



УДК 58.084.1

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.25.3>

Результаты пятилетнего лабораторного культивирования растений тополя берлинского, генетически модифицированных генами *uidA* и *nptII*

В. В. Павличенко, М. В. Протопопова, В. К. Войников

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Аннотация. В результате генетической трансформации растений частым явлением становится утрата трансформатом способности к экспрессии трансгена. Причинами замолчания трансгенов могут являться различные факторы: микроклональное размножение трансгенных растений или длительная культивация в открытом или закрытом грунтах. В настоящей работе проводили оценку сохранности трансгенов после пяти лет культивирования генетически модифицированных растений тополя берлинского в лабораторных условиях в отсутствие селективного фактора в питательной среде. Тополь берлинский (*Populus ×berolinensis* Dippel) является гибридом тополя лавролистного (*Populus laurifolia* Ledeb.) и тополя чёрного сорта Италика (*P. nigra* L. “*Italica*”). Генетическую трансформацию растений проводили с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. В качестве вектора для трансформации использовали бинарный вектор pBI121 (Clontech, США), содержащий селективный ген неомицин фосфотрансферазы II – *nptII*, определяющий устойчивость к сульфату канамицина и репортерный 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. Изученные трансгенные растения тополя берлинского характеризовались стабильной (постоянной) экспрессией генов *uidA* и *nptII*. Несмотря на отсутствие в питательной среде селективного фактора в виде антибиотика, активность гена *nptII* не снизилась и не исчезла по прошествии пяти лет содержания растений в стерильной лабораторной культуре. Показано, что применённый подход к генетической трансформации тополя берлинского посредством агробактерии может быть эффективно использован для получения стабильных трансгенных растений без потери вновь приобретённых свойств как минимум через пять лет.

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

Для цитирования: Павличенко В. В., Протопопова М. В., Войников В. К. Результаты пятилетнего лабораторного культивирования растений тополя берлинского, генетически модифицированных генами *uidA* и *nptII* // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2018. Т. 25. С. 3–14. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.25.3>

Введение

В настоящее время существенную долю продовольственного рынка занимают товары с добавлением компонентов, полученных из генетически модифицированных растений, обладающих новыми ценными свойствами.

Современные темпы научно-технического развития в комплексе с постоянно увеличивающимся населением планеты предполагают расширение объёма и ассортимента продуктов питания и материалов, полученных из организмов с модифицированным геномом. Классические подходы генетической трансформации растений не могут обеспечивать встраивание переносимой генетической конструкции в строго определённое место генома растения-реципиента. Довольно частым явлением становится утрата трансформатом способности к экспрессии трансгена. Причинами подобных замолканий трансгенов могут являться различные факторы. Так, например, к постепенному снижению уровня экспрессии трансгена может приводить микрклональное размножение трансгенных растений. Подобный эффект наблюдали при работе с трансгенной берёзой, у которой детектировали такие процессы, как транскрипционный сайленсинг и метилирование трансгена, что в свою очередь снижало уровень экспрессии встроённых генов [Stability of transgenes ... , 2010].

В качестве примера можно отметить работы по исследованию трансгенных линий сахарного тростника, проводимые на протяжении последних 50 лет. Так, на формах тростника, полученных путем биобаллистической трансформации, было показано, что экспрессия трансгенов является крайне нестабильной. Трансформированные таким способом растения обычно получали в свой геном сложные конструкции, которые в свою очередь часто представлены большим числом копий. Такие растения демонстрировали высокий уровень экспрессии трансгена на начальных этапах развития, но затем уровень экспрессии трансгена снижался. Данный факт связывают с замолканием генов по принципу обратной связи, вызванным высоким числом копий трансгена в геноме [Transgene-induced gene ... , 1998; Arruda, 2012]. Подобные эффекты замолкания также наблюдали при изучении трансгенных линий риса [Kumapala, Hall, 1998], ячменя [Meng, Ziv, Lemaux, 2006], горчавки [De novo DNA ... , 2011] и других растений.

Существуют также положительные примеры культивации модифицированных растений в течение длительного периода. Так, трёхлетнее хранение в состоянии покоя гладиолусов, генетически модифицированных по гену *uidA* не приводило к изменению его экспрессии [Kamo, 2003]. Стабильная экспрессия трансгенов *uidA*, *bar* и *nptII* была также показана для лилий, содержащихся в теплице в течение 9 лет [Kamo, 2014]. Исследования трансгенного красного перца показали сохранность трансгена в первом и втором поколениях растений [Stable production of ... , 2007].

