

УДК 582.681.81:630.832

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *POPULUS NIGRA* × *POPULUS DELTOIDES* (ОСОКІР КЛОНУ ГРАДІЗЬКА)

Н. К. КУЦОКОНЬ, В. А. РУДАС, М. В. ШИНКАРЧУК, О. Р. ЛАХНЕКО,
Б. В. МОРГУН, Н. М. РАШИДОВ, Д. М. ГРОДЗИНСЬКИЙ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148
e-mail: kutsokon@nas.gov.ua, rudasv@gmail.com

Мета. Провести генетичну трансформацію тополі *Populus nigra* × *P. deltoides* клон Градизька модельною конструкцією *pSV002*, що містить селективний ген стійкості до антибіотика канаміцину та маркерний ген β-глюкуронідази. **Методи.** Генетичну трансформацію проводили із використанням листкових, стеблових та черешкових експлантів тополі. Для виявлення трансформантів було застосовано селекцію на середовищі з канаміцином, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та гістохімічний аналіз. **Результати.** Отримано рослини-трансформанти, які пройшли селекцію на канаміцині, а також показали наявність в ДНК ПЛР-продукту гена *prtII* довжиною 700 п.н. та експресували ген β-глюкуронідази. **Висновки.** Розроблена методика генетичної трансформації *P. nigra* × *P. deltoides* клону Градизька дозволить в подальшому проводити генетичну модифікацію тополі з метою створення клонів з новими економічно корисними ознаками.

Ключові слова: генетична трансформація, *Populus* sp., мікроклональне розмноження.

Вступ. Представники роду тополя є серед найпопулярніших деревних рослин в дослідницьких лабораторіях усього світу. Свідченням цього, зокрема, може бути статистика, наведена в публікаціях FAO, яка показує (рис. 1), що зусилля дослідників в галузі генетичної трансформації дерев в половині випадків спрямовані на генетичну трансформацію *Populus* (47 % досліджень), а іншими представниками є роди *Pinus* (19 %), *Eucalyptus* (7 %) та ін. [1]. При цьому основними об'єктами генетичних модифікацій є дослідження, що стосуються генетичної експресії (21 %), культур клітин (18 %), стійкості до гербіцидів (13 %), біотичної стійкості (12 %), модифікації вмісту лігніну (9 %), маркерних генів (8 %), фертильності (6 %), росту (5 %), стабільності генів (3 %), фізіологічних модифікацій (3 %), біоремедіації (2 %) [1].

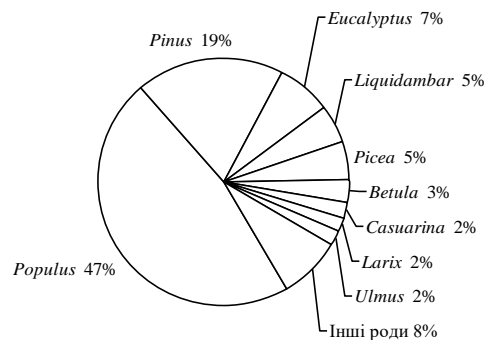


Рис. 1. Розподіл науково-дослідних праць у галузі генетичної модифікації за родами лісових культур [1].

© Н. К. КУЦОКОНЬ, В. А. РУДАС, М. В. ШИНКАРЧУК, О. Р. ЛАХНЕКО, Б. В. МОРГУН, Н. М. РАШИДОВ, Д. М. ГРОДЗИНСЬКИЙ, 2016

Генетично модифіковані дерева можуть мати вагомe значення як для людини і довкілля, так і економічне [2, 3]. Серед переваг для довкілля можна відзначити наступні: вища продуктивність на одиницю площі і зменшення навантаження на природні ліси, скорочення застосування хімікатів, біоремедіація, зв'язування вуглецю, адаптація до стресів, зменшення ерозії; до того ж, біомаса є відновлюваним джерелом енергії та сировинним матеріалом. Незважаючи на ряд критичних зауважень щодо використання трансгенних дерев, вони можуть мати значні переваги для здоров'я людини, серед яких зниження алергенності від пилку; охорона, відновлення та зниження забрудненості довкілля; ремедіація токсичних забруднень; рослини мають фармацевтичне та рекреаційне значення. Серед комерційних переваг можна відзначити збільшення обсягів деревної продукції та покращення якості біомаси, стійкість до хвороб та ушкоджень комахами, зниження витрат при вирощуванні та зменшення кількості хімікатів у целюлозному виробництві, поява нової продукції, можливість вирощування на забруднених територіях та їх ремедіації [2].

