

**IN SILICO АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИС-ЭЛЕМЕНТОВ В ПРОМОТОРАХ
ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АПОПЛАСТНУЮ ИНВЕРТАЗУ
И САХАРОЗОСИНТАЗУ У БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ**© 2020 г. Т. В. Тарелкина^а, *, Н. А. Галибина^а, Ю. Л. Мощенская^а, Л. Л. Новицкая^а^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: karelina.t.v@gmail.com

Поступила в редакцию 23.02.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 17.05.2020 г.

Работа является продолжением исследований по выявлению роли сахарозы в процессе формирования узорчатой древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti). Ранее было установлено, что при данном типе ксилогенеза в тканях ствола березы существенно изменяется активность ферментов метаболизма сахарозы — сахарозосинтазы и инвертазы. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о том, что активность указанных ферментов регулируется преимущественно на уровне транскрипции кодирующих их генов (*SUS* и *CWInv*). В геноме березы повислой мы идентифицировали гены, кодирующие сахарозосинтазу и апопластную инвертазу. *In silico* анализ регуляторных *цис*-элементов, присутствующих в 2 Кб промоторной области этих генов, позволил выявить ряд мотивов, участвующих в регуляции их экспрессии. Наибольшей как по числу отдельных элементов, так и по их встречаемости была группа элементов, связанная с влиянием абиотических факторов, в основном, света и недостатка влаги. Идентифицирован ряд тканеспецифичных мотивов, функция которых связана с экспрессией генов в проводящих тканях. Анализ гормон-зависимых элементов показал, что формирование узорчатой древесины карельской березы, происходящее на фоне высокой активности апопластной инвертазы, очевидно, не связано с активацией генов *CWInv* высоким уровнем ауксина. В исследованных последовательностях промоторов обнаружены различные элементы, указывающие на непосредственное влияние сигналинга сахаров. Выявлены два наиболее вероятных кандидата на участие в регуляции углеводного метаболизма в тканях ствола березы — транскрипционные факторы (ТФ) DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. Идентификация и функциональная характеристика ТФ семейства DOF у березы повислой представляют интерес с точки зрения регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза.

Ключевые слова: сахарозосинтаза, апопластная инвертаза, абиотический стресс, сигналинг сахаров, ауксин-зависимая экспрессия генов, береза повислая

DOI: 10.31857/S0475145020050080

ВВЕДЕНИЕ

Узорчатая древесина (ксилема) карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti) по рисунку напоминает мрамор и является одной из самых дорогостоящих в Северной Европе (Hagqvist, Mikkola, 2008). Признак узорчатости древесины наследуется, однако его проявление находится под контролем факторов среды (Hintikka, 1941; Соколов, 1970; Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Евдокимов, 1989; Новицкая, 2008; Novitskaya et al., 2016b; Galibina et al., 2019a). Кроме того, узорчатость может сильно варьировать в пределах одного ствола (Novitskaya et al., 2016a, 2016b) (рис. 1). Высокий уровень изменчивости

делает карельскую березу уникальным объектом для исследования механизмов регуляции ксилогенеза.

Формирование узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне высокой концентрации сахарозы в камбиальной зоне (Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016a) и сопровождается изменением активности расщепляющих сахарозу ферментов. У обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и у безузорчатых деревьев карельской березы расщепление сахарозы в зоне роста и дифференциации структурных элементов ксилемы в основном происходит с участием цитоплазматического фермента сахарозосинтазы



Рис. 1. Поперечный спил ствола карельской березы (кора удалена). Узорчатая древесина сформировалась вокруг древесины обычного строения после прореживания древостоя (резкое улучшение освещенности кроны). Хорошо видна асимметричность узора.

(СС) (Galibina et al., 2015b; Moshchenskaya et al., 2016; Novitskaya et al., 2020). Образование узорчатой древесины карельской березы связано с расщеплением сахарозы апопластной инвертазой (АпИнв) и поступлением в клетку большого количества гексоз (Galibina et al., 2015a, 2019b; Moshchenskaya et al., 2016; Novitskaya et al., 2020). Установлено, что активность СС в проводящих тканях ствола березы коррелирует с уровнем экспрессии кодирующих данный фермент генов *BpSUS1* и *BpSUS2* (Moshchenskaya et al., 2017). Активность АпИнв регулируется как на уровне экспрессии генов (*CWInv1.0*, *CWInv1.1*, *CWInv4*), так и на посттрансляционном уровне с участием ингибитора АпИнв, кодируемого геном *BpCif* (Galibina et al., 2019b).

К настоящему моменту накоплен значительный объем данных об участии сахарозосинтазы и инвертазы в различных физиологических процессах в растительном организме (Roitsch, 1999; Koch, 2004; Ruan, 2014; Moshchenskaya et al., 2019; Stein, Granot, 2019), проведены исследования по выявлению их роли в ксилогенезе и флоэмогенезе древесных растений (Sung et al., 1993, 1996; Nauch, Magel, 1998; Sauter, 2000; Coleman et al., 2009; Li et al., 2012; Roach et al., 2017). В то же время, молекулярно-генетические механизмы, участвующие в регуляции метаболизма сахаров, изучены слабо (Li et al., 2017; Stein, Granot, 2019). Наибольшее количество публикаций по данной теме посвящено результатам изучения регуляции экспрессии генов, кодирующих СС и АпИнв, на уровне тран-

скрипции. В этом случае регуляция осуществляется через взаимодействие сигнальных молекул (сахаров, гормонов и др.) или транскрипционных факторов (ТФ) с регуляторными *цис*-элементами, расположенными в 5'-фланкирующей области генов. Механизмы такого взаимодействия в настоящее время изучены слабо, однако экспериментальным путем было идентифицировано большое количество *цис*-элементов, участвующих в регуляции экспрессии генов в связи с действием эндогенных и экзогенных факторов (Galkin et al., 2004; Priest et al., 2009; Biłtas et al., 2016). Ряд *цис*-элементов был идентифицирован в промоторах генов, кодирующих ферменты углеводного обмена. Так, показано, что *цис*-элементы в промоторе гена СС риса *RSus1* необходимы для его сахарозо-индуцируемой экспрессии (Chang et al., 2011). Установлено, что содержащиеся в промоторах генов АпИнв томата *Lin5* и *Lin7* элементы сигналинга гиббереллина, ауксина и абсцизовой кислоты обуславливают индукцию экспрессии этих генов соответствующими гормонами (Proels et al., 2003). В промоторе гена АпИнв томата *Lin6* были идентифицированы мотивы, связанные с раневым сигналингом и суточными ритмами, и экспериментально показана индукция экспрессии данного гена соответствующими стимулами (Proels, Roitsch, 2009). Сравнительный анализ последовательностей промотора гена АпИнв табака *Nicotiana benthamiana* и промоторов 30 других его генов, демонстрирующих аналогичный профиль экспрессии при воздействии различных стрессовых факторов, позволил устано-

Таблица 1. Число регуляторных *цис*-элементов в 2 Кб промоторной области генов *BpSUS1–4* и *BpCWInv1–3*

Группа элементов	<i>BpSUS1</i>	<i>BpSUS2</i>	<i>BpSUS3</i>	<i>BpSUS4</i>	<i>BpCWInv1</i>	<i>BpCWInv2</i>	<i>BpCWInv3</i>
Чувствительные к влиянию абиотических факторов	38	28	26	31	26	36	30
Тканеспецифичные	20	20	25	25	18	22	20
Гормончувствительные	12	13	17	15	15	9	12
Сахарочувствительные	8	7	8	5	8	2	5
Прочие	30	23	22	22	24	24	24
Всего элементов	108	91	98	99	91	93	91

вить важную роль *цис*-элементов, участвующих в стрессовом сигналинге, в регуляции координированной экспрессии генов (Sheshadri et al., 2018).

