



УДК 58.084.1

Различная устойчивость к канамицину трансгенных клонов *Populus × berolinensis*, экспрессирующих ген *nptII*

В. В. Павличенко¹, М. В. Протопопова¹, Э. М. Байрамова²,
Е. Д. Золотовская², А. Д. Коновалов², В. К. Войников¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Аннотация. Проведена оценка устойчивости трансгенных линий тополя берлинского, трансформированных генетической конструкцией на основе плазмиды pB1121, несущей ген *nptII*. Наличие гена *nptII* в геномах трансгенных линий подтверждали с помощью ПЦР. Всего в исследовании использовали 6 трансгенных и 1 контрольную линию тополя. Определение устойчивости линий проводили по эффективности корнеобразования на средах с различными концентрациями канамицина: 12,5, 25, 50 и 75 мг/л. Результаты показали, что все трансгенные линии отличались по устойчивости к канамицину. Наиболее устойчивыми оказались растения линий II и III, которые укоренялись даже при использовании максимальной концентрации канамицина в питательной среде. Мы предполагаем, что различия в устойчивости могут быть обусловлены разным количеством копий импортированных генов в геномах трансформированных растений, а также различной эффективностью их транскрипции.

Ключевые слова: агробактериальная трансформация, канамицин, *nptII*, *uidA*, GUS-репортерная система, *Populus × berolinensis*, устойчивость, трансгенные растения.

Введение

Генетическая трансформация растений может приводить к появлению линий растений с различной степенью проявления целевого признака. Кроме того, даже в результате последующего вегетативного размножения полученных трансформантов могут выщепляться различные фенотипические варианты. В случае агробактериальной трансформации механизм такого расщепления не всегда однозначен и может быть обусловлен рядом причин, например различными местами встройки генетической конструкции в геном растения [7] и её активностью, а также копийностью целевого гена в геноме растения-реципиента [1]. В связи с необходимостью отбора растений лишь с определённым набором полезных признаков, методологические работы, направленные на исследование эффекта фенотипического расщепления в результате генетической трансформации, представляют научный интерес.

Одним из селективных генов, наиболее часто используемым при генетической трансформации, является ген неомисин фосфотрансферазы II

(*nptII*), обуславливающий устойчивость к ряду антибиотиков, включая канамицин. В результате генетической трансформации могут выплываться клоны с различной степенью проявления нового признака, в том числе и с различной степенью устойчивости к селективному агенту.

Настоящее исследование направлено на сравнительную оценку степени устойчивости к канамицину нескольких клонов тополя берлинского, трансформированных по гену *nptII*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis* Dippel), являющийся гибридом тополя лавролистного (*Populus laurifolia* Ledeb.) и тополя чёрного (*Populus nigra* L.). Представители семейства Ивовые часто используются в качестве модельного объекта для изучения влияния генетической трансформации на рост, развитие, метаболизм растений, а также для отработки методики создания древесных растений с новыми свойствами. Наиболее перспективными в этом отношении являются виды рода *Populus* ввиду их высокой способности к трансформации, регенерации и вегетативному размножению, а также небольшого размера полностью аннотированного генома [3; 4]. Существует мнение, что виды рода *Populus* играют такую же роль в изучении древесных растений, как *Arabidopsis thaliana* для двудольных травянистых [5].

Агробактериальную генетическую трансформацию тополя берлинского проводили с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 с хелперной плазмидой рMP90. В качестве бинарного вектора для трансформации использовали коммерческую плазмиду рВ1121 (Clontech, США), содержащую селективный и репортерный гены. В качестве селективного использовался ген неомидин фосфотрансферазы II (*nptII*), определяющий устойчивость к сульфату канамицина (далее по тексту – канамицин), а роль репортерного выполнял ген *uidA* из *E. coli*, кодирующий бактериальный фермент β-D-глюкуронидазу.

