

## БИОЛОГИЯ

УДК 633.521:577.21

Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ<sup>1</sup>, Е. Н. КОЖЕМЯКО<sup>2</sup>, Т. А. ПОДВИЦКИЙ<sup>1</sup>, Н. В. АНИСИМОВА<sup>1</sup>,  
академик Л. В. ХОТЫЛЕВА<sup>1</sup>, член-корреспондент А. В. КИЛЬЧЕВСКИЙ<sup>1</sup>

ПДРФ-АНАЛИЗ ГЕНОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТАЗ ЛЬНА  
(*LINUM USITATISSIMUM* L.)

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 06.10.2014

**Введение.** Лен – важный источник натурального волокна, широко востребованного на современном сырьевом рынке. В 2011 г. Беларусь была третьей после Франции и Бельгии по объему продаж льноволокна, при этом финансовая выручка Беларуси в сравнении с Францией оказалась в 10 раз ниже. Из первой двадцатки крупнейших экспортеров Беларусь продает лён по самой низкой цене (по данным FAO [1]). Специалистами отмечается, что в настоящее время производство льноволокна в Беларуси падает [2], что связано в первую очередь с низким качеством получаемой продукции [3]. Поэтому улучшение качества волокна льна является актуальной задачей, которую можно решить только при условии тщательного изучения биогенеза волокон и селекции данной культуры [2].

Поскольку целлюлоза является основным компонентом льноволокна, для создания принципиально новых сортов льна необходимо понимание процессов биогенеза целлюлозных микрофибрилл. К настоящему времени известен основной компонент биосинтеза целлюлозы, представляющий собой 36 CESA-полипептидов, образующих трансмембранную целлюлозосинтазную розетку [4]. Однако из-за сложности его структуры собрать этот комплекс *in vitro* и изучить его функционирование не удастся [5]. В качестве наиболее перспективного подхода изучения биогенеза волокна могут быть использованы методы молекулярной генетики.

CESA-полипептиды кодируются генами целлюлозосинтаз (*CesA*-генами), которые можно идентифицировать не только по полноразмерной последовательности, но и по класс-специфическим областям (CSRII), т. е. по фрагментам генов [6]. Исследователям уже доступна полная нуклеотидная последовательность генома льна культурного [7], а также некоторые последовательности транскриптома льна, включая и последовательности CSRII областей четырех генов целлюлозосинтаз [8]. На основе этих последовательностей нами был разработан метод идентификации генов целлюлозосинтаз льна с помощью ПДРФ-анализа [9]. Используя этот метод, можно сравнивать между собой сорта и формы льна, различающиеся по качеству волокна, и найти *CesA*-гены, способствующие формированию качественного льноволокна.

Цель работы – идентификация генов целлюлозосинтаз, экспрессирующихся у контрастных по качеству волокна форм льна.

**Материалы и методы исследования.** В качестве объектов исследования выбраны сорт льна-долгунца *Argane*, относящийся к подвиду *elongatum* и используемый для получения льноволокна, а также сорт *Endress Olajlen*, относящийся к подвиду *mediterraneum* (лен крупносемянный), который выращивается для получения масла и не формирует качественное волокно. Данные сорта льна имеют значительные различия по морфологическим признакам: высота растения (ВР), техническая длина стебля (ТД), число коробочек на одном растении (ЧК), число семян с одного растения (ЧСР), число семян, содержащихся в коробочке (ЧС/К), масса семян, собранных с одно-

го растения (МСП), масса 1000 семян (М1000) и др., а также по качеству формируемого волокна (табл. 1). Растения льна выращивали на делянках ЦБС НАН Беларуси в 2013 г. по общепринятым методикам, семена высеяли в оптимально ранние сроки в первой декаде мая (07.05.2013) для формирования нормального стеблестоя.