На основании вышесказанного можно заключить, что изучение регуляторных механизмов экспрессии генов, участвующих в углеводном обмене при различных сценариях ксилотрофии, представляет большой интерес с точки зрения познания механизмов нормального и аномального роста у древесных растений. В геноме березы повислой мы идентифицировали гены, кодирующие сахарозосинтазу и апопластную инвертазу, и изучили регуляторные элементы, присутствующие в их промоторных областях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск генов, кодирующих СС и АПИнв, проводили в геноме березы повислой (*Betula pendula* Roth), опубликованном на портале CoGe (Salojärvi et al., 2017). С этой целью нуклеотидные последовательности CDS и соответствующие им белковые последовательности генов *SUS* и *CWIN* *Arabidopsis thaliana* и *Populus trichocarpa* (базы данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (release 13, <https://www.arabidopsis.org>) и Phytozome (release 3.0, <http://www.phytozome.net/poplar>)) использовали в качестве поискового запроса BLAST по геному *B. pendula* (release 1.2, <https://genomevolution.org/coge>) для выявления гомологичных последовательностей.

Предсказание структуры белков березы повислой выполняли с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Marchler-Bauer, Bryant, 2004), предсказание физических свойств — с помощью ресурса Expert Protein Analysis System (ExPASy) (<https://www.expasy.org/>) (Artimo et al., 2012).

Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW. Фи-

логенетическое древо было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method), оценку достоверности кластеризации проводили методом bootstrap с 1000 повторами (Felsenstein, 1985; Saitou, Nei, 1987; Tamura et al., 2004). Определение степени идентичности/сходства последовательностей выполнено с помощью ресурса EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Для анализа методами биоинформатики были использованы промоторные области генов длиной 2000 пар нуклеотидов до старта транскрипции. Поиск *цис*-регуляторных элементов, расположенных в промоторах исследуемых генов, выполняли с помощью ресурсов New-PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo et al., 1999) и PlantPAN 3.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/>) (Chow et al., 2019). Помимо инструментов для выявления *цис*-элементов, указанные ресурсы содержат информацию об экспериментально проверенных функциях *цис*-элементов и ассоциированных с ними транскрипционных факторах (ТФ). Для выявления потенциальных сайтов связывания с ТФ проводили анализ частоты встречаемости *цис*-элементов и ее статистическое оценивание на основании встречаемости *цис*-элементов в промоторах модельных организмов *A. thaliana* и *P. trichocarpa* с помощью инструмента Regulation Prediction ресурса PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>) (Tian et al., 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация генов *SUS* и *CWINv* в геноме березы повислой

Гены семейств *SUS* и *CWINv* были идентифицированы и охарактеризованы у ряда древесных растений. У *Vitis vinifera* было выявлено 5 генов *SUS* (Zhu et al., 2017), по 6 генов — у *Citrus unshiu* (Islam et al., 2014) и *Prunus persica* (Zhang et al., 2015), 11 генов — у *Malus domestica* (Tong et al., 2018) и 15 генов у *Populus trichocarpa* (An et al., 2014). По 3 гена *CWINv* было идентифицировано у *Malus do-*

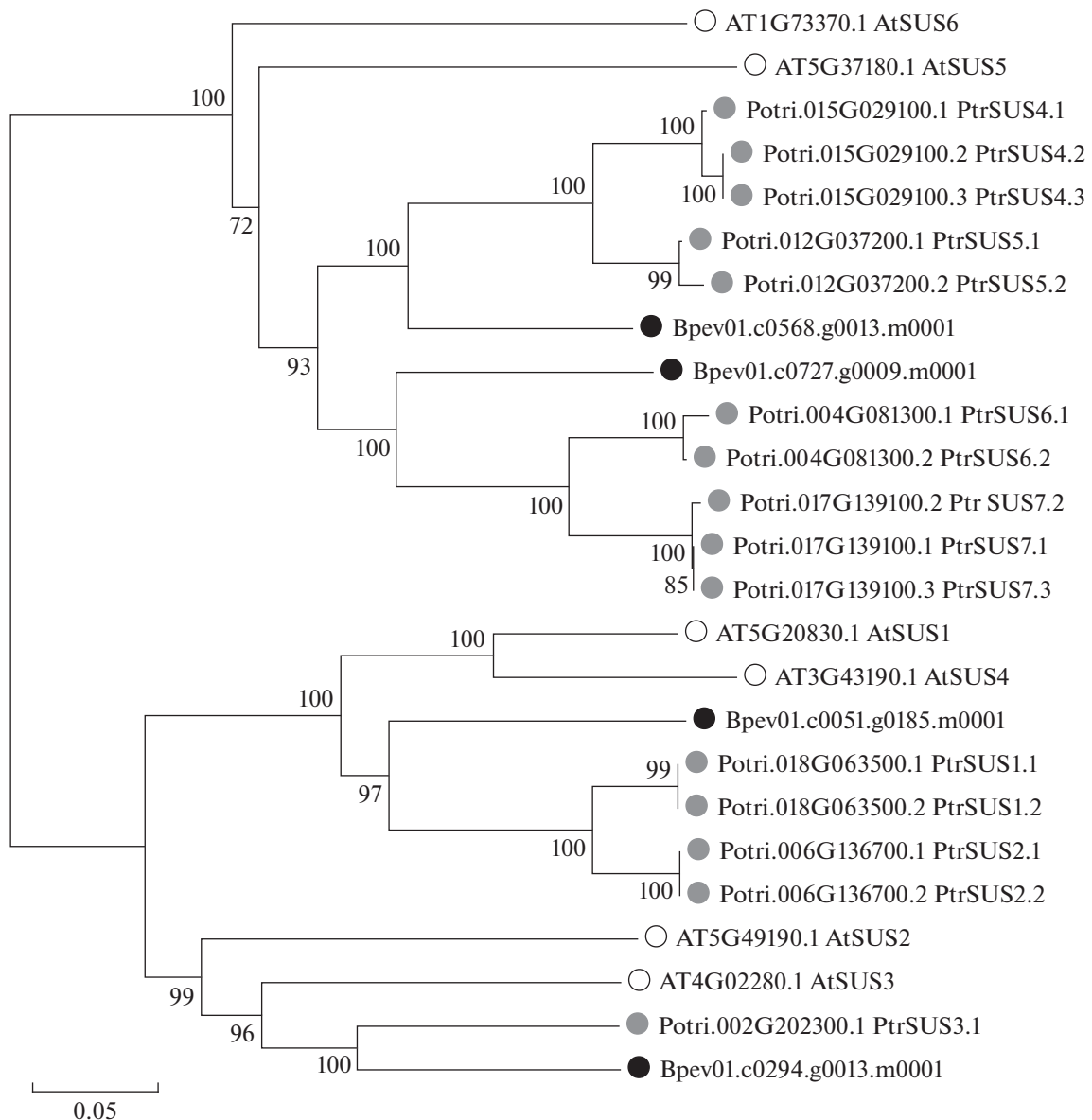


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей (CDS) потенциальных генов *SUS Betula pendula* и известных генов *SUS Arabidopsis* и *Populus*. Гены *Betula pendula* обозначены черным цветом, *Arabidopsis thaliana* – белым цветом, *Populus trichocarpa* – серым цветом. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви.

mestica (Hyun et al., 2011), *Camellia sinensis* (Qian et al., 2016) и *Populus trichocarpa* (Chen et al., 2015).

В геноме березы повислой было выявлено 4 гена *SUS*, кодирующих белки, гомологичные CC *Arabidopsis* и *Populus* (рис. 2). Генам *Bpev01.c0294.g0013.m0001*, *Bpev01.c0051.g0185.m0001* и *Bpev01.c0727.g0009.m0001* были присвоены названия *BpSUS1*, *BpSUS2* и *BpSUS3* соответственно, т.к. последовательности CDS этих генов продемонстрировали высокий уровень сходства с CDS генов *SUS1–SUS3 Betula luminifera* (номера доступа NCBI KC204973.1, KC204974.1, KC204975.1).

Гену *Bpev01.c0568.g0013.m0001* было присвоено название *BpSUS4*. Структура и физические свойства предсказанных белков соответствовали сахарозосинтазам, выявленным у других высших растений (Дополнительные материалы, табл. Д1).

