

УДК 581.1:577.214.625:578.853

ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *NtEXPA5* НА РАЗМЕРЫ КЛЕТОК И РОСТ ОРГАНОВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

© 2013 г. Б. Р. Кулуев, М. Г. Сафиуллина, А. В. Князев, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054 Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71

E-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 10.10.11 г.

Окончательный вариант получен 16.12.11 г.

Получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5*, кодирующего α -экспансин *Nicotiana tabacum*. Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров листьев и стеблей, при этом величина цветков оставалась практически неизменной. Увеличение размеров органов было обусловлено стимулированием только клеточного растяжения, при этом число клеточных делений даже уменьшалось. Полученные данные свидетельствуют о тесном взаимодействии регуляции клеточного растяжения и клеточного деления, которые вместе являются основными механизмами контроля величины органов растений.

Ключевые слова: экспансины, клеточное растяжение, клеточное деление, величина органов, *NtEXPA5*, сверхэкспрессия, трансгенные растения, *Nicotiana tabacum*.

DOI: 10.7868/S0475145013010059

ВВЕДЕНИЕ

Во многих морфогенетических процессах у растений, которые регулируются фитогормонами и множеством белковых факторов, важная роль принадлежит экспансинам. Экспансины — белки, участвующие в разрыве нековалентных связей между целлюлозными микрофибриллами и гликановыми поперечными мостиками (см. обзор Шаровой, 2007). Благодаря своим способностям разрывать клеточную стенку, экспансины стимулируют клеточное растяжение и таким образом участвуют в контроле роста всех органов растений. Было показано, что экспансины участвуют в регуляции таких физиологических процессов, как прорастание семени, развитие корня и листа, размягчение плодов, ответные реакции на стресс и многих других. Экспансины являются консервативными щелочными белками, непосредственно не обладающими ферментативной активностью, при этом они подразделяются на α - и β -экспансины, сходство между последовательностями нуклеотидов которых составляет 20–40%, а топологическое сходство третичной структуры доходит до 75%. Анализ промоторов генов экспансинов риса показал наличие доменов связывания с ауксинами, гиббереллинами, брассиностероидами, цитокининами и этиленом (Lee et al., 2001). Таким образом, экспрессия экспансинов контролируется

многими фитогормонами, которые служат сигнальными молекулами при регуляции формообразовательных и деструктивных процессов в растениях (Azeez et al., 2010; Park et al., 2010). Кроме экспансинов в регуляции клеточного растяжения участвуют большое количество других белковых факторов, таких как ARL (Hu et al., 2006), GRF5 (Horiguchi et al., 2005), XET (Nishikubo et al., 2007) и другие. Эти белковые факторы и фитогормоны функционируют совместно, формируя сложную сеть клеточной сигнализации, контролирующей клеточное растяжение. При этом процессы клеточного растяжения и клеточного деления тесно связаны друг с другом через многочисленные точки взаимодействия сигнальных молекул (Horiguchi et al., 2005).

В каждом растении присутствуют большое количество разнообразных экспансинов, но лишь у немногих растений они идентифицированы и определены их функции. Например, в геноме арабидопсиса было обнаружено 26 генов α -экспансинов и пять β -экспансинов, в геноме риса — 26 генов α - и 14 генов β -экспансинов (Cosgrove et al., 1997).

Одним из эффективных методов изучения экспансинов является получение трансгенных форм с повышенным или пониженным уровнем экспрессии целевых генов и проведение морфофизиоло-

