

Изучение экспрессии генов целлюлозосинтаз у льна в процессе роста

© 2024. Т. А. Базанов✉, И. В. Ушаповский, Н. Н. Логинова, Е. В. Минина,
П. Д. Вересова

ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», г. Тверь,
Российская Федерация

В селекции лубяных культур, направленной на создание высоковолокнистых сортов, важным является выявление закономерностей формирования волокна на молекулярном уровне, определение генотипспецифичности процессов синтеза целлюлозы, изучение эффективности работы генов, отвечающих за синтез целлюлозы на различных этапах онтогенеза растений. Целью работы являлось изучение экспрессии генов целлюлозосинтаз льна. Объектом исследования являлись 8 образцов льна (род *Linum*), отличающихся по содержанию волокна: 7 сортов *Linum usitatissimum* L., из которых 5 сортов льна-долгунца, 2 сорта льна масличного, один образец льна крупноцветкового (*L. grandiflorum* Desf.). Исследуемые сорта выращивали в растительной установке. Пробы растительного материала отбирали на 10-й, 20-й, 30-й, 40-й и 50-й дни после появления всходов. Проводили извлечение РНК, синтез кДНК. Были получены последовательности РНК *CesA1*, *CesA4*, *CesA6*, *CesA7* и разработаны ген-специфические праймеры для ПЦР. Экспрессию генов определяли методом полуколичественной RT-PCR, продукты реакции разделяли по размеру с помощью 1,2%-го агарозного геля. На основании полученных данных было установлено наличие фазо- и генотипспецифичности в процессе экспрессии целлюлозосинтаз семейства *CesA* в стебле льна. Целлюлозосинтазы первичной клеточной стенки льна (*CesA1*, *CesA6*) проявляют динамику роста экспрессии до стадии «елочка», а затем экспрессия постепенно снижается к фазе наступления быстрого роста, тогда как целлюлозосинтазы вторичной клеточной стенки (*CesA4*, *CesA7*) характеризуются постоянным увеличением экспрессии от первых дней развития проростков до фазы быстрого роста.

Ключевые слова: лён-долгунец, лен масличный, лен крупноцветковый, первичная клеточная стенка, вторичная клеточная стенка, *CesA*, РНК, кДНК, ПЦР, гель-электрофорез

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» (тема № FGSS-2024-0002).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Базанов Т. А., Ушаповский И. В., Логинова Н. Н., Минина Е. В., Вересова П. Д. Изучение экспрессии генов целлюлозосинтаз у льна в процессе роста. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2024;25(3):368–378. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.3.368-378>

Поступила: 18.03.2024

Принята к публикации: 14.05.2024

Опубликована онлайн: 26.06.2024

Study of the expression of cellulose synthase genes during plant growth of flax

© 2024. Taras A. Bazanov✉, Igor V. Ushapovsky, Natalya N. Loginova,
Ekaterina V. Minina, Polina D. Veresova

Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Tver, Russian Federation

During the selection of crops aimed at creating high-fiber varieties, it is important to determine the patterns of fiber formation at the molecular level and the genotype specificity of cellulose synthesis processes, to study the efficiency of the genes responsible for cellulose synthesis at various stages of plant ontogenesis. The aim of the work was to study the expression of flax cellulose synthase genes. The objects of the study were 8 samples of flax (genus *Linum*), differing in fiber content: 7 cultivars of *Linum usitatissimum* L., of which 5 cultivars of fiber flax, 2 cultivars of oilseed flax, as well as one sample of large-flowered flax (*L. grandiflorum* Desf.). The studied cultivar were grown in a growth chamber. Samples of plant material were taken on the 10th, 20th, 30th, 40th and 50th day after germination. RNA extraction and cDNA synthesis were carried out. RNA sequences of *CesA1*, *CesA4*, *CesA6*, *CesA7* were obtained and gene-specific primers for PCR were developed. Gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR, and reaction products were separated by size using a 1.2% agarose gel. Based on the data obtained, the presence of phase- and genotype-specificity in the process of expression of cellulose synthases of the *CesA* family in the flax stem was established. Cellulose synthases of the primary cell wall of flax (*CesA1*, *CesA6*) show a dynamic increase in expression up to the «herringbone» stage, and then the expression gradually decreases towards the onset of rapid growth phase, while cellulose synthases of the secondary cell wall (*CesA4*, *CesA7*) are characterized by a constant increase in expression from the first days of the development of seedlings to the phase of rapid growth.

Keywords: flax, linseed, large-flowered flax, primary cell wall, secondary cell wall, *CesA*, RNA, cDNA, PCR, gel electrophoresis

Acknowledgments: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the Federal Research Center for Bast Fiber Crops (theme No. FGSS-2024-0002). The authors thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interests: the authors stated that there was no conflict of interests.

For citation: Bazanov T. A., Uschapovsky I. V., Loginova N. N., Minina E. V., Veresova P. D. Study of the expression of cellulose synthase genes during plant growth of flax. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2024;25(3):368–378. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.3.368-378>

Received: 18.03.2024

Accepted for publication: 14.05.2024

Published online: 26.06.2024

На протяжении тысячелетий человечество эффективно использовало лубяные культуры для различных целей. В настоящее время их используют как сырье для текстильной промышленности, в производстве косметики, экологически чистых строительных материалов, в медицине, автомобилестроении и т. д. Интерес к натуральным волокнам также растет из-за экологических проблем и стимулирования развития рынка биоразлагаемых и перерабатываемых материалов, развития биоэнергетики [1, 2, 3].

Производители лубяных культур стремятся добиться высокого выхода и качества волокна. Основными хозяйственно ценными параметрами являются содержание волокна в стебле, прочность, линейная плотность, гибкость, цвет. Качество волокна рассматривается как интегральная характеристика, зависящая как от особенностей сорта и агроприемов, влияющих на формирование волокон растения, а также от способа обработки стеблей после сбора урожая. Важность биологической основы качества волокна отражается в выраженных различиях технических параметров волокна между сортами сельскохозяйственных культур [4]. Существуют многочисленные исследования, описывающие анатомические, морфологические и биохимические различия между сортами, связанные с качеством волокна. Для селекционной работы, направленной на высокие показатели продуктивности и качества волокна создаваемых сортов, необходимо изучать особенности генетического контроля формирования волокна, разрабатывать методологию управления синтезом целлюлозы и других биохимических компонентов волокна.

