

Оригинальные работы

УДК 633.52:577.21:632.165

Е.Н. ШИША¹, В.И. КОРХОВОЙ¹, Г.Я. БАЕР¹,
Е.В. ГУЗЕНКО², В.А. ЛЕМЕШ², Н.А. КАРТЕЛЬ²,
А.И. ЕМЕЦ¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики
Национальной академии наук Украины», Киев

² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск
E-mail: elenashysha@mail.ru

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.) ХИМЕРНЫМ ГЕНОМ *GFP-TUA6* ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК



Представлены результаты по агробактериальной трансформации ряда сортов льна-долгунца, районированных в Республике Беларусь и Украине, плазмидой, которая содержит химерный ген GFP-TUA6 и селективный ген прtII. При проведении экспериментов учитывали факторы, влияющие на эффективность трансформации, а именно оптическую плотность, время инокуляции эксплантов с агробактерией и условия кокультивирования. На селективной среде, содержащей канамицин в концентрации 100 мг/л, отобраны линии, трансгенная природа которых подтверждена с помощью ПЦР-анализа. Экспрессию химерного гена GFP-TUA6 изучали с помощью конфокальной лазерной микроскопии. Полученные нами линии в дальнейшем могут быть использованы для углубленного изучения роли микротрубочек в формировании волокон, а также механической устойчивости к полеганию у льна-долгунца.

© Е.Н. ШИША, В.И. КОРХОВОЙ, Г.Я. БАЕР,
Е.В. ГУЗЕНКО, В.А. ЛЕМЕШ, Н.А. КАРТЕЛЬ,
А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2013

Введение. Лен возделывается как техническая культура в течение уже многих тысяч лет, и недавние исследования позволили обнаружить следы льняных волокон в пещерах Грузии еще периода палеолита (30 тыс. лет тому назад) [1]. Льняное волокно является одним из самых крепких растительных волокон, поэтому его используют в основном для получения текстиля и усиления композиционных материалов [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. Ключевым регуляторным элементом анизотропного роста и, соответственно, клеточной формы является направленное отложение целлюлозных фибрилл [3]. В отложении же волокон определяющую роль играет целлюлозосинтазный комплекс, гены которого сейчас интенсивно изучаются у льна [4]. Плазматические целлюлозосинтазные комплексы, локализованные на мембране и обеспечивающие синтез микрофибрилл, связываются с микротрубочками и движутся вдоль кортикальных микротрубочек [3]. На протяжении достаточно длительного отрезка времени накоплено много доказательств того, что микротрубочки, благодаря которым осуществляется доставка строительного материала целлюлозных волокон, в значительной степени определяют корректное отложение и ориентацию прочных целлюлозных фибрилл в растениях [5–7].

Результаты протеомного анализа волокон льна подтверждают тот факт, что в белковом экстракте волокон находится намного больше структурных компонентов цитоскелета, так же как и белков, ответственных за везикулярный транспорт, по сравнению с другими окружающими тканями [8]. Так, волокна по меньшей мере в 1,5 раза больше обогащены тубулином и актином. Этих белков может быть больше в волокнах по сравнению с фракцией не содержащих их клеток из-за различий, в частности в архитектуре и в соотношении поверхности/объема указанных клеток. В дополнение к этому относительно повышенное содержание цитоскелетных белков в волокнах, приводящее к утолщению

клеточной стенки, может указывать на роль цитоскелета в отложении целлюлозы и других компонентов клеточной стенки. Предполагают, что в развивающихся волокнах льна существует также активная секреторная система, участвующая в доставке нецеллюлозных полисахаридных компонентов в клеточную стенку; допускают, что обогащение миозином, динамин-подобными белками и ингибитором диссоциации ГДФ также согласуется с процессами развития, которые наиболее активно выражены в этих клетках.

Очевидно, что и другие компоненты цитоскелета, а не только те, которые играют структурную роль (например, тубулин и актин), могут проявлять дополнительные функции, специфически связанные с секрецией и иными аспектами отложения вторичной клеточной стенки [9]. Результаты недавних исследований, обобщенные в обзоре [3], свидетельствуют о том, что ранее идентифицированный мутант арабидопсиса *rom2* кодирует большой целлюлозосинтазный взаимодействующий белок (CSI1), который специфически связывает микротрубочки.

