

ВПЛИВ ІНГІБИТОРУ ТИРОЗИНОВИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ ГЕНІСТЕЇНУ НА АГРОБАКТЕРІАЛЬНУ ТРАНСФОРМАЦІЮ РОСЛИН

Трансформація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* має очевидні переваги перед іншими поширеними методами трансформації рослин, такими як біобалістичний, електропорація та мікроін'єкція. Агробактеріальний метод трансформації дозволяє вводити в рослину великі за розміром генетичні конструкції, що призводить до мінімальних порушень у послідовності гена, що переноситься, а також не вимагає застосування спеціального устаткування. Взаємодія між агробактерією та рослиною регулюється різноманітними хімічними сигналами, що можуть впливати на вірулентність бактерії, однак молекулярні механізми цього явища до сих пір остаточно не з'ясовані [1]. Тому, на сьогоднішній день вдосконалення методу агробактеріальної трансформації та підвищення її ефективності залишається актуальним питанням.

Нещодавно було показано, що використання трифлюоперазину – інгібітору серин/треонінових протеїнказ, значно підвищує частоту агробактеріальної трансформації ембріоїдів сосни білої [2]. Нами також було досліджено вплив трифлюоперазину на частоту агробактеріальної трансформації квіткових рослин, а саме тютюну [3]. Зокрема, було виявлено, що додавання інгібітору до середовища для ко-культивування експлантів з бактерією у концентрації 10 мкМ призводить до підвищення частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну на 24–25 %. У рамках цього дослідження нами, також, було вивчено вплив іншого інгібітору серин-треонінових протеїнказ – W7 [4]. Було встановлено, що додавання інгібітору до середовища для ко-культивування у концентрації 25 мкМ призвело до значного підвищення частоти регенерації та швидкості росту рослин-регенерантів у порівнянні із контролем. Тому актуальним є дослідження впливу ряду інших інгібіторів протеїнказ на генетичну трансформацію рослин. Зокрема, в даній роботі представлено результати вивчення впливу інгібітору тирозинових протеїнказ, геністеїну, на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *Nicotiana tabacum*.

Матеріали і методи

Матеріали і методи

Для введення в культуру *in vitro* як вихідний матеріал використовували насіння *N. tabacum*. Пророщування насіння та культивування рослин проводили на безгормональному середовищі МС [5] протягом одного місяця.

Як експланти для агробактеріальної трансформації використовували молоді листочки *N. tabacum* площею 1,5–2,5 см². Для дослідження впливу інгібітору протеїнказ на підвищення ефективності агробактеріальної трансформації у роботі використовували інгібітор тирозинових протеїнказ, геністеїн (Sigma, США), який додавали до середовища для ко-культивування із агробактерією. Інгібітор розчиняли у воді, маточний розчин (10 мМ) зберігали в морозильній камері при –20 °С. У роботі було вивчено вплив широкого діапазону концентрацій геністеїну: від 1 до 100 мкМ.

Для генетичної трансформації було використано штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*, який містив плазмиду рGH217 с репортерним геном β-глюкоронидази (*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 трансформантів. Плазміда була люб'язно надана к.б.н. В.В. Радчуком (Інститут генетики рослин і дослідження культурних рослин, Гатерслебен, Німечина) (рис. 1). Перенесення генетичної конструкції рGH217 у суперві-

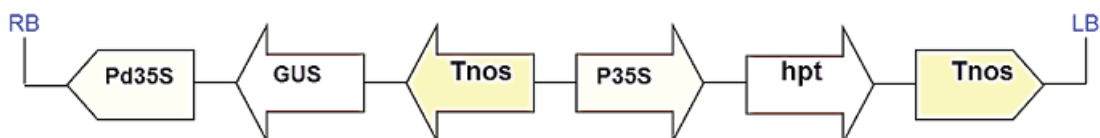


Рис. 1. Схема конструкції рGH217: LB і RB – ліва та права границі Т-ДНК, P35S – 35S промотор ВМЦК, GUS – ген β-глюкоронидази, *nos* – нопаліновий термінатор, *hpt* – ген стійкості до гігromіцину

рулентний штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* здійснювали згідно методу [6].

Після ко-культивування з агробактерією в присутності інгібітору геністеїну експланти переносили на середовище МС, що містило 1 мг/л 6-бензилоамінопурину (БАП) (Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) (Sigma, США), доповнене 5 мг/л гігromіцину та 400 мг/л цефатоксиму для елімінації агробактерії строком на 7 днів. Далі їх переносили на аналогічне за складом середовище, але без цефатоксиму.

Для вибору селективної концентрації гігromіцину попередньо було досліджено вплив різних концентрацій (1–15 мг/л) цього антибіотика на життєздатність експлантів.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин та детекції експресії гена-інтересу було проведено молекулярно-генетичний аналіз. Зі зразків відселектованих на гігromіцині ліній тютюну, була виділена геномна ДНК, яку використовували в якості матриці для отримання ланцюгів κДНК. Присутність послідовності гена *gus* у синтезованій κДНК фіксували за допомогою ПЛР аналізу. При ампліфікації були використанні відповідні праймери до *gus* гена, та отримано фрагменти розміром 634 п.н., що відповідають позитивному контролю (конструкції рGH217) [7].

Результати та обговорення

Для визначення будь-якого негативного впливу інгібітору геністеїну спочатку було досліджено дію його різних концентрацій на регенерацію листових експлантів *N. tabacum*. Було виявлено, що при додаванні інгібітору до середовища для регенерації рослин в низьких мікромольних концентраціях 1 та 5 мкМ частота регенерації експлантів складала близько 40 % та 60 % відповідно, в той час як при додаванні до даного середовища інгібітору в більш високих концентраціях: 10, 25, 50 та 100 мкМ, частота регенерації пагонів складала 100 %, у порівнянні із контролем, що становив 98 %.

Далі було перевірено вплив різних концентрацій геністеїну на частоту стабільної агробактеріальної трансформації тютюну. Оскільки показники частоти регенерації експлантів у присутності інгібітору у концентраціях 1 та 5 мкМ були меншими за контроль, у подальших дослідженнях зі стабільної трансформації з цими концентраціями інгібітору не проводилися. При додаванні до середовища для ко-культивування геністеїну у концентраціях 10, 25 та 50 мкМ частота трансформації складала 20, 60 та 80 %, відповідно, а при концентрації 100 мкМ – 85 %. У той час як частота трансформації контролю, без використання інгібітору, становила 75 % (рис. 2).

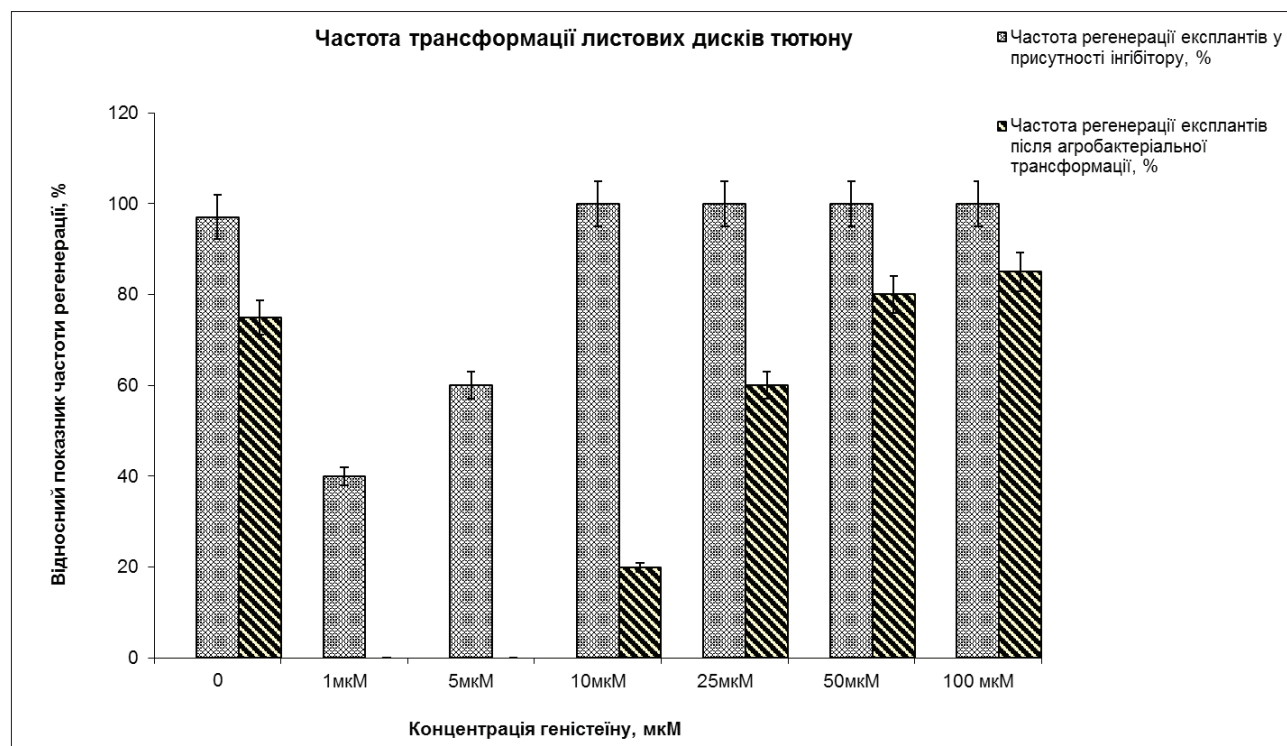


Рис. 2. Вплив різних концентрацій геністеїну на частоту регенерації експлантів

Після ко-культивування експланти перенесли на середовища МС, доповнене 5 мг/л гігromіцину. Для вибору селективної (LD_{50}) концентрації гігromіцину, попередньо було досліджено вплив різних концентрацій гігromіцину (1–15 мг/л) на життєздатність експлантів та встановлено, що саме концентрація 5 мг/л цього антибіотика є найбільш ефективною для селекції трансгенних ліній *N. tabacum*.

Тож, було встановлено, що найбільш ефективними концентраціями інгібітору тирозинових протеїназ для підвищення частоти агробактеріальної трансформації листових експлантів тютюну була концентрація: 100 мкМ. Результати досліджень демонструють зростання ефективності трансформації на 10 %. Тоді як при аналогічних наших дослідженнях з використанням інгібітору серин-треонінових протеїназ, трифлюоперазину, за концентрації 10 мкМ *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну підвищувалась на 24–25 % [3]. А при додаванні до середовища для ко-культивування інгібітору серин – треонінових протеїназ, W7, у концентрації 25 мкМ частота трансформації не перевищувала контроль, проте значно підвищувалися швидкість росту рослин-регенерантів. Зокрема, за викори-

стання цієї концентрації при проведенні агробактеріальної трансформації рослини-регенеранти в 2–2,5 рази швидше росли в довжину, ніж контроль

Також нами було проведено генетично-молекулярний аналіз за допомогою ПЛР отриманих зразків, що підтвердив їх трансгенну природу.

Висновки

Нами вперше було досліджено вплив геністеїну на частоту агробактеріальної трансформації тютюну. У результаті проведених експериментів було продемонстровано, що використання інгібітору тирозинових протеїназ, зокрема, геністеїну, може суттєво підвищувати ефективність агробактеріальної трансформації листових експлантів *N. tabacum*. Було досліджено вплив різних концентрацій цього інгібітору в межах від 1 до 100 мкМ та встановлено найбільш ефективну його концентрацію (100 мкМ) для агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну, при якій частота трансформації підвищувалась на 10 %. Оскільки частота трансформації без використання інгібітору (контроль) становила 75 %.

ЛІТЕРАТУРА

1. Nam J., Matthyse A.G., Gelvin S.B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration // *Plant Cell*. – 1997. – 9. – P. 317–333.
2. Tang W., Lin J., Newton R. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine // *Plant Cell Rep.* – 2007. – 26. – P. 673–683.
3. Федорчук В.В., Танасієнко І.В., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Інгібітор Ca^{2+} -залежних протеїназ трифлюоперазин підвищує ефективність агробактеріальної трансформації тютюну // *Доповіді НАН України*. – 2014. – № 11. – С. 112–118.
4. Федорчук В.В., Ємець А.І. Вплив інгібітору серин-треонінових протеїназ W7 на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію рослин [Електронний ресурс] // *Науковий Вісник НУБіП*. – 2015, прийнято до друку.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
6. Wise A.A., Liu Z., Binns A.N. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium* // *Meth. Mol. Biol.* – 2006. – 343. – P. 43–53.
7. Jefferson R., Kavanagh T., Bevan M. GUS fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *The EMBO Journal*. – 1987. – 6. – P. 3901–3907.

FEDORCHUK V., YEMETS A.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: nikafedorchuk@gmail.com*

**INFLUENCE OF TYROSINE PROTEINE KINASES INHIBITOR, GENESTEIN, ON
AGROBACTERIUM – MEDIATED PLANT TRANSFORMATION**

Aims. *Agrobacterium*-mediated method of DNA transfer allows to introduce in plant a big genetic construction with minimum effect on transferable gene sequence, and also it does not require special equipment. The interaction between plant and *agrobacterium* is regulated by a variety of chemical signals that can effect on the bacterial virulence, however, molecular mechanism of this still unclear. Therefore, improving *agrobacterial* transformation method and increasing its efficiency remain extremely important. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated method of DNA transfer was used to investigate the effect of genestein on transformation frequency. **Results.** In our study was investigated an influence of a set of genestein concentrations in the range from 1 to 100 μM on transformation frequency was investigated. We observed 20, 60, 80, and 85 % transformation frequency, when inhibitor was applied at concentrations 10, 25, 50, and 100 μM , correspondingly. It should be noted that transformation frequency of control plants was 75 %. **Conclusions.** The influence of different concentrations of tyrosine protein kinases inhibitor genestein on frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* leaf explants was investigated. It was established that the addition of 100 μM genestein into the medium for co-cultivation with *agrobacteria* led to the increase of the transformation rate up to 85 %, while the control was within 75 %.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation, tyrosine protein kinase inhibitor, *Nicotiana tabacum*.