

## ТРАНСФОРМАЦІЯ *CAMELINA SATIVA* МЕТОДОМ *IN PLANTA*

Як наслідок глобальної залежності від викопного палива в світі постало питання пошуку нових джерел біопалива. На сьогодні значну частку серед поновлюваних моторних палив складає біодизель, який виробляється в основному з ріпакової олії. Інтерес до біопалива спонукав дослідників критично оцінити альтернативні джерела сировини для виробництва біодизеля. Один із способів подолати попит на олії є використання неїстівних олійних рослин. До найбільш затребуваних відносяться: *Camelina sativa* (L.) Crantz, *Jatropha curcas* (L.), *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Brassica carinata* A. Braun та *Vernicia montana* Loug. [1–3]. Серед цих рослин, що не використовуються в харчовій промисловості, рижій посівний *Camelina sativa* L. Cranz (*Brassicaceae*) є найбільш перспективною культурою. До того ж властивості *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре описано [4]. Олія і біодизель з рижію використовували в якості палива у випробуваннях двигуна з багатообіцяючими результатами [4, 5]. Рижій, як скоростигла культура, вирізняється коротким вегетаційним періодом, високою адаптивною здатністю до абіотичних стресових факторів, стійкістю до хвороб та різних шкідників [6–8].

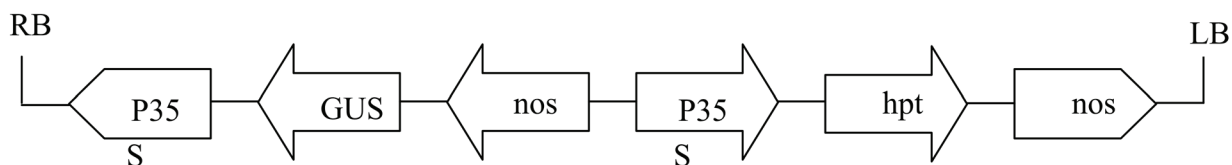
Традиційно покращення певних господарських характеристик олійних культур досягається шляхом селекції або ж з використанням біотехнологічних підходів. Відомо, що різноманітні біотехнологічні методи дозволяють створювати нові високопродуктивні форми та сорти, маніпулювати складом певних компонентів, у тому числі і жирних кислот. Незважаючи на свій потенціал щодо отримання олії, на сьогоднішній день існує всього кілька робіт, що стосуються культивування в умовах *in vitro* та генетичної трансформації рижію посівного [9–11]. Методи, засновані на культурі тканин та їх генетичній трансформації вимагають спеціальних навичок, є трудомісткими та потребують затрат часу та реактивів. Однією із проблем трансформації *in vitro*, яка пов'язана з регенерацією, є химерність отриманих трансформантів і соматональна мінливість. Раніше було запропоновано новий метод трансформації, наз-

ваний трансформація *in planta* [12], розроблений для *Arabidopsis thaliana*, який успішно використовується для трансформації інших представників з родини *Brassicaceae* таких як редька, ріпак, індійська гірчиця [13–17]. З огляду на зазначене вище метою даної роботи було розробити ефективний метод генетичної трансформації *in planta* *C. sativa* для подальшого удосконалення цього виду рослин.

### Матеріали і методи

Як вихідний матеріал використовували насіння рижію посівного (*C. sativa*) сорту Перемога з колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України (люб'язно наданого д.с.-г.н. Д. Б. Рахметовим). Дослідження проводили на дослідних ділянках Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України. Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, що містив векторну конструкцію pGH217 з репортерним геном в-глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину у трансгенних рослин. Схематичне зображення векторної конструкції наведено на рис. 1. Бактерію нарощували у рідкому живильному середовищі LB з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 100 мг/л та рифампіцин 50 мг/л) за температури 28 °C і постійному помішуванні на орбітальному шейкері ( $OD_{600} \approx 1,5$ ). Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 4500 об/хв протягом 10 хв, далі ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності  $OD_{600} = 1,0$ . До суспензії додавали 200 мкМ ацетосирінгону для підвищення ефективності інфікування агробактерією. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення всіх квіток у суспензійну культуру агробактерії на 10–15 сек та покривали поліетиленовими плівками для створення умов з підвищеною вологістю. Рослини витримували протягом 24 год в умовах підвищеної вологості.