Культурный лен (*Linum usitatissimum* L.) использовался для производства растительного волокна на протяжении многих тысяч лет [5]. Лубяные волокна льна – это первичные волокна, происходящие из прокамбия и сходные с рядом первичных лубяных волокон других видов растений (конопли, крапивы), образующие

толстую, богатую целлюлозой клеточную стенку [6]. Прежде чем инициируется утолщение клеточной стенки, волокна подвергаются специфическому типу клеточного удлинения, называемому интрузивным ростом, который происходит в глубине других тканей ствола [7]. Этот этап развития оказывает заметное влияние на выход и качество волокна, который во многом недооценен и недостаточно хорошо описан с молекулярно-генетической точки зрения [8, 9]. Структура и состав лубяного волокна аналогичны клеточной стенке G-волокон (желатинозных волокон) древесины [6, 10] и существенно отличаются от других типов клеточных стенок. Характерной отличительной особенностью лубяных волокон является высокое содержание целлюлозы (до 90 %). Целлюлозные микрофибриллы лубяного волокна аксиально ориентированы и переплетены матричными полимерами [6]. Как химический состав, так и пространственная организация полимеров в структуре клеточной стенки способствуют естественной прочности, гибкости, гладкости и линейности льняных волокон.

Волокна льна рассматриваются как одно из проявлений эволюционной специализации клеток, метаболизм которых ориентирован на масштабный синтез одного из метаболитов – целлюлозы. Целлюлоза, как совокупность неразветвленных полимеров β -1,4-связанных остатков глюкозы, является основным компонентом лубяных волокон и синтезируется растениями, большинством водорослей, некоторыми бактериями и грибами, и даже некоторыми животными [11]. Гены, синтезирующие целлюлозу у высших растений, отличаются от генов, обнаруженных у *Acetobacter* и *Agrobacterium* sp. Белки растительной целлюлозосинтазы (CesA) или каталитические субъединицы целлюлозосинтазы представляют собой интегральные мембранные белки длиной, примерно, 1000 аминокислот. Изучены последовательности для более 20 полноразмерных генов CesA, и они демонстрируют высокое

сходство друг с другом по всей длине кодируемого белка, за исключением двух небольших областей вариабельности. Существует ряд высококонсервативных остатков, включая несколько мотивов, которые, как показано, необходимы для активности гликозилтрансферазы. Кристаллическая структура белков целлюлозосинтазы и точный ферментативный механизм еще не изучены.

Гены *CesA* высших растений принадлежат к мультигенному семейству [12]. Установлено, что в образовании целлюлозосинтезирующего комплекса (так называемой «розетки») участвуют несколько различных *CesA* белков и как минимум три *CesA* гена транскрибируются одновременно; это свидетельствует о том, что три различных белка целлюлозосинтазы формируют функциональный целлюлозосинтезирующий комплекс [13, 14, 15]. В биосинтезе первичной и вторичной клеточной стенки участвуют продукты определенных *CesA* генов растений: для первичной клеточной стенки (далее ПКС) – *CesA1*, *CesA6*; для вторичной клеточной стенки (далее ВКС) – *CesA4*, *CesA7* [12].

Анализ экспрессии генов в критические периоды развития льна может повысить точность идентификации задействованных ключевых генов по сравнению с функциональным геномным подходом. Развивающиеся лубяные волокна характеризуются высокой экспрессией генов целлюлозосинтаз, белков арабиногалактана, β -галактозидаз и хитиназоподобных белков, которые связаны со структурой клеточной стенки и особенностями кристаллической структуры целлюлозы и являются важными мишенями для дальнейшего улучшения качества лубяных волокон [16]. Также установлено, что множественные факторы транскрипции активируются во время развития лубяных волокон, что потенциально идентифицирует ряд ключевых регуляторов развития волокон [17]. Результаты проводимых в этой области исследований позволяют формировать новые перспективные селекционно-генетические подходы в создании высоковолокнистых сортов льна и расширяют теоретические основы изучения биологии лубяных культур.

Цель исследования – изучение экспрессии генов целлюлозосинтаз льна в процессе роста растений.

Научная новизна – изучение паттерна экспрессии генов целлюлозосинтаз у образцов

культурного льна разных направлений селекции, а также *L. grandiflorum* Desf. с различным содержанием волокна.

Материал и методы. Экспериментальные исследования выполнены в лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур».

В качестве объекта исследований по экспрессии целлюлозосинтаз льна было использовано 7 сортов *Linum usitatissimum* L., из них 5 сортов льна-долгунца и 2 сорта льна масличного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации, и один образец льна крупноцветкового (*L. grandiflorum* Desf.). Критерием выбора сортов образцов было значение параметра «содержание волокна», т. е. высоко- и низковолокнистые образцы. Перечень исследованных сортов льна представлен в таблице 1.

Изучаемые генотипы выращивали в растительной установке при температуре 22 °С и фотопериоде «день/ночь» – 16/8 часов. Образцы отбирали на 10-й, 20-й, 30-й, 40-й и 50-й дни после всходов растений, немедленно замораживали в жидком азоте, где их хранили до выделения РНК. У 10-дневных растений удаляли семядоли, верхние листья, корни и выделяли РНК из гипокотилей. У более взрослых растений использовали части стебля длиной 4 см, взятые на 2 см ниже «точки слома». У образцов также удаляли листья и экстрагировали РНК из участков стебля. «Точка слома» (snap point) является местом перехода волокон от удлинения к утолщению клеточной стенки, которое можно обнаружить вручную по увеличению усилия, необходимого для слома стебля [19].

