



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВЕЛИЧИНЫ ОРГАНОВ У РАСТЕНИЙ

Кулуев Б.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук,
г. Уфа. Kuluev@bk.ru.

Резюме

Величина органов растений является важной морфологической характеристикой и находится под жестким генетическим контролем. В растениях за размеры, пропорции и симметрию органов отвечают большое количество генов-регуляторов роста и развития, многие из которых уже исследованы. В связи с тем, что размеры органов контролируются путем регуляции клеточного деления и растяжения, гены-регуляторы роста и развития можно условно разделить на две группы. К первой группе относятся гены-регуляторы клеточного деления, например *AINTEGUMENTA*, *ARGOS*, *CYCLIND3;1*, *CDPK*, *AN3/GIF1*, *WUSCHEL*, *CLAVATA3* и многие другие. Вторая группа генов, регулирующих клеточное растяжение, кодирует экспансины, ксилоглюкан эндотрансгликозилазы, а также ряд трансмембранных белков и транскрипционных факторов. О механизмах взаимодействия этих двух групп генов между собой известно очень мало и их раскрытие является предметом будущих исследований. Видимо, в этот процесс вовлечено большое количество различных белковых факторов и фитогормонов. Исследование генетической регуляции роста и развития растений имеет значение не только для фундаментальной науки, но представляет большой интерес и в прикладных целях, в связи с возможностью использования полученных знаний для создания хозяйственно важных растений с увеличенными размерами органов, которые будут востребованы в сельском и лесном хозяйствах.

Ключевые слова: величина органов; клеточное деление; клеточное растяжение; гены-регуляторы роста и развития; *AINTEGUMENTA*; *ARGOS*; *ARL*; *WUSCHEL*; *CLAVATA3*; экспансины.

Введение

Размеры органов растений контролируются двумя основными механизмами, а именно регуляцией клеточного деления и клеточного растяжения. Во время первой, так называемой, пролиферативной фазы развития органа клетки митотически делятся, и происходит накопление цитоплазматической массы. Затем процессы деления постепенно сменяются клеточным растяжением, при котором клетки увеличиваются в размерах и дифференцируются. Очень часто процессы клеточного растяжения сопровождаются полиплоидизацией совместно с эндоредупликацией, что также способствует увеличению размера органов. Регуляция клеточного деления и

растяжения в растениях четко скоординирована и контролируется одновременно фитогормонами, мембранными рецепторами, вторичными мессенджерами, протеинкиназами, протеинфосфатазами, кальциевыми каналами, белками-переносчиками фитогормонов, транскрипционными факторами, факторами ремоделинга хроматина и многими другими. Регуляция роста и развития растений – это сложный и хорошо скоординированный процесс, который, видимо, контролируется тысячами генов, однако наибольший интерес представляет исследование основных генов-регуляторов роста, так называемых переключателей развития [Медведев, Шарова, 2010], число которых

в растениях должно быть на порядок меньше. Из литературных источников известно, что клеточное растяжение находится под контролем генов, кодирующих экспансину, ксилоглюканэндо-трансгликозилазы, транскрипционный фактор GRF1, трансмембранный белок ARGOS-LIKE и другими, при этом большинство из них, видимо, пока остаются неизвестными. В регуляции клеточного деления задействованы такие гены, как AINTEGUMENTA (ANT), ARGOS, CYCLIND3;1, CDPK, AN3/GIF1, WUSCHEL, CLAVATA3 и многие другие. Показано, что сверхэкспрессия некоторых из перечисленных выше генов приводит к увеличению размеров органов у модельных трансгенных растений. В связи с этим предполагается, что используя генно-инженерные конструкции генов-регуляторов роста совместно с сильными конститутивными, индуцибельными или тканеспецифичными промоторами возможно получение быстрорастущих хозяйственно важных растений с увеличенными размерами органов. Однако уже при проведении первых работ по получению трансгенных растений с увеличенными размерами органов исследователи столкнулись с проблемой компенсаторного механизма в самих растениях, направленного на поддержание размеров органов близких к норме [Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003]. Например, при получении трансгенных растений с увеличенным количеством клеток в органе уменьшались размеры отдельных клеток [Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003], а при стимулировании клеточного растяжения [Hu et al., 2006] уменьшалось количество клеток. Все эти данные говорят о том, что процессы клеточного деления и клеточного растяжения тесно связаны друг с другом через целую сеть сигнальных молекул, особое место среди которых, безусловно, занимают фитогормоны. Необходимо отметить, что благодаря интенсивным исследованиям последних 20-ти лет было открыто и изучено множество генов-переключателей, участвующих в регуляции роста и развития растений. Однако механизмы действия и мишени большинства исследованных генетических регуляторов, а также их взаимодействие между собой и влияние их экспрессии на фитогормональный статус во многом остается не изученным. К тому же клеточное деление и клеточное растяжение исследуется часто отдельно, что не совсем правильно, так как эти процессы тесно связаны между собой и часто находятся под контролем одних и тех же фитогормонов и белковых факторов. В связи с этим наибольших результатов при исследовании роста растений можно добиться путем одновременного изучения большого количества генетических факторов, их

взаимодействия между собой и влияния их на содержание и локализацию фитогормонов. Данное направление исследований актуально не только в рамках фундаментальных исследований роста и развития, но и из-за возможности практического применения этих знаний в сельском и лесном хозяйствах. Большая часть данных о генетической регуляции роста и развития растений были получены при исследовании модельных растений арабидопсиса, однако представляет не меньший интерес изучение этих процессов и поиск гомологов генов-регуляторов в хозяйственно-важных растениях. В связи с вышесказанным целью нашей работы стало исследование генетической регуляции роста и развития растений, а также получение сельскохозяйственных и декоративных растений с измененными размерами органов. В рамках данной работы нами были получены трансгенные растения табака с увеличенным или уменьшенным уровнем экспрессии различных генов-регуляторов как клеточного деления, так и клеточного растяжения. Целевые гены были выделены нами как из арабидопсиса, так и из рапса, табака, осины и тополя. В настоящее время ведутся работы по морфофизиологической характеристике полученных трансгенных растений, включая измерение размеров органов, площади клеток эпидермиса и паренхимы листьев и цветков, оценку содержания в этих растениях фитогормонов, определение иммулокализации фитогормонов, определение взаимосвязи между различными генетическим факторами методом полуколичественного ОТ-ПЦР. Также у ряда исследуемых генов-регуляторов роста и развития были выделены промоторные участки и клонированы с репортерными генами с целью изучения регуляции их экспрессии фитогормонами и транскрипционными факторами. При получении трансгенных растений нами чаще всего применялись конститутивные промоторы, а именно 35S промотор вируса мозаики цветной капусты из группы каулимовирусов, однако в большинстве случаев активности данного промотора недостаточно, поэтому является актуальным поиск и создание более сильных конститутивных промоторов. В других же случаях, например при сверхэкспрессии некоторых важных для регуляции роста и развития растений факторов, когда значительное накопление целевого белкового продукта может играть отрицательную роль, может возникнуть необходимость применения более слабых конститутивных промоторов. Наиболее оптимальным вариантом для получения целого ряда таких промоторов с различным уровнем экспрессионной активности является выделение гомологичных 35S промотору природных

промоторов каулимовирусов, а также создание их гибридных и модифицированных форм. Частое использование лишь 35S промотора может приводить к уменьшению уровня экспрессии, ввиду того, что с энхансерной областью данного промотора взаимодействуют одни и те же транскрипционные факторы, ресурс которых может быть исчерпаем. В связи с этим в рамках данной работы нами ведутся также исследования различных конститутивных, тканеспецифичных и индуцибельных растительных промоторов. Работа заключается в поиске и создании новых растительных промоторов, которые совмещаются с генами-регуляторами роста и развития и используются для модификации ростовых параметров растений.