Для визначення селективної концентрації гігromіцину насіння нетрансформованих рослин *C. sativa* сорту Перемога висівали в чашки Пе-



**Рис. 1.** Схема конструкції рGH217: LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК, P35S – 35S промотор ВМЦК, *GUS* – ген в-глюкуронідази, *nos* – нопаліновий термінатор, *hpt* – ген стійкості до гігromіцину

трі на фільтрувальний папір, зволожений водним розчином гігromіцину в концентраціях 0, 5, 10, 15, 20 мг/л. Для кожного дослідження використовували не менше 30 насінин, дослідження проводили в трьох повторах. Насіння пророщували в умовах культуральної кімнати за температури + 23 °С.

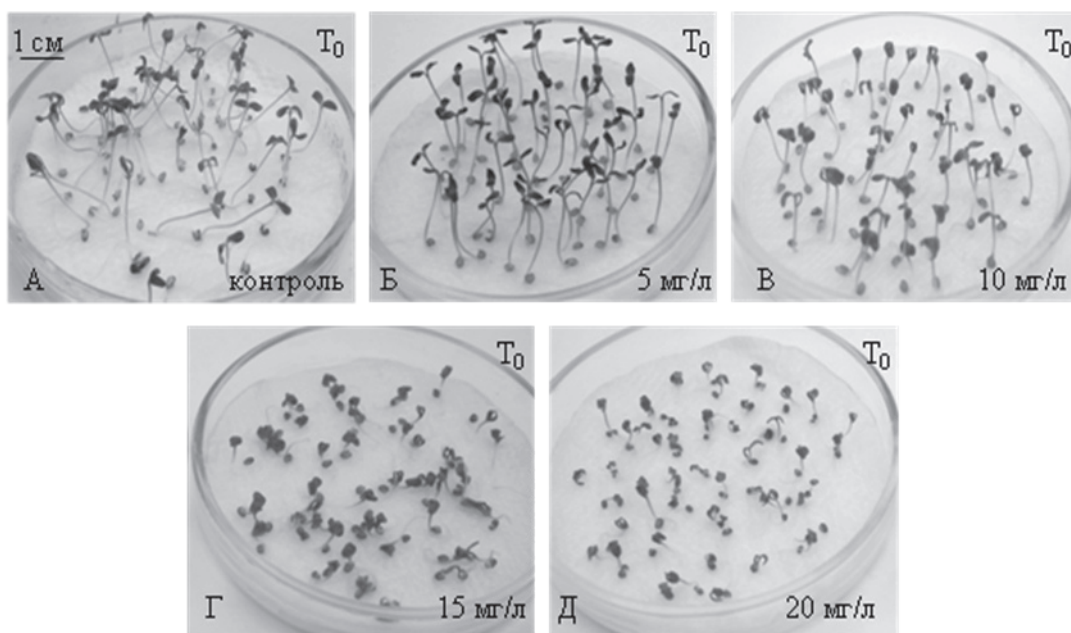
Для молекулярно-генетичного аналізу тотальну ДНК екстрагували із свіжого листа СТАВ-методом [18]. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували наступну пару праймерів: *uideA1* (5'-CAGGAAGTGATGGAGCATCAG - 3') та *uideA2*: 5'-TCGTGCACCATCAGCACGTTA -3' [19]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг ДНК, по 0,2 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 одиниці Taq-полімерази (Реплікон, Росія). Ампліфікацію проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems", США) за наступною схемою: початкова денатурація при 94 °С, 5 хв; ампліфікація – 30 циклів (94 °С – 35 с, 62 °С – 1 хв, 72 °С – 45 с); кінцева елонгація – 72 °С, 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі в 1xTBE-буфері в присутності етидії броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use, "Fermentas" (Литва), та 1Kb Plus DNA Ladder, "Invitrogen" (США).