Дальнейшие работы в направлении изучения клеточных механизмов взаимодействия целлюлозосинтазного комплекса и микротрубочек, а также взаимодействия последних с формирующимися микрофибриллами льняных волокон могут открыть новые возможности для создания сортов льна с устойчивостью к полеганию. Поскольку лен является важной технической культурой для Украины, ранее нами были проведены работы по введению в культуру *in vitro* разных сортов льна-долгунца отечественной и зарубежной селекции, характеризующихся различной устойчивостью к полеганию [10], и этот материал может быть эффективно использован для подобного рода исследований. Для разработки удобных моделей на основе используемого нами материала с целью углубленного изучения роли микротрубочек в процессах отложения, ориентации и поддержания структуры льняного волокна можно использовать химерный ген тубулина, слитый с репортерным геном зеленого флюоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequorea victoria* [11], экспрессия которого позволяет визуализировать различные

построения микротрубочек *in vivo* в растительных клетках [12, 13] и изучать особенности их функционирования [14]. Однако следует отметить, что сообщения о разработке успешных методик генетической трансформации растений льна-долгунца конструкциями, которые содержат ген, кодирующий GFP, в связке с генами, отвечающими за биосинтез других белков, пока немногочисленны [15].

Поэтому цель настоящего исследования – разработать эффективный метод генетической трансформации наиболее регенерационно-способных сортов льна-долгунца с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, которая несет химерный ген тубулина *TUA6* из *Arabidopsis thaliana*, слитый с репортерным геном *GFP*, получить трансгенные растения с целевым геном, осуществить их молекулярно-генетический анализ и изучить экспрессию перенесенного гена в клетках трансгенных линий.

Материалы и методы. В работе использовали 11 сортов льна-долгунца отечественной и зарубежной селекции. Семена сортов Вручий, Зоря 87, Рушнычок, Свитанок, Томский 16, Украинский 3 любезно предоставлены Институтом лубяных культур и фитофармацевтического сырья НААН Украины, семена сортов Весна, Вита, Дашковский, К-65 и Нива – Институтом цитологии и генетики НАН Беларуси. Методики введения в культуру *in vitro*, регенерации побегов из сегментов гипокотилей льна, их роста и укоренения, а также все необходимые для этих процессов среды разработаны и описаны нами ранее [10].

Для генетической трансформации льна-долгунца использовали супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, несущий бинарный вектор pBI121, Т-ДНК которого содержала химерный ген *GFP-TUA6* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV). В качестве селективного маркерного гена векторная конструкция содержала ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к канамицину [12]. Конструкция (рис. 1) любезно предоставлена д-ром Т. Хашимото (Институт науки и технологии Нара, Япония).

Для подбора условий с целью обеспечения эффективной генетической трансформации

льна сначала провели эксперименты по определению селективной концентрации канамицина как селективного агента. С этой целью в среду для регенерации побегов льна добавляли канамицин в различных концентрациях (50–200 мг/л) и размещали на ней экспланты шестисуточных асептических проростков семян льна-долгунца. В качестве контроля использовали среду без селективного агента. Экспланты инкубировали в условиях рассеянного света в течение трех недель при 16-часовом световом периоде и температуре 24–26 °С. Для каждой отдельной концентрации проводили опыты в трех повторностях.

Для трансформации экспланты гипокотилей шестисуточных проростков льна инкубировали в суспензии клеток ночной культуры *Agrobacterium tumefaciens*. С этой целью бактерии наращивали в среде LB [16] с добавлением 50 мг/л канамицина и 100 мг/л рифампицина на орбитальном шейкере (200 об./мин) при температуре 28 °С. Затем их центрифугировали 15 мин при 4000 об./мин, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в жидкой среде МС без добавления сахарозы и фитогормонов. Для кокультивирования с эксплантами использовали агробактериальную суспензию с оптической плотностью (OD₆₀₀) 0,3–0,5. Инокуляцию эксплантов агробактерией проводили в течение 1 ч, после чего их переносили на модифицированную среду МС, содержащую 200 мг/л мио-инозитола, 250 мг/л MES, 20 г/л сахарозы. Время кокультивирования агробактерии и эксплантов составляло от 1 до 3 сут.