Очевидно, что для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов повышенный уровень экспрессии лишь одного гена-регулятора роста недостаточен, необходимы новые знания как в области генной регуляции процессов клеточной пролиферации и растяжения, так и взаимодействия фитогормонов между собой и с другими сигнальными молекулами. Не исключено, что уже через несколько лет в результате исследований, проводимых нами и нашими коллегами из других научных учреждений, станут известны большинство генов, уровень экспрессии которых необходимо повышать или понижать одновременно для получения трансгенных растений с измененными размерами органов. Раскрытие всей сети генетической регуляции роста и развития растений позволит составлять алгоритмы создания трансгенных растений как с увеличенными, так и с уменьшенными размерами их органов.

Ген AINTEGUMENTA

Одним из первых генов-регуляторов величины органов растений, контролирующей клеточную пролиферацию, был изучен ген AINTEGUMENTA (ANT) *Arabidopsis thaliana* [Krizek, 1999]. Белковый продукт этого гена относится к транскрипционным факторам подкласса AP2 семейства AP2/ERF. [Krizek, 2003]. Одним из генов-мишеней ANT является ген CYCLIND3;1, который регулирует клеточное деление и способствует поддержанию клеток органа на стадии S [Mizukami, Fischer, 2000]. Транскрипция гена ANT стимулируется трансмембранным белком ARGOS, экспрессия которого в свою очередь индуцируется фитогормонами ауксинами и цитокининами, то есть в цепочке генов-регуляторов он располагается после гена AXR1 [Hu et al 2003]. Негативная регуляция экспрессии ANT на уровне трансляции осуществляется механизмом посттранскрип-

ционного сайленсинга посредством miRNA172 [Chen, 2004]. Было показано, что трансгенные растения, экспрессирующие ген ANT под контролем 35S промотора, характеризуются более быстрым развитием и большими размерами не только генеративных [Krizek, 1999], но и вегетативных органов [Mizukami, Fischer, 2000]. Трансгенные растения, экспрессирующие участок гена ANT в антисмысловой ориентации, отличаются более медленным развитием и меньшими размерами органов, чем контрольные нетрансгенные растения. Причём эти данные были получены не только на трансгенных резуховидках *A. thaliana*, но и с табаком *Nicotiana tabacum* L. [Mizukami, Fischer 2000], относящимся к другому семейству, что говорит об определенной универсальности гена ANT, а также свидетельствует о его консервативности. Действительно, гомологи и ортологи гена ANT были обнаружены у двудольных - *Nicotiana tabacum* L. [Rieu et al., 2005], *Brassica napus* L. [Chen et al., 2010], однодольных - *Aegilops crassa* Boiss. [Mizumoto et al., 2009] и голосеменных - *Pinus thunbergii* [Shigyo, Ito, 2004], *Gnetum parvifolium* [Yamada et al., 2008].

Мутанты *ant* арабидопсиса отличались замедленным развитием, уменьшенными цветками, а количество цветочных органов редуцировалось [Krizek, 1999]. Интегументы и функциональные зародышевые мешки в семязачатках мутантных растений были не развиты, что являлось причиной их стерильности. Мегагаметогенез останавливался, из-за чего женский гаметофит не формировался. Было показано, что количество цветков значительно сокращалось из-за снижения клеточной пролиферации во флоральных примордиях [Krizek, 1999]. Оказалось, что ANT принимает участие в развитии не только яйцеклетки, но и также в закладке и развитии всех органов [Krizek, 1999]. Даже в полностью дифференцированных органах эктопическая экспрессия ANT приводит к неоплазии, которая проявляется в виде каллусообразования, появления добавочных корней и побегов [Mizukami, Fischer, 2000]. Транскрипционный фактор ANT имеет два домена AP2, с помощью которых он связывается с молекулой ДНК и активирует экспрессию различных генов-регуляторов роста и развития [Nole-Wilson, Krizek, 2000; Krizek, 2009]. Сравнительно недавно было открыто ещё одно проявление сверхэкспрессии фактора ANT - увеличение массы и размеров семян [Chen et al., 2010]. Кроме прочего, есть мнение, что ANT-фактор также участвует в установлении ад/абаксиальной полярности листьев, работая совместно с другими генами [Nole-Wilson, Krizek, 2006] и тем самым

регулирует процесс развития семяножки [Losa et al., 2010].

Основное проявление транскрипционного фактора ANT происходит через регуляцию экспрессии гена CYCLIN D3;1 (CYCD3;1), который контролирует клеточную пролиферацию поддерживая клетки на синтетической фазе клеточного цикла [Mizukami, Fischer, 2000]. Это означает, что при постоянной экспрессии данного гена клетки долгое время остаются недифференцированными, не переходят в фазу покоя G₀, а продолжают интенсивно делиться, вызывая, таким образом, увеличение органа. Следует учитывать, что, вероятнее всего, рост органа в данном случае обусловлен также и другими, ещё не известными механизмами. В пользу наличия других генов-мишеней у ANT-фактора свидетельствует длительное сохранение меристематической компетентности клеток под его воздействием в центре апикальной и латеральной меристем.

Так как ген ANT представляет большой интерес в связи с возможностью его применения для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов, нами ведутся исследования влияния конститутивной, индуцибельной и тканеспецифичной экспрессии гена ANT на скорость роста, величину органов и отдельных клеток в трансгенных растениях табака. Для этого нами были амплифицированы полногеномные копии гена ANT из рапса и табака. При помощи базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программы MegaBlast был проведен поиск гомологов гена AINTEGUMENTA в геноме тополя. В результате проведенных теоретических исследований в геноме тополя нами было обнаружено 4 гомолога гена AINTEGUMENTA. Затем был проведен сравнительный анализ уровня сходности этих 4 генов с геном ANT арабидопсиса при помощи программы MegAlign. В итоге из этих 4-х генов было выбрано 2, отличающихся наибольшим уровнем сходности с геном ANT арабидопсиса: RAP10 (XM_002307275) и RAP13 (XM_002310846). Был осуществлен поиск открытых рамок считывания и подобраны праймеры к этим генам, в результате они были выделены из генома тополя черного (*Populus nigra*) и клонированы, размер их оказался равным примерно 3000 п.н., что почти в два раза больше их кДНК копий. Эти гены получили названия PnANTL1 и PnANTL2. После проведенных работ по выделению генов и анализу их нуклеотидных последовательностей, все известные последовательности гена AINTEGUMENTA из различных растений были выровнены при помощи программы MegAlign, что

