

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра генетики и биотехнологии

Правдина Ольга Юрьевна

Транскриптомный анализ генетических опухолей редиса

Выпускная квалификационная работа магистра
(магистерская диссертация)

Работа выполнена на кафедре
Генетики и биотехнологии

Научный руководитель:
к.б.н, м.н.с. Творогова Варвара Евгеньевна

Куратор:
аспирант Ткаченко Александр Анатольевич

Санкт-Петербург

2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Меристемы растений	6
1.1.1. Генная регуляция развития и поддержания меристем	8
1.1.2. Роль генов контроля клеточного цикла в регуляции меристем	11
1.1.3. Роль гормонов в регуляции меристем	12
1.2. Опухолообразование у растений	13
1.2.1. Спонтанное опухолообразование у растений	14
1.2.2. Патоген-индуцированное опухолообразование у растений	17
1.3. Другие дополнительные меристемы растений	20
1.3.1. Меристемы клубеньков у растений	20
1.3.2. Каллусообразование у растений	21
1.3.3. Соматический эмбриогенез у растений	23
1.4. РНК-секвенирование растений	24
1.4.1. Примеры применения РНК-секвенирования в транскриптомике растений	26
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Объект исследования	29
2.2. Методы обработки данных	29
2.3. Выделение РНК из опухоли и нормального корня, получение кДНК и проверка экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени	31
2.4. Амплификация фрагментов ДНК и выделение фрагментов из агарозного геля	32
2.5. Клонирование фрагментов в векторы экспрессии методом GateWay	33

2.6 Трансформация бактерий <i>Escherichia coli</i> и <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	34
2.7 Выделение плазмид и рестрикционное картирование	35
2.8 Условия выращивания растений и трансформация при помощи <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	36
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	37
3.1. Анализ качества и очистка прочтений	37
3.2. Сборка транскриптомов редиса и их сравнение	38
3.3. Функциональная аннотация транскриптома	39
3.4. Анализ дифференциальной экспрессии генов	40
3.5. Анализ обогащения функциональных групп генов	46
3.6. Сравнение результатов анализа транскриптома генетических и агробактериальных опухолей редиса	49
3.7. Результат проверки экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени	50
3.8. Создание векторов экспрессии и трансформация <i>Escherichia coli</i> и <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	51
3.9. Получение растительного материала и растений-трансформантов	54
4. Выводы	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые растения характеризуются динамическим и неопределенным ростом как в апикальном, так и в радиальном направлениях, а в связи с тотипотентностью растительных клеток в течение жизни способны формировать новые меристемы. Кроме образования и развития органов из конститутивных апикальных меристем побега и корня и латеральных меристем, под определённым воздействием у растений могут формироваться нерегулярные (дополнительные) меристемы, такие, как меристемы клубеньков бобовых, опухоли, раневые меристемы, каллус и др. [Лутова, 2013].

Опухоли у растений принято подразделять на спонтанные (генетические), которые возникают у организмов с определенным генотипом, и патоген-индуцированные, развивающиеся под влиянием паразитов [Додуева и др., 2016]. Опухолеобразование может быть вызвано изменением экспрессии ряда генов, продукты которых действуют на разных уровнях регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. Так, в опухолях различного происхождения обнаружено изменение уровней экспрессии генов регуляторов клеточного цикла, меристем-специфичных генов и генов, контролирующих передачу сигнала фитогормонов. Одной из общих характеристик спонтанных и индуцированных опухолей растений также является изменение баланса гормонов - цитокининов и ауксинов и способность к росту независимо от их присутствия [Лутова, Додуева, 2007].

На примере опухолей у инбредных линий редиса *Raphanus sativus L. var. Radicula* была показана роль генов семейств *KNOX* и *WOX* в развитии опухолей, а также их связь с экспрессией генов биосинтеза цитокининов [Tvorogova et al., 2012]. Кроме того, была обнаружена роль циклинов в образовании опухолей редиса: так, повышение уровня экспрессии гена *RsCycD3* (совместно с *RsKNAT1*) провоцирует пролиферацию клеток древесинной паренхимы, что ведет к опухолеобразованию [Лутова и др., 2008]. На редисе также впервые получены данные о взаимодействии CLE-пептидов и цитокининов, которое может иметь значение для развития опухоли. Вероятно, мишенями действия CLE-пептидов в опухолях являются гены *WOX4* и *WOX5*, для которых также было обнаружено повышение экспрессии при развитии опухоли и в ответе на цитокинины [Додуева и др., 2012].

Но несмотря на некоторые уже известные данные о генах и возможных сигнальных путях, вносящих вклад в опухолеобразование растений, механизмы образования генетических опухолей редиса до конца не ясны и нуждаются в дальнейшем изучении с помощью методов транскриптомики и биоинформатики.

Цель работы:

Проанализировать генетическую регуляцию образования генетических (спонтанных) опухолей у редиса *Raphanus sativus*.

В рамках этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение секвенирования РНК тканей генетической опухоли и корня редиса *Raphanus sativus* и сборки транскриптома.
2. Проведение анализа транскриптомов опухолей и нормальных корней редиса и выявление различий в экспрессируемых генах и обогащенных групп генов.
3. Проведение ПЦР в реальном времени для некоторых генов-вероятных участников процесса опухолеобразования из списка дифференциально экспрессирующихся генов.
4. Получение композитных растений редиса, не образующих генетических опухолей, с трансформированными корнями, содержащими вектора сверхэкспрессии генов, вероятно участвующих в опухолеобразовании.
5. Сравнение полученных результатов с данными по транскриптомному анализу агробактериальных опухолей.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Меристемы растений

Регуляция процессов пролиферации и дифференцировки является немаловажной частью процессов роста и развития растений. Во время постэмбрионального развития все органы растения в конечном итоге получены из нескольких плюрипотентных стволовых клеток, обнаруженных в специализированных структурах, называемых апикальными меристемами. Эмбриогенез растений приводит к простой структуре, состоящей из корневой апикальной меристемы (КАМ), эмбрионального корня, гипокотыля, одной или двух семядолей (эмбриональных листьев) и апикальной меристемы побега (ПАМ). Все остальные органы зрелого растения формируются постэмбрионально [Baurle & Laux, 2003]. Основной вклад в образование и развитие растительного организма вносят апикальные меристемы (АМ) побега и корня (рис.1.1, а). АМ побега (ПАМ) располагается на верхушке побега и прикрывается зачатками листьев, АМ корня (КАМ) находится на кончике главного и боковых корней и отграничивается от внешней среды корневым чехликом (колумеллой) [Лутова, 2013]. Надземные органы растений – стебель, листья, меристемы соцветия и цветка - образуются из ПАМ. В результате пролиферации и дифференцировки клеток-инициалей КАМ формируются основные ткани корня: эпидерма, первичная кора, проводящие ткани и корневой чехлик. Существенный вклад вносят и латеральные меристемы (ЛМ) – прокамбий и камбий, из клеток которых дифференцируются элементы проводящей системы и перицикл, который даёт начало боковым корням. А так как способность к пролиферации у клеток растений сохраняется на протяжении жизни, способны формироваться и вторичные меристемы: АМ вторичных побегов, боковых и придаточных корней, интеркалярные (вставочные) меристемы междоузлий и дополнительные (нерегулярные) меристемы - раневые меристемы, меристемы клубеньков, опухоли и каллус [Л.А. Лутова, 2013; Додуева и др., 2016].

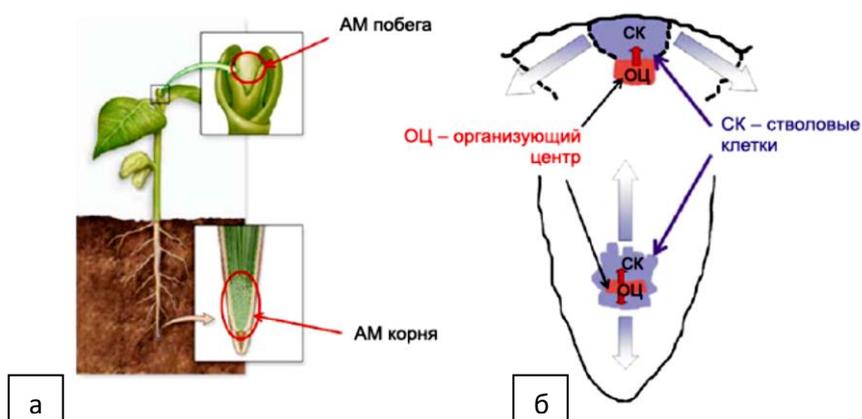


Рис.1.1. Стволовые клетки и организующие центры (б) в апикальных меристемах (АМ) побега и корня (а) [Лутова, 2013].

Основные меристемы имеют устройство сходного плана из нескольких слоев клеток, каждый со своим планом деления клеток и дающий начало определенным типам тканей. АМ побега и корня имеют центральную и периферическую зоны. Популяцию медленно делящихся стволовых клеток (СК) включает центральная зона, которая в АМ побега называется организующим центром (ОЦ), в АМ корня - покоящимся центром (ПЦ) (рис. 1.1, б). ОЦ ПАМ или ПЦ КАМ представляют собой самоподдерживающуюся группу, как правило, из небольшого количества клеток, являющуюся источником сигнала, подавляющего дифференцировку стволовых клеток. В периферической зоне находятся быстро делящиеся клетки, которые дают начало различным типам тканей. Развитие зачатков латеральных органов (цветков или листьев) побега происходит в ПАМ, но инициация латеральных органов корня (боковых корней) у большинства растений происходит выше КАМ, в дифференцированной зоне, путём реинициации деления клеток перицикла. Помимо покоящегося центра, КАМ содержит в себе клетки-инициалии, делящиеся с большей скоростью и образующие ряды клеток, которые дают начало тканям корня: эпидерме, первичной коре, проводящим тканям, эндодерме и колумелле. Апикальные меристемы имеют как схожие, так и различающиеся молекулярные механизмы регуляции. Различия механизмов контроля пролиферации и дифференцировки клеток в побеге и корне сопряжены с набором транскрипционных факторов, регулирующих их развитие [Лутова, Додуева, 2007; Додуева и др., 2016].

В то время как стволовые клетки в апикальных меристемах увеличивают высоту и количество органов растения, СК в латеральных меристемах обеспечивают клетки, которые приводят к увеличению обхвата оси побега и в конечном итоге позволяют царству растений включать крупнейших наземных организмов. Эти боковые меристемы имеют форму цилиндрических слоёв, которые окружают ось растения и создают специализированные ткани: сосудистый камбий, который зажат между ксилемой и флоэмой, что приводит к образованию дерева и луба, а также феллоген или пробковый камбий, который создает защитный слой снаружи оси побега [Baurle & Laux, 2003].

От ПАМ и КАМ латеральные меристемы отличаются отсутствием организующего центра, а пул стволовых клеток представлен в виде протяженного и однородного слоя [Додуева и др., 2016]. Прокамбий и перицикл - первичные ЛМ - возникают в процессе эмбрионального развития, камбий и феллоген – вторичные – на постэмбриональной стадии. Также прокамбий и камбий участвуют в транспортировке минералов и воды из

корня к вышележащим частям растений и органических соединений в обратном направлении, поэтому их называют меристемами проводящей системы. Сосудистые меристемы, помимо этого, составляют основу роста органов растений в толщину (вторичного утолщения) [Додуева и др., 2014].

Перицикл – наиболее плюрипотентная меристема растения, состоит из недифференцированных клеток, которые окружают стелу корня и иногда стебля. Время работы перицикла в молодых осевых органах ограничено. Со временем в стебле и в верхней части корня клетки перицикла утрачивают способность к пролиферации и полностью дифференцируются. Перицикл способен давать начало разнообразным типам меристем: меристемам боковых корней и клубеньков, камбию, феллогену и разнообразным меристемоподобным структурам (опухоли, каллусы) [Додуева и др., 2014]. Клетки перицикла не идентичны и делятся на два типа: прилежащие к ксилеме (ксилемный перицикл), использующиеся для закладки иных типов меристем, и прилежащие к флоэме (флоэмный перицикл), обычно этой способности не имеющие [Додуева и др., 2016].

Также перицикл относят и к неопределенным меристемам, где отсутствует экспрессия генов *WOX*, отвечающих за поддержание активности и идентичности меристем. Имея невысокую продолжительность жизни, данные меристемы впоследствии погибают или же расходуют свой запас стволовых клеток, либо в них начинает происходить экспрессия *WOX*, и они преобразовываются в один из типов конститутивных меристем [Додуева и др., 2016].

1.1.1. Генная регуляция развития и поддержания меристем

Меристем-специфичные гены регулируют поддержание активной пролиферации и сохранение запаса недифференцированных клеток в меристемах. Ключевыми генами среди них выступают *WUSCHEL (WUS)* и *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, которые кодируют гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы (ТФ), относящиеся к группам *WOX* и *KNOX*, соответственно. Ген *WUS* экспрессируется в группе клеток центральной зоны меристемы (в организующем центре), «побуждающих» к активным делениям ближние клетки меристемы. Обязательна для поддержания запаса стволовых клеток, в свою очередь, экспрессия гена *STM*, которая происходит в клетках апикальной меристемы и препятствует их дифференцировке [Лутова, Додуева, 2007]. Эти гены параллельно и независимо друг от друга регулируют активность меристемы. Контроль стволовых клеток не требует активности гена *STM*, и наоборот, *STM*, независимо от *WUS*, подавляет дифференцировку клеток в меристеме [Додуева и др., 2016].

К гомеодомен-содержащим транскрипционным факторам семейства TALE (Three Amino Acid Loop Extension), включающим в себя подсемейства *KNOX*, *WOX*, *BELL* и *HD-ZIP*, непосредственно и относится ген *STM*. Семейство TALE у растений, представлено двумя классами генов *KNOX* (KNOTTED1-like homeobox): *KNOX I* и *KNOX II*. Для правильного развития и функционирования ПАМ и для поддержания клеток в недифференцированном состоянии, обязательна экспрессия генов класса *KNOX I* (*STM*, *KNAT1/BP (BREVIPEDICELLUS)*, *KNAT2* и *KNAT6*) [Лутова, 2013]. Экспрессия генов *KNOX I* обнаружена во всех зонах АМ побега, в междоузлиях и в корне. В отличие от генов класса I, гены II группы (*KNAT3*, *KNAT4*, *KNAT5*, *KNAT7*), экспрессируются не только в меристемах, но и в дифференцированных тканях и, вероятно, осуществляют более разнообразные функции [Додуева и др., 2016; Лутова, Додуева, 2007; Gao et al., 2015]. Сверхэкспрессия генов *KNOX* у разных видов растений приводит к изменению морфологии листьев из-за задержки дифференциации клеток и в тяжелых случаях к образованию эктопической меристемы побега, таким образом, гены *KNOX* играют важную роль в развитии меристематической клеточной идентичности. В отличие от *STM*, мутация одного нисходящего гена *KNOX*, *KNAT1*, не приводит к терминации меристемы, что указывает на избыточность на уровне этих компонентов ниже по течению [Baurle & Laux, 2003].

Регуляторами деления и дифференцировки клеток в различных типах меристем растений являются гены семейства *WOX*. Для них показана экспрессия в процессе эмбриогенеза и в клетках-предшественницах апикальной меристемы побега и корня. Например, ген *WUS* функционирует в ПАМ, паралог этого же гена – *WOX5* – активен в КАМ. Не считая КАМ, ТФ *WOX5* регулирует поддержание меристем, развивающихся из перцикла и представляющих из себя модифицированные варианты бокового корня (меристемы клубеньков, некоторые типы опухолей и каллуса). *WOX4* – также является ТФ этой группы и регулирует развитие ЛМ прокамбия и камбия [Додуева и др., 2016].

Поддержание стволовых клеток и начало дифференцировки происходят в непосредственной близости от ПАМ и поэтому должны быть точно сбалансированы, чтобы поддерживать размер пула стволовых клеток в течение всей жизни растения. Мутации в системе генов *CLAVATA (CLV)* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) нарушают этот баланс и приводят к увеличению центральной зоны, где накапливается избыток стволовых клеток. Генетический и биохимический анализ показал, что три гена *CLV* действуют в общем сигнальном пути. *CLV1* кодирует LRR-рецепторную киназу, *CLV2* – аналогичный белок, не имеющий внутриклеточной киназной области, и *CLV3* кодирует небольшой пептид. Было предложено, что *CLV3* функционирует как лиганд, который секретируется из

стволовых клеток и связывается с рецепторным комплексом *CLV1-CLV2*, тем самым активируя последующие события сигнализации. Сигналинг *CLV* ограничивает размер ОЦ, подавляя транскрипцию *WUS* в соседних клетках. С помощью *WUS*, индуцирующего экспрессию *CLV3*, взаимодействие *WUS-CLV3* устанавливает цикл обратной связи между стволовыми клетками и ОЦ с возможностью динамического изменения размера популяции стволовых клеток (рис. 1.2). Если, например, число стволовых клеток стало слишком большим, экспрессия *WUS* снижается с помощью увеличенного сигнала *CLV3*, что приводит к уменьшению количества стволовых клеток и сопутствующему уменьшению экспрессии *CLV3*. Эктопические исследования экспрессии показывают, что связывание с *CLV1* может ограничить диапазон перемещения *CLV3*, и таким образом, рецептор *CLV1* на клетках, окружающих ОЦ, может эффективно защитить ОЦ от *CLV3*, достигающего его и, следовательно, от подавления транскрипции *WUS* [Baurle & Laux, 2003].

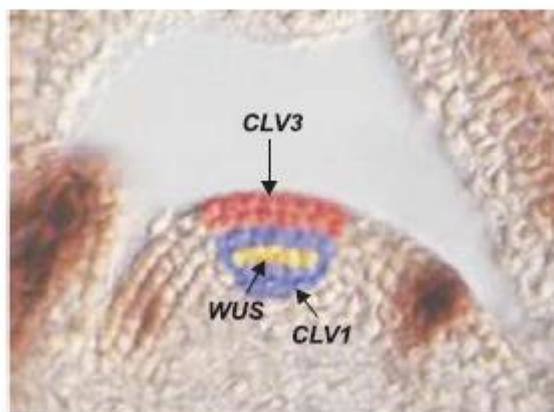


Рис. 1.2. Работа системы *WUS-CLAVATA* в апикальной меристеме побега [Лутова, 2013].

Работающая в латеральных меристемах система *CLAVATA*, напротив, не ограничивает, а поддерживает стволовые клетки. В ЛМ эта система включает в себя: CLE-пептиды (*CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION*) группы В (*TDIF*), определенные CLE-пептиды группы А, рецепторные киназы TDR / PXY, ER и MOL и ТФ *WOX4* и *WOX14* [Додуева и др., 2016].

Принадлежащие к семейству *GRAS*, группа ТФ – *HAM* (Hairy Meristem) участвует в регуляции поддержания стволовых клеток в меристемах. Транскрипционные факторы *HAM* связываются с ТФ *WOX* и являются их кофакторами. Аналогично *WOX*, каждая из меристем имеет узкоспецифичный ТФ группы *HAM*: в ПАМ это *HAM1*, взаимодействующий с *WUS*, в КАМ – *HAM2*, специфически связывающийся с *WOX5*, в камбии – *HAM4*, связывающийся с *WOX4* [Додуева и др., 2016].

Взаимодействующие ТФ *SCR (SCARECROW)* и *SHR (SHORTROOT)* из семейства *GRAS*, обязательны для спецификации организующего центра КАМ и развития радиальной структуры корня, и ТФ *PLT (PLETHORA)* из семейства *AP2 (APETALA 2)*, ответственные за создание максимума концентрации ауксина в КАМ, имеют большое значение в регуляции развития апикальной меристемы корня [Лутова, 2013].