Таблица 1. Хозяйственно ценные признаки сортов льна культурного

| Сорт   | ВР, см     | ТД, см     | ЧК         | ЧСР         | ЧС/К      | МСП, г      | М1000, г     |
|--|------------|------------|------------|-------------|-----------|-------------|--------------|
| Лен-долгунец (subsp. <i>elongatum</i> Vav. et Ell.)          |            |            |            |             |           |             |              |
| Ariane   | 88,0 ± 1,9 | 79,9 ± 2,4 | 3,9 ± 0,3  | 29,4 ± 3,4  | 7,5 ± 0,3 | 0,15 ± 0,01 | 4,92 ± 0,09  |
| Лен крупносемянный (subsp. <i>mediteranium</i> Vav. et Ell.) |            |            |            |             |           |             |              |
| Endress Olajlen  | 69,1 ± 1,5 | 55,0 ± 1,7 | 11,8 ± 1,4 | 64,9 ± 10,6 | 5,3 ± 0,2 | 0,74 ± 0,12 | 11,32 ± 0,16 |

**Синтез матрицы кДНК.** В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную при обратной транскрипции на общей РНК, с помощью олиго-дТ праймеров и набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно инструкции производителя. РНК для синтеза выделяли из стеблей на стадии быстрого роста (45-е сутки после посева) по методике с использованием TRI REAGENT™ (Sigma, США). После выделения и очистки ДНКазой I (Thermo Scientific, Литва) препараты РНК растворяли в 100 мкл воды, не содержащей РНКазы.

**Амплификацию** необходимых фрагментов *CesA*-генов проводили методом ПЦР в объеме 20 мкл с использованием 0,3 ед. ДНК-полимеразы Tornado (Праймтех, Беларусь) и соответствующего ей 2х Т-буфера (S). На одну реакцию нуклеотиды добавляли в конечной концентрации 0,2 мМ для каждого нуклеотида, прямой и обратный праймер в конечной концентрации 0,2 мМ, 1,5 мкл кДНК, которая после синтеза была разбавлена в соотношении 1 : 25. В опытах использовали класс-специфические праймеры, которые позволяют амплифицировать CSRII-область генов целлюлозосинтаз (табл. 2). Амплификацию проводили на амплификаторе TProfessional (Biometra, Германия) по программе, указанной в табл. 3.

Таблица 2. Праймеры, использованные для идентификации генов целлюлозосинтаз

| Праймер | Последовательность 5'→3' | Метка на 5' конце | Ссылка |
|---------|--------------------------|-------------------|--------|
| HVR2F   | TGYTATGTGTCAGTTGCCWC     | ROX               | [10]   |
| HVR2R   | GANCCRTARATCCAYCC        | FAM-ACH           |        |

Таблица 3. Программа для амплификации класс-специфических областей генов целлюлозосинтаз льна

| №                      | Температура, °С | Время, с |
|------------------------|-----------------|----------|
| 1                      | 95              | 900      |
| 2                      | 91              | 60       |
| 3                      | 55              | 90       |
| 4                      | 72              | 120      |
| № 2–4 повторяли 35 раз |                 |          |
| 5                      | 16              | 300      |

**Рестрикцию** проводили в 20 мкл реакционной смеси, которая включала 7 мкл воды mQ, 10 мкл ПЦР продукта, 2 мкл буфера, соответствующего ферменту, а также 1 мкл фермента. В работе использовали ферменты *Bam*HI, *Pst*I и *Pvu*II (Thermo Scientific, Литва). Образцы инкубировали в течение часа при 37 °С.

**Капиллярный электрофорез** выполняли на восьмикпиллярном генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) в капиллярах длиной 50 см и диаметром 50 мкм. Электрофорез проводили при температуре 60 °С. Использовали ANODE Buffer 3500 series и CATHODE Buffer 3500 (Applied Biosystems, США), гель для электрофореза – POP-7 (Applied

Biosystems, США). Перед загрузкой в генетический анализатор к пробам ДНК объемом 2–3 мкл добавляли 1 мкл раствора размерного стандарта S450 (CorDIS, Россия) и деионизированный формамид до 10 мкл. После этого пробы прогревали при 94 °С в течение 2 мин, а затем охлаждали во льду.