позволило определить две его консервативные области. К данным консервативным участкам были подобраны универсальные праймеры. Используя эти праймеры, нам удалось выделить оба консервативных участка гена AINTEGUMENTA не только из арабидопсиса, но и из рапса, табака, а также тополя черного (*Populus nigra*). Эти короткие последовательности ДНК (120-250 п.н.) были нами клонированы в антисмысловой ориентации под управлением конститутивных промоторов каулимовирусов с целью получения трансгенных растений с подавленной экспрессией гена AINTEGUMENTA. В итоге нами были получены трансгенные растения табака как с пониженным, так и с повышенным уровнем экспрессии гена ANT. Последние характеризовались увеличением размеров листьев (на 20%), стебля (на 20%) и цветков (на 5%). При этом причиной увеличения размеров органов было не только возрастание количества клеток, но и стимулирование клеточного деления. У части трансгенных растений с повышенным уровнем экспрессии генов PnANTL1 и PnANTL2 были отмечены различные дефекты в развитии цветка (рис.), что говорит об их участии в регуляции развития цветка. Методом полуколичественной ОТ-ПЦР нами было показано, что в исследуемых трансгенных растениях табака повышен уровень экспрессии экспансинов NtEXPA4 и NtEXPA5. Трансгенные растения, экспрессирующие участки гена ANT в антисмысловой ориентации (ANTi), наоборот, отличились уменьшением размеров листьев (на 30-40%), стебля (на 30%) и цветков (на 5-10%) (см. рис.). В данном случае размеры клеток не уменьшались, происходило лишь уменьшение их количества, приходящегося на один орган. Более того, у части трансгенных растений размеры клеток были существенно больше, чем у контрольных растений. Предполагается, что повышенный уровень экспрессии гена ANT отрицательно сказывается на жизнеспособности трансгенных побегов на начальных стадиях развития, поэтому в результате селекции, видимо, выживают лишь растения с низким уровнем экспрессии трансгена. Для преодоления данной проблемы нами ген ANT тополя был также совмещен с эстроген-индуцибельным промотором и цветкоспецифичным промотором фермента хальконсинтазы chsA из петунии. Ожидается получение трансгенных растений с увеличенными размерами цветка, чего, к сожалению, нам не удалось достичь при использовании конститутивных промоторов каулимовирусов.

Результаты наших исследований показывают, что изменение уровня экспрессии одного лишь гена

АНТ является не столь эффективным для создания трансгенных растений с измененными размерами органов, в то же время полученные нами генно-инженерные конструкции, видимо, могут найти применение в аграрном и лесном производстве для повышения урожайности некоторых сельскохозяйственных культур и для увеличения размеров стволов древесных растений. Для более значительного изменения размеров органов необходимо изменение уровня экспрессии и других генов-регуляторов роста и развития растений, а также использование индуцибельных и тканеспецифичных промоторов.

Гены ARGOS и ARL

Ген ARGOS *Arabidopsis thaliana* кодирует трансмембранный белок, вовлеченный в процесс роста и развития растений, при этом его экспрессия индуцируется ауксином и цитокининами [Hu et al., 2003]. ARGOS представляет из себя небольшой белок, состоящий из 106-ти аминокислот, на С-конце которого имеется лейцин-богатый участок, который предположительно является трансмембранным доменом. Наиболее высокий уровень экспрессии гена ARGOS проявляется в листовых примordiaх, ювенильных листовых пластинках и черешках, а также в тычиночных нитях и молодых стручках. Трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген ARGOS, характеризовались увеличением размеров всех надземных органов. Наиболее существенно исследуемый ген влиял на размеры листьев, сырая масса которых у трансгенных растений увеличивалась на 50-120% по сравнению с контрольными растениями [Hu et al., 2003], при этом размеры семян и корешков изменялись в наименьшей степени.

Было показано, что изменение размеров органов у трансгенных по гену ARGOS растений обуславливалось увеличением количества клеток, но не их размеров. Также для трансгенных растений, по сравнению с контрольными, было показано удлинение периода роста, более позднее начало цветения и увеличение количества семян. Полученные данные позволили предположить, что ген ARGOS способствует сохранению меристематической компетентности клеток и более длительному поддержанию их в центре апикальной и боковой меристем [Hu et al., 2003]. Не так давно ортолог гена ARGOS был исследован у китайской капусты *Brassica rapa L. ssp. pekinensis*, который был назван BrARGOS [Wang et al., 2009a]. Были получены трансгенные растения арабидопсиса с повышенным уровнем экспрессии данного гена. Эти растения также характеризовались увеличением

размеров всех надземных органов из-за увеличения количества клеток и пролонгирования роста [Wang et al., 2009a]. Ортолог гена ARGOS был обнаружен также в геноме риса *Oryza sativa*, при этом он был представлен единичной копией [Wang et al., 2009b]. Этот ген получил название OsARGOS и размер его составил 534 п.н. Для функциональной характеристики гена OsARGOS были получены трансгенные растения арабидопсиса. В этом случае также было показано увеличение размеров основных надземных органов, но в отличие от гена ARGOS, ген OsARGOS способствовал увеличению размеров не только надземных органов, но и корней [Wang et al., 2009b]. Интересно отметить, что в случае с геном OsARGOS изменение размеров органов было обусловлено увеличением как количества клеток, так и их размеров. В то же время трансгенные растения риса с повышенным или пониженным уровнем экспрессии гена OsARGOS по размеру органов совсем не отличались от контрольных растений. Возможно, это объясняется преобладанием других путей регуляции величины органов у риса и более мощным компенсаторным потенциалом, чем у арабидопсиса [Wang et al., 2009b]. Методом ОТ-ПЦР было показано, что повышение уровня экспрессии гена ARGOS увеличивает транскрипцию таких генов, как AINTEGUMENTA, CYCLIN D3;1, AtGIF1, регулирующих клеточную пролиферацию, и генов AtEXPA10, AtGRF1, участвующих в регуляции клеточного растяжения в тканях растений [Hu et al., 2003; Wang et al., 2009a, 2009b].

Ген ARL (ARGOS-LIKE) гомологичен гену ARGOS, однако кодирует белковый фактор, контролирующий клеточное растяжение, при этом его локализация, структура и функциональная роль пока являются предметом обсуждения [Hu et al., 2006]. Экспрессия данного гена стимулируется ауксинами, цитокининами и брассиностероидами, и мишенью его белкового продукта является ген TCH4, который регулирует рост клеточных стенок через ксиллоглюканэндотрансгликозилазы [Hu et al., 2006]. В геноме арабидопсиса гомологичным к этому гену является также ген OSR1, эктопическая экспрессия которого способствует увеличению размеров органов, причем как за счет стимулирования клеточного деления, так и клеточного растяжения [Feng et al., 2011]. Предполагается, что белковые продукты генов ARGOS, ARL и OSR1 относятся к одной и той же системе трансдукции фитогормональных сигналов, так как при выравнивании аминокислотных последовательностей этих белков был обнаружен

одинаковый у всех этих белков консервативный участок, который составляет предполагаемый трансмембранный участок, названный OSR-доменом, при этом имеются сведения, что все эти белки располагаются на эндоплазматическом ретикулуме [Feng et al., 2011]. Показано, что гены арабидопсиса с OSR-доменом могут быть использованы для получения хозяйственно важных растений с увеличенными и уменьшенными размерами органов, однако фенотипические проявления эктопической экспрессии генов данной группы были изучены лишь на примере арабидопсиса [Feng et al., 2011].