Участие в регуляции развития перицикла отмечено лишь для ТФ *SHR* и *SCR*. Вероятно, в перицикле не экспрессируются *WOX* гены. Однако на начальных этапах индукции иных видов меристем из перицикла активируется экспрессия *WOX* генов: *WOX5* в боковом корне, клубеньках, каллусе, спонтанных и патоген-индуцированных опухолях; *WUS* при регенерации побегообразованием, *WOX4* при закладке межпучкового камбия [Додуева и др., 2014].

1.1.2. Роль генов контроля клеточного цикла в регуляции меристем

Связанные с контролем клеточного цикла механизмы так же участвуют в поддержании апикальных меристем. Семейства серин/треониновых протеинкиназ, так же известные, как циклинзависимые протеинкиназы (CDK), контролируют все этапы клеточного цикла эукариот. У растений циклины разных классов контролируют разные этапы клеточного цикла: класса D (*CycD*) - переход G1—S, класса A (*CycA*) - фазу S и переход G2—M, класса B (*CycB*) - нормальный ход и завершение митоза. Посттрансляционная модификация CDK/циклиновых комплексов и транскрипционная регуляция генов, кодирующих CDK и циклины, играют значимую роль в контроле клеточного цикла. Фитогормональная регуляция транскрипции свойственна для ряда генов, фигурирующих в контроле клеточного цикла у растений. Например, транскрипционные факторы семейства *MYB*, ТФ *E2F* и MAP-киназный каскад участвуют в регуляции экспрессии генов CDK и циклинов [Лутова, Додуева, 2007].

Повышение уровня экспрессии генов *CycD3*, *CycA3;2*, *CDKA*, *CAK* у растений приводит к дедифференцировке и возобновлению пролиферации дифференцированных клеток [Лутова, Додуева, 2007].

Участие убиквитинлигазного комплекса APC/C (anaphase-promoting complex), регулирующего деградацию циклинов, в репрессии деления стволовых клеток было продемонстрировано на примере ПЦ КАМ [Додуева и др., 2016].

В клетках перицикла отмечается повышенный, в сравнении с окружающими его тканями, уровень экспрессии генов клеточного цикла, а именно *CDKA* (Cyclin Dependent Kinase A) и *CYCA2* (Cyclin A2) [Додуева и др., 2014].

1.1.3. Роль гормонов в регуляции меристем

К механизмам поддержания и регуляции меристем принадлежат и фитогормоны: ауксины, цитокинины (ЦК), гиббереллины, некоторые представители группы СLE-пептидов. Действие одного и того же гормона на разные меристемы может отличаться, как, например, противоположное действие ауксинов и цитокининов на апикальные меристемы. При этом одни гормоны отвечают за поддержку стволовых клеток в меристемах, а другие могут подавлять их работу [Додуева и др., 2016].

Действие меристем-специфичных генов и фитогормонов взаимосвязано, особенно это касается цитокинина (рис. 1.3). В то время как ген *WUS* регулирует цитокининовый ответ, репрессируя транскрипцию генов первичного ответа на цитокинин – генов *ARR* типа А (негативные регуляторы цитокининового сигналинга) (*ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR1*), гены *KNOX* действуют через прямую локальную активацию биосинтеза цитокининов (запуская экспрессию генов *IPT*), которые активируют клеточные деления в апикальной меристеме [Осипова и др., 2006]. Растения, имеющие высокий уровень биосинтеза цитокининов, проявляют и высокий уровень экспрессии генов *KNOX*, в то время как уменьшение концентрации цитокининов посредством сверхэкспрессии гена цитокининоксидазы *AtCKX3 Arabidopsis thaliana* провоцирует недоразвитие апикальной меристемы побега. И наоборот, растения, у которых повышен уровень экспрессии генов *KNOX*, обладают повышенным уровнем цитокининов в тканях [Додуева и др., 2014]. Также ТФ *KNOX* (например, продукты генов *NTH15* табака и *STM A. thaliana*) ингибируют транскрипцию генов, кодирующих GA-2-оксидазы и GA-20-оксидазы, участвующих в синтезе активных гиббереллинов. Поскольку в контроле развития ПАМ цитокинины вместе с ТФ *KNOX* стимулируют деление недифференцированных клеток ПАМ, а гиббереллины, наоборот, ингибируют и запускают их дифференцировку, по-видимому, *KNOX*-зависимая регуляция биосинтеза этих гормонов является главной функцией ТФ *KNOX* в развитии ПАМ [Лутова, 2013; Додуева и др., 2014].

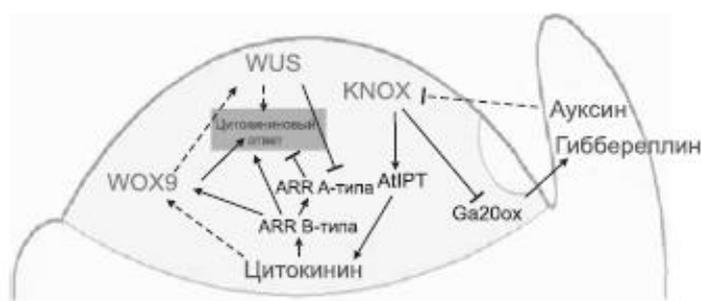


Рис. 1.3. Взаимодействие ТФ *KNOX*, *WOX* с фитогормонами в развитии АМ побега [Лутова, 2013].

Также известно об участии цитокининов и в развитии симбиотических отношений между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*. Экзогенные цитокинины провоцируют экспрессию ранних генов нодулинов *ENOD2*, *ENOD12*, *ENOD40*, связанную с образованием клубенька. Вероятно, функция гена *ENOD40*, который экспрессируется в делящихся клетках коры и примордия клубенька, – регуляция гормонального баланса [Акимова, Соколова, 2012]. СLE-пептиды также участвуют в контроле образования и развития меристем клубеньков, а также некоторых типов патоген-индуцированных опухолей [Додуева и др., 2014].

Ауксины, которые являются антагонистами цитокининов в контроле морфогенеза, ингибируют экспрессию генов *KNOX* и развитие АМ побега. Гиббереллины также участвуют в подавлении экспрессии генов *KNOX* [Додуева и др., 2014].

Таким образом, апикальные меристемы побега и корня обладают рядом сходных особенностей, главная из которых - наличие организующего центра. Его поддержание и размер регулируются похоже организованными в ПАМ и КАМ системами *WOX-CLAVATA* [Додуева и др., 2016]. В апикальных и латеральной меристемах гормоны тесно взаимодействуют с определенными группами транскрипционных факторов, специфичных для каждой меристемы, что в итоге и определяет особенности и функции этих тканей [Додуева и др., 2014].

1. 2. Опухолеобразование у растений

У растений можно выделить три главных уровня регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. На первом уровне участвуют механизмы регуляция клеточного цикла. На втором – контроль развития и поддержания идентичности меристем при помощи транскрипционных факторы семейств *KNOX* и *WOX*. На третьем уровне контроля главную роль играют фитогормоны, особенно цитокинины и ауксины, для которых показано участие в регуляции клеточного цикла и развития меристем. Нарушения в работе или функциях генов, действующих на любом из этих этапов, дестабилизируют баланс пролиферации и дифференцировки клеток, что может приводить к нарушениям морфогенетических процессов, в том числе к опухолеобразованию [Лутова и др., 2008].

Для опухолей растений характерно повышение количества и размера клеток. Обычно у растений выделяют собственно опухоли (структуры, напоминающие каллус, с неограниченным ростом, способные к гормон-независимому росту и, как правило, без признаков вторичной дифференцировки) и галлы (структуры с ограниченным ростом, состоящие в основном из дифференцированных тканей, неспособные к

самоподдержанию). Среди опухолей выделяют спонтанные (генетические), возникающие у растений с определенным генотипом, и индуцированные патогенами (например, агробактериальные). Индуцированные опухоли чаще всего представляют собой структурированные, ограниченно растущие галлы; а спонтанные – это типичные опухоли [Додуева и др., 2016].

Одной из общих характеристик растительных опухолей, независимо от происхождения, является изменение баланса гормонов, в частности, цитокининов и ауксинов. Помимо этого, в опухолях растений обнаружено повышение экспрессии генов контроля клеточного цикла (гены циклинов и *CDKA*), регуляции развития меристем (гены *KNOX*), а также генов, регулируемых гормонами, продукты которых участвуют в сигнальном ответе на цитокинины и ауксины (гены *ARR* А-типа и *Aux/IAA*) [Лутова и др., 2008].

1.2.1. Спонтанное опухолеобразование у растений

Спонтанное опухолеобразование найдено у многих видов высших растений. Образование генетических опухолей отмечено на листьях *Thea sinensis*, семядолях *Pharbitis nil*, боковых побегах *Picea glauca* и *Sequoia sempervirens*, стручках *Pisum sativum*, завязях *Sorghum bicolor*, у инбредных линий *Melilotus alba* и *Raphanus sativus* [Бузовкина, Лутова, 2007]. У арабидопсиса были получены несколько моногенных мутаций, приводящих к развитию опухолей (14 опухолевых линий, полученных посредством обработки прорастающих семян этилметансульфонатом), ведущих себя в культуре как активно пролиферирующий гормон-независимый каллус [Зубов, 2016].

Генетическая коллекция инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* var. *Radicula Pers.*) была заложена в 60-х гг. XX в. на кафедре генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета путем самоопыления растений трех сортов и в настоящее время включает 33 линии, для многих из которых характерны различные нарушения морфогенеза (рис. 1.4): образование опухолей на корнеплоде, израстания завязи, утолщения в узлах, изгибы побегов, прорастания семян в стручке [Бузовкина, Лутова, 2007].

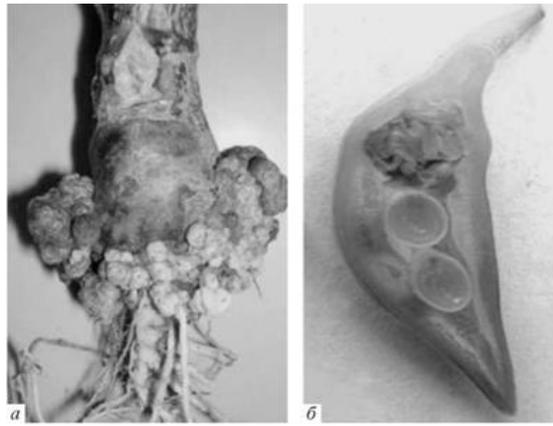


Рис. 1.4. Опухولةобразование у инбредных линий редиса: а - опухоль на корнеплоде, б - израстание завязи [Лутова, Додуева, 2007].

На ранних стадиях развития опухоли большие группы пролиферирующих клеток встречаются в ксилемных лучах (напротив полюса протоксилемы). На более поздних стадиях опухоли различают нерегулярно распределенные сосуды, связанные сосудистой сеткой, некоторые из сосудов ксилемы, образующих глобулярные структуры в опухолях. Зрелое тело опухолей на корнях редиса состоит из паренхиматических клеток и случайно распределенных сосудов ксилемы; пролиферирующие клетки в опухолях кластеризуются в меристематические очаги, обычно расположенные близко к сосудам ксилемы. Предполагается, что эти пролиферирующие клетки являются потомками камбийных клеток. В дополнение к пролиферации эти клетки демонстрируют некоторые морфологические характеристики клеток меристемы, например, малый размер, плотная цитоплазма и тонкие клеточные стенки [Osipova et al., 2014].

Спонтанные опухоли в редисе могут развиваться из-за изменения активности камбия: аномальная клеточная пролиферация камбия изменяет радиальную структуру корня, что приводит к образованию большой массы паренхимы и аномально распределенных сосудистых элементов. Кроме того, в зрелых опухолях редиса наблюдаются волнообразные ксилемы, похожие на глобулярные пучки, ранее описанные для опухолей, индуцированных *A. tumefaciens* [Osipova et al., 2014].

Одной из причин опухолеобразования у инбредных линий редиса является изменение баланса цитокининов и ауксинов. Трансформация линий редиса, не образующих генетические опухоли, геном биосинтеза цитокининов *ipt A. tumefaciens* и геном *rolC A. rhizogenes*, предположительно регулирующим метаболизм и передачу сигнала цитокининов, также приводит к развитию опухолей. Такой же эффект наблюдался при продолжительной обработке молодых растений безопухолевых линий редиса цитокининами [Лутова, Додуева, 2007]. У линий с наибольшей частотой

опухолеобразования наблюдается конститутивная активация ответа на цитокинин при отсутствии цитокинина в среде. В тканях опухолей на корнеплодах и опухолей, индуцированных цитокинином, наблюдается повышенный уровень экспрессии гена *RsCycD3*, гена *KNOX* класса I *RsKNAT1* и гена *RsARR5*. Резкое повышение экспрессии этих генов наблюдается при переходе к цветению, когда происходит активация пролиферации в древесинной паренхиме корнеплода и индукция опухолеобразования. В израстающих завязях редиса также отмечен повышенный уровень экспрессии этих генов по сравнению с нормальными завязями. Более того, в них обнаружена экспрессия генов, которые в норме экспрессируются только в апикальной меристеме побега, - *RsSTM* и *RsWUS*. Возможно, это является причиной дедифференцировки клеток стенки завязи и возникновения новых областей меристем. В генетических опухолях у инбредных линий редиса также обнаружена активация экспрессии *WOX5* в зонах пролиферации клеток рядом с максимумами концентрации ауксина [Лутова, Додуева, 2007].

Способность к опухолеобразованию у редиса в некоторых скрещиваниях наследуется моногенно и определяется рецессивным геном *tur*. Однако разное происхождение опухолевых линий и разные характеристики опухолей, а также отклонения от моногенного наследования признака в ряде случаев позволяют предположить о полигенном контроле признака или о наличии основного гена и нескольких генов-модификаторов, влияющих на его экспрессию [Бузовкина, Лутова, 2007].

Исходя из имеющихся данных, можно предположить о наличии двух схем контроля опухолеобразования у инбредных линий редиса:

1) повышение уровня цитокининов в корнеплодах при переходе к цветению приводит к повышению экспрессии *RsCycD3* и *RsKNAT1*, а также генов ответа на цитокинины (особенно *RsARR*), что индуцирует деления клеток древесинной паренхимы и ведет к опухолеобразованию;

2) повышенный уровень экспрессии *RsKNAT1* в корнеплодах ведёт к усиленной активации биосинтеза и сигналинга цитокининов, вследствие чего повышается уровень экспрессии *RsARR* и *RsCycD3*, что ведёт к активному делению клеток древесинной паренхимы и, как следствие, опухолеобразованию [Лутова и др., 2008].

Таким образом, опухолеобразование у растений может являться последствием изменений экспрессии ряда генов, продукты которых действуют на разных этапах регуляции деления клеток. Это затрудняет выявление генов, влияющих на опухолеобразование в случае полигенного контроля признака, в частности у межвидовых гибридов табака и инбредных линий редиса. Однако изучение опухолеобразования у

растений позволило обнаружить новые гены, вовлеченные в регуляцию пролиферации. Среди них гомологи онкогенов Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes*, которые были обнаружены в геномах ряда видов *Nicotiana*, рецепторная киназа CHRK1, иммунофиллин PAS1, анитифосфатаза PAS2, белок *Agrobacterium rhizogenes* ORF13, напрямую взаимодействующий с белком Rb растений и т. д. [Лутова, Додуева, 2007].

1.2.2. Патоген-индуцированное опухолеобразование у растений

Патоген-индуцированные опухоли могут быть вызваны бактериями, вирусами, грибами, нематодами, простейшими, членистоногими.

Индукция галлов и опухолей является одним из способов колонизации растений биотрофными патогенами, при которой разрастание тканей растения-хозяина создает для патогена среду обитания с доступным источником пищи. Это достигается «репрограммированием» зараженных растительных клеток под действием веществ, как правило, фитогормонов, выделяемых патогеном. В результате в растении образуется пул делящихся недифференцированных клеток, который заселяется патогеном, и затем может вторично дифференцироваться [Додуева и др., 2016].

Наиболее изученный фитопатоген, индуцирующий опухоли, – возбудитель корончатого галла *Agrobacterium tumefaciens*. Вирулентные бактерии содержат индуцирующую опухоль Ti-плазмиду, которая ответственна за трансформацию растительных клеток через введение Т-ДНК в растительную хромосому. Эта Т-ДНК содержит гены биосинтеза опинов (*mas2*, *mas*, *acs*, *nos*, *ocs*, *mis*, *sus* и *ags* гены, комбинация которых отличается для разных штаммов и типов синтезируемых опинов) и гены метаболизма фитогормонов (гены синтеза ауксина - *iaaH*, *iaaM* и цитокинина – *ipt*) [Galambos, 2013; Vladimirov et al, 2015].

Корончатый галл - это типичная опухоль (рис 1.5) с быстро делящимися клетками, способностью к гормон-независимому росту и потерей способности к регенерации. Сначала корончатый галл возникает как недифференцированная масса клеток, а в дальнейшем может происходить вторичная дифференцировка покровных тканей и флоэмы [Додуева и др., 2016; Osipova et al., 2014].

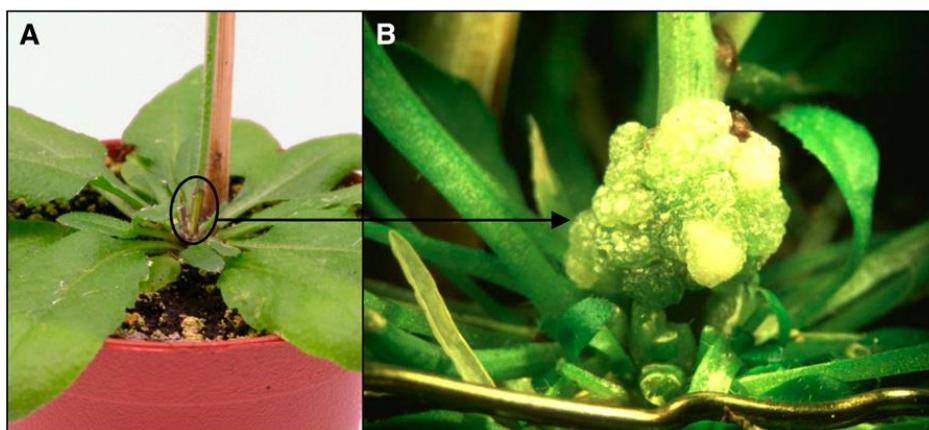


Рис. 1.5. Развитие корончатого галла на *Arabidopsis*: А) место повреждения стебля и инокуляции штаммом *Agrobacterium* C58, В) опухоль, развившаяся через 30-35 дней [Eckardt, 2006].

Известно еще несколько видов бактерий, образующих галлы, – *Pseudomonas savastanoi*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodococcus fascians*. Образование галлов этими бактериями также связано с их способностью к биосинтезу цитокининов и ауксинов, которая определяется плазмидными или хромосомными генами, которые демонстрируют высокий уровень гомологии друг с другом и с генами *A. tumefaciens*, но они не способны встраиваться в геном растения-хозяина [Chalupowicz et al., 2009; Додуева и др., 2016].

В опухолеобразовании у растений также участвуют некоторые виды грибов-фитопатогенов, как, например, *Ustilago maydis*, который вызывает образование опухолей на початках кукурузы, а *U. Esculenta* образует крупные галлы на злаке *Zizania latifolia*. Многие патогенные грибы растений способны к биосинтезу и секреции фитогормонов [Chung, Tzeng, 2004]. Например, у *U. maydis* были найдены гены *iad1* и *iad2*, кодирующие ферменты биосинтеза ауксина. У спорыньи (*Claviceps purpurea*) обнаружен уникальный ген биосинтеза цитокининов *SpIPT-LOG*, который кодирует фермент с двумя доменами белков IPT и LOG, катализирующих сразу два последовательных этапа биосинтеза цитокининов [Hinsch et al., 2015].

