

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТОПОЛЯ БЕРЛИНСКОГО ГЕНОМ ДЕГИДРИНА *WCS120* ИЗ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

Е.Д. Золотовская<sup>1,2</sup>, М.В. Протопопова<sup>1</sup>, А.Д. Коновалов<sup>1,2</sup>, В.В. Павличенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, [vpavlichenko@gmail.com](mailto:vpavlichenko@gmail.com), [marina.v.protopopova@gmail.com](mailto:marina.v.protopopova@gmail.com)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, [zolotovskayaelenad@gmail.com](mailto:zolotovskayaelenad@gmail.com), [konovalov.alexey.d@gmail.com](mailto:konovalov.alexey.d@gmail.com)

**Аннотация.** Работа посвящена созданию генетически модифицированных растений тополя берлинского по гену дегидрина *WCS120* из пшеницы мягкой сорта Иркутская. В результате селективного отбора регенерантов были получены 40 регенерантов тополя берлинского. Найден новый нуклеотидный вариант гена дегидрина *WCS120* у пшеницы мягкой сорта Иркутская.

**Ключевые слова:** генетическая трансформация, тополь берлинский, холодоустойчивость, дегидрины, пшеница мягкая сорт Иркутская

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1244-1247

С момента внедрения методов генетической инженерии одной из ее задач было придание новых полезных свойств растениям, используемых в сельском хозяйстве. К таким ценным свойствам можно отнести устойчивость культурных растений к ряду абиотических стрессовых факторов, включая холод, засуху и засоление. Данные факторы приводят к потере внутриклеточной воды и, как следствие, к истощению или гибели целого организма. В процессе эволюции растения выработали механизм защиты клеток от подобных повреждений. В основе данного механизма лежит функционирование специальных белков дегидринов, которые активно синтезируются в растительных клетках в результате воздействия низких положительных температур и способствуют защите от обезвоживания, а также выполняют криопротекторные функции, защищая клетку от образования внутриклеточного льда.

Гены, кодирующие некоторые дегидрины, активно используются для генетической трансформации сельскохозяйственных растений с целью повышения их морозо- и/или холодоустойчивости. Донорами ДНК для подобной генетической трансформации в основном являются модельные виды растений, обладающие ярко выраженной морозо- и/или холодоустойчивостью.

Одним из наиболее часто используемых модельных генов для придания растениям морозо- и/или холодоустойчивости является ген дегидрина *WCS120* из пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Существует множество сортов пшеницы мягкой, отличающихся друг от друга по степени устойчивости к низким положительным температурам, заморозкам и зимостойкости. Одним из наиболее морозоустойчивых сортов пшеницы мягкой является сорт Иркутская (*Triticum aestivum* L., разновидность *albidum*). Сорт морозоустойчив, хорошо переносит зимовку на полях со снежным покровом не менее 20 см.

Несмотря на то, что ген, кодирующий дегидрин *TaWCS120*, и его холодоиндуцируемый промотор активно изучаются [Limin et al., 1995; Sarhan et al., 1997; Mészáros et al., 2015; Éva et al., 2018], эффект трансформации древесных растений этим геном до настоящего момента не исследован. Изучение эффектов генетической трансформации древесных растений подразумевает использование модельных видов растений. К настоящему моменту известен лишь ограниченный набор модельных

древесных растений, способных к эффективному микрклональному размножению и агробактериальной генетической трансформации. В то же время, генетическая трансформация древесных растений позволит адаптировать ряд ценных культур к условиям, в которых их эффективное произрастание и плодоношение ранее было невозможно.

Среди древесных растений в качестве модельных часто используют представителей рода *Populus*. Представители данного рода обладают высокой способностью к регенерации и трансформации, а также имеют небольшой размер генома. В качестве объекта для генетической трансформации в данной работе был выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis* Dipp.). Тополь берлинский относится к семейству Ивовые (Salicaceae) и является гибридом тополя лавролистного и тополя черного сорта Италика (*P. laurifolia* Ledeb. × *P. nigra* L. “*Italica*”). Тополь берлинский является модельным объектом для изучения процессов роста и развития древесных растений, а также для постановки методики микрклонального размножения и генетической трансформации.