Трансгенные древесные растения в основном размножают вегетативно или микрклонально, поэтому с течением времени могут происходить замолкания трансгенов, вызванные в том числе и метилированием чужеродной ДНК [Rajeevkumar, Anunanthini, Sathishkumar, 2015]. В связи с этим контроль сохранности трансгена в процессе роста и развития трансгенного дерева должен осуществляться регулярно. В литературе описаны несколько длительных мониторинговых исследований трансгенных древесных растений. Так, стабильную экспрессию трансгена *uidA* наблюдали у персика в

течение девяти лет выращивания в теплице [Long-term stability of ... , 2007], а также у трансгенной геви, содержащейся в условиях *in vitro* более 15 месяцев [Variation in GUS ... , 2011]. Для тополей, выращиваемых в условиях открытого грунта в течение трёх лет, также была показана стабильная экспрессия двух трансгенов – *gfp* и *bar* [Stability of transgenes ... , 2009]. Устойчивая интеграция и экспрессия трансгенов (*uidA* и *nptII*) также была подтверждена и для апельсинов, выращиваемых в течение трёх лет в открытом грунте. Кроме того, авторы отмечали небольшую сезонную вариацию в уровнях экспрессии трансгенов в разных органах изученных растений апельсина [Pons, Peris, Peña, 2012]. Известны древесные трансгенные растения, срок испытаний которых в полевых условиях превышает 10 лет. Так, например, яблони, трансформированные геном, кодирующим белок аттацин E, содержались в условиях открытого сада в течение 12 лет и не теряли свойств, связанных с экспрессией трансгена [Stable expression and ... , 2010].

Несмотря на то что в подавляющем большинстве работ, посвящённых генетической трансформации древесных растений, экспрессия целевых генов сохраняется с течением времени, также известны случаи замолкания трансгена или снижения его экспрессии. Так, при исследовании девяти линий тополя, трансгенных по гену *uidA*, у половины из них наблюдали снижение экспрессии трансгена после переноса лабораторной культуры в теплицу [Stability of transgene ... , 2003]. Замолкание было также обнаружено у линий тополя, трансформированных по гену *rolC* [Fladung, Kumar, 2002], а отсутствие стабильной экспрессии отмечали после трансформации геном *bar* [Transgene stability and ... , 2012]. Замолкание или нестабильность экспрессии трансгенов могут быть следствием ошибок в процессе трансформации, эпигенетических эффектов или воздействия внешних факторов среды, однако эти эффекты изучены в недостаточной мере.

Таким образом, можно констатировать тот факт, что каждая новая генетическая трансформация является уникальной и на сегодняшний момент в точности невозпроизводимой. Процессы, происходящие в геноме растительных организмов, могут приводить к потере целевого признака или вызвать новые перестройки в геноме, которые, в свою очередь, могут стать причиной проявления нежелательных или даже опасных для потребителей признаков.

Настоящее исследование было направлено на оценку стабильности экспрессии генов *uidA* и *nptII* в генетически модифицированных линиях тополя берлинского, содержащихся в условиях *in vitro* на протяжении 5 лет.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis* Dippel), являющийся гибридом тополя лавролистного (*Populus laurifolia* Ledeb.) и тополя чёрного сорта Италика (*P. nigra* L. “*Italica*”). Представители рода *Populus* часто используют в качестве модельных объектов для изучения процессов роста и развития древесных растений, а также для микрклонального размножения и генетической трансформации.

Агробактериальную генетическую трансформацию проводили с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 с хелперной плазмидой pMP90. В качестве вектора для трансформации использовали коммерческую плазмиду pBI121 (Clontech, США). Данная плазида содержит селективный ген неомидин фосфотрансферазы II – *nptII*, определяющий устойчивость к сульфату канамицина (далее по тексту – канамицин), а также репортерный 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 [Transfection and transformation ... , 1978] с авторскими модификациями. Генетическую трансформацию растений осуществляли посредством инкубации отрезков 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 (200 об/мин) при температуре 26 °С. Трансформированные и отмытые от агробактерий экспланты переносили на твердую питательную среду для получения регенератов.