Филогенетический анализ показал, что из 5 генов березы повислой, принадлежащих к подсемейству кислых инвертаз, 3 гена гомологичны апопластным инвертазам *Arabidopsis* и *Populus*, в то время как последовательности двух других генов ближе к вакуолярным инвертазам (рис. 3). По результатам филогенетического анализа ге-

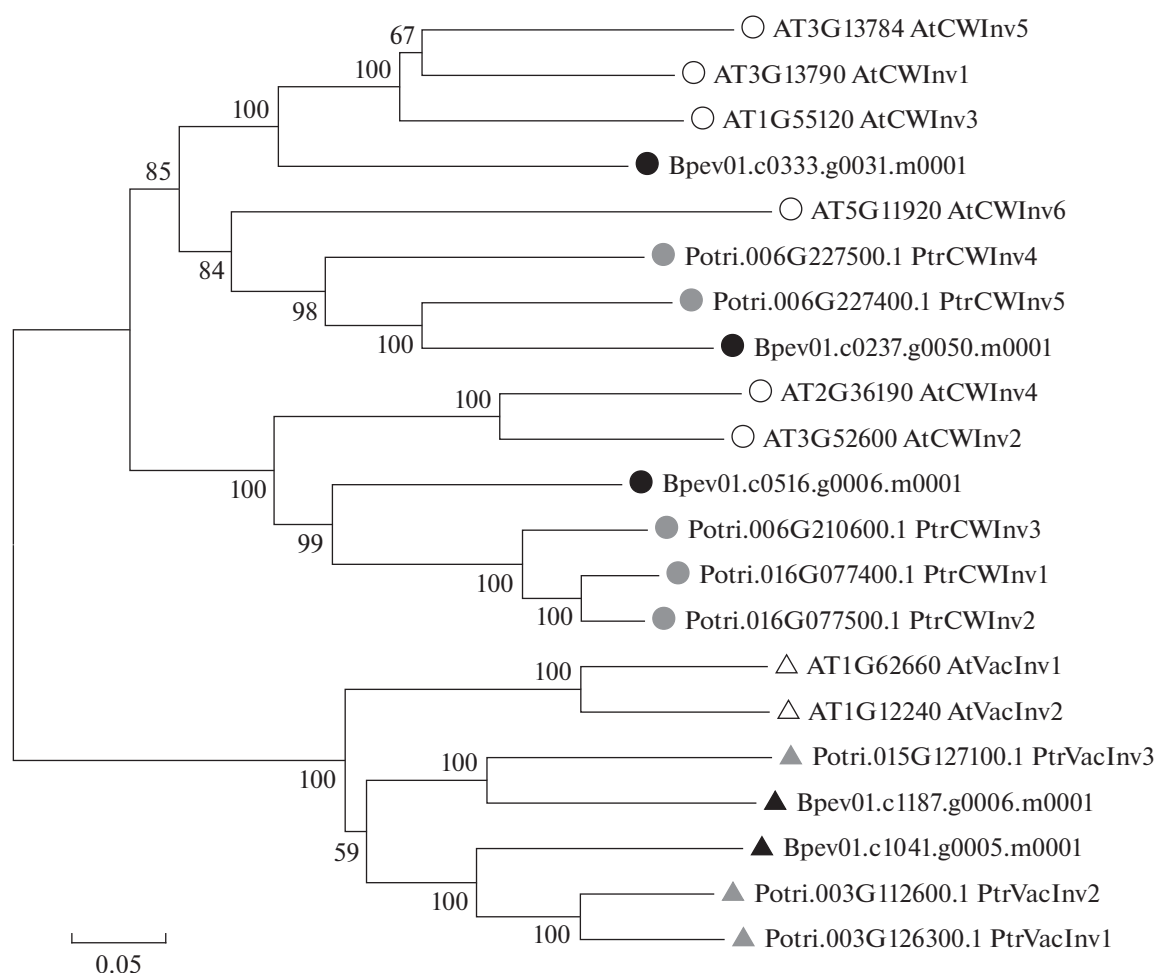


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей (CDS) потенциальных генов *CWInv* *Betula pendula* и известных генов *CWInv* и *VacInv* *Arabidopsis* и *Populus*. Гены *Betula pendula* обозначены черным цветом, *Arabidopsis thaliana* — белым цветом, *Populus trichocarpa* — серым цветом. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви.

нам *Bpev01.c0333.g0031*, *Bpev01.c0516.g0006* и *Bpev01.c0237.g0050*, кодирующим потенциальные АПИИ, были присвоены названия *BpCWInv1*, *BpCWInv2* и *BpCWInv3* соответственно (соответствуют *CWIN1.1*, *CWIN4*, *CWIN1* по Galibina et al., 2019b). По своей структуре и физическим свойствам предсказанные апопластные инвертазы березы повислой соответствовали апопластным инвертазам других растений (Дополнительные материалы, табл. Д2).

In silico анализ цис-элементов в промоторных областях генов

Исследование промоторных областей генов *SUS* и *CWInv* позволило выявить в их последовательностях ряд регуляторных элементов, как общих для нескольких промоторов, так и уникаль-

ных, т.е. встречающихся только в одной последовательности. В промоторах четырех генов *SUS* было выявлено 54 общих цис-элемента, в промоторах трех генов *CWInv* — 58 общих цис-элементов (рис. 4). Промотор гена *SUS1* содержал наибольшее количество уникальных элементов — 18. В промоторе *SUS3* было выявлено 14 уникальных мотивов, в промоторах *SUS2* и *SUS4* — по 4 уникальных цис-элемента (рис. 5). В промоторах генов *CWInv1*, *CWInv2* и *CWInv3* было выявлено 13, 15 и 13 уникальных элементов, соответственно (рис. 6).

С учетом опубликованных данных, содержащихся в базах данных NewPLACE (Higo et al., 1999) и PlantPAN 3.0 (Chow et al., 2019), все элементы были разделены на основании их функции на следующие группы: 1) тканеспецифичные элементы, 2) элементы, участвующие в гормональной регуляции, 3) элементы, участвующие в саха-

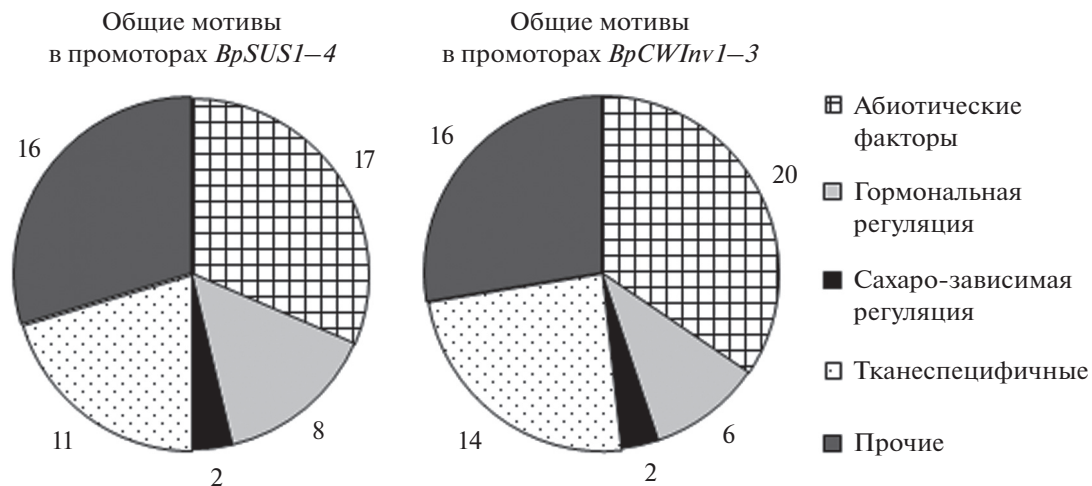


Рис. 4. Распределение общих мотивов в промоторах *BpSUS1-4* и *BpCWInv1-3* по группам в зависимости от функции. Числа обозначают количество *цис*-элементов в каждой группе.

ро-зависимой регуляции, 4) элементы, связанные с влиянием абиотических факторов, 5) прочие элементы (табл. 1).

Цис-элементы, связанные с влиянием абиотических факторов

In silico анализ регуляторных *цис*-элементов в 2 Кб промотора выявленных генов *SUS* и *CWInv* показал, что наиболее значительная группа (как по числу отдельных мотивов, так и по их встречаемости) была связана с действием различных абиотических факторов (табл. 1, рис. 4).

