

**А. Имамходжаева, кандидат биологических наук**

**М. Ганиханова**

**А. Курбонов, доктор сельскохозяйственных наук**

**Ш. Маманазаров, Й. Мухаммадов, Ш. Кадырова**

*Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан*

*Республика Узбекистан, 111215, Ташкентская обл., Кибрайский р-н, ул. Университетская, 2*

E-mail: kurbonov.abrorjon@mail.ru

УДК 575.113:582.769:577.2:577.21

DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/70-72

## **ВЫЯВЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ОТ СЕЛЕКТИВНОГО МАРКЕРНОГО ГЕНА ГЕНОТИПОВ СРЕДИ ПОПУЛЯЦИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СОРТА ХЛОПЧАТНИКА**

*Данная статья посвящена современным стратегиям и методам получения трансгенных растений без селективных маркерных генов. Приведена классификация наиболее применяемых в мире методик. Также представлен способ выполнения поисковых работ по выявлению из популяции хлопчатника сорта Порлок-1 безканамидиновых генотипов. В сконструированные для трансформации плазмидные векторы обязательно включают гены, позволяющие идентифицировать трансформантов. Это, как правило, гены устойчивости к антибиотикам (например, гены неомидинфосфотрансферазы (npt II) и гигромицинфосфотрансферазы (hpt)), продукты которых обеспечивают рост трансформированной растительной ткани на селективной среде. За свою основную функцию, выполняемую в процессе генно-инженерных работ они получили название – селективные маркерные гены (СМГ). После скрининга трансформированных клеток эти гены утрачивают свое значение, но остаются в геноме трансформантов. Так как такие последовательности стали называться «генетическим грузом» и даже «генетическим мусором», появилась необходимость удаления из генома растений таких генов. Представленная работа на хлопчатнике проводится впервые, как и технология РНК-интерференции для хлопчатника, изменившая качественные характеристики волокна. В ходе наших исследований получено более 259 растений (первый год анализа), которые размножены в 2019 году, 55 % из них дают негативный ПЦР-результат с парой праймеров Кап F/Кап R.*

**Ключевые слова:** биотехнологический хлопчатник, ДНК, праймеры, ПЦР, селективные маркерные гены (СМГ), npt II, верификация.

**A. Imamkhodzhaeva, PhD in Biological sciences**

**M. Ganikhanova**

**A. Kurbonov, Grand PhD in Agricultural sciences**

**Sh. Mamanazarov, Y. Mukhammadov, Sh. Kadyrova**

*Center for genomics and bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan*

*Respublika Uzbekistan, 111215, Tashkentskaya obl., Kibrajskij r-n, ul. Universitetskaya, 2*

E-mail: kurbonov.abrorjon@mail.ru

## **IDENTIFICATION OF GENOTYPES FREE FROM A SELECTIVE MARKER GENE AMONG POPULATIONS OF A BIOTECHNOLOGICAL COTTON VARIETY**

*This article focuses on modern strategies and methods for producing transgenic plants without selective marker genes. The classification of the most used methods in the world is given. Also the prospecting way to identify beanamycin-free genotypes from the cotton population of the Porlock-1 variety is presented. In to plasmid vectors are designed for transformation necessarily include genes for identifying transformants. As a rule, these are genes of antibiotic resistance (for example, genes of neomycin phosphotransferase (npt II) and hygromycin phosphotransferase (hpt)), the products of which ensure the growth of transformed plant tissue on a selective medium. For their main function performed in the process of genetic engineering works they are called selective marker genes (SMG). After screening of transformed cells these genes lose their meaning, but remain in the genome of transformants. Since such sequences have come to be called the "genetic load" and even "genetic debris" it became necessary*

to remove these genes from the plant genome. The work of such character on cotton is carried out for the first time also as the technology of RNA interference for cotton, which has changed the fiber quality characteristics. In the course of our work more than 259 plants were obtained (the first year of analysis), which were reproduced in 2019, 55 % of them give a negative PCR result with a pair of Kan F/ Kan R primers.

**Key words:** biotechnological cotton, DNA, primers, PCR, selective marker genes (SMG), *npt II*, verification.

## ВВЕДЕНИЕ

Для получения новых сортов сельскохозяйственных растений в мире активно используют метод РНК интерференции. С его помощью уже созданы растения – продуценты ценных метаболитов и промышленного сырья.

Как правило, в геноме биотехнологических растений кроме своего набора генов присутствует определенное количество привнесенного, ненужного после выполнения своих функций, генетического материала. Это селективные маркерные гены (СМГ), которые в обязательном порядке применяли для селекции трансформантов. В последнее время такие СМГ стали именовать даже «генетическим грузом». Присутствие в геноме и конститутивная экспрессия чужеродных для растений селективных генов, например, устойчивости к антибиотикам и гербицидам, не одобряется коммерческими компаниями. В связи с этим появилось новое направление в геномной инженерии – получение безмаркерных трансгенных растений и создание их нового поколения.

