

УДК: 577.21:57.085.1:577.233.3:633.11

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка**

I.P.Горбатюк, А.В.Бавол, М.О.Банникова, Б.В.Моргун

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (Київ, Україна)
molgen@icbge.org.ua*

В останні роки все більшої популярності набуває метод генетичної трансформації рослин *in planta* за допомогою агробактерій. Цей метод стає все більш конкурентоздатним по відношенню до «класичного» методу – *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та біолистичної трансформації. В даній роботі доведено можливість отримання генетичних трансформантів пшениці *Triticum aestivum* озимого сорту Подолянка шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. У дослідженні використовували штам АБІ *Agrobacterium tumefaciens*, який містив генетичну конструкцію р014, до складу якої входили послідовності генів *nptII* та *sgfp*. Бактеріальною суспензією було оброблено 24 попередньо кастровані колоси. В результаті подальшого запилення отримано 293 зернівки. Аналіз рослин Т₀ на присутність трансгенів проводили за допомогою ПЛР. Серед проаналізованих 175 рослин Т₀ 9 рослин мали послідовність гена *nptII*, 4 – послідовності генів *nptII* та *sgfp*. Таким чином, виявлено лише 4 рослини, одночасно трансгенні за обома генами (*nptII* та *sgfp*).

Ключові слова: *Triticum aestivum*, генетична трансформація *in planta*, трансгени *nptII* та *sgfp*.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* озимої м'якої пшениці сорта Подолянка**

I.P.Горбатюк, А.В.Бавол, М.О.Банникова, Б.В.Моргун

В последние годы все большую популярность приобретает метод генетической трансформации растений *in planta* с помощью агробактерий. Этот метод становится все более конкурентоспособным по отношению к «классическому» методу – *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in vitro* и биолистической трансформации. В данной работе доказана возможность получения генетических трансформантов пшеницы *Triticum aestivum* озимого сорта Подолянка путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*. В исследовании использовали штам АБІ *Agrobacterium tumefaciens*, который содержал генетическую конструкцию р014, в состав которой входили последовательности генов *nptII* и *sgfp*. Бактериальной суспензией было обработано 24 предварительно кастрированных колоса. В результате дальнейшего опыления получено 293 зерновки. Анализ растений Т₀ на присутствие трансгенов проводили с помощью ПЦР. Среди проанализированных 175 растений Т₀ 9 растений имели последовательность гена *nptII*, 4 – последовательности генов *nptII* и *sgfp*.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, генетическая трансформация *in planta*, *nptII* и *sgfp*.

***Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of bread winter wheat cv. Podolianka**

I.R.Gorbatyuk, A.V.Bavol, M.O.Bannikova, B.V.Morgun

Recently the method of plant genetic transformation *in planta* involving *Agrobacterium* has increasingly become popular. It turned to be more competitive in relation to the “classical” methods – *Agrobacterium*-mediated *in vitro* transformation and biolistic transformation. The possibility to obtain genetic transformants of winter wheat *Triticum aestivum* cv. Podolianka by *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation is proved in this article. In the study we used ABI strain of *Agrobacterium tumefaciens* which contained the binary vector p014 with coding sequences of *nptII* and *sgfp* genes. The bacterial suspension was applied to 24 pre-neutered wheat spikes. After pollination 293 grains were collected. Analysis of Т₀ plants for the presence of transgenes was performed by PCR. Among the 175 analyzed plants 9 showed the presence of *nptII* gene and 4 of them had sequences of both *nptII* and *sgfp* genes.

Key words: *Triticum aestivum*, *in planta* genetic transformation, transgenes *nptII* and *sgfp*.

Вступ

Генетичну трансформацію рослин можна здійснювати багатьма методами, найбільш поширеними з яких є трансформація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes in vitro* (опосередкований перенос генів) та біолістична трансформація (прямий перенос генів). Однак спосіб введення чужорідної ДНК за допомогою агробактерій має суттєві переваги перед іншими методами генетичної трансформації рослин. Його застосування дозволяє використовувати генетичні конструкції відносно великого розміру та призводить до мінімальних порушень у кодуючих послідовностях генів, що переносяться.