С целью исследования влияния эктопической экспрессии этих генов на величину органов в гетерологичных условиях, нами были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген ARGOS арабидопсиса [Кулуев и др., 2011]. Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров листьев на 20-26% и стебля на 25-30% по сравнению с контрольными растениями табака (см. рис.). Цветки увеличивались лишь на 4-8%. Эти изменения в размерах органов были обусловлены одновременным стимулированием как клеточного деления, так и клеточного растяжения. Сходные результаты были получены и при анализе трансгенных по гену ARL растений табака, однако в данном случае эктопическая экспрессия трансгена стимулировала лишь клеточное растяжение. Было показано, что в исследуемых растениях повышен уровень экспрессии экспансинов табака NtEXPA4 и NtEXPA5.

Большой интерес представляет поиск гомологов генов с OSR-доменом в геномах хозяйственно-важных растений и особенно деревьев. В связи с этим нами был осуществлен поиск ортолога гена ARGOS тополя, так как именно нуклеотидная последовательность его генома полностью определена и доступна в базе GenBank. Было обнаружено два гена, один из которых обладал большей схожестью с геном ARGOS арабидопсиса, который и был нами амплифицирован и клонирован. Так как исследуемый ген нами был выделен из тополя черного (*Populus nigra*), он получил название PnARGOS. Трансгенные растения, экспрессирующие данный ген, также характеризовались увеличением вегетативных органов, однако вызвано оно было лишь активизацией клеточного растяжения.

В целом трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие гены с OSR-доменом, характеризовались более существенным увеличением размеров органов, чем экспрессирующие ген ANT, поэтому для создания

модифицированных трансгенных растений более предпочтительно использование генов ARGOS и ARL. К тому же размер этих генов намного меньше размера гена ANT, что делает их более удобными объектами при генно-инженерных манипуляциях, при этом также существенно уменьшается вероятность мутационных изменений в трансгене.

Ген CYCLIN D3;1

CYCLIN D3;1 (CYC D3;1) – это ген-регулятор клеточного цикла, сверхэкспрессия которого приводит к увеличению количества недифференцированных клеток в органе [Dewitte et al., 2003]. В арабидопсисе сверхэкспрессия гена CYC D3;1 не увеличивает органы, но ведет к нарушенному органогенезу с образованием многочисленных мелких и неполноценных клеток [Dewitte et al., 2003]. Проведённые исследования CYC D-связанных генов в геноме арабидопсиса показали, что существует десять генов, формирующих 6-7 групп, большинство из которых ещё подробно не изучены. Группа CYC D3 включает три гена, из которых CYC D3;1 наиболее хорошо исследован [Oakenfull et al., 2002; Vandepoele et al., 2002]. Гомологи CYC D3;1 обнаружены в разных растениях: в люцерне и арабидопсисе [Dahl et al., 1995], кукурузе [Huntley et al., 1998], табаке [Setiady et al., 1995].

Строение растения зависит от клеток, которые проходят стадии клеточного растяжения и функциональной специализации [den Boer, Murtagh, 2000]. Клеточная дифференциация часто бывает скоординирована с уменьшением активности или даже остановкой деления [Donnelly et al., 1999; De Veylder et al., 2001], однако попытки определить молекулярные связи между контролем клеточного цикла и дифференциацией пока не увенчались успехом. Было показано, что манипуляции с компонентами клеточного цикла, включая циклин-зависимые киназы (CDK), белки-ингибиторы CDK [Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001] и митотические циклины [Doerner et al., 1996] влияют на длительность фаз клеточного цикла, число клеточных циклов и в целом на окончательные размеры клетки. Данные регуляторы влияют непосредственно на клеточный цикл и не нарушают процессы дифференциации. Уменьшение экспрессии CDK-активирующих киназ уменьшает активность CDK и способствует дифференциации меристематических клеток в корнях, однако остановка клеточного цикла происходит после дифференциации и не может быть воспроизведена блокаторами клеточного цикла [Umeda et al., 2000]. Следовательно, механизмы, контролирующие дифференциацию, не зависят от клеточного цикла.

У растений имеется так называемый циклин-ретинобластомный путь (CYCD/Rb) [Huntley et al., 1998], который опосредует переход из фазы G1 в S по механизмам, существующим у всех высших эукариот. Циклины типа D стимулируются митогенными сигналами роста. Все циклины формируют киназный комплекс с CDK-субъединицей. Ключевая цель фосфорилирования D-циклиновых киназ – белок Rb. Rb связывает семейство гетеродимерных транскрипционных факторов, называемых E2F/DP, и расположенных на промоторах, содержащих участки связывания E2F. Для роста клеток и прогрессии клеточного цикла требуется множество E2F-регулируемых генов. Затем Rb усиливает гистон-деацетилазную активность транскрипционного фактора E2F, ограниченного промотором, ингибируя транскрипцию E2F-регулируемых генов. Фосфорилирование Rb приводит к потере связи с E2F, приводя к высвобождению от транскрипционного сайленсинга E2F-регулируемых генов и последующего перехода в S-фазу [de Jager, Murray, 1999].

В культуре клеток уровни мРНК CYC D3;1 не зависят от стадии клеточного цикла, как это происходит при экспрессии митотических циклинов, таких как CYC B1;1. Скорее, экспрессия CYC D3;1 зависит от доступности сукцинил-КоА и фитогормонов. Повторное добавление сукцинил-КоА к клеточным культурам, лишенным его, приводит к индукции CYC D3;1 в поздней G1-фазе [Menges, Murray, 2002]. Впоследствии мРНК остаётся на относительно постоянном уровне в циклирующих клетках. Более того, после ответной реакции на сукцинил-КоА, CYC D3;1 индуцируется с помощью цитокинина и, в меньшей степени, с помощью брассиностероидов и других «митогенных» фитогормонов, включая ауксины и гиббереллины, причём это происходит как в клеточных культурах, так и в растениях [Riou-Khamlichi et al., 1999; Hu et al., 2000; Oakenfull et al., 2002]. Более того, экспланты листьев, которые постоянно экспрессируют CYC D3;1, способны образовывать каллусы в отсутствие экзогенного цитокинина. Интересно отметить, что транскрипция гена CYC D2;1 не регулируется фитогормонами [Riou-Khamlichi et al., 1999].

Активация CYC D3;1 в течение фазы G1, вместе с реакцией на внешние факторы, в т.ч. и на фитогормоны (цитокинины, ауксины, брассиностероиды и гиббереллины), которые известны как ключевые регуляторы пролиферации и дифференциации, говорит о том, что CYC D3;1 может принимать участие в интеграции пролиферативных и других сигналов. Киназная

активность в клетках повышалась вместе с увеличением уровня экспрессии гена CYC D3;1 [Healy et al., 2001]. Данное явление не характерно для CYCD2;1, что навело на мысль о том, что повышение уровня экспрессии можно применять для увеличения киназной активности, сопутствующей белку CYCD3;1 [Dewitte et al., 2003].

