

УДК 577.216.3, 577.218

Е.А. Шадымова\*, А.М. Писаренко, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Исаков  
 Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: yeriska1988@mail.ru

### Получение генетически модифицированных растений табака *Nicotiana tabacum* с повышенной толерантностью к пониженным температурам

В данной работе была проведена трансформация растений табака *Nicotiana tabacum* агробактериальными штаммами, содержащими белок-кодирующий сегмент ДНК гена транскрипционного фактора *AtDREB1A* из *Arabidopsis thaliana*. Наличие целевого гена было подтверждено присутствием вставки искомой длины после выделения ДНК из листьев полученных растений-регенерантов и положительным результатом реакции обратной транскрипции (РОТ) с использованием РНК, выделенной из листовых дисков. Несколько трансгенных линий проявили повышенную толерантность к пониженным температурам.

**Ключевые слова:** стрессовые условия, низкие температуры, табак, ген транскрипционного фактора *AtDREB1A*, трансформация.

### Y.A. Shadymova, A.M. Pisarenko, R.M. Nargilova, O.V. Karpova, B.K. Isakov Obtaining genetically modified tobacco plant *Nicotiana tabacum* with increased tolerance to low temperatures

In this investigation transformation of tobacco plants *Nicotiana tabacum* was carried out using agrobacterium strains contained protein-encoding DNA segment of transcription factor *AtDREB1A* gene from *Arabidopsis thaliana*. The presence of the target gene was proved by the obtaining of fragment with expected length after the isolation of DNA from regenerated plants leaves and by positive answer after reverse transcription reaction (RT) using RNA isolated from leaf disks. Several transgenic lines demonstrated increased tolerance to low temperatures.

**Keywords:** stressful conditions, low temperature, tobacco, gene of transcription factor *AtDREB1A*, transformation.

### Е.А. Шадымова, А.М. Писаренко, Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, Б.К. Ысқақов Төмен температураларға жоғары толерантты генетикалық түрлендірілген *Nicotiana tabacum* темекі өсімдіктерін алу

Осы жұмыста *Arabidopsis thaliana*-ның *AtDREB1A* транскрипция факторының генін кодтайтын ДНК сегменті бар агробактерия штамдарымен *Nicotiana tabacum* өсімдіктерінің трансформациясы өткізілген. Мақсаттық генінің бар болуы регенерантты өсімдіктердің жапырақтарынан ДНК-ды бөліп алғаннан кейін ізделіп отырған ұзындықтағы қыстырманьын бар болғанымен және жапырақ дискінен бөліп алынған РНК қолдануымен кері транскрипция реакциясының оң нәтижесімен расталған. Бірнеше трансгендік өсімдіктердің төмен температураларға жоғары толерантты болғаны айқындалды.

**Түйінді сөздер:** стресс жағдайлары, төмен температуралар, темекі, *AtDREB1A*, трансформация.

Абиотические стрессы окружающей среды и их влияние на растения уже давно вызывают особый интерес среди ученых, т.к. они значительно сокращают урожайность культурных растений [1]. В связи с этим остро стоит потребность не только сохранять, но и увеличивать продуктивность сельскохозяйственных культур на малопригодных почвах, а также в неблагоприятных условиях [2-6].

Для растений в стрессовом состоянии характерно изменение ряда обычных для организма реакций, протекающих на клеточном и молекулярном уровне, что в конечном итоге

приводит к гибели растения [7-9]. Такие виды стресса, как засуха, засоление и заморозки, индуцируют многие растительные гены, функционирование которых обеспечивает толерантность растений к неблагоприятным условиям. Белковые продукты, кодируемые этими генами, участвуют не только в защите клеток от стресса, но также и в регуляции сигнальной трансдукции для активации генов в ответ на стрессовое воздействие [10-11].

К подобного рода генам принадлежат гены транскрипционных факторов семейства DREB (degidration-responsive element (DRE) binding factors) [12-13]. Эти транскрипционные

факторы способны регулировать экспрессию многих других генов, которые индуцируются через АБК-независимый путь в стрессовых условиях и содержат в своих промоторных областях *cis*-регуляторную последовательность (TACCGACAT), названную DRE-элементом (Degidration – Responsive Element) [14]. Примером промотора, содержащего DRE-элемент, может являться индуцибельный промотор гена *rd29A*.