Для освобождения растительного материала от агробактерий и получения регенерантов использовали цефотаксим в финальной концентрации 200 мг/л. В качестве субстрата для индукции органогенеза использовали агаризованную питательную среду на основе 1/2 MS 5524 [Murashige, Skoog, 1962] (Sigma-Aldrich, Германия) с добавлением хелата железа и микроэлементов до полной нормы от среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), аденин сульфата (40 мг/л) и мезоинозита (50 мг/л), сахарозы (2 %) и агара (7 г/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. В качестве регуляторов роста использовали бензиладенин (0,2 мг/л), нафтилуксусную кислоту (0,01 мг/л) и тидиазурон (0,02 мг/л). Для проведения селективного отбора трансформированных растений в стерильную и остывшую до 55 °С питательную среду вносили канамицин в финальной концентрации 12,5 мг/л. В сосуды для культивирования объемом 100 мл разливали по 25 мл готовой питательной среды и закрывали крышками Magenta B-Cap (Sigma, Германия). 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 для укоренения на питательную среду, содержащую помимо основных компонентов, описанных выше, индолилмасляную кислоту в финальной концентрации 0,15 мг/л. Растения, укоренившиеся на питательной среде с антибиотиком, считали трансформированными и вегетативно размножали для дальнейших экспериментов. 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 °C. Наличие активности фермента β-глюкуронидазы детектировали по окрашиванию растительных тканей в синий цвет.

Суммарную ДНК выделяли из высушенных листьев с помощью СТАВ-метода [Doyle, Doyle, 1987] с авторскими модификациями.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в ДНК-амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) 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 °C, 5 мин); 35 циклов амплификации: денатурация (95 °C, 20 с), отжиг праймеров (60 °C, 20 с) и элонгация (72 °C, 1 мин); заключительная элонгация (72 °C, 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, США).

Всего было получено шесть трансгенных (I–VI) линий тополя берлинского. Каждая из групп была получена из одного растения, что свидетельствует об одинаковом генотипе внутри каждой группы. Все шесть линий содержались в течение пяти лет в условиях *in vitro* на питательной среде для укоренения без добавления антибиотика. Для сохранения растений в стерильной культуре применяли метод последовательной пересадки срезанных верхних частей растения (3–4 листа) на питательную среду для укоренения через каждые 25–30 дней. Каждые шесть месяцев для всех шести трансгенных линий оценивали эффективность корнеобразования на питательной среде с канамицином в финальной концентрации 25 мг/л. В конце пятилетнего срока содержания трансгенных растений тополя в условиях *in vitro* проводили выделение суммарной ДНК и осуществляли ПЦР для детектирования трансгенов (*nptII* и *uidA*) в геноме исследуемых линий растений.

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. У контрольных растений окрашивания не происходило. Результаты ПЦР подтвердили наличие генов *uidA* и *nptII* в геномах всех шести трансгенных линий тополя.

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. При использовании более высокой концентрации канамицина (25 мг/л) наблюдали 100%-ное укоренение трансгенных линий G1 и G3. Остальные трансгенные линии при использовании данной концентрации канамицина показали более низкий процент укоренения: G1 – 70 %, G4 – 70 %, G5 – 50 %, G6 – 90 %.

Полученные трансгенные линии тополя берлинского по генам *uidA* и *nptII* содержались в лабораторных условиях в течение пяти лет с использованием питательной среды без добавления антибиотиков. На данной питательной среде все трансгенные линии демонстрировали нормальное корнеобразование в течение всего эксперимента (рис. 1).

Из листьев всех трансгенных линий тополя берлинского была выделена суммарная ДНК. ПЦР на гены *uidA* и *nptII* показала их наличие в геномах всех изученных линий (рис. 2, 3).

Через пять лет все трансгенные линии были перенесены для укоренения на питательную среду, содержащую селективный агент – канамицин в финальной концентрации 25 мг/л. Все исследованные трансгенные линии тополя берлинского укоренялись на среде в присутствии антибиотика (рис. 3), что свидетельствовало о стабильной экспрессии трансгена (*nptII*), обуславливающего устойчивость к канамицину.

Контрольные растения, не обладающие устойчивостью к канамицину, при использовании такой же питательной среды корней не образовывали (рис. 4).