Загалом, плантації тополь найпоширеніші в Китаї, де вони складають 73 % усіх світових штучних насаджень тополь, включаючи 53 % світових плантацій для вирощування деревини та 49 % плантацій, закладених в агролісових системах [4].

Лабораторні дослідження з трансгенними лісовими деревними рослинами проводяться в багатьох країнах, проте не в усіх з них дозволено виконувати польові дослідження, а тим більше — вирощувати ГМ тополі в комерційних плантаціях. За даними [5], польові досліди з трансгенними лісовими культурами проводяться в США, Канаді, Бразилії, Чилі, ПАР, Австралії, Новій Зеландії, Індонезії, Індії та ряді країн Євросоюзу. Наразі Китай є єдиною державою, де офіційно дозволене комерційно вирощування трансгенних тополь, включаючи клони, стійкі до комах (Bt-тополі), соле- (JERF) і морозостійкі (FAD3) клони, а також клони з модифікованою композицією лігніну [6].

Вперше трансгенні тополі (гібрид NC-5339 *Populus alba* × *P. grandidentata*), стійкі до гербіциду гліфосату, було отримано в 1987 р. [7]. З того часу вони стали не лише модельним об'єктом для дослідження деревних рослин, але й набули вагомoго практичного значення. Для деяких видів *Populus* розроблено методи вирощування та

трансформації в культурі *in vitro* та створено клони трансгенних тополь [8–11].

Метою даної роботи було проведення генетичної трансформації високопродуктивного клону тополі Градиська *P. nigra* × *P. deltoides* модельною генетичною конструкцією pCB002 із селективним геном стійкості до антибіотика канаміцину та маркерним геном β-глюкуронідази. Це дозволить в подальшому проводити генетичну модифікацію тополі з метою створення клонів з новими корисними ознаками.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Клон тополі Градиська вважається природним гібридом тополі чорної, осокору (*P. nigra* L.) і тополі дельтоподібної (*P. deltoides* Marsh.), видів, що належать до секції Aigeiros і легко схрещуються між собою [12]. Її листя подібне до листя тополі чорної, темно-зелене, щільне, широко-дельтовидноромбічне за формою, слабо опушене знизу, завдовжки 6–6,5 см, завширшки — 7–7,5 см. Верхівка видовжено-загострена, основа — клиноподібна. Край листа слабо-пильчасто дрібнозубчастий. Черешки червоні, сплюснені, довжиною 5–5,5 см. Листя опадає зеленим [13]. За даними співробітників УкрНДІЛГА, для цього клону було показано високу продуктивність, що у віці 24 роки перевищувала контрольні насадження осокора за середнім приростом об'єму стовбура на 55 %.

Раніше клон було введено нами в культуру *in vitro* з використанням живців, одержаних в Українському ордену «Знак Пошани» науково-дослідному інституті лісового господарства та агролісомеліорації імені Г. М. Висоцького ДАЛРУ та НАН України (м. Харків). Рослини вирощували в пробірках на WPM середовищі з додаванням сахарози (20 г/л) та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (середовище WPMP) при 26 °C з освітленням люмінесцентними лампами 4000 люкс на 16-годинному фотоперіоді.

Агробактеріальний штам. Для генетичної трансформації осокора використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (GV2260), який містив бінарний pCB002 [14, 15]. Модельна генетична конструкція містила селективний *nptII* та маркерний *uidA* гени. Схема Т-ДНК представлена на рис. 2. Для культивування агробактерій використовували середовище Лурія-Бертані.