По количеству копий в промоторной области длиной 2 Кб у всех генов *SUS* и *CWInv*, в этой группе доминировали мотивы, связанные с реакцией на свет и недостаток влаги (GT1CONSENSUS, GATABOX, MYCCONSENSUSAT, ACGTATERD1 и др). Помимо них присутствовали элементы, связанные с регуляцией экспрессии повышенной и пониженной температурой, а также аноксией (RAV1AAT, LTRE1HVBLT49, CCAATBOX1, CURECORECR). В отличие от генов *SUS* в промоторах всех генов *CWInv* был выявлен элемент, участвующий в сигналинге фосфора (WBBOXPCWRKY1). Кроме того, в промоторах *CWInv* встречалось большее количество элементов, связанных с реакцией на аноксию (CURECORECR, ANAERO2CONSENSUS, ANAERO1CONSENSUS).

Наличие большого числа *цис*-элементов, участвующих в реакциях на различные абиотические стрессовые факторы в промоторах генов *SUS* и *CWInv*, согласуется с данными об участии сахаров в поддержании функций тканей древесных растений в условиях различных стрессов (Tomasella et al., 2019). Большое число идентичных мотивов,

связанных с воздействием света, водного и анаэробного стрессов и пониженной температуры, и близкие значения их встречаемости в промоторах генов из обеих групп позволяет предположить однонаправленное изменение уровня их экспрессии в ответ на действие этих факторов. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о подавлении формирования узорчатой древесины у карельской березы при ее произрастании в условиях плохой освещенности, низкой температуры и недостатка влаги (Евдокимов, 1989; Новицкая, 2008).

Промоторы *SUS1* и *SUS3* содержали уникальные элементы, связанные с сигналингом фосфора (P1BS) и иона аммония (AMMORESIVDCRNIA1) (рис. 5). Мотив P1BS является сайтом связывания с ТФ phosphorus starvation response 1 (Psr1) и присутствует в промоторах генов, экспрессия которых специфически активируется дефицитом фосфора у различных растений (Sobkowiak et al., 2012). Выявленные ранее изменения активности СС у растений карельской березы, произрастающих на почвах, отличающихся по уровням доступного азота и фосфора, может быть обусловлено наличием данных *цис*-элементов в промоторах соответствующих генов (Galibina et al., 2016, 2019a; Moshchenskaya et al., 2016).

Цис-элементы, участвующие в тканеспецифичной экспрессии генов

Анализ экспрессии генов *SUS* у различных растений свидетельствует о том, что, несмотря на структурную и функциональную близость кодируемых ими белков, отдельные гены *SUS* демонстрируют выраженную тканеспецифичную экспрессию (Xu et al., 2019). Гены *CWInv* специфично

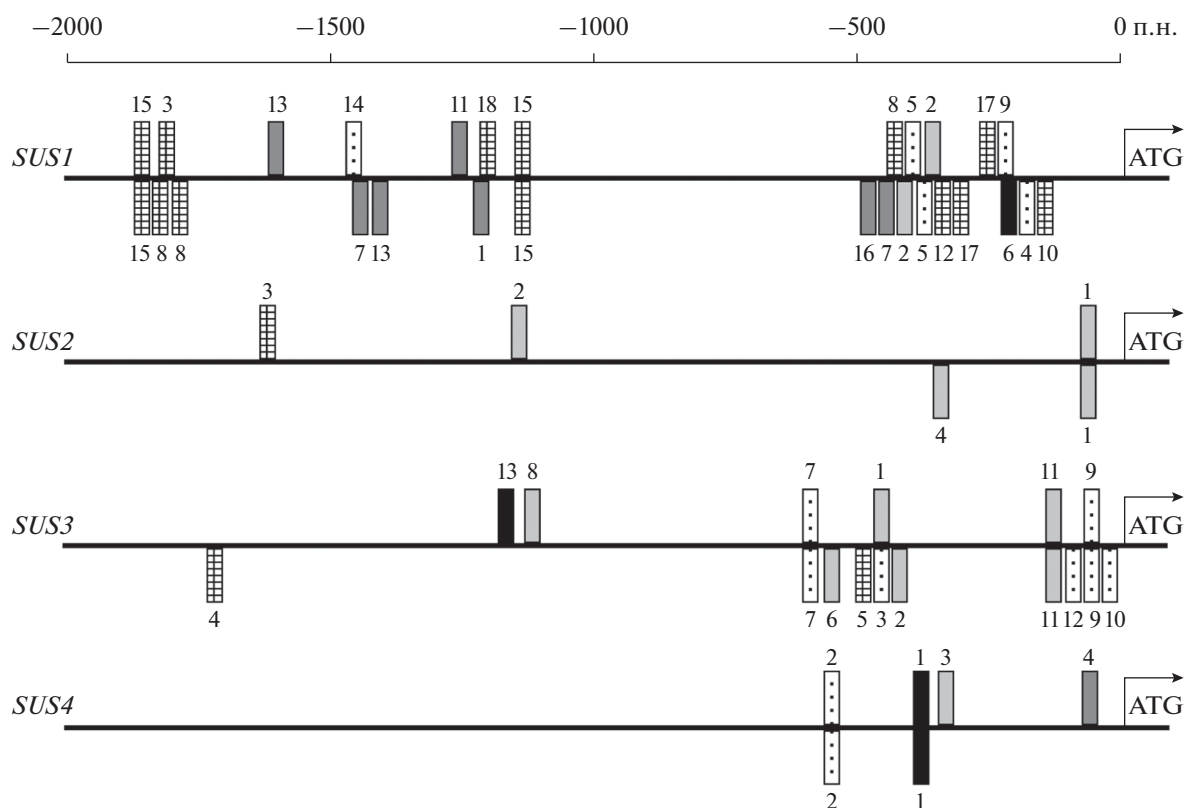


Рис. 5. Схема расположения уникальных *цис*-элементов в промоторах *BpSUS1–4*. Цветовые обозначения аналогичны рис. 3. Цифрами обозначены следующие элементы: *SUS1* 1 – 300CORE, 2 – ABRERATCAL, 3 – AT1BOX, 4 – BS1EGCCR, 5 – CACGTGMOTIF, 6 – CGACGOSAMY3, 7 – CTRMCAMV35S, 8 – HDZIP2ATATHB2, 9 – HEXAMERATH4, 10 – IBOXCORENT, 11 – INTRONLOWER, 12 – IRO2OS, 13 – MARARS, 14 – NAPINMOTIFBN, 15 – P1BS, 16 – QARBNEXTA, 17 – RAV1BAT, 18 – REBETALGLHCB21. *SUS2* 1 – CGCGBOXAT, 2 – PROXBBNAPA, 3 – SORLREP3AT, 4 – TATCCACHVAL21. *SUS3* 1 – ABRE3HVA22, 2 – ABREATCONSENSUS, 3 – ACGTOSGLUB1, 4 – AMMORESIVDCRNIA1, 5 – BOXIIPCCHS, 6 – C2GMAUX28, 7 – CARGNCAT, 8 – GARE1OSREP1, 9 – RYREPEATGMGY2, 10 – RYREPEATLEGUMINBOX, 11 – RYREPEATVFLEB4, 12 – SPHCOREZMC1, 13 – SURE1STPAT21. *SUS4* 1 – ACGTABOX, 2 – ACGTCBOX, 3 – AGCBOXNPGLB, 4 – TATABOX1.

экспрессируются во флоэме акцепторных органов, в связи с чем высказывается мнение, что их появление связано с развитием транспортной системы высших сосудистых растений (Wan et al., 2018).

В промоторах обеих групп исследованных нами генов было выявлено большое количество различных *цис*-элементов, участвующих в тканеспецифичной экспрессии генов в семенах, корнях, мезофилле листа и пыльце (CAATBOX1, ROOTMOTIFTAPOX1, CACTFTPPCA1, GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 и др.). Помимо общих для всех генов элементов, в промоторах отдельных генов *SUS* и *CWInv* встречались уникальные тканеспецифичные мотивы (рис. 5, рис. 6).

