

ГАЛИНОВСКИЙ Д.В.¹, ПОДВИЦКИЙ Т.А.¹, БАЕР Г.Я.², ПИРКО Я.В.², АНИСИМОВА Н.В.¹, ХОТЫЛЕВА Л.В.¹, ЕМЕЦ А.И.², КИЛЬЧЕВСКИЙ А.В.¹, БЛЮМ Я.Б.²

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: galinovsky@gmail.com

² ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,

Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2А, e-mail: blume@nas.gov.ua

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОСИНТЕЗИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА И ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ БЕЛКОВ В ПРОРОСТКАХ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

Льняное волокно является одним из самых крепких растительных волокон, поэтому его издавна используют для получения текстиля и усиления композиционных материалов [1, 2]. Чрезвычайно длинные волокна льна образуются на внешних тканях стебля между флоэмой и эпидермисом и достигают длины около 7 см. Известно, что направленный рост растительной клетки обусловлен отложением и изменениями компонентов клеточной стенки под действием тургорного давления. Соответственно, ключевым регуляторным элементом анизотропного роста и клеточной формы является направленное отложение целлюлозных фибрилл [3].

Основными структурными компонентами фибрилл являются молекулы целлюлозы, которые депонируются во вторичной клеточной стенке флоэмных волокон и во многом определяют физико-химические и технологические характеристики волокна льна. Биосинтез целлюлозы осуществляется связанным с цитоплазматической мембраной мультиферментным целлюлозо-синтезирующим комплексом. Плазматические мембранно-локализованные целлюлозо-синтезные комплексы, обеспечивающие синтез микрофибрилл целлюлозы, связываются с цитоскелетом и движутся вдоль кортикальных микротрубочек [3]. На протяжении достаточно длительного отрезка времени накоплены доказательства того, что микротрубочки, благодаря которым осуществляется доставка строительного материала целлюлозных волокон, в значительной степени определяют корректное отложение и ориентацию прочных целлюлозных фибрилл в растениях [4–6]. Для идентификации факторов, определяющих качество льноволокна целесообразно было бы сравнить уровень экспрессии генов, контролирующих синтез основных компонентов целлюлозосинтезирующего комплекса и

цитоскелета у различных форм льна. Возможно у растений, отличающихся по качеству льноволокна можно найти различия в функционировании генов, кодирующих целлюлозосинтезную розетку (гены целлюлозосинтаз) и белки цитоскелета (гены тубулина и актина), что, исходя из существующих представлений, может существенно влиять на качество и ориентацию фибрилл целлюлозы. Таким образом, изучение уровней экспрессии генов основных белков, вовлеченных в корректное отложение и ориентацию целлюлозных фибрилл (целлюлозосинтаза, тубулин и актин) в стеблях различных генотипов льна, отличающихся по качеству волокна, представляет значительный интерес для исследователей.

Материалы и методы

Для исследования были выбраны сорта льна-долгунца Блакіт (Беларусь) и Ariane (Франция), относящиеся к подвиду *elongatum* Vav. et Ell. и используемые для получения высококачественного волокна, а также образцы льна крупносемянного Endress Olajlen (subsp. *mediterraneum* Vav. et Ell.) и льна-прыгунца Dehiscens (subsp. *crepitans* Voenn.), существенно различающиеся по морфобиологическим признакам и не используемые в текстильной промышленности. РНК выделяли из гипокотилей десятидневных проростков льна, удаляя семядоли и корешки, по протоколу с использованием реагента TRI REAGENT фирмы Sigma (США). Контроль качества РНК осуществляли при помощи электрофореза образцов РНК в 1,5 % агарозном геле и по результатам спектрофотометрических измерений.

Перед постановкой обратной транскрипции пробы РНК обрабатывали ДНКазой. Реакцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10 мкл раствора РНК, 1 мкл ДНКазы1, 2 мкл 10X буфера для фермента и 7 мкл воды, обработанной DEPC.

