

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОЦЕНКЕ ФЕНОТИПА ТРАНСГЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

В.Г. Лебедев, К.А. Шестибратов

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия, vglebedev@mail.ru

Аннотация. Изучение фенотипа растений является неотъемлемой частью как фундаментальных, так и прикладных исследований. В последние годы для этих целей стали активно применяться компьютерные методы анализа, в основном, на травянистых растениях. Начиная с 2010 года, мы работаем над изучением фенотипа трансгенных растений осины, березы и груши с помощью технологий имиджинга. Исследовано влияние генотипа и условий выращивания на изменение параметров листовой пластинки и плодов трансгенных деревьев.

Ключевые слова: фенотипирование, трансгенные растения, груша, осина, береза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1305-1307

Фенотип организма является продуктом взаимодействия генотипа и окружающей среды, и понимание этих взаимосвязей является одной из ключевых проблем современной биологии. Изучение фенотипа особенно актуально для трансгенных растений, у которых встраивание новых или блокирование экспрессии существующих генов в большинстве случаев приводит к его изменениям, причем, не всегда ожидаемым (т.н. непреднамеренные эффекты). Традиционные методы оценки фенотипа (например, с помощью измерительных приборов) очень длительны и трудоемки, а также деструктивны, что не позволяет проводить широкомасштабные эксперименты с большим числом генотипов, а также исключает повторный анализ одних и тех же растений. Этим недостатком лишена современная экспериментальная технология из т.н. омикс-технологий – феномика. Составной частью феномики является фенотипирование – комплексная оценка признаков растения через количественное измерение его отдельных параметров, и поэтому ее иногда называют высокопроизводительной физиологией растений. Компьютерный анализ изображений, представляющих собой оцифрованные признаки, позволил существенно увеличить производительность фенотипирования, которое выступало тормозящим фактором в научных исследованиях [Furbank, Tester, 2011].

Древесные растения являются интересным объектом изучения как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладных исследований, но им уделяется значительно меньше внимания по сравнению с травянистыми видами. Феномика также не является исключением: в одном из последних обзоров по этой теме [Humphrik et al., 2015] около половины исследований проводилось с арабидопсисом, а остальные – в основном с зерновыми, но древесные растения не упоминались. Около 10 лет назад, когда методы высокопроизводительного фенотипирования только входили в употребление, нами была разработана оригинальная методика анализа окраски плодов, основанная на получении изображений в стандартизованных условиях и их последующем анализе в системе цифровых координат L^*a^*b . Данная методика была использована для оценки динамики созревания плодов томата, в которых методом РНК интерференции был подавлен ген биосинтеза этилена [Долгов и др., 2008]. В дальнейшем компьютерные методы анализа изображений мы использовали для оценки фенотипа ряда древесных трансгенных растений – осины, березы и груши, экспрессирующих различные гены.

Листья являются органом фотосинтеза и играют большую роль в выживании и росте растений [Xu et al., 2009]. Известно много примеров изменения формы и

размеров листьев у трансгенных растений, как ожидаемых, так и непреднамеренных. В своих исследованиях на листьях трансгенных деревьев мы использовали программу LAMINA (Leaf shApe deterMINAtion) [Bylesjo et al., 2008]. Анализ листовых параметров двулетних трансгенных растений осины и березы с геном глутаминсинтетазы GS1, основного фермента азотного метаболизма растений, проведенный в 2010 году в теплице, показал отличия от контроля по ряду признаков. Оценка этих же растений в полунатуральных условиях в 2011 году существенных различий не выявила, но после переноса из защищенного грунта площадь листьев березы уменьшилась в среднем на 25%, а осины – на 37%. В трехлетнем эксперименте (2014-2016) мы оценивали влияние трансформации геном GS1 на рост и содержание листовых пигментов у двух видов березы (*Betula pubescens* и *B. pendula*), выращиваемых в полунатуральных условиях на различном азотном фоне [Lebedev et al., 2017]. Анализ листьев 21 генотипа березы (4 контрольных и 17 трансгенных) с помощью программы LAMINA позволил определить эффект встраивания гена и различной доступности азота.