Большой интерес представляют уникальные мотивы, идентифицированные в промоторах генов *SUS1* и *CWInv3*, которые, согласно имеющимся данным, отличаются наибольшей актив-

ностью в дифференцирующей ксилеме березы (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). В промоторе *SUS1* были выявлены два уникальных элемента HEXAMERATH4 и BS1EGCCR (рис. 5). HEXAMERATH4 присутствует в промоторе гена, кодирующего H4 гистон у *Arabidopsis*; этот мотив участвует в меристемоспецифической экспрессии данного гена (Chaubet et al., 1996). Элемент BS1EGCCR обнаружен в промоторе гена *CCR* и участвует в его специфической экспрессии в проводящих тканях ствола и корня эвкалипта (Lacombe et al., 2000). Можно предположить, что высокий уровень экспрессии *SUS1* в камбиальной зоне и дифференцирующихся проводящих тканях при реализации нормального сценария ксилогенеза березы повислой обусловлен наличием этих мотивов.

Промотор *CWInv3*, в отличие от двух других генов *CWInv*, не содержал уникальных элементов, связанных со специфической экспрессией в проводящих тканях ствола (рис. 6). Высокие по

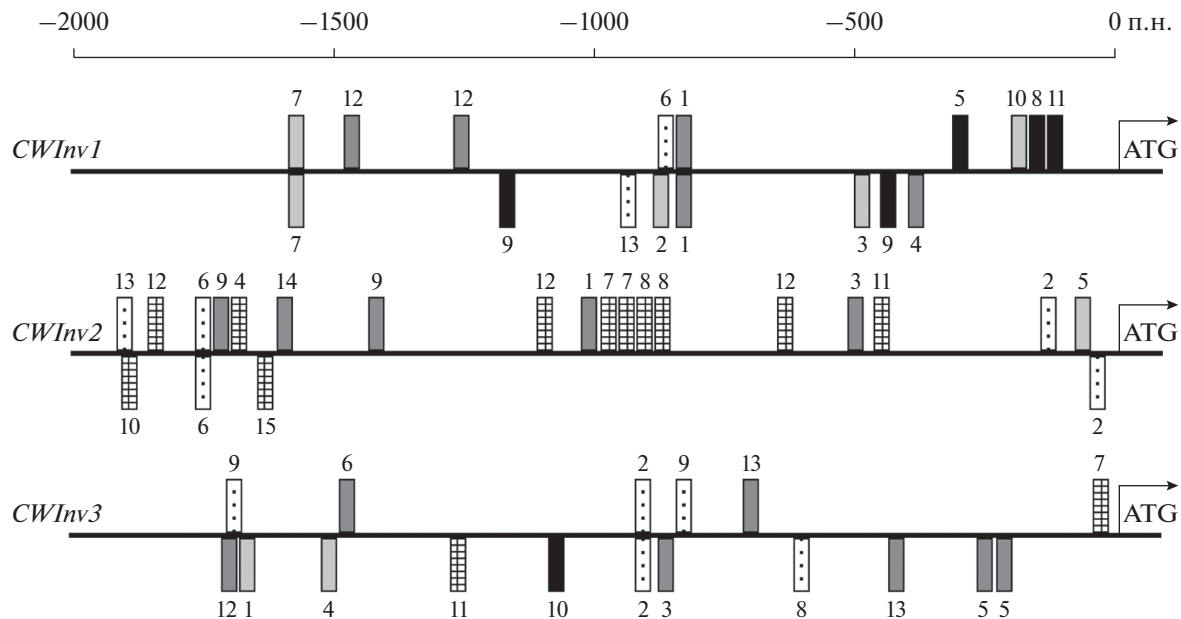


Рис. 6. Схема расположения уникальных *цис*-элементов в промоторах *BpCWInv1–3*. Цветовые обозначения аналогичны рис. 3. Цифрами обозначены следующие элементы: *CWInv1* 1 – ACGTTBOX, 2 – ARFAT, 3 – AUXREPSIAA4, 4 – BOXLCOREDPCAL, 5 – CGACGOSAMY3, 6 – MYBPLANT, 7 – RYREPEATVFLEB4, 8 – SREATMSD, 9 – SURE1STPAT21, 10 – TATCCACHVAL21, 11 – TATCCAYMOTIFOSRAMY3D, 12 – WBOXNTCHN48, 13 – XYLAT. *CWInv2* 1 – 300CORE, 2 – AACACOREOSGLUB1, 3 – AGMOTIFNTMYB2, 4 – ANAERO4CONSENSUS, 5 – ASF1MOTIFCAMV, 6 – CARGNCAT, 7 – CBFHV, 8 – DRECRTCOREAT, 9 – LECPLEACS2, 10 – PREATPRODH, 11 – RBCSCONSENSUS, 12 – REBETALGLHCB21, 13 – RGATAOS, 14 – SEBFCONSSTPR10A, 15 – SORLIP2AT. *CWInv3* 1 – ABRELATERD1, 2 – CARGATCONSENSUS, 3 – CTRMCAMV35S, 4 – GARE1OSREPI, 5 – MARABOX1, 6 – MRNASTA2CRPSBD, 7 – MYBATRD22, 8 – NAPINMOTIFBN, 9 – RHERPATEXPA7, 10 – SP8BFIBSP8BIB, 11 – SV40COREENHAN, 12 – T/GBOXATPIN2, 13 – TATABOX3.

сравнению с другими генами *CWInv* значения экспрессии данного гена в зоне дифференциации ксилемы березы могут быть вызваны наличием мотивов, участвующих в стабилизации мРНК (MRNASTA2CRPSBD) и усилении транскрипции (CTRMCAV35S), о чем свидетельствуют данные литературы (Nickelsen et al., 1999; Pauli et al., 2004). Высокая экспрессия гена *CWInv1* в дифференцирующей ксилеме березы может быть связана с наличием мотива XYLAT, идентифицированного в промоторах 52 генов *Arabidopsis*, демонстрирующих специфическую экспрессию во вторичной ксилеме (Ko et al., 2006). Промотор гена *CWInv2* содержал уникальный элемент, встречающийся у генов, экспрессия которых наблюдается преимущественно во флоэме (RGATAOS) (рис. 6).

Цис-элементы, участвующие в сигналинге гормонов

В группе элементов, принимающих участие в гормон-зависимой экспрессии, в промоторах *SUS* и *CWInv* по количеству копий доминировали мотив ARR1AT, являющийся сайтом связывания с цитокинин-зависимым ТФ ARR1 (Taniguchi et al., 2007), и мотив WRKY71OS, необходимый для по-

давления сигналинга гиббереллина (Zhang et al., 2004). Наличие этих двух *цис*-элементов характерно для промоторов генов, специфически активных в проводящих тканях (Zhang et al., 2014). Помимо этого, в промоторах всех генов *SUS* и *CWInv* были выявлены элементы, участвующие в трансдукции сигналов этилена (WBOXNTERF3). В отличие от промоторов генов *CWInv* промоторы *SUS* содержали большее количество мотивов, участвующих в сигналинге абсцизовой кислоты. Среди всех изученных генов, промоторы *SUS3* и *CWInv1* содержали наибольшее число уникальных *цис*-элементов, участвующих в сигналинге различных гормонов, что указывает на важную роль гормонов в их активации (рис. 5, рис. 6).

