

УДК 581.1

ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ У ДВУХ ФОРМ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

© 2021 г. Ю. Л. Мощенская^а, Н. А. Галибина^а, *, Т. В. Тарелкина^а,
К. М. Никерова^а, О. В. Чирва^а, Л. Л. Новицкая^а

^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: galibina@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 28.07.2020 г.

После доработки 06.08.2020 г.

Принята к публикации 06.08.2020 г.

Изучили пригодность пяти генов — *GAPDH1*, *Actin1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*, *18SpPНК* для нормирования данных экспрессии целевых генов методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. С целью обнаружения стабильно экспрессирующихся референсных генов использовали листья и ткани ствола у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Стабильность экспрессии потенциальных референсных генов оценивали с помощью двух пакетов программ NormFinder и BestKeeper. С использованием как стабильно, так и менее стабильно экспрессирующихся референсных генов сравнили экспрессию гена, кодирующего инвертазу клеточной стенки в тканях ствола деревьев *Betula pendula* Roth в период активного камбиального роста. Показано, что лучшие результаты получают при использовании комбинация двух генов *GAPDH1* и *Ef1a(1)*.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth, количественный анализ экспрессии, 18S рНК, актин, фактор элонгации 1а, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

DOI: 10.31857/S0015330321020111

ВВЕДЕНИЕ

Береза повислая (*Betula pendula* Roth), как пионерная порода бореальных лесов Евразии, представляет собой важный источник древесного сырья в Северной Европе [1]. Ценность березы — в ее незаменимости для производства натуральных отделочных материалов (фанера), технологичности производства из нее целлюлозы и гораздо большей, чем у сосны и ели, скорости наращивания древесной массы. Помимо практической значимости, данный вид представляет собой уникальный объект для познания механизмов ксилогенеза и флоэмогенеза, поскольку включает формы, существенно отличающиеся по текстуре древесины. У обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) образуется типичная для вида прямо-слоистая древесина, у карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) в результате нарушения дифференцировки камбиальных инициалей локально формируется anomalous (узорчатая) древесина [2]. Публикация полного генома *B. pendula* [1] открыла широкие возможности для изучения профиля экспрессии генов в различных органах и тканях и установления их функции [3–7].

По сравнению с другими методами анализа экспрессии генов, метод обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) является предпочтительным в связи с его высокой чувствительностью, специфичностью и меньшим временем, затрачиваемым на эксперимент [8]. Для объективной оценки уровней экспрессии целевых генов необходимо нормирование результатов qRT-PCR по отношению к референсным генам. Пригодный для нормализации референсный ген должен иметь стабильную экспрессию в различных тканях и в различных экспериментальных условиях [9–13]. В качестве референсных, как правило, выбирают гены, участвующие в поддержании клеток, регулирующие основные метаболические функции/пути, такие как синтез компонентов цитоскелета, гликолитический путь, синтез субъединиц рибосом, синтез факторов элонгации, свертывание белков и деградация белков [13]. Вариабельность экспрессии любых референсных генов не является постоянной и в различных экспериментальных условиях может сильно изменяться, поэтому выбор генов для нормализации данных является необходимым этапом эксперимента, и даже применение широ-

ко используемых в современных исследованиях референсных генов требует предварительной оценки их стабильности [8, 13–16]. Подбор подходящих референсных генов для изучения экспрессии генов-интереса на растениях разных форм березы повислой (*B. pendula* var. *pendula* и var. *carelica*) ранее не проводился.

С целью выявления референсных генов, пригодных для нормирования уровня транскриптов, мы проанализировали стабильность экспрессии генов *ACT1*, *18S pPHK*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)* в разных тканях (лист, флоэма, ксилема) у двух форм березы повислой, различающихся по структуре образующейся древесины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и отбор образцов. Объектами исследования были 13–14-летние деревья *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Деревья *B. pendula* var. *pendula* (“обычная” береза) имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Поскольку при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве карельской березы появляются особи, как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины, среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры (1) с высокой степенью узорчатости древесины (узорчатые растения) и (2) растения, у которых признаки аномального строения древесины отсутствовали (безузорчатые растения). Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления плюсовых деревьев (Forelia OY, Финляндия). Число растений в каждой группе составило 3 штуки. Все растения произрастали на Агробиологической станции КарНЦ РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45′ с.ш., 34°20′ в.д.).

Для анализа отбирали листья с удлиненных побегов, ткани ствола (флоэма и ксилема). Образцы флоэмы и ксилемы отбирали на высоте 1.3 м от поверхности земли. У карельской березы выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий проводящих тканей. Для отбора образцов на стволе вырезали окошки 2 × 6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины бритвенным лезвием соскабливали тонкий слой, куда входили дифференцирующиеся клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. С внутренней поверхности коры препарировали комплекс тканей, включающий камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. В дальнейшем эти ткани обозначены как “флоэма”. Весь растительный материал замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при –80°C. Отбор образцов тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Анализ срезов показал, что для всех исследу-

емых растений был характерен активный камбиальный рост.

Выделение и очистка суммарной РНК, синтез кДНК. Для выделения суммарной РНК навеску растительной ткани (50–100 мг) растирали в жидком азоте. Процедуру выделения проводили с использованием двух лизирующих буферов (на основе цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) и додецилсульфата натрия (ДДС)) и хлороформ-изоамиловой смеси (24 : 1) по методике, описанной М. Су с соавт. [18], дополнительно лизат ткани обрабатывали ингибитором РНКаз для предотвращения возможной деградации проб и ДНКазой (“Синтол”, Россия) для избавления от примеси геномной ДНК. Соотношение ткань/буфер составило 1 : 10. Состав экстракционного ЦТАБ буфера: 100 мМ Tris–HCl (pH 8.0); 25 мМ ЭДТА, 2 М NaCl, 2% СТАВ, 2% PVP, 2% меркаптэтанол (добавляют перед использованием); экстракционного ДДС буфера: 10 мМ Tris–HCl, 1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, 0.5% ДДС.

