

УДК 633.52-575.113:577.21

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ И РЕПРОДУКЦИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

© 2014 г. В. А. Лемеш*, Т. Е. Саматадзе**, Е. В. Гузенко*, Е. В. Железнякова*, А. В. Амосова**, А. В. Зеленин**, О. В. Муравенко**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Российская Федерация, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: olgmur1@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.01.2014 г.

Окончательный вариант получен 03.02.2014 г.

С использованием биобаллистической трансформации гипокотильных эксплантов льна-долгунца сорта Василек получены первичные трансформанты, несущие генетическую конструкцию с химерным геном *gfp-ua6*. Жизнеспособные модифицированные растения послужили основой для создания самопыленных линий, у которых подтверждено наследование введенной генетической конструкции при воспроизведении в течение трех генераций. У трансгенных растений изучены особенности фенологических стадий роста, высота растений, число коробочек и мейоз. Сравнение трансформированных линий по годам воспроизводства выявило значительное снижение образования семян у одной из них. Это послужило причиной проведения анализа мейоза этих линий на стадиях метафазы I и анафазы I. Показано, что процент клеток с нарушениями мейоза был самым высоким у трансгенных растений из линии с самой низкой семенной продуктивностью. Таким образом, неспецифическое встраивание генетической конструкции с использованием биобаллистической трансформации в геном трансформантов льна-долгунца в разной степени нарушают течение мейоза, что и является основной причиной неодинаковой воспроизводимости трансгенных линий льна-долгунца. Можно заключить, что для получения стабильно воспроизводимых линий трансгенных растений целесообразно проводить у них систематический анализ мейоза.

Ключевые слова: лен-долгунец, биобаллистическая трансформация, трансгенные линии, фенологические и морфологические признаки, мейоз.

DOI: 10.7868/S0475145014060081

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что интеграция трансгенов в геном растений отражается на их онтогенетическом развитии и вызывает изменения различных морфологических признаков: формы листовых пластинок и строения цветков (Van Lijsebettens et al., 1991; Uchimiya et al., 1995; Ohshima et al., 1997); высоты растений (Feldman et al., 1989). В зависимости от места встройки ДНК-инсерции могут стать причиной эмбриолетальности (Egampalli et al., 1991), мужской стерильности (Peirson et al., 1997), а также приводить к хромосомным aberrациям (Choi et al., 2000). Вместе с тем, в настоящее время значительно расширяется применение методов генной инженерии при выведении новых сортов хозяйственно-ценных растений, что позволяет быстро получить новый признак, недостижимый для данного организма путем традиционной селекции. Этот подход особенно важен для

получения новых сортов льна-долгунца, поскольку высокая генетическая однородность существующих его сортов и отсутствие близкородственных доноров необходимых хозяйственно-ценных признаков в значительной мере ограничивает возможности традиционной селекционной работы.

Лен посевной (*Linum usitatissimum* L., $2n = 30$) — одна из древних технических культур комплексного использования, значение которой в мире неизменно высоко. Его разновидность лен-долгунец или прядильный лен (*elongate*) возделывают для получения волокна. Другие разновидности: лен-кудряш (*brevimulticaulia*) и крупносемянный лен (*macrospermum*), объединяют под общим названием лен масличный, и выращивают для получения масла. Лен был в числе первых растений — объектов генной инженерии. На сегодняшний день нет данных о регистрации сортов, созданных на основе генетически модифицированных ли-

ний льна-долгунца, и их коммерческом использовании. Проводятся лабораторные исследования по использованию агробактериальной и ПЭГ-индуцированной трансформации для создания модифицированных растений льна-долгунца (Чикризова, 1997; Millam et al., 2005; Wrobel-Kwiatkowska et al., 2007; Каляева, 2001). Получение стабильно воспроизводимых трансгенных линий льна-долгунца до сих пор остается трудно решаемой задачей, что делает особенно актуальным дальнейшее изучение особенностей развития и репродукции генетически модифицированных линий этого растения.