Таким образом, целью работы была генетическая трансформация тополя берлинского геном дегидрина *TaWCS120* из пшеницы мягкой сорта Иркутская.

Из этиолированных проростков пшеницы мягкой выделяли суммарную РНК. О качестве выделенной РНК судили по наличию классических фракций рибосомальной РНК, визуализированных после их электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. На основе РНК, очищенной от геномной ДНК, синтезировали кДНК. Для амплификации целевого гена дегидрина *TaWCS120* осуществляли подбор рабочих праймеров с использованием известной последовательности гена *WCS120*, представленной в базе данных GeneBank (№ M93342.2). Подбор праймеров проводили к участкам гена, включающим в себя открытую рамку считывания (от «Старт» до «Стоп» кодона), а также 5' и 3'-некодирующие области гена. В участки праймеров, комплементарные к 5' и 3'-некодирующим областям гена вносили изменения таким образом, чтобы полученные ампликоны содержали на противоположных концах сайты рестрикции BamH1 (5'-GGATCC-3') и SacI (5'-GAGCTC-3'). Сайты рестрикции необходимы для переноса ампликона в плазмидные векторные конструкции для проведения дальнейшей агробактериальной трансформации. Основные характеристики праймеров представлены в таблице. Жирным подчеркнутым шрифтом выделены сайты рестрикции.

**Таблица.**

**Праймеры для амплификации гена *TaWCS120***

Название	Последовательность (от 5' к 3')	Ta, °C	Длина праймера, п.о.	Длина продукта, п.о.
WCS120_F	GTGAG <b>GGATCC</b> CAGCGCAAGATGGAG	63,2	25	1222
WCS120_R	GGCAG <b>GAGCTC</b> GCTCAGTGCTG	62,9	21	

Амплификацию гена *TaWCS120* проводили с использованием трёх различных полимераз: GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, США), Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, США) и iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, США). Полученный ПЦР продукт очищали от димеров праймеров и компонентов ПЦР реакции методом горизонтального электрофореза в агарозном геле и лигировали в промежуточный вектор pTZ57R/T. Полученной векторной конструкцией трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Из отобранных с помощью бело-голубого скрининга

колоний выделяли плазмидную ДНК, несущую целевой ген, и проводили ее секвенирование по методу Сенгера на автоматическом капиллярном секвенаторе серии 3500 (Applied Biosystems) с использованием праймеров M13. Для каждого ПЦР продукта, полученного с помощью различных полимераз, проверяли по 8 различных клонов.

При анализе результатов секвенирования целевого продукта с использованием трех различных полимераз было обнаружено, что полимеразы GoTaq Flexi DNA Polymerase и Advantage 2 Polymerase Mix дают большое количество замен (ошибок) в нуклеотидной последовательности целевого гена по сравнению с последовательностью из GeneBank, что может быть связано с низкой точностью работы исследованных полимераз. Наиболее точной оказалась iProof High-Fidelity DNA Polymerase. Однако во всех трех случаях наблюдали повторяющиеся устойчивые замены в последовательности целевого гена (1176 пар оснований в открытой рамке считывания) в позициях № 115 и 481 по сравнению с нуклеотидной последовательностью, представленной в базе данных GenBank. В случае использования высокоточной iProof High-Fidelity DNA Polymerase наблюдали только эти замены.

Нуклеотидную последовательность, полученную с помощью iProof High-Fidelity DNA Polymerase и заключенную в промежуточный вектор pTZ57R/T, рестрицировали по сайтам BamHI и SacI и лигировали в предварительно линеаризированный по тем же сайтам вектор pRI 101-AN, используемый для агробактериальной генетической трансформации. Перенос полученной векторной конструкции в клетки *A. tumefaciens* осуществляли с помощью прямой трансформации методом замораживания-оттаивания [Holsters et al., 1978] с авторскими дополнениями.

Для агробактериальной генетической трансформации тополя берлинского использовали суспензию клеток полученного штамма *A. tumefaciens*, содержащих плазмиды с геном дегидрина *TaWCS120*. В качестве эксплантов растительной ткани для генетической трансформации использовали отрезки стеблей без пазушных почек.