Перенос векторной конструкции в клетки *A. tumefaciens* осуществляли с помощью прямой трансформации методом замораживания-оттаивания с авторскими модификациями [6]. Непосредственно генетическую трансформацию растений осуществляли при помощи инкубации растительных эксплантов (отрезки стеблей без пазушных почек) в суспензии *A. tumefaciens*. Инкубацию проводили в жидкой среде для культивации *A. tumefaciens* – YEB без антибиотиков в течение двух суток на перемешивающем шейкере при температуре 26 °С. Трансформированные и отмытые от агробактерий экспланты переносили на питательные среды для получения регенерантов. Для освобождения растительного материала от агробактерий и получения регенерантов использовали цефотаксим в финальной концентрации 200 мг/л. Для образования регенерантов питательную среду готовили на основе 50%-ной среды Мурашиге – Скуга MS 5524 (Sigma, Germany) [2], содержащую полную норму хелата железа и микроэлементов среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновую кислоту (0,5 мг/л), мезо-

инозит (50 мг/л), аденин сульфат (40 мг/л), бензиладенин (0,2 мг/л), нафтилуксусную кислоту (0,01 мг/л) и тидиазурон (0,02 мг/л). В качестве источника углеводов использовали сахарозу в финальной концентрации 2 %. Для получения твёрдой среды применяли агар в финальной концентрации 7 г/л. Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. Для проведения селективного отбора трансформированных растений в стерильную (автоклавированную) остывшую до 55 °С питательную среду добавляли канамицин в финальной концентрации 12,5 мг/л. В сосуды для культивирования объёмом 100 мл разливали по 25 мл готовой питательной среды и закрывали прозрачными крышками Magenta B-Cap (Sigma, Germany). На поверхность затвердевшей и остывшей до комнатной температуры питательной среды помещали экспланты растений. Сосуды с эксплантами экспонировали в световой комнате с фотопериодом 16/8 ч. (день/ночь) при температуре 24 °С. Через 20 суток отмечали появление первых регенерантов, которые срезали и переносили на питательную среду для укоренения на основе 1/2 MS 5524 (Sigma, Germany), содержащую полную норму хелата железа и микроэлементов среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновую кислоту (0,5 мг/л), инозит (50 мг/л), индолилмасляную кислоту (0,15 мг/л), сахарозу (2 %), агар (Биотехновация, Россия) (7 г/л), канамицин (12,5 мг/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. Растения, укоренившиеся на питательной среде с канамицином, считали потенциально трансформированными и вегетативно размножали для дальнейших экспериментов. Контрольные растения параллельно переносили на аналогичную питательную среду и среди них не отмечали корнеобразования. Всего было отобрано шесть трансгенных линий тополя берлинского. Трансгенность отобранных линий тополя была дополнительно подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), детектирующей гены *nptII* и *uidA*, а также качественной реакции гидролиза 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуронида (X-gluc) – субстрата фермента β -глюкуронидазы (продукта гена *uidA*).

Качественную реакцию на активность GUS-репортерной системы проводили путём инкубирования отрезков листьев трансгенных растений в растворе X-gluc (1 mM X-gluc в 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) в течение 20 ч при 37 °С. Наличие активности фермента β -глюкуронидазы детектировали по окрашиванию растительных тканей в синий цвет.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в ДНК-амплификаторе T100 (Bio-Rad) с использованием набора для ПЦР GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Реакцию проводили в объёме 20 мкл с финальной концентрацией каждого праймера 250 нМ. В работе использовали следующие праймеры: для гена *uidA* – прямой – 5'-TGT GGG CAT TCA GTC TGG ATC G-3' и обратный – 5'-GCC AGT CCA GCG TTT TTG CAG-3'; для гена *nptII* – прямой - 5'-AGG TTC TCC GGC CGC TTG-3' и обратный – 5'-AGT ACG TGC TCG CTC GAT GC-3'. Температурный режим реакции: иницирующая денатурация (95 °С, 5 мин); 35 циклов амплификации: денатурация (95 °С, 20 с), отжиг праймеров (60 °С, 20 с) и элонгация (72 °С, 1 мин); заключи-

тельная элонгация (72 °С, 7 мин). Качество ПЦР-продукта определяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на гель-документирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad).

Всего в исследовании использовали шесть трансгенных (I–VI) и одну контрольную линию тополя. Каждая из групп была получена из одного растения, что свидетельствует об одинаковом генотипе внутри каждой группы. Определение устойчивости линий проводили по эффективности корнеобразования на среде с различными концентрациями канамицина: 12,5; 25; 50 и 75 мг/л. На каждом виде питательной среды укореняли по 10 растений, каждое из них содержали в отдельной пробирке в 10 мл вышеописанной питательной среды для укоренения в световой комнате с фотопериодом 16/8 ч (день/ночь) при температуре 23 °С.