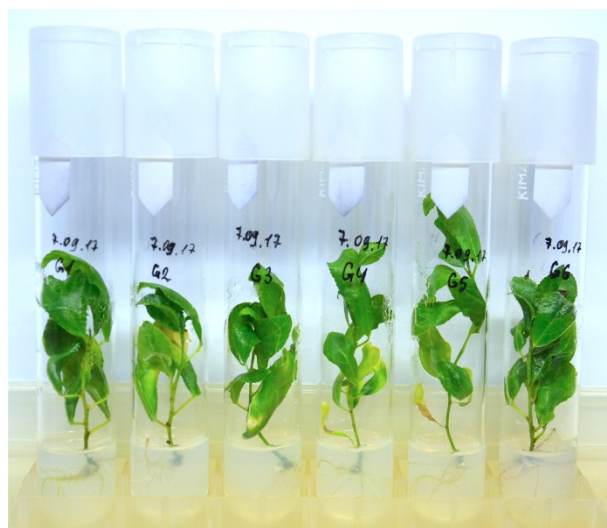


Рис. 1. Нормальное корнеобразование у трансгенных линий тополя берлинского, содержащихся в течение пяти лет на питательной среде без добавления антибиотика

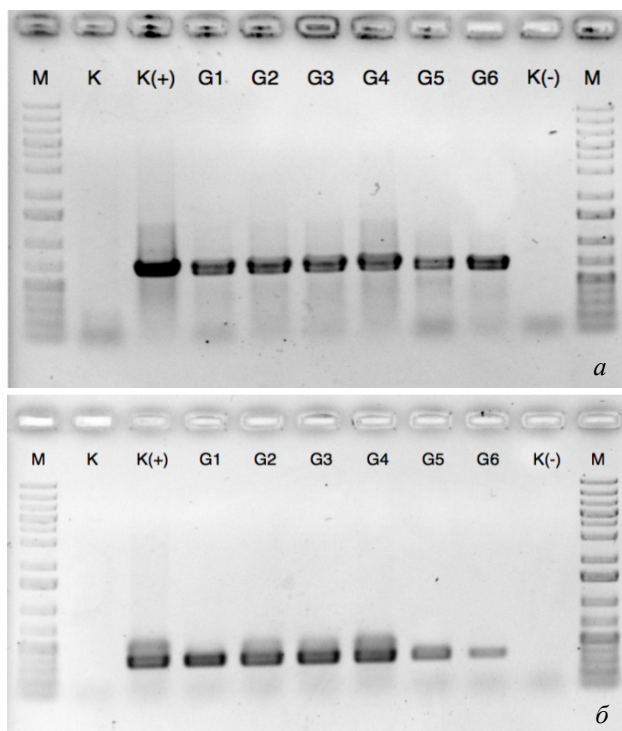


Рис. 2. Результаты ПЦР на наличие генов *uidA* (а) и *nptII* (б) у линий тополя берлинского. М – ДНК-маркер (GeneRuler DNA Ladder 1 kb Plus, Fermentas), К – контроль (нетрансформированное растение), К(+)- положительный контроль ПЦР (плазмида, содержащая *uidA*), К(-) – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без образца ДНК), G1–G6 – трансгенные линии

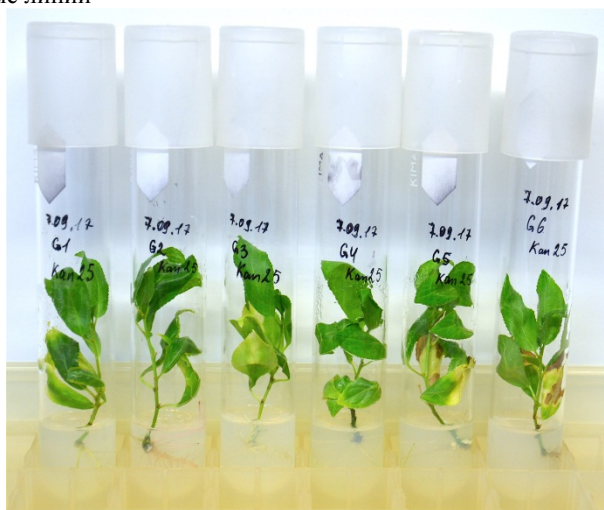


Рис. 3. Нормальное корнеобразование у трансгенных линий тополя берлинского, содержащихся в течение пяти лет в условиях *in vitro*, после добавления канамицина (25 мг/л) в питательную среду



Рис. 4. Нарушение корнеобразования у контрольной линии тополя берлинского на питательной среде с канамицином (25 мг/л)

Качественная реакция на активность GUS-репортерной системы также показала наличие активности гена *uidA* у всех шести отобранных трансгенных линий тополя после пяти лет содержания в лабораторных условиях без давления селективного агента.