Возможной мишенью действия гормонов при образовании опухолей становятся меристем-специфичные транскрипционные факторы. Так, недавно было показано, что при росте корончатого галла на горохе происходит активация экспрессии гена *WOX5*. Также в опухолях, индуцированных агробактерией, обнаружен ген *SHR*, активирующийся при развитии опухолей [Виноградова и др., 2015].

Для нематод, паразитирующих на корнях, характерна иная стратегия опухолеобразования. Индуцирование опухолей происходит при впрыскивании в ткани растения секрета глоточных желез нематоды, который содержит белки, похожие на

растительные CLE-пептиды (рис. 1.6). Выяснено, что CLE-пептиды нематод, как и растительные, подвергаются пост-трансляционной модификации в растительной клетке и взаимодействуют с одним из растительных рецепторов CLE-пептидов – CLV2 / CRN [Wang et al., 2011]. Известно также, что CLE-пептиды могут участвовать в образовании других типов опухолей. Например, при изучении транскриптома опухолей, индуцированных агробактерией, была обнаружена активация экспрессии гена CLE41, участвующего в поддержании камбия [Додуева и др., 2016].

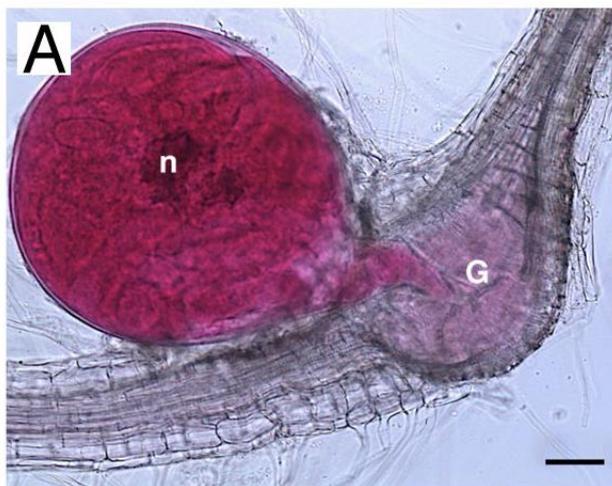


Рис. 1.6. Обычная грушевидная взрослая самка нематоды *Meloidogyne incognita*, ассоциированная с галлом на корне *Arabidopsis* дикого типа (n - нематода, G – галл) [Vieira et al., 2013].

Опухоли межвидовых гибридов табака занимают промежуточное положение между спонтанными и патоген-индуцированными опухолями: это спонтанные опухоли, но для их образования нужна экспрессия последовательностей, полученных некоторыми из предковых видов от агробактерий в результате горизонтального переноса генов (ГПГ) [Intrieri, Vuiatti, 2001]. В геномах более чем 40 видов рода *Nicotiana* обнаружены последовательности, имеющие 70–90 % гомологии с *rol* генами *A. rhizogenes*, которые отвечают за повышение чувствительности тканей растения-хозяина к гормонам (ауксинам и цитокининам), и *ORF* генами *A. rhizogenes*. Считается, что ГПГ произошел на ранних этапах эволюции рода *Nicotiana* при заражении предковой формы агробактериями. Межвидовые гибриды табака характеризуются образованием генетических опухолей, которые напоминают гиперплазии, вызванные агробактериями [Додуева и др., 2005].

Среди генов, экспрессируемых в опухолях табаков, выявлены гены, кодирующие гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы группы *KNOX*, в частности, гены *HOT* (Homeobox in tobacco). У межвидовых гибридов табаков *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii* и *Nicotiana glauca* x *Nicotiana suaveolens* в опухолях была обнаружена высокая

экспрессия генов *NTH15* и *NTH20* (гены *KNOX I* класса) и *NTH23* (ген *KNOX II* класса) [Осипова и др., 2006]. Также экспрессия уникального циклина *GTC_{ус}* наблюдается только в опухолях у межвидовых гибридов табака [Лутова, Додуева, 2007].

1.3. Другие дополнительные меристемы растений

1.3.1. Меристемы клубеньков у растений

Симбиоз бобовых растений и бактерий ризобий представляет собой сложно регулируемый процесс, контролируемый генами обоих партнеров. Клубеньки (рис. 1.7) образуются в результате обмена сигналами между растением-хозяином, выделяющим флавоноиды, и ризобиями, выделяющими сигнальные молекулы липохитоолигосахаридной природы - Nod-факторы [Додуева и др., 2016]. Nod-факторы связываются с особыми рецепторами бобовых растений и активируют сигнальный каскад, ведущий к образованию клубеньков. При рецепции Nod-факторов, в клетках корневой эпидермы происходит деполяризация мембраны, изменения концентрации кальция в перинуклеарном пространстве, структуры цитоскелета, провоцируется деление клеток ксилемного перицикла и, как следствие, деформация клеток эпидермы, а также экспрессируются гены ранних нодулинов (*ENOD2*, *ENOD12*, *ENOD40*) [Акимова, Соколова, 2012]. У бобовых растений с недетерминированным типом клубеньков (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) закладывается самоподдерживающаяся меристема, благодаря чему продолжается рост клубенька. У бобовых растений (*Lotus japonicus*, *Glycine max*), формирующих клубеньки детерминированного типа, активация делений происходит в клетках внешней коры [Осипова и др., 2011].



Рис. 1.7. Клубеньки на корнях *M. Truncatula* [Couzigou et al., 2012].

У бобовых растений существует специализированная система авторегуляции клубенькообразования (англ. Autoregulation of nodulation, AON), которая осуществляет контроль развития клубеньков на уровне всего организма. Это механизм, посредством которого растение подавляет последующее образование клубеньков на корнях после того,

как их уже образовались достаточно. В AON у всех изученных бобовых участвует CLV1-подобная рецепторная киназа; мутации в гене этой киназы (*MtSUNN Medicago truncatula/ LjHAR1 Lotus japonicus/ PsSYM29 Pisum sativum/ GmNARK Glicine max*), приводит к суперклубенькообразующему фенотипу. AON инициируется в ходе развития клубеньков посредством сигнала, поступающего из корней (сигнал 'Q') - CLE-пептидов. У модельных бобовых растений (*M. truncatula, L. japonicus*) были выявлены CLE гены (*MtCLE13, LjCLE-RS1, LjCLERS2*), экспрессия которых активируется при клубенькообразовании. Восприятие CLE-пептидов, поступивших из клубенька, CLV1-подобной киназой, локализованной в листьях, приводит к формированию нового сигнала, поступающего из побега и подавляющего развитие клубеньков [Додуева и др., 2016].

Мишенью сигнального каскада, индуцируемого CLE-пептидами в AON, служит ген *WOX5*. Экспрессия этого гена активируется при закладке клубенька и сохраняется в клубеньковой меристеме на ранних стадиях его развития. Ген *WOX5* в меристеме клубенька, как и в КАМ, активируется ауксином [Osipova et al., 2014].

Другой важный регулятор образования и развития меристемы клубенька – цитокинины и ТФ *KNOX*. Нарушения функции рецепторов цитокинина у мутантов *L. Japonicus* и *M. truncatula* приводят к подавлению клубенькообразования. Однако при развитии клубеньков была обнаружена активация транскрипции генов, кодирующих регуляторы ответа на цитокинин (RR) А и В типов. Белки *MtRR1* (RR В-типа) и *MtRR4* (RR А-типа) являются позитивным и негативным регуляторами клубенькообразования, соответственно. Также в перицикле корня гороха и люцерны была показана активация экспрессии генов биосинтеза цитокининов – *IPT* и *LOG* в ответ на инокуляцию ризобиями. Похожий паттерн экспрессии был выявлен и для генов *MtKNOX3* и *PsKNOX3*, кодирующих ТФ *KNOX* класса II. Кроме того, ТФ *KNOX3*, по-видимому, является важным регулятором клубенькообразования, так как сверхэкспрессия генов *KNOX3* приводит к развитию спонтанных клубеньков без инокуляции ризобиями [Azarakhsh et al., 2015].

1.3.2. Каллусообразование у растений

Одним из следствий тотипотентности клеток растений является способность образовывать каллус – массу недифференцированных клеток, способных дать начало целому растению. Образование каллуса можно спровоцировать *in vitro* при культивировании эксплантов растений на среде, содержащей ауксины и цитокинины (рис. 1.8). В зависимости от наличия или отсутствия признаков вторичной дифференцировки выделяют несколько типов каллуса: недифференцированный компактный,

корнеобразующий, побегообразующий, эмбриогенный (способный к соматическому эмбриогенезу) [Додуева и др., 2016].



Рис. 1.8. Формирование каллуса из эксплантов брокколи: А) формирование каллуса, В) дифференциация побегов, С) рост побегов [Ahmed et al., 2012].

О молекулярных механизмах образования каллуса известно немного, но, по сути, каллус представляет собой меристемоподобную ткань, способную давать начало нормальным меристемам (например, при регенерации побегов и корней из каллуса, при соматическом эмбриогенезе). При этом каллус может индуцироваться из существующих меристем, например, на гипокотильных и корневых эксплантах арабидопсиса каллус развивается из клеток ксилемного перицикла или возникает за счет дедифференцировки клеток [Додуева и др., 2016].

Обнаружено, что образование каллуса можно вызвать, изменяя уровень экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла, таких как *E2F* (E2 PROMOTER BINDING FACTOR) и *DP* (DIMERIZATION PARTNER), которые кодируют транскрипционные факторы, необходимые для контроля репликации ДНК, и гены *KRP*, кодирующие репрессоры циклин-зависимых киназ. Усиленное каллусообразование также характерно для линий со сверхэкспрессией генов, кодирующих транскрипционные факторы, контролирующие развитие листа, *LBD* (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN) и ауксин-зависимые ТФ *ARF7* и *ARF19* (AUXIN RESPONSE FACTOR7 и 19), мишенью действия которых служат гены *E2F* и *DP*. В регуляции уровня белков *KRP* важную роль играет белок-транскрипционный адаптер *PRZI* (PROPORZ1); нарушение его функции у мутанта арабидопсиса *prz1* вызывает спонтанное каллусообразование со снижением экспрессии генов *KRP*. Активация некоторых других транскрипционных факторов может вызывать спонтанный переход к соматическому эмбриогенезу и формирование эмбриогенного каллуса [Додуева и др., 2016].

На 7 сортах гороха посевного *Pisum sativum* были изучены процессы образования клубеньков и каллуса. В качестве индуктора клубенькообразования использовали один и тот же штамм 250 азотфиксирующих бактерий *Rhizobium leguminosarum*. Для получения каллуса использовали эксплантаты из 3-суточных побегов. В результате было показано,

что максимальная (оптимальная для азотфиксации) масса клубеньков одними растениями достигается за счет увеличения числа клубеньков, а другими — за счет увеличения массы каждого из клубеньков, что, по-видимому, зависит от сорта гороха. И также было обнаружено, что максимальный размер каллуса дают сорта, растения которых имеют большое число клубеньков. Небольшие каллусы характерны для сортов, у которых растения имеют крупные клубеньки, но в небольшом количестве. Таким образом, с высокой долей вероятности можно утверждать, что чем больше растение гороха индуцирует клубеньков, тем больших размеров может достигнуть каллус, полученный из клеток этого растения [Петров, 2012].

1.3.3. Соматический эмбриогенез у растений

Соматический эмбриогенез (СЭ) – процесс, во время которого незиготические клетки формируют эмбрионы, которые затем проходят через стадии эмбрионального развития, впоследствии формируя новое растение. Для образования соматических эмбрионов (рис. 1.9) необходимо сформировать специфические условия *in vitro*, которые включают в себя обработку гормонами и развитие эмбрионного каллуса, хотя некоторые растения, как *Kalanchoë daigremontiana*, способны формировать их самостоятельно. Соматический эмбриогенез имеет множество сходных черт с зиготическим эмбриогенезом (ЗЭ). В ходе своего развития, соматический эмбрион проходит через различные морфологические стадии, характерные для развития эмбриона из зиготы. В особенности, важным этапом СЭ является закладка пулов стволовых клеток апикальных меристем и прокамбия. Создание локальных максимумов концентрации ауксина, которые возникают благодаря активности белков полярного транспорта ауксинов PIN, - необходимое условие нормального морфогенеза зародыша при обоих видах эмбриогенеза [Додуева и др., 2016].

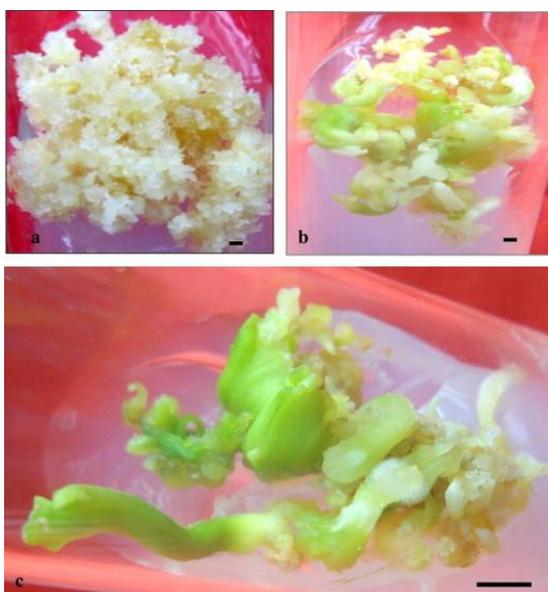


Рис. 1.9. Соматические эмбрионы *Catharanthus roseus*: (а) эмбриональная ткань развилась из гипокотилия, (b) соматический эмбрион, образовавшийся на твердой среде MS, (c) созревший эмбрион в твердой среде MS [Mujib et al., 2014].

Обнаружено, что соматический и зиготический эмбриогенез имеют большое количество сходных экспрессирующихся генов. Например, гены, кодирующие ТФ разных групп: *LEC1 (LEAFY COTYLEDON1)*, *LEC2 (LEAFY COTYLEDON2)* и *FUS3 (FUSCA3)*, *BABY BOOM*, *AGAMOUS-LIKE15 (AGL15)*, ТФ семейства *WOX*. Изучение соматического эмбриогенеза у винограда показало, что практически все гены *WOX* экспрессируются в ходе каллусообразования, как в неэмбрионном каллусе, так и в ходе соматического эмбриогенеза. Экспрессия гена *WUS* у арабидопсиса служит маркером и стимулятором соматического эмбриогенеза. Ген *WUS* участвует в закладке ПАМ, а ген *WOX5*, в свою очередь, участвует в закладке КАМ соматических зародышей. Гомологи генов *WOX1* и *WOX3* активируются на поздних стадиях СЭ у *Vitis vinifera*. Экспрессия генов *WOX11, 12* и *13* в ходе каллусообразования и/или СЭ также отмечена у разных видов растений [Додуева и др., 2016].

1.4. РНК-секвенирование растений

РНК-секвенирование (RNA-Seq) - изучение транскрибируемых генов организма при помощи секвенирования следующего поколения. Термин «секвенирование следующего поколения» (от англ. Next Generation Sequencing, NGS) включает в себя технологии, позволяющие получать информацию о нуклеотидном составе миллионов последовательностей в одном эксперименте. Таким образом, применение NGS для исследования экспрессии генов на сегодняшний день представляется оптимальным подходом, позволяющим изучать транскрипционные профили любых объектов [Weber, 2015; Жуков и др., 2015].

На данный момент RNA-Seq широко используется для определения дифференциальной экспрессии генов или транскриптов, а также для выявления новых транскриптов, идентификации аллеле-специфичной экспрессии, событий альтернативного сплайсинга и для точного измерения трансляции транскриптов [Williams et al., 2015; Davidson & Oshlack, 2014]. Данные транскриптома предоставляют богатые ресурсы для выявления и разработки большого количества маркеров одиночного нуклеотидного полиморфизма (SNP) и инсерций / делеций (InDel) на основе сравнения последовательностей транскриптомов с референсными последовательностями генома. Недавно, используя сравнительный транскриптомный анализ, было обнаружено большое

количество маркеров SNP и InDel у многих видов растений, включая *Arabidopsis*, *Brassica napus*, рис и томат [Luo et al., 2017].

Преимущества РНК-секвенирования над такими технологиями анализа экспрессии генов, как ПЦР, заключаются в более высокой чувствительности, позволяющей детектировать до 90 % всех экспрессирующихся генов. Одним из преимуществ RNA-seq по сравнению с более старыми технологиями, такими как микрочипы, является то, что он позволяет проводить транскриптомный анализ немодельных организмов, таких как редис *Raphanus sativus* или горох *Pisum sativum*, поскольку референсный геном и аннотация не требуются для генерации и анализа данных [Davidson & Oshlack, 2014]. Кроме того, стоимость методик секвенирования постоянно снижается, что делает их все более доступными и привлекательными для использования [Жуков и др., 2015].

Однако эксперименты по РНК-секвенированию растений могут иметь некоторые сложности, связанные с особенностями геномов растений. Среди самых различных таксонов, от мхов до покрытосеменных растений, широко распространена полиплоидия. Полиплоидами являются 35-47% видов покрытосеменных растений [Soltis et al., 2015]. Сложности секвенирования генома у растений с большими геномами или у тех, которые пережили недавнюю полиплоидию, обусловлены высоким процентом сходства между последовательностями в удвоенном геноме. Это проблема особенно актуальна для больших аллополиплоидных геномов, таких, как у пшеницы (~ 15 Gbp) *Triticum aestivum*. Преобладание подобных повторяющихся элементов в этих геномах означает, что они часто исключаются из сборки генома [Wendel et al., 2016].

В геномах различных растений также высок процент дублированных генов. Даже *Arabidopsis thaliana*, который имеет сравнительно маленький геном, из-за чего является модельным растением, по разным оценкам содержит от 47% до 63% дублированных генов. В дополнение к различиям последовательности, дублированные гены могут иметь различные паттерны экспрессии. Около 70% повторяющихся пар у *A. thaliana* имеют существенные различия в уровнях транскриптов [Wendel et al., 2016; Хатефов и др., 2011].

Поэтому в случаях, когда геном слишком сложен для эффективной сборки: содержит очень много повторов, имеет высокую ploидность или очень большой размер, часто используют сборку транскриптома *de novo*.

1.4.1. Примеры применения РНК-секвенирования в транскриптомике растений

Секвенирование транскриптома обеспечивает быстрое понимание расположения генов, возможность изолировать интересующие гены, разработку функциональных маркеров, количественное определение экспрессии генов и сравнительные геномные исследования, а системная биология и биоинформатика имеют большое значение для понимания молекулярных систем, которые лежат в основе различных функций растений. Поэтому сегодня РНК-секвенирование используется повсеместно при анализе транскриптомов растений для крайне разнообразных задач [Naol et al., 2016].

Секвенирование РНК, которое является более эффективным и экономически более выгодным, чем секвенирование всего генома, стало мощным инструментом в исследовании лекарственных растений. Например, традиционные китайские лекарственные растения использовались в профилактике заболеваний и в лечении в течение тысяч лет, и в настоящее время представляют собой богатый источник лекарственных веществ и препаратов-кандидатов. Так, полынь однолетняя (*Artemisia annua*) использовалась в качестве лекарства у китайских травников в течение более чем 2000 лет, но была подвергнута научному исследованию лишь после 1970-х годов. А в 2010 году платформа 454 была использована для создания баз данных EST из кДНК библиотек, полученных из железистого трихома *Artemisia*. Были обнаружены основные гены, связанные с метаболическими путями и фенотипическими признаками, такими как развитие трихома и архитектура растений, которые могут повлиять на выработку артемизинина, а также было определено количественное их содержание в различных библиотеках. С помощью программного обеспечения CAP3 была проведена сборка *de novo* транскриптома полыни однолетней. Функциональные исследования этих генов будет способствовать молекулярной модификации, трансформации генов и метаболической инженерии для повышения производства необходимых лекарственных веществ в этом растении [Naol et al., 2016; Новикова, Згода, 2015].

Транскриптомное секвенирование играет важную роль и в изучении ценных сельскохозяйственных культур. Например, бобовые представляют собой второй по значимости источник питания человека и корма для животных после зерновых культур и обладают уникальной способностью фиксировать атмосферный азот. Несмотря на их важность, они стали «сиротами» от геномной революции. Тем не менее, совсем недавно были разработаны геномные ресурсы для нескольких важных видов бобовых, в том числе сои, лотоса, люцерны и нута. Из последних исследований ясно, что биология бобов быстро претерпевает трансформацию из-за применения геномных подходов [Garg,

Mukesh, 2013]. Так, горох посевной (*Pisum sativum L.*), будучи одной из наиболее значимых бобовых культур в мире, недостаточно изучен с позиций молекулярной генетики и геномики. Секвенирование генома гороха на данный момент не завершено, поэтому целесообразно проводить изучения транскриптома растения, как наиболее активной части генома, состав которого весьма различается в разных тканях и органах. Например, симбиотические гены, контролирующие развитие азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы, у бобовых растений экспрессируются преимущественно в корнях и клубеньках и представляют особый интерес в изучении принципов формирования микробно-растительных систем [Жуков и др., 2015].

РНК-секвенирование растений активно используется и в фундаментальных исследованиях. Так, до некоторого времени межвидовой перенос молекул матричной РНК не был исследован, и её передача считалась невозможной. Однако в 2014 году учёным удалось выяснить, что повилика (*Cuscuta L.*), которая относится к паразитическим растениям из семейства вьюнковых, способна получать от растения-хозяина не только питательные вещества, но и крупные молекулы, в частности, молекулы мРНК. Секвенирование транскриптома повилики, растущей на арабидопсисе (*Arabidopsis thaliana*) показало, что мРНК двигается в больших количествах и двунаправленным способом, однако паразит получает больше информационной РНК, чем растение-хозяин [Kim et al., 2012]. Кроме того, РНК-секвенирование применяется, например, и в изучение развития органов растения [Liu et al., 2014], для анализа гормонального ответа [Shi et al., 2013], для изучения филогении растений [Wen et al., 2013].

Эксперименты с RNA-seq также дают уникальную возможность более глубокого изучения молекулярно-генетической основы реакции растений на сигналы из окружающей среды [Mironova et al., 2015]. Например, при изучении транскриптомного профиля растений при стрессовых условиях, как засуха [Gong et al., 2015; Tian et al., 2015] или при изучении устойчивости растений к патогенам [Hao et al., 2016].

Помимо стандартного использования секвенирования РНК для анализа транскриптома отдельной ткани или организма, постепенно набирают обороты новые подходы изучения транскриптомов. Например, транскриптомика одиночной клетки используется в большем количестве исследований на животных, но этот метод еще не так широко используется в растениях. Тем не менее, ранние исследования показывают, что протоколы RNA-Seq одиночной клетки (single-cell RNA-seq), разработанные для клеток животных, дают информативные наборы данных у растений [Efroni, Birnbaum, 2016].

Многие отличительные особенности растений связаны с функциями узкоспециализированных клеток. Транскриптомный анализ этих специализированных

клеток значительно улучшил наше понимание ключевых событий в развитии растений, таких как спецификация тканей в корне и стебле или созревание устьиц. Тканеспецифичное профилирование также показало, что условия окружающей среды приводят к резко различающимся ответам в различных типах клеток. Поэтому транскриптомика одиночной клетки имеет потенциал для решения таких проблем, как природа стволовых клеток и инициалей, пластичность растительных клеток и степень локализованных клеточных ответов на сигналы из окружающей среды [Efroni, Birnbaum, 2016].

Было показано, что RNA-seq является отличным инструментом для изучения целых митохондриальных транскриптомов, способных предоставлять глобальную информацию об уровне транскрипции и событиях созревания РНК, включая редактирование. Однако RNA-Seq применяется пока только к растительным митохондриям у нескольких видов. Тем не менее, его полезность в растениях особенно перспективна для характеристики сложности митохондриальных геномов и транскриптомов растений. И РНК-секвенирование обладает огромным потенциалом для продвижения нашего понимания эволюции растений и цитоядерных взаимодействий в широком спектре видов растений [Stone, Storchova, 2014].

Также, секвенирование РНК революционизирует обнаружение вирусов. Большинство известных вирусов растений имеют РНК-геном, который может быть обнаружен с использованием RNA-Seq. ДНК-вирусы также обнаруживаются RNA-Seq, поскольку их циклы инфицирования включают продуцирование РНК посредством транскрипции их генов. Данные транскриптомы хозяев ценны для изучения реакции хозяина на вирусные инфекции и изучения манипуляций вируса с хозяином. Важно также отметить, что RNA-Seq допускает всеобъемлющий и усовершенствованный скрининг широкого круга вирусных видов по сравнению с более традиционно используемыми технологиями (например, ПЦП). Кроме того, можно использовать RNA-Seq для скрининга образцов без предварительной информации о вирусной инфекции. Таким образом, RNA-Seq является очень мощным инструментом для обнаружения и количественного определения вирусов в растениях при наличии или отсутствии симптомов [Nagano et al., 2015; Cho et al, 2015].

Подводя итог, можно сказать, что сочетание технологий NGS и возможностей современной вычислительной биологии открывает новые перспективы изучения транскриптомов, в том числе у немодельных видов организмов, что обеспечивает поступательное развитие многих направлений биологии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Материалом для работы и секвенирования послужила высокоинбредная линия редиса сорта Сакса *Raphanus sativus* L. №19 (рис. 2.1), образующая опухоли на корнеплоде. В качестве опыта использовались образцы опухолей, а в качестве контроля — образцы нормального корня того же растения. Для каждого образца было сделано по 3 повторности.

В качестве материала для трансформации использовались не образующие опухоли растения редиса линии №28. Семена обеих линий были взяты из коллекции кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета.



Рис. 2.1. 19 линия редиса *Raphanus sativus* L., образующая опухоли.

2.2. Методы обработки данных

Секвенирование образцов проводилось в компании Genotek. Для проведения секвенирования из тотальной РНК была синтезирована кДНК с использованием набора Mint-2 (Евроген) согласно протоколу производителя. Из полученной кДНК были приготовлены библиотеки с наборами New England Biolabs NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®. Двойное баркодирование библиотек проводили с помощью ПЦР (используются реагенты из наборов NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina и NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1)). Далее образцы тканей были просеквенированы на платформе Illumina HiSeq2500, а полученные данные были проанализированы с помощью следующих биоинформатических методов:

1. FastQC v0.11.5 (оценка качества «сырых» данных транскриптомного секвенирования) [URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>].
2. Trimmomatic v0.36 (тримминг (обрезка) сырых прочтений для устранения выявленных проблем) [Bolger et al., 2014].
3. bbtools (очистка образцов прочтений от контаминаций) [URL: <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>].
4. Trinity v2.4.0 & v2.6.5 (сборка транскриптома *de novo* из триммированных ридов и с референсным геномом) [Grabherr и др., 2011].
5. HISAT2 v.2.0.5 (выравнивание прочтений на референсный геном) [Kim et al., 2015].
6. SAMtools v.1.3 (перевод файлов формата «sam» в «bam»; объединение и сортировка по левой координате прочтений) [Li et al, 2009].
7. Stringtie v1.3.3b (сборка транскриптома при помощи референсного генома) [Pertea, 2016].
8. Trans-Abyss v1.5.5 (объединение нескольких сборок в одну) [Robertson et al. 2010].
9. TransRate v1.0.3 (оценка качества сборок транскриптома) [Smith-Unna et al, 2016].
10. BUSCO v3 (оценка качества сборок транскриптома) [Simão et al., 2015].
11. BLAST v1.1.5 (аннотация транскриптов по базам генов *Arabidopsis thaliana* и Uniprot) [Altschul et al., 1990].
12. Kallisto v0.44.0 (количественная оценка РНК-секвенирования на основе псевдо-выравнивания) [Bray et al., 2016].
13. Sleuth v3 (анализ дифференциальной экспрессии генов) [Pimentel et al., 2017].
14. FGSEA (поиск перепредставленных функциональных групп в некотором списке генов; расчёт степени обогащения) [Sergushichev, 2016].
15. TransDecoder v5.1.0 (идентификация кодирующих областей в последовательностях транскриптов, которые генерируются с помощью сборки транскриптома с использованием Trinity) [Haas et al., 2013; URL: <https://github.com/TransDecoder/>].
16. Trinotate v3.1.0 (автоматическая функциональная аннотация транскриптома, в частности *de novo* собранных транскриптомов от модельных или немодельных организмов) [URL: <http://trinotate.github.io>].

2.3. Выделение РНК из опухоли и нормального корня, получение кДНК и проверка уровня экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени

Для подтверждения данных о дифференциальной экспрессии генов, полученных нами при анализе данных транскриптома, мы выделили из опухолей редиса и из его нормального корня РНК с последующим получением кДНК и постановкой ПЦР в реальном времени. Материал был собран с растений редиса линии №19. Для выделения РНК взяли по две биологических повторности боковых корней (в качестве контроля) и опухолевой ткани и гомогенизировали каждую пробу в жидком азоте. РНК выделяли при помощи набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные пробы РНК очищали от остатков ДНК при помощи набора RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). 700 нг РНК из каждой пробы использовали для получения кДНК при помощи набора RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) с использованием праймера oligodT. Концентрацию РНК и кДНК измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vvis (Thermo Scientific, USA).

С полученной кДНК поставили ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов EvaGreen фирмы «Синтол» и амплификатора CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA). Состав реакционной смеси имел следующий вид:

- dH₂O – 14,7 мкл;
- 10x ПЦР буфер – 2,5 мкл;
- dNTP (2,5 мМ) – 2,5 мкл;
- кДНК – 0,5 мкл;
- MgCl₂ (25 мМ) – 2,5 мкл;
- F-праймер – 1 мкл;
- R-праймер – 1 мкл;
- SynTaq-полимераза – 1 мкл.

Протокол условий проведения ПЦР:

- 1 цикл - 95°C, 5 мин,
- 45 циклов - 95°C, 15 с; 60°C, 30 с.; 72°C, 30 с,
- 1 цикл - 95°C, 10 с,
- 1 цикл – с 65°C до 95°C, 5 с.

В качестве контроля использовали праймеры к транскриптам генов убиквитина (*UBC*) и тубулина (*TUB4*). Используемые в ходе ПЦР праймеры, подобранные с помощью программы Primer3Plus (URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi->

bin/primer3plus/primer3plus.cgi), представлены в таблице 2.1. Результаты ПЦР в реальном времени оценивались при помощи $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [Rao et al, 2013].

<i>RsARR3</i>	F: AGCCTCCGTCGAGTTACAGA R: CACCGGTTTCAGCAAGAAAT
<i>RsWOX4</i>	F: TCTGTTGCGCATTAGGAGTG R: CCGCTACTTTCGACCTCAAG
<i>RsCLE46</i>	F: TCCATCTTTTATGCCCATCC R: GGTCAAAGTCAAGCCCTGAG
<i>RsAGL17</i>	F: CAAAAGTTGTTGCTGCTCCA R: TGGGAAGAGGGAAGATTGTG
<i>RsAGL14</i>	F: CCCCCTCTCTCTCCCTTATC R: CTTCGGCATCACAAAGAACA
<i>RsIAA7</i>	F: TGCATTGGTGAAGGTATCCA R: ATCCAGTCGCCATCTTTGTC
<i>RsBRI1</i>	F: CGAGCTTCCAAGTTTTTCGTC R: AGCTGGCGTGAAACTGAACT
<i>RsCYCP3;2</i>	F: AACCGGGATTGAGTTGACAG R: GGCAAACCCAGATCTTTGA
<i>RsWES1</i>	F: AAGCCATGGTTGGTATGAGC R: TTGTGGAGTTCGAGTGCAAG
<i>RsTPST1</i>	F: CCCTTACGACATGGAGGAGA R: CTCTTGGCGACTTGGAGAAC

Таблица 2.1. Праймеры для ПЦР в реальном времени.

2.4. Амплификация фрагментов ДНК и выделение фрагментов из агарозного геля

Праймеры для клонирования фрагмента в вектор подбирались с использованием программы Primer3Plus. Последовательности праймеров представлены в таблице 2.2. ПЦР осуществляли с использованием высокоточной полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase и соответствующих компонентов реакционной смеси (ThermoFisher Scientific, USA) на амплификаторе MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option (Bio-Rad, USA). Результаты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле, при этом для аналитических проб в качестве интеркалирующего агента использовали бромистый этидий, а для препаративных – реагент SYBRSafe (Thermo Fisher Scientific, USA).

Визуализацию результатов электрофореза осуществляли при помощи трансиллюминатора или Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (BioRad, USA).

<i>RsCLE46_attB1</i>	<p>F: GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGAGAAGACACGCTGT ATTAATCA</p> <p>R: GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTACATTGGAACATAAC TTTAAGGAAT</p>
<i>RsAGL17_attB2</i>	<p>F: GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGGAAGAGGGAAGA TTGTG</p> <p>R: GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTATTATCTTAGCTCTTCG ATGATGAA</p>

Таблица 2.2. Праймеры для клонирования фрагментов в вектор для сверхэкспрессии.

Протокол условий проведения ПЦР:

- 1 цикл – 98°C, 2 мин,
- 5 циклов – 98°C, 20 с; 60°C, 20 с; 72°C, 40 с;
- 30 циклов - 98°C, 20 с; 65°C, 20 с; 72°C, 40 с,
- 1 цикл - 72°C, 5 мин.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля производили при помощи набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенных фрагментов измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vvis.

2.5. Клонирование фрагментов ДНК в векторы экспрессии методом Gateway

Полученные фрагменты ДНК встраивали в векторы экспрессии методом Gateway. В качестве векторов для сверхэкспрессии гена использовали векторы pK7WG2D (рис 2.2) и pH2GW7.

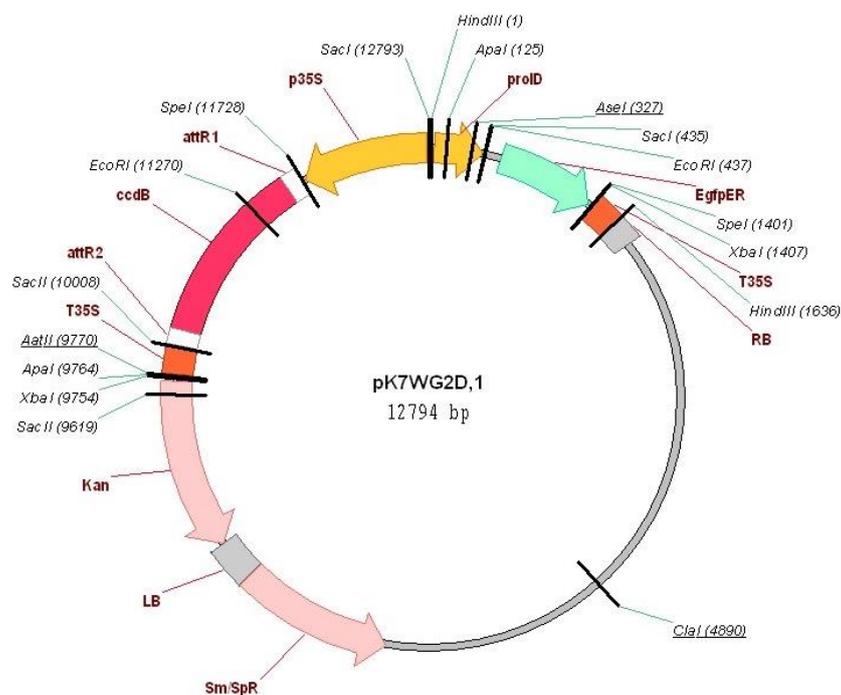


Рис. 2.2. Схема вектора pK7WG2D.

Аmplицированные фрагменты ДНК встраивали в вектор pDONR221 с использованием ферментативной смеси BP Clonase II (Thermo Fisher Scientific, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Для клонирования в вектора для сверхэкспрессии pK7WG2D и pH2GW7 использовали ферментативную смесь LR Clonase (Thermo Fisher Scientific, USA). Все реакции рекомбинации инкубировали при +25°C в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) в течение 16 часов для увеличения конечного выхода. Реакции останавливали путем добавления протеиназы Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, USA) и инкубации в течение 10 минут при +37°C и затем использовали для трансформации бактерий *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes*.

2.6. Трансформация бактерий *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes*

Для трансформации *E. coli* мы использовали химически компетентные к трансформации бактерии штамма Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA). Пробирку объемом 1.5 мл с химическими компетентами инкубировали на ледяной бане в течение 10 минут, после чего добавляли в пробирку 5 мкл реакции рекомбинации BP/LR, затем инкубировали еще в течение 10 минут, помещали на 60 секунд в температуру +42°C для индукции теплового шока, снова переносили на ледяную баню на 5 минут, добавляли 500 мкл жидкой среды LB и помещали в термостат с шейкером на 1-2 часа при температуре +37°C. После инкубации суспензию бактерий центрифугировали 2 минуты на настольной центрифуге при ускорении 4000g. Затем большую часть супернатанта сливали, в остатках

ресуспендировали бактериальный осадок и переносили на чашку Петри с твердой средой LB и антибиотиком спектиномицином (в конечной концентрации 100 мг/л) или канамицином (в конечной концентрации 50 мг/л). Чашки Петри с бактериальным посевом инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение одной ночи.

Для трансформации *A. rhizogenes* использовали электрические компетенты штамма MSU440. Пробирку объемом 1.5 мл с электрическими компетентами инкубировали на ледяной бане в течение 10 минут, после чего добавляли в пробирку 5 мкл плазмидной ДНК, полученной из трансформированных *E. coli*, и инкубировали на ледяной бане еще в течение 5 минут. Затем полученную смесь заливали в кюветы для электропорации коротким разрядом при напряжении 1250В в электропораторе Eporator (Eppendorf, Germany). После этого в пробирку добавляли 500 мкл жидкой среды LB и помещали пробирку в термостат с шейкером на 1-2 ч при температуре +28 °С. После инкубации суспензию бактерий центрифугировали в течение 2 минут на настольной центрифуге при ускорении 4000g. Большую часть супернатанта сливали, а в остатках ресуспендировали бактериальный осадок и переносили на чашку Петри с твердой средой LB и антибиотиком. Чашки Петри с бактериальным посевом инкубировали в термостате при температуре +28°C в течение двух суток.

2.7. Выделение плазмид и рестрикционное картирование

Плазмиды из бактерий выделялись при помощи коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для выделения бактерии высаживались в жидкую культуру (3 мл жидкой среды с селективным агентом) и инкубировались в термостате либо при температуре +37°C в течение 1 ночи (для *E. coli*), либо при температуре +28°C в течение двух суток (для *A. rhizogenes*). Концентрация раствора с выделенной плазмидной ДНК измерялась при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000с UV-Vvis.

Для проверки векторов на наличие вставки использовалось рестрикционное картирование. Для этого применялись эндонуклеазы рестрикции (BamHI для вектора pK7WG2D и PstI для вектора pH2GW7) и буфер 2x FD GreenBuffer из комплекта FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA). Для осуществления рестрикции компоненты смешивались в следующем соотношении:

- плазмидная ДНК – 1000 нг;
- 10x FD Green Buffer – 2 мкл;
- эндонуклеазы рестрикции – по 1 мкл каждой;
- dH₂O – до 20 мкл.

Реакционную смесь инкубировали более 5 минут при температуре +37°C, после чего наносили на 1% агарозный гель с бромистым этидием для визуализации результатов рестрикции.