Осаждение РНК проводили 100% изопропанолом. Осадок РНК растворяли в необходимом объеме свободной от РНКаз воды. Целостность полученной РНК анализировали при помощи метода электрофореза в 1% агарозном геле. Определение концентрации РНК проводили спектрофотометрически (планшетный спектрофотометр SPECTROstar NANO, “BMG Labtech”, Германия) по поглощению на длине волны 260 нм. Чистоту полученного препарата оценивали по соотношению оптических плотностей, измеренных при 230, 260 и 280 нм (A260/A280 и A260/A230). Отсутствие примесей геномной ДНК подтверждали с помощью постановки ПЦР с использованием в качестве матрицы полученного препарата РНК.

кДНК синтезировали согласно протоколу производителя, используя набор реактивов для обратной транскрипции MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 мкл РНК-матрицы (1 мкг), 1 мкл Oligo(dT) праймера и 1 мкл случайного праймера (Randoom (dN)10-primer) (20 мкМ), 1 мкл обратной транскриптазы (MMLV ревертазы) (100 ед.), 4 мкл 5x буфера для синтеза первой цепи кДНК (280 мМ Tris–HCl, pH 8.7; 37.5 мМ KCl; 30 мМ MgCl₂), 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DDT (20 мМ), 3 мкл стерильной, свободной от РНКаз воды. Реакцию обратной транскрипции проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (“Thermo scientific”, США).

Поиск генов в геноме березы повислой методами биоинформатики. В качестве референсных генов были выбраны гены рибосомной РНК 18S (*18S pPHK*), актина (*ACT1*), фактора элонгации 1a (*Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH1*) – как наиболее часто используемые для этой цели [18–20 и др.].

Поиск генов проводили в геноме березы повислой (*Betula pendula* Roth), опубликованном на портале CoGe [1]. С этой целью были получены нуклеотидные последовательности CDS и соответствующие им белковые последовательности генов *Arabidopsis thaliana* и *Populus trichocarpa* из баз данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (release 13, <https://www.arabidopsis.org>) и Phytozome (release 3.0, <http://www.phytozome.net/poplar>). Указанные последовательности использовали в качестве поискового запроса BLAST по геному *B. pendula* (release 1.2, <https://genomevolution.org/coge>) для выявления гомологичных последовательностей.

Предсказание структуры белков березы повислой выполняли с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA X [21]. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW. Филогенетическое древо было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method), оценку достоверности кластеризации проводили методом bootstrap с 1000 повторами [22, 23]. Определение процента идентичности/сходства последовательностей выполняли с помощью ресурса EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Подбор праймеров для qRT-PCR и их проверка. Специфические праймеры (“Синтол”, Россия) для амплификации участков исследуемых референсных генов конструировали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 8.21 (PREMIER Biosoft). С целью подтвердить, что получен единственный продукт реакции, проводили анализ кривой плавления, а также электрофорез продуктов количественной ПЦР в 8% акриламидном геле с окраской бромистым этидием.

Условия количественной ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию образцов проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (“Thermo scientific”, США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green – qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). ПЦР-РВ проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл qPCRmix-HS SYBR, по 1 мкл прямого и обратного праймера (0.4 мкМ) (“Синтол”, Россия), 2 мкл матрицы кДНК, 16 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды. Конечное содержание кДНК в реакционной среде для всех образцов составляло 100 нг, согласно рекомендации протокола производителя. ПЦР проводили при следующих условиях: 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов по 95°C в течение 15 с для денатурации, 55°C в течение 30 с для отжига и 72°C в течение 30 с для элон-

гации. Для каждой пары праймеров применяли отрицательный контроль – постановка ПЦР в отсутствие матрицы кДНК.

Анализ стабильности экспрессии генов. Специфичность полученных продуктов ПЦР оценивали с помощью анализа кривых плавления. Для определения эффективности (E) ПЦР проводили с каждой парой праймеров на серии 10-кратных разведений (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5}) кДНК. Для определения значений C_t строили калибровочные кривые, используя программное обеспечение Excel, в соответствии с коэффициентами корреляции R и значениями наклона кривой (slope, k), которые можно рассчитать по калибровочным кривым значений C_t для каждого гена. Эффективность ПЦР-амплификации (E) рассчитывали по формуле $E = (10^{(-1/k)} - 1) \times 100$.

Поиск подходящего референсного гена проводили с помощью двух пакетов программ NormFinder и BestKeeper, анализируя стабильность экспрессии каждого претендента на эту роль. Исходные значения C_t переводили в формат, необходимый для анализа в NormFinder. Максимальный уровень экспрессии (наименьшее значение C_t) принимали равным 1. Относительные уровни экспрессии рассчитывали, используя формулу: $2^{-\Delta g C_t}$, в которой $\Delta g C_t$ – это наименьшее значение C_t , вычтенное из соответствующего значения C_t для каждого гена и каждого образца. Отобранные NormFinder гены анализировали с помощью BestKeeper с учетом непретерженных значений C_t и эффективности амплификации.