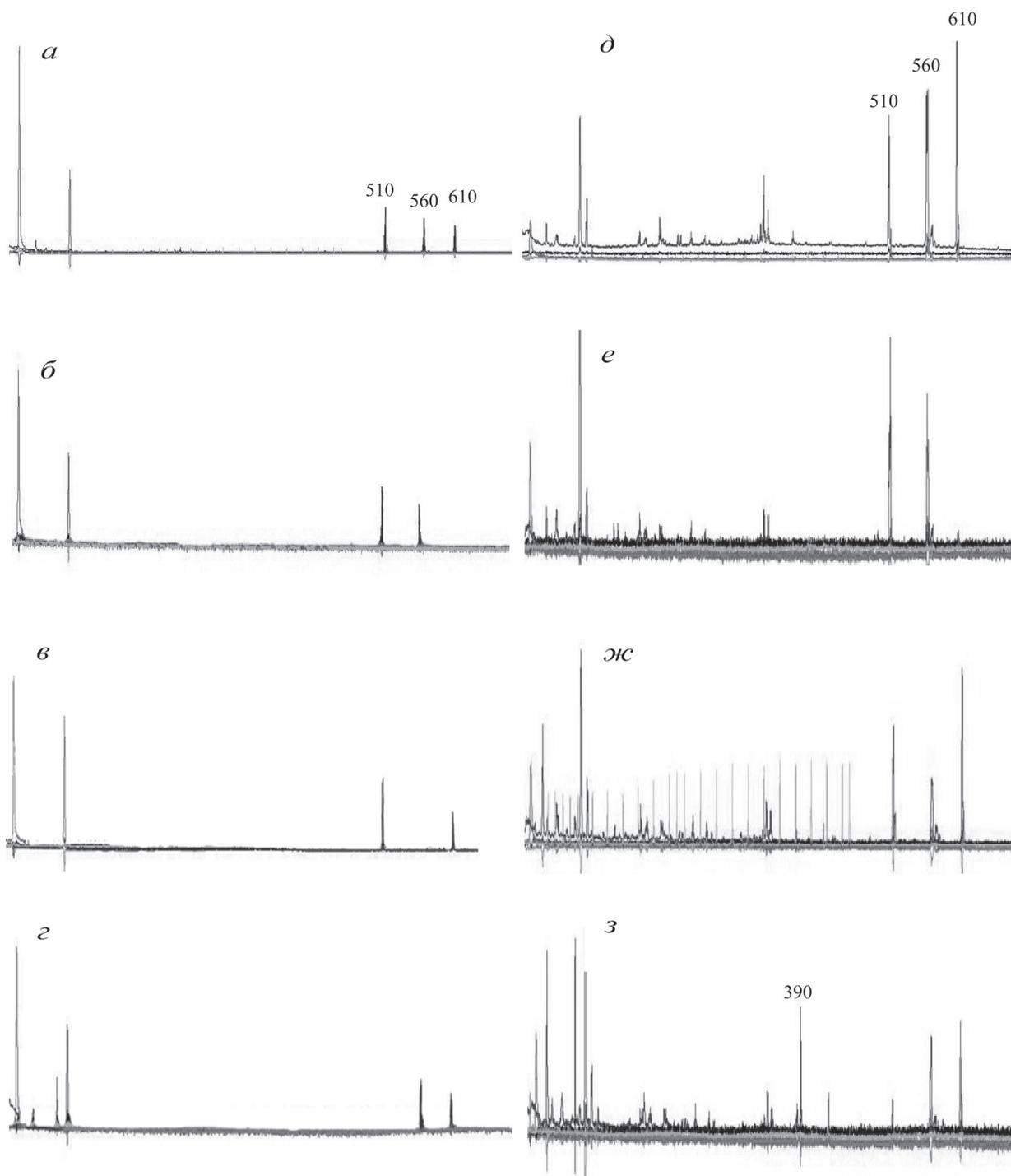
**Результаты и их обсуждение.** Для разработки метода идентификации генов целлюлозосинтазы мы использовали подход, который предложили в 2006 г. М. Ranik и А. Myburg для растений эвкалипта (*Eucalyptus grandis* W. Hill). Данный подход позволяет идентифицировать гены целлюлозосинтазы не по полноразмерной последовательности данных генов, а по класс-специфической области (CSRII), т. е. по фрагменту гена [6]. Эффективность данного подхода позднее была показана для растений осины [10] и льна (*Linum usitatissimum* L.) [8]. Нуклеотидные последовательности CSRII областей четырех генов целлюлозосинтазы льна (*LusCesA1*, *LusCesA4*, *LusCesA7* и *LusCesA9*) были сиквенированы и депонированы нами в базу данных GenBank (JZ482253, JZ482254, JZ482255, JZ482256). На основе полученных CSRII-фрагментов генов целлюлозосинтазы были подобраны ферменты рестрикции, которые в данных последовательностях имели уникальные сайты узнавания, и разработан метод идентификации данных генов на основе ПДРФ-анализа. Разработанный метод включает два этапа. Первый этап – амплификация с помощью ПЦР класс-специфической области *CesA*-генов, а второй этап – гидролиз ПЦР-продукта ферментами *Bam*HI, *Pst*I и *Pvu*II. Различия длины фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении ферментом *Pvu*II, позволяют различить гены *LusCesA1* и *LusCesA9*. Гидролиз CSRII-области ферментом *Bam*HI позволяет идентифицировать ген *LusCesA4*, а *Pst*I – ген *LusCesA7* [9].