гического анализа опытных растений в сравнении с контрольными (Cho et al., 2000). Таким способом, например, было показано, что повышенная экспрессия гена *AtEXPA1* арабидопсиса приводит к задержке роста побегов, особенно в ранней фазе вегетативного роста (Гао и др., 2010). Трансгенные по гену *AtEXPA10* растения характеризовались увеличением длины черешков и площади листовой пластинки (Cho et al., 2000). Эктопическая экспрессия гена *PttEXPA1* осины (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) способствовала увеличению размеров междоузлий и площади листьев (Gray-Mitsumune et al., 2008). Таких исследований с каждым годом становится все больше, при этом наиболее частым фенотипическим проявлением сверхэкспрессии экспансинов является увеличение размеров клеток растений. Что касается табака, то у него на данный момент идентифицировано лишь 6 генов α -экспансинов (Link et al., 1998), которые получили названия *NtEXPA*, с порядковыми номерами от 1 до 6, и их нуклеотидные последовательности имеются в GenBank (AF049350–AF049355). Эксперименты по получению трансгенных растений табака с измененным уровнем экспрессии данных экспансинов не проводились, поэтому точно не известно, за какие процессы они несут ответственность в организме табака. Наличие в геноме растений большого количества генов различных экспансинов пока не находит точного объяснения, поэтому представляет большой интерес изучение их по отдельности, с целью выяснения функции каждого из них. В данной работе в качестве объекта исследования нами был выбран ген *NtEXPA5* табака. С целью изучения влияния эктопической экспрессии этого экспансина на величину органов и отдельных клеток, нами были получены трансгенные растения табака, с повышенным уровнем экспрессии целевого гена. Предполагалось, что трансгенные по гену *NtEXPA5* растения табака за счет увеличения размеров клеток, будут отличаться большими размерами органов. Однако изначально было неясно, какие именно органы будут преимущественно увеличиваться.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции

В работе использованы бактерии *E. coli* штамма XL1-Blue и *A. tumefaciens* штамма AGL0. Из плазмид использовали T-вектор pKRX и бинарный вектор pCambia 1301 с геном устойчивости к гиромцину и репортерным геном *GUS* (CAMBIA, Австралия). В вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была дополнительно вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования. Геномную ДНК табака выделяли методом солевой экстракции (Aljanabi et al., 1997). Тотальную РНК выделяли тризолом фирмы Invitro-

gen (США). ОТ-ПЦР осуществляли при помощи MuLV-обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса бактериальных колоний используя наборы фирмы Цитокин (Россия). Качество и количество выделенных препаратов определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad, США). Для ПЦР использовали амплификаторы производства компании “ДНК-технология” (Россия). Ген *NtEXPA5* выделили из тотальной ДНК табака при помощи праймеров NtEXPF ACAATGGCAACATTCTCCATTATCTC и NtEXPR СТАСТТААТТААААТТGAGCCCc. Для ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5* использовали праймеры ATTCAACAATGGTTTAAACATGTG и TTGC-CATCCAGTATTAGACCCTTTA. Для получения ампликонов с “тупыми” концами использовали Pfu ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия), для “затупления” липких концов после рестрикции или амплификации использовали T4-ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия). Для поиска целевых клонов при лигировании в векторе pCambia 1301 использовали праймер 35ScambF: AGAGGAC-СТАACAGAАСТCG в паре с праймером 1301R TGCTCTAGCATTCGCCATTC. Из целевых генно-инженерных конструкций нарабатывались специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35ScambF/NtEXPR, NtEXPF/1301R, 35ScambF/1301R, а при сочетании пар 35ScambF/NtEXPF, NtEXPR/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *NtEXPA5*. После полной проверки полученный бинарный вектор с геном *NtEXPA5* под контролем 35S промотора вводили в клетки *A. tumefaciens* методом электропорации при помощи прибора фирмы Bio-Rad модели Micropulser. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программы MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания генов экспансинов и построения филогенетического дерева использовали метод CLUSTALW (программа MegAlign).

Получение трансгенных растений табака, морфологическая характеристика и условия выращивания растений

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков, для получения которых использовали листья растений

3-месячного возраста. Первичные трансгенные T₀-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина (Нуг). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях T₀-побегов определяли гистохимически, используя субстрат X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуроновой кислоты, Fermentas). Образцы ткани листьев инкубировали в течение ночи при 37°C в 0.1% растворе X-Gluc, содержащем 0.1 М натриевый фосфатный буфер (рН 7.0), 10 мМ Na₂EDTA и 0.1% Triton X-100. После инкубации с гистохимическим реактивом в течение ночи, зеленые ткани отбеливались обработкой 70% этанолом и исследовались под стереомикроскопом на наличие синей окраски. Все полученные T₀ GUS+ побеги каждого варианта укореняли в присутствии 25 мг/л Нуг, затем переносили в почвенную смесь, довели до цветения, самоопыляли и получали семена (T₁ потомство).