Ранее была высказана гипотеза, согласно которой формирование узорчатой древесины карельской березы индуцируется повышенным уровнем ауксина в тканях ствола (Щетинкин 1987). Поэтому среди элементов, связанных с гормон-зависимой регуляцией, особое внимание мы уделяли мотивам, участвующим в сигналинге ауксина. Мотив ARFAT, обнаруженный в промоторах всех *SUS*, присутствует в промоторах ранних ауксин-зависимых генов и является сайтом связывания с ТФ семейства ARF (Hagen,

Таблица 2. Список перепредставленных сайтов связывания с ТФ в промоторах генов *Bp SUS1–SUS2* и *Bp CWInv1–CWInv3*

Семейство ТФ	Проторы <i>SUS1–SUS2</i>	Промоторы <i>CWInv1–CWInv3</i>
DOF	DOF1.5 (AT1G29160) DOF1.7 (AT1G51700) DOF1.10 (AT1G69570) DOF2.2 (AT2G28810) DOF3.2 (AT3G45610) DOF3.6 (AT3G55370) DOF5.1 (AT5G02460)	DOF1.5 (AT1G29160) DOF1.7 (AT1G51700) DOF1.8 (AT1G64620) DOF1.10 (AT1G69570) DOF2.2 (AT2G28810) DOF3.2 (AT3G45610) DOF3.4 (AT3G50410) DOF3.6 (AT3G55370) DOF4.2 (AT4G21030) DOF4.7 (AT4G38000) DOF5.1 (AT5G02460) DOF5.6 (AT5G62940) DOF5.8 (AT5G66940)
MYB	MYB15 (AT3G23250) MYB17 (AT3G61250) MYB31 (AT1G74650) MYB55 (AT4G01680) MYB84 (AT3G49690) MYB96 (AT5G62470)	
BBR-BPC	BPC1 (AT2G01930) BPC5 (AT4G38910) BPC6 (AT5G42520)	
MIKC MADS	SVP (AT2G22540) SOC1 (AT4G18960) AGL20 (AT2G45660)	AGL20 (AT2G45660)
TCP	TCP1 (AT1G67260) TCP20 (AT3G27010)	
CPP		TSO1 (AT3G22780) TCX6 (AT2G20110)
ERF	ERF005 (AT5G25390)	ERF122 (AT5G67000)
bHLH	bHLH34 (AT3G23210)	
C2H2	TFIIIA (AT1G72050)	
AP2	BBM (AT5G17430)	BBM (AT5G17430)
B3	RTV1 (AT1G49480)	RTV1 (AT1G49480)
GRAS	RGA1 (AT2G01570)	RGA1 (AT2G01570)
GATA		GATA1 (AT3G24050)
NAC	NAC094 (AT5G39820)	

Guilfoyle 2002; Tiwari et al., 2003). При низком уровне ауксина в клетке ARF формируют гетеродимер с белками-репрессорами Aux/IAA, что блокирует экспрессию ауксин-зависимых генов. При повышении уровня ауксина в клетке происходит протеолиз Aux/IAA, и после снятия репрессии ARF обеспечивают транскрипцию ауксин-зависимых генов (Li et al., 2016). Помимо элемента ARFAT в промоторах *SUS* были выявлены и другие элементы, участвующие в ауксин-индуцируемой экспрессии (ASF1MOTIFCAMV, C2GMAUX28, CATATGGMSAUR, NTBBIARROLB). Из сказанного следует, что повышение концентрации ауксина в камбиальной зоне березы должно способствовать увеличению уровня экспрессии *SUS* и, следовательно, формированию обычной по строению древесины.

В свою очередь, в промоторах генов *CWInv* (за исключением *CWInv1*) элементы, участвующие в трансдукции ауксинового сигнала, были обнаружены в незначительном количестве, что свидетельствует об ограничении участия гормона в регуляции транскрипции этих генов. Это находится в соответствии с результатами наших исследований, согласно которым развитие структурных аномалий древесины карельской березы происходит при высоких уровнях экспрессии *CWInv* на фоне интенсивной инактивации ауксина (Novitskaya et al., 2020).

Регуляторные цис-элементы, участвующие в сигналинге сахаров

В настоящий момент установлено, что сахара играют роль сигнальных молекул и воздействуют на экспрессию сахарочувствительных генов (Koch, 2004; Horacio, Martinez-Noel, 2013; Lastdrager et al., 2014). Высказываются предположения о том, что ферменты метаболизма сахарозы участвуют в переключении между сахарозным и глюкозным сигналингом (Ruan et al., 2010; Ruan, 2012, 2014). Так, например, высокая активность АпИнв во флоэме может через глюкозный сигналинг стимулировать деление клеток и подавлять программируемую клеточную смерть (Wang, Ruan, 2013). В свою очередь, экспрессия генов сахарозосинтазы и инвертазы также регулируется в зависимости от уровня сахаров (Li et al., 2017).

В промоторах всех исследованных генов присутствовал ряд цис-элементов, связанных с сигналингом сахаров. Общим для всех последовательностей был мотив WBOXHVISO1, являющийся сайтом связывания с ТФ семейства WRKY SUSIBA2. Мотив WBOXHVISO1 был идентифицирован в промоторах генов сахарозосинтазы, инвертазы и переносчиков сахаров у различных организмов, в том числе древесных (Afoufa-Bastien et al., 2010;

Rabot et al., 2014; Li et al., 2015; Qian et al., 2018). На примере овса показано, что при высоком уровне сахаров SUSIBA2 связывается с мотивом WBOXHVISO1 и работает как усилитель транскрипции сахаро-чувствительных генов (Sun et al., 2003). Экспериментально установлено, что присутствие элемента WBOXHVISO1 критично для индукции экспрессии генов вакуолярной инвертазы розы *Rosa hybrida* (*RhVIT*) и чая *Camellia sinensis* (*CsINV5*) в присутствии сахарозы (Rabot et al., 2014; Qian et al., 2018). Сравнительный анализ промоторов гена, кодирующего переносчик сахаров *CITST2*, у 124 культиваров арбуза и колоцинта показал, что однонуклеотидная замена А/С в мотиве WBOXHVISO1 приводит к нарушению связывания ТФ SUSIWM1 (гомолог SUSIBA2) с промотором исследованного гена, результатом чего является более слабая экспрессия *CITST2* и более низкое содержание сахаров в плодах несладких культиваров (Ren et al., 2018). Примечательно, что у березы встречаемость данного элемента была выше в промоторах генов *CWInv* (2–6 шт. на 2 Кб) по сравнению с генами *SUS* (1–3 шт.). Кроме того, в промоторах всех генов *CWInv* присутствовал элемент TATCCAOSAMY, являющийся сайтом связывания с MYB ТФ и участвующий в активации гена альфа-амилазы риса (кодирует фермент, расщепляющий крахмал до простых сахаров) в условиях недостатка сахаров, особенно глюкозы (Lu et al., 2002). Этот мотив мы выявили в промоторах 3 из 4 генов *SUS* (*BpSUS1*, *BpSUS2*, *BpSUS3*).

Помимо различных цис-элементов, участвующих в позитивной регуляции экспрессии генов в ответ на сахара, были выявлены также элементы негативной регуляции. В промоторах всех генов *SUS* березы присутствовал мотив SREATMSD, идентифицированный у 272 из 1592 генов *Arabidopsis*, экспрессия которых подавляется в присутствии больших количеств глюкозы (Tatematsu et al., 2005). Из всех генов *CWInv* этот элемент присутствовал только в промоторе *CWInv1* (рис. 6). Встречаемость этого элемента в промоторах исследованных генов была низкой — от 1 до 3 копий. Промотор гена вакуолярной инвертазы картофеля *StvacINV1*, экспрессия которого существенно снижается в присутствии высоких концентраций глюкозы и фруктозы, содержит 9 копий элемента SREATMSD, из них 7 копий расположены на участке от –360 до –524 п.н. (Ou et al., 2013). Кроме того, в промоторах всех исследованных генов березы, за исключением *SUS3* и *CWInv2*, были идентифицированы мотивы PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A и MYBGANV. Известно, что наличие этих двух мотивов критично для подавления экспрессии гена альфа-амилазы риса при высоких концентрациях сахарозы (Morita et al., 1998).

Полученные результаты согласуются с полученными нами данными, согласно которым формирование узорчатой древесины карельской березы обусловлено локальным повышением уровня сахарозы в камбиальной зоне (Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016a, 2016b). У карельской березы узорчатые и безузорчатые участки одного и того же ствола существенно различаются по уровню экспрессии *SUS* и *CWInv* (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). Мы полагаем, что позитивные и негативные элементы сигналинга сахаров участвуют в тонкой регуляции экспрессии генов *SUS* и *CWInv* березы в условиях локального повышения уровня сахарозы и/или отношения уровня сахарозы к уровню моносахаров. Однако для установления роли элементов сигналинга сахаров в процессе формирования узорчатой древесины карельской березы необходимы дальнейшие исследования.