2.8. Условия выращивания растений и трансформация при помощи

Agrobacterium rhizogenes

Семена стерилизовались путем экспозиции в течение 10 минут в растворе гипохлорита натрия («Белизна») при перемешивании в шейкере. Стерилизованные семена высаживались на чашки Петри с 20 мл MS0 (Murashige-Skoog 0) и проращивались в камере для выращивания растений (KBW 400, Binder, Germany) при температуре +21°C и световом режиме 16:8.

Для трансформации использовались растения возрастом 7 дней. Гипокотиль растения полностью отсекался скальпелем в стерильных условиях, после чего место поранения инокулировалось суспензией трансформированных *A. rhizogenes* штамма MSU440, выращиваемой на твердой среде LB при температуре +28°C. После трансформации растения пересаживались на новую чашку с 20 мл среды MS0. Через 7 дней растения пересаживались на среду MS0 с добавлением антибиотика цефатоксима (в концентрации 300 мг/л). Первая генерация корней удалялась, после чего растения переносились на новую чашку Петри с 20 мл среды MS0. По достижении вторым поколением адвентивных корней оптимальной длины растения пересаживались в горшки с вермикулитом, накрытые полиэтиленовой пленкой, обильно поливались водой и выращивались при температуре + 25°C, освещенности ~3000 люкс и световом режиме 16:8 свет:темнота. Спустя день после посадки растения регулярно проветривались путём снятия пленки с горшков на 10-15 минут для постепенной адаптации растений к выращиванию в открытом грунте.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Анализ качества и очистка прочтений

Первым этапом обработки данных секвенирования был анализ качества прочтений, проведенный при помощи FastQC. Далее была проведена очистка прочтений плохого качества от контаминаций адаптерами Illumina, polyA-хвостами, рибосомальной РНК, митохондриальной и пластидной ДНК, идентифицированных при помощи BLAST, а также агробактериальной ДНК. Удаление контаминаций проводилось при помощи Trimmomatic и bbtools; полученный результат далее снова оценивался программой FastQC. На рис. 2.1 для визуализации результатов показаны графики GC-состава прочтений до (а) и после (б) их очистки. Исходя из отсутствия дополнительных пиков на графиках, технические последовательности (адаптеры, праймеры), поли(А)-хвосты и ДНК организмов других видов были удалены из библиотек.

Очищенные прочтения затем использовали для сборки транскриптома.

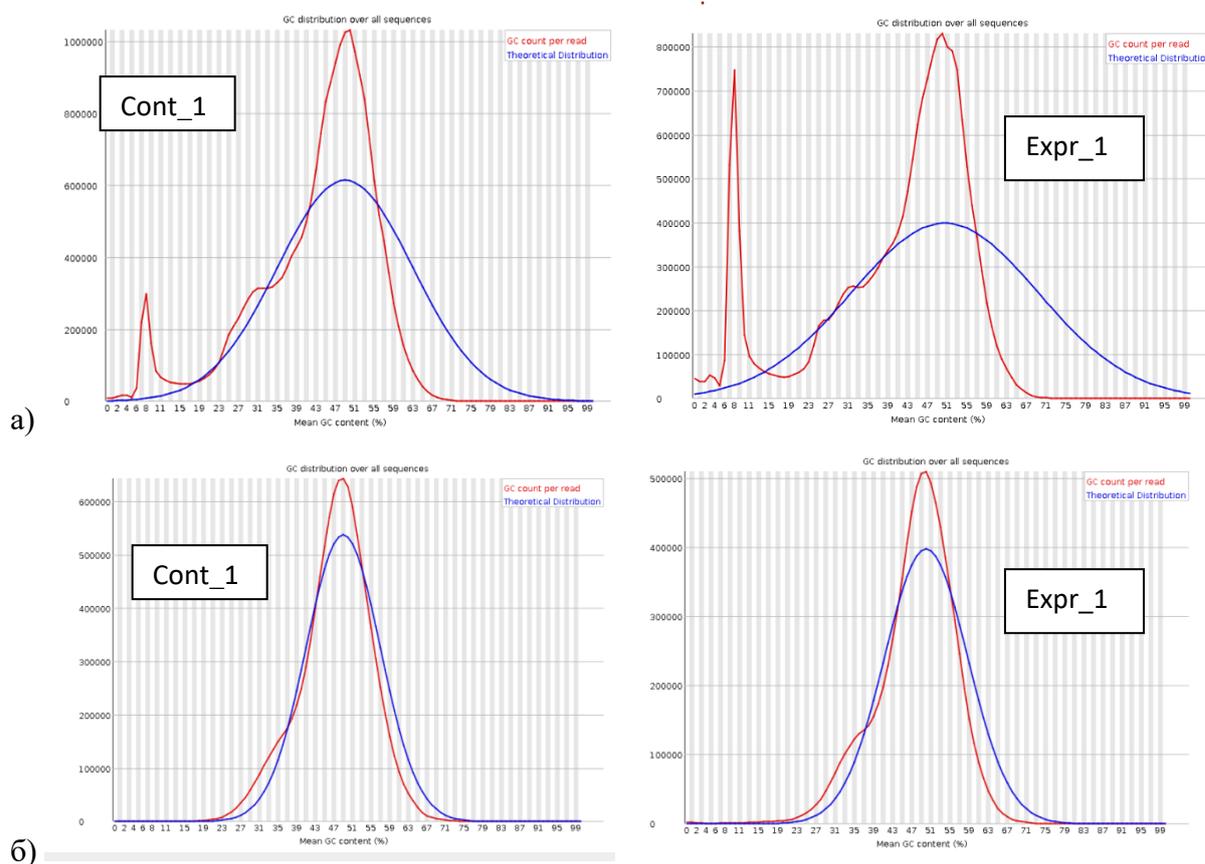


Рис. 3.1. Графики распределения GC-состава в библиотеках прочтений для первой повторности результатов секвенирования тканей нормального корня (cont_1) и первой повторности результатов секвенирования опухоли (expr_1): а) до очистки, б) после очистки.

3.2. Сборка транскриптомов редиса и их сравнение

Сборка транскриптомов проводилась четырьмя способами: *de novo* (без референсной последовательности) при помощи Trinity (двух версий – Trinity v2.4.0 и v2.6.5) и с референсным геномом (геном редиса *R. sativus* RSA_r1.0) при помощи программ Trinity и Stringtie. Перед тем, как выполнять сборки с референсной последовательностью, прочтения выравнивали на геном при помощи программы HISAT2. Затем полученные файлы формата “sam” были переведены в формат “bam”, объединены и отсортированы по левой координате прочтений при помощи SAMtools. Далее три полученные сборки объединили с помощью Trans-Abyss-merge, получив таким образом еще одну сборку («метасборку», где контиг удаляется, если он имеет совпадающую последовательность точной, полной длины в сборке меньшего размера k-mer). Все 4 транскриптома проанализировали с помощью программ для оценки качества Transrate и BUSCO для того, чтобы выбрать лучшую сборку для последующей работы с ней.

TransRate оценивает ошибки в сборке транскриптома, чтобы получить диагностический показатель качества для каждого контига (продолжительного участка ДНК, полученного в процессе сборки), и эти оценки контигов интегрирует для оценки целых сборок. BUSCO предоставляет количественные измерения для оценки сборки и полноты транскриптома на основе эволюционно обоснованных ожиданий по содержанию генов из почти универсальных однокопийных ортологов, выбранных из базы данных OrthoDB v9. Однако при оценке качества транскриптомов TransRate и BUSCO дали противоречащие друг другу результаты, поэтому при выборе сборки для дальнейшей работы мы руководствовались результатами TransRate.

Полученные результаты оценки качества TransRate сравнили между сборками (табл. 3.1), в результате чего, для дальнейшего анализа была выбрана сборка при помощи программы Trinity с референсным геномом (в таблице 3.1 - Trinity-GG v.2.6.5).

Результаты оценки при помощи BUSCO были следующими: Trinity v2.4.0 – 73,2%, Trinity-GG v2.4.0 – 66,9%, Trinity v.2.6.5 – 75,5%, Trinity-GG v.2.6.5 – 70,2%, Stringtie – 93,5%, Trans-Abyss – 64,3%.

	Trinity v2.4.0	Trinity-GG v2.4.0	Trinity v.2.6.5	Trinity- GG v.2.6.5	Stringtie	Trans- Abyss
Transrate assembly score	0.0376	0.0667	0.0379	0.0897	0.0298	0.007
Количество	121910	88213	122269	79195	98572	242448

контигов						
Размер контигов, (кол-во оснований)	201-7075	201-7085	201-7085	201-7085	64-16462	64-16462
Хороших контигов	48%	60%	46%	70%	29%	44%

Таблица 3.1. Результаты оценки качества сборок при помощи TransRate (красным выделена лучшая сборка).

Далее выбранный транскриптом аннотировали путем сравнения с протеомной и нуклеотидной базами данных *Arabidopsis thaliana*, так как базы данных для редиса *R. sativus* на данный момент обладают недостаточно полной информацией, и использование данных о хорошо охарактеризованном модельном объекте позволяют провести более обширный функциональный анализ результатов секвенирования. Аннотацию проводили с помощью программного обеспечения BLAST. Полученные результаты далее использовали для анализа дифференциальной экспрессии генов.

3.3. Функциональная аннотация транскриптома

Функциональную аннотацию транскриптома проводили при помощи программы Trinotate. Trinotate предназначен для автоматической функциональной аннотации транскриптомов, в частности собранных *de novo*, от модельных или немодельных организмов. Trinotate использует ряд методов для функциональной аннотации, включая поиск гомологии с известными последовательностями (BLAST + / SwissProt) и используя различные базы данных (eggNOG / GO / KEGG). Все данные функциональных аннотаций, полученные в результате анализа транскриптов, интегрируются в базу данных SQLite (URL: <http://www.sqlite.org/index.html>), что позволяет быстро и эффективно искать элементы с конкретными качествами, связанными с научной гипотезой, или создать целый отчет аннотаций для транскриптома. Trinotate также использует данные, полученные при помощи программы TransDecoder, которая позволяет идентифицировать кандидаты в кодирующие области в последовательностях транскриптов.

TransDecoder идентифицировал 48670 протеин-кодирующих открытых рамок считывания среди 79196 транскриптов, сгенерированных с помощью сборки транскриптома с использованием Trinity. Trinotate позволил провести функциональную аннотацию транскриптов, а также провести анализ гомологии генов редиса *R. sativus* с

другими видами (рис. 3.2). Из 79196 транскриптов *Trinotate* удалось идентифицировать 50684 транскриптов, которые соответствовали 32115 генам. Анализ, основанный на поиске BLASTx, показал наличие ближайших гомологов генов *R. sativus* среди многочисленных видов организмов. Транскрипты редиса имели наибольшее число совпадений с генами *A. thaliana* - 86,62% (27818 генов). Далее следуют *Oryza sativa* (298 генов – 0,93%), *Schizosaccharomyces pombe* (284 гена – 0,88%), *Saccharomyces cerevisiae* (240 генов – 0,75%), *Brassica napus* (146 генов – 0,45%) и *Nicotiana tabacum* (131 ген – 0,41%). В группу «другие» отнесены представители 503 видов, которые имели от 1 до 100 гомологичных генов.

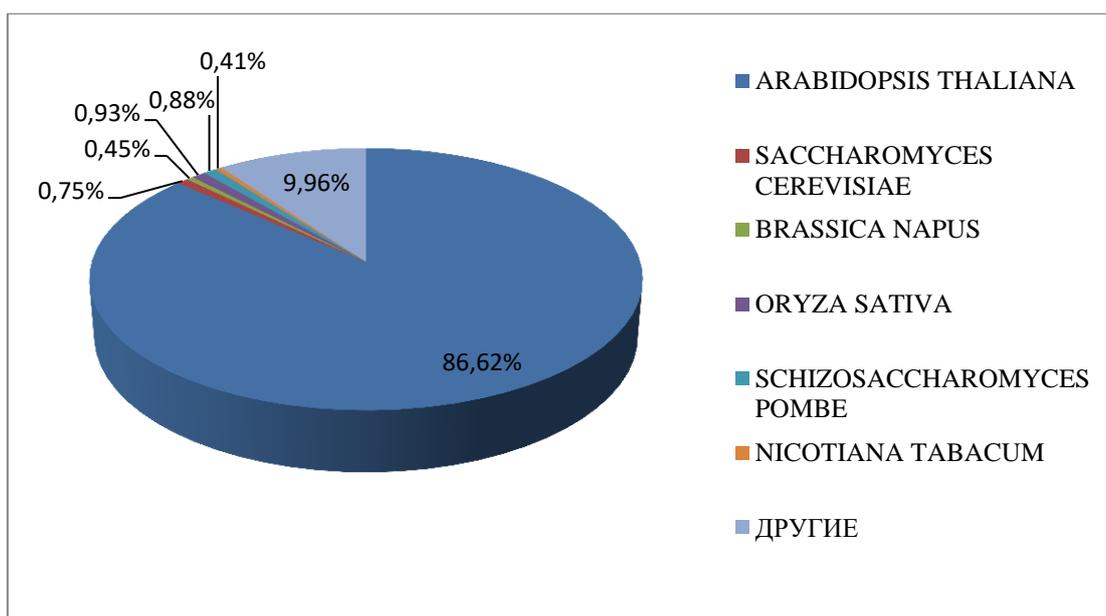


Рис. 3.2. Диаграмма анализа гомологии генов *R. sativus* с другими видами.

3.4. Анализ дифференциальной экспрессии генов

Для полученного транскриптома была проведена количественная оценка на основе псевдовыравнивания при помощи Kallisto. Полученные данные затем использовались в Sleuth для анализа дифференциальной экспрессии. На рис. 3.3 изображен график, полученный при помощи Sleuth и визуализирующий дифференциальную экспрессию генов между образцами опухолей и нормальных корней.

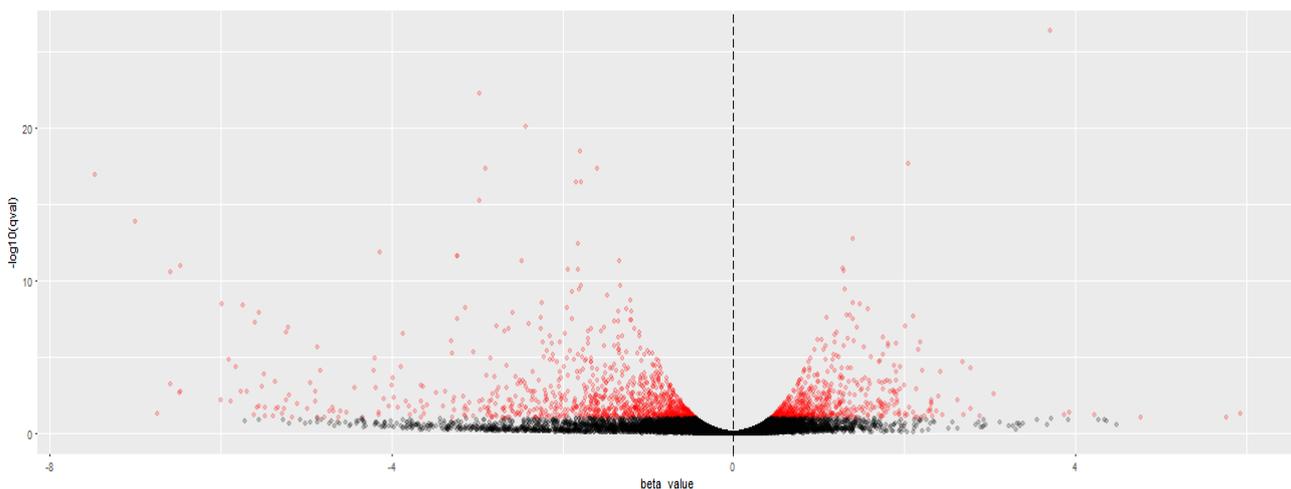


Рис. 3.3 Volcano plot, отображающий дифференциальную экспрессию между образцами; справа - гены с повышением экспрессии в опухолях, слева - гены с понижением экспрессии в опухолях по сравнению с нормальным корнем.
(красные точки – дифференциально экспрессирующиеся гены).

Ось x (beta_value) – логарифм изменения экспрессии в опухолях по сравнению с нормальным корнем, ось y (-log10(qval)) – отрицательный десятичный логарифм p-value с поправкой на множественные сравнения.

В результате нами был получен список из примерно 1600 дифференциально экспрессирующихся генов (613 повышающих и 1022 понижающих экспрессию в тканях опухоли по сравнению с нормальной тканью корня).

Так, среди генов с повышенной экспрессией в опухолях по сравнению с нормальным корнем, довольно широко представлены гены, вовлеченные в сигналинг гормонов. Например, транскрипционные факторы (далее - ТФ) *ARR* А-типа, такие как *ARR3*, *ARR4*, *ARR5* и *ARR15*, являющиеся негативными регуляторами ответа на цитокинин, который является негативным регулятором корнеобразования (как следствие и опухолеобразования). Это подтверждает уже имеющиеся данные о повышении их экспрессии в растительных опухолях разного происхождения, которое наблюдается даже при отсутствии цитокинина в среде [Лутова, Додуева, 2007]. Стоит отметить другой ТФ *ARR*, относящийся к *ARR* В-типа, - *ARR11*. Этот транскрипционный активатор участвует в ранней стадии пути передачи сигнала цитокинина, и экспрессия соответствующего гена снижается в опухолях [Imamura et al, 2003]. Гены *LOG1* и *LOG8*, кодирующие белки семейства лизин-декарбоксилаз, которые работают на заключительной стадии синтеза биоактивных цитокининов и участвуют в регуляция активности цитокининов, также снижают экспрессию в тканях опухолей по сравнению с корнем [Kuroha et al., 2009].

Среди повышающих экспрессию в опухоли генов, вовлеченных в ауксиновый сигналинг, можно также выделить ген *IAA7* – транскрипционный фактор, действующий как репрессор ауксин-индуцированной передачи сигнала, который играет роль в управлении гравитропическим ростом и развитием саженцев на свету [Li et al., 2011]. Вероятно, это указывает на негативную регуляцию ауксинового сигналинга в тканях опухоли в отличие от нормальной ткани корня.

Также среди этого списка генов был обнаружен еще пока слабо охарактеризованный ген AT5G59305 *CLAVATA 3/ESR 46* (CLE)-подобного белка (*CLE46*), который согласно некоторым данным не влияет на развитие КАМ. Но на редисе уже получены данные о взаимодействии CLE-пептидов и цитокининов, которое может иметь значение для индукции опухоли [Додуева, Лутова, 2011]. Поэтому этот ген может являться вероятным кандидатом-участником регуляции опухолеобразования и нуждается в дальнейшем изучении.

Также среди генов, повышающих экспрессию в опухолях и участвующих в ответе на ауксин, был обнаружен ген *TPST1*, который кодирует тирозилпротеин сульфотрансферазу (TPST), трансмембранный белок. *TPST1* обычно экспрессируется по всему растению, а наивысшие уровни экспрессии находятся в корневой апикальной меристеме. TPST действует в ауксиновом пути для поддержания постэмбриональной ниши стволовых клеток корня. Мутант с потерей функциональности *TPST1* имел фенотип карлика, сопровождающийся чахлыми корнями, бледно-зелеными листьями, ранним старением и уменьшенным количеством цветов [Zhou et al., 2010; Komori, 2009].