Извлечение РНК из растительного материала проводили с помощью набора реагентов для колоночного выделения тотальной РНК из растений RNA-Xtrac Plants (ООО «Биомедицинские инновации», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Контроль качества экстрагированной РНК осуществляли путем электрофореза образцов РНК в 1,5%-ном агарозном геле и спектрофотометрических измерений. Перед обратной транскрипцией образцы РНК обрабатывали ДНКазой. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора «Обратная транскриптаза M-MuLV без активности РНКазы H (RN-)-» («Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица 1 – Перечень сортообразцов льна, использованных для исследования экспрессии генов целлюлозосинтаз /

Table 1 – List of flax cultivar used to study the expression of cellulose synthase genes

Генотип / Genotype	Оригинатор / Originator	Содержание волокна, % / Fiber content, %	Источник данных / Data source
Лен-долгунец / Fiber flax			
Томский 16 / ‘Tomskii 16’	Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН), г. Новосибирск / Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies RAS, Novosibirsk	35	[18]
Лен-долгунец / Fiber flax			
Визит / ‘Vizit’	Федеральный научный центр лубяных культур, обособленное подразделение НИИ льна (ОП НИИЛ), г. Торжок / Federal Research Center for Bast Fiber Crops, separate division of the Flax Research Institute, Torzhok	32	Государственный реестр селекционных достижений РФ ¹ / State Register of Selection Achievements of the Russian Federation
Надежда / ‘Nadezhda’		29	
Универсал / ‘Universal’		25,8	
Синичка / ‘Sinichka’	Вятский государственный агротехнологический университет (Вятский ГАТУ), г. Киров / Vyatka State Agrotechnological University, Kirov	18,8–20,5	
Лен масличный / Oilseed flax			
ЛМ 98 / LM 98	Федеральный научный центр лубяных культур, обособленное подразделение НИИ льна (ОП НИИЛ), г. Торжок / Federal Research Center for Bast Fiber Crops, separate division of the Flax Research Institute, Torzhok	20–25	Электронный ресурс ² / Electronic resource
РФН / RFN	Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В. С. Пустовойта (ФНЦ ВНИИМК), г. Краснодар / Federal Research Center of V. S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops, Krasnodar		
Лен крупноцветковый / Large-flowered flax			
<i>L. grandiflorum</i> Desf. к-3284	Коллекция Федерального научного центра лубяных культур (ФНЦ ЛК), г. Тверь / Collection of the Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Tver	< 20	Данные авторов / Authors’ data

Для получения последовательностей РНК Cesa1, Cesa4, Cesa6, Cesa7 использовали интерфейс UniProt³. С полученными последовательностями был проведен BLAST-анализ на геном *Linum usitatissimum* L. с помощью программного обеспечения NCBI⁴. Ген-специфические праймеры для ПЦР (табл. 2) были разработаны с использованием программного обеспечения Primer3plus⁵.

RT-PCR обеспечивает высокочувствительный и специфичный метод анализа экспрессии мультигенных семейств, позволяющий определять слабоэкспрессированные транскрипты и, таким образом, изучать экспрессию на разных стадиях роста. В данной работе был использован метод полуколичественной (SQ)-RT-PCR, предназначенный для сравнения уровней экспрессии генов в мультигенных семействах.

¹Государственный реестр селекционных достижений, рекомендованных к использованию в Российской Федерации. [Электронный ресурс]. URL: <https://gossortrf.ru> (дата обращения: 13.11.2023).

²Лен масличный – текстильное сырьё. РосЛенКонопля: сайт о льне и конопле. 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rosflaxhemp.ru/fakti-i-cifri/o-lne/pererabotka.html/id/3059> (дата обращения: 13.11.2023).

³UniProt consortium. 2003. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения: 11.09.2023).

⁴The National Center for Biotechnology Information. 1988. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 09.09.2023).

⁵Primer3Plus: pick primers from a DNA sequence. 2012. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.primer3plus.com/> (дата обращения: 09.09.2023).

Таблица 2 – Последовательности праймеров, использованных для полуколичественной RT-PCR /
Table 2 – Sequences of primers used for semi-quantitative RT-PCR

Ген / Gene	Последовательность праймера, 5'→3' / Sequence primer 5'→3'	
	прямой / forward	обратный / reverse
CesA1	CTTGCTGTGGATTACCCGGT	AGCTCGCCTCTCTTTCACAA
CesA4	TGGAAAGAACCGTGTTTGCTG	TGGGGAATCTCTGTGGTGTG
CesA6	TGACTCTATTGTGGGTTTCGAGT	ACACTACACATCCGGTCAGC
CesA7	AAGATGCTTGGCCCTATCGT	GACGAGTGTGGCTTTCCTGT

Полуколичественная RT-PCR основана на относительной экспрессии, измеренной во время линейной фазы реакции [20]. При полуколичественной RT-PCR целевой вид кДНК амплифицируется с использованием одинакового количества циклов для всех исследуемых образцов. После электрофоретического разделения в геле и окрашивания EtBr (или каким-либо другим красителем нуклеиновой кислоты) скорость экспрессии целевого гена оценивают путем измерения интенсивности полосы, соответствующей образовавшемуся ампликону. Интенсивность полосы отражает количество копий целевой кДНК (т. е. целевой мРНК) в начале ПЦР и, следовательно, уровень экспрессии целевого гена в образце.

Полуколичественную RT-PCR проводили с использованием количественных образцов кДНК из 10–50-дневных растений с использованием 28 циклов, как было рекомендовано в работах [21, 22]. Амплификацию RT-PCR проводили в термоциклере T-100 (BioRad). Оптимизированная смесь для реакции амплификации (25 мкл) содержала 4 нг кДНК, 1х ПЦР-буфер, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP, 0,4 мкМ каждого праймера и 1,5 ед. ДНК-полимеразы Taq. На первом этапе амплификации происходила начальная денатурация при 95 °C в течение 15 мин; затем следовали 28 циклов денатурации при 95 °C в течение 10 с, отжига праймеров при 62 °C в течение 10 с и элонгации 72 °C в течение 10 с. Заключительным этапом была терминальная элонгация при 72 °C в течение 10 минут.