В данной работе в результате биобаллистической трансформации гипокотильных эксплантов льна-долгунца сорта Василек получены трансгенные самоопыленные линии и проведен анализ особенностей их развития и воспроизведения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использован позднеспелый сорт льна-долгунца Василек белорусской селекции (Ловчая, 2009).

Для биобаллистической трансформации использовали сегменты гипокотилей пятидневных проростков длиной 5–7 мм. Биобаллистическую трансформацию гипокотильных эксплантов проводили по ранее описанной методике (Гузенко, Лемеш, 2013). Вводимая конструкция содержала химерный ген *gfp-tua6* (слитая рамка считывания) под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV), в качестве селективного маркерного гена конструкция включала *nptII* ген, который обеспечивает устойчивость к канамицину (Ueda et al., 1999). Достоверность результатов, свидетельствующих об экспрессии целевого гена GFP-меченного тубулина в геноме растений-трансформантов, подтверждалась методом конфокальной микроскопии (наличие специфического зеленого свечения флуоресцентного белка GFP); достоверность встройки последовательности селективного маркерного гена *nptII* и 35S промотора подтверждалась методом ПЦР-анализа (Лемеш и др., 2010).

Жизнеспособные предположительно трансгенные побеги проходили укоренение *in vitro* по методике, разработанной нами для укоренения растений-регенерантов льна-долгунца и льна-масличного (Гузенко и др., 2009).

Для изучения мейоза использовали молодые бутоны. Приготовление препаратов, окрашивание хромосом и анализ мейоза проводили по описанной ранее методике (Саматадзе и др., 2012). Для характеристики отдельных фаз мейотического деления использовали не менее 5 препаратов и анализировали не менее 70 клеток. Для каждой



Рис. 1. Флуоресценция белка GFP в результате экспрессии химерного гена *gfp-tua6* в клетках побега льна-долгунца, сформировавшегося на каллусе после проведения биобаллистической трансформации (черные вкрапления).

стадии подсчитывали процент клеток с нормальным прохождением мейоза и с нарушениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С применением биобаллистической трансформации гипокотильных эксплантов льна-долгунца сорта Василек получены трансгенные растения, несущие генетическую конструкцию с химерным геном *gfp-tua6*. Метод биобаллистики (прямой трансформации) считается одним из перспективных способов введения чужеродной ДНК (Wijayanto, 1998; Wijayanto et al., 1999). Он пригоден для трансформации любых растительных объектов, тканей и органов; не нуждается в сложных векторных конструкциях; возможна прямая регенерация трансгенных побегов минуя каллус; возможно введение нескольких генов одновременно. Трансгенный статус первичных трансформантов подтвержден с использованием конфокальной микроскопии (наличие специфического зеленого свечения флуоресцентного белка GFP) (рис. 1). Методом ПЦР-анализа доказана достоверность встройки последовательности 35S промотора и селективного маркерного гена *nptII*.

По результатам молекулярно-генетического анализа было отобрано 24 первичных трансформанта, несущие полноценную генетическую конструкцию с химерным геном *gfp-tua6*. Наблюдения за онтогенезом трансгенных растений показали, что фенологические стадии роста (елочка, быстрый рост) были намного продолжительней, чем у исходного сорта Василек. В фазе “елочки” обычно растение льна-долгунца достигает высоты 5–10 см и имеет несколько (5–6) пар густо рас-

Характеристика по основным морфологическим признакам модифицированных самоопыленных линий, полученных на основе сорта Василек

Образец	Василек		V-2		V-3	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Высота растения, см	113.7 ± 3.2	118.8 ± 1.9	105.6 ± 1.5	103.4 ± 1.2	107.1 ± 1.3	105.6 ± 0.5
Количество коробочек, шт.	27.2 ± 2.9	15.7 ± 0.4	11.0 ± 1.1	10.3 ± 0.7	9.4 ± 0.9	10.4 ± 0.7
Количество семян в коробочке, шт.	7.0 ± 0.4	8.1 ± 0.4	3.8 ± 0.2	3.0 ± 0.4	3.9 ± 0.3	1.2 ± 0.3