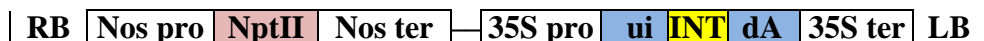


Рис. 2. Схема Т-ДНК генетичної конструкції pCB002: LB, RB — повтори, які обмежують Т-ДНК; Nos pro, Nos ter — промоторна і термінаторна ділянки гена *nos* нопалінсинтази *Agrobacterium tumefaciens*; *nptII* — ген неоміцинфосфотрансферази II *Escherichia coli*, що обумовлює стійкість до антибіотика канаміцину; 35S pro, 35S ter — промотор і термінатор 35S PHK вірусу мозаїки цвітної капусти (*CaMV* 35S); *uidA* — ген (з інтроном *INT*), який кодує фермент β-глюкуронідазу (GUS).

Генетична трансформація та регенерація трансформантів. Трансформацію проводили за протоколами [16, 17] із власними модифікаціями. З рослин 3–4-тижневого віку нарізали листкові, черешкові і стеблові експланти, робили на них надрізи, переносили їх на агаризоване середовище WPM без селекції, що містило 2 мг/л нафтилоцтової кислоти та 1 мг/л бензиламінопурину для індукції калусу, та поміщали на розсіяне світло при температурі 23–25 °С на 5 днів. Після цього експланти інокулювали однодобовою суспензією агробактерій з часом експозиції 10 хв, додавши до рідкого MS середовища ацетосірінгон (0,04 мг/л). Після інокуляції експланти вміщували на середовище WPMC без селекції та інкубували на розсіяному світлі.

Після дводобової кокультивації з агробактеріями експланти переносили на середовище для селекції та регенерації пагонів (WPMR), яке було доповнено 100 мг/л канаміцину, 5 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти і містило 600 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерій. Кожні 14 днів експланти пересажували на свіже WPMR середовище. Приблизно через 3 місяці після трансформації зелені калуси і пагони висаджували для нормалізації пагонів на свіже середовище (WPMN), яке містило 0,1 мг/л бензиламінопурину та антибіотики: 500–600 мг/л цефотаксиму; 100 мг/л канаміцину. Після отримання повністю сформованих рослин їх в подальшому вирощували на безгормональному WPM середовищі.

Аналіз трансформантів. ДНК з отриманих регенерантів виділяли згідно загальноприйнятим методикам [18]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили для визначення наявності послідовності селективного гена *nptII*, для чого використовували праймери *npt1F* (5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3') та *npt2R* (5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3') [15]. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК становив 700 п.н.

Експресію гена β-глюкуронідази визначали гістохімічним методом згідно методики [19] з деякими модифікаціями.

Результати та обговорення

Трансформовані експланти *Populus nigra* × *P. deltoides* пересажували кожні 2 тижні на свіже середовище WPMR, доповнене антибіотиками канаміцином (для селекції трансгенних рослин) та цефотаксимом (для елімінації *A. tumefaciens*). На 5–6 пасажі починали

з'являтися зелені калуси (рис. 3). Після подальших пасажів на калюсах з'явилися пагони, зразки яких відбирали для аналізу присутності трансгена.



Рис. 3. Регенерація трансформантів *Populus nigra* × *P. deltoides* клону Градізька трансформованих модельною конструкцією *pCB002*, на селективному середовищі з канаміцином.

В ході роботи було отримано близько 100 регенерованих рослин, трансформованих конструкціями *pCB002*, які пройшли селекцію на канаміцині. Як видно з рис. 4, очікуваний ПЛР продукт з фрагментом гена *nptII* довжиною 700 п.н. було отримано для трьох ліній тополі. Для цих же ліній було встановлено експресію гена β-глюкуронідази шляхом високоспецифічного фарбування (рис. 5).