При изучении уровня экспрессии CYC D3;1 в арабидопсисе было обнаружено, что мРНК CYC D3;1 присутствует в больших количествах в вегетативных меристемах побегов, а также в цветоносах, в особенности по периферии меристемы и в примордиях. Кроме того, высокие уровни экспрессии были обнаружены в развивающихся листьях, прокамбии, васкулярных тканях и пазушных бутонах цветков. В более развитых листьях сильные сигналы проявлялись в адаксиальных клетках. Наоборот, в клетках, подверженных эндоредупликации, таких как мезофилл зрелых листьев и сердцевина стебля, такие сигналы не наблюдались [Dewitte et al., 2003]. Таким образом, экспрессия гена CYC D3;1 связана с пролиферирующими тканями и отсутствует в зрелых органах.

Чтобы проанализировать возможную роль CYC D3;1 в процессах пролиферации и дифференциации, были созданы трансгенные растения арабидопсиса с повышенной экспрессией CYC D3;1 под контролем конститутивного 35S промотора [Dewitte et al., 2003]. В проростках трансгенных по гену CYC D3;1 растений семядоли были увеличены, а более поздние розеточные листья искривились вскоре после формирования абаксиальной поверхности и были меньше по размерам, чем листья контрольных растений. Морфологический анализ показал, что образование листьев и стеблей в сверхэкспрессирующих растениях длилось дольше по сравнению с диким типом. Стебель трансгенных растений был короче, стеблевые листья были «кудрявые», а цветков образовывалось меньше, чем у контрольных растений. Структура листьев в растениях со сверхэкспрессией данного гена значительно изменена, в них не развиты слои губчатого и палисадного мезофилла, благодаря гиперпролиферации эпидермиса состоит из большого числа мелких, не полностью дифференцированных многоугольных клеток. Также было выявлено, что экспрессия CYCD3;1 приводит к раннему окончанию фазы G1, при этом перекрывая контроль над нормальными размерами при делении клеток и приводя к сдвигу в клеточном цикле меристематических клеток от фазы G1 к G2.

Эндоредупликация – это маркер дифференцированного состояния клеток в большинстве надземных тканей растений, и в листьях она происходит только после прекращения нормальных митотических циклов [De Veylder et al., 2001]. Сравнение уровней ploидности показало, что клетки растений со сверхэкспрессией CYCD3;1 были по большей части недостаточно дифференцированы, и имели долю ядер с содержанием ДНК >4С, в то время как розеточные листья дикого типа имели долю ядер с ДНК 8С, 16С и 32С. Подобное уменьшение эндоредупликации наблюдалось в большинстве зрелых тканей растений, включая розеточные листья, прицветник и участки стебля [Dewitte et al., 2003].

Белок Rb функционирует как негативный регулятор киназной активности CYC D3;1. Уровень экспрессии Rb был увеличен и в побегах, и в зрелых розеточных листьях, а также в побегах растений сверхэкспрессирующих ген CYC D3;1 [Dewitte et al., 2003].

Таким образом, конститутивная экспрессия CYC D3;1 уменьшает объемы клеток в фазе G1 клеточного цикла и приводит к гиперпролиферации эпидермальных тканей листа, в целом замедляя развитие растения и приводя к нарушениям дифференциации в тканях из-за замедления фазы G0 в листьях и семядолях. Происходит разъединение процессов роста и клеточного цикла в апикальных меристемах побега. Завершение клеточного цикла, наблюдаемое до этого в корреляции с поздними стадиями развития листа [Donnelly et al., 1999], требуется для нормальных процессов дифференциации различных типов клеток. Регуляция экспрессии CYC D3;1 транскрипционным фактором ANT – важный фактор в запуске клеточного растяжения и дифференциации в растениях. Следует отметить, что сверхэкспрессия CYC D3;1 влияет на активность специфических генов в пути CYCD-Rb. Данные исследования доказывают важнейшую роль CYC D3;1 при переходе от клеточной пролиферации к конечным стадиям дифференциации [Dewitte et al., 2003].

Регуляция клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега

Апикальная меристема побега может давать начало органам и вторичным меристемам на протяжении всей жизни растения. Стволовые клетки, локализованные в центральной зоне меристемы, активно делятся, смещая дочерние клетки к периферии, где они становятся частью примордий органов и дифференцируются [Lenhard et al., 2002]. Под двумя слоями клеток центральной зоны L1 и L2 располагается

организующий центр, который состоит из недифференцированных, но при этом митотически малоактивных стволовых клеток [Lenhard et al., 2002]. Правильное функционирование меристемы и сохранение стволовых клеток в центральной зоне достигается за счет согласованности процессов поддержания меристематической компетентности, деления клеток и их дифференцировки [Lenhard et al., 2002]. Известно, что в контроле деления и дифференциации клеток в апикальной меристеме побегов участвуют гены SHOOTMERISTEMLESS (STM) и WUSCHEL (WUS), кодирующие два основных транскрипционных фактора, действующие независимо друг от друга, подавляя дифференциацию клеток [Lenhard et al., 2002]. Активация STM, который относится к гомеодомен-содержащим транскрипционным факторам класса KNOX, приводит к увеличению экспрессии цитокинин-регулируемого гена ARR-5, а также генов AtIPT5 и AtIPT7, участвующих в биосинтезе цитокининов [Jasinski et al., 2005]. Данный транскрипционный фактор вовлечен в цитокининовый сигналинг клеточного деления, который включает еще три близкие по строению гистидинкиназы – рецепторы цитокининов CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2, а также ряд переносчиков фосфатов АНР [Романов, 2009].

Ген WUS кодирует гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, относящийся к группе генов WOX, активно экспрессируется в центральной зоне апикальной меристемы в небольшой группе клеток, которые составляют организующий центр, поддерживая клетки в недифференцированном состоянии [Leibfried et al., 2005]. Транскрипционный фактор WUS негативно регулирует экспрессию генов ARR типа А, сдерживающих передачу цитокининового сигнала [Ikeda et al., 2009]. Цитокинины стимулируют экспрессию генов ARR типа В, но, в то же время, опосредованно способствуют активации генов ARR типа А, разрывающих запущенную этой группой гормонов цепь сигналов. WUS-фактор блокирует эту петлю обратной связи, что проявляется в цитокинин-индуцируемой активации клеточного деления. Таким образом, цитокинин в апикальной меристеме может оказывать свой эффект на клеточное деление в полной мере только в клетках, активно экспрессирующих регуляторный белок WUS. Более того, цитокинины сами способны увеличивать уровень экспрессии гена WUS через рецепторный комплекс АНК4 [Sablowski, 2011].