Аликвоты (10 мкл) реакции разделяли по размеру на 1,2%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере, предварительно окрашенном бромистым этидием. Электрофорез проводили в агарозном геле размером 15×10 см в течение 2 часов при силе тока 200 мА, чтобы обеспечить хорошее разделение продуктов ПЦР. Продукты амплификации непосредственно количественно определяли путем сканирования интенсивности флуоресценции в УФ-свете с использованием системы гель-документирования ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Силу сигнала каждой амплифицированной полосы измеряли с использованием программного обеспечения для анализа изображений Image Lab версии 6.0.1 (Bio-Rad, США). Ген GAPDH использовали в качестве эталонного [23]. Три независимых репликации RT-PCR были выполнены для каждого гена, каждой стадии развития и генотипа, включая GAPDH. Экспрессию целевых генов оценивали относительно эталонного гена, рассчитывая путем деления сигнала ПЦР-ампликона гена целлюлозосинтазы на сигнал GAPDH.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования были получены данные по экспрессии генов целлюлозосинтаз первичной и вторичной клеточной стенки для восьми образцов льна на пяти стадиях развития стебля.

На рисунке 1 представлен пример электрофоретического разделения продуктов амплификации кДНК гена целлюлозосинтазы CesA7 сорта Томский 16 и референсного гена GAPDH.

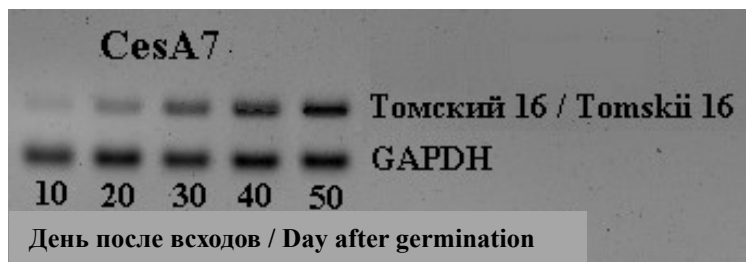


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов амплификации кДНК гена CesA7 сорта Томский 16 и гена GAPDH /

Fig. 1. Electropherogram of separation of cDNA amplification products of the CesA7 gene of the 'Tomskii 16' cultivar and the GAPDH gene

В таблице 3 приведены усредненные по результатам трех проб данные, отражающие значения экспрессии генов CesA1, CesA4, CesA6 и CesA7 относительно экспрессии гена GAPDH.

Таблица 3 – Экспрессия генов целлюлозосинтаз CesA1, CesA4, CesA6, CesA7 при развитии стебля восьми генотипов льна /

Table 3 – Expression of cellulose synthase genes CesA1, CesA4, CesA6, CesA7 during stem development of eight flax genotypes

Дни после всходов / Days after germination	Генотип / Genotype	Экспрессия относительно гена GAPDH / Expression relative to the GAPDH gene			
		CesA1	CesA6	CesA4	CesA7
10	Томский 16 / 'Tomskii 16'	0,226	0,098	0,183	0,214
	Визит / 'Vizit'	0,203	0,088	0,202	0,173
	Надежда / 'Nadezhda'	0,215	0,096	0,179	0,158
	Универсал / 'Universal'	0,186	0,091	0,18	0,257
	Синичка / 'Sinichka'	0,184	0,087	0,165	0,143
	РФН / RFN	0,281	0,083	0,152	0,159
	ЛМ 98 / LM 98	0,303	0,078	0,156	0,154
	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	0,382	0,133	0,356	0,104
20	Томский 16 / 'Tomskii 16'	0,203	0,113	0,354	0,332
	Визит / 'Vizit'	0,186	0,105	0,392	0,389
	Надежда / 'Nadezhda'	0,192	0,108	0,312	0,325
	Универсал / 'Universal'	0,167	0,097	0,356	0,331
	Синичка / 'Sinichka'	0,158	0,101	0,321	0,308
	РФН / RFN	0,316	0,166	0,288	0,265
	ЛМ 98 / LM 98	0,308	0,156	0,312	0,291
	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	0,412	0,213	0,322	0,215
30	Томский 16 / 'Tomskii 16'	0,161	0,102	0,543	0,584
	Визит / 'Vizit'	0,145	0,096	0,532	0,524
	Надежда / 'Nadezhda'	0,151	0,074	0,498	0,538
	Универсал / 'Universal'	0,135	0,085	0,538	0,495
	Синичка / 'Sinichka'	0,123	0,103	0,484	0,508
	РФН / RFN	0,262	0,135	0,466	0,493
	ЛМ 98 / LM 98	0,231	0,147	0,453	0,514
	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	0,403	0,235	0,363	0,457
40	Томский 16 / 'Tomskii 16'	0,107	0,075	1,254	0,741
	Визит / 'Vizit'	0,096	0,064	1,186	0,841
	Надежда / 'Nadezhda'	0,1	0,049	1,289	0,883
	Универсал / 'Universal'	0,091	0,051	1,248	0,811
	Синичка / 'Sinichka'	0,086	0,06	0,915	0,764
	РФН / RFN	0,124	0,079	1,037	0,746
	ЛМ 98 / LM 98	0,111	0,113	0,942	0,751
	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	0,268	0,138	0,687	0,824
50	Томский 16 / 'Tomskii 16'	0,054	0,034	0,922	0,993
	Визит / 'Vizit'	0,048	0,032	0,862	1,289
	Надежда / 'Nadezhda'	0,049	0,024	0,998	1,214
	Универсал / 'Universal'	0,046	0,026	0,924	1,275
	Синичка / 'Sinichka'	0,043	0,03	0,834	1,115
	РФН / RFN	0,072	0,043	0,711	1,052
	ЛМ 98 / LM 98	0,069	0,049	0,635	0,935
	<i>L. grandiflorum</i> Desf.	0,134	0,078	0,641	0,612

Экспрессия генов CesA1, CesA4, CesA7, CesA6 была обнаружена у всех восьми сортов на всех стадиях развития. Уровни и характер экспрессии исследуемых генов значительно варьировали.