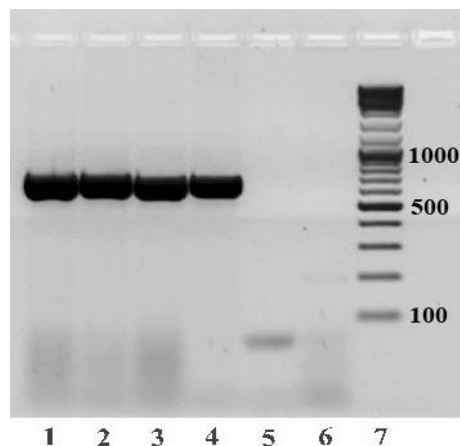


Рис. 4. Електрофореграма ПЛР-аналізу рослин тополі *Populus nigra* × *P. deltoides* клону Градізька, трансформованих генетичною конструкцією *pCB002*. 1–3 — трансгенні рослини гібридного осокара; 4 — трансгенна рослина *Nicotiana tabacum* як позитивний контроль; 5 — негативний контроль, ПЛР без ДНК; 6 — контроль, ДНК нетрансформованої рослини гібридного осокара; 7 — маркер молекулярної маси GeneRuler DNA LadderMix (Fisher Thermo Scientific). Довжина ПЛР-продукту — 700 п.н.

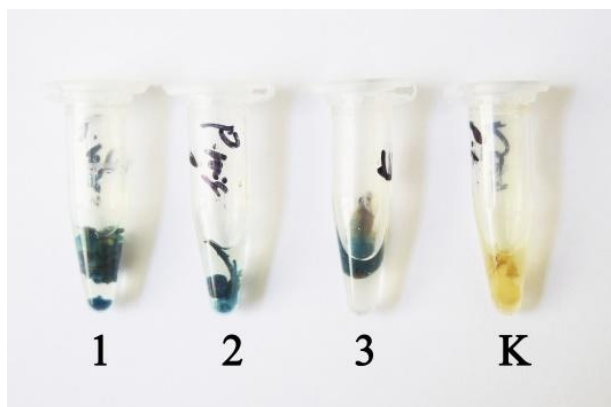


Рис. 5. Експресія гена β-глюкуронідази у трансформантів гібридного осокора *Populus nigra* × *P. deltoides* клону Градізька. 1–3 — трансформанти ліній 1–3; К — контрольна нетрансформована рослина.

Як показали наші результати, частота трансформації гібридного осокора була невисокою, на рівні 3%. Таку ж невисоку частоту трансформації зазначають і інші автори, крім того, процес трансформації залежить від генотипу [16].

Отримані трансформанти, що пройшли селекцію на канаміцині, показали наявність трансгена як за методом ПЛР, так і в гістохімічному аналізі за активністю *gus* гена. Генетична конструкція, використана в даному дослідженні є модельною і містить селективний та маркерний гени. Проте, методика розроблена в даному дослідженні, дозволить в подальшому проводити генетичну модифікацію продуктивного клону тополі для надання рослинам бажаних властивостей, зокрема, підвищення стійкості до впливу стресових факторів та збільшення продуктивності при використанні їх у біопаливній галузі.

Висновки

Отримані рослини-трансформанти, що пройшли селекцію на канаміцині, показали присутність в ДНК ПЛР-продукту гена *nptII* довжиною 700 п.н. та експресували ген β-глюкуронідази. Розроблена методика генетичної трансформації *P. nigra* × *P. deltoides* клону Градізька дозволить в подальшому проводити генетичну модифікацію тополі з метою створення клонів з новими економічно корисними ознаками.

Робота проведена за підтримки цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресур-

си і новітні технології біоенергоконверсії» (2013–2017 pp., № 0113 U 002928).

