Design of an inducible *rolC* expression vector

Khafizova G.V., Matveeva T.V.

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: galina.khafizova@gmail.com

Key message. *rolC* is one of the most conserved genes in T-DNA - a fragment, that agrobacteria transfer to the plant during transformation. The *rolC* functions are not defined yet, to clarify them we designed an inducible expression vector.

Keywords: *rolC*, naturally transgenic plants, cellular T-DNA

Today agrobacterial transformation by members of *Rhizobiaceae* family is one of the main production methods of transgenic plants *in vitro*. This method is based on the ability of bacteria to integrate the fragment of their DNA (T-DNA) into a plant's genome. However, there are some transgenic plants that appeared in nature before we developed methods of genetic engineering (Matveeva, Sokornova, 2017). These plants contain sequences homologous to agrobacterial T-DNA in their genomes. One of the highly conserved genes in T-DNA sequence is *rolC* and it has been shown that in a number of naturally transgenic plants *rolC* is expressed in different organs and tissues, and its function has not yet been established (Matveeva, 2018). Possible functions of *rolC* that are speculated are: cytokinin level regulation, secondary metabolites synthesis and carbohydrates metabolism. Number of plant studies confirmed *rolC* role in carbohydrate metabolism, and also showed an impact of *rolC* on the morphophysiological processes (Hanieh Mohajjel-Shoja et al., 2011). These experiments used pTA7002 vector which consisted of *Ar_rolC* gene (the *rolC* gene from *A. rhizogenes* A4 strain) and dexamethasone-induced promoter with viral protein VP16 transcription activation domain. Using this construction as a template, we cloned *Ar_rolC* and its promoter into the destination vector pB7WG2D. New vector carries the *gfp* reporter gene, as well as a selective marker *bar* (resistance to ammonium glufosinate), which streamlines selection process of plant explants after agrobacterial transformation. Application of *rolC* pB7WG2D_rolC_pDex inducible expression vector optimized our study and experiments design. Using new transformation vector for plant species without T-DNA-like sequences could provide significant evidence of controlled changes in plant metabolism, which will expand our understanding of the *rolC* gene role in the regulation of secondary metabolites synthesis.

This study was supported by a grant from the RFBR 18-016-00118 and conducted using the equipment of the "molecular and cellular technology development" Centre of the SPbSU Research Park.

Создание конструкций для индуцируемой экспрессии *rolC*

Хафизова Г.В., Матвеева Т.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. *rolC* – один из наиболее консервативных генов в Т-ДНК - фрагменте, который агробактерии переносят в растение при трансформации. Функции *rolC* не определены, создание конструкций для индуцируемой экспрессии позволит их уточнить.

Ключевые слова: *rolC*, природно-трансгенные растения, клеточная Т-ДНК

Агробактериальная трансформация растений бактериями семейства *Rhizobiaceae* сегодня является одним из основных способов получения трансгенных растений в лаборатории. Этот метод основан на умении бактерий встраивать в растение фрагмент своей ДНК – Т-ДНК. Однако существуют трансгенные растения, появившиеся в природе без участия человека (Матвеева, Сокоорнова, 2017), - их геномы содержат последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий. Ген *rolC* является одним из наиболее консервативных генов в составе Т-ДНК. Было показано, что у ряда природно-трансгенных растений *rolC* экспрессируется в разных органах и тканях, его функция на сегодня не установлена (Matveeva, 2018). Среди возможных функций *rolC* предполагают: регуляцию уровня цитокининов в растительных тканях, участие в синтезе вторичных метаболитов, и в метаболизме углеводов. Результаты ранее проведенных исследований по изучению активности гена *rolC* подтвердили его роль в углеводном метаболизме, а также показали влияние *rolC* на морфофизиологические процессы растений (Hanieh Mohajjel-Shoja et al., 2011). В данных экспериментах были использованы конструкции на основе вектора pTA7002, содержащие ген *Ar_rolC* (ген *rolC* из штамма *A. rhizogenes* A4) под воздействием дексаметазон-индуцируемого промотора, содержащего активирующий транскрипцию домен вирусного белка VP16. Используя данную конструкцию в качестве матрицы, мы получили фрагмент, включающий *Ar_rolC* и промотор, и переклонировали его в вектор назначения pB7WG2D. Данный вектор содержит репортерный ген *gfp*, а также селективный маркер для растений *bar* (устойчивость к глюфосинату аммония), что облегчает отбор растительных эксплантов, в которые встроилась конструкция, после агробактериальной трансформации. Вектор для индуцируемой экспрессии *rolC* pB7WG2D_rolC_pDex был создан для оптимизации работы по изучению роли гена *rolC* во вторичном метаболизме растений. Использование созданного вектора для трансформации видов, не содержащих Т-ДНК-подобных последовательностей, позволит выявить контролируемые изменения в метаболизме растений, что поможет прояснить участие гена *rolC* в регуляции синтеза вторичных метаболитов.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-016-00118 с использованием оборудования ресурсного центра «РМКТ» СПбГУ.