

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 635.521:631.527

Эффективность транзientной экспрессии в протопластах разных сортов картофеля

© 2020 Л.Н. КОНОВАЛОВА¹, С.Р. СТРЕЛЬНИКОВА¹, Н.Е. ЗЛОБИН¹, П.Н. ХАРЧЕНКО¹, Р.А. КОМАХИН¹

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550

*e-mail: recombination@iab.ac.ru

Поступила в редакцию 20.02.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Получение мезофильных протопластов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с целью транзientной экспрессии генов является необходимым технологическим этапом для проверки эффективности новых генетических конструкций, а также при редактировании генома с использованием технологии CRISPR/Cas. В данном исследовании для выделения протопластов использовали листья растений картофеля девяти российских сортов, выращенных *in vitro* в течение 6-7 недель в сосудах под крышками из фольги, препятствующими газообмену с окружающей средой. Впервые показана возможность выделения от $2,4 \cdot 10^6$ до $4,6 \cdot 10^6$ жизнеспособных протопластов из одного грамма асептических листьев растений в зависимости от использованного сорта. Установлено, что уровень трансфекции протопластов плазмидной генетической конструкцией рНВТ-sGFP-NosT в зависимости от сорта составляет от 10 до 49% и достаточен для успешного проведения последующих экспериментов по оценке эффективности генетических конструкций и редактирования генома картофеля.

Ключевые слова: картофель, *Solanum tuberosum*, протопласты, плазмидная ДНК, трансфекция, транзientная экспрессия, *gfp*.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-16-24

В настоящее время обеспечение глобальной продовольственной безопасности в изменяющихся климатических условиях – актуальная задача, для решения которой целесообразно использование самых современных методов исследования [1]. Редактирование генома сельскохозяйственных растений, стратегии синтетической биологии и новейшие системы молекулярного клонирования позволяют разрешить эту проблему [2–5]. Эти новейшие экспериментальные подходы, прежде всего, предполагают применение экспрессионных кассет (генетических конструкций), которые в настоящее время можно быстро создавать вручную или автоматически с использованием соответствующего оборудования [6–9]. Оценка функциональности и эффективности новых экспрессионных кассет с

использованием стабильных трансформантов растений – наиболее точный и востребованный экспериментальный подход, однако для многих видов сельскохозяйственных культур его применение не оправдано из-за относительно низкой эффективности генетической трансформации, медленного, трудоемкого и дорогостоящего процесса селекции трансформированных клеток, необходимости использования больших площадей для культивирования эксплантов и как следствие низкой пропускной способности метода [10, 11]. Таким образом, возможность экспериментальной проверки экспрессионных кассет в цикле «конструирование-сборка-тестирование» ограничена [12].

Устранить это узкое место можно с использованием метода транзientной экспрессии [13].

Список сокращений: ПЭГ – полиэтиленгликоль; ФДА – флуоресцеиндиацетат.

Этот экспериментальный подход основан на кратковременном функционировании генетических конструкций в клетках интересующих видов сельскохозяйственных растений без длительной и дорогостоящей селекции трансформированных клеток. В настоящее время многие методы оценки транзientной экспрессии в сельскохозяйственных культурах выполняются с использованием почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в качестве переносчика новых экспрессионных каскадов, расположенных в Т-ДНК растительных экспрессионных векторов [14–17]. Хотя этот метод способен обеспечить достаточный уровень экспрессии целевых генов в клетках растений, он применим не ко всем сельскохозяйственным культурам. Например, не удастся стабильно агроинфильтрировать листья растений картофеля. Альтернативным подходом является бомбардировка растительной ткани микрочастицами с нанесенными на них ДНК экспрессионных каскадов, но такие процедуры не особенно производительны и для них требуется специальное оборудование и дорогостоящие микроносители для ДНК [18, 19].

Трансформация (трансфекция) клеток растений временно лишенных клеточной стенки – протопластов также широко используется для оценки эффективности создаваемых генетических конструкций и имеет преимущества по сравнению с другими методами. В частности, в этом случае не требуется специального оборудования, можно проводить скрининг с высокой пропускной способностью, быстро и надежно, но, как правило, экспериментальный протокол оптимизирован только под один модельный генотип [12]. Однако функциональность и эффективность новых генетических конструкций иногда необходимо оценить в нескольких генотипах одной сельскохозяйственной культуры, которые могут существенно различаться по фенотипу и реакции на экспериментальные процедуры.