Побеги регенерировали на селективной среде, содержащей 100 мг/л канамицина, а также 400 мг/л карбенициллина для элиминации агробактерии. Укоренение отобранных побегов осуществляли на среде для роста и развития растений льна-долгунца [10] в присутствии 10 мг/л канамицина. Частоту трансформации определяли как процентное соотношение количества эксплантов с регенерировавшими на селективной среде побегами к общему числу взятых для эксперимента эксплантов.

Для подтверждения наличия перенесенных чужеродных генов у отобранных и укоренившихся на селективных средах растений льна-



Рис. 1. Схема конструкции pBI121 с химерным геном *GFP-TUA6*

долгунца и у их потомства T₁ был проведен молекулярно-генетический анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК из растений выделяли, используя набор Plant DNA Isolation Kit («Sigma», Германия). Для проверки интеграции химерного гена *GFP-TUA6* в геном отобранных линий использовали праймеры к фрагменту последовательности 35S-промотора, синтезированные в Ин-те пищевой биотехнологии и геномики в концентрации 1 мкМ: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' и 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'. Размер амплифицированного фрагмента составлял 195 п.н. В состав реакционной смеси для ПЦР (объемом 25 мкл) входило 500 нг геномной ДНК, 0,1 ед. *Taq*-полимеразы («Fermentas», Литва), 5×ПЛР-буфер с сульфатом аммония («Хеликон», РФ), 200 мкМ каждого дНТФ («Хеликон», РФ) и праймеры в упомянутой концентрации. Реакцию проводили на амплификаторе PCR Applied Biosystem 2720 (США) при соблюдении следующих условий: первичная денатурация – 4 мин при 94 °С; далее 25 циклов: 30 с – 94 °С, 40 с – 54 °С, 1 мин – 72 °С, конечная элонгация – 7 мин при 72 °С. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Параллельно проводили ПЦР-анализ некоторых отобранных растений с целью проверки наличия в их геноме кодирующей последовательности селективного маркерного гена *nptII*. Для амплификации участка последовательности этого гена использовали две пары праймеров: 1) 5'-AATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' и 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3', дающие фрагмент величиной 622 п.н.; 2) 5'-GAGGCTATTCGGCTATGAT-3' и 5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3' (840 п.н.). Реакционная смесь содержала 500 нг исследуемой ДНК, 0,5 ед. *Taq*-ДНК полимеразы («Fermentas», Литва), 5×ПЛР-буфер с сульфатом аммония («Хеликон», РФ), 200 мкМ каждого дНТФ («Хели-

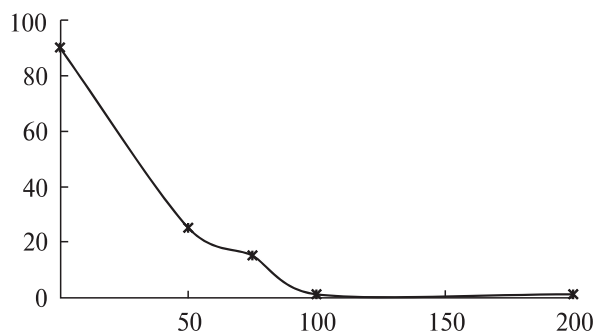


Рис. 2. Влияние различных концентраций канамицина (по горизонтали, мг/л) на частоту регенерации побегов с explantов гипокотилей льна-долгунца (по вертикали, %)

кон», РФ). Реакцию для первой пары праймеров осуществляли при следующих условиях: первичная денатурация 5 мин при 94 °С; далее 25 циклов: 30 с – 94 °С, 45 с – 65 °С, 40 с – 72 °С, конечная элонгация 7 мин при 72 °С; для второй пары праймеров – первичная денатурация 5 мин при 94 °С; затем 25 циклов: 30 с – 94 °С, 60 с – 60 °С, 40 с – 72 °С, конечная элонгация 7 мин при 72 °С. Далее продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле.

Интеграцию белка TUA6-GFP в нативные структуры микротрубочек клеток трансгенных линий льна изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия).

Результаты исследований и их обсуждение.