В настоящее время возможно получение биобезопасных безмаркерных (без селективных генов) трансгенных растений. Имеющиеся стратегии создания трансгенных растений, не содержащих потенциально опасных селективных маркеров, в зависимости от инструмента выполнения систематизируют в несколько групп. Это ко-трансформация, транспозиция (Ac/Ds), сайт-специфическая рекомбинация и методы прямого скрининга трансформантов. [1] Например, при ко-трансформации целевой и маркерный ген располагаются в двух независимых Т-ДНК, в одном или двух агробактериальных штаммах. Двойные трансформанты скрещивают и отбирают потомство без селективного гена. В другой стратегии выполняется перемещение любого из генов, целевого или маркерного, с использованием транспозиции, в частности, системы мобильного элемента кукурузы Ac/Ds, с последующим удалением маркерного гена из растительного генома. Третья стратегия получения безмаркерных растений основана на системах сайт-специфической рекомбинации из бактерий. Это – техника Cre/lox. [8, 9] Четвертая группа – методы прямого скрининга трансформантов, сгруппированы система FLP/FRT, прямой скрининг трансформантов и система R/RS с помощью ПЦР. [2, 3, 4].

Для нас представляет интерес прямой скрининг трансформантов по наличию продукта экспрессии целевого гена. Этот метод основан на выявлении генотипов без чужеродных нуклеотидных фрагментов в геноме. Как обнаружено исследователями, в больших популяциях трансформированных растений обнаруживаются генотипы без селективных генов. В исследованиях мы применили эту технику для биотехнологического хлопчатника *G. hirsutum* (сорт серии *Порлок*), полученного в результате РНК интерференции.

Цель работы – выявить генотипы, не несущие в своем геноме селективный маркерный ген, то есть обнаружить естественным процессом образовавшиеся безканамициновые растения хлопчатника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе создания основы сортов хлопчатника серии *Порлок* использована векторная конструкция pHellsgate-8::PHYA1, в состав которой был введен ген устойчивости к канамицину (*npt II*). Геномную ДНК выделяли из листьев СТАВ-методом в модификации для хлопчатника.

Реакционную смесь для ПЦР в объеме 10 мкл готовили по схеме: 15 нг геномной ДНК, 1 мкл 10 x Taq буфера, 0,2 мкл dNTP (10 mM каждый), 5 pM/мкл праймер, 0,07 мкл Taq полимеразы (5 ед./мкл AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), до 10 мкл воды. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл – 94°C, 3 мин; 35 циклов 94°C, 1 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; 1 цикл – 72°C, 7 мин.

Для ПЦР были использованы праймеры: 35S-F/35S-R, PDK-F/OST-R и Kan F/Kan R Kan F/Kan R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ученые работают над ускоренным производством новых генотипов и высокой урожайности и скороспелости, устойчивости к вредителям и заболеваниям, к меняющимся экологическим условиям природы. Для технических культур, внимание уделяется обновлению ценных экономических признаков, среди которых основное значение для хлопчатника имеет качество волокна. Средневолокнистый хлопчатник (*G. Hirsutum* L.) – скороспелый высокоурожайный, однако, у тонковолокнистого хлопчатника (*G. Barbadosense* L.) самое качественное волокно, но он относительно низкоурожайный и позднеспелый. Методом RNAi – РНК-интерференции созданы новые сорта, волокно которых по характеристикам приближается к тонковолокнистому виду – *G. Barbadosense* L.

РНК-интерференция для хлопчатника была результатом внедрения специально сконструированной плазмидной конструкции (рисунки на 4-й стр. обл.) в культуру клеток Кокер-312 (Coker-312), и далее с помощью методов традиционной гибридизации его с отечественным сортом – АН-Баявут-2 и последующей селекцией был получен ген-нокаутный сорт *Порлок-1*.

С целью исключения вопросов потребителей о присутствии «чужеродного генетического груза» в геноме биотехнологических сортов проведены поисковые работы.

Из урожая хлопчатника 2017 года рандомизированным способом отобрали генотипы, ДНК которых проанализировали на присутствие в них плазмидных последовательностей с помощью ряда праймеров 35S-F/35S-R, PDK-F/OST-R. Получив

**Результаты ПЦР анализа некоторых геномов биотехнологического хлопчатника сорта Порлок-1**

Сочетание праймеров	Номер образца ДНК от биотехнологического хлопчатника											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
35S-F&35S-R	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
35S-F&PDK-R	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
PDK-F&OST-R	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Kan F & Kan R	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-

Примечание. (+) – в 1,5%-м агарозном геле обнаружен продукт ПЦР; (-) – не обнаружен.

положительные результаты эти же образцы ДНК использовали в ПЦР с парой праймеров Kan F/Kan R. В этом случае учитывали только негативные результаты, то есть для нас представляли интерес те образцы ДНК, у которых не происходила амплификация.