Экспрессия гена CesA1 была невысокой и продемонстрировала различную динамику для сортов льна-долгунца, льна масличного и *L. grandiflorum* Desf. (рис. 2). Самый высокий уровень экспрессии гена отмечали в начале развития растений – на стадии проростков, затем

начинал снижаться. Экспрессия этого гена у сортов льна-долгунца была самой низкой из изученных образцов и характеризовалась линейным уменьшением величины в зависимости от возраста растений. У сортов льна масличного и *L. grandiflorum* Desf. экспрессия оказалась выше в 1,5–2,0 раза и характеризовалась иной зависимостью. После прохождения растением фазы, соответствующей быстрому росту, у сортов льна-долгунца отмечается снижение экспрессии CesA1.

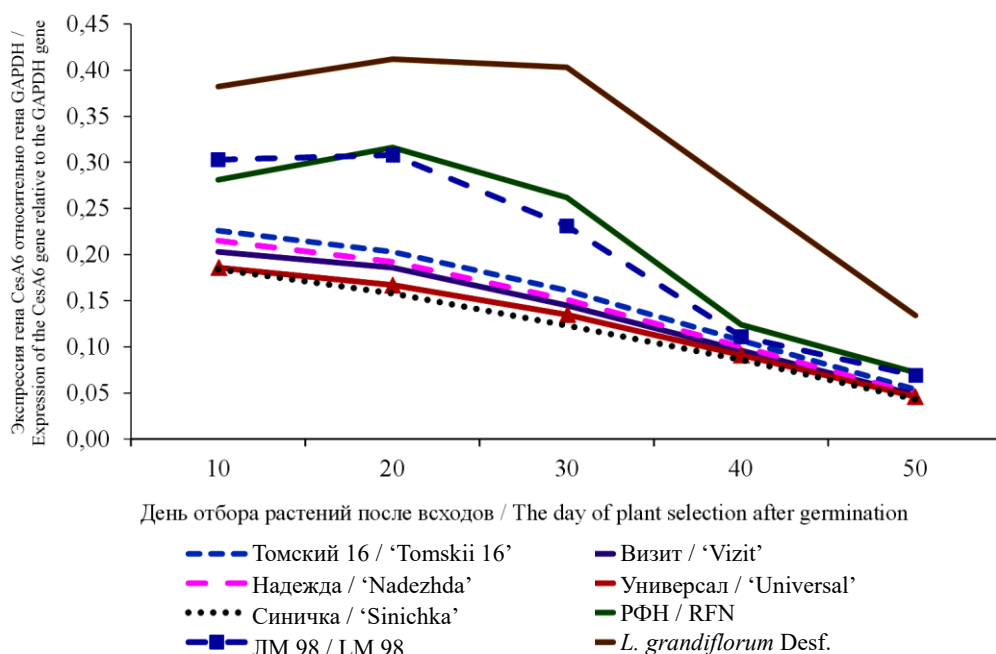


Рис. 2. Динамика экспрессии гена CesA1 относительно гена GAPDH в процессе онтогенеза у различных генотипов льна /

Fig. 2. Dynamics of expression of the CesA1 gene relative to the GAPDH gene during ontogenesis in various flax genotypes

Следующий изученный ген целлюлозосинтазы CesA6 показал наиболее слабый уровень экспрессии из всех исследованных генов во всех образцах (рис. 3). Как и в случае с CesA1, паттерны экспрессии образцов прядильного и масличного льна, а также *L. grandiflorum* Desf. сильно отличались. Наибольший уровень экспрессии выявлен у *L. grandiflorum* Desf., который характеризовался подъемом до наступления фазы быстрого роста у растений льна и постепенным снижением в дальнейшем. Сопоставляя характер экспрессии CesA1 и CesA6, отмечается, что экспрессия генов ПКС у сортов масличного льна выше, чем у прядильного на всех стадиях развития растения, но со временем она принимает относительно равные значения.

Ген CesA4, связанный с образованием ВКС, характеризовался сходным проявлением экспрессии практически для всех образцов льна (рис. 4). Сорт льна-долгунца Синичка в фазе быстрого роста по уровню экспрессии оказался ближе к образцам масличного льна, а по характеру экспрессии – к *L. grandiflorum* Desf.

CesA7 – второй исследованный ген, связанный с образованием ВКС, демонстрирует постоянно растущий характер экспрессии в зависимости от возраста растений, идентичный для всех образцов культурного льна (рис. 5). Различия в уровне экспрессии наблюдали после 40-го дня развития растений. На 50-й день близкие результаты по уровню экспрессии показали оба сорта масличного льна, сорт льна-долгунца с невысоким содержанием волокна в стебле –

Синичка и высоковолокнистый сорт Томский 16. Сорт Томский 16 относится к группе раннеспелых сортов льна, а все другие исследуемые сорта

прядильного льна – к группе среднеспелых. *L. grandiflorum* Desf. проявил резкое снижение уровня экспрессии после 40-го дня развития.