In silico анализ перепредставленных сайтов связывания с транскрипционными факторами

С целью выявления ТФ, потенциально участвующих в регуляции углеводного обмена при нормальном и аномальном сценариях ксилогенеза березы, мы проанализировали перепредставленные сайты связывания ТФ в промоторах генов *SUS1–SUS2* и *CWInv1–CWInv3*, экспрессия которых существенно изменяется в процессе формирования узорчатой древесины у карельской березы (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). В промоторах двух генов *SUS* и трех генов *CWInv* были идентифицированы перепредставленные сайты связывания с 28 и 21 ТФ соответственно (табл. 2). Наибольшее число выявленных ТФ принадлежало к семействам DOF (13 шт.) и MYB (6 шт.). При этом сайты связывания с ТФ семейства MYB были выявлены только в промоторах генов *SUS*, тогда как для промоторов *CWInv* было характерно большее число сайтов связывания с различными ТФ семейства DOF.

Исходя из данных литературы, среди выявленных ТФ наибольший интерес с точки зрения участия в регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза представляют DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. Установлено, что ТФ HCA2 играет важную роль в регуляции камбиальной активности и дифференциации камбиальных производных. Сверхэкспрессия *HCA2* у *A. thaliana* приводит к увеличению камбиальной активности, усилению экспрессии флэомоспецифичных генов и подавлению ксилемоспецифичных генов (Guo et al., 2009). ТФ DOF5.8 участвует в регуляции морфогенеза проводящих тканей листа *A. thaliana*; экспрессия кодирующего его гена модулируется ауксином (Konishi, Yanagisawa, 2015). До настоящего времени ТФ

семейства DOF у березы повислой не исследовались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В геноме березы повислой были идентифицированы 4 гена *SUS* и 3 гена *CWInv*. *In silico* анализ регуляторных *cis*-элементов в промоторах генов, кодирующих ферменты метаболизации сахарозы, позволил выявить ряд мотивов, участвующих в регуляции экспрессии исследованных генов. Наибольшей как по числу отдельных элементов, так и по их встречаемости в 2 Кб промоторной области генов была группа элементов, связанная с влиянием различных абиотических факторов, в основном, света и недостатка влаги. Также промоторы исследованных генов содержали большое количество тканеспецифичных мотивов. Анализ гормон-зависимых элементов показал, что экспрессия генов *CWInv*, играющих важную роль в формировании узорчатой древесины карельской березы, слабо регулируется уровнем ауксина, что согласуется с нашими данными об активной конъюгации гормона в присутствии высоких концентраций сахарозы. В исследованных последовательностях промоторов были выявлены различные элементы, указывающие на непосредственное влияние сигналинга сахаров.

На основе анализа перепредставленных сайтов связывания с ТФ и сопоставления полученных результатов с литературными данными были выявлены два наиболее вероятных кандидата, потенциально участвующих в регуляции углеводного метаболизма в тканях ствола березы – ТФ DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. ТФ семейства DOF не описаны у березы повислой; их идентификация и функциональная характеристика представляют интерес с точки зрения регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза у форм березы повислой, отличающихся по текстуре древесины.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00622_а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Т.В. Тарелкина провела исследования методами биоинформатики. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и в написании текста статьи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы к данной статье доступны на странице журнала на портале eLIBRARY.RU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евдокимов А.П. Биология и культура карельской березы. Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 228 с.
- Ермаков В.И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Ленинград: Наука, 1986. 144 с.
- Любавская А.Я. Карельская береза. М.: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
- Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
- Соколов Н.О. Отбор и выращивание березы карельской в Ленинградской области с использованием самосева / Лесная генетика, селекция и семеноводство. Петрозаводск: Карелия, 1970. с. 277–281.
- Щетинкин С.В. Гистогенез узорчатой древесины березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl. и *Betula pendula* Roth): Дис. ... канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 1987. 169 с.
- Afoufa-Bastien D., Medici A., Jeauffre J. et al. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 245–266.
- An X., Chen Z., Wang J. et al. Identification and characterization of the *Populus* sucrose synthase gene family // Gene. 2014. V. 539. P. 58–67.
- Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K. et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. W597–W603.
- Biłas R., Szafran K., Hnatuszko-Konka K. et al. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2016. V. 127. P. 269–287.
- Chang J.-C., Liao Y.-C., Yang C.-C. et al. The purine-rich DNA-binding protein OsPurα participates in the regulation of the rice *sucrose synthase 1* gene expression // Physiol. Plant. 2011. V. 143. P. 219–234.
- Chaubet N., Flenet M., Clement B. et al. Identification of cis-elements regulating the expression of an *Arabidopsis* histone H4 gene // The Plant Journal. 1996. V. 10. P. 425–435.
- Chen Z., Gao K., Su X. et al. Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0138540.
- Chow C.-N., Lee T.-Y., Hung Y.-C. et al. PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. D1155–D1163.
- Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure // PNAS. 2009. V. 106. P. 13118–13123.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Krasavina M.S. et al. Invertase activity in trunk tissues of Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2015a. V. 62. P. 753–760.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Krasavina M.S. et al. Activity of sucrose synthase in trunk tissues of Karelian birch during cambial growth // Russ. J. Plant Physiol. 2015b. V. 62. P. 381–389.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. et al. Labile nitrogen availability in soil influences the expression of wood pattern in Karelian birch // Ботанический журнал. 2019a. Т. 104. С. 1598–1609.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. et al. Apoplastic invertase activity regulation in the cambial zone of Karelian Birch // Russ. J. Dev. Biol. 2019b. V. 50. P. 20–29.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. Excess of exogenous nitrates inhibits formation of abnormal wood in the Karelian birch // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 69–76.
- Galkin A.P., Lioshina L.G., Medvedeva T.V. et al. Regulatory regions of plant genes promoters and proteins-regulators of promotive activity // Biopolymers and Cell. 2004. V. 20. P. 363–379.
- Guo Y., Qin G., Gu H. et al. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 3518–3534.
- Hagen G., Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. P. 373–385.
- Haggqvist R., Mikkola A. Visakoivun kasvatus ja käyttö. Hämeenlinna: Metsäkustannus & Visaseurary, 2008. 168 p.
- Hauch S., Magel E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation // Planta. 1998. V. 207. P. 266–274.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 297–300.
- Hintikka T.J. Visakoivusta ja niiden anatomista. Helsinki: Suomalaisen kirjallisuuden seuran kirjapainon Oy, 1941. 346 p.
- Horacio P., Martinez-Noel G. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored // Plant Signal Behav. 2013. V. 8. P. e23316.
- Hyun T.K., Eom S.H., Kim J.S. Genomic analysis and gene structure of the two invertase families in the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) // Plant Omics. 2011. V. 4. P. 391–399.