Проверка референсных генов. С использованием потенциальных референсных генов сравнили относительную экспрессию гена *SWINI*, кодирующего изоформу апопластной инвертазы (АпИнв), в тканях ствола растений обычной березы и узорчатых растений карельской березы. Ранее было показано, что возрастные узорчатости древесины у карельской березы коррелирует с увеличением активности АпИнв [4]. Относительный уровень транскриптов генов *SWINI* (RQ) вычисляли по формуле:

$$RQ = E^{-\Delta C_t}, \text{ где } E - \text{эффективность ПЦР,} \\ \Delta C_t = C_t(\text{целевого гена}) - (\text{референсного гена}).$$

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel и PAST. На диаграммах приведены средние значения с учетом трехкратной биологической и трехкратной аналитической повторностей и их стандартные отклонения. Выборки проверялись на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни (обозначение на графиках латинскими буквами). Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Таблица 1. Спектрофотометрические показатели качества суммарной РНК, полученной из растений двух форм *Betula pendula* Roth.

Объект	Ткань/орган	A260/A280	A260/A230
<i>Betula pendula</i> var. <i>pendula</i>	Лист	1.980 ± 0.002	2.033 ± 0.020
	Флоэма	1.968 ± 0.005	2.036 ± 0.011
	Ксилема	1.985 ± 0.006	2.022 ± 0.001
<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>	Лист	1.986 ± 0.002	2.069 ± 0.020
	Флоэма	1.972 ± 0.002	2.070 ± 0.021
	Ксилема	1.979 ± 0.003	2.057 ± 0.019

Таблица 2. Результаты попарного выравнивания аминокислотных последовательностей белков *B. pendula* и *A. thaliana*

ID гена, кодирующего белок <i>B. pendula</i>	Ближайший гомологичный белок <i>A. thaliana</i> (номер локуса в TAIR)	Процент идентичности аминокислотных последовательностей белков <i>B. pendula</i> и <i>A. thaliana</i>
Vpev01.c0427.g0027.m0001	Actin 1 (AT2G37620)	93.8
Vpev01.c1225.g0009.m0001	Actin 7 (AT5G09810)	98.7
Vpev01.c0556.g0017.m0001	Actin 7 (AT5G09810)	97.6
Vpev01.c0029.g0002.m0001	Actin 11 (AT3G12110)	97.1
Vpev01.c0564.g0031.m0001	Actin 11 (AT3G12110)	96.8
Vpev01.c0365.g0049.m0001	Actin 12 (AT3G46520)	97.1
Vpev01.c0052.g0178.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	89.1
Vpev01.c1040.g0016.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	89.4
Vpev01.c1513.g0002.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	87.9
Vpev01.c0288.g0008.m0001	EF1a (AT1G07940)	95.3
Vpev01.c0437.g0013.m0001	EF1a (AT1G07940)	94.2
Vpev01.c0437.g0013.m0002	EF1a (AT1G07940)	94.0
Vpev01.c0437.g0018.m0001	EF1a (AT1G07940)	94.2

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка качества РНК. Оценка качества полученной РНК при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием позволила выявить отчетливое разделение полос 18S и 28S рРНК, что свидетельствует о хорошем качестве суммарной РНК. Отношение оптических плотностей, измеренные на длинах волн 260 и 230 нм (A260/A230), показывает уровень загрязнения препарата РНК полисахаридами и полифенолами, а их отношение при 260 и 280 нм (A260/A280) – загрязнение образца белками. Полученные нами для всех органов и тканей значения A260/A230 были выше 2, а значения A260/A280 составляли 1.97–2.0 (табл. 1), что говорит об отсутствии загрязнения препарата РНК полифенолами, полисахаридами и белками. Отсутствие примеси геномной ДНК в полученных препаратах подтверждали также постановкой ПЦР-РВ с использованием в качестве матрицы

полученной суммарной РНК, при этом не было зафиксировано появления ПЦР продукта после 40 циклов реакции.

Поиск последовательностей потенциальных референсных генов и подбор праймеров для количественной ПЦР в режиме реального времени. В геноме березы повислой нам не удалось идентифицировать последовательности, обладающие достаточно высоким уровнем сходства с последовательностями 18S рРНК других видов. В базе данных NCBI была найдена частичная последовательность 18S рРНК березы повислой (номер доступа в базе данных NCBI GU476453.1) длиной 1493 п.н., которая была использована для конструирования праймеров для количественной ПЦР [24]. На основе последовательности GU476453.1 нами были сконструированы праймеры для ПЦР-РВ, используемые в данной работе (табл. 3).

В геноме березы повислой было идентифицировано по 6 генов, кодирующих белки, гомоло-