В нашей работе мы применили метод ПДРФ-анализа для идентификации генов целлюлозосинтазы двух подвидов льна культурного, которые имеют существенные фенотипические различия по признакам продуктивности волокна (табл. 1). Это позволяет предположить, что данные растения могут различаться по экспрессии генов целлюлозосинтазы. CSRII-области генов целлюлозосинтазы из стеблей льна *Argiane* (лен-долгунец) и *Endress Olajlen* (лен крупносемянный) амплифицировали и разделили с помощью электрофореза (рисунок, *a* и *d*). Праймеры, использованные в работе на 5'-конце, несли модифицированные нуклеотиды, что позволило детектировать ПЦР-продукты посредством флуоресценции. В наших экспериментах интенсивность флуоресценции красителя FAM была значительно выше по сравнению с красителем ROX.

При разделении данных фрагментов в капилляре обнаружили три пика, соответствующие фрагментам ДНК размером 510, 560, 610 п. н. (рисунок, *a* и *d*). Полученные фрагменты ДНК соответствуют класс-специфическим областям следующих *CesA* генов: 610 п. н. – *CesA4*, 510 п. н. – *CesA7*, 560 п. н. – *CesA1* и/или *CesA9*. На электрофореграмме также видны дополнительные пики (более многочисленные для *Argiane* и менее выраженные для *Endress Olajlen*), соответствующие более легким фрагментам ДНК (рисунок, *d*). Мы полагаем, что данные фрагменты ДНК представляют собой неспецифические продукты амплификации либо абортированные продукты ПЦР. После расщепления полученных ПЦР продуктов ферментами *Bam*HI, *Pst*I и *Pvu*II образцы разделяли методом капиллярного электрофореза (рисунок).

После обработки ферментом *Bam*HI ПЦР-продуктов CSRII-областей *CesA*-генов в обоих случаях обнаружили фрагменты ДНК размером 510, 560 и 100 п. н. (рисунок *b*, *e*). Из экспериментальных данных можно заключить, что самый крупный фрагмент ДНК размером 610 п. н. расщепляется на участки размером 100 п. н. и 510 п. н. (рисунок, *b*, *e*). На этом основании мы делаем вывод, что в изучаемых образцах присутствует CSRII-область гена *LusCesA4*. Другими словами, можно утверждать, что в клетках стебля льна сорта *Argiane* и *Endress Olajlen* экспрессируется данный ген.