Общеизвестно, что картофель (*Solanum tuberosum* L.) одна из ведущих культур в мировом аграрном секторе, востребованная разными отраслями промышленности. Традиционные методы селекции позволяют создавать промышленные сорта картофеля, если доступны для скрещиваний растения-доноры генов хозяйственно-ценных признаков [20]. Эти гены могут быть найдены в природных популяциях, но их обнаружение дорогой и длительный процесс, не гарантирующий положительных результатов. Из-за особенностей полового размножения и сегрегации аллелей тетраплоидного генома картофеля генетическая инженерия является эффективным способом создания новых генотипов с комплексом полезных свойств [21]. Новым

решением проблемы стали технологии редактирования генома растений TALEN (transcription activator-like effector nucleases) [4, 22] и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated 9) [23, 24]. При самом простом применении они позволили целенаправленно создать мутации во всех аллелях выбранного гена тетраплоидных сортов картофеля Ranger Russet и Kuras, и придать им новые признаки, соответственно, пониженное содержание редуцирующих сахаров и акриламида [25] и изменить молекулярную структуру крахмала [4]. Для успешного геномного редактирования сортов картофеля российской селекции необходимо, прежде всего, оценить уровень экстракции протопластов из мезофилла листа конкретного генотипа и эффективность их трансфекции генетическими конструкциями.

Цель работы состояла в оценке продуктивности выделения протопластов из мезофилла листьев картофеля девяти отечественных сортов и эффективности их трансфекции плазмидной ДНК.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал. Объектами исследований служили растения отечественных сортов картофеля *S. tuberosum* L.: Барин, Вектор, Надежда, Северное Сияние, Скороплодный, Утро, Фрителла, Юбилей Жукова, Снегирь (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию; <http://reestr.gossortrf.ru/reestr/culture/159.html>), полученные из Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха». Растения культивировали *in vitro* на безгормональной питательной среде MS [26] при температуре 22–24 °С, режиме освещения 16/8 ч и освещенности 3000–4000 лк. в течение 4–7 недель. Все растения были проверены на отсутствие бактериальной, вирусной (X, Y, M, L, S и A) и виридной контаминации.

Выделение протопластов. Для получения протопластов использовали листья асептических растений, размноженных микроклонально. Выделение протопластов выполняли по ранее опубликованной методике [27] с некоторыми изменениями. В частности, раствор для ферментации листьев содержал 0,5 % Cellulase «Onozuka R-10» и 0,5% Maserase R-10, 0,5 М сахарозы, 5 мМ хлорида кальция и 0,01 М 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты (рН 5,6). Раствор готовили непосредственно перед экспериментом и стерилизовали фильтрованием (диаметр пор мембраны 22 мкм).

Для ферментации одного грамма листьев использовали 10 мл раствора. Ферментацию проводили при температуре 28–30 °С в течение 15–16 ч. По истечении этого времени с использованием инвертированного микроскопа Opton ICM 405 (Carl Zeiss, Германия) оценивали качество выделенных протопластов, которые должны иметь правильную сферическую форму. Протопласты очищали от остатков растительной ткани путем фильтрации через нейлоновую мембрану (диаметр пор 100 мкм) и центрифугировали (при 80–100 г в течение 3 мин) для получения флотирующего слоя клеток, которые промывали и оставляли в среде W-5 [27]. Эффективность выделения протопластов определяли как количество флотирующих клеток, выделенных из одного грамма листьев. Для каждого сорта опыт повторяли не менее трех раз.

Определение плотности и жизнеспособности протопластов. Количество выделенных протопластов измеряли в камере Фукса-Розенталя [28] с использованием микроскопа OLYMPUS Bx 51 (OLYMPUS, Япония). Жизнеспособность протопластов определяли по флуоресценции в ультрафиолетовом свете продуктов гидролиза витального красителя флуоресцеиндиацетата (ФДА) [29] с использованием микроскопа OLYMPUS Bx 51 с системой флуоресценции U-RLF_T (OLYMPUS) и фильтром для GFP (41017). Жизнеспособность выражали в процентах флуоресцирующих клеток по отношению к общему количеству клеток, взятых для анализа.

Трансфекция протопластов плазмидной ДНК. Трансфекцию плазмидной генетической конструкцией рНВТ-sGFP-NosT [30], с репортерным геном *gfp* под контролем вирусного промотора CaMV35S, осуществляли с использованием полиэтиленгликоля 4000 (ПЭГ), в соответствии с методикой [31]. Для каждого эксперимента по трансфекции использовали 10^5 жизнеспособных клеток и 20 мкг плазмидной ДНК. Для этого 100 мкл суспензии протопластов смешивали с плазмидной ДНК в стерильной пробирке и добавляли ПЭГ в соответствующей концентрации. Трансфекцию выполняли при комнатной температуре в течение 15 мин и останавливали путем добавления 1 мл жидкой питательной среды W-5 [27]. Затем протопласты осаждали центрифугированием (при 500 г в течение 5 мин), ресуспендировали в жидкой питательной среде WSS [27] и инкубировали 36 ч при комнатной температуре. Для каждого сорта опыт повторяли трижды в трехкратной повторности. Для трансфекции плазмидную ДНК рНВТ-sGFP-NosT очищали в градиенте хлористого цезия.