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проведены анализы, подтверждающие трансгенную природу отобранных для исследования линий тополя. Так, качественная реакция на активность GUS-репортерной системы показала наличие активности гена *uidA* у всех шести отобранных трансгенных линий тополя: в присутствии X-gluc листья растений окрашивались в синий цвет (рис. 1). У контрольных растений окрашивания листьев не происходило. Результаты ПЦР подтвердили наличие генов *uidA* и *nptII* в геномах всех шести трансгенных линий тополя (рис. 2, 3).

Растения из всех трансгенных групп укоренялись со 100%-ной эффективностью в случае использования финальной концентрации канамицина в питательной среде 12,5 мг/л, которая также была использована для отбора регенерантов после генетической трансформации (табл., рис. 4). При использовании более высокой концентрации канамицина (25 мг/л) наблюдали 100%-ное укоренение трансгенных линий II и III. Остальные трансгенные линии при использовании данной концентрации канамицина показали более низкий процент укоренения: I – 70 %, IV – 70 %, V – 50 % и VI – 90 %. Использование концентрации канамицина в питательной среде до значения 50 мг/л привело к ещё большему разделению трансгенов по степени устойчивости к канамицину по сравнению с предыдущей концентрацией: I – 40 %, II – 80 %, III – 90 %, IV – 10 %, V – 40 % и VI – 70 %. При максимальной концентрации канамицина в питательной среде (75 мг/л) укоренение наблюдали только в двух линиях из шести: II – 30 %, III – 10 %. Представители остальных групп в случае использования данной концентрации показали 100%-ную гибель. Контрольные растения не образовывали корни и погибали уже при концентрации канамицина в питательной среде 12,5 мг/л (рис. 5).

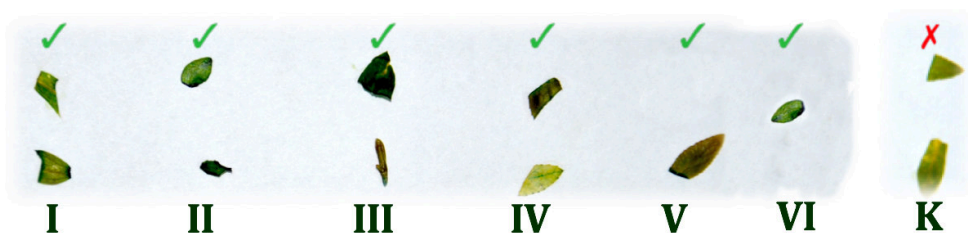


Рис. 1. Результаты качественной реакции на активность GUS-репортерной системы у трансгенных (I–VI) и контрольной (K) линий растений тополя берлинского, ✓ – наличие синего окрашивания, ✗ – отсутствие синего окрашивания

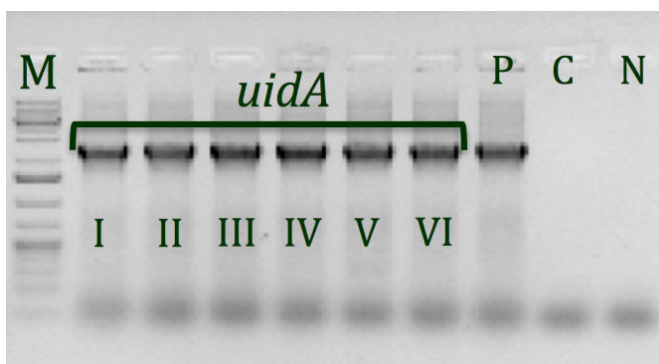


Рис. 2. Результаты ПЦР на наличие гена *uidA* у линий тополя берлинского. М – ДНК-маркер (GeneRuler DNA Ladder, Fermentas), I–VI – трансгенные линии; Р – позитивный контроль (плазмида pBI121), С – контрольная линия, N – негативный контроль (без добавления ДНК)

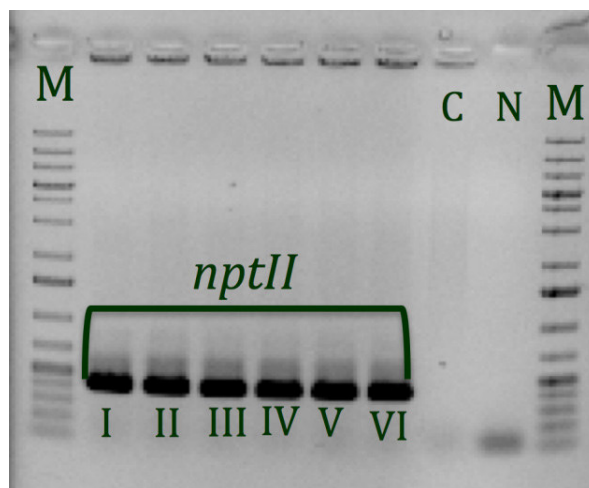


Рис. 3. Результаты ПЦР на наличие гена *nptII* у линий тополя берлинского. М – ДНК-маркер (1 kВ plus GeneRuler DNA Ladder, Fermentas), I–VI – трансгенные линии; С – контрольная линия, N – негативный контроль (без добавления ДНК)