положенных настоящих листочков, продолжительность данной фазы составляет примерно 15 дней. Продолжительность периода быстрого роста в зависимости от сорта льна составляет 12–20 дней, после которой следует бутонизация и цветение (Ловчая, 2009). Полученные в наших экспериментах первичные трансформанты фазу “елочки” проходили около 30 дней, продолжительность периода бурного роста составила от 30 до 60 дней, что в 2–3 раза превышало обычные сроки. При этом фаза бутонизации и цветения наступила у части растений, а семена завязали только некоторые из них.

Лучшими жизнеспособными трансгенными формами оказались два растения, которые послужили основой линий V-2 и V-3. Известно, что для отбора стабильных трансформантов необходим контроль и анализ растений в течение трех и более поколений, поэтому полученные нами линии воспроизводились в течение трех генераций. В каждом поколении линий V-2 и V-3 проводился отбор истинных растений-трансформантов с помощью ПЦР-скрининга, что позволило установить достаточно стабильное наследование генетической конструкции с химерным геном *gfp-taab*. По годам воспроизводства трансгенные растения обеих линий по продолжительности фенологических стадий роста практически не отличались друг от друга и от контрольных растений сорта Василек. Это свидетельствует в пользу стабилизации функционирования генома в целом у потомков первичных трансформантов уже в следующем поколении.

В таблице приведена характеристика самоопыленных линий V-2, V-3, полученных на основе трансгенных растений, по основным морфологическим признакам за два года репродукции в условиях теплицы. Из таблицы следует, что у трансформантов льна-долгунца по сравнению с исходным не наблюдалось существенного изменения высоты растений, тогда как число коробочек и семян в коробочке снизилось сразу в первый год воспроизведения. Таким образом, наблюдения за основными фенотипическими признаками (высотой растений и числом коробочек) трансгенных линий льна-долгунца по годам воспроизводства, также подтверждают сделанное выше заключение

о стабилизации генома у трансформантов первого поколения. Вместе с тем, число семян в коробочке у растений линии V-3 продолжало снижаться во втором поколении, тогда как в линии V-2 такого снижения не было. Это может отражать существенное нарушение репродуктивной функции у трансформантов линии V-3.

Аномалии в развитии цветков, пыльников, зародыша и эндосперма, приводящее к снижению репродуктивной функции выявлены и у других видов трансгенных растений, например табака и томата. При этом наблюдаются нарушения как в процессе мейотического деления клеток, так и в микроспорогенезе (Баврина и др., 2007; Чабан и др., 2010; Сидорчук и др., 2008). С целью выяснения причин снижения семенной продуктивности самоопыленных линий V-2 и V-3 было проведено изучение мейоза этих линий, в основном, на стадиях метафазы I и анафазы I.

Сравнительное изучение мейоза выявило, что при его нормальном течении у изучаемых линий наблюдалось 15 бивалентов, основном, открытых. Встречались клетки, содержащие униваленты в метафазе I (рис. 2а). Наличие открытых бивалентов не нарушает общего течения мейоза, но может указывать на ослабление конъюгации. Отсутствие конъюгации хромосом является причиной нарушений при прохождении последующих стадий мейоза. В норме центромерные районы объединенных в биваленты хромосом ориентированы к полюсам веретена деления. Полярная ориентация унивалентных хромосом в клетках исследуемых линий нарушена – чаще всего они находятся за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспороцита. Клетки с нарушениями (клетки с унивалентами и т.д.) составили у контроля 2.19%, что не является критическим. У линий V-2 и V-3 процент клеток с нарушениями составил 3.84 и 5.67% соответственно.