Гены CLAVATA (CLV1, CLV2, CLV3) являются негативными регуляторами клеточного деления, при этом мутанты арабидопсиса clv1, clv2

и *clv3* фенотипически не различаются [Clark et al., 1997]. Продуктом гена *CLV3* является небольшой секретирующийся в межклеточное пространство пептид, состоящий из 78 аминокислот, способный к транспорту по апопласту, при этом в зрелом состоянии он гликозилирован L-арабинозой и состоит из 12-ти аминокислот, которые составляют так называемый CLE-домен [Shinohara et al., 2010]. *CLV3* относится к широко распространенным в растениях пептидам семейства CLE, которые иногда называют также гликопептидными фитогормонами [Shinohara et al., 2010]. *CLV1* кодирует рецепторную киназу с внеклеточным лейцин-богатым повторяющимся рецепторным доменом и внутриклеточной серин/треонин-киназной областью. *CLV2* кодирует белок с внеклеточным доменом, похожим на домен *CLV1*, однако у этого белка отсутствует киназный домен [Clark et al., 1997]. Было показано, что *CLV3* связывается непосредственно с *CLV1* [Trotchaud et al., 1999], то есть, в конечном счете, продукт гена *CLV3* является сигнальной молекулой, а продукт гена *CLV1* является его рецептором. В передаче сигнала *CLV3* важную роль играет также мембрано-ассоциированная киназа *CORYNE (CRN)* [Zhu et al., 2010]. Было показано, что сигнальный путь *CLV3* включает как минимум два различных рецепторных комплекса, один из которых состоит из гомодимера *CLV1*, а второй из *CLV2/CRN* гетеродимера [Zhu et al., 2010]. Необходимо отметить, что даже известная на данный момент часть регуляторной цепи пептида *CLV3* выглядит намного сложнее: например, она еще включает рецептор-подобную протеинкиназу *RPK2*, но в целом сигнал от этих активированных рецепторных комплексов передается через MAP-киназный каскад в ядро, где его мишенью служит ген *WUS* [Осипова и др., 2006], цитокинины же способствуют прерыванию этой петли обратной связи [Sablowski, 2011].

В литературе имеется множество данных о регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега и примордиях органов, накапливаются также данные о взаимосвязи между этими процессами, их скоординированности и контроле большим количеством белковых факторов и фитогормонов [Sablowski, 2011]. В апикальной меристеме побегов обнаруживаются повышенные концентрации цитокининов и ауксинов, которые активируют клеточное деление и сдерживают процесс дифференцировки клеток [Sablowski, 2011]. Концентрация же гиббереллинов и brassinosterоидов возрастает в активно растущих органах, способствуя в основном растяжению клеток и их дифференцировке [Dodsworth, 2009]. Цитокинины и ауксины также участвуют в

регуляции роста клеток растяжением, при этом взаимосвязи между этими фитогормонами и генами-переключателями развития во многом остаются неизвестными [Holst et al., 2011].

Нами было проведено исследование влияния эктопической экспрессии гена *CLAVATA3* на клеточную пролиферацию и содержание цитокининов в трансгенных растениях табака. Цель работы заключалась в исследовании регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме и выяснении взаимосвязи этого процесса с делением и дифференцировкой клеток в листьях трансгенных растений табака с эктопической экспрессией гена *CLV3 A. thaliana*. В арабидопсисе сверхэкспрессия гена *CLV3* выражалась в том, что меристема побега прекращала закладку органов сразу же после появления первых листьев [Brand et al., 2000], лишь у части трансгенных растений меристема продолжала функционировать, побег формировался, но листья и цветки были уродливыми, а тычинки и плодолистки вообще не развивались. В табаке же проявления данного гена, вероятно, могут быть не столь катастрофичны, что могло бы позволить выявить отклонения в морфофизиологических параметрах и фитогормональном статусе трансгенных растений и подойти к пониманию вопроса о регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега и листьях трансгенного табака. Полученные нами трансгенные по гену *CLAVATA3* растения табака характеризовались снижением высоты стебля, уменьшением числа листьев и цветков, существенным увеличением размеров клеток в листьях и, соответственно, сокращением их количества, приходящегося на один орган. Опытные растения характеризовались повышенным содержанием цитокининов, при этом изменений в содержании ауксинов и АБК не наблюдалось. Для части трансгенных растений были характерны дефекты в развитии цветка (см. рис.). Полученные данные свидетельствуют в пользу вовлечения цитокининов в регуляцию процесса клеточного растяжения, компенсирующего уменьшение количества клеток. На основе полученных нами и литературных данных была построена гипотетическая схема взаимодействия процессов клеточного деления и растяжения. Центральным звеном в этой регуляторной сети являются цитокинины, которые, с одной стороны, через гены *ARR* стимулируют клеточное деление, а с другой - через гены экспансинов контролируют и рост клеток растяжением.

Экспансины

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 разрыхлять 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 всего 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 большинством фитогормонов, 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 арабидопсисе 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 морфофизиологического 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. \times *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. Фенотипические проявления эктопической экспрессии генов экспансинов табака не изучены, они могут оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на рост и развитие, причем это будет зависеть от уровня экспрессии исследуемых генов.

Нами ведутся исследования, направленные на получение трансгенных растений с увеличенными размерами листьев и стебля. Проанализировав литературные данные, мы предположили, что наиболее подходящими для этих целей являются гены экспансинов AtEXPA10 и PttEXPA1. Исходя из этого, нами были получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген AtEXPA10 арабидопсиса, а также растения с повышенным уровнем экспрессии гена PnEXPA1 тополя черного [Кулуев и др., 2012]. Трансгенные по генам экспансинов растения табака характеризовались увеличением размеров листьев и стеблей на 20-60%, а размеров цветков на 5-9% по сравнению с контрольными растениями (см. рис.). Опытные растения отличались увеличением количества цветков, что говорит об участии экспансинов в закладке примордий органов. Размеры органов трансгенных по AtEXPA10 растений табака увеличивались как за счет стимулирования клеточной пролиферации, так и клеточного растяжения. Сверхэкспрессия гена PnEXPA1 активировала только клеточное растяжение, при

этом часто происходило компенсаторное уменьшение количества клеток. Кроме этих экспансинов нами были выделены гены PnEXPA3 тополя, NtEXPA1 и NtEXPA6 табака, которые также

были использованы для получения трансгенных растений табака. Ожидается получение трансгенных растений табака с увеличенными размерами листьев и стебля.