В качестве explantов для агробактериальной трансформации в работе использовали гипокотили шестисуточных проростков льна-долгунца, поскольку они, как установлено ранее, являются наиболее подходящим материалом для подобного рода манипуляций [17–20]. Так как для осуществления успешной генетической трансформации любого вида растений прежде всего необходимо подобрать соответствующие условия для эффективной регенерации побегов или полноценных растений, нами были подобраны среды для введения в культуру *in vitro* и регенерации растений. Хорошо известно, что для *L. usitatissimum* в значительной степени выражена зависимость регенерации побегов от выбранного генотипа [21–39]. В связи с этим для агробактериальной трансформации

из сортов льна-долгунца с охарактеризованными ранее особенностями морфогенетического ответа [10] отобраны сорта с самыми высокими показателями частоты и эффективности регенерации побегов, а также их укоренения – Томский 16, Украинский-3, Свитанок, Вручий, Рушнычок, Весна и Вита.

Для эффективного отбора трансформантов льна-долгунца предварительно проведены эксперименты по установлению селективной концентрации канамицина путем оценки его влияния на регенерацию и жизнеспособность побегов, индуцированных из explantов гипокотилей (рис. 2). Оказалось, что канамицин при всех используемых концентрациях (50–200 мг/л) ингибировал инициацию побегов на explантах по сравнению с контролем. На средах, содержащих канамицин в концентрациях 50 и 75 мг/л, после трех недель культивирования наблюдали образование одиночных, но жизнеспособных побегов. В дальнейшем побег, регенерировавший в присутствии 50 мг/л канамицина, оставались жизнеспособными и продолжали свой рост, в то время как на среде, содержащей канамицин в концентрации 75 мг/л, большая часть побегов начинала некротизироваться, что в дальнейшем приводило к их полной гибели. Канамицин в концентрации 100 мг/л ингибировал индукцию регенерации побегов, и хотя в некоторых случаях происходило формирование каллуса на explантах гипокотилей, при дальнейшем культивировании они некротизировали и погибали. При добавлении в среду 200 мг/л канамицина в течение предельно короткого срока происходила полная гибель исследуемых explantов.

Поскольку канамицин угнетал формирование побегов уже в концентрации 100 мг/л, то эта концентрация и была выбрана для селекции трансгенных растений льна-долгунца. Ранее аналогичная концентрация канамицина была использована и для селекции трансгенных линий масличного льна [17], а также нами для получения трифлюралин-устойчивых линий льна-долгунца [20, 30].

Необходимыми факторами, определяющими эффективность трансформации, являются оптическая плотность бактериальной суспензии и время кокультивирования explantов

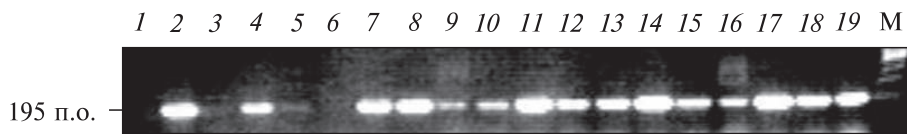


Рис. 4. Результаты ПЦР-анализа растений льна-долгунца, трансформированных химерным геном *GFP-TUA6* с использованием праймеров к последовательности 35S промотора CaMV: 1 – негативный контроль (ДНК нетрансформированного растения); 2 – позитивный контроль (плазмида pBI121); 3 – сорт Томский 16, линия 1; 4 – сорт Томский 16, линия 2; 5 – сорт Свитанок, линия 3; 6 – сорт Свитанок, линия 4; 7 – сорт Свитанок, линия 5; 8 – сорт Свитанок, линия 6; 9 – сорт Свитанок, линия 7; 10 – сорт Свитанок, линия 8; 11 – сорт Свитанок, линия 9; 12 – сорт Свитанок, линия 10; 13 – сорт Свитанок, линия 11; 14 – сорт Свитанок, линия 12; 15 – сорт Рушнычок, линия 1; 16 – сорт Украинский-3, линия 4; 17 – сорт Украинский-3, линия 5; 18 – сорт Вита, линия 1; 19 – сорт Весна, линия 1; М – маркер молекулярных масс