Известно, что отклонения от нормальной бивалентной конъюгации заключаются в образовании не только унивалентов, но и мультивалентов (Поддубная-Арнольди, 1976). В нашем исследовании встречались клетки как с тривалентами, так и с квадривалентами (рис. 2б). Показано, что квадриваленты могут формироваться в диплоидных растениях в результате появления гетерози-

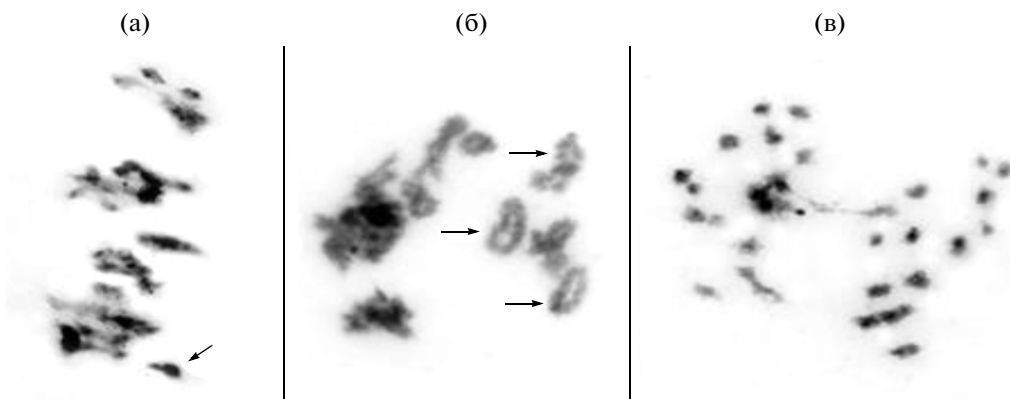


Рис. 2. Мейоз в материнских клетках пыльцы у трансгенных линий льна: (а) М-I с унивалентной хромосомой (стрелкой указан унивалент); (б) диакинез — образование квадрилентов (указаны стрелками); (в) А-I — отставание хромосом и мосты.

готных транслокаций и могут иметь адаптивное значение для растения (Sheidai et al. 2012). Это подтверждается также в работе, по изучению морфологического и генетического разнообразия в популяции экотипов *L. album* L. (Masoud Sheidai et al., 2014).

Основной тип нарушений у полученных нами линии V-2 и V-3 в анафазе I и анафазе II состоит в отставании нескольких хромосом от основной группы деления и образовании мостов (рис. 2в). Большинство отстающих хромосом не достигает полюсов и остается в цитоплазме. Когда наступает телофаза, они становятся микроядрами в клетках диад. Были выявлены клетки с дегенерацией хромосом. В результате подобных нарушений формируются гаметы с несбалансированным числом хромосом, что может приводить к резкому снижению фертильности пыльцы и обуславливать снижение репродуктивной функции (Поддубная-Арнольди, 1976).

Показано, что интеграция векторных конструкций в геном растений при биобалистической трансформации носит случайный характер, что приводит к различного рода мутациям и хромосомным перестройкам внутри генома растения (Choi et al., 2000; Latham et al., 2005), которые отражаются на различных репродуктивных способностях растений-трансформантов (Egampalli et al., 1991, Peirson et al., 1997, Сидорчук и др., 2008). По-видимому, встраивание в геном трансформантов льна-долгунца генетической конструкции с использованием биобалистической трансформации также не имеет специфичности и может приводить к различным структурным изменениям их хромосом. Эти изменения незначительно отражаются на морфологии растений обеих линий V-2 и V-3, но в разной степени нарушают течение мейоза, что приводит к различной динамике снижения числа завязавшихся семян.

Так, у линий V-2 и V-3 процент клеток с нарушениями в 1.8 и 2.6 раза превышает контрольные значения. При этом, в первом поколении у растений обеих линий число семян снижается практически одинаково, а в следующем — у линии V-3 этот показатель значительно снижается по сравнению с линией V-2, у которой таких изменений не наблюдается. Вероятно, эти данные свидетельствуют о более высокой стабильности геномов растений-трансформантов линии V-2 по сравнению с линией V-3.