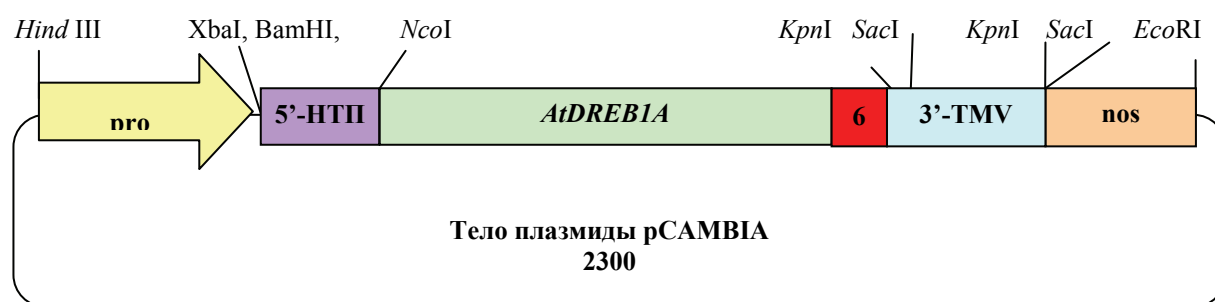
ДНК последовательности, кодирующие DRE-связывающие белки DREB1A, DREB2A и DREB1C уже были установлены ранее. Это обстоятельство позволило нам амплифицировать и клонировать ДНК-фрагмент, кодирующий белок AtDREB1A из *Arabidopsis thaliana* Colombia, с различными вариантами 5'- и 3'-нетранслируемых последовательностей (НТП). После чего была показана экспрессия гена *AtDREB1A* в

бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы и в системе трансляции *Escherichia coli* [15].

В настоящей работе была проведена трансформация листовых дисков табака, в результате чего были получены трансгенные растения, экспрессирующие рекомбинантный ген *AtDREB1A*. Трансгенные линии были использованы в дальнейшем для изучения действия низкой температуры на данные растения.

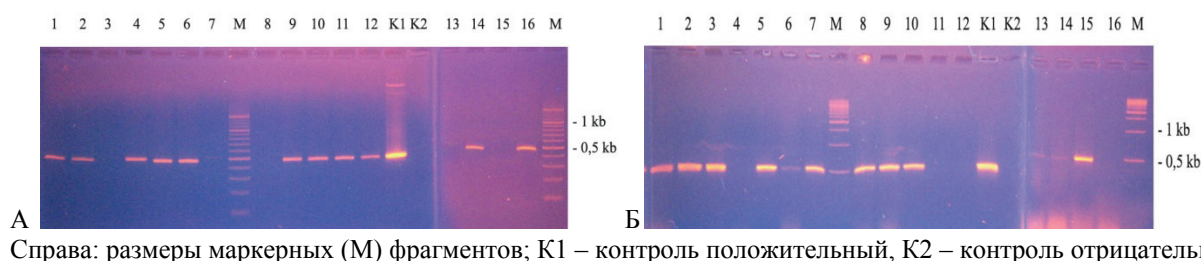
### Результаты и их обсуждение

Трансформация растений табака *Nicotiana tabacum* Samsun NN проводилась методом кокультивации с использованием агробактериальных штаммов, содержащих рекомбинантные ДНК-конструкции в составе вектора pCAMBIA 2300 (схематическое изображение представлено на рисунке 1).



*pro* – индуцибельный промотор *Arabidopsis thaliana* rd29A или конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV35S, 5' – НТП – последовательность искусственного энхансера «3xARC» или Y-вируса картофеля «5'PVY», *AtDREB1A* – кодирующая последовательность гена *AtDREB1A*, 6 – последовательность 6xHis-Tag, 3'-TMV – 3'-НТП TMV, nos – терминатор гена нопалинсинтетазы. Стрелками указаны сайты, по которым проводилось клонирование

**Рисунок 1** – Схематическое изображение плазмидной ДНК, использованной для трансформации и получения трансгенных растений табака



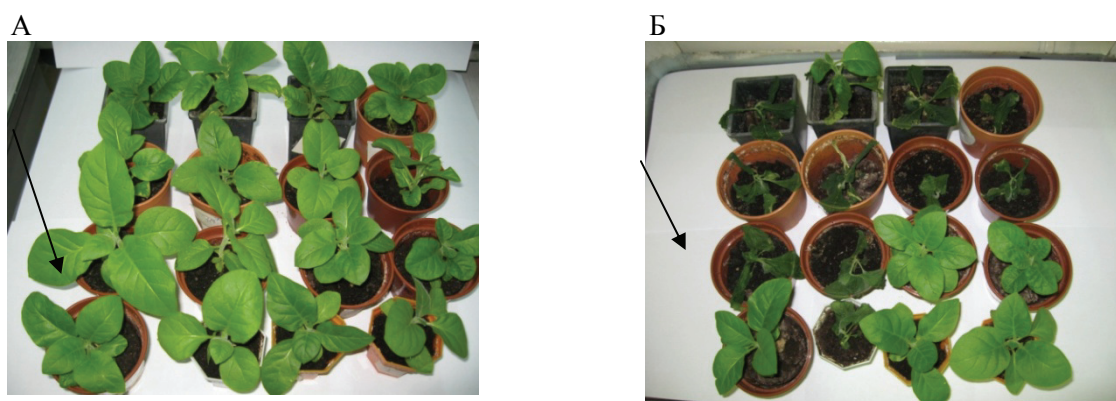
Справа: размеры маркерных (М) фрагментов; K1 – контроль положительный, K2 – контроль отрицательный