Заключение

Результаты пятилетнего культивирования трансгенных линий тополя берлинского в лабораторных условиях показали, что замолкания трансгенов (*uidA* и *nptII*) не происходит. Несмотря на отсутствие в питательной среде селективного фактора в виде антибиотика, активность гена *nptII* не снизилась и не исчезла по прошествии пяти лет содержания растений в стерильной лабораторной культуре. Показано, что применённый подход к генетической трансформации тополя берлинского посредством агробактерии может быть эффективно использован для получения стабильных трансгенных растений без потери вновь приобретённых свойств как минимум через пять лет.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» при СИФИБР СО РАН при частичной финансовой поддержке стипендии Президента РФ (СП-3823.2015.1) и комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН (проект № 0343-2015-0005).

Список литературы

- Arruda P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation // *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. Vol. 23. P. 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.012>
- De novo* DNA methylation of the 35s enhancer revealed by high-resolution methylation analysis / S. Yamasaki, M. Oda, N. Koizumi, K. Mitsukuri, M. Johkan, T. Nakatsuka, M. Nishihara, K. Mishiba // *Plant biotechnology*. 2011. Vol. 2. P. 223–230. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.10.1222a>
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* 1987. Vol. 19. P. 11 – 15.
- Fladung M., Kumar S. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). III. T-DNA repeats influence transgene expression differentially among different transgenic lines // *Plant Biol.* 2002. Vol. 4. P. 329–338. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32329>
- Kamo K. K. Long-term expression of the *uidA* gene in *Gladiolus* plants under control of either the ubiquitin, rolD, mannopine synthase, or cauliflower mosaic virus promoters follow-

ing three seasons of dormancy // *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 21. P. 797–803. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0578>

Kamo K. Long term transgene expression in *Lilium longiflorum* 'Nellie White' grown outdoors and in the greenhouse // *Scientia Horticulturae*. 2014. Vol. 167. P. 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.12.011>

Kumpatla S. P., Hall T.C. Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene // *Plant J.* 1998. Vol. 14. P. 129–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00097.x>

Long-term stability of marker gene expression in *Prunus subhirtella*: A model fruit tree species / F. Maghuly, A. da C. Machado, S. Leopold, M. A. Khan, H. Katinger, M. Laimer // *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 127. P. 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.016>

Meng L., Ziv M., Lemaux P.G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley // *Plant Mol. Biol.* 2006. Vol. 62, N 1–2. P. 15–28. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9000-7>

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Pons E., Peris J. E., Peña L. Field performance of transgenic citrus trees: assessment of the long-term expression of *uidA* and *nptII* transgenes and its impact on relevant agronomic and phenotypic characteristics [Electronic resource] // *BMC Biotechnol.* 2012. 12:41. URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/41>. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-41>

Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants // *Front. Plant. Sci.*, 2015. Vol. 6 (693). P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>

Stability of transgene expression in poplar: a model forest tree species / S. Hawkins, J. C. Leple, D. Cornu, L. Jouanin, G. Pilate // *Ann. For. Sci.* 2003. Vol. 60. P. 427–438. <https://doi.org/10.1051/forest:2003035>

Stability of transgenes in trees: expression of two reporter genes in poplar over three field seasons / J. Li, A. M. Brunner, R. Meilan, S. H. Strauss // *Tree Physiol.* 2009. Vol. 29. P. 299–312. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpn028>

Stability of transgenes in long-term micropropagation of plants of transgenic birch (*Betula platyphylla*) / F. Zeng, J. Qian, W. Luo, Y. Zhan, Y. Xin, C. Yang // *Biotechnol. Lett.* 2010. Vol. 32. P. 151–156. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0120-4>

Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period / E. Borejsza-Wysocka, J. L. Norelli, H. S. Aldwinckle, M. Malnoy [Electronic resource] // *BMC Biotechnol.* 2010. Vol. 10. P. 41. URL: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1472-6750-10-41>. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-41>

Stable production of transgenic pepper plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / M. K. Ko, H. Soh, K.-M. Kim, Y. S. Kim, K. Im // *Hortscience*. 2007. Vol. 42, N 6. P. 1425–1430. [Electronic resource]. <http://hortsci.ashspublications.org/content/42/6/1425.full.pdf+html>

Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* / M. Holsters, D. de Waele, A. Depicker, E. Messens, M. van Montagu, J. Schell // *Mol. Gen. Genet.* 1978. Vol. 163, N 2, P. 181–187. <https://doi.org/10.1007/BF00267408>

Transgene-induced gene silencing in plants / H. Vaucheret, C. Béclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J.-B. Morel, P. Mourrain, J.-C. Palauqui, S. Vernhettes // *The Plant Journal*. 1998. Vol. 16, N 6. P. 651–659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00337.x>

Transgene stability and agronomical performance of two transgenic Basta®-tolerant lines of *Populus alba* L. / M. Bonadei, S. Zelasco, A. Giorcelli, M. Gennaro, P. Calligari, E. Quatrini, A. Balestrazzi // *Plant Biosystems*. 2012. Vol. 146. P. 33–40. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.641037>

Variation in GUS activity in vegetatively propagated *Hevea brasiliensis* transgenic plants / L. Lardet, J. Leclercq, E. Benistan, F. Dessailly, G. Oliver, F. Martin, P. Montoro // *Plant Cell Rep.* 2011. Vol.30. P. 1847–1856. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1092-0>

Results of a Five-year Laboratory Cultivation of the Berlin Poplar Genetically Modified with *uidA* and *nptII* Genes

V. V. Pavlichenko, M. V. Protopopova, V. K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

Abstract. As a result of the genetic transformation of plants, the loss of a transformant's ability to express the transgene becomes frequent. The causes of such silencing transgenes can be various factors. For example, micropropagation of transgenic plants or their long-term cultivation can lead to a gradual decrease in the expression level of a transgene. At the present study, the preservation of transgenes after five years of cultivation of genetically modified plants of Berlin poplar under laboratory conditions in the absence of a selective factor in a nutrient medium was carried out. Berlin poplar (*Populus × berolinensis* Dippel) is a hybrid of laurel poplar (*Populus laurifolia* Ledeb.) and Italic black poplar (*P. nigra* L. "Italica"). Genetic transformation of plants was performed using the C58C1 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. The transformation vector pBI121 (Clontech, USA) containing the selective neomycin phosphotransferase II gene – *nptII*, which determines resistance to kanamycin sulfate and the *E. coli* reporter *uidA* gene encoding bacterial enzyme β-D-glucuronidase was used. The transfer of the vector into *A. tumefaciens* cells was carried out using direct transformation by the freeze-thaw method. The studied transgenic plants of the Berlin poplar were characterized by stable (constant) expression of the *uidA* and *nptII* genes. Despite the absence of a selective agent in the nutrient medium, the activity of the *nptII* gene did not decrease or disappear after 5 years of keeping the plants in a sterile laboratory culture. It is shown that the applied approach of agrobacterium mediated genetic transformation of Berlin poplar can be effectively used to obtain stable transgenic plants without losing newly acquired properties after at least 5 years.

Keywords: agrobacterium mediated transformation, *nptII*, *uidA*, GUS-reporter system, *Populus ×berolinensis*, transgenic plants, stable transformation.

For citation: Pavlichenko V.V., Protopopova M.V., Voinikov V.K. Results of a Five-year Laboratory Cultivation of the Berlin Poplar Genetically Modified with *uidA* and *nptII* Genes. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2018, vol. 25, pp. 3-14. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.25.3> (in Russian)