Методи генетичної трансформації *in vitro* широко використовуються, але вони мають ряд недоліків: необхідність дотримання асептичних умов вирощування досліджуваного матеріалу; довготривалість експериментів; можливість появи соматоклонів; залежність ефективності трансформації від генотипу досліджуваного об'єкту. При трансформації *in vitro* часто виникають проблеми, пов'язані з регенерацією трансформантів. Так, у однодольних рослин регенерація взагалі обмежена низьким морфогенетичним потенціалом, внаслідок чого отримання фертильних рослин утруднено (Curtis, Nam, 2001). Крім того, цінні трансгенні рослини можуть бути безповоротно втрачені на етапі адаптації до нестерильних умов вирощування, що, в кінцевому рахунку, призводить до зменшення кількості отриманих трансформантів (Subramanyam et al., 2013). Тому тривають пошуки інших (альтернативних або більш досконалих) біотехнологічних методів отримання генетично трансформованих рослин.

На даний час все більш привабливим стає метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, оскільки він дозволяє уникнути використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів, та дозволяє уникнути соматоклональної мінливості, яка зустрічається під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro* (Subramanyam et al., 2013; Чумаков, Моисеева, 2012). Показано, що частота трансформації рису та пшениці за допомогою даного методу є значно вищою у порівнянні з іншими методами генетичної трансформації (Supartana et al., 2005, 2006). Вперше трансформацію *in planta* застосували у роботі з *Arabidopsis* (Feldmann, Marks, 1987). З того часу даний метод трансформації успішно використовують для різних сільськогосподарських культур, включаючи овочеві (редис, помідори і перець) (Curtis, Nam, 2001; Yasmeen et al., 2008; Kumar et al., 2009) та злаки (пшениця, кукурудза, рис) (Supartana et al., 2005; Chumakov et al., 2006; Mamontova et al., 2013; Moiseeva et al., 2014).

З огляду на зазначене вище, метою нашої роботи було отримати трансгенні рослини пшениці *T. aestivum* озимого сорту Подолянка за допомогою модифікованої методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

Матеріали та методи

У дослідженні використовували рослини пшениці, отримані з насіння озимого сорту Подолянка, яке було надане Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України (Гончарук та ін., 2011).

Для проведення трансформації *in planta* обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка (Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009). Проводили кастрування, залишаючи по 12–14 колосочків на колос. На кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу. Через три доби проводили інокуляцію суспензією нічної культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок. Запилення проводили після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії.

У дослідженні використовували штам ABI *Agrobacterium tumefaciens*, який містив генетичну конструкцію p014, до складу якої входили послідовності генів *nptII* (неоміцинфосфотрансферази) та *sgfp* (синтетичний ген зеленого флуоресцентного білку) (рис. 1). Бактерію вирощували у рідкому живильному середовищі Himedia M002 (аналог LB) (Supartana et al., 2006) з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 50 мг/л та канаміцин 100 мг/л) на шейкері протягом 16 годин. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000g 10 хв. і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності $OD_{600}=1,0$ (Чумаков, Моисеева, 2012; Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009; Supartana et al., 2006). До суспензії бактерій додавали 100 мкМ ацетосирінгон (Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009;) та 0,05% сілвет L77 (Silvet L77) (Curtis, Nam, 2001), pH доводили до 4,0.

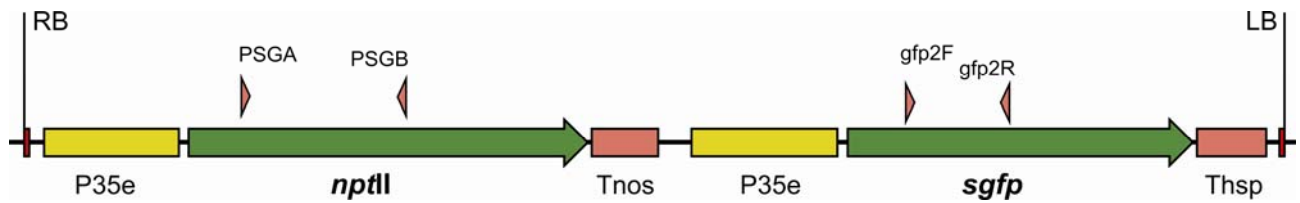


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції p014. Показано кодуючі послідовності генів неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) та зеленого флуоресцентного білку (*sgfp*), підсилений промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (P35e), термінатори нопалінсинтази (Tnos) і білку теплового шоку (Thsp). Для генів *nptII* та *sgfp* показані місця посадки пар праймерів PSGA-PSGB та *gfp2F-gfp2R* відповідно.