**Рисунок 2** – Результаты электрофореза в 1,2 %-ном агарозном геле продуктов анализа ДНК (А) и РНК (Б), выделенных из трансгенных растений табака

В результате трансформации были получены трансгенные растения табака. Данное обстоятельство было подтверждено положительными результатами анализа препаратов тотальных ДНК и РНК, выделенных из листьев растений. Препараты ДНК выделяли методом с использованием *СТАВ*, РНК – с помощью тризола. Наличие вставки рекомбинантных ДНК-фрагментов продемонстрировано на рисунке 2А, где четко наблюдается присутствие фрагмента ожидаемой длины 0,5 kb в большинстве проб. Наличие РНК-транскриптов гена *AtDREB1A* показано с помощью РОТ, результаты которой представлены на рисунке 2Б. Для дальнейшего исследования воздействия низких температур

на растения использовали только те варианты, в которых наблюдалось наличие РНК-транскриптов. Стрессовые условия были организованы в два этапа: 1. +5°C, 18 часов; 2. -10°C, 3 часа.

После воздействия холодового шока растения погибали уже на следующий день. Результат представлен на рисунке 3, где наглядно показано, что некоторые варианты растений действительно проявляли явную устойчивость к действию температуры -10°C. Примечательно, что большинство толерантных растений показали присутствие транскриптов гена *AtDREB1A* и содержали рекомбинантную ДНК-кассету под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV).



А – внешний вид растений до эксперимента, Б – внешний вид растений после эксперимента. Контрольное нетрансгенное растение обозначено стрелками, остальные варианты растений – трансгенные

**Рисунок 3** – Результаты воздействия холодового шока на растения табака

Всего в ходе исследования было проанализировано 72 экземпляра растений, т.е. 12 вариантов (с различными ДНК-конструкциями) в нескольких повторностях. Наилучший результат был получен у четырех линий.

Таким образом, нами созданы трансгенные растения с повышенной толерантностью к

пониженным температурам. Исходя из этого, можно сделать вывод, что рекомбинантный ген транскрипционного фактора *AtDREB1A* действительно обеспечивает повышение устойчивости растений к пониженным температурам.

#### Литература

- 1 Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // *Critical Reviews in Plant Science*. - 2005. – V. 21. P, 1–36.
- 2 Bray E.A., Plant responses to water deficit // *Trends Plant Sci*. - 1997. – V. 2. – P, 48–54.
- 3 Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S., Understanding plant responses to drought —from genes to the whole plant // *Funct. Plant Biol*. - 2003. – V. 30. – P, 239–264.
- 4 Munns R., Tester M., Mechanisms of salinity tolerance // *Annu. Rev. Plant Biol*. - 2008. V. 59. – P, 651–681.

- 5 Witcombe J.R., Hollington P.A., Howarth C.J., Reader S., Steele K.A., Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture // *Philos. Trans. R. Soc. B.* - 2008. V. 363. – P, 703–716.
- 6 Charu Lata and Manoj Prasad. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // *Journal of Experimental Botany.* - 2011. V.11. – P, 111-118.
- 7 Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // *Plant Cell Environ.* - 2000. – V. 23. – P, 337–350.
- 8 Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 2000. V. 51. – P, 463–499.
- 9 Strizhov N., Abraham E., Okresz L. et al. Differential expression of two 1-pyrroline5carboxylate synthetase genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis* // *Plant J.* - 1997. V. 12. – P, 557–569.
- 10 Ahuja I., R.C.H. de Vos, Bones A.M., Hall R.D., Plant molecular stress responses face climate change // *Trends Plant Sci.* - 2010. V. 15. – P, 664–674.
- 11 Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants // *Journal of Experimental Botany.* - 2004. V. 55. – P, 225–236.
- 12 Maria Reguera, Zvi Peleg, Eduardo Blumwald. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 2011. V. 11. – P, 101-109.
- 13 Junya Mizoi, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 2012. V.12. – P.86-96.
- 14 Saleh A. and M. Pagés. Plant AP2/ERF transcription factors // *Genetika.* - 2003. V. 35, No. 01. – P, 37-50. 2003
- 15 Карпова О.В., Ерискина Е.А., Станбекова Г.Э., Жигайлов А.В., Кожанов Е.В., Полимбетова Н.С., Исков Б.К. Клонирование и экспрессия гена транскрипционного фактора *AtDREB1A* из *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vitro* // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды. Материалы Всероссийской научной конференции. Иркутск. - 2009. - №1. – С. 207-210.