Таблица

Эффективность корнеобразования у растений шести трансгенных линий тополя берлинского на средах с различными концентрациями канамицина (% укоренившихся растений от общего числа использованных в исследовании)

№ линии	Концентрация канамицина (мг/л)			
	12,5	25	50	75
I	100	70	40	0
II	100	100	80	30
III	100	100	90	10
IV	100	70	10	0
V	100	50	40	0
VI	100	90	70	0

Результаты исследования выявили наличие доза-зависимого эффекта канамицина на эффективность укоренения у всех исследованных трансгенных линий тополя берлинского. Данный эффект выражался в снижении процента укоренившихся растений при увеличении концентрации канамицина. Было также показано, что все полученные трансгенные линии тополя по гену *nptII* отличались устойчивостью к канамицину. Так, из шести полученных трансгенных линий наиболее устойчивыми к канамицину оказались растения линий II и III. Наибольшую устойчивость к канамицину показали трансгенные растения линии II. Растения четырёх оставшихся линий были менее устойчивы к высоким концентрациям канамицина в питательной среде. Кроме того, было обнаружено фенотипическое расщепление у растений каждой линии. Так, в большинстве случаев, не все растения одной линии укоренялись на селективной среде, либо укоренялись с разной эффективностью. Для каждой из линий расщепление по фенотипу увеличивалось в пользу неукоренившихся растений с усилением давления селективного фактора (увеличение концентрации канамицина в среде).

Результаты исследования показали, что при использовании более высоких концентраций селективного агента можно отбирать трансгенные растения с наиболее выраженным эффектом генетической трансформации. Использование же более низких концентраций может приводить к снижению селективности и отбору растений с менее выраженным эффектом генетической трансформации. Последняя стратегия в свою очередь может быть применена в случае необходимости отбора трансформантов с менее выраженным фенотипическим эффектом генетической трансформации, в том числе связанных с нежелательной активностью селективного гена. Наблюдаемые различия в устойчивости трансгенных линий тополя берлинского по гену *nptII* к канамицину могут быть связаны с генетическими особенностями полученных линий. Такими особенностями могут являться различное количество копий импортированных генов в геноме, а также различная эффективность их транскрипции у отобранных линий тополя, что планируется подтвердить в ходе дальнейших исследований.



Рис. 4. Образование корней на питательной среде с различным содержанием канамицина у трансгенных линий тополя. В качестве примера представлены результаты для линии II

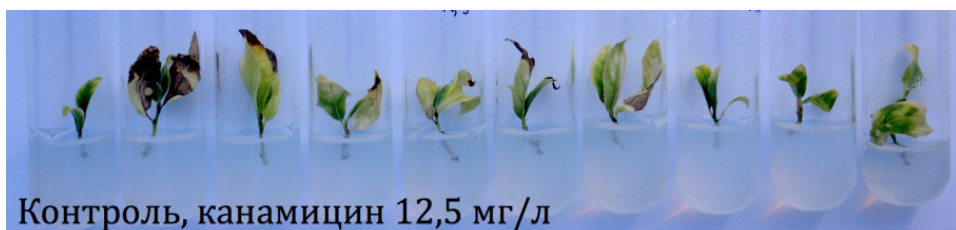


Рис. 5. Нарушение корнеобразования у контрольной линии тополя берлинского на питательной среде с канамицином (12,5 мг/л)

Заключение

Результаты исследования показали, что все изученные трансгенные линии тополя берлинского экспрессирующие ген *nptII* отличались по устойчивости к канамицину. Наиболее устойчивыми оказались растения линий II и III, которые укоренялись даже при использовании максимальной концентрации канамицина в питательной среде (75 мг/л). Мы предполагаем, что различия в устойчивости могут быть обусловлены различным количеством копий импортированных генов в геномах трансформированных растений, а также эффективностью их транскрипции.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке стипендии Президента РФ (СП-3823.2015.1), Комплексной программы фундаменталь-

ных исследований СО РАН (проект № 0343-2015-0005) и проекта РФФИ 14-04-31681 мол_а. Авторы признательны К. З. Гамбургу за помощь в селективном отборе трансгенных растений тополя. Авторы благодарят Байкальский аналитический центр (ЦКП) при Президиуме ИИЦ СО РАН за предоставленную возможность использования необходимого для исследования оборудования.