Анализ флуоресценции репортерного белка GFP в протопластах. Количество клеток с флуо-

ресценцией репортерного белка GFP определяли через 36 ч после трансфекции на микроскопе OLYMPUS Bx 51 (OLYMPUS) с системой флуоресценции U-RLF_T и фильтром для GFP (41017). Для этого 1 мл суспензии протопластов с плотностью 10^5 клеток осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 70–100 мкл остатков питательной среды, наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. При увеличении 20х в проходящем свете подсчитывали общее количество протопластов, затем при ультрафиолетовом освещении в этом же поле зрения подсчитывали количество флуоресцирующих клеток. В нескольких полях зрения анализировали не менее 200 клеток в каждой повторности каждого генотипа. Эффективность трансфекции выражали в процентах флуоресцирующих клеток по отношению к общему количеству клеток, использованных для подсчета.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали критерий Стьюдента и программу MS Excel. Представлены средние значения и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование мезофильных протопластов описано для нескольких видов растений, в том числе для арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) [31], кукурузы (*Zea mays* L.) [32], табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum* L.) и табака Бентхама (*Nicotiana benthamiana* (Domin)) [33], томата (*Solanum lycopersicum*) [34] и риса (*Oryza sativa* L.) [12, 35]. Об использовании протопластов картофеля для транзientной экспрессии генов доступно мало сообщений, хотя протоколы экстракции протопластов некоторых индивидуальных генотипов представлены в научной литературе [31, 36–40]. Недавно были опубликованы статьи с краткими разделами по транзientной экспрессии репортерных генов *gfp* и *yfp* в протопластах картофеля, соответственно, сорта Désirée [22] и сорта Ranger Russet [25]. Однако оставалось неясно, насколько эффективными окажутся предложенные в этих публикациях процедуры для экспериментальных работ с протопластами разных сортов картофеля отечественной селекции.

Первоначально в наших исследованиях для получения протопластов побеги девяти сортов картофеля отечественной селекции Барин, Вектор, Надежда, Северное Сияние, Скороплодный, Утро, Фрителла, Юбилей Жукова и Снегирь культивировали в сосудах под ватно-марлевыми пробками в течение 4–5 недель в соответствии с общепринятыми рекомендациями по микроклональному

размножению. Первые результаты экспериментов показали, что эффективность выделения протопластов из трех сортов картофеля Фрителла, Вектор и Надежда оказалась достаточно низкой и не превышала $5,0 \cdot 10^5$ клеток из грамма листьев. Ранее из листьев растений сорта Desirée авторам Nicolia A. и др. удавалось выделять не менее $7,6 \cdot 10^5$ клеток [22]. Низкая эффективность продукции протопластов из использованных отечественных сортов картофеля обуславливает необходимость значительных объемов экспериментальных работ, повышает трудоемкость и снижает пропускную способность последующих экспериментов.

Анализ причин низкой эффективности показал, что листья растений в недостаточной степени подвергаются гидролизу ферментами за 15–16 ч инкубации, что не позволяет отдельным протопластам высвободиться из растительной ткани в раствор. Увеличивать время инкубации листьев в растворе для ферментации нецелесообразно, поскольку это снижает качество (целостность клеток) и выход протопластов [27]. Поэтому в

следующем эксперименте с этими же сортами картофеля в растворе для ферментации повысили количество ферментных препаратов Cellulase «Onozuka R-10» и Macerase R-10 в два раза (до 1,0%). Однако и этот экспериментальный подход не имел успеха, листья растений оставались относительно жесткими и в недостаточной степени подвергались гидролизу. Дополнительное увеличение количества ферментов нецелесообразно, поскольку также снижает качество выделяемых протопластов [27].

Для того чтобы сделать листья картофеля более восприимчивыми к ферментам побеги вырастили в сосудах с пробками из фольги, которые препятствовали газообмену с окружающей средой. Данный экспериментальный подход привел к тому, что побеги и листья растений росли медленнее, достигали необходимого размера только через 6–7 недель культивации и имели немного хлоротичный фенотип. Тем не менее, в результате этого эксперимента выделили протопласты из всех девяти сортов картофеля (рис. 1).