Таблица 1

Праймеры к генам, использованным в исследованиях

Название гена	Продукт гена	Название праймера	Последовательности праймеров, 5'→3'	Ссылка
<i>LusCesA1</i>	целлюлозо-синтаза 1	BA12F1	GATCTAGAACCAAACATCGTT	–
		BA12R1	TCTCTGAGACATTAAGAGTGAC	
<i>LusCesA4</i>	целлюлозо-синтаза 4	BS58F14	TACGGTTATGATCCACCAGTGTC	–
		BS58R14	CGCTTCCCTCCCATTTCCTCTT	
<i>LusCesA7</i>	целлюлозо-синтаза 7	BS19F3	CGGCCAAAGATGGTAA	–
		BS19R5	GCAGGGCTAGAGGATGGA	
<i>LusCesA9</i>	целлюлозо-синтаза 9	BS13F3	ACGAGCACTTTATGAGCTAT	–
		BS13R2	GGTTTTGATTCTTCTCTCC	
ACT	актин	ACT-F	TCCAGGCCGTTCTTTCTCTA	[8]
		ACT-R	CTGTAAGGTCACGACCAGCA	
GAPDH	глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназа	GAPDH-F	AGGTTCTTCCCGCTCTCAAT	[8]
		GAPDH-R	CCTCCTTGATAGCAGCCTTG	
TUA	α -тубулин	TUA-F	CCTGTTGGGAGCTTTACTGC	[8]
		TUA-R	AAGGTGTTGAAGGCATCGTC	
ETIF1	фактор 1 инициации трансляции эукариот	ETIF1-F	CCTTGTAGGGCTGAGGGATT	[8]
		ETIF1-R	CTCATCAAGACCACCAGCAA	

Инкубировали 1 ч при температуре 37 °С, после чего инактивировали фермент, добавляя 2 мкл 0,5 М ЭДТА с последующей инкубацией в течение 15 мин при 65 °С.

Синтез кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя, с использованием олиго-дТ праймеров. Для каждой пробы проводили RT-контрольную реакцию. В реакционную смесь данного контроля входили все компоненты, кроме обратной транскриптазы. Позитивный контроль осуществлялся с использованием РНК-матрицы гена GAPDH, входящей в набор, а в качестве негативного контроля использовали реакционную смесь без матрицы.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в пробирках для ПЦР или 96-ти луночном планшете (Thermo Scientific, Великобритания). Объем реакционной смеси на один образец составлял 20 мкл и содержал 10 мкл 2X Т-буфера (S) для ДНК-полимеразы (Праймтех, Беларусь), нуклеотиды в конечной концентрации 0,2 мМ для каждого нуклеотида, прямой и обратный праймер в конечной концентрации 0,2 мкМ, 50–100 нг кДНК, 0,1 ед. ДНК-полимеразы

Tornado (Праймтех, Беларусь) и 0,1 мкл флуоресцентного красителя Zubr Green 100X (Праймтех, Беларусь) или с использованием набора SYBR® Green JumpStart™Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, США). Праймеры к генам, использованным в работе, приведены в таблице 1.

Реакцию амплификации проводили, используя амплификаторы CFX96 и Real-Time PCR IQ-Cycler (BioRad, США) по программе, представленной в таблице 2.

Таблица 2

Программа ПЦР в реальном времени для изучения экспрессии генов

Номер шага	Температура °С	Время мин.-сек	Количество циклов
1	95,0	15:00	1
2	99,0	0:01	44
3	58,0	0:10	
4	72,0	0:30	
5	Чтение плашки		
6	95,0	0:10	1
7	Кривая плавления от 65 °С до 95 °С: шаг 0,1 °С		0:05
8	Чтение плашки		

Специфичность амплификации в экспериментах определяли по наличию единичного пика на кривой плавления. Анализ экспрессии проводили с использованием ДДСт, метода [7]. В качестве референсных генов были использованы гены *GAPDH* и *ETIF1* [8].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований в изученных сортах льна, формирующих различное по качеству волокно, удалось детектировать экспрессию генов *LusCesA1*, *LusCesA4*, *LusCesA7*, *LusCesA9*, *Actin* и *TUA* (рис. 1).