Частина насіння пшениці, отриманого після трансформації, висадили у посудини з ґрунтом і культивували в умовах теплиці. Іншу частину вирощували в умовах мікроділянкового досліду.

Рослини покоління T₀ (листя) аналізували на присутність послідовностей генів *nptII*, *sgfp* та вірулентності (*Vir C*) за використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Постановка полімеразно-ланцюгової реакції

Реакційні суміші включали: специфічні праймери (табл. 1), по 2 мкл буфера для ПЛР 10xDreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфата (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q.

Таблиця 1.

Гени, які детектували, послідовності праймерів, довжина очікуваного фрагмента

№ п/п	Гени, які детектували	Нуклеотидні послідовності праймерів, які використовувалися	Довжина очікуваного фрагмента
1.	<i>nptII</i>	PSGA форвардний – 5'-GAG-GCT-ATT-CGG-CTA-TGA-CTG-3' PSGB реверсний – 5'-CAA-GCT-CTT-CAG-CAA-TAT-CAC-G-3' (Demeke et al., 1999)	647 п.н.
2.	<i>sgfp</i>	<i>gfp2F</i> форвардний – 5'-CAG-CGT-GAA-CGG-CCA-CAA-GTT-CA-3' <i>gfp2R</i> реверсний – 5'-CGA-TGC-GGT-TCA-CCA-GGG-TGT-3' (власний дизайн)	311 п.н.
3.	<i>Vir C</i>	VCF форвардний – 5'-ATC-ATT-TGT-AGC-GAC-T-3' VCR реверсний – 5'-AGC-TCA-AAC-CTG-CTT-C-3' (Sawada et al., 1995)	720 п.н.
4.	<i>TaTM20</i> референтний ген	RTF форвардний – 5'-AAG-GGT-TGC-TCC-TCT-TCG-CGA-TCT-TG-3' RTR реверсний – 5'-GTA-CAT-GCC-AGC-ACC-GTA-TGG-ATT-G-3' (Kim et al., 2008)	900 п.н.

Реакції проводили з використанням наступних профілів:

1. ПЛР для визначення трансгену *nptII*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 34 цикли – денатурація 30 с при 94°C, ренатурація 30 с при 60°C, елонгація 40 с при 72°C, фінальна елонгація 5 хв при 72°C. Використовувалась пара праймерів №1 (табл. 1).

2. Мультиплексна низхідна (Touchdown) ПЛР для визначення послідовності гена зеленого флуоресцентного білку (*sgfp*): початкова денатурація 4 хв при 94°C, 7 циклів – денатурація 30 с при 94°C, ренатурація 45 с при 68°C (з кожним циклом температура зменшується на 1°C), елонгація 30 с при 72°C та 25 циклів – денатурація 30 с при 94°C, ренатурація 30 с при 60°C, елонгація 30 с при 72°C, фінальна елонгація 5 хв при 72°C. Використовувались пари праймерів №2 та №4 (табл. 1).

3. ПЛР для визначення наявності бактеріального зараження (ген *Vir C*): початкова денатурація 4 хв при 94°C, 34 цикли – денатурація 30 с при 94°C, ренатурація 30 с при 59°C, елонгація 30 с при 72°C, фінальна елонгація 5 хв при 72°C. Використовувалась пара праймерів №3 (табл. 1).

Реакції ампліфікації проводили в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Scientific) та

Mastercyclergradient (Eppendorf). Продукти ампліфікації розділяли в 1,2% агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

Результати та обговорення

24 колоси озимого сорту Подолянка кастрували, обробляли агробактеріальною суспензією та запиляли пилком, отриманим з іншого колосу тієї ж рослини, відповідно до зазначеної методики. Середня довжина колоса була 5,9 см.