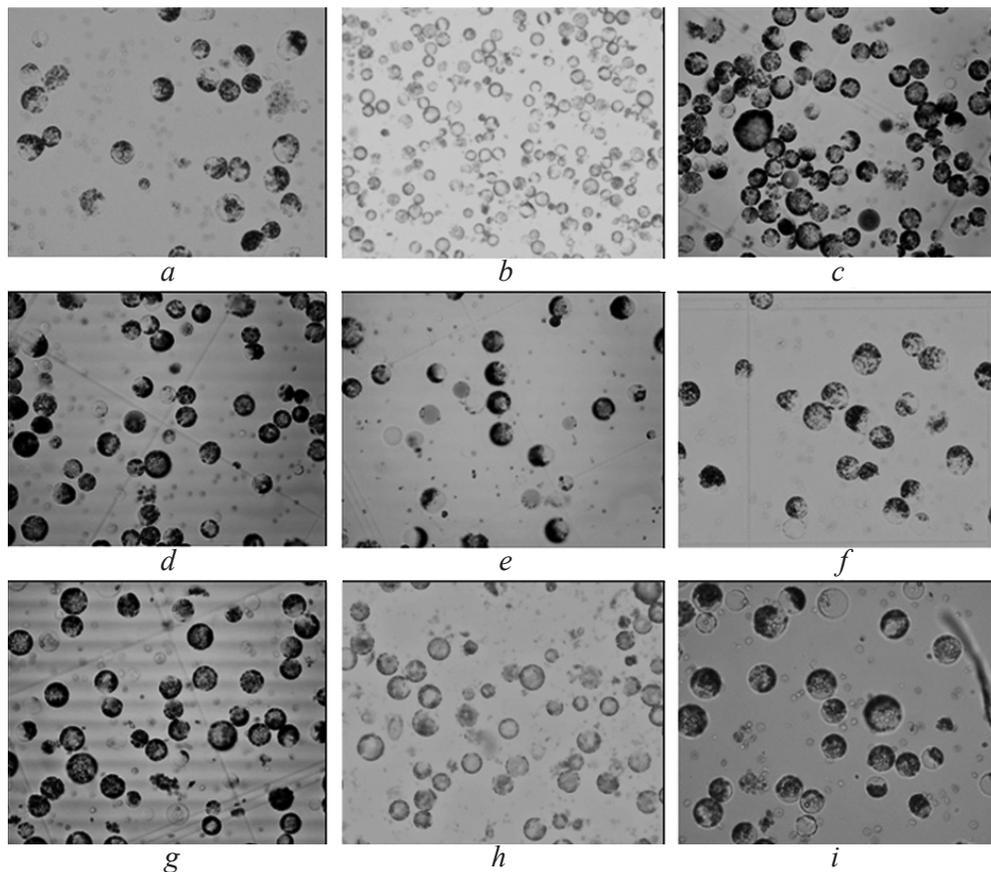


Рис. 1. Протопласты из листьев асептических растений картофеля разных сортов в проходящем свете. *a* – Юбилей Жукова, *b* – Скороплодный, *c* – Фрителла, *d* – Северное Сияние, *e* – Вектор, *f* – Снегирь, *g* – Надежда, *h* – Утро, *i* – Барин. Увеличение 20×.

Fig. 1. Protoplasts from the leaves of the aseptic potato plants of various cultivars in transmitted light: *a* – Yubiley Zhukova, *b* – Skoroplodnyy, *c* – Fritella, *d* – Severnoye Siyaniye, *e* – Vector, *f* – Snegir, *g* – Nadezhda, *h* – Utro, and *i* – Barin. Magnification 20×.

Как видно из рис. 1, протопласты растений сортов Барин, Вектор, Надежда, Северное Сияние, Скороплодный, Утро, Фрителла, Снегирь и Юбилей Жукова имели правильную сферическую форму, различались по размеру клеток и соотношению клеток разного размера. Особенно много мелких клеток присутствовало у сорта Скороплодный (рис. 1b). Следует отметить, что протопласты из сорта Desirée также различались по размеру, но не известно сказывалось ли это на эффективности их последующей трансфекции плазмидной ДНК [22].

Эффективность выделения мезофильных протопластов из листьев разных отечественных сортов картофеля представлена в табл. 1. В зависимости от сорта из одного грамма листовой ткани картофеля выделили от $2,4 \cdot 10^6$ до $4,6 \cdot 10^6$ клеток. Таким образом, эффективность экстракции протопластов из всех девяти отечественных сортов оказалась сопоставима или выше, чем показано ранее для сорта Desirée – не более $1,9 \cdot 10^6$ клеток из грамма свежих листьев [22]. Наиболее отзывчивыми оказались отечественные сорта Фрителла и Северное Сияние, демонстрирующие продуктивность от $4,3 \cdot 10^6$ до $4,6 \cdot 10^6$ клеток, а наименее – сорта Юбилей Жукова, Утро, Вектор, Снегирь и Надежда – от $2,4 \cdot 10^6$ до $2,7 \cdot 10^6$ клеток. Между двумя этими группами существовали различия по количеству выделяемых протопластов, но они не были статистически значимыми. Поскольку известно, что на постановку одного эксперимента используется не более $2,0 \cdot 10^5$ клеток [4, 22, 25], можно предполагать, что 1 грамма листьев любого изученного сорта будет достаточно для десятикратной повторности эксперимента.

Известно, что для транзientной экспрессии генов необходима не только высокая эффективность выделения протопластов из единицы массы листьев, но и их жизнеспособность. В работе Nicolia A. и др. было показано, что жизнеспособность протопластов картофеля сорта Desirée, впоследствии использованных для трансфекции плазмидной ДНК, составляла более 98% [22]. Для определения жизнеспособности протопласты отечественных сортов картофеля окрашивали витальным красителем FDA, продукты гидролиза которого накапливаются только в живых клетках и флуоресцируют под действием ультрафиолета. Большинство протопластов после процедур выделения и очистки флуоресцировали в ультрафиолете (рис. 2), т.е. были жизнеспособными и могли быть использованы для трансфекции генетическими конструкциями. В целом жизнеспособность протопластов изученных сортов картофеля оставалась высокой и варьировала от 93 до 99%, составляя в среднем около $97,0 \pm 2,0\%$.