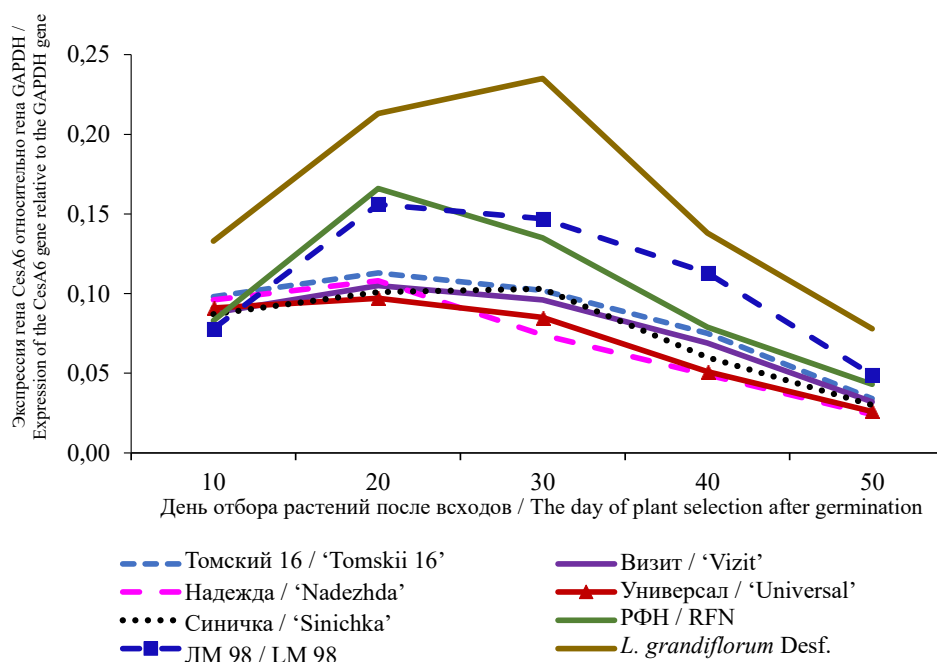


Рис. 3. Динамика экспрессии гена CesA6 относительно гена GAPDH в процессе онтогенеза у различных генотипов льна /

Fig. 3. Dynamics of expression of the CesA6 gene relative to the GAPDH gene during ontogenesis in various flax genotypes

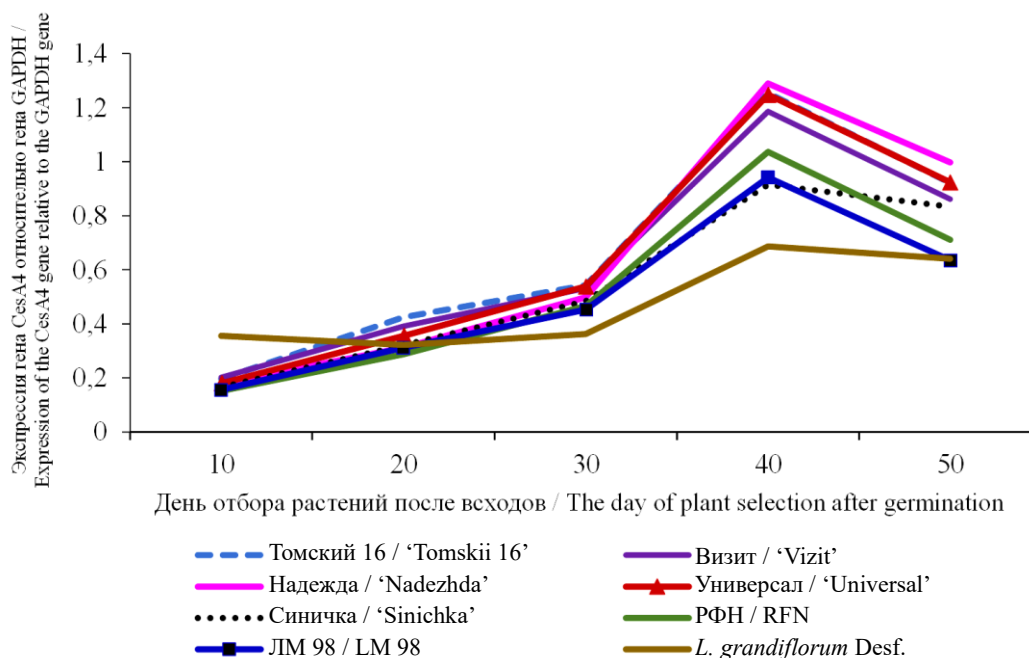


Рис. 4. Динамика экспрессии гена CesA4 относительно гена GAPDH в процессе онтогенеза у различных генотипов льна /

Fig. 4. Dynamics of expression of the CesA4 gene relative to the GAPDH gene during ontogenesis in various flax genotypes

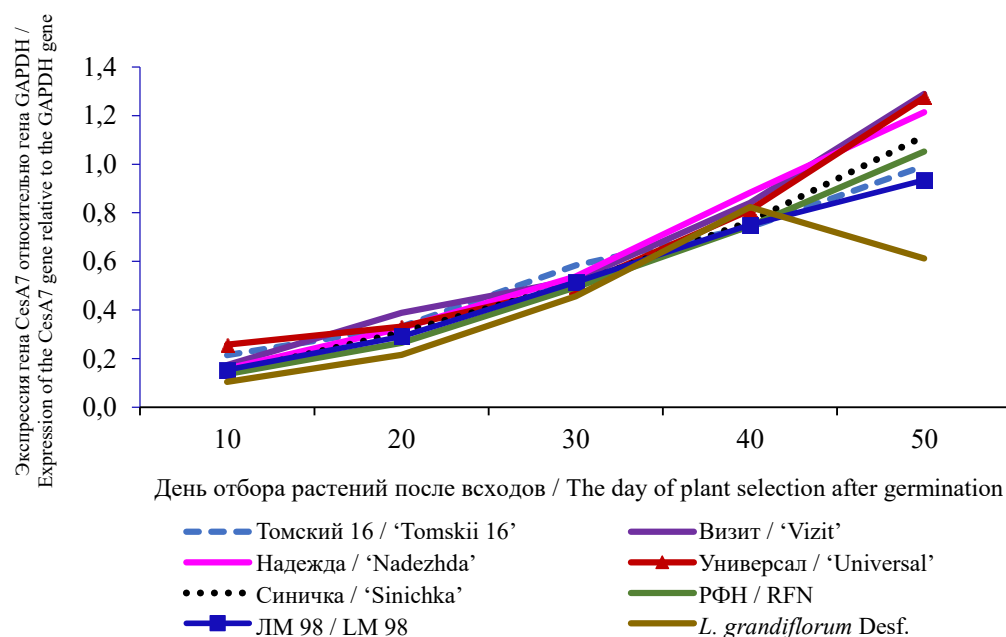


Рис. 5. Динамика экспрессии гена CesA7 относительно гена GAPDH в процессе онтогенеза у различных генотипов льна /

Fig. 5. Dynamics of expression of the CesA7 gene relative to the GAPDH gene during ontogenesis in various flax genotypes

Полученные данные указывают, что экспрессия изученных CesA генов у льна зависит от генотипа, стадии развития растений, особенностей формирования клеточных стенок. Во всех исследованных образцах льна гены, связанные с ВКС (CesA4 и CesA7), имели более высокий уровень экспрессии в стеблях, чем в проростках. В то же время уровни экспрессии, связанные с ПКС CesA1 и CesA6, на стадии быстрого роста были меньше, чем в проростках. Анализ показывает, что на более поздних стадиях развития растения активность генов ПКС начинает снижаться. Гены вторичной клеточной стенки увеличивают экспрессию на стадии быстрого роста.