Уровень экспрессии перечисленных генов на стадии проростков существенно различался. Экспрессия всех генов целлюлозосинтаз была значительно ниже экспрессии референсных генов, тогда как гены актина и тубулина экспрессируются гораздо интенсивнее. Уровень их экспрессии сопоставим с экспрессией референсных генов, особенно для генов тубулина у сортов льна крупносемянного (Endress Olajlen) и льна-прыгунца (Dehiscens).

Среди генов семейства целлюлозосинтаз в гипокотылях всех форм льна наиболее интенсивно экспрессируются гены *LusCesA4* и *LusCesA7*. Эти гены доминируют в общем пуле генов целлюлозосинтаз, в количественном выражении их экспрессия на 1–2 порядка выше экспрессии остальных *CesA*-генов. Наиболее низкий уровень экспрессии характерен для гена *LusCesA1* всех исследуемых сортов, причем у льна-прыгунца (Dehiscens) он минимален. Следует отметить, что в экспериментах на растительных тканях различных видов растений четко показано наличие двух групп генов, кодирующих целлюлозосинтазы, которые специфически экспрессируются при биогенезе первичной и вторичной клеточной стенки [9]. Так, для *A. thaliana* функционирование продуктов генов *AtCesA1*, *AtCesA2*, *AtCesA3*, *AtCesA5*, *AtCesA6* и *AtCesA9* связывают с образованием первичной клеточной стенки, экспрессия генов *AtCesA4*, *AtCesA7* и *AtCesA8* необходима для биогенеза более толстой и механически прочной вторичной клеточной стенки [10]. На основании проведенного ранее сравнительного анализа предполагают, что у льна-долгунца гены *LusCesA1* и *LusCesA9* ассоциированы с синтезом первичной клеточной стенки, а *LusCesA4* и *LusCesA7* – вторичной [11].

Сравнение сортов льна по уровню экспрессии генов целлюлозосинтаз и генов белков цитоскелета показало, что в сортах льна-долгунца

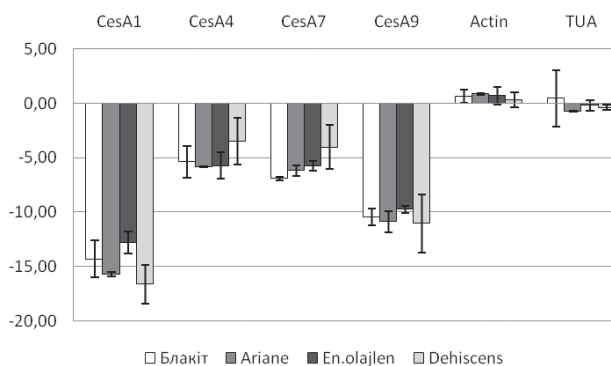


Рис. 1. Относительная экспрессия (\log_2 Отношение) *CesA*-генов, генов актина и α -тубулина в проростках различных образцов льна относительно референсных генов *GAPDH* и *ETIF1*

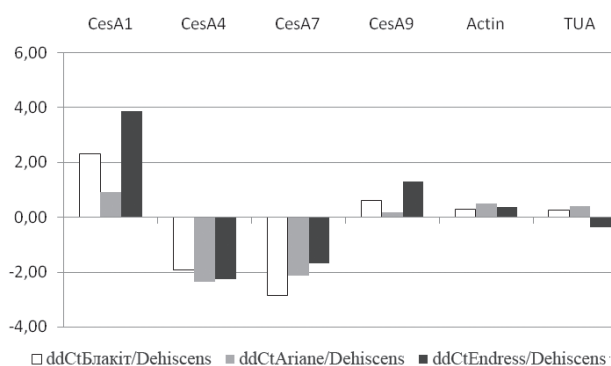


Рис. 2. Относительная экспрессия (\log_2 Отношение) *CesA*-генов, генов актина и α -тубулина. $\Delta\Delta C_T$ значения были рассчитаны относительно соответствующих генов льна-прыгунца (Dehiscens)

(Блакит, Ariane), формирующих высококачественное волокно, уровень экспрессии генов *LusCesA4* и *LusCesA7* оказался ниже, чем у льна-прыгунца (Dehiscens) (рис. 2).

