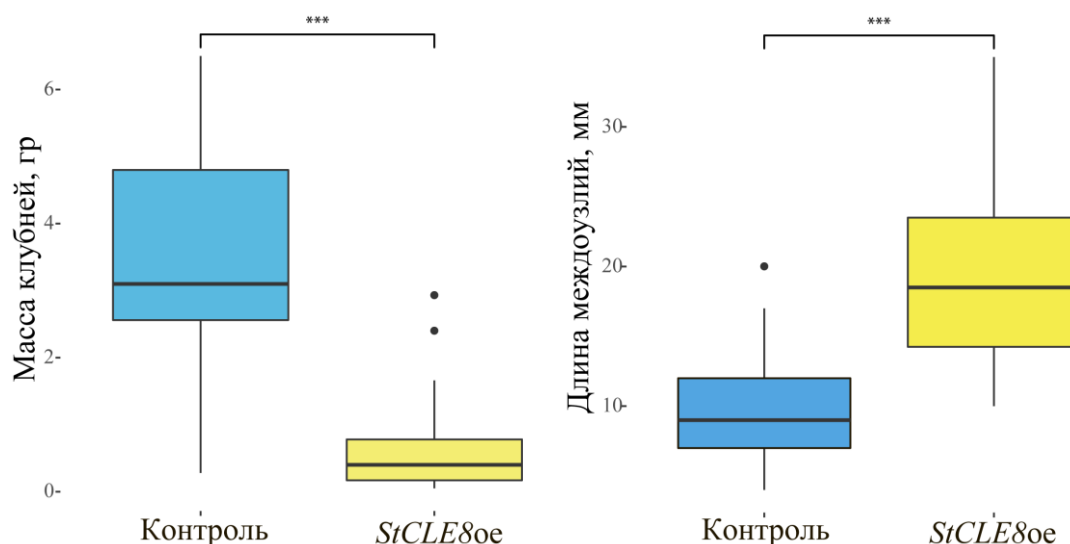


Рис. 13. Масса клубней и длина междоузлий контрольных растений и растений со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (*StCLE8oe*). ***, $p < 0,001$.

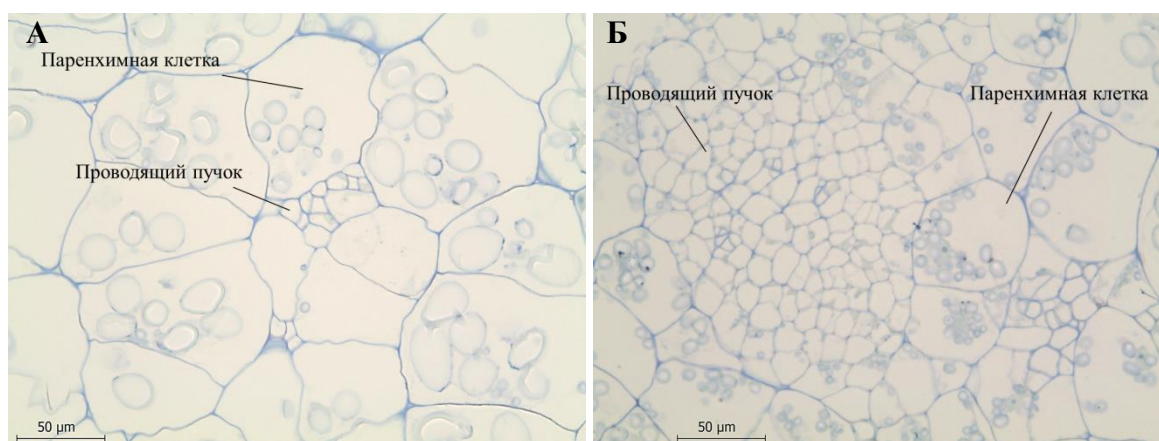


Рис. 14. Формирующиеся проводящие пучки в перимедуллярной зоне клубня контрольного растения (А) и растения со сверхэкспрессией гена *StCLE8* (Б).

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), связанное с увеличением активности камбия. Наличие активности промотора гена *StCLE8*, увеличение экспрессии гена *StCLE8* в клубне, а также разрастание проводящих пучков в клубне со сверхэкспрессией *StCLE8*, позволяют предположить, что *StCLE8* может быть участником образования такой структуры, как клубень, и даже, возможно, активировать деление клеток перимедуллярной зоны. 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: вероятно, для получения ожидаемого эффекта 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).

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.15).

В первую очередь, мы идентифицировали 42 гена картофеля, кодирующих пептиды CLE и присутствующих почти у всех проанализированных видов картофеля, как диких, так и культурных. Среди генов *Solanum tuberosum* *StCLE* мы выявили вероятных регуляторов ответа на изменение содержания азота (*StCLE4* и *StCLE10*), ответа на дефицит воды (*StCLE23*) и регулятор утолщения клубня (*StCLE8*).

Для гена *StCLE8* было также проведено изучение эффекта сверхэкспрессии на развитие растений и формирование клубней. Выявленные отличия трансгенных растений со сверхэкспрессией *StCLE8* от контроля подтверждают роль этого гена в контроле активности камбия и развитии проводящих пучков, а также свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия *StCLE8* на уровне целого растения не может быть использована как способ повышения урожайности картофеля.

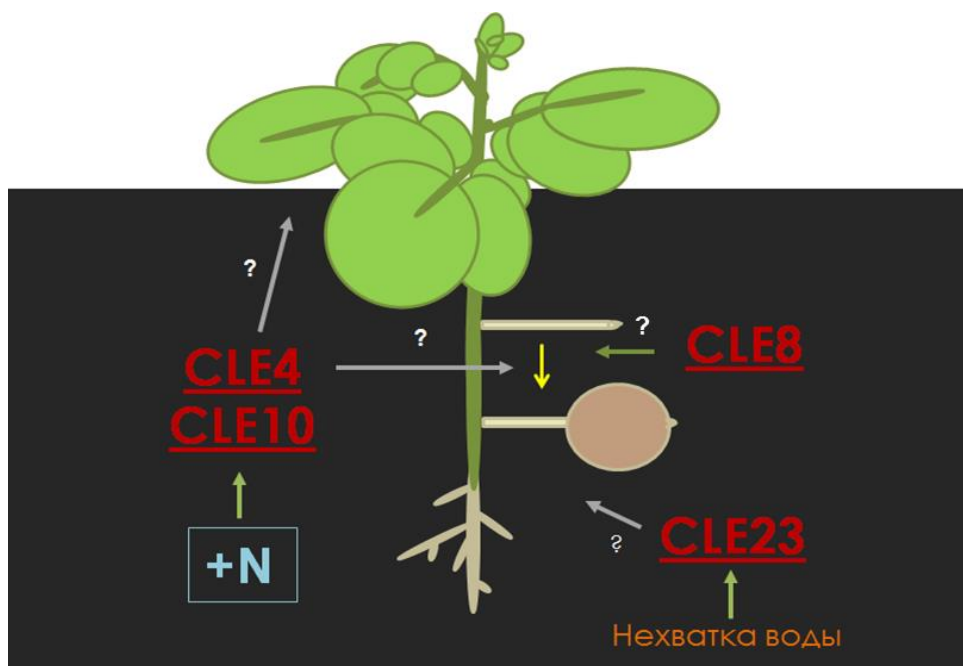


Рис. 15. Предполагаемая схема регуляции развития клубня у картофеля с помощью пептидов CLE. Пептиды CLE4 и CLE10 образуются в ответ на наличие азота в среде и могут влиять на клубнеобразование. Пептид CLE8 участвует в утолщении клубня. Пептид CLE23 образуется в ответ на нехватку воды.

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 и нарушение их упорядоченного строения, 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*.

Список публикаций по теме диссертации

1. **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. DOI 10.3390/agronomy11050984
2. **Ганчева М.С.**, Лосев М.Р., Гурина А.А., Полюшкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Полиморфизм последовательностей генов CLE картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6).
3. Полюшкевич Л.О., **Ганчева М.С.**, Додуева И.Е., Лутова Л.А. Рецепторы пептидов CLE у растений. *Физиология растений*. 2020; 67 (1):1–17. DOI 10.1134/S0015330320010285
4. **Ганчева М.С.**, Маловичко Ю.В., Полюшкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Пептидные гормоны растений. *Физиология растений*. 2019; 66(2):83–103. DOI 10.1134/S001533031901007X
5. **Ганчева М.С.**, Додуева И.Е., Лутова Л.А. Роль пептида CLE41 в развитии запасающей паренхимы корня у представителей рода *Raphanus*. *Физиология растений*. 2018; 65:279-293. DOI 10.7868/S0015330318040048
6. **Gancheva M.S.**, Dodueva I.E., Lebedeva M.A., Tvorogova V.E., Tkachenko A.A., Lutova L.A. Identification, expression, and functional analysis of CLE genes in radish (*Raphanus sativus* L.) storage root. *BMC Plant Biology*. 2016. DOI 10.1186/s12870-015-0687-y

Участие в конференциях

1. **Gancheva M.**, Poliushkevich L., Rutkovskaya E., Lebedeva M., Dodueva I., Lutova L. CLE AND CEP GENES IN POTATO: identification and expression analysis. International Plant Growth Substances Association (IPGSA) Conference. June 25- 29, 2019. Paris, France.
2. **Ганчева М.С.**, Рутковская Е.А., Полюшкевич Л.О., Лебедева М.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Пептидные гормоны CLE и CEP у картофеля. IX Съезд ОФР. 18-24 Сентября 2019 года. Россия, Казань.
3. **Ганчева М.С.**, Полюшкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Идентификация и анализ экспрессии генов *CLE* у картофеля. Конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». 18-22 июня 2019.
4. **Gancheva M.S.**, Dodueva I.E., Lutova L.A. Role of CLE genes in tuber development in potato. International Association for Plant Biotechnology Congress. August 19-24 2018, Dublin, Ireland.
5. **Gancheva M.**, Poliushkevich L., Paponova S., Malovichko Y., Kurmazov N., Dodueva I., Lutova L. Components of WOX-CLAVATA system in potato: identification, characterization and expression analysis. VI Workshop on Plant Peptides and Receptors. September 5-7 2018, Antequera, Spain.

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.