В результате расщепления ферментом *Pst*I CSRII-областей из льна-долгунца фрагмент ДНК 510 п. н. расщепляется на два участка размером 415 и 90 п. н. (рисунок, *з*), что свидетельствует об экспрессии гена *LusCesA7* в анализируемых пробах. Кроме того, на фореграмме идентифицировали дополнительный пик (метка FAM), соответствующий фрагменту ДНК размером 390 п. н. При анализе фрагментов класс-специфических областей из генома льна биоинформатическими методами не обнаружили ген, который бы по размерам продуктов рестрикции его CSRII-области соответствовал нашим экспериментальным данным. Наиболее близкие значения были получены для генов из локусов *Lus10026609*, *Lus10026610* и *Lus10030455*, которые составляли около 350



Рестрикционный анализ CSR II-области *CesA*-генов льна-долгунца (Ariane) и льна крупносемянного (Endress Olajlen): *a* – без рестриктазы (Endress Olajlen); *б* – *Bam*HI (Endress Olajlen); *в* – *Pvu*II (Endress Olajlen); *г* – *Pst*I (Endress Olajlen); *д* – без рестриктазы (Ariane); *е* – *Bam*HI (Ariane); *ж* – *Pvu*II (Ariane); *з* – *Pst*I (Ariane)

и 210 п. н. Данные последовательности являются гомологами последовательности AT2G33100.1 из генома *Arabidopsis thaliana* и могут быть отнесены к целлюлозосинтазоподобным генам (*CsID*).

При обработке CSR II-областей, полученных из льна крупносемянного, ферментом *Pst*I фрагмент ДНК размером 510 п. н. также расщепляется (рисунок, *г*), что является индикатором гена *LusCesA7*. В результате на электрофореграмме появляется фрагмент ДНК размером 90 п. н., а второй фрагмент размером около 415 п. н. обнаружить не удалось. Возможно, это связано с тем, что краситель ROX, в нашем случае, имеет более низкую интенсивность флуоресценции по срав-

нению с FAM, поэтому внесенного количества образца было недостаточно для идентификации данного фрагмента.

При анализе фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении CSRII-областей из стеблей льна-долгунца ферментом *PvuII*, были идентифицированы фрагменты размером 610, 560 и 510 п. н. (рисунок, ж). Причем интенсивность флуоресценции пика 560 п. н. значительно ниже по сравнению с контрольным образцом, не обработанным ферментом (рисунок, д), что свидетельствует о прошедшей рестрикции. Неполное расщепление фрагмента может указывать на присутствие дополнительных генов целлюлозосинтаз в данных образцах. Анализ генома льна биоинформатическими методами указывает, что такими генами могут быть гены *CesA6* (локус Lus10041063), ген *CesA8* (локус Lus10029245), либо целлюлозосинтазоподобный *CsID*-ген (Lus10012119). После рестрикции фрагментов *CesA*-генов из льна крупносемянного ферментом *PvuII* детектировали присутствие двух фрагментов ДНК 610 и 510 п. н. (рисунок, в), т. е. в данном случае происходит полное расщепление фрагмента ДНК размером 560 п. н. Согласно методу идентификации *CesA*-генов, с помощью данного фермента можно идентифицировать гены *LusCesA1* и *LusCesA9* [9]. В случае гена *LusCesA1* фрагмент размером 552 п. н. расщепляется на фрагменты размером 497 и 55 п. н., а в случае гена *LusCesA9* фрагмент размером 576 п. н. разрезается на 441 и 135 п. н. Однако предполагаемые продукты рестрикции в эксперименте не обнаружили, что не позволило дифференцировать данные гены.