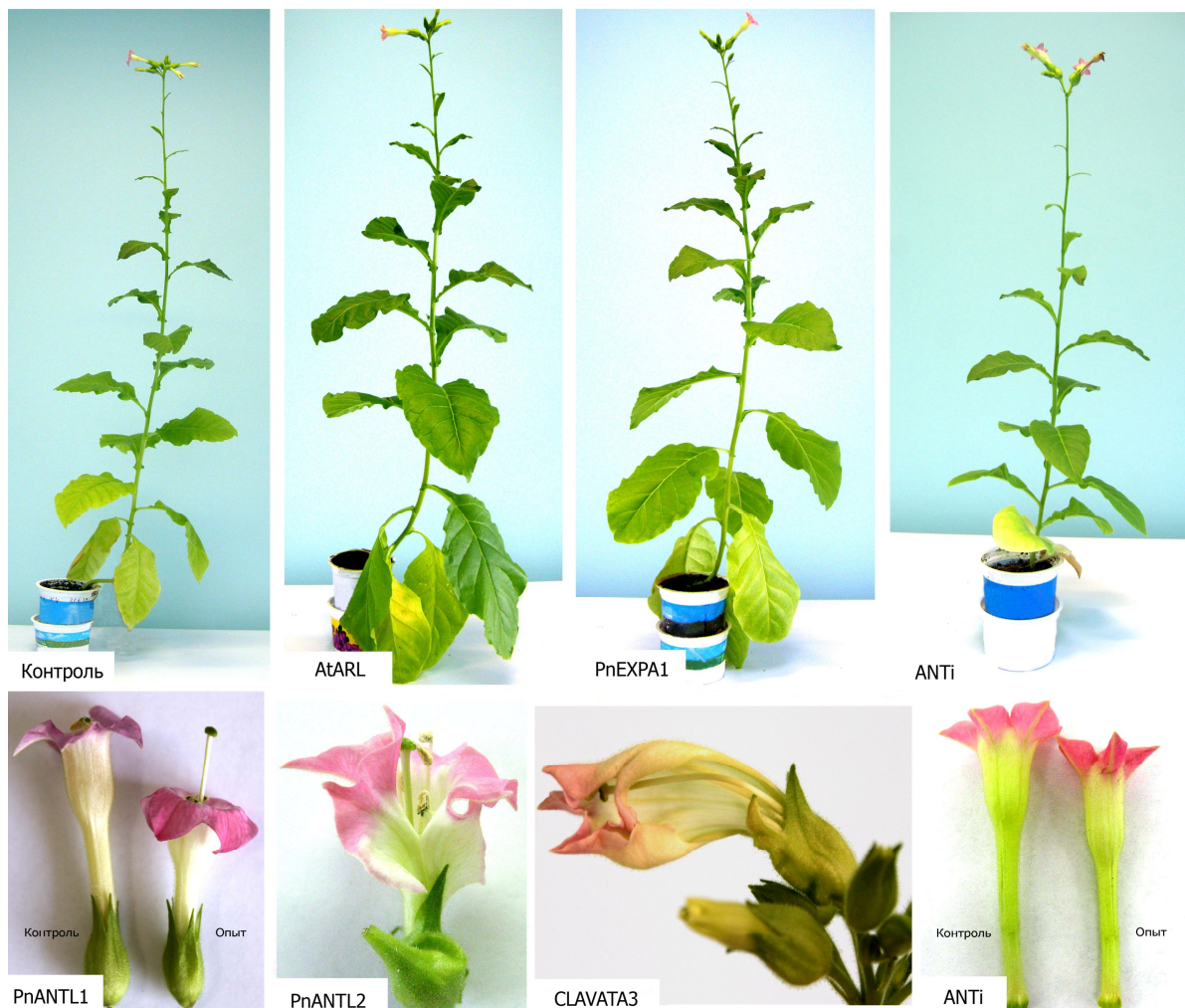


Рис.1. Контроль – трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена. AtARL – трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген ARL арабидопсиса. PnEXPA3 – трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген PnEXPA3 тополя черного. ANTi – трансгенные растения табака, экспрессирующие участок гена ANT в антисмысловой ориентации. PnANTL1 – цветки некоторых трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген PnANTL1, которые отличались уменьшением размера венчика, при этом размеры остальных цветочных органов остались в пределах нормы. PnANTL2 – цветки некоторых трансгенных по гену PnANTL2 растений табака характеризующиеся несимметричным развитием венчика. CLAVATA3 – для одной из линий трансгенных по гену CLAVATA3 растений табака были характерны цветки с несросшимся венчиком. ANTi – большинство трансгенных растений, экспрессирующих участок гена ANT в антисмысловой ориентации характеризовались небольшим уменьшением размеров цветка.

Заключение

В генетической регуляции роста и развития растений задействованы большое количество различных генов, большинство из которых пока остается не исследованным. В то же время, даже накопленная к данному времени информация не систематизирована и сложна для понимания. Например, одних только типов транскрипционных факторов, отличающихся строением ДНК-связывающих доменов у арабидопсиса известно около 40, и все они принимают участие в регуляции роста и развития растений. Кроме того, помимо генетической, существует еще и эпигенетическая составляющая регуляции роста и развития растений, включающая метилирование ДНК и модификацию гистонов [см. обзор Медведев, Шарова, 2010]. В данном небольшом обзоре были представлены лишь общие сведения о некоторых важных для растений генах-регуляторах роста и развития растений. Судя по литературным данным, некоторые из этих генов вполне могут быть использованы для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Задачей наших исследований является поиск наиболее оптимального сочетания растительного промотора и гена-регулятора роста и развития. Эти генно-инженерные конструкции будут исследованы на модельных растениях табака, и в случае обнаружения значительного их влияния на величину органов и скорость роста, они могут быть применены для генетической модификации хозяйственно важных растений.

Литература

1. Гао К., Лю К., Лю И.Т. Специфическая роль *ATEXP1* при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 245-253.
2. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. №3. С. 443-452.
3. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Чемерис А.В. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108-117.
4. Медведев С.С., Шарова Е.И., Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов // Журнал Сибирского федерального университета. 2010. Т.3. №2. С. 109-129.
5. Осипова М.А., Долгих Е.А., Лутова Л.А. Роль транскрипционных факторов *WOX* и *KNOX* в развитии и опухолеобразовании у растений // Экологическая генетика. 2006. Т. 4. С. 3-9.
6. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56. №2. С. 295-319.
7. Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805-819.
8. Azeez A., Sane A.P., Tripathi S.K. 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.
9. Brand U., Fletcher J.C., Hobe M., Meyerowitz E.M., Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity // Science. 2000. V. 289. P. 617-619.
10. Chen B., Wang T., Wang H., Li Y., Yan X., Wang L., Wei W. Cloning and expression level analysis of two *BnaANT* candidate genes in *Brassica napus* // Agricultural Sciences in China. 2010. V. 9. P. 488-496.
11. Chen X. A MicroRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development // Science. 2004 V. 26. P. 2022-2025.
12. 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.
13. Clark S.E., Williams R.W., Meyerowitz E.M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis* // Cell. 1997. V. 89. P. 575-585.
14. 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.
15. Dahl M., Meskiene I., Bogre L., Ha D.T.C., Swoboda I., Hubmann R., Hirt H., Heberle-Bors E. The D-Type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle // The Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1847-1857.
16. Den Boer B.G.W., Murray J.A.H. Triggering the cell cycle in plants. Trends Cell Biol. V. 10. P. 245–250.