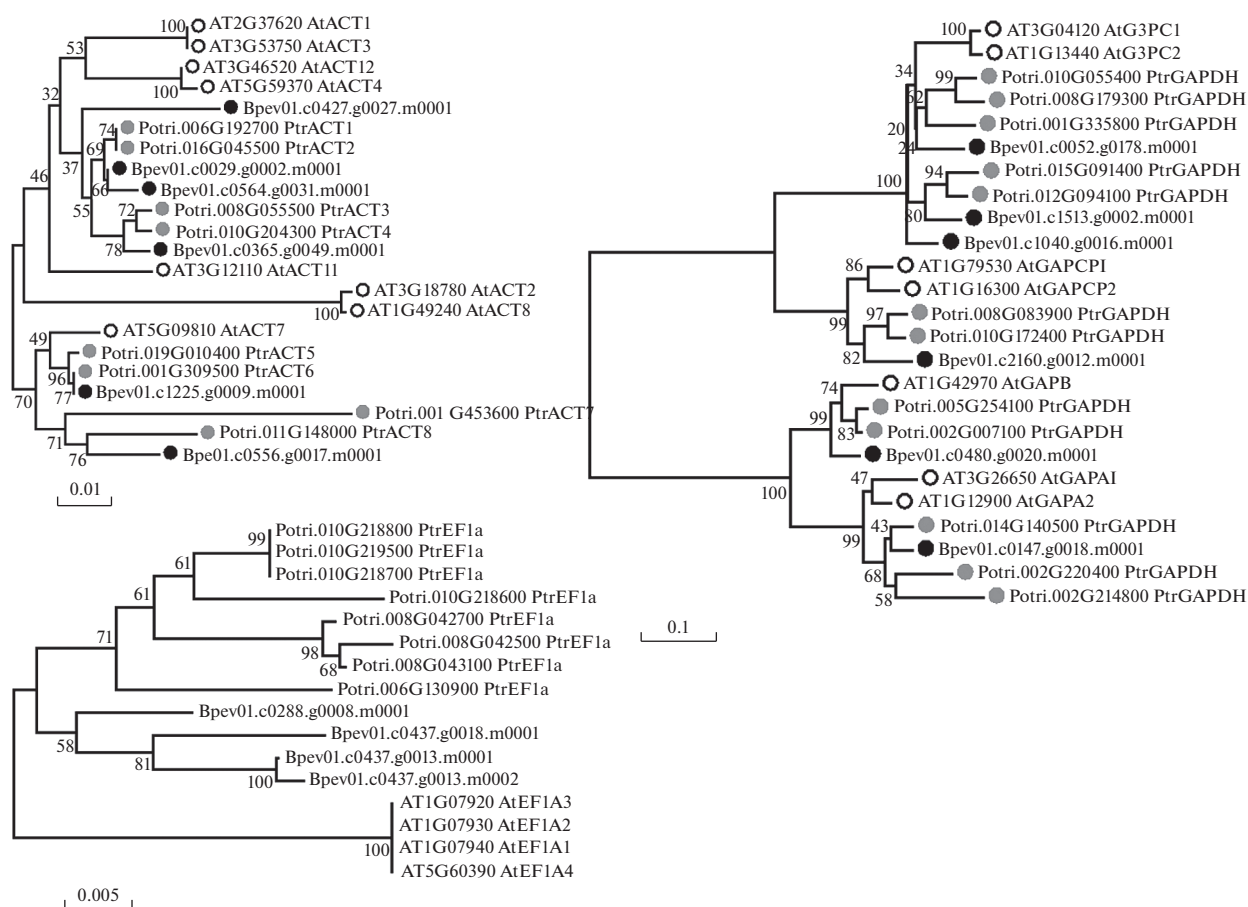


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей известных белков *Arabidopsis thaliana* (светлые точки) и *Populus trichocarpa* (серые точки) и потенциальных белков *Betula pendula* (черные точки). а – актин, б – *GAPDH*, в – *Efla*. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви. Рядом с названиями белков *A. thaliana* и *P. trichocarpa* указаны коды доступа в базах данных TAIR и Phytozome.

гичные актину и *GAPDH*, и 4 гена, кодирующих белки, гомологичные *Efla A. thaliana* и *P. trichocarpa* (рис. 1). Аминокислотные последовательности предсказанных белков *B. pendula* продемонстрировали высокий процент идентичности с последовательностями гомологичных белков *A. thaliana* (табл. 2). Для дальнейшего анализа были отобраны гены из каждого семейства и сконструированы специфичные пары праймеров (табл. 3). Размер продуктов количественной ПЦР для всех исследуемых генов находился в диапазоне 94–188 п.н., а температура отжига праймеров имела диапазон от 52 до 60°C.

Определение эффективности и специфичности амплификации ПЦР. Прежде чем оценивать стабильность экспрессии изучаемых референсных генов, мы установили эффективность амплификации в ходе ПЦР. Полученные значения эффективности (E) находились в диапазоне от 98.5 до 100% для всех рассмотренных генов (табл. 3). В ходе оценки специфичности ПЦР при помощи

гель-электрофореза в 8% акриламидном геле были обнаружены ампликоны ожидаемой длины и показано отсутствие димеров праймеров. При анализе кривых плавления продуктов ПЦР с каждой парой праймеров был выявлен один пик и не обнаружено неспецифических продуктов реакции (рис. 2).

Анализ стабильности экспрессии потенциальных референсных генов. Значения пороговых циклов (Ct), полученные для различных образцов, позволили выявить существенные различия в уровне транскрипции исследуемых генов (рис. 3а). Полученные для 5 генов значения Ct находились в диапазоне от 8 до 35 циклов. Ген *18S pPHK* имел самые низкие значения Ct (9.9), что говорит о наиболее высоком уровне транскрипции. Самый низкий уровень экспрессии был показан для гена *GAPDH1* (27.7).

Анализ стабильности экспрессии потенциальных референсных генов при помощи программы

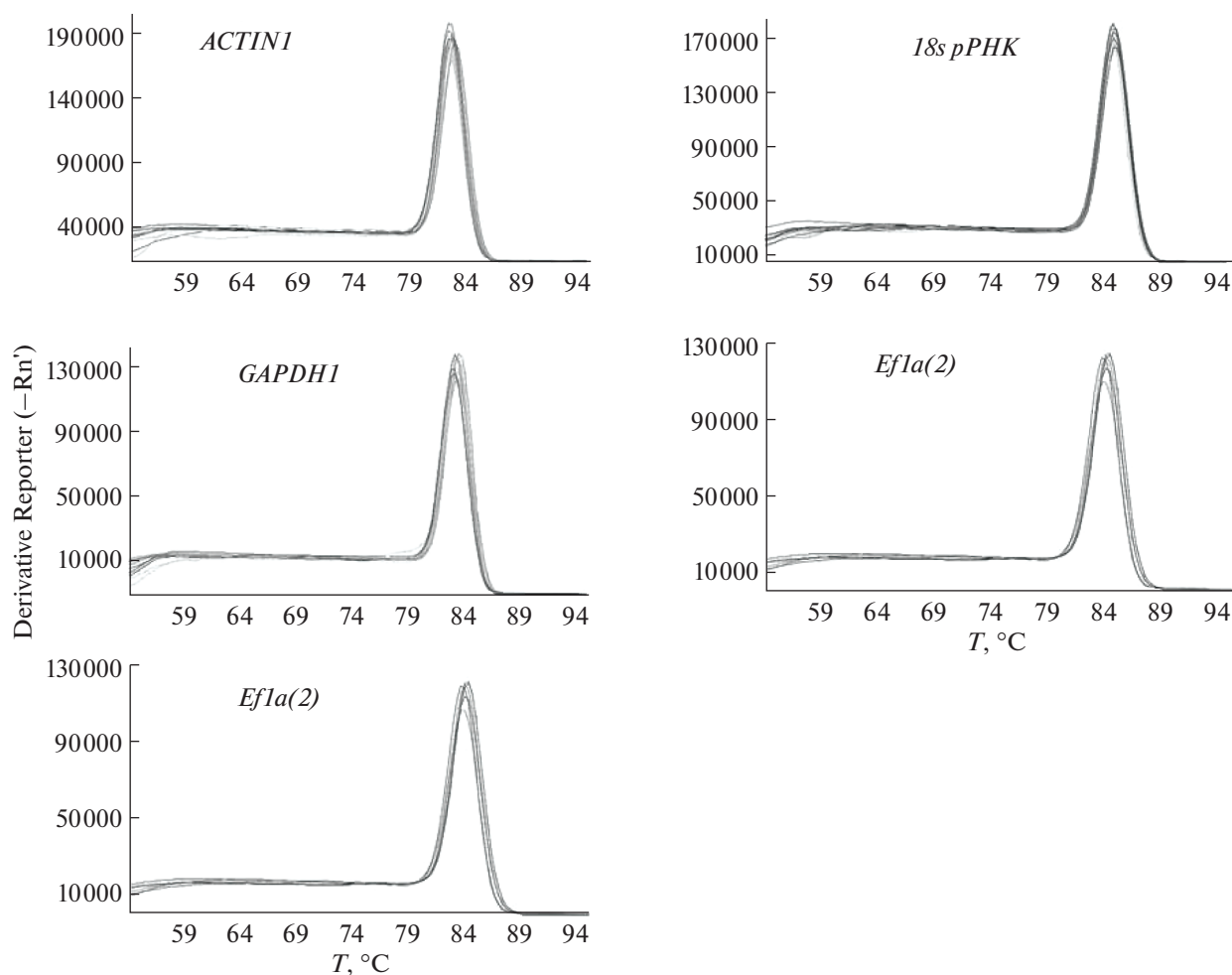


Рис. 2. Специфичность амплификации и кривые плавления продуктов ПЦР потенциальных референсных генов.

Таблица 3. Описание референсных (*18S pPHK*, *Actin1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*, *GapDH1*) и целевого (*CWIN1*) генов. T_m – температуры плавления; R^2 – коэффициент корреляции порогового цикла и логарифма концентрации ДНК матрицы

Ген	Лocus/номер доступа (NCBI)	Праймер (5' → 3') (прямой / обратный)	Длина продукта (п.н.)	T_m , °C	Эффективность амплификации, %	R^2
<i>18S pPHK</i>	GU476453.1	CTACTATGGTGGTGACGGGTGAC CGCCTGCTGCCCTTCCTTGG	94	60	98.8	0.993
<i>Actin1</i>	Bpev01.c0427.g0027	GGTGGTGAATGAGTAGCC TTCTTCCCTTATGCC	167	54	100.7	0.998
<i>Ef1a(1)</i>	Bpev01.c0437.g0013.m0001	TGTGCTGTTCTTATCATTGACTCC TTCTCGTACCTTGCCTTGG	145	54	98.7	0.989
<i>Ef1a(2)</i>	Bpev01.c0437.g0018.m0001	GCCACACCTGCCACATTGC AGCGAAAGTCTCCACCACCATAG	188	52	98.5	0.999
<i>GapDH1</i>	Bpev01.c1040.g0016.m0001	AGAATACAAGCCAGAАCTCAAC CTCTACCACCTCTCCAATCC	188	54	98.7	0.984
<i>CWIN1</i>	Bpev01.c0333.g0031.m0001	AGTGCCCCGATTTCTTCCCTG GTCCACCTGCCCTTGTCCG	181	55	99.0	0.990