Для контроля наследования трансгенов и определения количества вставок, часть T₁ семян каждой полученной линии поверхностно стерилизовали последовательным погружением в 70% спирт, 5% раствор гипохлорита натрия, промывали в стерильной дистиллированной воде и проращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов. Интеграцию собственно целевого гена в растительные геномы определяли с помощью ПЦР анализа.

Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом ("Гера", Россия) на открытой светоплощадке при температуре 25–27°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк. Наблюдение за растениями поколения T₁ осуществляли начиная от стадии появления корешков до получения семян, что занимало от 4 до 6-ти месяцев. На чашках Петри отмечали время появления корешков, семядолей, оценивали скорость роста и дружность всходов. Замеры величины листьев производили только после пересадки в почву, через каждые 30, 45 дней и в период цветения), в итоге было осуществлено 3 замера. По каждому варианту (линия трансгенных растений) было отобрано по 5 растений, измеряли по три самых крупных нижних листа в длину, начиная от начала листовой пластины, по центральной жилке до самого кончика. Затем вычисляли среднее значение

длины листа для каждого растения. Длину стебля определяли в период цветения, так как стебель у табака начинал активно расти только через месяц после акклиматизации. Отмечали время перехода к цветению, определяли длину цветка, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика. При этом измеряли длину 3-х цветков с каждого растения и вычисляли среднее значение. Определяли площадь 3-х самых крупных нижних листьев и вычисляли среднее значение. Для изучения влияния конститутивной экспрессии целевого гена на размер и количество клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев одного возраста. Также определяли среднее число клеток, приходящихся на один лист и на 1 мм² листовой поверхности. Измерения проводили при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения. Кроме сравнительной морфологической характеристики, из растений выделяли ДНК и проводили ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск гомологов гена NtEXPA5 в GenBank, амплификация и получение генно-инженерных конструкций целевого гена в векторе pCambia 1301

Выравнивание нуклеотидных последовательностей кДНК генов различных экспансинов арабидопсиса, табака, томатов и тополя размерами около 750 п.н. показало, что наиболее высоким уровнем сходства к гену *NtEXPA5* обладают гены *LeEXPA2* (AF096776) томатов *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) и *PttEXPA2* (AY435100.1) осины *P. tremula* × *tremuloides*, которые с генами *AtEXPA1*, *AtEXPA10* арабидопсиса, *NtEXPA4* табака и *PttEXPA3* осины формируют отдельную родственную группу экспансинов (рис. 1). Наиболее близкой к этим экспансином является вторая группа, состоящая из генов *LeEXPA9*, *LeEXPA18*, *NtEXPA6*, *PttEXPA1* и *PttEXPA5* (рис. 1). Из литературных источников следует, что экспансины первой группы, а именно гены *AtEXPA10* (Cho et al., 2000), *PttEXPA2*, *PttEXPA3* (Gray-Mitsumune et al., 2004), *LeEXPA* (Argu et al., 2008) характеризуются высоким уровнем экспрессии в молодых листьях и принимают участие в регуляции роста и развития листьев. Исходя из этого, было высказано предположение, что сверхэкспрессия гена *NtEXPA5*, в первую очередь должна оказывать влияние на величину листьев. Другие экспансины на рисунке 1 не представлены, так как они обладают меньшей схожестью с исследуемым геном *NtEXPA5*. Для подбора праймеров и амплификации гена *NtEXPA5* табака была использована нуклеотидная последовательность под номером AF049354 из GenBank. Участок ДНК, содержащий ген *NtEXPA5*, был амплифицирован из геномной ДНК

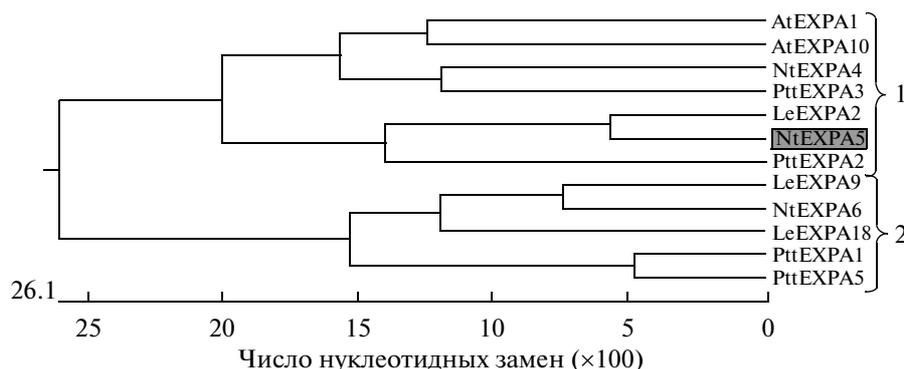


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов гена *NtEXPA5* с близкородственными экспансионами табака, томатов, арабидопсиса, тополя. Для выравнивания использовались нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания кДНК генов экспансионов размером около 750 п.н. Показаны две отдельные ветви экспансионов, которые, возможно, выполняют разные функции.

табака и его размер составил около 1000 п.н. (рис. 2а). Ампликон был клонирован в фагмидном Т-векторе рKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемым и не содержит замен нуклеотидов. Ген *NtEXPA5* был выщеплен из вектора рKRX по сайту *BsePI*, а липкие концы затуплены Т4-ДНК-полимеразой. После этого по сайту рестрикции *SmaI* было осуществлено ненаправленное клонирование целевого гена в векторе рCambia 1301. Полученный в результате электропорации агробактериальный клон, содержащий вектор рCambia 1301 с целевым геном в сенсорной ориентации, был использован для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получения трансгенных растений.

Получение трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевой генно-инженерной конструкцией с геном *NtEXPA5* было отобрано 15 первичных побегов. Из них укоренились на селективной среде с гигромицином 8 растений, которые все показали активность репортерного гена *GUS* в листьях. Из этих растений шесть были успешно акклиматизированы к условиям почвы и отобраны для дальнейшей работы. Таким образом, было получено 6 линий трансгенных растений с номерами 4, 5, 6, 8, 12 и 15. Из первых четырех отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *NtEXPA5* и 35S промотора. Было показано, что все 4 отобранные растения содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор. Экспрессия гена *NtEXPA5* в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР (рис. 2б), при этом в контрольных растениях уровень экспрессии был заметно ниже. Размер ампликона

при ОТ-ПЦР составил около 400 п.н., что совпадает с теоретически ожидаемым размером в 379 п.н. Из всех линий трансгенных растений были отобраны семена с целью получения второго поколения растений.

Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*

Семена шести линий трансгенных растений второго поколения были высеяны на селективную среду, где растения № 4 показали соотношение вы-

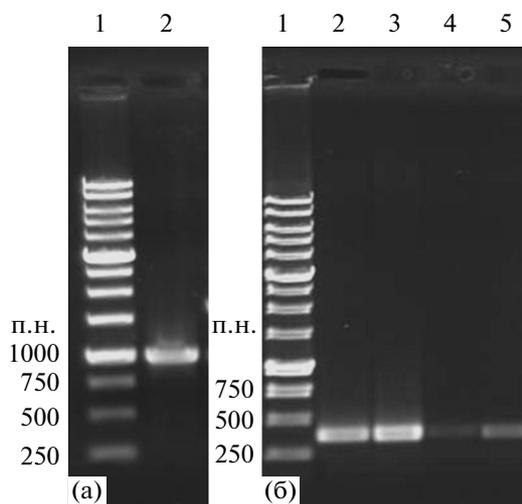


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР и ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5*. (а) — результаты ПЦР участка ДНК табака, содержащего ген *NtEXPA5*. 1 — маркеры молекулярной массы 250 п.н. — 10000 п.н. (Сибэнзим, Россия), 2 — ампликон гена *NtEXPA5* размером около 1000 п.н. (б) — результаты ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5*. 1 — маркеры молекулярной массы 250 п.н. — 10000 п.н. (Сибэнзим, Россия). 2, 3 — ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* размером 379 п.н. из трансгенных растений. 4, 5 — ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* из контрольных растений.