Интересна также повышенная экспрессия в опухолях гена *PINI*, вовлеченного в полярный транспорт ауксина, развитие побега и корня, формирования проводящих пучков, так как ранние стадии развития спонтанных опухолей (и корончатого галла) включают в себя формирование максимумов концентрации ауксинов [Lebedeva et al., 2015]. Ген же *AGL14*, ТФ с MADS-боксом, который контролирует транспорт ауксина посредством позитивной регуляции транскрипции *PIN* во время развития корня, напротив, снижает экспрессию в опухолях [Pařenicová et al., 2003]. При этом ген из этого же семейства AGAMOUS-LIKE – *AGL17*, участвующий в индукции цветения, имеет повышенную экспрессию в тканях опухоли. Транскрипты *AGL17* в норме присутствуют в различных органах растений с наивысшим выражением в корне. Сверхэкспрессия *AGL17* вызывает раннее цветение, в то время как потеря функции *AGL17* приводит к позднему цветению, особенно в длинные дни [Han et al., 2008]. Гены, участвующие в регуляции цветения, могут представлять интерес, так как для растений, образующих спонтанные опухоли, характерно развитие опухолей в период цветения [Бузовкина, Лутова, 2007].

В регуляции цветения также участвует *BRI1*. Это ген, кодирующий рецептор brassиностероидов, принимающий участие в автономном пути, который регулирует переход к цветению, главным образом через его влияние на уровни экспрессии *FLC*, как обнаружено с помощью двойного мутантного анализа [Noguchi et al., 1999].

Также в опухолях значимо повышена экспрессия некоторых генов циклинов и циклин-зависимых киназ: *CDKB2;2*, *CYCB1;3*, *CYCA1;1*, *CYCP3;2*, *CYCA2;3*, *CYCA3;2*, *CYCB2;4*, *CDKB2;1*, *CDKB1;2*, *CYCB2;2* и *CYCB1;1*, большинство из которых участвуют в регуляции G2 / M-перехода митотического клеточного цикла и необходимы для правильной организации апикальной меристемы побега. Ранее уже была показана роль циклинов в образовании опухолей редиса, так как повышение экспрессии этих генов может провоцировать пролиферацию клеток корня, что приведёт к образованию опухоли [Лутова, 2013].

Кроме того, в списке дифференциально экспрессированных генов представлено несколько представителей семейства генов альфа-экспансинов, для которых характерно участие в размягчении клеточной стенки растений и в одно- и многомерном клеточном росте: гены *EXPA1*, *EXPA4*, *EXPA6* и *EXPA13*. Для *EXPA1*, *EXPA4* и *EXPA6* также известно об их участии в формировании на корнях синцитий, индуцированных нематодами [Wieczorek et al., 2006], что может указывать на их участие в спонтанном опухолеобразовании.

Среди генов с пониженной экспрессией в опухоли по сравнению с нормальной тканью корня представлено множество генов, участвующих в ответе на патогенез или на другие стрессовые факторы. Ген *STZ* – транскрипционный репрессор, который участвует в ответе на солевой, фотоокислительный, холодовой стресс и на отсутствие воды [Sakamoto et al., 2004]. Ген *MYC2*, кодирующий ТФ из семейства bHLH - позитивный регулятор образования бокового корня, участвует в ответе на насекомых, на высыхание, на ранение и окислительный стресс; вовлечен также в АБК-активированный сигналинг и сигналинг жасмоната [Fernandez-Calvo et al., 2011]. *WESI* – кодирует белок ответа на ауксин из семейства GH3 - амидосинтазу, которая играет роль в реакциях стресса, модулируя эндогенные уровни активного ауксина; имеет фотоморфогенную роль в развитии гипокотилия. Его экспрессия также индуцируется салициловой кислотой, абсцизовой кислотой и ауксином, что указывает на роль *WESI* в реакции на стресс из окружающей среды. Ген *WESI* также активируется у инфицированных растений [Park et al., 2007]. *MYB2* - кодирует транскрипционный фактор, который экспрессируется на поздних стадиях развития для подавления производства цитокининов, а также индуцируется такими стрессами, как засуха и соленость. Трансгенные растения, сверхэкспрессирующие

AtMYB2, показывают фенотип раннего цветения, менее разветвляющегося побега и небольшого роста, как если бы растения были в стрессовом состоянии [Yongfeng et al., 2011]. *WRKY53* – ТФ из семейства WRKY, участвует в защитном ответе на патогены, регуляции ответа на хитин, перекись водорода, озон и салициловую кислоту, участвует в процессе старения; может действовать как транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор в зависимости от последовательностей, окружающих W-боксы (WRKY фактор-связывающие сайты); сверхэкспрессия вызывает ускоренное старение растения, а нокаут – замедленное [Xie et al., 2014]. *WRKY53* и *HSPRO2* являются положительными регуляторами базального сопротивления патогенам (как *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*). Нокаутные мутанты обоих генов являются более восприимчивыми к *P. syringae*. *WRKY53* и *HSPRO2*, по-видимому, отрицательно регулируются посредством сигналинга через жасмоновую кислоту и этилен [Murray et al., 2007]. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что в опухолевых тканях подавляется экспрессия генов, участвующих в регуляции ответа на стресс, особенно ответа на патогенов.

Также среди генов с пониженной по сравнению с корнем экспрессией в опухолях присутствуют некоторые гены, регулирующие рост корня и его тканей. Например, *JAZ7*, регулятор передачи сигнала жасмонатов, вместе с *MYC2* является положительным регулятором деления клеток камбия (эффект применения жасмонатов на активность камбия подтвердил стимулирующую роль жасмонатов во вторичном росте и предполагает, что сигнализация жасмонатов вызывает деление клеток в этой области) [Sehr et al., 2010]. *ZAT11* из семейства ТФ с C2H2 и C2HC цинковыми пальцами, активно экспрессируется в корнях, особенно в корневых кончиках, а также в семядолях и гипокотиле; представляет собой двухфункциональный регулятор транскрипции, который положительно регулирует рост первичного корня, но отрицательно регулирует толерантность к ионам никеля Ni²⁺, то есть сверхэкспрессия *ZAT11* вызывает усиленный рост корней и повышенную чувствительность к ионам никеля [Liu et al., 2015].

Среди генов, повышающих экспрессию в опухоли, также присутствует ген *WOX4*, транскрипционный фактор, участвующий в регуляции развития прокамбия и камбия. Также он является частью сигнального пути *TDIF-TDR-WOX4*, который играет решающую роль в поддержании организации сосудистой меристемы во время вторичного роста. Помимо этого известно, что его экспрессия усиливается при опухолеобразовании и ответе на цитокинины [Додуева и др., 2012; Suer et al., 2011; Ohmori et al., 2013].

Таким образом, полученные нами данные подтверждают уже имеющуюся информацию о генах, вовлеченных в формирование опухолей, и в тоже время, возможно, позволят найти новые регуляторы опухолеобразования среди полученного нами списка

генов с повышенной экспрессией. Поэтому, исходя из анализа литературных данных, нами были выбраны десять наиболее, как нам кажется, вероятных участников механизма опухолеобразования согласно их функциям: *ARR3*, *WOX4*, *CLE46*, *AGL17*, *AGL14*, *IAA7*, *BRI1*, *CYCP3;2*, *WES1* и *TPST1* для проверки при помощи RT-PCR (ПЦР в реальном времени) и сверхэкспрессии некоторых из них в корнях редиса, не образующего спонтанных опухолей.

Также списки дифференциально экспрессированных генов были проанализированы при помощи онлайн-платформы ThaleMine [URL: <https://apps.araport.org/thalemine/>] с целью поиска обогащенных генных онтологий (Gene Ontology Enrichment). Результаты представлены в таблицах 3.2, 3.3.

Gene Ontology Enrichment		
GO term	p-Value	Количество совпавших генов
Cellular component organization or biogenesis [GO:0071840]	4.371223e-6	117
Cellular component organization [GO:0016043]	1.136292e-4	102
Cell cycle [GO:0007049]	1.240809e-18	56
Cell division [GO:0051301]	2.252123e-12	37
Cell cycle process [GO:0022402]	3.716141e-10	37
DNA metabolic process [GO:0006259]	0.002263	34
Chromosome organization [GO:0051276]	0.004173	32
Mitotic cell cycle process [GO:1903047]	5.587738e-10	28

Таблица 3.2. Результаты GO enrichment анализа списка генов с повышенной экспрессией в опухоли.

Полученные результаты из таблицы 3.2 говорят нам о том, что среди дифференциально экспрессирующихся генов опухоли наиболее обогащены наборы генов, отвечающие за митотический клеточный цикл, организацию хромосом и других клеточных компонентов и метаболизм ДНК. Высокий уровень экспрессии этих генов указывает на активную пролиферацию клеток корня, что в итоге приводит к образованию опухолей.

Gene Ontology Enrichment		
GO Term	p-Value	Количество совпавших генов
Response to stimulus [GO:0050896]	4.916878e-12	357
Response to stress [GO:0006950]	6.368446e-7	213
Response to chemical [GO:0042221]	5.101284e-10	196
Response to abiotic stimulus [GO:0009628]	1.195544e-6	137
Response to organic substance [GO:0010033]	0.004805	124
Response to endogenous stimulus [GO:0009719]	0.002982	112
Response to hormone [GO:0009725]	0.048878	102
Defense response [GO:0006952]	0.043060	99

Таблица 3.3. Результаты GO enrichment анализа списка генов с повышенной экспрессией в нормальном корне по сравнению с опухолью.

Полученные результаты из таблицы 3.3 свидетельствуют о значительном преобладании в нормальном корне обогащённых групп генов, ответственных за регуляцию ответа на различные типы стресса и эндогенные и экзогенные стимулы. Следует отметить, что, несмотря на то, что образцы тканей опухоли были взяты с одного растения, то есть находились в одинаковых условиях и под воздействием одинаковых внешних стимулов, в списке генов с повышенной экспрессией в опухолях не наблюдается генов, отвечающих за положительную регуляцию защитного ответа. Исходя из этого, можно предположить наличие негативной регуляции стрессового сигналинга в тканях растущей опухоли.

3.5. Анализ обогащения функциональных групп генов

Анализ обогащения групп генов (GSEA) представляет собой вычислительный метод, который определяет, показывает ли априори определенный набор генов статистически значимые, согласующиеся различия между двумя биологическими состояниями (например, фенотипами), и позволяет выбирать из определенного списка набор генов, которые имеют неслучайное поведение в рассматриваемом эксперименте. Основным результатом анализа обогащения генов является оценка обогащения (ES), которая отражает степень, в которой набор генов представлен в верхней или нижней части ранжированного списка генов. GSEA вычисляет ES, идя вниз по ранжированному списку генов, увеличивая значение ES, когда ген находится в наборе генов и уменьшает его, когда это не так. Положительное значение ES указывает на обогащение набора генов в верхней

части ранжированного списка; отрицательное - на обогащение набора генов в нижней части ранжированного списка [Subramanian et al., 2005; Sergushichev, 2016].

В нашей работе мы использовали более точную и быструю версию метода GSEA, реализованную в пакете FGSEA [Sergushichev, 2016].

На рисунке 3.4 представлен список из 20 самых обогащённых путей с краёв ранжированного списка, полученный при помощи FGSEA. Первые десять путей имеют повышенную экспрессию в опухоли по сравнению с нормальной тканью корня, вторые десять путей имеют пониженную экспрессию в опухоли.

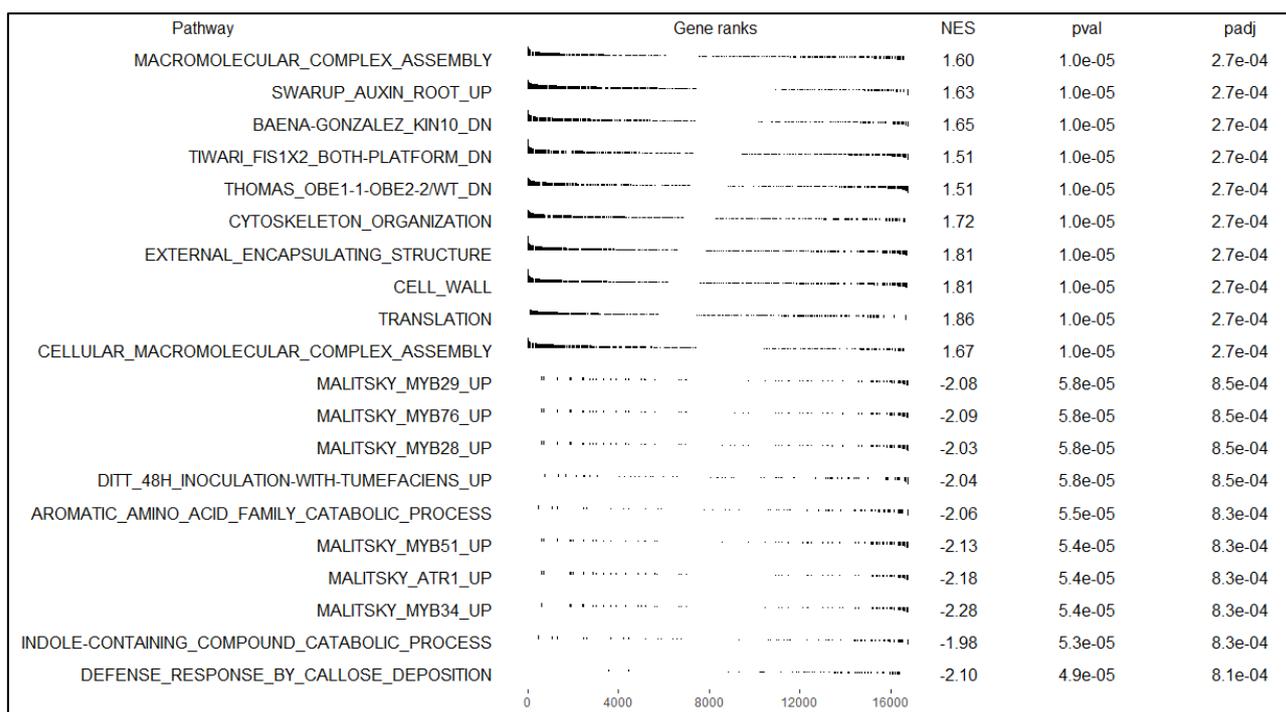


Рис. 3.4. Список из 20 наиболее обогащенных путей, полученный при помощи FGSEA.

Так, в первой половине данного списка представлено несколько путей, вовлеченных в сборку белковых комплексов, цитоскелета и клеточной стенки (пути «Macromolecule complex assembly», «Cytoskeleton organization», «External encapsulating structure», «Cell wall», «Cellular macromolecular complex assembly»), что говорит об активных процессах пролиферации, происходящих в тканях опухоли. Высокий уровень экспрессии генов контроля клеточного цикла, большинство из которых ответственны за переход клетки в митоз, и альфа-экспансинов приводит к динамичным клеточным делениям и росту клеток растяжением, за счёт чего образуется сама опухоль и наращивает свой объём. Путь «Swarup auxin root up» индуцируется ауксином во время иницирования бокового корня в тканях, окружающих сайт инициации [Swarup et al., 2008], и включает в себя транспортёры ауксина, как *LAX3* и *AUX1*, а также регуляторы ответа на ауксин, как *LRP1*.

Это подтверждает литературные данные о вероятном происхождении генетических опухолей по механизму закладки бокового корня. Путь «Thomas *obe1-1-obe2-2 wt dn*» включает в себя гены, экспрессия которых понижается у мутантов *obe1* и *2*, которые характеризуются нарушением развития корня и репрессией ауксинового сигналинга. Функции *OBE* заключается в том, что они представляют собой второй уровень регуляции в сигналинге ауксина. Данные Thomas et al. свидетельствуют о том, что этот контроль связан с каноническим сигнальным путем ауксина через *PIN*, *ARF* и *AUX / IAA*. Однако широко распространенная экспрессия *OBE1* и *OBE2*, не ограниченная пространством или временем возникновения максимумов ауксина, предполагает, что они могут обеспечить регуляторную платформу для преобразования сигналов ауксина в функциональные выходы, скорее всего, путем модификации хроматина [Thomas et al., 2009]. Так как в нашем эксперименте эти гены повышают экспрессию, это говорит об активации некоторых регуляторов сигнального ответа на ауксин в тканях опухоли.

Обогащенный набор генов «Ваена-Gonzalez *KIN10 dn*» свидетельствует о негативной регуляции гена *KIN10*, кодирующего протеин-киназу, которая участвует в защите растений и способствует выживанию в условиях стресса, темноты и сахарного дефицита [Ваена-Gonzalez et al., 2007]. По-видимому, гены, которые регулируются *KIN10*, повышают экспрессию в опухолях. Это можно объяснить тем, что *KIN10* - это детектор метаболического состояния клетки, а так как в опухолях клетки способны активно делиться, значит и располагают большим количеством ресурсов.

Среди путей из второй половины списка большинство связаны с метаболизмом триптофана и индольных соединений, которые являются предшественниками ауксина (пути «Malitsky *MYB29 UP*», «Malitsky *MYB76 UP*», «Malitsky *MYB28 up*», «Aromatic amino acid family catabolic process», «Indole containing compound catabolic process», «Malitsky *MYB51 UP*», «Malitsky *ATR1 UP*», «Malitsky *MYB34 UP*»). Представленные в этих обогащенных путях гены, такие как *MYB29*, *MYB76*, *MYB28*, *MYB51*, *ATR1* и *MYB34*, участвуют в позитивной регуляции биосинтеза ауксина [Malitsky et al., 2008]. Так как эти пути имеют пониженную экспрессию в тканях опухоли по сравнению с нормальной тканью корня, можно предположить, что в опухолях происходит негативная регуляция биосинтеза и сигналинга ауксина.

Кроме того, гены путей «Malitsky *MYB29 UP*», «Malitsky *MYB76 UP*», «Malitsky *MYB28 up*», «Malitsky *MYB51 UP*», «Malitsky *ATR1 UP*», «Malitsky *MYB34 UP*» и «Defense response by callose deposition» участвуют в позитивной регуляции механизма защиты от насекомых, бактерий и грибов, а также механизма ответа на абиотический стресс [Malitsky et al., 2008]. Обогащение этих наборов генов в нижней части списка говорит о пониженной

их экспрессии в опухолевой ткани, что, опять же, может указывать на наличие негативной регуляции сигнальных путей ответа на стрессовые факторы. Интересно также, что набор генов «Ditt 48h inoculation with tumefaciens up», кодирующий транскрипционные факторы и защитные белки *Arabidopsis*, которые синтезируются в растении в ответ на заражение патогеном *Agrobacterium tumefaciens*, тоже имеет пониженную экспрессию в опухолевой ткани [Ditt et al., 2006].

Таким образом, исходя из полученных данных анализа обогащённых групп генов, можно сделать вывод о том, что в генетических опухолях повышается уровень цитокинина (с чем связано и множество генов *ARR* в списке дифференциально экспрессируемых) и понижается уровень ауксина (о чем свидетельствуют пути негативной регуляции биосинтеза и передачи сигнала ауксина, а также повышенная экспрессия репрессора ауксинового сигналинга *IAA7*). Вероятно, также повышается уровень сахарозы из-за притока ресурсов к опухоли, исходя из обогащения пути сигналинга, в котором участвует *KIN10*. Понижение стрессового ответа, вероятно, связано с тем, что все ресурсы опухолевых клеток направлены на синтез различных макромолекулярных комплексов и клеточных органелл, в связи с очень активной клеточной пролиферацией, поэтому ответ на стресс подавлен.

3.6. Сравнение результатов анализа транскриптома генетических и агробактериальных опухолей редиса

Ранее коллегами из нашей лаборатории был проведен транскриптомный анализ опухолей редиса, вызванных патогеном *Agrobacterium tumefaciens*.

Также как и в генетических опухолях, в агробактериальных наблюдалось обогащение путей, ответственных за организацию клеточной стенки («Cell wall organization», «External encapsulating structure organization»), трансляцию («Translation»), индукцию ауксина во время формирования боковых корней («Swarup auxin root up»). Кроме того, в спонтанной опухоли наблюдается повышенная экспрессия набора генов «Baena-Gonzalez *KIN10* dn», отвечающих за негативную регуляцию киназы *KIN10*, а в агробактериальной - пониженная экспрессия пути «Baena-Gonzalez *KIN10* UP», отвечающего за позитивную регуляцию киназы *KIN10*, что говорит о повышенной экспрессии *KIN10* в обоих типах опухолей.