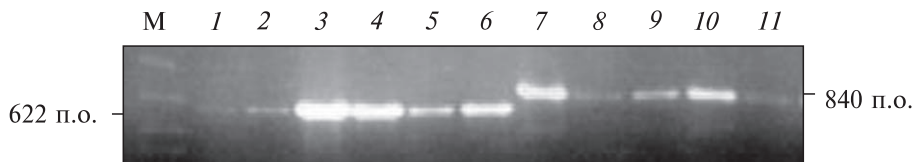


Рис. 5. Результаты ПЦР-анализа трансгенных линий льна-долгунца, трансформированных геном *GFP-TUA6* с использованием праймеров к гену *nptII*: 1 – негативный контроль 1 (дистиллированная вода); 2 – негативный контроль 2 (ДНК нетрансформированного растения); 3 – позитивный контроль (плазмида pBI121); 4 – сорт Украинский-3, линия 5; 5 – сорт Свитанок, линия 7; 6 – сорт Свитанок, линия 12; 7 – позитивный контроль (плазмида pBI121); 8 – сорт Вручий, линия 1; 9 – сорт Свитанок, линия 8; 10 – сорт Свитанок, линия 10; 11 – сорт Украинский-3, линия 3

с агробактерией. В ходе экспериментов установлено, что максимальная эффективность трансформации сегментов гипокотилей льна конструкцией pBI121, несущей ген *GFP-TUA6*, достигается при значении оптической плотности (OD_{600}) агробактериальной суспензии, равной 0,4. При этом следует отметить, что как при значении $OD_{600} = 0,3$, так и при значении $OD_{600} = 0,5$ нам не удалось получить ни одной трансгенной линии. Экспланты гипокотилей, инокуляцию которых проводили суспензией клеток агробактерии с оптической плотностью $OD_{600} = 0,3$, через 3–4 нед после перенесения на среду для селекции некротизировали и в дальнейшем погибали. При значении $OD_{600} = 0,5$ наблюдалась очень сильная контаминация исходного материала агробактерией, от которой невозможно было избавиться даже при добавлении в среду для селекции антибактериальных агентов карбенициллина или цефотаксима в концентрациях 400–500 мг/л.

Экспериментально также установлено, что оптимальное время кокультивирования экс-

плантов с агробактерией составляет 2 сут. Очевидно, что кокультивирование на протяжении 24 ч недостаточно для интеграции экзогенной ДНК в геном растительного материала, так как при соблюдении этих условий не удалось регенерировать на селективной среде ни одного побега. При увеличении времени кокультивирования до трех суток (при $OD_{600} = 0,4$) нам не удавалось элиминировать бактерию, в результате чего происходила 100%-ная гибель эксплантов. Таким образом, в ходе экспериментов установлено, что для достижения положительных результатов при проведении *Agrobacterium*-опосредуемой трансформации льна-долгунца необходимо использовать суспензию бактериальных клеток, имеющую значение $OD_{600} = 0,4$, а время кокультивирования эксплантов гипокотилей с агробактерией не должно превышать двух суток.

В результате селекции условно трансгенных побегов из сегментов гипокотилей исследуемых сортов льна-долгунца в присутствии 100 мг/л канамицина был отобран ряд линий, часть которых при перенесении на сре-

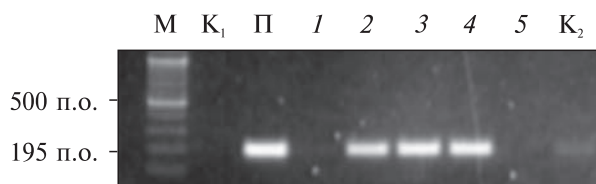


Рис. 7. Результаты ПЦР-анализа трансгенных растений поколения T_1 сорта Свитанок, линия 12 с использованием праймеров к последовательности 35S промотора CaMV: М – маркер молекулярных масс, K_1 – контроль (H_2O), П – плазмидная ДНК, 1–5 – ДНК трансгенных растений поколения T_1 , K_2 – контроль (ДНК из нетрансформированной линии льна-долгунца)

ду для корнеобразования формировали корневую систему в присутствии 10 мг/л упомянутого антибиотика (рис. 3, см. вклейку в конце номера). Необходимо также подчеркнуть, что для укоренения отбирали побеги, инициированные в местах проникновения агробактерии в гипокотили, что позволяет избежать отбора химерных побегов [18, 19, 31]. В целом нами укоренено 17 линий нескольких сортов льна-долгунца.