References

- Arruda P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, vol. 23, pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.012>
- Yamasaki S., Oda M., Koizumi N., Mitsukuri K., Johkan M., Nakatsuka T., Nishihara M., Mishiba K. De novo DNA methylation of the 35s enhancer revealed by high-resolution methylation analysis. *Plant biotechnology*, 2011, vol. 2, pp. 223-230. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.10.1222a>
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, vol. 19, pp. 11-15.
- Fladung M., Kumar S. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). III. T-DNA repeats influence transgene expression differentially among different transgenic lines. *Plant Biol.*, 2002, vol. 4, pp. 329–338. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32329>
- Kamo K.K. Long-term expression of the *uidA* gene in *Gladiolus* plants under control of either the ubiquitin, rolD, mannopine synthase, or cauliflower mosaic virus promoters following three seasons of dormancy. *Plant Cell Rep.*, 2003, vol. 21, pp. 797-803. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0578-9>
- Kamo K. Long term transgene expression in *Lilium longiflorum* 'Nellie White' grown outdoors and in the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, 2014, vol. 167, pp. 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.12.011>

- Kumpatla S.P., Hall T.C. Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *Plant J.*, 1998, vol. 14, pp. 129–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00097.x>
- Maghuly F., da C. Machado A., Leopold S., Khan M. A., Katinger H., Laimer M. Long-term stability of marker gene expression in *Prunus subhirtella*: A model fruit tree species. *J. Biotechnol.*, 2007, vol. 127, pp. 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.016>
- Meng L., Ziv M., Lemaux P.G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley. *Plant Mol. Biol.*, 2006, vol. 62, N 1–2, pp. 15–28. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9000-7>
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pons E., Peris J.E., Peña L. Field performance of transgenic citrus trees: assessment of the long-term expression of uidA and nptII transgenes and its impact on relevant agronomic and phenotypic characteristics. *BMC Biotechnol.*, 2012, 12:41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-41>
- Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front. Plant. Sci.*, 2015, vol. 6 (693), pp. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
- Hawkins S., Leple J. C., Cornu D., Jouanin L., Pilate G. Stability of transgene expression in poplar: a model forest tree species. *Ann. For. Sci.*, 2003, vol. 60, pp. 427–438. <https://doi.org/10.1051/forest:2003035>
- Li J., Brunner A.M., Meilan R., Strauss S.H. Stability of transgenes in trees: expression of two reporter genes in poplar over three field seasons. *Tree Physiol.*, 2009, vol. 29, pp. 299–312. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpn028>
- Zeng F., Qian J., Luo W., Zhan Y., Xin Y., Yang C. Stability of transgenes in long-term micropropagation of plants of transgenic birch (*Betula platyphylla*). *Biotechnol. Lett.*, 2010, vol. 32, pp. 151–156. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0120-4>
- Borejsza-Wysocka E., Norelli J. L., Aldwinckle H. S., Malnoy M. Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. *BMC Biotechnol.*, 2010, vol. 10, p. 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-41>
- Ko M. K., Soh H., Kim K.-M., Kim Y.S., Im K. Stable production of transgenic pepper plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Hortscience*, 2007, vol. 42, no. 6, pp. 1425–1430. [Electronic resource]. <http://hortsci.ashspublications.org/content/42/6/1425.full.pdf+html>
- Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M., Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, 1978, vol. 163, no. 2, pp. 181–187. <https://doi.org/10.1007/BF00267408>
- Vaucheret H., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.-B., Mourrain P., Palauqui J.-C., Vernhettes S. Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 1998, vol. 16, no. 6, pp. 651–659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00337.x>
- Bonadei M., Zelasco S., Giorcelli A., Gennaro M., Calligari P., Quattrini E., Balestrazzi A. Transgene stability and agronomical performance of two transgenic Basta[®]-tolerant lines of *Populus alba* L. *Plant Biosystems*, 2012, vol. 146, pp. 33–40. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.641037>
- Lardet L., Leclercq J., Benistan E., Dessailly F., Oliver G., Martin F., Montoro P. Variation in GUS activity in vegetatively propagated *Hevea brasiliensis* transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 2011, vol. 30, pp. 1847–1856. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1092-0>

Павличенко Василий Валерьевич
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН

Pavlichenko Vasily Valeryevich
Candidate of Science (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS

*Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59,
факс (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
Россия, 664033, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42-46-59,
факс (3952) 51-07-54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com*

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

*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
tel.: (3952) 42-46-59, fax (3952) 51-07-54
e-mail: vpavlichenko@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,
Russian Federation
tel.: (3952) 42-46-59, fax (3952) 51-07-54
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com*

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

Дата поступления: 12.07.2018
Received: July, 12, 2018