Однако в отличие от генетических опухолей, в индуцированных агробактерией, наблюдается повышенная экспрессия наборов генов, регулирующих ответ на стресс и внешние стимулы («Response to abiotic stimulus», «Response to oxidative stress», «Yoh DREB2A drought and heat stress response up»), но не на защитный ответ на патогена, что

может быть связано с тем, что агробактерии и многие другие фитопатогены умеют подавлять ответ растения на свое присутствие [Gohlke & Deeken, 2014].

Среди дифференциально экспрессирующихся генов с повышенной экспрессией в агробактериальных опухолях присутствуют некоторые группы генов, которые были обнаружены нами и в генетических опухолях: негативные регуляторы ответа на цитокинин (*ARR4*, *ARR7*) и экспансины (*EXPA1*, *EXPA15*, *EXPB3*).

При этом регуляторы ответа на жасмонаты (как *JAZ7*), гены из семейств MYB и WRKY (*MYB2* и *WRKY53*), участвующие в регуляции ответа на различные типы стресса, имеют пониженную экспрессию в спонтанной опухоли, тогда как в агробактериальной их (*JAZ1*, *JAZ5*, *MYB95*, *MYB74*, *MYBRI*, *WRKY48*, *WRKY46*) экспрессия повышена.

Таким образом, генетические и агробактериальные опухоли имеют некоторые общие механизмы закладки и развития опухоли, связанные с общностью процессов, происходящих при росте агробактериальных и естественных опухолей. В обоих случаях происходит изменение баланса цитокинина и ауксина, которое вызывает активное деление клеток, что и способствует образованию опухолей.

3.7. Результат проверки экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени

Результаты проведения ПЦР в реальном времени для проверки данных секвенирования РНК и экспрессии генов и представлены на рисунках 3.5 и 3.6. Эксперимент проводился в двух биологических повторностях, для каждого из которых было сделано по 3 технических.

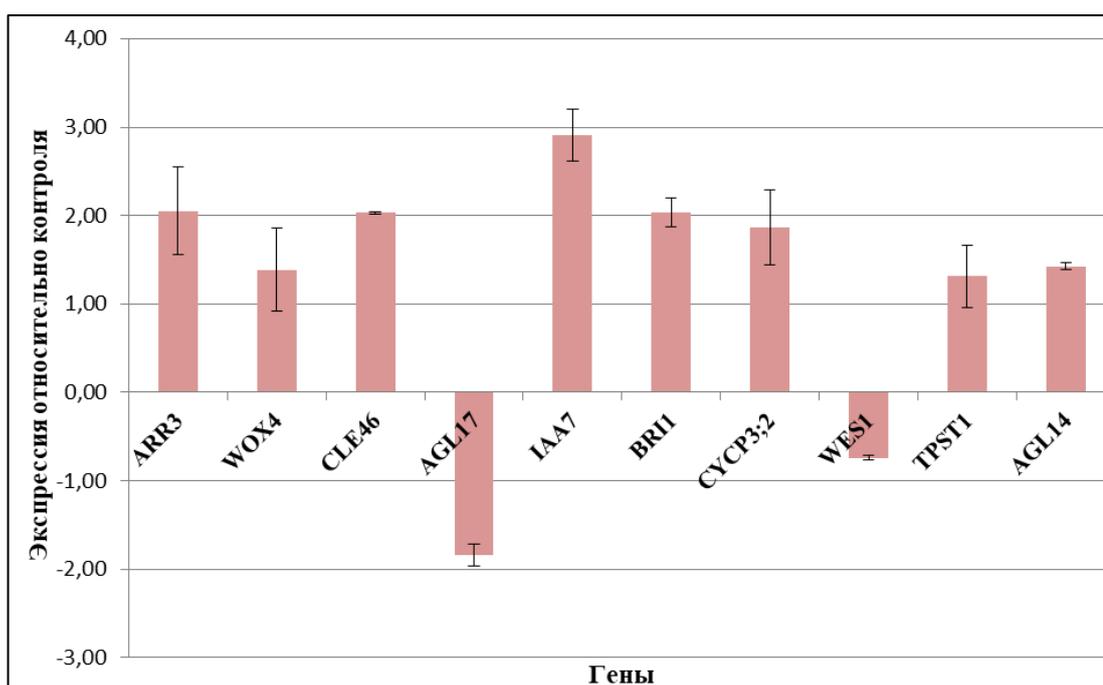


Рис. 3.5. Экспрессия генов в опухоли по сравнению с нормальной тканью корня относительно контроля – гена *UBC* (ось Y – $\log(2^{(-\Delta\Delta Ct)})$).

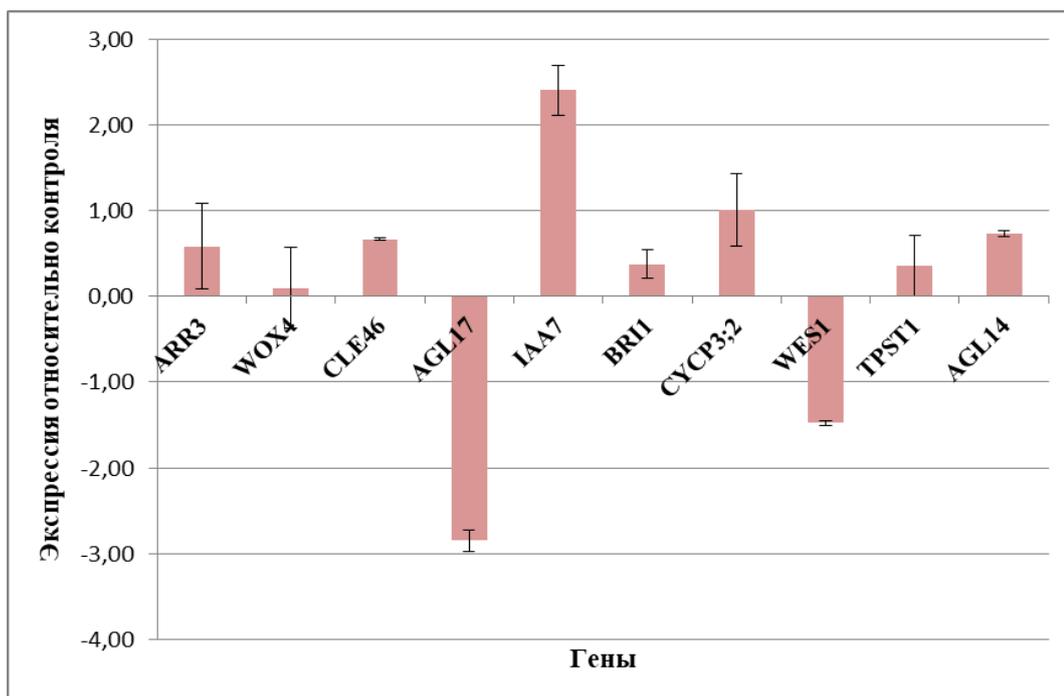


Рис. 3.6. Экспрессия генов в опухоли по сравнению с нормальной тканью корня относительно контроля – гена *TUB4* (ось Y – $\log(2^{(-\Delta\Delta Ct)})$).

Исходя из полученных графиков, можно сказать, что эти результаты почти полностью подтверждают данные транскриптомного анализа. Экспрессия генов *ARR3*, *BRI1*, *CLE46*, *CYCP3;2*, *IAA7*, *TPST1* и *WOXA* повышена по сравнению с контролем (*UBC* и *TUB4*), и эти гены представлены в списке дифференциально экспрессирующихся генов с повышенной экспрессией в опухолях. А экспрессия генов *WES1* и *AGL17* снижена, что также подтверждает данные подсчёта дифференциальные экспрессии, согласно которым, экспрессия этих генов понижена в опухолях по сравнению с нормальным корнем. Однако ген *AGL14* по неизвестным причинам имеет повышенную экспрессию в опухоли согласно результатам ПЦР в реальном времени, тогда как согласно биоинформатическому анализу она должна быть понижена.

3.8. Создание векторов экспрессии и трансформация *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes*

Мы предположили, что гены, для которых была обнаружена повышенная экспрессия в опухоли, могут являться регуляторами и участниками процесса образования генетических опухолей. Наиболее вероятными кандидатами на роль таких участников опухолеобразования из списка дифференциально экспрессирующихся генов нам

показались два гена – *RsAGL17* и *RsCLE46*. Ген *RsAGL17* был выбран, так как он участвует в регуляции начала цветения и имеет повышенную экспрессию в опухолях согласно нашим результатам, а для линий редиса со спонтанным опухолеобразованием характерна закладка опухолей именно во время периода цветения. Ген *CLE46* был выбран, так как на данный момент о нем нет никаких литературных данных, но для некоторых *CLE*-генов уже было показано участие в спонтанном опухолеобразовании, и его экспрессия также повышена в тканях опухоли.

Чтобы проверить эту гипотезу мы решили получить композитные растения редиса со сверхэкспрессией этих генов в корнях редиса, в норме не образующего спонтанных опухолей. Для проведения трансформации редиса было создано два вектора сверхэкспрессии гена *CLE46* - pK7WG2D и pH2GW7 (рис. 3.7). Проверка вектора pH2GW7 дала неоднозначные результаты, после чего от него было решено отказаться, так как вектора для сверхэкспрессии pK7WG2D (рис. 3.8.), успешно собранного и использованного для трансформации *E.coli* и *Agrobacterium rhizogenes* (рис. 3.9), было достаточно.

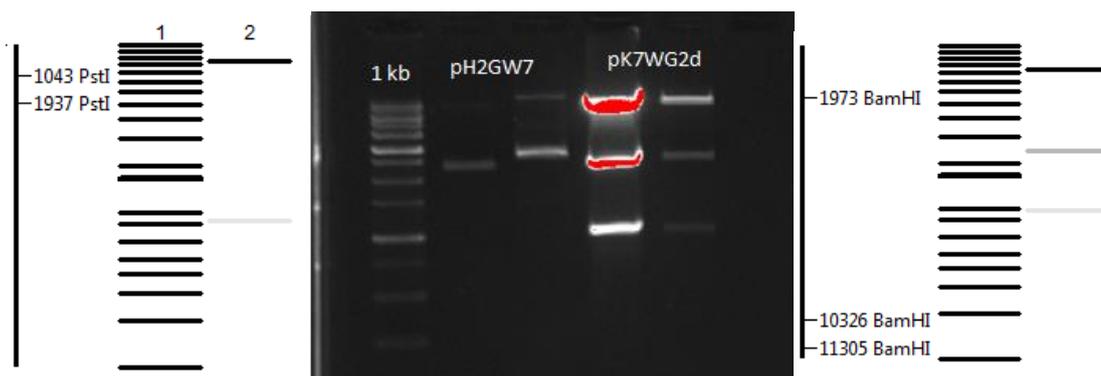


Рис. 3.7. Результат проверки рестрикцией сборки векторов pK7WG2D *RsCLE46* и pH2GW7 *RsCLE46* и трансформации ими *E.coli* (рестриктазы BamHI и PstI соответственно).

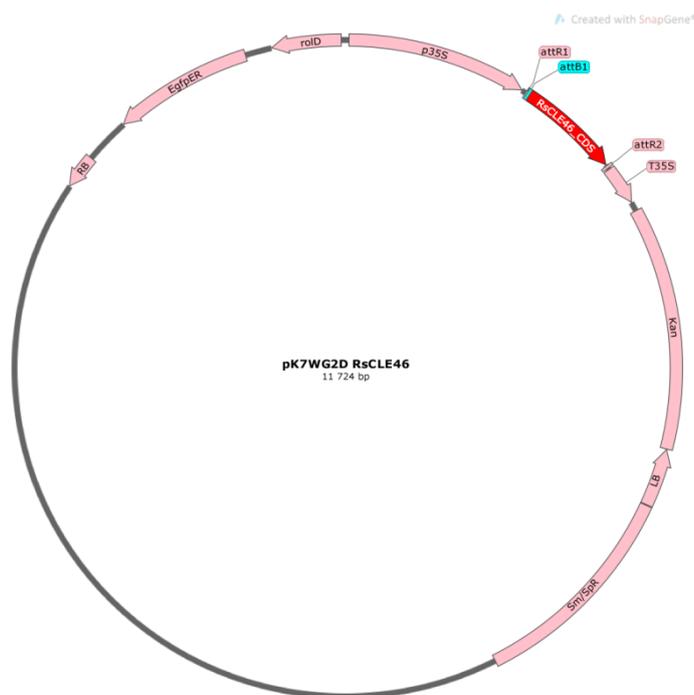


Рис. 3.8. Карта вектора pK7WG2D, содержащего последовательность гена *CLE46*.

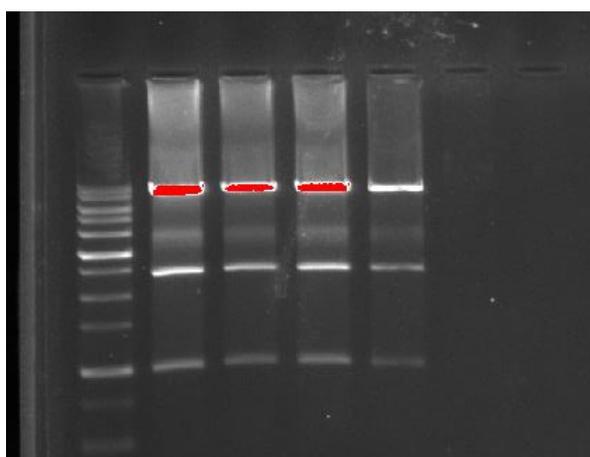


Рис. 3.9. Результат проверки рестрикции трансформации вектором pK7WG2D *RsCLE46* бактерий *Agrobacterium rhizogenes* (слева направо: маркер 1kb Ladder, четыре повторности рестрикции pK7WG2D *RsCLE46*; рестриктаза - *VamHI*).

Однако клонировать ген *RsAGL17*, чтобы сконструировать вектор для сверхэкспрессии этого гена нам так и не удалось.

Для трансформации растений в качестве контроля был использован вектор для сверхэкспрессии pB7WG2D, содержащий промотор и кодирующую последовательность гена β-глюкуронидазы *E. coli* (*GUS*) (рис. 3.10) [Karimi et al., 2002]. Плазмида pB7WG2D *GUS*, выделенная из протрансформированных *Agrobacterium rhizogenes*, также была проверена рестрикцией (рис. 3.11).

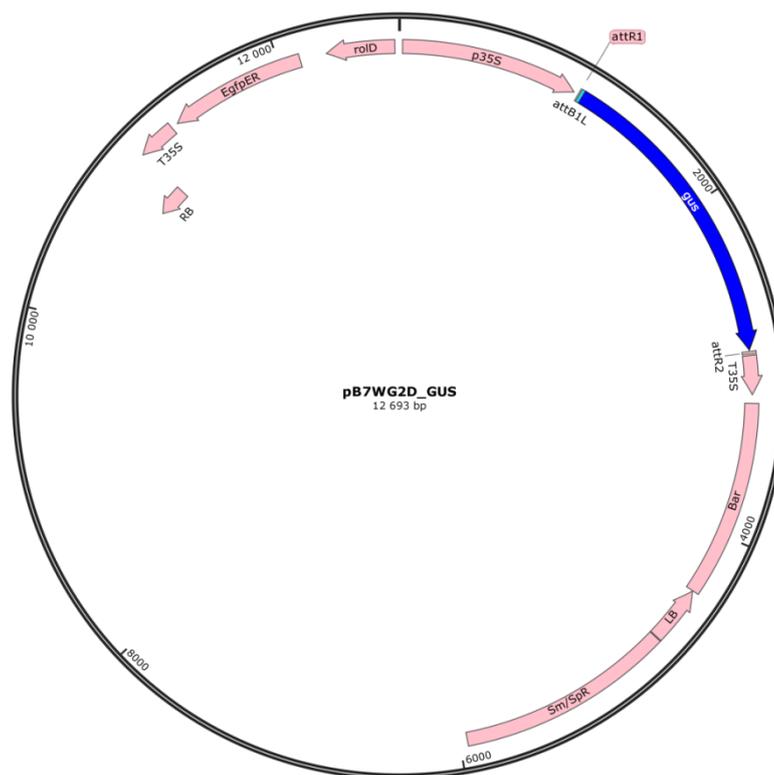


Рис. 3.10. Карта вектора pB7WG2D, содержащего последовательность гена *GUS*.

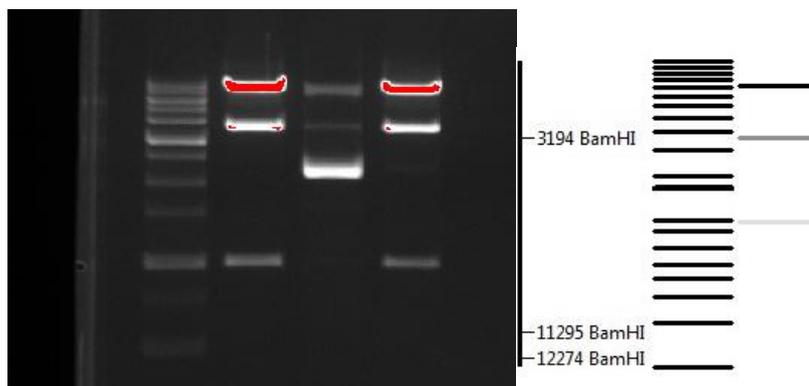


Рис. 3.11. Результаты рестрикции pB7WG2D *GUS* ферментом BamHI (слева направо: 1 kb Ladder, три повторности рестрикции pB7WG2D *GUS*).

3.9. Получение растительного материала и растений-трансформантов

Для трансформации вектором pK7WG2D *RsCLE46* было посажено 21 семя редиса 28 линии, не образующей спонтанных опухолей. В результате было получено и трансформировано 11 проростков. Для трансформации вектором pB7WG2D *GUS* было посажено 27 семян редиса 28 линии. Все 11 трансформированных вектором pK7WG2D *RsCLE46* проростков были пересажены в горшки с вермикулитом (рис.3.12), но к настоящему моменту еще не перешли к стадии цветения, поэтому о влиянии

сверхэкспрессии *RsCLE46* на корнеобразование мы пока сказать не можем, но результаты будут получены в процессе дальнейшей работы.



Рис. 3.12. Проросток трансформированного редиса

4. ВЫВОДЫ

1. Было проведено секвенирование РНК тканей генетической опухоли редиса *Raphanus sativus* и нормального корня. Всего было получено 285 миллионов 2x101 п.н. прочтений. Из полученных прочтений был собран транскриптом генетических опухолей редиса при помощи программного пакета Trinity. Всего было получено 79196 транскриптов, из них 48670 было идентифицировано как протеин-кодирующие. Из 79196 транскриптов удалось аннотировать 50684, которые соответствовали 32115 генам.

2. В результате анализа полученного транскриптома были обнаружены гены, уровень экспрессии которых отличается у генетических опухолей и нормального корня редиса. Среди этих генов можно выделить следующие группы: компоненты сигнальных путей ауксина (*IAA7*, *TPST1*, *PIN1*, *AGL14*) и цитокинина (*ARR3*, *ARR4*, *ARR5*, *ARR11*, *ARR15*, *LOG1*, *LOG8*), регуляторы клеточного цикла (*CDKB2;2*, *CYCB1;3*, *CYCA1;1*, *CYCP3;2*, *CYCA2;3*, *CYCA3;2*, *CYCB2;4*, *CDKB2;1*, *CDKB1;2*, *CYCB2;2* и *CYCB1;1*), развития меристем (CLE-пептиды, *ZAT11*, *JAZ7*, *WOX4*), цветения (*AGL17*, *BRI1*), роста клетки растяжением (*EXPA1*, *EXPA4*, *EXPA6* и *EXPA13*), ответа на различные типа стресса (*STZ*, *MYC2*, *WES1*, *WRKY53*). Также в тканях опухоли активируются метаболические пути, участвующие в делении и росте клеток, негативной регуляции синтеза и передачи сигнала ауксина, и подавляется ответ на стресс.