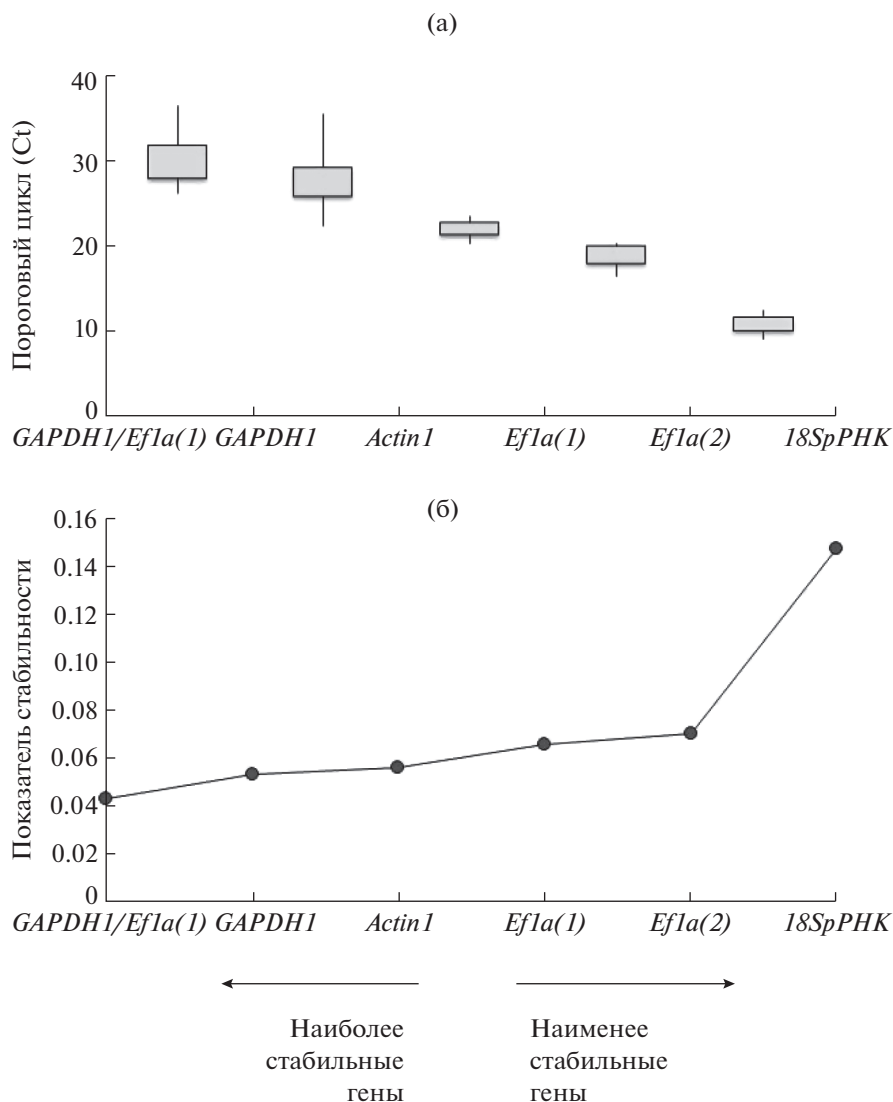


Рис. 3. Значения Ct референсных генов (а) и стабильность их экспрессии, определенная с помощью программы NormFinder (б).

NormFinder позволил выявить, что наилучшими референсными генами для проведения ПЦР на различных образцах *B. pendula* Roth являются *GAPDH1* и *Actin1*, имеющие сходные значения показателя стабильности (0.054 и 0.056, соответственно), затем располагались *Ef1a(1)* и *Ef1a(2)* (0.067 и 0.071, соответственно) и *18SpPHK* (0.148) (рис. 3б).

Используемая нами программа NormFinder оценивает стабильность экспрессии на основе математической модели [25]. Данная программа выстраивает исследуемые гены на основе их минимальной меж- и внутригрупповой вариации. Поскольку в данной работе по оценке пригодности референсных генов мы использовали образцы разных форм березы повислой, то выборка образцов ($n = 30$) была разделена на две группы ($n = 15$) –

образцы *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. В результате оценки стабильности экспрессии потенциальных референсных генов и их внутри- и межгрупповой вариации, референсные гены *GAPDH1* и *Ef1a(1)* были предложены программой NormFinder как лучшая комбинация двух генов. Показатель стабильности данных генов составил при этом 0.044.

Оценка референсных генов при помощи программы BestKeeper основана на анализе пороговых значений Ct, по которым рассчитывается коэффициент вариации (CV), стандартное отклонение (SD) и коэффициент корреляции (r) для каждого гена в ряду данных [26]. Наименьшие значения SD и наиболее близкий к 1 показатель r имеют наиболее стабильно экспрессирующиеся гены. По результатам анализа NormFinder исключили наиме-

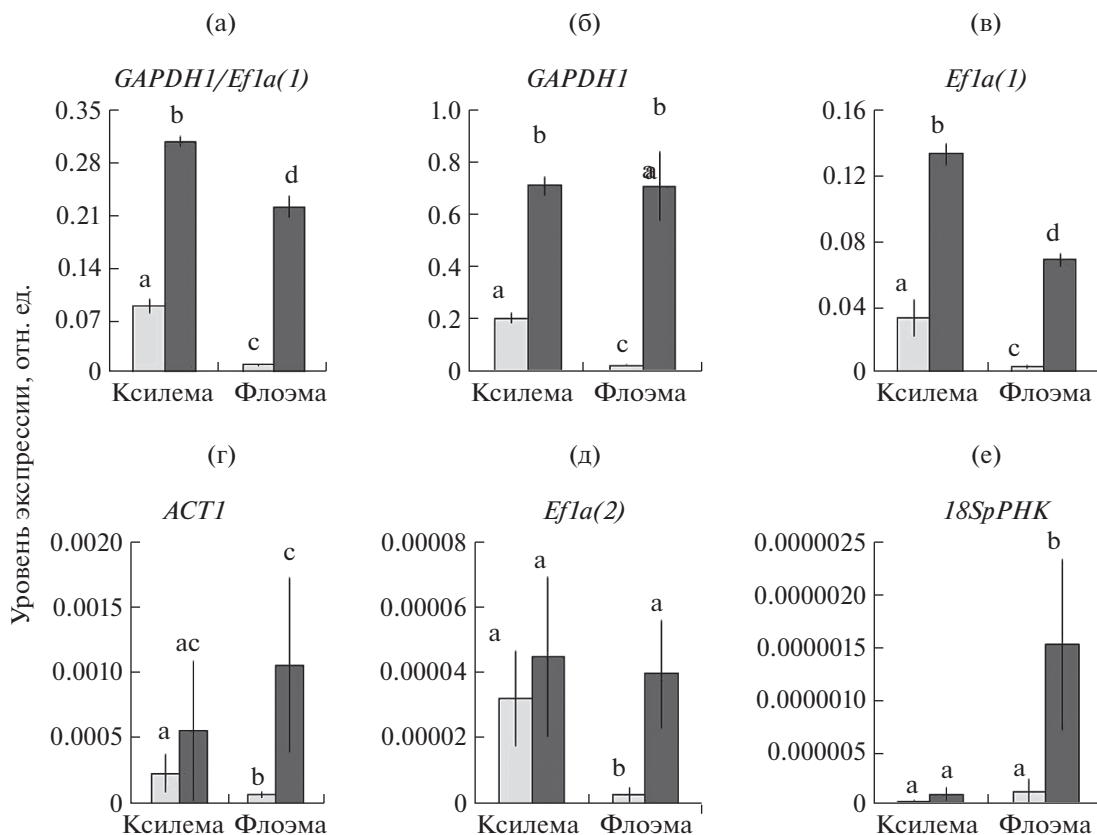


Рис. 4. Относительные уровни экспрессии (отн. ед.) целевого гена (*CWINI.1*), рассчитанные посредством нормализации на различные референсные гены в ксилеме деревьев *Betula pendula* Roth. var. *pendula* (светлые столбики) и var. *carelica* (темные столбики). Бары – стандартные отклонения, рассчитанные на основании трех биологических и трех аналитических повторностей.

нее стабильно экспрессирующийся ген *18SpPHK*, остальные гены ранжировали в соответствии со значениями CV ± SD в образцах. Анализ исследуемых генов при помощи программы BestKeeper показал, что наиболее стабильными генами с наименьшим показателем SD являются гены *Actin1*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, наименее стабильным оказался ген *Ef1a(2)*.

Таким образом, анализ стабильности экспрессии референсных генов при помощи двух пакетов программ показал сходные результаты.

Экспрессия гена, кодирующего апопластную инвертазу, в тканях ствола двух форм березы повислой относительно потенциальных референсных генов. В результате экспериментальной проверки потенциальных референсных генов было показано, что использование для расчета относительного уровня транскрипции референсных генов с разной стабильностью экспрессии может приводить к значительному искажению результатов. При использовании стабильных референсных генов (*GAPDH1/Ef1a(1)*; *GAPDH1* и *Ef1a(1)*) закономерности в распределении экспрессии *CWINI* у двух форм березы повислой были схожи. Так, у карельской березы, по сравнению с “обыч-

ной” березой, относительный уровень транскриптов *CWINI* был в 3.5–4 и 20–30 раз больше в тканях ксилемы и флоэмы, соответственно (рис. 4а, б, в), что согласуется с нашими предыдущими данными [4].

При использовании в качестве внутреннего контроля *ACT1* и наименее стабильного гена *Ef1a(2)* достоверных отличий в экспрессии *CWINI* в ксилеме между растениями карельской и “обычной” березой не наблюдали (рис. 4г, д)

Относительный уровень транскрипции гена *CWINI* при использовании в качестве референсного гена *18SpPHK* был близок к нулю, что значительно усложняет оценку различий в экспрессии целевого гена. Кроме того, как и в случае с *ACT1* и *Ef1a(2)*, не наблюдали отличий между узорчатой древесиной *B. pendula* var. *carelica* и прямоствольной древесиной *B. pendula* var. *pendula* (рис. 4е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Универсального референсного гена, имеющего стабильную экспрессию у разных видов растений, не существует. Ранее для растений *B. pendula*

при нормализации данных количественной ПЦР-РВ использовали гены *Actin* [4, 6, 29], *Tubulin* [5, 28], *GAPDH* [27] и *18SpPHK* [7, 30]. В проведенном исследовании у двух форм березы повислой была впервые оценена пригодность пяти генов – *GAPDH1*, *Actin1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*, *18SpPHK* для использования в качестве референсных при постановке qRT-PCR, основываясь на стабильности их экспрессии.

Результаты исследования уровня экспрессии потенциальных референсных генов были проанализированы при помощи программ NormFinder и BestKeeper. Данные программы используют различные алгоритмы оценки стабильности референсных генов, в связи с чем возможны некоторые различия в результатах. В нашем исследовании данные, полученные при помощи данных программ, различались незначительно. Было показано, что из числа изученных генов наиболее стабильно экспрессируемые в образцах *B. pendula* являются *Actin1*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, при этом гены *GAPDH1* и *Ef1a(1)* были предложены программой NormFinder как лучшая комбинация двух референсных генов и имели наиболее низкое значение показателя стабильности.

Согласно результатам нашего исследования, наименее стабильно экспрессирующимся оказался ген *18SpPHK*. Несмотря на частое использование этого гена в качестве референсного, встречаются и противоположные данные, согласно которым *18SpPHK* не может служить в качестве внутреннего контроля, поскольку он транскрибируется РНК-полимеразой I, тогда как мРНК синтезируются РНК-полимеразой II [8]. Согласно полученным данным, *18SpPHK* имеет самые низкие значения Ct, что при расчетах приводит к очень низким значениям относительного уровня экспрессии целевого гена и искажению результатов. На основании вышеперечисленных данных ген *18SpPHK* был исключен из числа возможных референсных генов для проведения ПЦР-РВ на образцах *B. pendula*.