Несмотря на постоянно возобновляющиеся попытки создать стабильно воспроизводимые трансгенные линии льна-долгунца, несущие ортологичные гены, повышающие устойчивость растений (Чикризова и др., 1996) или улучшающие упругие качества льноволокна (Wrobel-Kwiatkowska et al., 2007), до настоящего времени таких линий не получено. Наше исследование показало, что основным фактором нестабильности трансгенных линий льна-долгунца является нарушение мейоза, вызванное встройкой чужеродной генетической конструкции, что приводит к прекращению воспроизводства. Одна из полученных нами трансгенных линий льна-долгунца V-2 имела достаточно стабильные фенотипические и репродуктивные показатели. Дальнейшее изучение локализации трансгена в ее хромосомах может помочь в решении проблемы получения других стабильных трансгенных линий льна-долгунца. Это особенно актуально для России и Беларуси в связи с в возникшей на границе 80–90 годов необходимостью импорта хлопкового волокна.

Работа поддержана грантами: РФФИ 12-04-90046-Бел_a и 14-08-01167, БРФФИ Б12Р-170.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баврина Т.В., Миляева Э.Л., Гетман И.А., Романов Г.А. Особенности проявления и наследования TRD1-

- фенотипа у инсерционного мутанта табака с длительным периодом цветения // Физиол. растений. 2007. Т. 54. С. 730–737.
- Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Ризогенез в культуре *in vitro* у сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Доклады НАН Беларуси. 2009. Т. 53. № 6. С. 86–89.
- Гузенко Е., Лемеш В. Создание новых генотипов льна-долгунца методами генетической инженерии. Изво Lambert Academic Publishing. 2013. 149 с. (www.lap-publishing.com).
- Каляева М.А. Разработка эффективной системы генетической трансформации льна и дикорастущих видов рода *Linum*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: Пушино. Ин-т фундамент. пробл. биологии РАН. 2001. 21 с.
- Лемеш В.А., Гузенко Е.В., Емец А.И., Баер О.А., Баер Г.Я., Шиша Е.Н., Блюм Я.Б., Картель Н.А. Создание генетически модифицированных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) методом биолиственной трансформации Весці НАН Беларусі. Сер. біял навук. 2010. № 1. С. 18–23.
- Ловчая Л.В. Лен: энциклопедия // Мин-во информации Респ. Беларусь. Под ред И.А. Голуба. Минск: Беларус. Энцыкл. імя П.Броўкі. 2009. 168 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений М.: Наука, 1976. 508 с.
- Саматадзе Т.Е., Амосова А.В., Суслина С.Н., Загуменникова Т.Н., Цицилин А.Н., Быков В.А., Зеленин А.В., Муравенко О.В. Сравнительный анализ кариотипов трех видов MACLEAYA – продуцентов комплекса изохинолиновых алкалоидов // Известия РАН. Серия биологическая. 2012. № 6. С. 601–611.
- Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Шамина Н.В., Дейнеко Е.В. Сравнительный анализ цитологических нарушений у трансгенных растений табака с мутантным фенотипом // Международная научная конференция “Молекулярная генетика, геномика и биотехнология”. Минск, 24–26 ноября, 2004 г. С. 187–188.
- Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Преждевременный цитокinesis в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // Цитология. 2008. Т. 50. № 5. С. 447–451.
- Чабан И.А., Халилуев М.Р., Долгов С.В. Цитоэмбриологическое изучение трансгенных растений томатов с аномальным фенотипом // Тезисы III Всероссийского симпозиума “Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности”. Москва, 18–21 октября 2010 г. С. 84.
- Чикризова О.Ф. Создание форм льна-долгунца на основе генетической трансформации *A. tumefaciens*: Автореф. дис. ... канд. сельхоз.-наук. Москва. Всерос. научно-исслед. инст. льна. 1997. 18 с.
- Choi H.-W., Lemaux P.G., Cho M. High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avenasativa* L.) plants // Plant Science. 2000. V. 156. P. 85–94.
- Errampalli D., Patton D., Castle L., Mickelson K., Hansen K., Schnell J., Feldmann B.C., Meinke D. Embryogenic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis // Plant Cell. 1991. V. 3. P. 149–157.
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christiansos M.L., Quatrano R.S. A dwarf mutant of Arabidopsis generated by T-DNA insertion mutagenesis // Science. 1989. V. 243. P. 1351–1354.
- Latham J.R., Wilson A.K., Steinbrecher R.A. The Mutational Consequences of Plant Transformation // Journal of Biomedicine and Biotechnology 2006. Article ID 25376, P. 1–7.
- Millam S., Obert B., Pret'ová A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2005. Vol. 82. № 2. P. 93–103.
- Ohshima S., Murata M., Sanamoto W., Ogura Y., Motoyoshi F. Cloning and molecular analysis of Arabidopsis gene Terminal Flower 1 // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 254. P. 186–194.
- Peirson B.N., Bowling S.E., Makaroff Ch. A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged Arabidopsis thaliana mutant // The Plant Journal. 1997. V. 11. P. 659–669.
- Sheidai M., Seif E., Nouroozi M., Noormohammadi Z. Cytogenetic and molecular diversity of *Cirsium arvense* (Asteraceae) populations in Iran // J. Jpn. Bot. 2012. V. 87. P. 193–205.
- Sheidai M., Ziaee S., Farahani F., Talebi S.M., Noormohammadi Z., Farahani Y.H.A. Infra-specific genetic and morphological diversity in *Linum album* (Linaceae) // Biologia. 2014. V. 69. № 1. P. 32–39.
- Uchimiya H. In: Modification of gene expression and non-Mendelian inheritance. Japan. 1995. P. 187–197.
- Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana L. // Protoplasma. 1999. V. 206. № 1. P. 201–206.
- Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., Van Montagu M. Insertional mutagenesis in Arabidopsis thaliana: Isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology // Theoretical and Applied Genetics. 1991. V. 81. № 2. P. 277–284.
- Wijayanto T. Gene transfer to flax (*Linum usitatissimum* L.) using particle bombardment: M.Sc. diss. University of Saskatchewan. Saskatoon. SK. Canada. 1998.
- Wijayanto T., McHughen A. Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment // In vitro Cell Dev. Biol. Plant. 1999. V. 35. P. 456–465.
- Wrobel-Kwiatkowska M., Zebrowski J., Starzycki M., Oszmian'ski J., Szopa J. Engineering of PHB synthesis causes improved elastic properties of flax fibers // Biotechnology Progress. 2007. V. 23. P. 269–277.