С целью ускорения экспериментального процесса протопласты выделили из растений, выращенных в течение 4–5 недель в сосудах под крышками из фольги. Однако выход протопластов из единицы массы листовой ткани у сортов Фрителла, Вектор и Надежда снизился в 2–3 раза по сравнению с предыдущими экспериментами. Следовательно, экспериментально подобранный период

Таблица 1

Эффективность экстракции протопластов из одного грамма асептических листьев растений картофеля разных сортов

The extraction efficiency of protoplasts from one gram of aseptic leaves of potato plants of different varieties

Сорт	Плотность, 10^6 клеток/мл*
Барин	$3,0 \pm 0,5$
Вектор	$2,6 \pm 0,5$
Надежда	$2,4 \pm 0,4$
Северное Сияние	$4,6 \pm 1,5$
Скороплодный	$3,1 \pm 0,8$
Снегирь	$2,7 \pm 0,8$
Утро	$2,4 \pm 0,4$
Фрителла	$4,3 \pm 1,1$
Юбилей Жукова	$2,4 \pm 0,3$

*представлены средние значения \pm стандартные ошибки.

*average values \pm standard errors are presented.

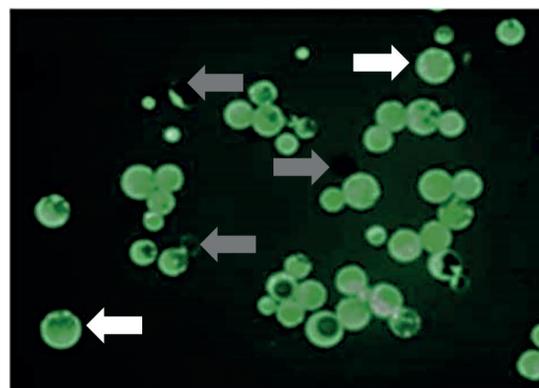


Рис. 2. Протопласты картофеля, окрашенные витальным красителем FDA, продукты гидролиза которого флуоресцируют ярко-зеленым цветом под действием ультрафиолета (возбуждение 488 нм, испускание 530 нм). Некоторые жизнеспособные протопласты показаны белой стрелкой. Темно-серой стрелкой отмечены нежизнеспособные клетки. Увеличение 20 \times .

Fig. 2. Potato protoplasts dyed with the fluorescein diacetate (FDA) vital stain. Products of FDA hydrolysis fluoresce bright green under UV illumination (excitation 488 nm, emission 530 nm). Some of viable protoplasts are marked with white arrows. Non-viable cells are marked with dark-grey arrows. Magnification 20 \times .

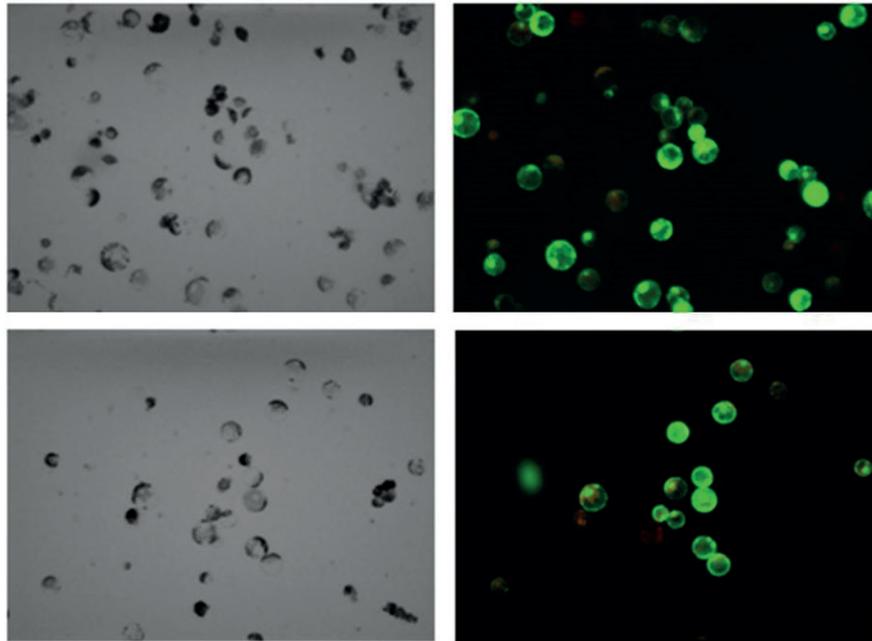


Рис. 3. Протопласты картофеля после трансфекции плазмидой рНВТ-sGFP-NosT. Слева – в проходящем свете, справа – под действием ультрафиолета (возбуждение 395, 475 нм, испускание 498 нм). В качестве примера сверху протопласты сорта Северное Сияние, снизу – сорта Барин. Увеличение 20×.