Среди случайно отобранного растительного материала были получены 90...93 %-е результаты амплификации с праймерами 35S-F/35S-R, PDK-F/OST-R, что подтверждает присутствие плазмидной конструкции, вызывающей эффект интерференции в геноме растений хлопчатника сорта *Порлок*. Тогда как результаты ПЦР с праймером на селективный маркерный ген (*npt II*) составляли 3...4 %. В таблице схематично представлены результаты ПЦР с разным сочетанием праймеров.

Таким образом отобраны растения, имевшие отрицательные результаты амплификации с праймером для выявления гена канамицинустойчивости. Семена этих растений высеяны в 2019 году в полевые условия для размножения и повторной молекулярно-генетической верификации на наличие в их геноме селективного гена *npt II*.

К периоду цветения на четырех делянках возделывали 259 растений, у которых были взяты листья и экстрагирована ДНК для ПЦР-анализа. По электрофорезу результатов – продуктов амплификации дано заключение, что более 55 % растений при положительном ответе на 35S-F/35S-R, PDK-F/OST-R не синтезировали ампликоны с праймером Kan F & Kan R. То есть дают негативный ПЦР-результат с парой праймеров Kan F/Kan R (вероятнее всего фрагмент *npt II* отсутствует). Семена этих растений подготовлены к высеву в 2020 году и выращенные из них растения будут еще раз подвергнуты молекулярно-генетической верификации с целью обнаружения механизма появления безмаркерных генотипов.

Понять механизм наследования и эксцизии СМГ *npt II* в естественных популяциях представляет определенную важность для разработки рекомендаций к использованию инструмента молекулярно-генетической верификации, как наименее трудоемкого в сравнении с техникой ко-трансформации, транспозиции, сайт-специфической рекомбинации или с целью удаления селективных генов из растительного генома с помощью рекомбиназ (Cre, FLP, R). [6, 7, 8]

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В дополнение к селективным маркерным генам при создании трансгенных растений нередко используют так называемые репортерные гены, про-

дукты которых дают возможность сразу судить об экспрессии встроенной генетической конструкции и оценивать успешность трансформации растения. [5] Расширение списка доступных для практического использования репортерных генов будет увеличиваться по мере создания новых хромогенных и флуорогенных субстратов для различных ферментов. Несмотря на растущее число селективных и репортерных маркерных генов, лишь некоторые из них нашли применение при создании трансгенных растений. Это обусловлено трудоемкостью и длительностью даже первичных экспериментов по тестированию их экспрессии. Недостатки многих из маркерных генов остаются не совсем очевидными. Неоднозначен ответ на вопрос о биологической безопасности маркерных генов, так как эффект от их распространения в природной среде может проявиться через много лет после начала применения.

В ходе нашей работы получено более 259 растений (первый год анализа), которые размножены в 2019 году, 55 % из них дают негативный ПЦР-результат с парой праймеров Kan F/Kan R.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Hee-Jong Woo, Seok-Cheol Suh, Yong-Gu Cho. Strategies for developing marker-free transgenic plants.// Biotechnology and Bioprocess Engineering. – Vol. 16. – Issue 6. – pp. 1053–1064.
2. Khan R., Nakamura I., Mii M. Development of disease-resistant marker-free tomato by R/RS site-specific recombination. Plant Cell Rep. – 2011. – 30. – 1041–1053.
3. Li B., Li N., Duan X., Wei A. et al. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system. Journal of Biotechnology. – 2010. – 145. – 206–213.
4. Perez-Bernal M., Delgado M., Cruz A. et al. Marker-free Transgenic Rice Lines with a Defensin Gene are Potentially Active against Phytopathogenic Fungus.// Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 52 (2). – pp. 135–144 (2017). DOI: 10.1556/038.52.2017.021 First published online July 23, 2017.
5. Rukavtsova E., Zakharchenko N., Pigaleva S. et al. Obtaining the markerless transgenic plants. // RAS Reports. – 2009. – t. 426. – № 2. – с. 261–264.
6. Narendra T., Sebastin R., Ranjan S. et al. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern// Journal of Biosciences. March 2012. DOI: 10.1007/s12038-012-9187-5. https://www.researchgate.net/publication/220000891.
7. Verweire D., Verleyen K., Buck S. De et al. Marker-Free Transgenic Plants through Genetically Programmed Auto-Excision // Plant Physiology, December 2007. – Vol. 145. – pp. 1220–1231, www.plantphysiol.org.
8. Yelda Ozden Çiftçi. Transgenic Plants: Advances and Limitations./ Published: March 7th 2012. DOI: 10.5772/1409 ISBN: 978-953-51-0181-9 eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-5229-32012.
9. Zuo J., Niu Q., Moller S., Chua N. Chemical- regulated site-specific DNA excision in transgenic plants / Nat. Biotechnol. – 2001. – 19. – 157–161.