Features of Development and Reproduction of Transgenic Flax

V. A. Lemesh^a, T. E. Samatadze^b, E. V. Guzenko^a, E. V. Zheleznyakova^a,
A. V. Amosova^b, A. V. Zelenin^b, and O. V. Muravenko^b

^a Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072, Belarus

^b Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: olgmur1@yandex.ru

Received January 14, 2014; in final form, February 3, 2014

Abstract—Primary transformants carrying a genetic construct with the chimeric *gfp-tua6* gene were obtained using biolistic transformation of hypocotyl explants of flax variety Vasilek. Viable modified plants were used as a basis for the production of inbred lines with confirmed inheritance of introduced genetic construct in three generations. The characteristics of phenological growth stages, plant height, number of bolls and meiosis were studied for transgenic plants. A comparison of transformed lines based on reproduction years revealed a significant decrease of seed production in one line. Meiotic analysis of this line at metaphase I and anaphase I stages was conducted. The percentage of cells with impaired meiosis was highest in transgenic plants of the line with the lowest seed production. Thus, the nonspecific incorporation of genetic construct into the flax genome using biolistic transformation impairs meiosis to a different extent and it is the main reason for unequal reproducibility of transgenic flax. The production of stably reproducing transgenic lines requires systematic analysis of meiosis.

Keywords: flax, biolistic transformation, transgenic lines, phenological and morphological characteristics, meiosis