Для трансформации и микроклонального размножения использовали питательную среду на основе 1/2 MS 5524 [Murashige et al., 1962] производства Sigma-Aldrich 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 производства Биотехновация, Россия (7 г/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. Экспланты с нанесенной на них суспензией агробактерии экспонировали на твердой питательной среде в течение суток в темноте при 24 °C. После коэкспонирования экспланты переносили на твердую питательную среду с добавлением кинетина (0,5 мг/л) и индолил масляной кислоты (0,1 мг/л) для индукции органогенеза. Помимо регуляторов роста в питательную среду добавляли селективные и подавляющие рост агробактерии антибиотики (канамицин (15 мг/л) и цефотаксим (200 мг/л)). В течение 20 дней проводили экспонирование отрезков в световой комнате с фотопериодом 16/8 (день/ночь) при температуре 24 °C. Через 20 дней наблюдали появление первых регенерантов. Селективно отобранные регенеранты переносили на твердую питательную среду для дальнейшего размножения. В результате селективного отбора было получено 40 линий регенерантов.

Таким образом, в результате проведенных исследований был найден новый нуклеотидный вариант гена *TaWCS120*. Наличие устойчивых нуклеотидных замен может быть связано с полиморфизмом генов дегидринов, что привело к образованию собственной нуклеотидного варианта гена *WCS120* у пшеницы мягкой сорта Иркутская. Была создана генетическая векторная конструкция на основе плазмиды pRI 101-AN со встроенным геном *TaWSC120*, получен штамм *A. tumefaciens* со встроенной

конструкцией. Проведена агробактериальная генетическая трансформация эксплантов *Populus × berolinensis* геном *TaWCS120* в результате которой было селективно отобрано 40 клонов растений. Дальнейшая работа будет направлена на подтверждение трансформации с помощью ПЦР анализа и на оценку уровня экспрессии гена *TaWCS120* в геноме полученных трансгенных линий тополя берлинского.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к аналитическому оборудованию.

#### Литература

Éva C., Téglás F., Zelenyánszka H., Tamásb C., Juhász A., Mészárosb K., Tamás L. Cold inducible promoter driven Cre-lox system proved to be highly efficient for marker gene excision in transgenic barley // *Journal of biotechnology*. – 2018. – V. 265. – P. 15–24.

Holsters M., de Waele D, Depicker A, Messens E., van Montagu M., Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* // *Molecular and general genetics*. – 1978. – V. 163 (2). – P. 181–187.

Limin A.E., Houde M., Chauvin L.P., Fowler D.B., Sarhan F. Expression of the cold-induced wheat gene *Wcs120* and its homologs in related species and interspecific combinations // *Genome*. – 1995. – V. 38 (5). – P. 1023–1031.

Mészáros K., Éva C., Kiss T., Bányai J., Kiss E., Téglás F., Láng L., Karsai I., Tamás L. Generating marker-free transgenic wheat using minimal gene cassette and cold-inducible Cre/Lox System // *Plant molecular biology reporter*. – 2015. – V. 33 (5). – P. 1221–1231.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

Sarhan F., Ouellet F., Vazquez-Tello A. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – V. 101 (2). – P. 439–445.

### GENETIC TRANSFORMATION OF *POPULUS BEROLINENSIS* BY *WCS120* DEHYDRIN GENE FROM SOFT WHEAT

E.D. Zolotovskaya<sup>1,2</sup>, M.V. Protopopova<sup>1</sup>, A.D. Konovalov<sup>1,2</sup>, V.V. Pavlichenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, [marina.v.protopopova@gmail.com](mailto:marina.v.protopopova@gmail.com), [vpavlichenko@gmail.com](mailto:vpavlichenko@gmail.com)

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, [zolotovskayaelenad@gmail.com](mailto:zolotovskayaelenad@gmail.com), [konovalov.alexey.d@gmail.com](mailto:konovalov.alexey.d@gmail.com)

**Abstract.** The present study is devoted to creation of genetically modified berlin poplar transformed by dehydrin *TaWCS120* gene from soft wheat (Irkutsk variety). As a result of regenerants selection, 40 clones of the berlin poplar were obtained. A new nucleotide variant of the dehydrin *WCS120* gene from soft wheat (Irkutsk variety) was found.

**Keywords:** genetic transformation, berlin poplar, cold resistance, dehydrins, soft wheat Irkutsk variety