### Результати та обговорення

Метод трансформації *in planta* дозволяє уникнути вирощування культури *in vitro* і регенерації рослин. Більше того ріст і розвиток рослин, після агроінфекції проходить без селективного тиску. Селекція потрібна тільки для ідентифікації трансгенного насіння в загальній масі зібраного насіння [20, 21]. Відомо, що селекція є важливим етапом в трансформації рослин і визначення рівня селективного тиску – це один з основних факторів, який вирішує ефективність трансформації. Беручи до уваги, що конструкція для трансформації містила ген *hpt*, який забезпечує стійкість до гі-

гromіцину, було проведено серію дослідів для визначення впливу антибіотика на проростання насіння та морфологію проростків рижію посівного, оскільки дані дослідження раніше не проводилися. В контрольних умовах (без антибіотика) спостерігали проростання 100 % повноцінних проростків з насіння. У присутності низьких концентрацій гігromіцину (5 мг/л) спостерігали формування злегка деформованих коренів, і розвиток проростків дещо сповільнювався. Щодо концентрацій 5 та 10 мг/л гігromіцину, то значних відмінностей між проростками не спостерігали, всі вони мали однакову форму та розміри, як видно на рис. 2. При пророщуванні насіння в присутності 15 та 20 мг/л антибіотика було встановлено, що концентрація 20 мг/л є найбільш токсичною для контролю: через 2 тижні всі проростки темніли і гинули. Отже, за результатами тестування на стійкість до селективного агента було встановлено, що критичною концентрацією для відбору трансгенних ліній рижію є 20 мг/л гігromіцину. У попередніх дослідженнях нами було виявлено, що ефективною селективною концентрацією гігromіцину для відбору трансгенних клітин калюсу рижію посівного є 5 мг/л [11].

Для трансформації рижію посівного бактеріальною суспензією було оброблено 50 рослин сорту Перемога на ранній стадії цвітіння. Трансформовані рослини знаходилися на ділянках до повного дозрівання насіння. У результаті проведених досліджень було отримано насіння, яке відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом. Тож, його спочатку перевіряли на стійкість до селективного агента гігromіцину для відбору потенційно трансгенних ліній. Для цього зібране насіння ( $T_1$ ), пророщували на фільтрувальному папері з гігromіцином у концентрації 20 мг/л. Протягом 3–5 діб насіння проростало рівномірно, але вже через тиждень селекції спостерігали, що нетрансформовані проростки на гігromіцині були більш пригнічені у рості, листя скручувалося в той час, як трансформоване насіння мало довші гіпокотили та рівномірні сходи (рис. 3 Б),

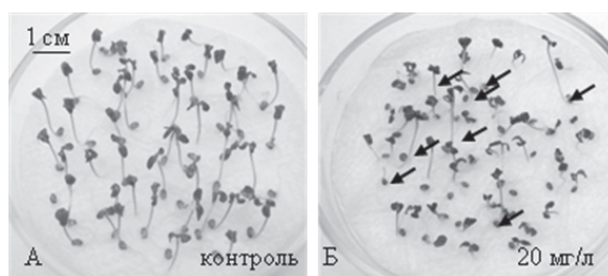


**Рис. 2.** Характер проростання насіння нетрансформованої рослини без антибіотика (А) та у присутності гі-горміцину (Б-Д)

причому у контролі (рис. 3 А) спостерігали проростання всіх насінин.

За попередніми розрахунками нами було встановлено, що майже близько 13 % насіння, отриманого після трансформації *C. sativa* методом *in planta* виявляє стійкість до селективного агента. Це вищий показник частоти трансформації порівняно з тим, що вдалося нами попередньо отримати за використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації цього виду [11]. Нами також було проведено молекулярно-генетичний аналіз частини відібраних трансгенних насінин з використанням праймерів, специфічних до гена в-глюкоронідази. ПЛР-аналіз 30 ймовірно трансгенних рослин показав наявність трансгена у 80 % рослин.