Перелік літератури

1. Chaix G., Monteuiis O. Biotechnology in the forestry sector // Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. — FAO, 2004. — P. 19–56.
2. Walter C., Killerby S. O. A global study on the state of forest tree genetic modification // Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. — FAO, 2004. — P. 57–95.
3. Kutsokon N. K. Main trends in the genetic transformation of *Populus* species. Cytology and Genetics. — 2011. — V. 45. — P. 352–361.
4. Ball J., Carle J., Del Lungo A. Contribution of poplars and willows to sustainable forestry and rural development // Unasylva. — 2005. — V. 56. — P. 3–9.
5. Wheeler N. Synthesis: a snapshot of the global status and trends in forest biotechnology / Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. — FAO. — 2004. — P. 3–18.
6. Lu M. Z. Update on the transgenic poplar plantations and research in China // Fifth Intern. Poplar Symposium: Poplars and willows: from research models to multipurpose trees for a biobased society, Orvieto, Italy, 20–25 September, 2010. — P. 8.
7. Fillatti J. J., Sellmer J., McCown B. H., Haissig B. E., Comai L. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus* // Mol. Gen. Genet. — 1987. — V. 206 (2). — P. 192–199.
8. Han K. H., Meilan R., Ma C., Strauss S. H. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). // J. Plant Cell Reports. — V. 19. — 2000. — P. 315–320.
9. Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S., Carbonera D. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: forest tree improvement // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2003. — V. 72. — P. 109–138.
10. Giri C. C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview // Trees. — 2004. — V. 18. — P. 115–135.
11. Kutsokon N., Libantova J., Rudas V., Rashydov N., Grodzinsky D., Durechova D. Advancing protocols for poplar *in vitro* propagation, regeneration and selection of transformants // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. — V. 2 (Special issue). — 2013. — 1447–1454.
12. Consensus document on the biology of *Populus L.* (*Poplars*). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 16. — Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2000. — 56 p.
13. Лось С. А. (керівник) Звіт про НДР за темою № 7 «Збереження генетичних ресурсів лісових порід і отримання генетично поліпшеного репродуктивного матеріалу для лісових насаджень та біоенергетичних плантацій». Український НДІ лісового господарства та агролісочелювання. — Харків, 2013.
14. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants // EMBO J. — 1987. — 6. — P. 3901–3907.
15. Матвеева О. Ю., Тищенко О. М., Моргун Б. В. Пат. №77331. Україна. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої

- трансформації in planta. Оpubліковано: 11.02.2013. Бюл. №3, 2013. 5 с.
16. Meilan R., Ma C. Poplar (*Populus* spp.) // In Meth. Mol. Biol. — 2006. — V. 344. — P. 143–151.
17. Yevtushenko D. P., Misra S. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. × *P. maximowiczii* A. Henry // Plant Cell Rep. — 2010. — P. 211–221.
18. Murray M. J., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. — 1980. — V. 8 (19). — P. 4321–4325.
19. Krens F. A., Trifonova A., Keizer L. C. P., Hall R. D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Science. — 1996. — 116. — P. 97–106.

Представлена Тищенко О. М.
Надійшла 24.10.2016

GENETIC TRANSFORMATION OF *POPULUS NIGRA* × *P. DELTOIDES* (BLACK POPLAR, CLONE GRADIZKA)

N. K. Kutsokon, V. A. Rudas, M. V. Shinkaruk,
O. R. Lakhneko, B. V. Morgun, N. M. Rashydov,
D. M. Grodzynsky

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148
e-mail: kutsokon@nas.gov.ua, rudasv@gmail.com

Aim. To carry out genetic transformation of poplar *Populus nigra* × *P. deltoides* clone Gradizka with the model gene construct pCB002 carrying selective gene of kanamycin resistance and marker gene of β-glucuronidase. **Methods.** Genetic transformation was performed with the using leaf, stem and petiole poplar explants. Transformants were selected on the medium with kanamycin, and transgene was identified by polymerase chain reaction (PCR) and histochemical GUS assay. **Results.** Successful transformants selected on kanamycin media were confirmed by the presence of PCR-product for the gene *nptII* with the length 700 bp, and *gus* gene expression was also observed. **Conclusions.** Protocol for genetic transformation of *P. nigra* × *P. deltoides* clone Gradizka established here will be used for poplar genetic modification to create new clones with commercially important traits.

Keywords: genetic transformation, *Populus* sp., microclonal propagation.