Морфофизиологические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301, и трансгенных растений табака поколения T₁, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5* арабидопсиса

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 1301	Линии трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген <i>NtEXPA5</i>		
		pCambia 1301 NtEXPA5 № 4	pCambia 1301 NtEXPA5 № 5	pCambia 1301 NtEXPA5 № 6
<i>Длина листьев, см</i>				
30 дней	3.6 ± 0.3	2.7 ± 0.4	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.1
45 дней	10.3 ± 0.8	7.4 ± 0.9	7.7 ± 0.1	8.9 ± 0.4
В период цветения	17.2 ± 0.6	19 ± 0.1	20.9 ± 0.2	19.7 ± 0.2
<i>Площадь трех самых крупных листьев, см²</i>	148 ± 2	162.7 ± 3.9	178.5 ± 6.2	178.0 ± 3.4
<i>Высота стебля, см</i>	78 ± 3	96.5 ± 0.5	113.5 ± 2.1	96.6 ± 1.9
<i>Длина цветка, см</i>	4.49 ± 0.01	4.55 ± 0.01	4.90 ± 0.03	4.88 ± 0.07
Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм ²	15472 ± 753	24342 ± 114	23303 ± 1582	19041 ± 261
Число клеток эпидермиса листьев на 1 мм ²	71.5 ± 2.8	41.1 ± 0.2	44.1 ± 2.5	52.3 ± 0.8

живших и погибших 72 : 22, растения № 5 – 66 : 21 и растения № 6 – 82 : 23, что близко к классическому соотношению 3 : 1 ($\chi^2 = 0.13; 0.03; 0.54$, соответственно), а это косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Соотношение выживших и погибших у других трех линий растений было ближе к значению 15 : 1, что предполагает двойное встраивание трансгена, поэтому эти растения в дальнейших экспериментах не использовались. По 5 растений отобранных линий № 4, № 5 и № 6 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфофизиологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (pCambia 1301 № 5).

Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (таблица). В то же время в период цветения листья у опытных растений были длиннее на 10–22% (рис. 3 и 4). По площади листьев трансгенные растения также характеризовались увеличением на 10–21% (таблица). По высоте стебля опытные растения были заметно выше контрольных, и разница составляла у линии № 4 и № 6 24%, а у линии № 5 – 46%. По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были небольшими и в целом составили от 1% у линии № 4 до 9% у линий № 5 и № 6 (таблица). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не различались (рис. 3).

Для выяснения причины увеличения размеров листьев и стебля, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса ли-

стьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет стимуляции клеточного деления. Трансгенные по гену *NtEXPA5* растения, в отличие от контрольных растений, характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев (рис. 3). При этом у линии № 4 клетки были больше на 57%, у линии № 5 на 51%, а у линии № 6 на 23% крупнее, чем у контрольных растений (рис. 4). Из полученных данных видно, что размеры клеток у опытных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры отдельных органов (рис. 4).

Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев и эпидермиса цветков. Например, клетки мезофилла листьев по сравнению с контролем были увеличены в среднем на 20–40%, а размеры клеток эпидермиса цветков лишь на 10–15%. То есть сверхэкспрессия гена *NtEXPA5* в первую очередь влияла на величину клеток листьев, а размеры клеток эпидермиса цветков изменялись в гораздо меньшей степени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *NtEXPA5* по схожести нуклеотидных последовательностей оказался наиболее близким к экспансионам, участвующим в регуляции роста и развития листьев. Действительно, эктопическая экспрессия гена *NtEXPA5* приводила, в первую очередь к увеличению размеров листьев, но в то же время у анализируемых растений были существенно увеличены и размеры стебля. Ранее нами были получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие гены *AtEXPA10* арабидопсиса и