Таким образом, можно сделать вывод, что в клетках стебля льна-долгунца и льна крупносемянного экспрессируются гены *LusCesA4*, *LusCesA7* и/или гены *LusCesA1*, *LusCesA9*. В стебле льна-долгунца обнаружена экспрессия гена, который по профилю рестрикции CSRII-областей похож на ген, кодирующий целлюлозосинтазоподобный белок *CsID* (гомолог последовательности AF232907 из *Arabidopsis thaliana*), который не был обнаружен в пробах из стеблей льна крупносемянного.

**Заключение.** В результате работы были получены и проанализированы класс-специфические области генов целлюлозосинтаз льна культурного (*Linum usitatissimum* L.) двух подвидов – льна-долгунца (subsp. *elongatum* Vav. et Ell.) и льна крупносемянного (subsp. *mediteranium* Vav. et Ell.). В стеблях образцов обоих подвидов наблюдалась схожая картина профиля экспрессии генов целлюлозосинтаз. Установлена экспрессия генов *LusCesA4*, *LusCesA7*, имеются доказательства функционирования гена *LusCesA9* или *LusCesA1* либо их комбинации. Выявленные отличия в профиле продуктов рестрикции свидетельствуют об экспрессии в стеблях льна-долгунца дополнительных генов целлюлозосинтаз либо целлюлозосинтазоподобных генов (возможно, *CesA6*, *CesA8*, а также *CsID* гомолог гена AF232907 из генома *Arabidopsis thaliana*), что может влиять на качественные характеристики формируемого волокна.

Авторы статьи искренне благодарят доктора биол. наук В. В. Титка за содействие в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ–ГФФИУ (договор № Б13К-024).

## Литература

1. FAO Statistics [Electronic resource] – Mode of access: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. – Date of access: 05.05.2014.
2. Пестис М. В., Шинтарь И. М., Пестис П. В. Состояние и перспективы производства и переработки льна в условиях Гродненской области. Гродно, 2011. – 168 с.
3. Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь [Электронный ресурс] / Льноводство. – Минск, 2014. – Режим доступа: <http://mshp.minsk.by/agriculture/crop/tk/>. – Дата доступа: 05.05.2014.
4. Saxena I. M., Brown R. M. // *Annals of Botany*. 2005. Vol. 96. P. 9–21.
5. Горшкова Т. А. Растительная клеточная стенка как динамическая система. М., 2007. – 429 с.
6. Ranik M., Myburg A. A. // *Tree Physiology*. 2006. Vol. 26, N 5. P. 545–556.
7. Wang Z., Hobson N., Galindo L. et al. // *Plant J*. 2012. Vol. 72, N 3. P. 461–473.
8. Галиновский Д. В., Анисимова Н. В., Райский А. П. и др. // *Генетика*. 2014. Т. 50, № 1. С. 26–34.
9. Галиновский Д. В., Анисимова Н. В., Титок В. В., Хотылева Л. В. // Матер. междунар. конф. «Интродукция, сохранение и использования биологического разнообразия мировой флоры». Минск, 2012. Ч. 2. С. 272–276.
10. Liang X., Joshi C. P. // *Tree Physiology*. 2004. Vol. 24, N 5. P. 543–550.

D. V. GALINOUSKY, E. N. KAZHAMIAKO, Ts. A. PADVITSKI, N. V. ANISIMOVA,  
L. V. KHOTYLEVA, A. V. KILCHEVSKY

D.Galinousky@igc.bas-net.by

## RFLP-ANALYSIS OF CELLULOSE SYNTHASE GENES OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

### Summary

The fiber flax Ariane and linseed Endress Olajlen were used as a subject of investigation in the present work. These flax cultivars form various types of fiber with contrast quality properties. Cellulose synthase genes, which are expressed in different breeds of flax, were identified by the RFLP-analysis. The expression of *LusCesA4*, *LusCesA7*, as well as *LusCesA9* and/or *LusCesA1* genes was determined in the stems of the both breeds. The functioning of additional genes (probably, *CesA6*, *CesA8*, *Cs1D*) was found in the stems of fiber flax, but they were not expressed in the stems of linseed.