17. De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T.S., Krols L., Terras F., Landrieu I., Van Der Schueren E., Maes S., Naudts M., Inze D. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis // *The Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 1653-1668.
18. Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M., Jacqumard A., Kilby N.J., Murray J.A.H. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-Type cyclin CYCD3 // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 79-92.
19. Dodsworth S. A Diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem // *Developmental Biology*. 2009. V. 336. P. 1-9.
20. Doerner P., Jorgensen J.E., You R., Steppuhn J., Lamb C. Control of root growth and development by cyclin expression // *Nature*. 1996. V. 380. P. 520-523.
21. Donnelly E.T., McClure N., Lewis S.E. The effect of ascorbate and alphatocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa // *Mutagenesis*. 1999. V. 14. P. 505-512.
22. Feng G., Qin Z., Yan J., Zhang X., Hu Y. Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL // *New Phytologist*. 2011. V. 191. P. 635-646
23. 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.
24. Healy J.M.S., Menges M., Doonan J.H., Murray J.A.H. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled // *J Biol Chem*. 2001. V. 276. P. 7041-7047.
25. Holst K., Schmulling T., Werner T. Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic Arabidopsis plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation // *Plant Physiology*. 2011. V. 168. P. 1328-1334.
26. 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.
27. Hu Y., Qiao L., Wang S., Rong S.B., Meuillet E.J., Benggren M. 3-(hydroxymethyl)-bearing phosphoinositol ether lipid analogue and carbonate surrogates block PI3K/AKT and cancer cell growth // *J. Med Chem*. 2000. V. 43. P. 3045-3050.
28. Hu Y., Xie Q., Chua N. The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 1951-1961.
29. Hu Y., Poh H., Chua N. The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth // *The Plant Journal*. 2006. V. 47. P. 1-9.
30. Huntley R., Healy S., Freeman D., Lavender P., de Jager S., Greenwood J., Makker J., Walker E., Jackman M., Xie Q., Bannister A.J., Kouzarides T., Gutierrez C., Doonan J.H., Murray J.A. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol*. 1998. V. 37. P. 155-169.
31. Ikeda M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. Arabidopsis WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 3493-3505.
32. Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M. KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities // *Current Biology*. 2005. V. 15. P. 1560-1565.
33. Krizek B.A. Ectopic expression of AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs // *Dev Genet*. 1999. V. 25. P. 224-236.
34. Krizek B.A. AINTEGUMENTA utilizes a mode of DNA recognition distinct from that used by proteins containing a single AP2 domain // *Nucleic Acids Res*. 2003. V. 31. P. 1859-1868.
35. Lee Y., Choi D., Kende H. Expansins: over-expanding numbers and functions // *Curr Opin Plant Biol*. 2001. V. 4. P. 527-532.
36. Leibfried A., To J.P., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.U. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators // *Nature*. 2005. V. 438. P. 1172-1175.
37. Lenhard M., Jurgens G., Laux T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation // *Development*. 2002. V. 129. P. 3195-3206.
38. Link B.M., Cosgrove D.J. Acid-growth response and α -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco // *Plant Physiol*. 1998. V. 118. P. 907-916.

39. Losa A., Colombo M., Brambilla V., Colombo L. Genetic interaction between ANT and the ovule identity genes SEEDSTICK (STK), SHATTERPROOF1 (SHP1) and SHP2 // *Sex Plant Reprod.* 2010. V. 23. P. 115-121.
40. Mizukami Y., Fischer R.L. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 942-947.
41. Mizumoto K., Hatano H., Hirabayashi C., Murai K., Takumi S. Altered expression of wheat AINTEGUMENTA homolog, WANT-1, in pistil and pistil-like transformed stamen of an alloplasmic line with *Aegilops crassa* cytoplasm // *Dev Genes Evol.* 2009. V.219. P. 175-187.
42. Nishikubo N., Awano T., Banasiak A. 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.
43. Nole-Wilson S., Krizek B.A. DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA // *Nucleic Acids Res.* 2000. V.28. P. 4076-4082.
44. Nole-Wilson S., Krizek B.A. AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes // *Plant physiology.* 2006. V. 141. P. 977-987.
45. Oakenfull E.A., Riou-Khamlichi C., Murray J.A.H. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression // *Philosophical Transactions: Biological Sciences, Royal Society, London.* 2002. V. 357. P. 749-760.
46. Park C.H., Kim T.W., Son S.H. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. P. 380–387.
47. Rieu I., Bots M., Mariani C., Weterings K.A. Isolation and expression analysis of a tobacco AINTEGUMENTA ortholog (NtANTL) // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 803-805.
48. Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmard A., Murray J.A.H. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin // *Science.* 1999. V. 283. P. 1541-1544.
49. Sablowski R. Plant stem cell niches: from signalling to execution // *Current Opinion in Plant Biology.* 2011. V. 14. P. 4-9.
50. Setiady Y.Y., Sekine M., Hariguchi N., Yamamoto T., Kouchi H., Shinmyo A. Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 949-957.
51. Shigyo M., Ito M. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes // *Dev. Genes Evol.* 2004. V. 214. P. 105-114.
52. Shinohara H., Matsubayashi Y. Arabinosylated glycopeptide hormones: new insights into CLAVATA3 structure // *Current Opinion in Plant Biology.* 2010. V. 13. P. 515-519.
53. Trotochaud A.E., Hao T., Wu G., Yang Z., Clark S.E. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and rho-related protein // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 393-406.
54. Umeda M., Umeda-Hara C., Uchimiya H. A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 13396-13400.
55. Vandepoele K., Simillion C., Van de Peer Y. Detecting the undetectable: uncovering duplicated segments in Arabidopsis by comparison with rice // *Trends Genet.* 2002. V. 18. P. 606–608.
56. Wang B., Zhou X., Xu F., Gao J. Ectopic expression of a chinese cabbage BrARGOS gene in Arabidopsis increases organ size // *Transgenic Res.* 2009. V. 19. P. 461-472.
57. Wang B., Sang Y., Song J., Gao X.Q., Zhang X. Expression of rice *OsARGOS* gene in Arabidopsis promotes cell division and expansion and increases organ size // *J. Genet. Genomics.* 2009. V. 36. P. 31-40.
58. Wang H., Zhou Y., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L.C. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* 2000. V. 24. P. 613–623.
59. Yamada T., Hirayama Y., Imaichi R., Kato M. AINTEGUMENTA homolog expression in gnetum (Gymnosperms) and implications for the evolution of ovulate axes in seed plants // *Evol Dev.* 2008. V. 10. P. 280-287.
60. Zhu Y., Wang Y., Li R., Song X., Wang Q., Huang S., Bo Jin J., Liu C.M., Lin J. Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis // *Plant Journal.* 2010. V. 61. P. 223-233.

GENETICAL REGULATION OF ORGAN SIZE IN PLANTS

Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Republic of Bashkortostan, Ufa, kuluev@bk.ru

Organ size of plants is an important morphological characteristic and is under strict genetic control. A large number of genes, regulating growth and development are responsible for size, proportion and symmetry of organs. Most of these genes are discovered. In fact, size of organs is controlled by regulation of cellular division and expansion, and these genes could be divided in two groups. First group consists of genes regulating cell division, for example *AINTEGUMENTA*, *ARGOS*, *SYCLIND3*, *1*, *CDPK*, *AN3/GIF1*, *WUSCHEL*, *CLAVATA3*. The second group of genes that regulate cell elongation, encodes expansins, xyloglucan endotransglucosylases, as well as a number of transmembrane proteins and transcription factors. Mechanisms of interaction of these two groups of genes with each other and very little is known of their disclosure is the subject of future research. Apparently, this process involves a large number of protein factors and all the hormones, which together are signaling molecules in growth regulation. The study of genetic regulation of plant growth and development is important not only for fundamental science, but is of great interest in applications, due to the possibility of using the knowledge gained to create economically important plants with increased sizes of which will be of demand in agriculture and forestry.

Keywords: organ sizes; cellular division, cellular expansion; *AINTEGUMENTA*; *ARGOS*; *ARL*; *WUSCHEL*; *CLAVATA3*; expansins