Для доказательства трансгенной природы полученных линий провели их ПЦР-анализ с использованием специфических праймеров к 35S-промотору и гену *nptII*. На рис. 4 представлены результаты амплификации последовательности 35S промотора с помощью ПЦР у 17 отобранных линий льна. Из электрофореграммы видно, что размеры амплифицированных фрагментов ДНК соответствуют позитивному контролю и составляют 195 п.н. При этом при анализе ДНК нетрансформированных растений специфических фрагментов не обнаружено. Несколько отселектированных линий льна-долгунца также были выборочно проанализированы на наличие в их геноме последовательности, кодирующей ген *nptII*. Для этого использовали две пары праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты ДНК размером 622 и 840 п.н. Фрагменты таких размеров обнаружили у пяти из семи проанализированных линий, что также свидетельствует об их трансгенной природе (рис. 5, см. вклейку в конце номера). Соответственно, результаты проведенного молекулярно-генетического анализа отселектированных линий *L. usitatissimum* продемонстрировали, что

не все регенеранты имели в своем геноме последовательности 35S-промотора или гена *nptII*.

Впоследствии все линии (T_0), трансгенная природа которых подтверждена с помощью ПЦР-анализа, были адаптированы к условиям закрытого грунта. После проведения их самоопыления получили семена (T_1), которые повторно высевали в закрытый грунт для оценки их всхожести. Установили, что полученные семена льна сохраняли фертильность и обладали хорошей всхожестью, а растения (T_1) в процессе своего онтогенеза ничем не отличались от контрольных (рис. 6, см. вклейку в конце номера).

Для доказательства наследования чужеродных генов в первом поколении трансгенных растений льна-долгунца проводили их ПЦР-анализ с использованием праймеров к последовательности 35S промотора. Как видно из электрофореграммы (рис. 7), у части проанализированных линий T_1 обнаружен фрагмент размером 195 п.н. Известно, что в первом поколении трансгенных растений, полученных в результате самоопыления, привнесенные чужеродные гены наследуются как единичные локусы в соотношении 3:1 [32–34]. Сходный характер расщепления свойствен и полученным линиям льна, однако есть достаточные основания предполагать, что в наших экспериментах расщепление также произошло по моногибридной схеме, т.е. 3:1.

Поскольку известно, что продукт экспрессии химерного гена *GFP-TUA6* – GFP-меченный тубулин – способен инкорпорироваться в нативные микротрубочки растительных клеток [12], нами наряду с молекулярно-генетическим анализом полученных трансгенных линий льна-долгунца визуализированы микротрубочки в их интерфазных клетках с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Установлено, что химерный белок GFP-тубулин способен встраиваться в кортикальные микротрубочки, вызывая их свечение в клетках (рис. 8, см. вклейку в конце номера), что свидетельствует об экспрессии перенесенного чужеродного гена в трансгенных линиях. Следует отметить, что к настоящему времени это

первые данные о визуализации GFP-меченого тубулина в стабильных трансформантах льна-долгунца, хотя ранее с использованием этого химерного гена удалось визуализировать микротрубочки в живых клетках трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* [12].

Ранее сообщалось только о визуализации эндоплазматического ретикула в клетках льна-долгунца с помощью трансформации конструкцией, содержащей GFP5ER [35]. В другой работе эти же исследователи приводят положительные результаты по транзientной экспрессии цитоскелетных репортерных генов *35S::GFP:ABD2* (с визуализацией актиновых филаментов) и *35S::GFP:MBD* (с визуализацией микротрубочек), полученной вследствие биолиственной трансформации клеток семядольных листьев и сегментов гипокотилей льна-долгунца [15].

Таким образом, в ходе наших исследований продемонстрирована успешная агробактериальная трансформация льна-долгунца химерным геном *GFP-TUA6* в комбинации с селективным маркерным геном *nptII*. Результаты ПЦР-анализа подтвердили трансгенную природу отобранных на канамицине линий и их потомков в первом поколении. Установлено также, что GFP-меченный тубулин успешно кополимеризуется с эндогенным тубулином и принимает участие в формировании кортикальной сети микротрубочек в трансгенных клетках льна-долгунца. Хотя имеются сообщения о том, что интрузивный рост клеток, который характерен для растений, содержащих волокна, и в частности для льна, не удается воспроизвести в культуре *in vitro* [36], разработка новых клеточно-биологических подходов для прижизненного формирования волокон при развитии органов и регенерации растений из недифференцированных клеток открывает новые экспериментальные возможности. Полученные нами линии в дальнейшем могут быть использованы для углубленного изучения роли микротрубочек в формировании волокон, а также механической устойчивости к полеганию у льна-долгунца.