За допомогою методу *in planta* проводилися експерименти по трансформації рижю посівного, однак досліди проводилися в лабораторних умовах з використанням вакуум інфільтрації [10]. Авторам не вдалося отримати трансгенні рослини рижю без додаткової обробки вакуумом (метод «floral-dip»), хоча для багатьох культур, наприклад соняшнику, кукурудзи [22] описано успішні досліди по трансформації без додаткових обробок, тобто трансформація базувалась на простому зануренні квіток (до розкриття) в суспензію агробактеріальних клітин. Хоча при порівнянні обох методів для трансформації арабідопсису отримано рівнозначні результати [23]. Незважаючи на те, що метод генетичної трансформації рос-



**Рис. 3.** Характер проростання насіння  $T_1$  трансформованої рослини без антибіотика (А) та у присутності гі-горміцину (Б)

лин *in planta* є набагато простішим, ніж класичний *Agrobacterium*-опосередкований метод трансформації *in vitro*, оскільки не потребує ряду маніпуляцій, пов'язаних з введенням в культуру, однак для даного методу є важливими декілька факторів, насамперед це стадія розвитку рослини і будова квітки, тривалість контакту рослинних тканин з агробактерією, використання індукторів генів вірулентності, генотип рослини [24]. Слід зазначити, що температура навколишнього середовища може мати вирішальне значення на перебіг процесу трансформації і суттєво впливати на його ефективність [25]. Тому, незважаючи на отримані результати, необхідно провести ряд аналізів для оптимізації протоколу з метою підвищення ефективності та дослідження впливу різних факторів на процес трансформації.

## Висновки

Отже, в результаті проведеної генетичної трансформації методом *in planta* відібрано стійке до селективного агента гігросцину насіння ри-