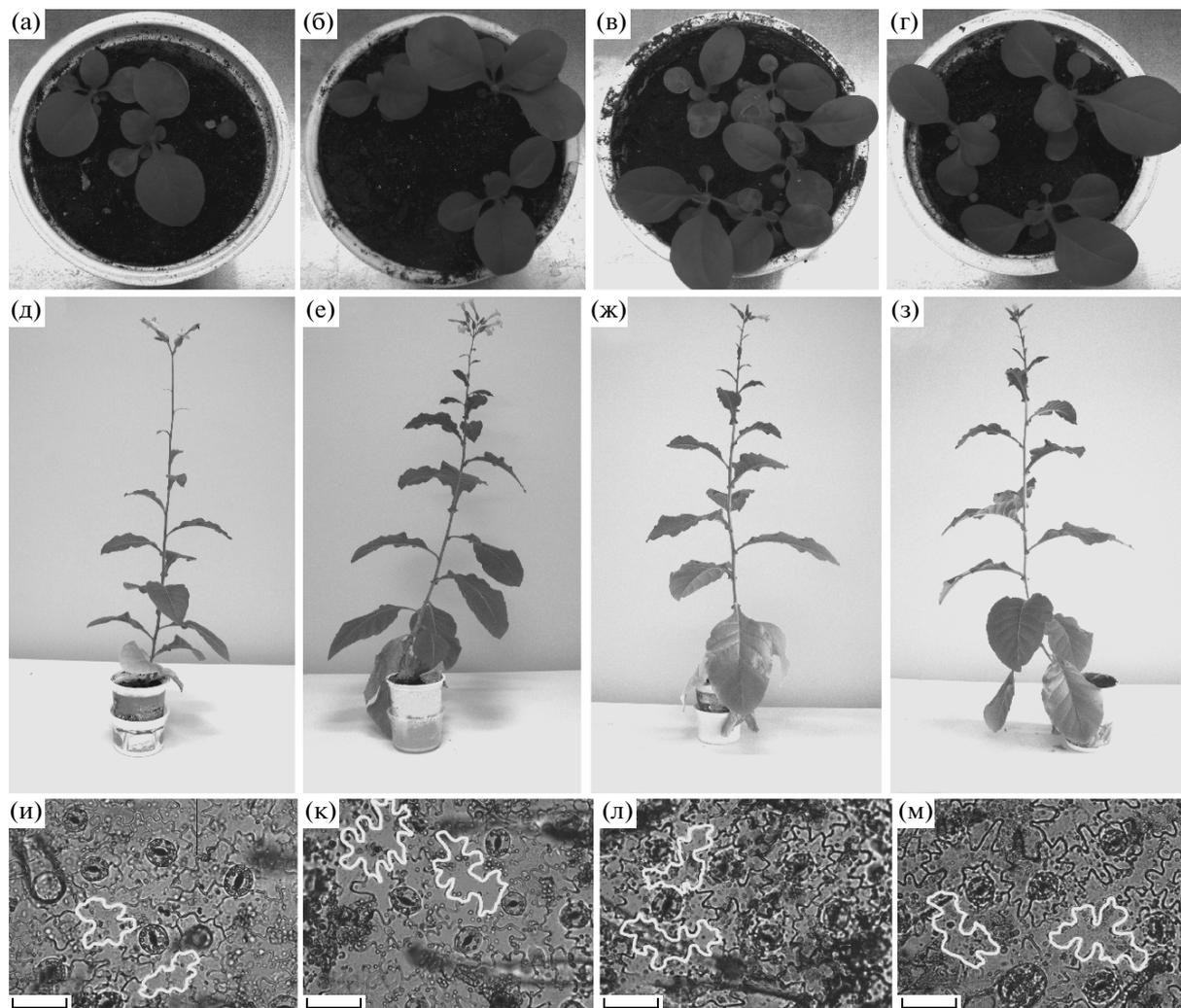


Рис. 3. Сравнение трансгенных растений поколения T_1 сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*, и контрольной группы, содержащей в своем геноме векторную молекулу без целевого гена. (а) — контрольные растения через 30 дней после акклиматизации; (б–г) — трансгенные растения через 30 дней после акклиматизации; (д) — контрольные растения в период цветения; (е–з) — трансгенные по гену *NtEXPA5* растения табака в период цветения; (и) — клетки эпидермиса листьев контрольных растений табака, увеличение 200 \times ; (к–м) — клетки эпидермиса листьев трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака, увеличение 200 \times . Шкала 50 мкм.