Исследования экспрессии гена CesA6 указывают на сложность изучаемого процесса, что проявляется в неоднозначности получаемых результатов. Так, выявленный в настоящем исследовании уровень экспрессии очень низкий для всех образцов, что согласуется с результатами работы [24], но отличается от других работ сходной тематики [25, 26]. Возможно, это связано со структурой гена, состоящего как минимум из пяти паралогических последовательностей (А, В, С, D и Е).

Для определения значимости различий между уровнями экспрессии исследованных образцов был проведен кластерный анализ полученных данных методом евклидовых расстояний (рис. 6).

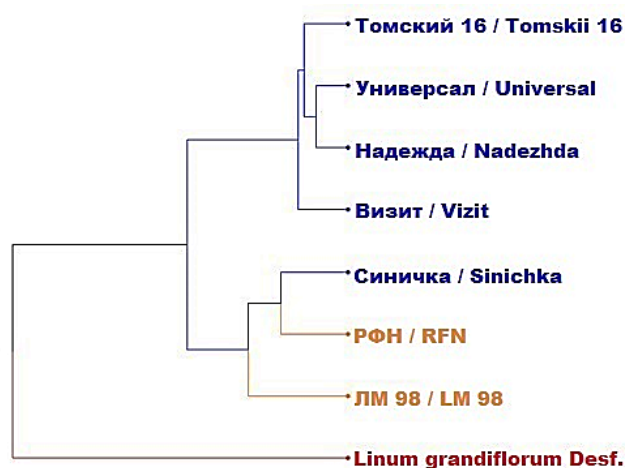


Рис. 6. Дендрограмма кластерного анализа исследованных образцов по экспрессии генов целлюлозосинтаз льна /

Fig. 6. Dendrogram of cluster analysis of the studied samples for the expression of cellulose synthase genes of flax

Кластерный анализ сгруппировал исследованные образцы, разделив друг от друга виды *Linum usitatissimum* L. и *L. grandiflorum* Desf., а также генотипы культурного льна на сорта льна-долгунца с высоким и средним содержанием волокна и группу, объединяющую сорта с низким содержанием волокна. Таким образом, характер и уровень экспрессии генов целлюлозосинтаз исследованных образцов льна связаны с содержанием волокна в стебле.

Заклучение. Полученные данные показывают на генотип- и стадиоспецифичность процессов экспрессии генов целлюлозосинтаз семейства *CesA* в стебле льна. Оценка экспрессии генов целлюлозосинтаз льна в динамике роста

растений позволяет расширить представление о генетическом контроле развития льна. Целлюлозосинтазы первичной клеточной стенки проявляют динамику роста экспрессии до стадии «елочка», затем экспрессия постепенно снижается к фазе быстрого роста, тогда как целлюлозосинтазы вторичной клеточной стенки характеризуются постоянным увеличением экспрессии от первых дней развития проростков до стадии быстрого роста. Различия в экспрессии генов, выявленные между двумя видами льна *Linum usitatissimum* L. и *L. grandiflorum* Desf. на стадии быстрого роста, указывают на наличие особенностей функционирования генов, отвечающих за синтез целлюлозы в пределах рода *Linum*.

References

1. Dhaliwal J. S. Natural fibers: applications. Generation, development and modifications of natural fibers. London: IntechOpen, 2020. Pp. 1–23. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86884>
2. Mohite S., Patil C. K. Linseed Biodiesel – A Review. FLAME 2022: Advances in Fluid and Thermal Engineering. Lecture Notes in Mechanical Engineering. Singapore: Springer, 2023. Pp. 131–141. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-2382-3_11
3. Haag K., Padovani J., Fita S., Trouvé J., Pineau C., Hawkins S., De Jong H., Deyholos M., Chabbert B., Müssig J., Beaupré J. Influence of flax fibre variety and year-to-year variability on composite properties. Industrial Crops and Products. 2017;98:1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.028>
4. Pisupati A., Willaert L., Goethals F., Uyttendaele W., Park C. H. Variety and growing condition effect on the yield and tensile strength of flax fibers. Industrial crops and products. 2021;170:113736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113736>
5. 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):1359. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1175404>
6. Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Ageeva M., Mikshina P. Plant ‘muscles’: fibers with a tertiary cell wall. New Phytologist. 2018;218(1):66–72. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14997>
7. Ageeva M., Petrovská B., Kieft H., Sal’nikov V., Snegireva A., Van Dam J., Van Veenendaal W., Emons A., Gorshkova T., Van Lammeren A. Intrusive growth of flax phloem fibers is of intercalary type. Planta. 2005;222:565–574. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1536-2>
8. Snegireva A., Chernova T., Ageeva M., Lev-Yadun S., Gorshkova T. Intrusive growth of primary and secondary phloem fibres in hemp stem determines fibre-bundle formation and structure. AoB Plants. 2015;7:plv061. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv061>
9. Mokshina N., Chernova T., Galinousky D., Gorshkov O., Gorshkova T. Key stages of fiber development as determinants of bast fiber yield and quality. Fibers. 2018;6(2):20. DOI: <https://doi.org/10.3390/fib6020020>
10. Gorshkova T., Mokshina N., Chernova T., Ibragimova N., Salnikov V., Mikshina P., Tryfona T., Banasiak A., Immerzeel P., Dupree P., Mellerowicz E. Aspen tension wood fibers contain β -(1→4)-galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls. Plant Physiology. 2015;169(3):2048–2063. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00690>
11. Lampugnani E. R., Flores-Sandoval E., Tan Q. W., Mutwil M., Bowman J. L., Persson S. Cellulose synthesis – central components and their evolutionary relationships. Trends in Plant Science. 2019;24(5):402–412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.011>
12. Daras G., Templalexis D., Avgeri F., Tsitsekian D., Karamanou K., Rigas S. Updating insights into the catalytic domain properties of plant cellulose synthase (CesA) and cellulose synthase-like (Csl) proteins. Molecules. 2021;26(14):4335. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26144335>
13. Wilson T. H., Kumar M., Turner S. R. The molecular basis of plant cellulose synthase complex organisation and assembly. Biochemical Society Transactions. 2021;49(1):379–391. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST20200697>
14. Haigler C. H., Roberts A. W. Structure/function relationships in the rosette cellulose synthesis complex illuminated by an evolutionary perspective. Cellulose. 2019;26:227–247. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2157-9>
15. Purushotham P., Ho R., Zimmer J. Architecture of a catalytically active homotrimeric plant cellulose synthase complex. Science. 2020;369(6507):1089–1094. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb2978>
16. Roach M. J., Deyholos M. K. Microarray analysis of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues. Molecular Genetics and Genomics. 2007;278:149–165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0241-1>
17. Mokshina N., Gorshkov O., Galinousky D., Gorshkova T. Genes with bast fiber-specific expression in flax plants – Molecular keys for targeted fiber crop improvement. Industrial crops and products. 2020;152:112549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112549>
18. Горбова М. А., Мансапова А. И. Изучение сортов льна-долгунца томской селекции в подтаёжной зоне Омской области. Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур: сб. мат-лов 11-й Всеросс. конф. молодых учёных и специалистов. Краснодар: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК имени В. С. Пустовойта, 2021. С. 44–49. DOI: <https://doi.org/10.25230/conf11-2021-44-49>

