

УДК 66.047

СУПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ХРИЗАНТЕМЫ CDM44 ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К Пониженным температурам*А.В. Нежданова, А.М. Камионская, А.В. Щенникова**Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

Одним из ключевых регуляторных семейств у растений является семейство MADS-box генов (Parenicova et al., 2003). Кодированные ими факторы транскрипции принимают участие в контроле многих аспектов развития, включая сельскохозяйственно ценные признаки, такие как сроки вегетации, вегетативная масса, строение соцветия и цветка, фертильность, морфология плода, формирование семян (Smaczniak et al., 2012; Dong et al., 2014; Theißen et al., 2016). Также, данные факторы транскрипции могут регулировать уровень биосинтеза различных вторичных метаболитов (например, каротиноидов, антоцианов, и др.) (Jaakola et al., 2010; Li et al., 2019). Более того, показано, что MADS-box белки участвуют в ответе растения на различные абиотические и биотические стрессы (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Наиболее известны функции MADS-белков в области определения идентичности цветковых органов. Согласно общепринятой модели ABCDE, идентичность чашелистиков определяется MADS-box генами активностей A+E, лепестков – A+B+E, тычинок – B+C+E, плодolistиков – C+E, и семязачатков – C+D+E (Theißen et al., 2016). Генетическая активность E, необходимая для определения идентичности сразу всех цветковых органов, представлена генами SEPALLATA (SEP) – SEP1, SEP2, SEP3 и SEP4 (или, соответственно, AGL2, AGL4, AGL9 и AGL3) (Pelaz et al., 2000, 2001). Цветок с выключенной E-активностью состоит из одних чашелистиков, а вместо пестика формируется новый цветок с тем же паттерном развития (Ferrario et al., 2003). А мутация сразу всех SEP-генов sep1 sep2 sep3 sep4 приводит к формированию цветка, состоящего из листьев (Ditta et al., 2004). MADS-белки регулируют транскрипцию генов-мишеней в составе мультимерных комплексов, что описано моделью «Квартет» (Smaczniak et al., 2012). Согласно модели, все цветок-специфичные тетрамеры MADS-белков включают SEP-белок, что свидетельствует о его решающей роли в формировании комплексов и регуляции развития цветка.

Ключевые роли SEP-генов в различных аспектах репродуктивного онтогенеза растения делает их перспективным объектом внутри- и межвидовых исследований, как для фундаментальной науки, так и для научно обоснованной биотехнологии агрокультур.

Целью настоящего исследования стало определение функции MADS-box гена E-класса – CDM44 из хризантемы (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat., сорт Парламент). Анализ структуры и филогении CDM44 показал, что он является структурным гомологом генов SEP3 (*Arabidopsis thaliana*), CaMADS-RIN (*Capsicum annuum*) и RIN (*Solanum lycopersicum*) (рис. 1), что предполагает и функциональное сходство с ними. Был проведен *in vivo* анализ транскрипционной активности CDM44 и его белок-белковых взаимодействий с MADS-белками других классов в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе. В результате было показано, что CDM44 способен активировать транскрипцию генов-мишеней, а также формировать комплексы с MADS-белками C-класса подсолнечника NAM45 и NAM59. Данные результаты подтверждают принадлежность CDM44 к SEP3-кляде.

Чтобы исследовать возможное участие CDM44 в развитии меристемы цветка и соцветий, с помощью агробактериальной трансформации были получены и проанализированы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* с суперэкспрессией трансгена CDM44 (E) под контролем усиленного 35S CaMV промотора. Эктопическая экспрессия CDM44 не повлияла на время цветения или строение соцветия, а цветки имели нетрансгенный фенотип. Однако семенные коробочки таких растений созревали гораздо медленнее контроля и формировали значительно меньше семян (рис. 2). Данный эффект может быть объяснен замалчиванием генов клады SEP3 (и трансгена, и родных генов табака), что указывает на возможность участия CDM44 в регуляции сроков созревания плода, подобно его гомологу RIN (Li et al., 2019), а также в определении идентичности семязачатков (Smaczniak et al., 2012).

Полученные растения 35S:CDM44 были дополнительно подвергнуты стрессу, связанному с воздействием пониженных температур. В процессе инкубации при +4 °C трансгенные растения демонстрировали более высокую устойчивость к холодovому стрессу в сравнении с контрольными, нетрансгенными растениями. У последних наблюдались видимые симптомы повреждения листьев (увядание) и снижение уровня хлорофилла.

На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемый нами ген CDM44 участвует в регуляции созревания семян хризантемы, а также в ответе растения на холодovый стресс. Мы планируем изучить участие CDM44 в реакции растения на другие стрессы (повышенные температуры, обезвоживание, солевой стресс и др.).