Компьютерную оценку листовых параметров проводили также на растениях осины, трансформированных с целью модификации состава древесины геном ксиланглюканазы *sp-Xeg* из гриба *Penicillium canescens* [Шестибратов и др., 2012] или РНК-интерференционной конструкцией с фрагментами гена биосинтеза лигнина 4CL [Shestibratov et al., 2011]. Эксперименты в 2012-2013 годах показали, что ген ксиланглюканазы, помимо изменения содержания целлюлозы, привел к уменьшению ширины листовой пластинки у некоторых генотипов. Блокирование экспрессии гена 4CL не повлияло на площадь листьев, но существенно изменило их форму – они стали менее округлыми.

Исследования по фенотипированию также осуществляли на трансгенных растениях груши, проходившими полевые испытания [Lebedev, Dolgov, 2008; Dolgov et al., 2011]. Измерения изображений листьев, выполненные в 2011-2013 годах, показали отклонения для ряда генотипов, но в большинстве случаев они были нестабильными во времени, что позволяет предположить влияние погодных условий. Для оценки формы и размера плодов трансгенных растений груши с маркерным геном *gus* использовали программу TomatoAnalyzer [Brewer et al., 2006]. Плоды нескольких генотипов, собранные в 2011 году, показали превышение над контрольными образцами по нескольким параметрам. Однако изменения были нестабильными: у тех же генотипов плоды урожая 2013 года не отличались от контроля, тогда как у других были отмечены изменения в меньшую сторону. Насколько нам известно, ранее об анализе размера и формы плодов трансгенных деревьев, тем более с помощью компьютерных технологий, не сообщалось.

В настоящее время мы работаем над 3Д моделированием кроны трансгенных деревьев на основе цифровых изображений.

Литература

Долгов С.В., Тимербаев В.Р., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Корнеева И.В., Харченко П.Н. Использование механизма ПТИГ для модификации процесса созревания плодов. Сборник научных трудов «Молчание генов». – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. – С. 253–269.

Шестибратов К.А., Подрезов А.С., Салмова М.А., Ковалицкая Ю.А., Видягина Е.О., Логинов Д.С., Королева О.В., Мирошников А.И. Фенотипическое проявление экспрессии гена ксиланглюканазы из *Penicillium canescens* в трансгенных растениях осины // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 5. – С. 1–9.

Brewer M.T., Lang L., Fujimura K., Dujmovic N., Gray S., van der Knaap E. Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit shape variation in tomato and other plant species // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 15–25.

Bylesjo M., Segura V., Soolanayakanahally R.Y., Rae A.M., Trygg J., Gustafsson P., Jansson S., Street N.R.. LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters // *BMC Plant Biology.* – 2008. – V. 8. – No. 82.

Dolgov S.V., Lebedev V.G., Firsov A.P. Pear fruit taste modification by thaumatin II gene expression // *Acta Horticulturae.* – 2011. – V. 909. – P. 67–73.

Furbank R.T., Tester M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck // *Trends Plant Sci.* – 2011. – V. 16. – P. 635–644.

Humplik J.F., Lazar D., Husickova A., Spichal L. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses - a review // *Plant Methods.* – 2015. – V. 11. – No. 29.

Lebedev V.G., Dolgov S.V. Stability of gus and bar gene expression in transgenic pear clonal rootstock plants during several years // *Acta Horticulturae.* – 2008. – V. 800. – P. 373–382.

Lebedev V.G., Kovalenko N.P., Shestibratov K.A. Influence of nitrogen availability on growth of two transgenic birch species carrying the pine GS1a gene // *Plants.* – 2017. – V. 6(1). – No. 4.

Shestibratov K., Lebedev V., Podrezov A., Salmova M. Transgenic aspen and birch trees for Russian plantation forests // *BMC Proceedings.* – 2011. – V. 5, Suppl. 7. – P. 124.

Xu F., Guo W., Xu W., Wei Y., Wang R. Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? // *Prog Nat Sci.* – 2009. – V. 19. – P. 1789–1798.

IMAGING TECHNOLOGIES IN PLANT PHENOTYPING OF TRANSGENIC TREES

V.G. Lebedev, K.A. Shestibratov

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, vglebedev@mail.ru

Abstract. The plant phenotyping is an integral part of both fundamental and applied research. In recent years, automated image analysis has been actively used, but mainly for herbaceous plants. Since 2010 we are studying the phenotype of transgenic aspen, birch and pear plants using imaging technology. The effects of the genotype and environmental conditions on size and shape of leaves and fruits of transgenic trees were investigated.

Keywords: *phenotyping, transgenic plants, pear, aspen, birch*