Работа выполнена при поддержке совместных грантов с Республикой Беларусь и Государственного фонда фундаментальных исследований

ний Украины, гранты № 14.4/023 (2007–2008) и № 29.4/016 (2009–2010).

*E.N. Shysha, V.I. Korhovyu, G.Ya. Bayer,
E.V. Guzenko, V.A. Lemesh, N.A. Kartel,
A.I. Yemets, Ya.B. Blume*

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: elenashysha@mail.ru

GENETIC TRANSFORMATION OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.) WITH CHIMERIC *GFP-TUA6* GENE FOR VISUALISATION MICROTUBULE

The data of *Agrobacterium*-mediated transformation of some *Linum usitatissimum* cultivars zoned on the territories of Belarus and Ukraine with the plasmid carrying chimeric *GFP-TUA6* gene and *nptII* gene as selectable marker conferring resistance to kanamycin are presented in this study. Transformation was affected by a number of factors including optical density (OD₆₀₀), time of inoculation of explants with *Agrobacterium* and co-culture conditions. Transgenic nature of obtained lines was confirmed by PCR analysis. Expression of *GFP-TUA6* gene was detected with confocal laser scanning microscopy. The obtained transgenic lines can be used for further functional studies the role of microtubules in the processes of building the flax fibres and resistance to wind.

*О.М. Шиша, В.І. Корховий, Г.Я. Баєр,
О.В. Гузенко, В.О. Лемеш, М.О. Картель,
А.І. Ємець, Я.Б. Блюм*

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РОСЛИН ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ (*LINUM USITATISSIMUM* L.) ХІМЕРНИМ ГЕНОМ *GFP-TUA6* ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ МІКРОТРУБОЧОК

Представлено результати з агробактеріальної трансформації ряду сортів льону-довгунця, районуваних на територіях Білорусі та України, за допомогою плазмід, що містила химерний ген *GFP-TUA6* та селективний маркерний ген *nptII*, який несе стійкість до канаміцину. При проведенні трансформації враховували фактори, що впливають на ефективність трансформації, а саме оптичну щільність, оптимальний проміжок часу інюкуляції експлантів з агробактерією та умови кокультивування. На селективному середовищі, що містило канаміцин в концентрації 100 мг/л, відібрано лінії, трансгенна природа яких була підтверджена за допомогою ПЛР-аналізу. Експресію химерного гена *GFP-TUA6* детектовано за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікро-

скопії. Отримані в ході наших досліджень лінії в подальшому можуть бути використані для поглибленого вивчення ролі мікротрубочок в процесах формування волокна, а також механічної стійкості до полягання у льону-довгунця.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kvavadze 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**, № 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 BioEnergy*. – 2009. – **3**, № 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 synthase nexus unraveled // *Trends Plant Sci*. – 2012. – **17**, № 11. – P. 666–674.
4. *Грушецкая З.Е., Лемеш В.А., Хотылева Л.В.* Создание специфических и выродженных праймеров к генам *CesA* целлюлозосинтазы льна (*Linum usitatissimum* L.) // *Цитология и генетика*. – 2010. – **44**, № 4. – С. 3–8.
5. *Baskin T.I.* On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model // *Protoplasma*. – 2001. – **215**. – P. 150–171.
6. *Baskin T.I.* Anisotropic expansion of the plant cell wall // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. – 2005. – **21**. – P. 203–222.
7. *Baskin T.I., Beemster G.T., Judy-March J.E., Marada 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.
8. *Hotte N.S.C., Deyholos M.K.* A flax fibre proteome: identification of proteins enriched in bast fibres // *BMC Plant Biol*. – 2008. – **8**. – P. 52.
9. *Boutte Y., Vernhettes S., Satiat-Jeunemaitre B.* Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organization // *Cell Biol. Int*. – 2007. – **31**. – P. 649–654.
10. *Шуша Е.Н., Емец А.И., Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Картель Н.А., Блюм Я.Б.* Изучение регенерационной способности и корнеобразования сортов льна-долгунца украинской и белорусской селекции // *Физиология и биохимия культур растений*. – 2011. – **43**, № 1. – С. 57–64.
11. *Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J.* Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein // *Gene*. – 1992. – **111**. – P. 229–233.
12. *Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T.* Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* // *Protoplasma*. – 1999. – **206**. – P. 201–206.
13. *Kumagai F., Yoneda A., Tomida T., Sano T., Nagata T., Hasezawa S.* Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells // *Plant Cell Physiol*. – 2001. – **42**, № 7. – P. 723–732.
14. *Krasylenko Yu., Yemets A., Sheremet Ya., Blume Ya.B.* Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in *Arabidopsis* // *Physiol. Plant*. – 2012. – **145**, № 4. – P. 501–515.
15. *Bleho J., Šamaj J.* Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transient transformation events in flax explants // *Agriculture (Po'nohospodárstvo)*. – 2010. – **56**, № 4. – P. 99–105
16. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning. Book 1. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – P. 630–631.
17. *Dong J.Z., McHugen A.* An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Sci*. – 1993. – **88**. – P. 61–71.
18. *Dong J.Z., McHughen A.* Transgenic flax plants from *Agrobacterium tumefaciens* transformation – incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants // *Plant. Sci*. – 1993. – **91**. – P. 139–138
19. *Полякова А.В., Чиркизова О.Ф., Каляева М.А. и др.* Трансформация растений льна-долгунца // *Физиология растений*. – 1998. – **45**, № 6. – С. 882–887.
20. *Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Baird V., Blume Ya.* The development of transformation vectors based upon modified plant *a*-tubulin gene as a selectable marker // *Cell. Biol. Int*. – 2008. – **32**, № 5. – P. 566–570.
21. *Ling H.Q., Binding H.* Plant regeneration from protoplasts in *Linum* // *Plant Breed*. – 1987. – **98**. – P. 312–317.
22. *Ling H.Q., Binding H.* Improvement of plant regeneration from protoplasts by the induction of somatic embryogenesis // *J. Plant. Physiol*. – 1992. – **139**. – P. 422–426.
23. *Белоговова М.А., Ралдугина Г.Н.* Регенерация побегов на семядольных эксплантах льна-долгунца и их укоренение // *Физиология растений*. – 2006. – **53**, № 4. – С. 142–148.
24. *Bretange B., Chupeau M.-C., Chupeau Y., Fouil-*