Gorbova M. A., Mansapova A. I. Study of fiber flax varieties of Tomsk breeding in the subtaiga zone of the Omsk region. Topical issues of biology, breeding, technology of cultivation and processing of agricultural crops: collection of materials of the 11th All-Russian Conference of Young Scientists and specialists. Krasnodar: FGBNU FNTs VNIIMK imeni V. S. Pustovoyta, 2021. pp. 44–49. DOI: <https://doi.org/10.25230/conf11-2021-44-49>

19. Gorshkova T. A., Sal'nikov V. V., Chemikosova S. B., Ageeva M. V., Pavlencheva N. V., Van Dam J. E. The snap point: a transition point in *Linum usitatissimum* bast fiber development. Industrial Crops and Products. 2003;18(3):213–221. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(03)00043-8)

20. 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. Journal of experimental botany. 2009;60(2):487–493. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ern305>

21. Kumar S., Jordan M. C., Datla R., Cloutier S. The LuWD40-1 gene encoding WD repeat protein regulates growth and pollen viability in flax (*Linum usitatissimum* L.). PLoS One. 2013;8(7):e69124. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069124>

22. Thambugala D., Cloutier S. Fatty acid composition and desaturase gene expression in flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Applied Genetics. 2014;55:423–432. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0222-0>

23. Huis R., Hawkins S., Neutelings G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). BMC plant biology. 2010;10:71. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-71>

24. Galinovsky D., Padvitskiy T., Bayer G., Pirkov Y., Pydiura N., Anisimova N., Nikitinskaya T., Khotyleva L., Yemets A., Kilchevsky A., Blume Ya. Expression analysis of cellulose synthase and main cytoskeletal protein genes in flax (*Linum usitatissimum* L.). Cell Biology International. 2019;43(9):1065–1071. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.10837>

25. Chantreau M., Chabbert B., Billiard S., Hawkins S., Neutelings G. Functional analyses of cellulose synthase genes in flax (*Linum usitatissimum*) by virus-induced gene silencing. Plant biotechnology journal. 2015;13(9):1312–1324. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12350>

26. Mokshina N., Gorshkova T., Deyholos M. K. Chitinase-like (CTL) and cellulose synthase (CESA) gene expression in gelatinous-type cellulosic walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) bast fibers. PLoS One. 2014;9(6):e97949. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097949>

Сведения об авторах

✉ **Базанов Тарас Александрович**, кандидат хим. наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», Комсомольский проспект, д. 17/56, г. Тверь, Российская Федерация, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9544-5528>, e-mail: t.bazanov@fncl.ru

Ушаповский Игорь Валентинович, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, заместитель директора по науке, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», Комсомольский проспект, д. 17/56, г. Тверь, Российская Федерация, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0602-1211>

Логинова Наталья Николаевна, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», Комсомольский проспект, д. 17/56, г. Тверь, Российская Федерация, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4633-392X>

Минина Екатерина Витальевна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», Комсомольский проспект, д. 17/56, г. Тверь, Российская Федерация, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6559-9577>

Вересова Полина Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и клеточной селекции, ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», Комсомольский проспект, д. 17/56, г. Тверь, Российская Федерация, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7797-2578>

Information about the authors

✉ **Taras A. Bazanov**, PhD in Chemical Science, Head of the Laboratory of the molecular-genetic researches and cell selection, leading researcher, Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Komsomolsky prospect, 17/56, Tver, Russian Federation, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9544-5528>, e-mail: t.bazanov@fncl.ru

Igor V. Ushapovsky, PhD in Biological Science, leading researcher, the Laboratory of the molecular-genetic researches and cell selection, Deputy Director for Science, Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Komsomolsky prospect, 17/56, Tver, Russian Federation, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0602-1211>

Natalya N. Loginova, researcher, the Laboratory of the molecular-genetic researches and cell selection, Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Komsomolsky prospect, 17/56, Tver, Russian Federation, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4633-392X>

Ekaterina V. Minina, postgraduate, junior researcher, the Laboratory of the molecular-genetic researches and cell selection, Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Komsomolsky prospect, 17/56, Tver, Russian Federation, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6559-9577>

Polina D. Veresova, junior researcher, the Laboratory of the molecular-genetic researches and cell selection, Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Komsomolsky prospect, 17/56, Tver, Russian Federation, 170041, e-mail: info@fncl.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7797-2578>

✉ – Для контактов / Corresponding author