Уровень экспрессии генов *LusCesA1* и *LusCesA9* оказался минимальным у льна-прыгунца (Dehiscens) и максимальным у сорта льна крупносемянного (Endress Olajlen). Образцы льна-долгунца (Блакит, Ariane) по уровню экспрессии этих генов занимают промежуточное положение. Вероятно, такое соотношение активности генов, вовлеченных в биогенез льноволокна, является оптимальным для формирования волокна высокого качества.

Экспрессия генов тубулина и актина в 10-дневных проростках всех исследуемых сортов находится приблизительно на одном уровне. Известно, что гены актина и тубулина часто используются для нормализации результатов экспрессии, однако ранее было показано, что

экспрессия генов актина нестабильна на разных стадиях развития растений [12]. То же касается и генов тубулина: показана стабильность экспрессии данного гена в процессе развития *Orobancha ramosa* [13], но по результатам geNorm анализа она оказалась неустойчивой в процессе развития и при абиотическом стрессе у *Lolium perenne* [14]. Также, при исследовании кандидатов для использования в качестве референсных генов у льна, показана нестабильность экспрессии генов актина и тубулина в процессе развития растений *L. usitatissimum* [8]. Как было показано нами ранее, в геноме льна предвидится существование 7 изоформ тубулина [15] и 10 генов, кодирующих актин. Поэтому в дальнейшем интересно было бы изучить экспрессию разных генов актина и изоформ тубулина в процессе развития растений льна.

Выводы

Таким образом, в сортах льна культурного, относящихся к разным подвидам, установлена