Помимо проверки стабильности экспрессии референсных генов нами была проверена надежность и целесообразность использования описанных генов в качестве референсных. Показано, что использование различных генов в качестве референсных без предварительной оценки стабильности их экспрессии может приводить к значительному искажению данных об уровне транскрипции целевого гена.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00622_a).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salojärvi J., Smolander O.-P., Nieminen K., Rajaraman S., Safronov O., Safdari P., Lamminmäki A., Immanen J., Lan T., Tanskanen J., Rastas P., Amiryousefi A., Jayaprakash B., Kammonen J.I., Haggvist R. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // Nat. Genet. 2017. V. 49. P. 904. <https://doi.org/10.1038/ng.3862>
2. Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 18. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0419-2>
3. Moshchenskaya Y.L., Galibina N.A., Topchieva L.V., Novitskaya L.L. Expression of genes encoding sucrose synthase isoforms during anomalous xylogenesis in Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 616. <https://doi.org/10.1134/S1021443717030104>
4. Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M., Moshchenskaya Y.L., Borodina M.N., Sofronova I.N. Apoplastic invertase activity regulation in the cambial zone of Karelian birch // Russ. J. Dev. Biol. 2019. V. 50. P. 20. <https://doi.org/10.1134/S1062360419010028>
5. Alonso Serra J., Safronov O., Lim K.J., Fraser Miller S.J., Blokhina O.B., Campilho A., Chong S.L., Fagerstedt K., Haavikko R., Helariutta Y., Immanen J., Kangasjärvi J., Kauppila T.J., Lehtonen M., Ragni L. et al. Tissue specific study across the stem reveals the chemistry and transcriptome dynamics of birch bark // New Phytol. 2019. V. 222. P. 1816. <https://doi.org/10.1111/nph.15725>
6. Novitskaya L.L., Tarelkina T.V., Galibina N.A., Moshchenskaya Y.L., Nikolaeva N.N., Nikerova K.M., Podgornaya M.N., Sofronova I.N., Semenova L.I. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 378. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09989-8>
7. Qu C., Bian X., Han R., Jiang J., Yu Q., Liu G. Expression of BpPIN is associated with IAA levels and the formation of lobed leaves in *Betula pendula* 'Dalecartica' // J. For. Res. 2020. V. 31. P. 87. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0865-5>
8. Zhou L.N., Yao W.F., Liu J., Shang J., Shan M.Q., Zhang L., Ding A.W. Protective effect of different solvent extracts from platycladi cacumen carbonisatum on LPS-induced human umbilical vein endothelial cells damage // China journal of Chinese materia medica. 2013. V. 38. P. 3933.
9. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>

10. *Exposito-Rodriguez M., Borges A.A., Perez A.B., Perez J.A.* Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process // *BMC Plant Biol.* 2008. V. 8: e131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
11. *Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M.* Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat // *BMC Molecular Biol.* 2009. V. 10: e11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
12. *Li M.Y., Wang F., Jiang Q., Wang G.L., Tian C., Xiong A.-S.* Validation and Comparison of Reference Genes for qPCR Normalization of Celery (*Apium graveolens*) at Different Development Stages // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: e313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00313>
13. *Jaiswal P.S., Kaur N., Randhawa G.* Identification of reference genes for real-time PCR gene expression studies during seed development and under abiotic stresses in *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. // *bioRxiv.* 2018: e313437. <https://doi.org/10.1101/313437>
14. *Chandna R., Augustine R., Bisht N.C.* Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e36918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036918>
15. *Manoli A., Sturaro A., Trevisan S., Quaggiotti S., Nonis A.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 807. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>
16. *Reddy P.S., Rao T.S.R.B., Sharma K.K., Vadez V.* Genomewide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.) // *Plant Gene.* 2015. V. 1. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2014.12.002>
17. *Су М., Цзан В., Яо Н., Хуан М.* Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. С. 791.
18. *Han X., Lu M., Chen Y., Zhan Z., Cui Q., Wang Y.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e43084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043084>
19. *Yang M., Wu S., You W., Jaisi A., Xiao Y.* Selection of Reference Genes for Expression Analysis in Chinese Medicinal Herb *Huperzia serrata* // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00044>
20. *Zhou J., Yuan J., Long H., Tan X.* Expression profiles of a tung tree phosphate transporter cDNA and structural characteristics of the encoded protein // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 162. <https://doi.org/10.3103/S0095452719020105>
21. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
22. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
23. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4 P. 406. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
24. *Zhang W., Wei R., Chen S., Jiang J., Li H., Huang H., Yang G., Wang S., Wei H., Liu G.* Functional characterization of CCR in birch (*Betula platyphylla* × *Betula pendula*) through overexpression and suppression analysis // *Physiol. Plant.* 2015. V. 154. P. 283. <https://doi.org/10.1111/ppl.12306>
25. *Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F.* Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 5245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
26. *Кулакова Н.В., Болотова Т.А., Ханаев И.В., Черногор Л.И., Беликов С.И.* Выбор референсных генов для количественной ПЦР в режиме реального времени в губке *Lubomirskia baicalensis* // *Internetion journal of applied and fundamental research.* 2016. V. 1. P. 360.
27. *Гродецкая Т.А., Евлаков П.М., Исаков И.Ю.* Анализ экспрессии генов стрессоустойчивости в условиях воздействия засухи на растения березы в центрально-черноземном регионе // *Лесотехнический журнал.* 2020. № 2. С. 23. <https://doi.org/10.34220/issn.2222-7962/2020.2/3>
28. *Keinanen S.I., Hassinen V.H., Karenlampi S.O., Tervahauta A.I.* Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone // *Tree Physiol.* 2007. V. 27. P. 1243. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.9.1243>
29. *Morales L.O., Tegelberg R., Brosche M., Keinanen M., Lindfors A., Aphalo P.J.* Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves // *Tree Physiol.* 2010. V. 30. P. 923. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq051>
30. *Kosonen M., Lännenpää M., Ratilainen M., Kontunen-Soppela S., Julkunen-Tiitto R.* Decreased anthocyanidin reductase expression strongly decreases silver birch (*Betula pendula*) growth and alters accumulation of phenolics // *Physiol. Plantarum.* 2015. V. 155. P. 384. <https://doi.org/10.1111/ppl.12324>