Fig. 3. Potato protoplasts after рНВТ-sGFP-NosT plasmid transfection. On the left: in transmitted light; on the right: under UV illumination (excitation 395, 475 nm, emission 498 nm). Upper part: protoplasts of Severnoye Siyaniye cultivar; lower part: protoplasts of Barin cultivar (as the examples). Magnification 20×.

культивирования растений в течение 6–7 недель с использованием крышек, препятствующих газообмену с окружающей средой, в данных исследованиях можно считать наиболее приемлемым для высокой эффективности получения жизнеспособных протопластов из растений картофеля изученных сортов.

Известно, что параметры трансфекции протопластов картофеля могут зависеть от генетической конструкции, количества ДНК, времени инкубации с ПЭГ и его концентрации, количества протопластов [4, 22, 25]. Для оценки эффективности трансфекции протопластов картофеля отечественных сортов использовали плазмиду рНВТ-sGFP-NosT [30] с геном зеленого флуоресцентного белка GFP под контролем сильного и конститутивного вирусного промотора CaMV35S, эффективное применение которой ранее продемонстрировали на сорте Desirée [22].

Для трансфекции применяли 20 мкг препарата плазмидной ДНК, что по количеству было сопоставимо с 10–15 мкг, использованными для трансфекции различными генетическими конструкциями сортов картофеля Desirée, Ranger Russet, Atlantic, Russet Burbank, Shepody и Kuras [4, 22, 25].

В этих же исследованиях для трансфекции плазмидной ДНК к протопластам добавляли на 3

или 30 мин ПЭГ в концентрации от 12,5 до 40%, но четкой зависимости эффективности создания трансформантов от времени экспозиции и концентрации ПЭГ не получили. Однако известно, что использование более низкой концентрации ПЭГ и более короткого времени инкубации лучше сохраняло жизнеспособность протопластов картофеля [39]. Поэтому в наших исследованиях трансфекцию выполняли путем экспозиции протопластов в течение 15 мин с ПЭГ в двух вариантах концентраций 10 и 20%.

В различных экспериментах для трансфекции использовали от $5,0 \cdot 10^4$ до $2,0 \cdot 10^5$ клеток [4, 22, 25], в наших экспериментах задействовали 10^5 жизнеспособных протопластов для каждого эксперимента (повторности).

Транзистентную экспрессию гена *gfp* определяли по флуоресценции его белкового продукта внутри протопластов. Как видно из рис. 3 часть трансфицированных протопластов картофеля продуцировала репортерный белок GFP, вне зависимости от размера клеток. Остальные клетки либо не получили плазмиду, либо были нежизнеспособны на момент анализа флуоресценции. Не исключено, что часть протопластов, в которые плазида проникла, могли погибнуть при трансфекции или после нее за 36 ч инкубации.

Эффективность трансфекции протопластов картофеля плазмидой pHBT-sGFP-NosT
The transfection efficiency of potato protoplasts with pHBT-sGFP-NosT plasmid

Сорт	Изучено клеток, шт.	Эффективность трансфекции, %*	
		ПЭГ 10%	ПЭГ 20%
Барин	1930	21,0 ± 4,0	33,0 ± 10,0
Вектор	2789	10,0 ± 2,0	22,0 ± 10,0
Надежда	1816	37,0 ± 11,0	49,0 ± 4,0
Северное Сияние	2894	31,0 ± 5,0	31,0 ± 9,0
Скороплодный	1815	35,0 ± 5,0	35,0 ± 5,0
Снегирь	2660	47,0 ± 6,0	18,0 ± 3,5
Утро	2440	18,0 ± 2,0	28,0 ± 7,0
Фрителла	2107	33,0 ± 9,0	37,0 ± 7,0
Юбилей Жукова	2427	18,0 ± 5,0	17,0 ± 5,0

*представлены средние значения ± стандартные ошибки.

*average values ± standard errors are presented.

В табл. 2 представлены данные по эффективности трансфекции, которую определяли как отношение флуоресцирующих протопластов к общему числу проанализированных клеток. Рассчитанная таким образом эффективность трансфекции протопластов находилась в интервале от 10 до 49%. Наиболее высокую эффективность при использовании ПЭГ в концентрации 10% продемонстрировал сорт Снегирь ($47,0 \pm 6,0$), а наименьшую – сорт Вектор ($10,0 \pm 2,0$). При концентрации ПЭГ равной 20% наиболее эффективными и стабильными оказались сорта Фрителла ($37,0 \pm 7,0$) и Надежда ($49,0 \pm 4,0$), а наименее – сорта Юбилей Жукова ($17,0 \pm 5,0$), Вектор ($22,0 \pm 10,0$) и Снегирь ($18,0 \pm 3,5$). Не обнаружено значимого влияния концентрации ПЭГ на эффективность трансфекции протопластов всех сортов, за исключением сорта Снегирь, для которого ПЭГ в концентрации 20% достоверно снижал процент флуоресцирующих клеток в 2,6 раза.