3. Согласно ПЦР в реальном времени, экспрессия генов *ARR3*, *BRI1*, *CLE46*, *CYCP3;2*, *IAA7*, *TPST1* и *WOX4* повышается в тканях опухоли, а экспрессия генов *WES1* и *AGL17* понижается, что согласуется с данными транскриптомного анализа.

4. Были получены композитные растения редиса линии №28 (не образующей в норме генетических опухолей) с трансформированными корнями, содержащими вектор сверхэкспрессии pK7WG2D *RsCLE46*.

5. В генетических опухолях, как и в агробактериальных, наблюдалось обогащение путей, ответственных за организацию клеточной стенки, трансляцию, индукцию боковых корней через ауксиновый сигналинг, а также повышение экспрессии генов-регуляторов ответа на цитокинин и экспансинов, что говорит о сходстве процессов, происходящих при образовании и росте агробактериальных и генетических опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed N. U., Park J. I., Kim H. R., Nou I. S. Progress in Genetic Manipulation of the *Brassicaceae* // Journal of Plant Biotechnology. 2012. V. 39. №. 1. P. 1-12.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W. Basic local alignment search tool // J Mol Biol. 1990. V.215. P. 403-10.
3. Azarakhsh M., Kirienko A. N., Zhukov V. A., Lebedeva M. A., Dolgikh E. A., Lutova, L. A. *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN 3*: a new regulator of symbiotic nodule development // Journal of experimental botany. 2015. V. 66. №22. P. 7181-7195.
4. Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // Nature. 2007. V. 448. № 7156. P. 938.
5. Bäurle I., Laux T. Apical meristems: the plant's fountain of youth // Bioessays. 2003. V. 25. №10. P. 961-970.
6. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. T. 30. № 15. C. 2114–2120.
7. Bray N.L, Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // Nature Biotechnology. 2016. №34. P. 525–527.
8. Chalupowicz L., Barash I., Panijel M., Sessa G., & Manulis-Sasson S. Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* // Molecular plant-microbe interactions. 2009. V. 22. №. 7. P. 849-856.
9. Cho Time-Course Won Kyong, Lian Sen et al. RNA-Seq Analysis Reveals Transcriptional Changes in Rice Plants Triggered by Rice stripe virus Infection // PLOS ONE. 2015.
10. Chung K. R., Tzeng D. D. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta* // J Biol Sci. 2004. V.4. №. 6. P. 744-750.
11. Couzigou J. M., Zhukov V., Mondy S., Heb G. A., Cosson V., Ellis T. N et al. NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* BLADE-ON-PETIOLE genes // The Plant Cell. 2012. V. 24. №11. P. 4498-4510.
12. Davidson N. M., Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes // Genome biology. 2014. V.15. №. 7. P. 410.
13. Ditt, R. F., Kerr, K. F., de Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., & Nester, E. W. The *Arabidopsis thaliana* Transcriptome in Response to *Agrobacterium tumefaciens* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2006. V.19, N6, P. 665–681.

14. Eckardt N. A. A genomic analysis of tumor development and source-sink relationships in *Agrobacterium*-induced crown gall disease in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2006. V.18. P. 3350-3352.
15. Efroni Idan, Birnbaum Kenneth D. The potential of single-cell profiling in plants // *Genome Biology*, 2016.
16. Fernandez-Calvo P., Chini A., Fernandez-Barbero G. et al. The *Arabidopsis* bHLH Transcription Factors *MYC3* and *MYC4* Are Targets of *JAZ* Repressors and Act Additively with *MYC2* in the Activation of Jasmonate Responses // *The Plant Cell*, 2011, V.23, P. 701–715.
17. Galambos A., Zok A., Kuczmog A., Olah R., Putnoky P., Ream W., Szegedi E. Silencing *Agrobacterium* oncogenes in transgenic grapevine results in strain-specific crown gall resistance // *Plant Cell Rep*, 2013, V. 32, №11, p. 1751–1757.
18. Gao J., Yang X., Zhao W., Lang T., Samuelsson T. Evolution, diversification, and expression of *KNOX* proteins in plants // *Frontiers in plant science*. 2015. V.6. P. 882.
19. Garg Rohini and Jain Mukesh. RNA-Seq for Transcriptome Analysis in Non-model Plants // *Legume Genomics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 2013, V. 1069, P. 43-58.
20. Gohlke J., Deeken R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development // *Frontiers in plant science*. 2014. V. 5. P. 155.
21. Gong Lei, Zhang Hongxia, Gan Xiaoyan, Zhang Li, Chen Yuchao, Nie Fengjie, Shi Lei, Li Miao et al. Transcriptome Profiling of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions // *PLOS ONE*. 2015.
22. Grabherr M.G. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. // *Nat. Biotechnol*. 2011. T. 29. № 7. C. 644–52.
23. Haas Brian J., Alexie Papanicolaou, Yassour Moran. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity // *Nature Protocols*. 2008. V.8, P 1494–1512.
24. Han P, García-Ponce B, Fonseca-Salazar G, Alvarez-Buylla ER, Yu H. *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway // *Plant J*. 2008. V.55. №2.
25. Hao Da-Cheng, Chen Shi-Lin, Xiao Pei-Gen, Liu Ming. Application of high-throughput sequencing in medicinal plant transcriptome studies // *Drug development research*. 2012. P. 487–498.

26. Hao Yingbin, Wang Ting, Wang Kang et al. Transcriptome Analysis Provides Insights into the Mechanisms Underlying Wheat Plant Resistance to Stripe Rust at the Adult Plant Stage // PLOS ONE. 2016.
27. Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novák O., Galuszka P., Tudzynski P. *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Clavicepspurpurea* // Environ. Microbiol. 2015. V.17. N8. P. 2935-2951.
28. Imamura A., Kiba T., Tajima Y., Yamashino T., Mizuno T. In Vivo and In Vitro Characterization of the *ARR11* Response Regulator Implicated in the His-to-Asp Phosphorelay Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana* // Plant and Cell Physiology, 2003, V.44, №2, P. 122–131.
29. Intrieri M. C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* //Molecular Phylogenetics and evolution. 2001. V.20. №1. P. 100-110.
30. Karimi M., Inzé D., Depicker A. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation // Trends in plant science. 2002. V. 7. №. 5. P. 193-195.
31. Kim D., Langmead B., Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements // Nature Methods. 2015. V.12, P. 357–360.
32. Kim G., LeBlanc M.L., Wafula E.K., dePamphilis C.W., Westwood J.H. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts // Science. 2012. P. 808 – 811.
33. Komori R., Amano Y., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis* // Proc Natl Acad Sci. 2009. V. 106. №35. P. 15067–15072.
34. Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N. et al. Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis* // The Plant Cell, 2009, V.21, P.3152–3169.
35. Lebedeva M. A., Tvorogova V. E., Vinogradova A. P., Gancheva M. S., Azarakhsh M. et al. Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus sativus*): Cellular, molecular and physiological events //Journal of plant physiology. 2015. V.173. P. 97-104.
36. Li H., Hagen G., Guilfoyle T. J. Do some IAA proteins have two repression domains? // Plant Signal Behav. 2011.V.6. №6. P. 858–860.
37. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. V.25. №16. P. 2078-2079.

38. Liu D., Sui S., Ma J., Li Z., Guo Y., Luo D., Yang J., Li M. Transcriptomic Analysis of Flower Development in Wintersweet (*Chimonanthus praecox*) // PLOS ONE. 2014. V. 9. №1.
39. Liu XM, An J, Han HJ, Kim SH, Lim CO, Yun DJ, Chung WS ZAT11, a zinc finger transcription factor, is a negative regulator of nickel ion tolerance in *Arabidopsis* // Plant Cell Rep., 2014, V.33, №12, P. 2015-2021.
40. Luo H. et al. Co-localization of major quantitative trait loci for pod size and weight to a 3.7 cM interval on chromosome A05 in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) // BMC genomics. 2017. V.18. №1. 15 p.
41. Malitsky S., Blum E., Less H., Venger I., Elbaz M., Morin S., Eshed Y., Aharoni A. The Transcript and Metabolite Networks Affected by the Two Clades of *Arabidopsis* Glucosinolate Biosynthesis Regulators // Plant Physiol. 2008. V.148. N4. P. 2021–2049.
42. Mironova V.V., Weinholdt C., and Grosse I. RNA-Seq Data Analysis for Studying Abiotic Stress in Horticultural Plants Abiotic Stress // Biology in Horticultural Plants. Springer Japan. 2015. P. 197-220.
43. Mujib A., Ali M., Isah T. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) –A comparative study // Saudi journal of biological sciences. 2014. V. 21. №5. P. 442-449.
44. Murray S.L., Ingle R.A., Petersen L. N., Denby K.J. Basal Resistance Against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* Involves WRKY53 and a Protein with Homology to a Nematode Resistance Protein // Mol Plant Microbe Interact, 2007, V.20, №11, P. 1431-1438.
45. Nagano Atsushi J., Honjo Mie N., Mihara Motohiro, Sato Masanao, Kudoh Hiroshi. Detection of Plant Viruses in Natural Environments by Using RNA-Seq // Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology. 2015. V. 1236.
46. Noguchi Takahiro, Fujioka Shozo, Choe Sunghwa et al. Brassinosteroid-Insensitive Dwarf Mutants of *Arabidopsis* Accumulate Brassinosteroids // Plant Physiol. 1999. V. 121. №3. P. 743–752.
47. Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., Hirano, H. Y. *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* Is Involved in Meristem Maintenance and Is Negatively Regulated by the *CLE* Gene FCP1 in Rice // THE PLANT CELL. 2013. V.25. I.1. P. 229-41.
48. Osipova M.A., Tvorogova V.E., Vinogradova A.P., Gancheva M.S., Azarakhsh M., Ilina E.L., Demchenko K.N., Dodueva I.E., Lutova L.A., Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus sativus*): cellular, molecular and physiological events // Journal of Plant Physiology, 2014, 31 p.

49. Pařenicov L., de Folter S., Kieffer M. et al. Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*, 2003, V.15, P. 1538–1551.
50. Park J., Seo P.J., Lee A.K., Jung J.H., Kim Y., Park C. An *Arabidopsis* *GH3* Gene, Encoding an Auxin-Conjugating Enzyme, Mediates Phytochrome B-Regulated Light Signals in Hypocotyl Growth // *Plant and Cell Physiology*, 2007, V.48, №8, P.1236–1241.
51. Pertea M., Kim D., Pertea G.M., Leek J.T., Salzberg S.L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown // *Nature Protocols*, 2016, V.11, P.1650-1667.
52. Pimentel H., Bray N.L., Puente S., Melsted P., Pachter L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty // *Nature Methods*. 2017. №14. P. 687–690.
53. Rao Xiayu, Huang Xuelin, Zhou Zhicheng and Lin Xin An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013. V. 3. P. 71–85.
54. Robertson G. et al. 2010. De novo assembly and analysis of RNA-seq data // *Nature Methods*. 2010. №7. P. 909-912.
55. Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions // *Plant Physiol.*, 2004, V.136, P. 2734-2746.
56. Sehr E.M., Agusti J., Lehner R., Farmer E.E., Schwarz M., Greb T. Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation // *Plant J.*, 2010, V.63, №5, P. 811–822.
57. Sergushichev A. An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation // *bioRxiv*. 2016.
58. Shi Xiuling, Gupta Sarika, Lindquist Ingrid E., Cameron Connor T., Mudge Joann, Rashotte Aaron M. Transcriptome Analysis of Cytokinin Response in Tomato Leaves // *PLOS ONE*. 2013.V. 8. №1.
59. Simão F.A, Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs // *Bioinformatics*, 2015.
60. Smith-Unna R.D., Bournnell C., Patro R., Hibberd J.M., Kelly S. TransRate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies // *Genome Res*. 2016. V.26. P. 1134-1144.

61. Soltis P.S, Marchant D. B., de Peer Y. V., Soltis D.E. Polyploidy and genome evolution in plants // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2015. Vol. 35 P. 119–125.
62. Stone James D., Storchova Helena. The application of RNA-seq to the comprehensive analysis of plant mitochondrial transcriptomes // *Mol Genet Genomics*, 2014.
63. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A, Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *PNAS*. 2005. V.102. N43. P. 15545-15550.
64. Suer, S., Agusti, J., Sanchez, P., Schwarz, M., Greb, T. *WOX4* Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in *Arabidopsis* // *THE PLANT CELL*. 2011.
65. Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B. et al. The auxin influx carrier *LAX3* promotes lateral root emergence // *Nature cell biology*. 2008. V.10. N8. P. 946-954.
66. Thomas C.L., Schmidt D., Bayer E.M., Dreos R., Maule A.J. *Arabidopsis* plant homeodomain finger proteins operate downstream of auxin accumulation in specifying the vasculature and primary root meristem // *Plant J*. 2009. V.59. N3. P. 426-436.
67. Tian X-j, Long Y, Wang J, Zhang J-w, Wang Y-y, Li W-m, et al. De novo Transcriptome Assembly of Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and Discovery of Drought-Response Genes in Root Tissue Based on Transcriptomic Data // *PLOS ONE*. 2015. V.10. №7.
68. Tvorogova V.E., Osipova M.A., Lutova L.A. Interactions between KNOX and WOX genes and phytohormones in radish inbred lines with spontaneous tumorigenesis // 18th FESPB Congress, Freiburg, Germany, 2012. P. 622.
69. Vieira P., Engler G., de Almeida Engler J. Enhanced levels of plant cell cycle inhibitors hamper root-knot nematode-induced feeding site development // *Plant signaling & behavior*. 2013. V. 8. №. 12. 4 p.
70. Wang J., Replogle A., Hussey R., Baum T., Wang X., Davis E.L., Mitchum M.G. Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. // *Mol. Plant Pathol*. 2011. V.12. N2. P. 177-186.
71. Weber A.M. Discovering New Biology through Sequencing of RNA // *Plant Physiology*. 2015. Vol. 169. P. 1524 – 1531.
72. Wen J, Xiong Z, Nie Z-L, Mao L, Zhu Y, et al. Transcriptome Sequences Resolve Deep Relationships of the Grape Family // *PLOS ONE*. 2013. V8. №9.
73. Wendel J.F., Jackson S.A., Meyers B.C., Wing R.A. Evolution of plant genome architecture // *Genome Biology*. 2016. Vol. 17. 14 p.

74. Wieczorek K., Golecki B., Gerdes L., Heinen P., Szakasits D., Durachko D.M., Cosgrove D.J., Kreil D.P., Puzio P.S., Bohlmann H, Grundler F.M. Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.*, 2006, V.48, P. 98-112.
75. Williams Alexander G., Thomas Sean, Wyman Stacia K., Holloway Alisha K. RNA-seq Data: Challenges in and Recommendations for Experimental Design and Analysis // *Curr Protoc Hum Genet.* 2015. V. 83.
76. Xie Y., Huhn K., Brandt R. et al. REVOLUTA and WRKY53 connect early and late leaf development in *Arabidopsis* // *Development*, 2014, V.141, №24, P. 4772–4783.
77. Yongfeng G., Susheng G. AtMYB2 Regulates Whole Plant Senescence by Inhibiting Cytokinin-Mediated Branching at Late Stages of Development in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*, 2011, V.156, P.1612–1619.
78. Zhou W., Wei L., Xu J., Zhai Q., Jiang H., Chen R., Chen Q., Sun, J., Chu, J., Zhu L., Liu C. M., Li C. Arabidopsis Tyrosylprotein Sulfotransferase Acts in the Auxin/PLETHORA Pathway in Regulating Postembryonic Maintenance of the Root Stem Cell Niche // *Plant Cell.* 2010. V. 22. №11.
79. Акимова Г. П., Соколова М. Г. Содержание цитокининов на начальных этапах бобово-ризобиального симбиоза и влияние гипотермии // *Физиология растений*, 2012, Т.59, № 5, С. 694–700.
80. Бузовкина И.С., Лутова Л.А. Генетическая коллекция инбредных линий редиса: история и перспективы // *Генетика*, 2007, Т.43, №10, С. 1411–1423.
81. Виноградова А.П., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Меристематические характеристики опухолей, индуцированных *Agrobacterium tumefaciens* у гороха // *Генетика*. 2015. Т. 51. №1. С. 54-62.
82. Владимиров И.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Гены биосинтеза и катаболизма опинов *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* // *Генетика*, 2015, Т. 51, № 2, С. 121-129.
83. Додуева И. Е., Ганчева М. С., Осипова М. А., Творогова В. Е., Лутова Л. А. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // *Физиология растений*, 2014, Т. 61, № 5, С. 611–631.
84. Додуева И. Е., Юрлова Е. В., Осипова М. А., Лутова Л. А. CLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // *Физиология растений*. 2012. Т.59. № 1. С. 17–31.
85. Додуева И., Лутова Л. Опухоли высших растений: проблема системного контроля пролиферации клеток // Saarbrücken: LAP Lambert Acad. Publ. 2011. 136 с.

86. Додуева И.Е., Творогова В.Е., Азарахш М., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Стволовые клетки растений: единство и многообразие // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т.20. №4. С. 441-458.
87. Додуева И.Е., Фролова Н.В., Власенко М.А., Монахова В.А., Лутова Л.А. Трансформация инбредных линий редиса (*Raphanus sativus L.*) генами Т-ДНК агробактерий: изменение опухолевого фенотипа и реакции на фитогормоны у трансгенных растений // Вестник биотехнологии, 2005, Т.1, № 2, С. 22-29.
88. Жуков В.А., Кулаева О.А., Жернаков А.И., Тихонович И.А. Секвенирование следующего поколения для изучения транскриптомных профилей тканей и органов гороха посевного (*Pisum sativum L.*) // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. №3. С. 278 – 287.
89. Зубов Д.А. Стволовые клетки растений и животных: две стороны одной медали. Часть 2 // Гены и клетки, 2016, Т.10, № 4, С. 6-17.
90. Лутова Л. А., Долгих Е. А., Додуева И. Е., Осипова М. А., Ильина Е. Л. Изучение системного контроля деления и дифференцировки клеток растений на примере опухолевого роста у редиса // Генетика, 2008, Т. 44, №8, С. 1075 – 1083.
91. Лутова Л.А, Додуева И.Е. Роль меристемоспецифичных генов растений в формировании генетических опухолей // Онтогенез. 2007. Т.38. № 6. С. 420-433.
92. Лутова Л.А. Современные аспекты генетики развития растений // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013, Т.17, № 4/2, С. 1003-1016.
93. Новикова С.Е., Згода В.Г. Транскриптомика и протеомика в исследованиях индуцированной дифференцировки лейкозных клеток // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. №5. С. 529 – 544.
94. Орлов Ю.Л. Компьютерное исследование регуляции транскрипции генов эукариот с помощью данных экспериментов секвенирования и иммунопреципитации хроматина // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т.18. № 1. С. 193 – 206.
95. Осипова М. А., Долгих Е. А., Лутова Л. А. Особенности экспрессии меристем специфичного гена *WOX5* при органогенезе клубеньков бобовых растений // Онтогенез, 2011, Т.42, № 4, С. 264–275.
96. 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, №4, С. 3-9.
97. Петров Ю. П. Взаимосвязь роста каллуса и числа клубеньков у гороха посевного *Pisum sativum* // Цитология, 2012, Т.54, №12, С. 925-932.

98. Хатефов Э.Б., Щербак В.С. Роль полиплоидии в селекции сельскохозяйственных культур // Селекция зерновых культур. 2011. № 2. С. 15 – 16.