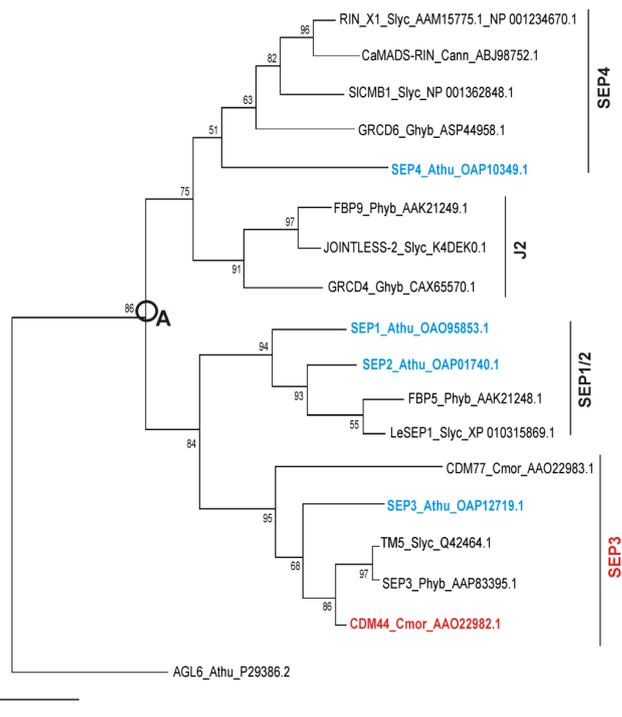


Рисунок 1. Филогенетическая классификация MADS-фактора транскрипции CDM44 в сравнении с известными гомологами SEP; AGL6 использован в качестве внешней группы. Дендрограмма построена методом максимального правдоподобия (модель JTT; G+G; программа MEGA 6.0). Существенные значения бутстрэп указаны в основании ветвей. А (Ancestor) – общий предшественник подклад SEP. Рядом с названием каждого белка приведен номер доступа в NCBI и вид растения: Slyc – Solanum lycopersicum L.; Cann – Capsicum annuum L.; Phyb – Petunia x hybrida hort. ex E. Vilm.; Cmor – Chrysanthemum x morifolium Ramat.; Ghyb – Gerbera hybrid cultivar; Athu – Arabidopsis thaliana (L.) Heynh

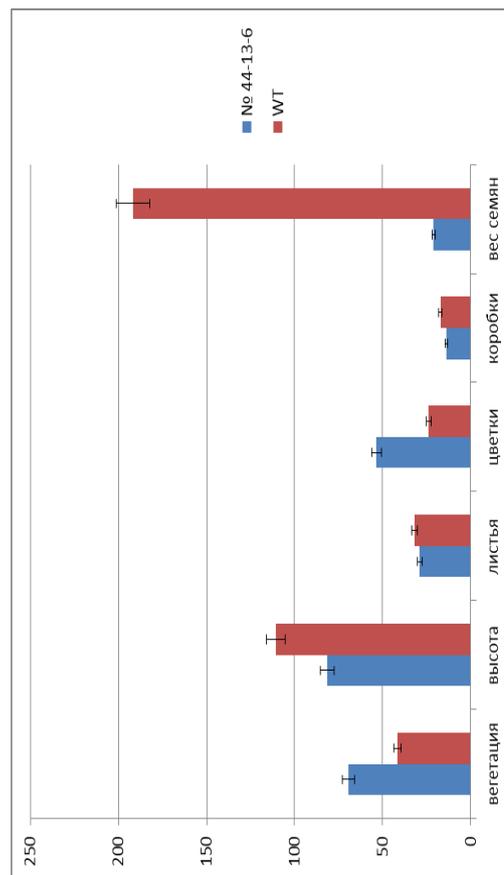


Рисунок 2. Характеристики линии трансгенных растений табака 35S:CDM44 в сравнении с контролем

Полученные данные могут быть использованы для научно обоснованной селекции сортов (включая методы геномного редактирования) с повышенной устойчивостью к стрессам и /или улучшенной морфологией плода.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 18–29–07007 и, частично, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- Castelán-Muñoz N. et al. MADS-Box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants //Frontiers in plant science.2019.T. 10.C. 853.
- Ditta G. et al. The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity //Current Biology.2004.T. 14.№. 21.C. 1935–1940.
- Dong T. et al. A non-climacteric fruit gene CaMADS-RIN regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit //PloS one.2014.T. 9.№. 4.C. e95559.
- Ferrario S. et al. The MADS box gene FBP2 is required for SEPALLATA function in petunia //The Plant Cell.2003.T. 15.№. 4.C. 914–925.
- Jaakola L. et al. A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits //Plant Physiology.2010.T. 153.№. 4.C. 1619–1629.
- Li S. et al. A Critical Evaluation of the Role of Ethylene and MADS Transcription Factors in the Network Controlling Fleshy Fruit Ripening. New Phytol.2019.T. 221.№. 4.C. 1724–1741.
- Parenicová L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world //The Plant Cell.2003.T. 15.№. 7.C. 1538–1551.
- Pelaz S. et al. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes //Nature.2000.T. 405.№. 6783.C. 200–203.
- Pelaz S. et al. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development //The Plant Journal.2001.T. 26.№. 4.C. 385–394.
- Smaczniak C. et al. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development //Proceedings of the National Academy of Sciences.2012.T. 109.№. 5.C. 1560–1565.
- Theißen G., Melzer R., Rümpler F. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution //Development.2016.T. 143.№. 18.C. 3259–3271.