- loux G.* Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source // *Plant Cell Rep.* – 1994. – **14**. – P. 120–124.
25. *Dedicova B., Hricova A., Samaj J., Obert B., Bobak A., Pretova A.* Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments // *J. Plant. Physiol.* – 2000. – **157**. – P. 327–334.
26. *Баер О.А., Баер Г.Я., Емец Я.Б., Блюм Я.Б.* Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // *Физиология и биохимия культур. растений.* – 2004. – **36**, № 1. – С. 48–54.
27. *Nichterlein K., Umbach H., Friedt W.* Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Euphytica.* – 1991. – **58**. – P. 157–164.
28. *Chen Y., Kenaschuk E.O., Dribnenki P.* Response of flax genotypes to doubled haploid production // *Plant Cell Tissue Org. Cult.* – 1999. – **57**. – P. 195–198.
29. *Chen Y., Dribnenki P.* Effect of genotype and medium composition on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture // *Ibid.* – P. 204–207.
30. *Емец А.И., Баер О.А., Радчук В.В., Блюм Я.Б.* Агробактериальная трансформация льна-долгунца мутантным геном тубулина, несущим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам // *Генетика.* – 2009. – **45**, № 10. – С. 1377–1385.
31. *Jordan M., McHughen A.* Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots // *Plant Cell Rep.* – 1988. – **7**. – P. 285–287.
32. *Misra S., Gedamu L.* Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – **78**. – P. 161–168.
33. *Denis M., Delourme R., Gourret J.P., Mariani C., Renard M.* Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus* // *Plant Physiol.* – 1993. – **101**. – P. 1295–1304.
34. *Budar F., Thia-Thoong L., Van Montagu M., Hernals- teens J.P.* *Agrobacterium*-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor // *Genetics.* – 1986. – **114**. – P. 303–313.
35. *Bleho J., Obert B., Takáč T., Petrovská B., Heym C., Menzel D., Šamaj J.* ER disruption and GFP degradation during non-regenerable transformation of flax with *Agrobacterium tumefaciens* // *Protoplasma.* – 2012. – **249**. – P. 53–63.
36. *Снегирева А.В., Агеева М.В., Аменицкий С.И., Чернова Т.Е., Эбскамп М., Горшкова Т.А.* Интрузивный рост волокон склеренхимы // *Физиология растений.* – 2010. – **57**, № 3. – С. 361–375.

Поступила 24.07.12