В исследованиях зарубежных авторов эффективность трансфекции протопластов картофеля сорта Desiree плазмидой pHBT-sGFP-NosT составляла от 38 до 39% [22]. Этого оказалось достаточно для последующего использования протопластов картофеля для транзientной экспрессии разнообразных генетических конструкций с целью редактирования некоторых генов и получения регенерантов из индивидуальных клеток с нокаутом всех четырех аллелей тетраплоидного генома [4, 22, 25]. Параметры эффективности трансфекции отечественных сортов Скороплодный, Фрителла, Северное Сияние и Надежда оказались наиболее близки к опубликованным ранее результатам зарубежных исследователей [22]. Следовательно, все изученные отечественные сорта картофеля при необходимости могут быть

использованы для транзientной экспрессии генетических конструкций в протопластах. Наилучшим сочетанием параметров экстракции протопластов и их трансфекции плазмидной ДНК отличаются сорта Фрителла и Северное Сияние, примерно в три раза более низкую эффективность демонстрировал наименее пригодный для данных экспериментов сорт Юбилей Жукова.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности выделения необходимого количества жизнеспособных протопластов из растений картофеля отечественных сортов. Уровень эффективности их трансфекции плазмидной ДНК достаточен для успешного проведения последующих экспериментов по редактированию генома картофеля. Создание системы оценки генетических конструкций методом транзientной экспрессии в протопластах нескольких сортов отечественной селекции обеспечивает техническую платформу для будущих исследований в области геномного редактирования картофеля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексного плана научных исследований «Развитие селекции и семеноводства картофеля».

ЛИТЕРАТУРА

1. Huber S.C. Grand challenges in plant physiology: the underpinning of translational research. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2, 48. doi: 10.3389/fpls.2011.00048
2. Cabello J.V., Lodeyro A.F., Zurbriggen M.D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26, 62–70. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.011

3. Piquerez S.J., Harvey S.E., Beynon J.L., Ntoukakis V. Improving crop disease resistance: lessons from research on *Arabidopsis* and tomato. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5, 671. doi: 10.3389/fpls.2014.00671
4. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(1), 117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3
5. Kubis A., Bar-Even A. Synthetic biology approaches for improving photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(5), 1425–1433. doi: 10.1093/jxb/erz029
6. De Paoli H.C., Tuskan G.A., Yang X. An innovative platform for quick and flexible joining of assorted DNA fragments. *Scientific Reports*, 2016, 6, 19278. doi: 10.1038/srep19278
7. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, 6(5), 343–345. doi: 10.1038/nmeth.1318
8. Patron N.J., Orzaez D., Marillonnet S., et al. Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist*, 2015, 208(1), 13–19. doi: 10.1111/nph.13532
9. Pollak B., Cerda A., Delmans M., et al. Loop assembly: a simple and open system for recursive fabrication of DNA circuits. *New Phytologist*, 2019, 222(1), 628–640. doi: 10.1111/nph.15625
10. Ветчинкина Е.М., Комахина В.В., Высоцкий Д.А. и др. Экспрессия растительного гена антимикробных пептидов pro-SmAMP2 повышает устойчивость трансгенных растений картофеля к возбудителям альтернариоза и фузариоза. *Генетика*, 2016, 52, 1055–1068.
11. Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., et al. Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 2016, 28(7), 1510–1520. doi: 10.1105/tpc.16.00196
12. Page M.T., Parry M.A.J., Carmo-Silva E. A high-throughput transient expression system for rice. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(7), 2057–2064. doi: 10.1111/pce.13542
13. Sainsbury F., Lomonosoff G.P. Transient expressions of synthetic biology in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 19, 1–7. doi: 10.1016/j.pbi.2014.02.003
14. Andrieu A., Breitler J.C., Siré C., et al. An in planta, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Rice*, 2012, 5(1), 23. doi: 10.1186/1939-8433-5-23
15. Bhaskar P.B., Venkateshwaran M., Wu L., et al. *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato. *Plos ONE*, 2009, 4(6), 1–8, e5812. doi: 10.1371/journal.pone.0005812
16. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to the suppression of rust diseases on wheat. *The Plant Journal*, 2013, 73(3), 521–532. doi: 10.1111/tpj.12047
17. Маджарова Н.В., Казакова К.А., Стрельникова С.Р. и др. Промоторы pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 из дикорастущего растения *Stellaria media* для биотехнологии двудольных растений. *Физиология растений*, 2018, 65(5), 388–400.
18. Kirienko D.R., Luo A., Sylvester A.W. Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study. *Plant Physiology*, 2012, 159(4), 1309–1318. doi: 10.1104/pp.112.199737
19. Ueki S., Magori S., Lacroix B., Citovsky V. Transient gene expression in epidermal cells of plant leaves by biolistic DNA delivery. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 940, 17–26. doi: 10.1007/978-1-62703-110-3_2
20. Hameed A., Zaidi S.S., Shakir S., Mansoor S. Applications of New Breeding Technologies for Potato Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9, 925. doi: 10.3389/fpls.2018.00925
21. Nadakuduti S.S., Starker C.G., Ko D.K., et al. Evaluation of Methods to Assess in vivo Activity of Engineered Genome-Editing Nucleases in Protoplasts. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10, 110. doi: 10.3389/fpls.2019.00110
22. Nicolia A., Proux-Wera E., Ahman I., et al. Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Journal of Biotechnology*, 2015, 204, 17–24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.021
23. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096), 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
24. Bortesi L., Fische, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 2015, 33(1), 41–52.
25. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1), 169–176. doi: 10.1111/pbi.12370
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3), 473–497.
27. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев: Изд-во Наукова Думка, 1985, 48–56.
28. Биотехнология растений: культура клеток. Пер. с англ. В.И. Негрука. Под редакцией Р.Г. Бутенко. М.: Агропромиздат, – 1989, 61–62.
29. Larkin P.J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta*, 1976, 128, 213–216. doi: 10.1007/BF00393231