экспрессия генов целлюлозосинтаз первого, четвертого, седьмого и девятого классов. Было установлено, что ключевыми генами биосинтеза целлюлозы в десятидневных гипокотылях исследованных подвигов льна культурного, являются гены *LusCesA4* и *LusCesA7*, экспрессия которых на 1–2 порядка выше экспрессии *CesA*-генов других классов. Уровень экспрессии гена *CesA1* был самым низким (в несколько раз ниже *CesA9* и на несколько порядков ниже *CesA4* и *CesA7*). Между сортами обнаружены отличия по уровню экспрессии *CesA*-генов. В сортах льна-долгунца (Блакіт и Ariane subsp. *elongatum* Vav. et Ell), формирующих высококачественное волокно, уровень экспрессии генов *LusCesA4* и *LusCesA7* оказался ниже, чем у льна-прыгунца (*Dehiscens* subsp. *crepitans* Voenn.). Уровень экспрессии генов цитоскелета в целом оказался выше, чем генов целлюлозосинтаз у всех исследованных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kavadze E., Bar-Yosef O., Belfer-Cohen A., Boaretto E., Jakeli N., Matskevich Z., Meshveliani T. 30,000-Year-Old Wild Flax Fibers // *Science*. – 2009. – 325, N 5946. – P. 1359.
2. Dissanayake N.P.J., Summerscales J., Grove S.M., Singh M.M. Life cycle assessment of flax fiber for the reinforcement of composites // *J. Bio-Based Materials and BioEnergy*. – 2009. – 3. – P. 245–248.
3. Bringmann M., Landrein B., Schudoma C., Hamant O., Hauser M.-T., Persson S. Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthesis nexus unraveled // *Trends Plant Sci.* – 2012. – 11. – P. 666–674.
4. Baskin T.I. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model // *Protoplasma*. – 2001. – 215. – P. 150–171.
5. Baskin T.I., Beemster G.T., Judy-March J.E., Marda F. Disorganization of cortical microtubules stimulates tagential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2004. – 135. – P. 2279–2290.
6. Baskin T.I. Anisotropic expansion of the plant cell wall // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2005. – 21. – P. 203–222.
7. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method // *Methods*. – 2001. – 25. – P. 402–408.
8. Huis R., Hawkins S., Neutelings G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.) // *BMC Plant Biol.* – 2010. – 10. – P. 1–14. Doi: 10.1186/1471-2229-10-71.
9. Burton R.A., Gibeault D.M., Bacic A., Findlay K., Robertsc K., Hamiltont A., Baulcombed D.S., Finchera S. Viruss induced silencing of a plant cellulose synthase gene // *Plant Cell*. – 2000. – 12. – P. 691–705.
10. Kumar M., Thammannagowda S., Bulone V., Chiang V., Han K.H., Joshi C.P., Mansfield S.D., Mellerowicz E., Sundberg B., Teeri T., Ellis B.E. An update on the nomenclature for the cellulose synthase genes in *Populus* // *Trends Plant Sci.* 2009. 14. – P. 248–254.
11. Галиновский Д.В., Анисимова Н.В., Райский А.П., Леонтьев В.Н., Титок В.В., Хотылева Л.В. Гены целлюлозосинтаз, контролирующие формирование волокна льна (*Linum usitatissimum* L.) // *Генетика*. – 2014. – 50, № 1. – С. 26–34.
12. Guenin S., Mauriat M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C., Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references // *J. Exp. Bot.* – 2009. – 60. – P. 487–493.
13. Gonzamlez-Verdejo C., Die J., Nadal S., Jimenez-Marimn A., Moreno M., Romam B. Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR: Analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobancha ramosa* development // *Anal. Biochem.* – 2008. – 379. – P. 38–43.
14. Martin R., Hollenbeck V., Dombrowski J. Evaluation of Reference Genes for Quantitative RT-PCR in *Lolium perenne* // *Crop Sci.* – 2008. – 48. – P. 1881–1887.
15. Баер Г.Я., Пидюра М.О., Пірко Я.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук послідовностей генів, що кодують актин у геномі льону // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2014. – С. 146–150.

GALINOUSKY D.V. ¹, PADVITSKI T.A. ¹, BAYER G.YA. ², PIRKO YA.V. ², ANISIMOVA N.V. ¹, KHOTYLEVA L.V. ¹, YEMETS A.I. ², KILCHEVSKY A.V. ¹, BLUME YA.B. ²

¹ *Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: galinowsky@gmail.com*

² *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2^o, e-mail: galinabayer@mail.ru*

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF CELLULOSE SYNTHASE COMPLEX AND THE CYTOSKELETAL PROTEINS IN FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.) SEEDLINGS

Aims. Study of gene expression involved in the correct orientation and deposition of cellulose fibrils in the stems of different genotypes of flax (Blakit and Ariane, Endress Olajlen and Dehiscens) differing in fiber quality is one of the considerable interest for researchers. **Methods.** The RT-PCR and qPCR for gene expression analysis of cellulose synthase complex (*Ces* genes) and the cytoskeleton (actin and tubulin genes) in seedlings of flax were used. **Results.** The expression of genes *LusCesA1*, *LusCesA4*, *LusCesA7*, *LusCesA9*, *Actin* and *Tubulin (TUA)* in ten-days hypocotyls all of the studied varieties of flax were described. **Conclusions.** It was found that the key cellulose biosynthesis genes in hypocotyls of flax were *LusCesA4* and *LusCesA7* whose expression is 1–2 orders of magnitude higher than expression of *CesA* genes of other classes. In the varieties of flax, forming a high-quality fiber, the level of gene expression *LusCesA4* and *LusCesA7* were lower than that of flax Dehiscens. The level of gene expression of the cytoskeleton as a whole was higher than *Ces* genes in all the samples studied.

Keywords: flax, cellulose synthase complex, actin, tubulin, RT-PCR, qPCR, gene expression.