PnEXPA1 тополя черного (Кулуев и др., 2012). Трансгенные по генам *AtEXPA10* и *PnEXPA1* растения характеризовались увеличением размеров листьев на 20–40%, а у трансгенных по гену *NtEXPA5* растений листья были больше лишь на 10–20%. Интересно отметить, что стебли у трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака были больше, чем у контрольных растений на 24–46%, против разницы в 16–29% в случае с генами *AtEXPA10* и *PnEXPA1*. Отсюда можно сделать вывод о том, что эктопическая экспрессия гена *NtEXPA5* в первую очередь влияет именно на рост стебля в длину, а на рост листьев в меньшей степени. Повышенная экспрессия гена *NtEXPA5* практически не влияла на рост цветков, что может объясняться компенсаторным влиянием других путей генетического

контроля размеров цветков у табака. Повышенный уровень экспрессии гена *NtEXPA5* мог привести и к уменьшению размеров органов (Гао и др., 2010), однако все проанализированные нами трансгенные растения характеризовались увеличением размеров всех вегетативных органов или соответствием контрольным растениям.

Как и предполагалось, все полученные трансгенные растения отличались увеличением размеров клеток эпидермиса и паренхимы листьев. В среднем величина клеток увеличивалась на 25–55%, при этом листья у анализируемых растений увеличивались лишь на 10–20%. Это говорит о том, что в листьях трансгенных растений происходило компенсаторное уменьшение количества клеток, что способствовало, сохранению размеров

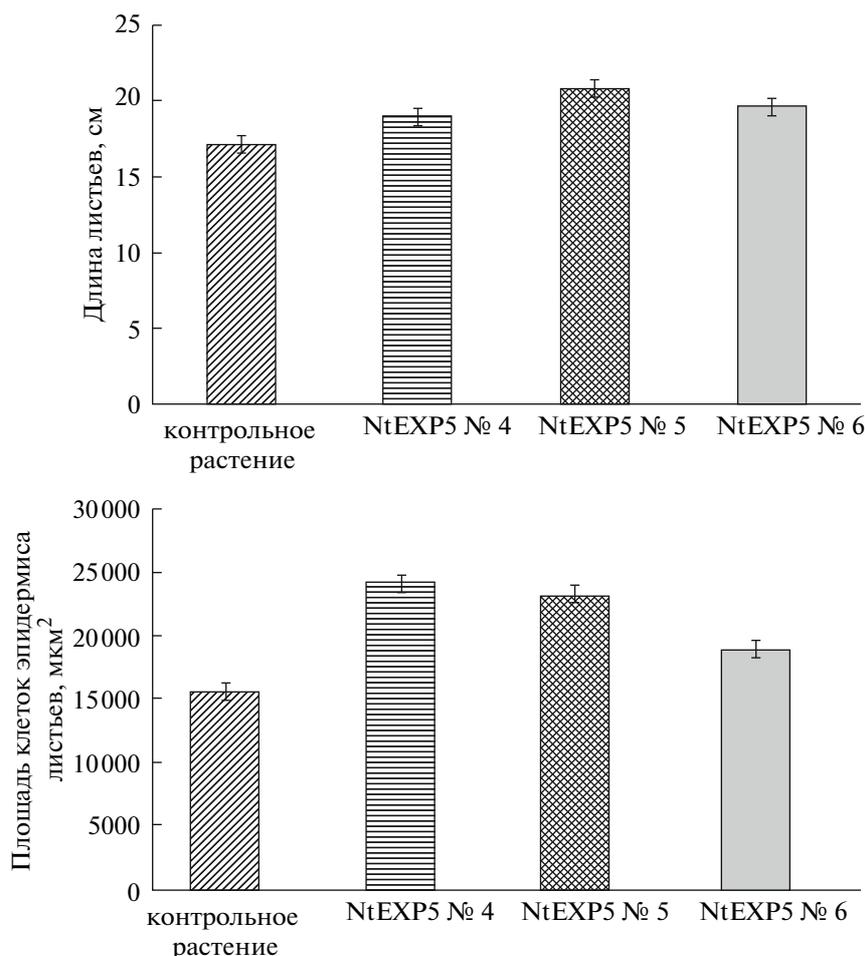


Рис. 4. Сравнительный анализ длины листьев и размеров клеток эпидермиса листьев трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*.