30. Chiu W., Niwa Y., Zeng W., et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 1996, 6(3), 325–330. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00483-9
31. Yoo, S. D., Cho, Y. H., Sheen, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2007, 2(7), 1565–1573. doi: 10.1038/nprot.2007.199
32. Sheen J. Signal transduction in maize and arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol*, 2001, 127, 1466–1475. doi: 10.1104/pp.010820
33. Fischer R., Hain R. Tobacco protoplast transformation and use for functional analysis of newly isolated genes and gene constructs. *Methods in Cell Biology*, 1995, 50, 401–410. doi: 10.1016/s0091-679x(08)61046-8
34. Nguyen V.C., Clelland B.W., Hockman D.J., et al. Replication stress checkpoint signaling controls tRNA gene transcription. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(8), 976–981. doi: 10.1038/nsmb.1857
35. Zhang Y., Su J., Duan S., et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant methods*, 2011, 7(1), 30. doi: 10.1186/1746-4811-7-30
36. Jones H., Ooms G., Jones M.G. Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts. *Plant Mol Biol*, 1989, 13, 503–511. doi: 10.1007/BF00027310
37. Anjum, M. A. Effect of protoplast source and media on growth and regenerability of protoplast-derived calluses of *Solanum tuberosum* L. *Acta physiologiae plantarum*, 1998, 20(2), 129–133.
38. Sharma S., Sarkar D., Pandey S.K., et al. Stoloniferous shoot protoplast, an efficient cell system in potato for somatic cell genetic manipulations. *Sci. Hortic*, 2011, 128, 84–91. doi: 10.1016/j.scienta.2011.01.007
39. Craig W., Gargano D., Scotti N., et al. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Report*, 2005, 24(10), 603–611. doi: 10.1007/s00299-005-0018-0
40. Leucci M.R., Di Sansebastiano G., Gigante M., et al. Secretion marker proteins and cell-wall polysaccharides move through different secretory pathways. *Planta*, 2007, 225, 1001–1017. doi: 10.1007/s00425-006-0407-9

Efficiency of Transient Expression in Protoplasts of Various Potato Varieties

L.N. KONOVALOVA¹, S.R. STRELNIKOVA¹, N.E. ZLOBIN¹, P.N. KHARCHENKO¹, and R.A. KOMAKHIN¹

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

*e-mail: recombination@iab.ac.ru

Received February 20, 2020

Revised March 25, 2020

Accepted May 15, 2020

Abstract—Production of mesophilic protoplasts in potato (*Solanum tuberosum* L.) for transient gene expression is a mandatory technological stage in testing efficiency of new genetic constructs and CRISPR/Cas genome editing. In this study, isolation of protoplasts was carried out from leaves of potato plants of nine Russian cultivars grown *in vitro* for 6–7 weeks in vessels with foil caps, which prevented gas exchange with the environment. We first ever demonstrated the possibility of obtaining $2.4 \cdot 10^6$ to $4.6 \cdot 10^6$ viable protoplasts from one gram of aseptic plant leaves depending on the used potato cultivar. We established that the level of transfection of protoplasts with the genetic construct pHBT-sGFP-NosT amounts from 10 to 49% depending on the cultivar, which is sufficient for subsequent successful analysis of the efficiency of genetic constructs and potato genome editing.

Key words: potato, *Solanum tuberosum*, protoplasts, plasmid DNA, transfection, transient expression, *gfp*

Funding—The work was financially supported by the Comprehensive Research Program «Development of Potato Breeding and Seed Production».

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-16-24