- Islam M.Z., Hu X.-M., Jin L.-F. et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of *Citrus* sucrose synthase genes: investigation of possible roles in the regulation of sugar accumulation // PLoS One. 2014. V. 9. P. e113623.
- Ko J.-H., Beers E.P., Han K.-H. Global comparative transcriptome analysis identifies gene network regulating secondary xylem development in *Arabidopsis thaliana* // Molecular Genetics and Genomics. 2006. V. 276. P. 517–531.
- Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 235–246.
- Konishi M., Yanagisawa S. Transcriptional repression caused by Dof5.8 is involved in proper vein network formation in *Arabidopsis thaliana* leaves // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 643–652.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lacombe E., Van Doorselaere J., Boerjan W. et al. Characterization of cis-elements required for vascular expression of the Cinnamoyl CoA Reductase gene and for protein-DNA complex formation // The Plant Journal. 2000. V. 23. P. 663–676.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 799–807.
- Li F., Hao C., Yan L. et al. Gene structure, phylogeny and expression profile of the sucrose synthase gene family in cacao (*Theobroma cacao* L.) // Journal of Genetics. 2015. V. 94. P. 461–472.
- Li J., Wu L., Foster R. et al. Molecular regulation of sucrose catabolism and sugar transport for development, defence and phloem function // J. Integr. Plant Biol. 2017. V. 59. P. 322–335.
- Li S.-B., Xie Z.-Z., Hu C.-G. et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 47.
- Li X., Wu H.X., Southerton S.G. Identification of putative candidate genes for juvenile wood density in *Pinus radiata* // Tree Physiol. 2012. V. 32. P. 1046–1057.
- Lu C.-A., Ho T.D., Ho S.-L. et al. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression // The Plant Cell. 2002. V. 14. P. 1963–1980.
- Marchler-Bauer A., Bryant S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. W327–W331.
- Morita A., Umemura T., Kuroyanagi M. et al. Functional dissection of a sugar-repressed α -amylase gene (*RAmy1A*) promoter in rice embryos // FEBS Letters. 1998. V. 423. P. 81–85.
- Moshchenskaya Y., Galibina N., Nikerova K. et al. Activity of sucrose dissimilating enzymes in early ontogeny in different forms of silver birch // Transactions of the KarRC RAS. 2016. № 11. P. 78–87.
- Moshchenskaya Yu.L., Galibina N.A., Novitskaya L.L. et al. The role of sucrose synthase in sink organs of woody plants // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 10–21.
- Moshchenskaya Yu.L., Galibina N.A., Topchieva L.V. et al. Expression of genes encoding sucrose synthase isoforms during anomalous xylogenesis in Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 616–624.
- Nickelsen J., Fleischmann M., Boudreau E. et al. Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas* // The Plant Cell. 1999. V. 11. P. 957–970.
- Novitskaya L., Nikolaeva N., Galibina N. et al. The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows // Silva Fenn. 2016a. V. 50. P. 1461–1478.
- Novitskaya L., Nikolaeva N., Tarelkina T. Endogenous variability of the figured wood of Karelian birch // Wulfenia. 2016b. V. 23. P. 175–188.
- Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // J. Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 18–29.
- Novitskaya L.L., Tarelkina T.V., Galibina N.A. et al. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // J. Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 378–394.
- Ou Y., Song B., Liu X. et al. Promoter regions of potato vacuolar invertase gene in response to sugars and hormones // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 69. P. 9–16.
- Pauli S., Rothnie H.M., Chen G. et al. The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region // Journal of Virology. 2004. V. 78. P. 12120–12128.
- Priest H.D., Filichkin S.A., Mockler T.C. cis-Regulatory elements in plant cell signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 643–649.
- Proels R.K., Hause B., Berger S. et al. Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues // Plant Molecular Biology. 2003. V. 52. P. 191–201.
- Proels R.K., Roitsch T. Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1555–1567.
- Qian W., Yue C., Wang Y. et al. Identification of the invertase gene family (*INVs*) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress // Plant Cell Reports. 2016. V. 35. P. 2269–2283.
- Qian W., Xiao B., Wang L. et al. *CsINV5*, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* // BMC Plant Biology. 2018. V. 18. P. 228–248.
- Rabot A., Portemer V., Péron T. et al. Interplay of sugar, light and gibberellins in expression of *Rosa hybrida* vacuolar invertase 1 regulation // Plant and Cell Physiology. 2014. V. 55. P. 1734–1748.
- Ren Y., Guo Sh., Zhang J. et al. A tonoplast sugar transporter underlies a sugar accumulation QTL in watermelon // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 836–850.
- Roach M., Arrivault S., Mahboubi A. et al. Spatially resolved metabolic analysis reveals a central role for transcriptional control in carbon allocation to wood // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3529–3539.

- Roitsch T. Source-sink regulation by sugar and stress // Curr. Opin. Plant Biol. 1999. V. 2. P. 198–206.
- Ruan Y.-L. Signaling role of sucrose metabolism in development // Molecular Plant. 2012. V. 5. P. 763–765.
- Ruan Y.-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // Annu. Rev. Plant Biol. 2014. V. 65. P. 33–67.
- Ruan Y.-L., Jin Y., Yang Y.-J. et al. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat // Molecular Plant. 2010. V. 3. P. 942–955.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
- Salojärvi J., Smolander O.-P., Nieminen K. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // Nature Genetics. 2017. V. 49. P. 904–912.
- Sauter J.J. Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems // Cell and Molecular Biology of Wood Formation. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2000. p. 71–83.
- Sheshadri S.A., Nishanth M.J., Harita N. et al. Comparative genome based *cis*-elements analysis in the 5' upstream and 3' downstream region of cell wall invertase and Phenylalanine ammonia lyase in *Nicotiana benthamiana* // Comput. Biol. Chem. 2018. V. 72. P. 181–191.
- Sobkowiak L., Bielewicz D., Malecka E.M. et al. The role of the PIBS element containing promoter-driven genes in Pi transport and homeostasis in plants // Front. Plant Sci. 2012. V. 3. P. 58.
- Stein O., Granot D. An overview of sucrose synthases in plants // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 95.
- Sun C., Palmqvist S., Olsson H. et al. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter // The Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2076–2092.
- Sung S.S., Kormanik P.P., Black C.C. Vascular cambial sucrose metabolism and growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in relation to transplanting stress // Tree Physiol. 1993. V. 12. P. 243–258.
- Sung S.S., Kormanik P.P., Black C.C. Temporal and spatial aspects of root and stem sucrose metabolism in loblolly pine trees // Tree Physiol. 1996. V. 16. P. 1003–1008.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // PNAS. 2004. V. 101. P. 11030–11035.
- Taniguchi M., Sasaki N., Tsuge T. et al. ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions // Plant and Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 263–277.
- Tatematsu K., Ward S., Leyser O. et al. Identification of *cis*-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 757–766.
- Tian F., Yang D.C., Meng Y.Q. et al. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants // Nucleic Acids Res. 2020. V. 48. P. D1104–D1113.
- Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription // The Plant Cell. 2003. V. 15. P. 533–543.
- Tomasella M., Petrussa E., Petruzzellis F. et al. The possible role of non-structural carbohydrates in the regulation of tree hydraulics // IJMS. 2019. V. 21. P. 144–165.
- Tong X.L., Wang Z.Y., Ma B.Q. et al. Structure and expression analysis of the sucrose synthase gene family in apple // J. Integrat. Agric. 2018. V. 17. P. 847–856.
- Wan H., Wu L., Yang Y. et al. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 163–177.
- Wang L., Ruan Y.-L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 163.
- Xu X., Yang Y., Liu C. et al. The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants // BMC Plant Biology. 2019. V. 19. P. 566–579.
- Zhang C., Yu M., Ma R. et al. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) // Acta Physiol. Plant. 2015. V. 37. P. 81–96.
- Zhang L., Yang T., Li X. et al. Cloning and characterization of a novel Athspr promoter specifically active in vascular tissue // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 78. P. 88–96.
- Zhang Z.-L., Xie Z., Zou X. et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1500–1513.
- Zhu X., Wang M., Li X. et al. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles // Genes. 2017. V. 8. P. 111–135.

***In silico* Analysis of Regulatory *cis*-Elements in the Promoters of Genes Coding Apoplastic Invertase and Sucrose Synthase in Silver Birch**

T. V. Tarelkina^{1,*}, N. A. Galibina¹, Yu. L. Moshchenskaya¹, and L. L. Novitskaya¹

¹Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: karelina.t.v@gmail.com

This work is a continuation of studies on the role of sucrose in the formation of figured wood of Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti). It was previously established that this type of xy-

logenesis is accompanied by significant changes in activity of sucrose metabolizing enzymes, sucrose synthase and invertase, in the birch trunk tissues. The results of molecular genetic analysis indicate that the activity of these enzymes is regulated mainly at the level of transcription of the genes encoding them (*SUS* and *CWInv*). We identified genes encoding sucrose synthase and cell wall invertase in the genome of silver birch. *In silico* analysis of the regulatory *cis*-elements present in the 2 kb promoter region of these genes revealed a number of motifs involved in the regulation of their expression. The largest both in the number of individual elements and in their occurrence was a group of elements associated with the influence of abiotic factors, mainly light and drought. A number of tissue-specific motifs were identified, the function of which is associated with gene expression in conducting tissues. Analysis of hormone-dependent elements showed that the formation of figured wood of Karelian birch, which occurs against the background of high apoplastic invertase activity, is obviously not associated with the activation of *CWInv* genes by a high level of auxin. In the studied promoter sequences, various elements were found indicating a direct effect of sugar signaling. The two most likely candidates for participation in the regulation of carbohydrate metabolism in the birch trunk tissues were identified – transcription factors (TF) DOF5.6 (HCA2) and DOF5.8. The identification and functional characteristics of the DOF family TFs of silver birch are of interest from the point of view of the regulation of alternative xylogenesis scenarios.

Keywords: sucrose synthase, cell wall invertase, abiotic stress, sugar signaling, auxin-dependent gene expression, silver birch