жію посівного сорту Перемога. Молекулярно-генетичний аналіз відібраних насінин показав наявність перенесеного гена, що забезпечує стійкість до даного антибіотика.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Becker H.C., Loptien H., Rubbelen G., Gymez-Campo C. 13 Breeding: An overview // In: developments in plant genetics and breeding. – 1999. – P. 413–460.
2. Chen Y.H., Chen J.H., Chang C.Y., Chang C.C. Biodiesel production from tung (*Vernicia montana*) oil and its blending properties in different fatty acid compositions. // Bioresour. Technol. – 2010. – 101, N 24. – P. 9521–9526.
3. Azam M., Waris A., Nahar N.M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India // Biomass Bioenerg. – 2005. – 29. – P. 293–302.
4. Frohlich A., Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production // Ind. Crop. Prod. – 2005. – 21. – P. 25–31.
5. Bernardo A., Howard-Hildige R., O'Connell A., Nichol R., Ryan J., Rice B., Roche E., Leahy J.J. Camelina oil as a fuel for diesel transport engines // Ind. Crop. Prod. – 2003. – 17. – P. 191–197.
6. Putnam D., Budin J., Field L., Breene W. *Camelina*: a promising low-input oilseed. In: Janick J., Simon J (eds) // New crops. – Wiley, New York, 1993. – P. 314–322.
7. Gehringer A., Friedt W., Luhs W., Snowdon R.J. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*) // Genome. – 2006. – 49. – P. 1555–1563.
8. Peccia P., Russo R., Brambilla I., Reggiana R., Mapelli S. Biochemical seed traits of *Camelina sativa* – an emerging oilseed crop for biofuel: environmental and genetic influences // J. Crop Improv. – 2014. – 28. – P. 465–483.
9. Tattersall A., Millam S. Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa* // Plant Cell Tiss Org. – 1998. – 55. – P. 147–149.
10. Lu C., Kang J. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediate transformation // Plant Cell Rep. – 2008. – 27, N 2. – P. 273–278.
11. Емец А.И., Бойчук Ю.Н., Шиша Е.Н., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro*, регенерация и генетическая трансформация рыжика посевного (*Camelina sativa*) // Цитология и генетика. – 2013. – 47, № 3. – С. 14–20.
12. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 1998. – 16. – P. 735–743.
13. Qing C.M., Fan L., Lei Y., Bouchez D., Tourneur C., Yan L., Robaglia C. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *Chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration // Mol. Breed. – 2000. – 6. – P. 67–72.
14. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // Transgenic Res. – 2001. – 10. – P. 363–371.
15. Wang W.C., Menon G., Hansen G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants // Plant Cell Rep. – 2003. – 22. – P. 274–281.
16. Inan G., Zhang Q., Li P., Wang Z., Cao Z., Zhang H., Zhang C., Quist T.M., Goodwin S.M., Zhu J., Shi H., Damsz B., Charbaji T., Gong Q., Ma S., Fredricksen M., Galbraith D.W., Jenks M.A., Rhodes D., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Joly R.J., Bressan R.A., Zhu J.K. Salt cress *A. halophyte* and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles // Plant Physiol. – 2004. – 135. – P. 1718–1737.
17. Chhikara S., Chaudhary D., Yadav M., Sainger M., Jaiwal P. A non-tissue culture approach for developing transgenic *Brassica juncea* L. plants with *Agrobacterium tumefaciens* // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2012. – 48. – P. 7–14.
18. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. – New York: John Wiley, 1987. – P. 431–433.
19. Becker D., Bretschneider R., Lurtz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue // Plant J. – 1994. – 5. – P. 299–307.
20. Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S., Maba B., Vezon D., Voisin R., Pelletier G. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. – 2000. – 155. – P. 1875–1887.
21. Desfeux C., Clough S.J., Bent A.F. Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method // Plant Physiol. – 2000. – 123. – P. 895–904.
22. Матвеева А.Ю., Комисаренко А.Г. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду с РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // VII международная конференция молодых ученых и специалистов, ВНИИМК. – 2013. – С. 145.
23. Викторэк-Смагур А., Хнатушко-Конка К., Кононович А.К. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация // Физиол. раст. – 2009. – 56, № 4. – С. 619–628.
24. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. Invited review: factor influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2004. – 40. –P. 31–45.
25. Горбатюк І.Р., Бавол А.В., Моргун Б.В. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подолянка та ярого сорту Bobwhite // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К., 2014. – 15. – С. 35–39.

**BOYCHUK YU.M.<sup>1</sup>, BAYER O.O.<sup>1</sup>, BAYER G.YA.<sup>1</sup>, RAKHMETOV D.B.<sup>2</sup>, BLUME YA.B.<sup>1</sup>, YEMETS A.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyповs'koho str., 2a, e-mail: boychuk.yulia@gmail.com*

<sup>2</sup> *M.M. Grishko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Timiryazevska str., 1, e-mail: jamal\_r@bigmir.net*

### **TRANSFORMATION OF *CAMELINA SATIVA* BY *IN PLANTA* METHOD**

**Aims.** The aim of the study was to develop an efficient method of genetic transformation of *C. sativa in planta* for further improvement of this plant species. **Methods.** Used a strain of *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, containing vector construction pGH217 of the reporter gene  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) controlled 35S promoter of cauliflower mosaic virus and nos-terminator, and selective marker gene *hpt*. **Results.** It was found that almost 13 % of seeds obtained after transformation of *C. sativa in planta* method were resistant to the selective agent. The selective hygromycin concentration to pick up transgenic false flax lines is 20 mg/l. **Conclusion.** As a result of *in planta* transformation a hygromycin-resistant *C. sativa* seeds were produced. Molecular analysis confirmed the transgenic nature of selected lines.

**Keywords:** transformation, *C. sativa*, *in planta*.