органов близких к размерам органов контрольных растений. В связи с полученными данными не исключается, что сверхэкспрессия экспансинов влияет негативно на уровень экспрессии различных транскрипционных факторов, стимулирующих клеточное деление, например, AP2-фактора AINTEGUMENTA (Mizukami et al., 2000), при этом сигнальными молекулами могут оказаться различные фитогормоны.

Результаты наших исследований показывают, что ген *NtEXPA5* может быть применен для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Особенно данный ген актуален для увеличения длины стебля, что может иметь практическое значение в лесной биотехнологии. Однако применение этого гена ограничивается компенсаторным механизмом в растениях, направленным на поддержание гомеостаза. Для преодоления этих трудностей необходимо вместо конститутивных использование тканеспецифичных и индуцибельных промоторов, а также, наряду со сверхэкспрессией экспансинов, одновременно стимулировать

биосинтез транскрипционных факторов, регулирующих клеточное деление, уровень экспрессии которых в трансгенных по экспансином растений, по всей видимости, снижен.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (контракт № 16.518.11.7047).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гао К., Лю К., Лю И.Т. Специфическая роль АТЕХР1 при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 245–253.
- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П. и др. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108–117.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.

- Aljanabi S.M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4692–4693.
- Arru L., Rognoni S., Poggi A. et al.* Effect of sugars on auxin-mediated *LeEXPA2* gene expression // *Plant Growth Regul.* 2008. V. 55. P. 11–20.
- Azeez A., Sane A.P., Tripathi S.K. et al.* The gladiolus *GgEXPA1* is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence // *Postharvest Biology and Technology.* 2010. V. 58. P. 48–56.
- Cho H.T., Cosgrove D.J.* Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 9783–9788.
- Cosgrove D.J., Bedinger P.A., Durachko D.M.* Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 6559–6564.
- Gray-Mitsumune M., Blomquist K., McQueen-Mason S. et al.* Ectopic expression of a wood-abundant expansin PttEXPA1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 62–72.
- Horiguchi G., Kim G.T., Tsukaya H.* The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2005. V. 43. P. 68–78.
- Hu Y., Poh H., Chua N.* The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // *The Plant J.* 2006. V. 47. P. 1–9.
- Lee Y., Choi D., Kende H.* Expansins: over-expanding numbers and functions // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. V. 4. P. 527–532.
- Link B.M., Cosgrove D.J.* Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 907–916.
- Mizukami Y., Fisher R.L.* Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 942–947.
- Nishikubo N., Awano T., Banasiak A. et al.* Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar – a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 843–855.
- Park C.H., Kim T.W., Son S.H. et al.* Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. P. 380–387.

Effect of Ectopic Expression of *NtEXPA5* Gene on Cell Size and Growth of Organs of Transgenic Tobacco Plants

B. R. Kuluev, M. G. Safiullina, A. V. Knyazev, and A. V. Chemeris

Research Institute for Biochemistry and Genetics, Scientific Center of Ufa, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia
e-mail: kuluev@bk.ru

Abstract—We obtained transgenic tobacco plants demonstrating overexpression of *NtEXPA5* gene that encodes α -expansin of *Nicotiana tabacum*. The transgenic plants were characterized by increased size of leaves and stems. However, size of flowers remained almost unchanged. The increase of organ sizes was induced by cell stretching only. Moreover, the number of cell divisions was even decreased. The obtained data suggest tight interaction between cell stretching regulation and cell division, which together provide the basic mechanism aimed at the controlling of plant organ sizes.

Keywords: expansins, cell stretching, cell division, organ size, *NtEXPA5*, overexpression, transgenic plants, *Nicotiana tabacum*.