Список литературы

1. Karami O. Factors Affecting *Agrobacterium*-mediated Transformation of Plants / O. Karami // *Transgenic Plant Journal*. – 2008. – Vol. 2(2). – P. 127–137.
2. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
3. Rishi A. S. Genetic modification for improvement of *Populus* / A. S. Rishi, N. D. Nelson, A. Goyal // *Physiology and molecular biology of plants*. – 2001. – Vol. 7. – P. 7–21.
4. Studart-Guimarães C. Evaluation of heterologous promoters in transgenic *Populus tremula* × *P. alba* plants / C. Studart-Guimarães, C. Lacorte, A. C. M. Brasileiro // *Biologia plantarum*. – 2006. – Vol. 50 (1). – P. 15–20.
5. Taylor G. *Populus*: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? / G. Taylor // *Annals of Botany*. – 2002. – Vol. 90. – P. 681–689.
6. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* / M. Holsters [et al.], // *Molecular and general genetics*. – 1978. – Vol. 163(2). – P. 181–187.
7. Uçarlı C. Expression and genomic integration of transgenes after *Agrobacterium*-mediated transformation of mature barley embryos / C. Uçarlı, F. Tufan, F. Gürel // *Genetic and Molecular Research*. – 2015. – Vol. 14(1). – P. 1096–1105.

Different Degrees of Resistance to Kanamycin of *Populus*×*berolinensis* (Salicaceae) Transgenic Clones Expressing *nptII* Gene

V. V. Pavlichenko¹, M. V. Protopopova¹, E. M. Bairamova²,
E. D. Zolotovskaya², A. D. Kononov², V. K. Voinikov¹

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

²*Irkutsk State University, Irkutsk*

Abstract. The resistance to kanamycin of several transgenic lines of *Populus*×*berolinensis* transformed by genetic construction on the base of pBI121 binary vector and containing *nptII* gene was evaluated. The presence of *nptII* gene in the transgenic plants genomes was approved by PCR. Six transgenic lines and one control line of poplar were tested. The degrees of resistance of the studied lines of poplar to kanamycin were determined by their rooting ability. In experiments 12.5, 25, 50 and 75 mg/L of kanamycin sulphate in the growth media were tested. The results showed the different degrees of resistance of all studied poplar transgenic lines to kanamycin. The lines II and III were the most resistant and were rooted even at the highest used concentration of kanamycin in the growth media. We suppose, that differences in the resistance may be caused by different copy numbers of imported genes in the transgenic plants genomes and by differences in their expression.

Keywords: *Agrobacterium* mediated transformation, kanamycin, *nptII*, *uidA*, GUS-reporter system, *Populus*×*berolinensis*, resistance, transgenic plants.

Павличенко Василий Валерьевич
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
e-mail: vpavlichenko@gmail.com

Pavlichenko Vasilij Valeryevich
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59
fax: (3952) 51-07-54
e-mail: vpavlichenko@gmail.com

Протопопова Марина Владимировна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Protopopova Marina Vladimirovna
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
tel. (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Байрамова Эльвира Махаловна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: bairamovaelvira@gmail.com

Bairamova Elvira Makhhalovna
Student
Irkutsk State University
1, K.Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: bairamovaelvira@gmail.com

Золотовская Елена Дмитриевна
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К.Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: zolotovskayaelenad@gmail.com

Zolotovskaya Elena Dmitriyevna
Student
Irkutsk State University
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: zolotovskayaelenad@gmail.com

Коновалов Алексей Дмитриевич
студент
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1
тел.: (3952) 24-18-70
e-mail: konovalov.alexey.d@gmail.com

Konovalov Aleksey Dmitriyevich
Student
Irkutsk State University
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952) 24-18-70
e-mail: konovalov.alexey.d@gmail.com

Войников Виктор Кириллович
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952) 42-46-59
факс (3952) 51-07-54
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru

Voinikov Victor Kirillovich
Doctor of Sciences (Biology), Principal
Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel. (3952) 42-46-59
fax (3952) 51-07-54
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru