ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

11 • 2014

БІОХІМІЯ

УДК 606.57.08

В. В. Федорчук, І. В. Танасієнко, академік НАН України **Я. Б. Блюм, А. І. Ємець**

Інгібітор Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ, трифлюоперазин, підвищує ефективність агробактеріальної трансформації тютюну

Вперше досліджено вплив різних концентрацій інгібітора Ca^{2+}*-кальмодулінзалежної протеїнкінази, трифлюоперазину, на ефективність агробактеріальної трансформації листкових експлантів Nicotiana tabacum. Встановлено, що використання трифлюоперазину в концентраціях 10 й 25 мкмоль/л призводить до підвищення частоти трансформації до 98%, що на 25% вище порівняно з контролем. Також нами було проведено серію експериментів по підбору умов агробактеріальної трансформації штамом AGL1, що містив плазміду pGH217, та визначено найбільш ефективну методику генетичної трансформації.*

Генетична трансформація рослин є потужним сучасним інструментом, який набуває все більш широкого поширення і застосування як у фундаментальних дослідженнях у біології рослин, зокрема в галузі функціональної геноміки, так і в практичних розробках з метою отримання різних ліній з новими ознаками, що дає змогу обминати обмеження традиційної селекції рослин, спрямованої на їх покращення [1]. Проте, незважаючи на велику кількість методів доставки рекомбінантної ДНК у рослинні клітини як прямих, так і опосередкованих, перенесення генів за допомогою *Agrobacterium* є найусталенішим методом трансформації більшості видів рослин [2]. У порівнянні з іншими методами генетичної трансформації рослин, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація має ряд переваг, які базуються насамперед на можливості переносу великих фрагментів ДНК, інсерації всього кількох копій генів при мінімальній реорганізації геному, а також економічній доступності методу [1, 2]. Не в останню чергу цей метод трансформації забезпечує й оптимальні можливості для сегрегації маркерних селективних генів у отриманих трансформантів [3].

Поряд з цим добре відомо, що не лише різні генотипи рослин, а навіть експланти однієї і тієї лінії рослин, потребують добору індивідуальних умов трансформації, до того ж існує цілий ряд факторів різної природи, що зумовлюють ефективність агробактеріальної трансформації [4]. Тому на сьогодні продовжуються роботи з вдосконалення методів генетичної

© В. В. Федорчук, І. В. Танасієнко, Я. Б. Блюм, А. І. Ємець, 2014

трансформації за допомогою *Agrobacterium* та пошук нових чинників, які могли б сприяти підвищенню ефективності отримання трансгенних ліній рослин. Зокрема, розробка таких нових методичних підходів все більше базується на поглибленому розумінні молекулярних механізмів утворення індукованих агробактеріями пухлин у трансформованих рослин та залучення до цього процесу сигнальних внутрішньоклітинних каскадів [5].

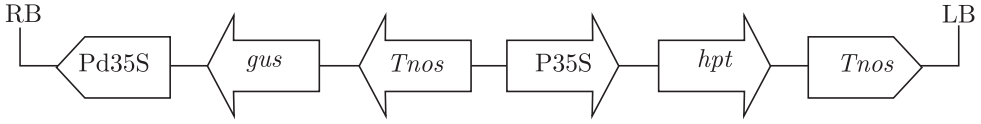
Використання інгібітора протеїнкіназ — трифлюоперазин (трифтороперазин) — значно підвищує ефективність агробактеріальної трансформації ембріоїдів сосни білої [6]. Відомо [7], що ця речовина інгібує активність Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ, у тому числі рослинного походження. Слід відзначити, що в рослинних клітинах Ca^{2+}-залежні протеїнкінази відіграють надзвичайно важливу регуляторну роль у порівнянні з тваринною клітиною і тому представлені як широким спектром Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ, так і Ca^{2+}-кальмодулінзалежних протеїнкіназ та протеїнкіназ, подібних до Ca^{2+}-залежних, фосфоліпід-стимульованих протеїнкіназ рослинного походження [8, 9]. Ці типи протеїнкіназ повною мірою залучені до регуляції клітинного циклу у рослин та відіграють важливу роль у регуляції структури базових елементів цитоскелета, в тому числі і мікротрубочок [10]. Впливаючи біохімічно на такі важливі сигнальні системи рослинної клітини, можна досягти змін у ефективності агробактеріальної трансформації, тому дослідження впливу інгібіторів різних типів протеїнкіназ на ефективність трансформації рослин є окремим актуальним біотехнологічним питанням. Враховуючи наведені вище результати, нами було поставлено за мету вивчити вплив трифлюоперазину як інгібітора Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дводольних рослин.

Досліди проводили з використанням тканин асептичних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* (L.). Для введення в культуру *in vitro* як вихідний матеріал використовували насіння *N. tabacum*. Насіння стерилізували у 5%-у розчині гіпохлориту натрію впродовж 10 хв з подальшим триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді [11]. Пророщування насіння та культивування рослин проводили на безгормональному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [12] впродовж одного місяця.

Для оцінки регенераційного потенціалу тютюну механічно пошкоджені експланти молодих листків (листові диски) тютюну розміром 1,5–2,5 $см^2$ висаджували на середовище МС, яке містило 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) (“Sigma”, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) ((“Sigma”, США). У кожну чашку Петрі висаджували по п’ять листових дисків, загалом було проаналізовано по 125 експлантів. Частоту регенерації визначали через три тижні після початку культивування як співвідношення експлантів з регенерованими пагонами до загальної кількості висаджених експлантів.

Для генетичної трансформації *Agrobacterium tumefaciens* використовували її штам AGL1, який містив плазмід pGH217 з репортерним геном β-глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і нопалінового термінатора (*nos*), а також селективний маркерний ген (*hpt*), що забезпечує стійкість трансформантів до гігроміцину.

Схема конструкції pGH217 представлена таким чином:



(тут LB й RB — ліва й права границі Т-ДНК, P35S — 35S промотор ВМЦК).

Плазміда була люб'язно надана доктором В. Радчуком (Інститут генетики рослин і дослідження культурних рослин, Гатерслебен, Німечинна). Перенесення векторної конструкції pGH217 у супервірулентний штам AGL1 *A. tumefaciens* здійснювали методом, описаним у статті [13]. Для цього нічну культуру агробактерії вирощували в 50 мл рідкого середовища LB, доповненого 100 мг/л спектиноміцину та 50 мг/л ріфампіцину, при постійному струшуванні на шейкері при 28 °C.

Умови агробактеріальної трансформації листових дисків штамом AGL1 визначали шляхом оцінювання оптичної щільності агробактерії (OD_{600}) та тривалості її ко-культивування з експлантами. Для цього бактерію осаджували центрифугуванням (14 000 об/хв) впродовж 5 хв, супернатант видаляли, а осад перед інокуляцією ресуспендували рідким середовищем МС до досягнення оптичної щільності бактерії у межах 0,3–0,5. Тривалість ко-культивування експлантів з агробактерією становила від 24 до 72 год.

З метою оцінки впливу інгібування активності Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ на ефективність трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*, використовували трифлюоперазин (10-[3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]-2-(трифторометил)-10*H*-фенотіазин) ("Sigma", США), для чого готували його маточний водний розчин концентрацією 10 ммоль/л, який зберігали при −20 °C. Для оцінки впливу трифлюоперазину на ефективність регенерації листових експлантів *N. tabacum* його додавали в середовище для регенерації пагонів концентрацією 10–300 мкмоль/л. Частоту регенерації пагонів визначали через чотири тижні у присутності вказаних концентрацій трифлюоперазину, вплив останнього на ефективність генетичної трансформації оцінювали шляхом додавання його до середовища для ко-культивування експлантів з агробактерією концентрацією 10–300 мкмоль/л. Відповідно було протестовано тривалість дії інгібітора під час ко-культивування в діапазоні від 10 хв до 48 год. Контрольні зразки ко-культивували з агробактерією при відсутності трифлюоперазину.

Після ко-культивування експланти переносили на середовище МС, яке містило 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти, 5 мг/л гігроміцину та 400 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії, терміном на 7 діб. Потім їх пересаджували в аналогічне за складом середовище, але без цефотаксиму. Попередньо для вибору селективної концентрації гігроміцину ("Duchefa", Німечинна) досліджували його вплив у різних концентраціях (1–15 мг/л) на життєздатність експлантів після трьох тижнів їх культивування в присутності даного селективного агента.

Для гістохімічного визначення експресії репортерного гена *gus* у тканинах *N. tabacum* після агробактеріальної трансформації використовували 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкоронід (X-Gluc) ("Sigma", США). У результаті реакції з даним субстратом в області локалізації ферменту в трансгенних клітинах утворювався осад синього кольору [14]. Для оцінки GUS-експресії через 3 доби після проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації довільно відбирали по 10 експлантів з кожної проби. Далі брали 2,5 мг X-Gluc та змішували з 5 мл буфера (0,1 моль фосфатний буфер, 0,5 ммоль фериціаніду і фероціаніду калію, 1%-й Тритон X-100). Усі розчини зберігали в холодильній камері при −20 °C.

Для детекції GUS-експресії відібрані експланти промивали у фосфатному буфері, підсушували на фільтрувальному папері, після чого додавали розчин X-Gluc та витримували під вакуумом 15 хв. Оброблені тканини інкубували в термостаті при 37 °C впродовж доби. Потім експланти промивали 70%-м етиловим спиртом та залишали в спирті на 3 год для знебарвлення [14]. Висновки про наявність GUS-експресії робили, підраховуючи кількість синіх зон на експлант. Для цього всі листочки підбиралися одного розміру та знаходилися в однакових умовах. GUS-експресію оцінювали візуально, встановлюючи інтенсив-

ність забарвлення в синій колір тканин листка, кількість таких забарвлених зон на листок з подальшим підрахунком середнього показника. Дослідження проводили в трьох повторностях.

У результаті проведених досліджень було підібрано оптимальні умови для введення в культуру *in vitro* вихідного рослинного матеріалу. При дослідженні умов стерилізації на проростання насіння встановлювали оптимальний час його стерилізації 5%-м гіпохлоритом натрію, який становив 10 хв [11]. За таких умов проростання насіння відзначалася на рівні 100% без зараження експериментального матеріалу.

Оскільки частота та ефективність генетичної трансформації, зокрема агробактеріальної, залежить від типу експланту певного виду рослин, обраних для роботи, та їх здатності до ефективної регенерації пагонів або повноцінних рослин, нами попередньо було оцінено регенераційний потенціал листових експлантів *N. tabacum*. Було встановлено, що частота регенерації пагонів з листових дисків становить 97%. У середньому на кожному окремому експланті *in vitro* формувалося чотири рослини-регенеранти.

При дослідженні впливу різних концентрацій трифлюоперазину на регенерацію листкових експлантів тютюну було виявлено, що цей інгібітор Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ у високих концентраціях (200 і 300 мкмоль/л) призводив до некрозу листових дисків через 7 діб після початку їх культивування на середовищі для регенерації пагонів, в той час як після додавання до даного середовища трифлюоперазину в нижчих концентраціях (50, 100 і 150 мкмоль/л) частота регенерації рослин становила 58, 46 і 27% відповідно в порівнянні з контролем. При використанні трифлюоперазину в концентраціях 10 і 25 мкмоль/л частота регенерації дорівнювала 100 і 99% відповідно. Отже, трифлюоперазин у концентраціях 10 і 25 мкмоль/л позитивно сприяв регенерації пагонів, підвищуючи показник її частоти. Під час визначення оптимальної селективної концентрації гігроміцину (досліджували концентрації 1–15 мг/л) було виявлено, що для селекції слід використовувати цей антибіотик концентрацією 5 мг/л. При використанні гігроміцину в цій концентрації листові експланти темніли, на них не відбувалась регенерація пагонів. Також з метою визначення умов для найбільш ефективної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації листових дисків *N. tabacum* штамом AGL1, що містив плазміду pGH217, було проведено вивчення впливу оптичної щільності агробактерії та тривалості її ко-культивування з вихідними екплантами. Виявилось, що оптимальною оптичною щільністю для трансформації було значення $OD_{600} = 0{,}5$, а найефективніший час ко-культивування вихідного матеріалу з бактерією становив 72 год. При цьому частота регенерації пагонів з експлантів на селективному середовищі, яке містило 5 мг/л гігроміцину, досягала 73%.

Далі було проаналізовано вплив різних концентрацій трифлюоперазину на частоту стабільної трансформації *N. tabacum*. Так, при додаванні цього інгібітора до середовища для ко-культивування експлантів з агробактерією в концентраціях 50, 100 і 150 мкмоль/л частота трансформації становила 50, 40 і 20% відповідно, тоді як у присутності інгібітора в концентраціях 10 і 25 мкмоль/л частота трансформації становила 98 і 97% відповідно, у порівнянні з контролем, для якого цей показник був на рівні 73% (рис. 1). Статистичну обробку отриманих даних проводили, згідно з методикою Лакіна (1990).

Таким чином, нами встановлено, що найефективнішими концентраціями трифлюоперазину для поліпшення ефективності агробактеріальної трансформації листкових експлантів тютюну були концентрації 10 і 25 мкмоль/л (рис. 2.). Результати проведених досліджень свідчать про зростання частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації за цих умов на 24–25%.

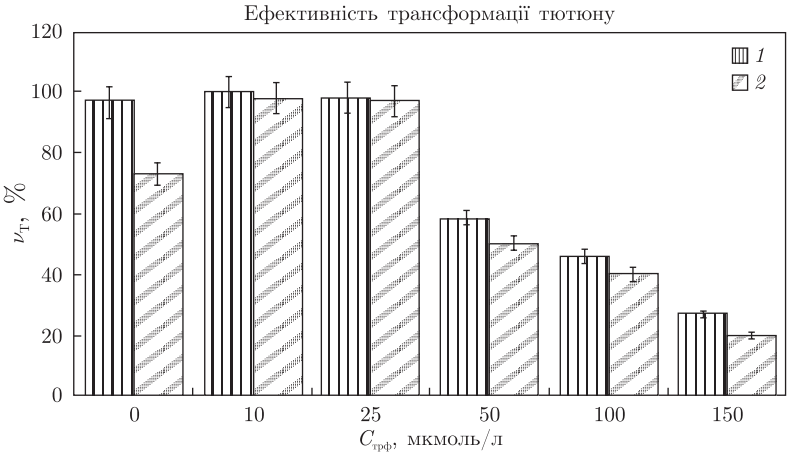


Рис. 1. Частота агробактеріальної трансформації тютюну (ν) при використанні різних концентрацій трифлюоперазину ($C_{трф}$). Ефективність регенерації експланатів: *1* — у присутності інгібітора, %; *2* — після агробактеріальної трансформації, %

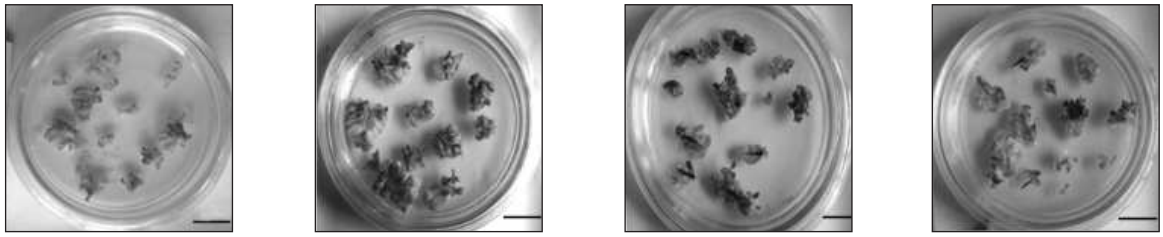


Рис. 2. Регенерація пагонів тютюну після агробактеріальної трансформації за умов використання трифлюоперазину: *а* — контроль; *б* — 10 мкмоль/л; *в* — 25 мкмоль/л; *г* — 50 мкмоль/л. М-б: 1 см = 1 мм

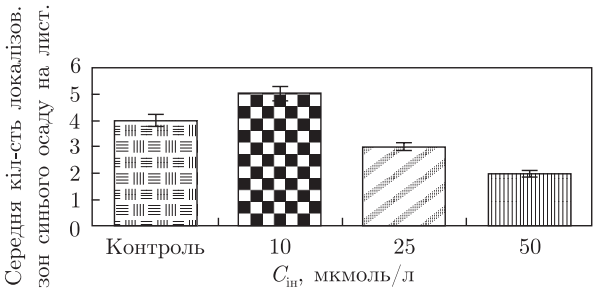


Рис. 3. Інтенсивність транзієнтної експресії гену *gus* після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів *N. tabacum* при використанні різних концентрацій інгібітора трифлюоперазину

На наступному етапі досліджень нами вивчено інтенсивність транзієнтної трансформації *N. tabacum* з використанням найбільш ефективних концентрацій трифлюоперазину, а саме 10, 25 і 50 мкмоль/л (рис. 3). Для цього було проведено гістохімічний аналіз та вивчено транзієнтну експресію гену *gus* у протрансформованих експлантів. Дані оцінювались візуально за площею та інтенсивністю синього забарвлення, що формувався в результаті реакції β-глюкуронідази з субстратом X-Gluc [14].

Найбільш інтенсивну, у порівнянні з контролем, *gus*-експресію спостерігали за умов присутності трифлюоперазину концентрацією 10 ммоль/л, у той час як при його використанні

в концентраціях 25 і 50 ммоль/л фіксували зменшення інтенсивності експресії в 2 і 3 рази у порівнянні з контролем відповідно.

Отримані нами результати дещо відрізняються від тих, що були отримані при дослідженні впливу різних концентрацій трифлюоперазину (від 50–350 мкмоль/л) на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ембріоїдів сосни білої [6]. Авторами цієї роботи було показано, що додавання до середовища для ко-культивування цього інгібітора в концентрації 150 мкмоль/л підвищувало ефективність трансформації сосни у 2,5 раза, в той час як використання такої концентрації для трансформації листових дисків тютюну призводило до інтенсивної некротизації тканин впродовж першого тижня культивування. Ефективними для стабільної трансформації тютюну виявились концентрації 10 і 25 мкмоль/л трифлюоперазину (див. рис. 1, 2), при цьому результати аналізу транзієнтної експресії репортерного гену *gus* вказують на те, що найбільш ефективним є використання лише 10 мкмоль/л трифлюоперазину.

Отже, нами вперше було досліджено вплив трифлюоперазину — інгібітора Ca^{2+}-залежних протеїнкіназ — на частоту *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації покритонасінних на прикладі тютюну як модельного об'єкта. Свого часу під час дослідження диференціальної експресії на початкових етапах агробактеріальної трансформації суспензійної культури клітин *N. tabacum* лінії BY-2 було показано зміни рівня експресії Ca^{2+}-залежної протеїнкінази [15], що може слугувати логічним поясненням отриманих нами результатів. У будь-якому випадку отримання нових доказів того, що використання інгібіторів протеїнкіназ може істотно підвищувати частоту генетичної трансформації у дводольних рослин, свідчить на користь необхідності продовження поглиблених досліджень у цьому напрямі.

1. *Thomson J. A.* Genetic engineering of plants // Encyclopedia of Life Sciences Support Systems // Biotechnology. – 2007. – **3**. – UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK. – http://www.eolss.net.
2. *Barampuram S., Zhang Z. J.* Recent advances in plant transformation // Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology / Ed. J. A. Birchler. – Berlin: Springer, 2011. – Vol. 701. – P. 1–35.
3. *Рукавцова Е. Б., Лебедева А. А., Захарченко Н. С., Бурьянов Я. И.* Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений // Физиол. растений. – 2013. – **60**, № 1. – С. 17–30.
4. *Alimohammadi M., Bagherieh-Najjar M. B. Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors // African J. Biotech. – 2009. – **8** (20). – P. 5142–5148.
5. *Pitzschke A., Hirt H.* New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation // EMBO J. – 2010. – **29**(6). – P. 1–12.
6. *Tang W., Lin J., Newton R.* Okadaic acid and tri?uoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine // Plant Cell Rep. – 2007. – **26**. – P. 673–683.
7. *Polya G. M., Micucci V.* Interaction of wheat germ Ca^{2+}-dependent protein kinases with calmodulin antagonists and polyamines // Plant Physiol. – 1985. – **79**. – P. 968–972.
8. *Wang H., Chevalier D., Larue C. et al.* The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana* // *Arabidopsis* Book. – Rockville. – 2007. – P. 1–38.
9. *Karpov P. A., Nadezhdina E. S., Yemets A. I. et al.* Bionformatic search of plant microtubule – and cell cycle related serine-threonine protein kinases // BMC Genomics. – 2010. – **11** (Suppl. 1). – P. 14.
10. *Шеремет Я. О., Ємець А. І., Віссенберг К. та ін.* Влияние ингибиторов серин/треонин протеинкиназ на морфологию корня *Arabidopsis thaliana* и организацию микротрубочек в его клетках // Цитология. – 2010. – **52**, № 5. – С. 389–398.
11. *Gallois P., Marinho P.* Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens* – expression of heterologous genes in tobacco // Methods in Molecular Biology. – Vol. 49. Plant Gene Transfer and Expression Protocols. – Berlin: Springer, 1996. – P. 39–48.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – **15**. – P. 473–497.

13. *Wise A. A., Liu Z., Binns A. N.* Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium* // Methods Mol. Biol. – 2006. – **343**. – P. 43–53.
14. *Jefferson R., Kavanagh T., Bevan M.* GUS fusions β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J. – 1987. – **6**. – P. 3901–3907.
15. *Jiang H., Doerge R. W., Gelvin S. B.* Differential expression of plant genes during the initial stages of *Agrobacterium*-mediated transformation // Plant J. – 2003. – **35**. – P. 219–236.

ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України", Київ

Надійшло до редакції 23.04.2014

В. В Федорчук, И. В. Танасиенко, академик НАН Украины **Я. Б. Блюм, А. И. Емец**

Ингибитор Ca^{2+}-зависимых протеинкиназ, трифлюоперазин, повышает эффективность агробактериальной трансформации табака

Впервые исследовано влияние разных концентраций ингибитора Ca^{2+}*-кальмодулинзависимой протеинкиназы, трифлюоперазина, на эффективность агробактериальной трансформации листовых эксплантов Nicotiana tabacum. Установлено, что использование трифлюоперазина в концентрациях 10 и 25 мкмоль/л приводит к повышению частоты трансформации до 98%, что на 25% выше в сравнении с контролем. Также нами была проведена серияя экспериментов по подбору условий агробактериальной трансформации штаммом AGL1, который содержал плазмиду pGH217, и определена наиболее эффективная методику генетической трансформации.*

V. V. Fedorchuk, I. V. Tanasienko,
Academician of the NAS of Ukraine **Y. B. Blume, A. I. Yemets**

An inhibitor of Ca^{2+}-dependent protein kinases, trifluoperazine, increases the efficiency of agrobacterium-mediated transformation of tobacco

The influence of different concentrations of the inhibitor of Ca^{2+}*-calmodulin-dependent protein kinase, trifluoperazine, on the efficacy of the agrobacterium-mediated transformation of Nicotiana tabacum leaf explants is investigated. It is established that the addition of 10 and 25 μM trifluoperazine into the medium for the co-cultivation with agrobacterium led to increasing the transformation rate up to 98%, that higher by 25% as compared to control. We conducted a series of experiments on the selection of conditions for the agrobacterium-mediated transformation by AGL1 strain that contained plasmid pGH217 and determined the most efficient methodology of genetic transformation.*