Слід зазначити, що температура навколишнього середовища є важливим фактором, який впливає на перебіг процесу трансформації, а також на його ефективність (Tempe et al., 1977; Moiseeva et al., 2014). Нами встановлено, що для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці сорту Подолянка необхідна температура +18–20°C (Горбатюк та ін., 2014). В даному досліді температурні показники були оптимальними для трансформації пшениці сорту Подолянка і становили +17–18°C.

Після завершення вегетаційного періоду отримано 293 насінини з 620 прокастрованих та оброблених агробактеріальною суспензією колосків. Таким чином, середня зав'язуваність насіння складала 46,4±2,4 %.

Отримане насіння відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом (рис. 2).



Рис. 2. Типовий колос та насіння, отримане після обробки *in planta* агробактеріальною суспензією

Все отримане насіння T_0 було висіяно у ґрунт. Частина зерен T_0 висаджували у вегетаційні посудини і культивували в умовах теплиці за температури +22°C і 16-годинного фотоперіоду (126 зерен), а іншу вирощували в умовах мікроділянкового досліду (167 зерен). Загалом отримано 120 паростків (в умовах теплиці) та 55 паростків в умовах мікроділянкового досліду. Після того як рослини T_0 досягли фази двох листків, частину одного з листків зрізали для проведення ПЛР-аналізу.

Серед проаналізованих 175 рослин T_0 тільки у дев'яти виявлено позитивний сигнал присутності послідовності гену *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. (рис. 3).

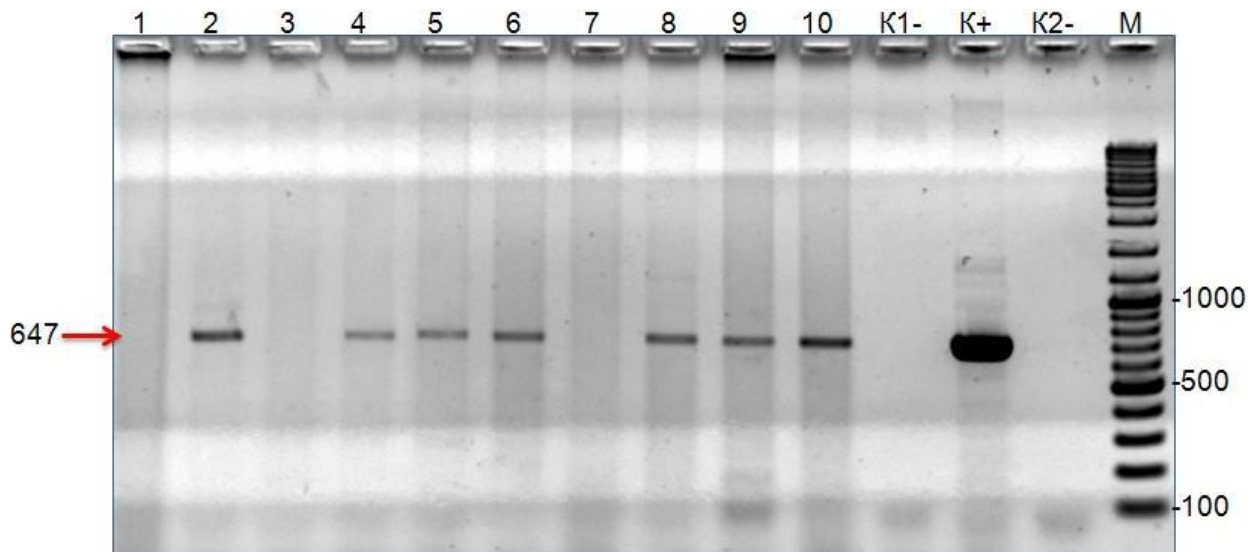


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гену *nptII*. Доріжки 1–10 – досліджувані проби, K1- – ДНК нетрансформованої пшениці сорту Подольнка у якості негативного контролю, K+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K2 – негативний контроль – ТЕ буфер, M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

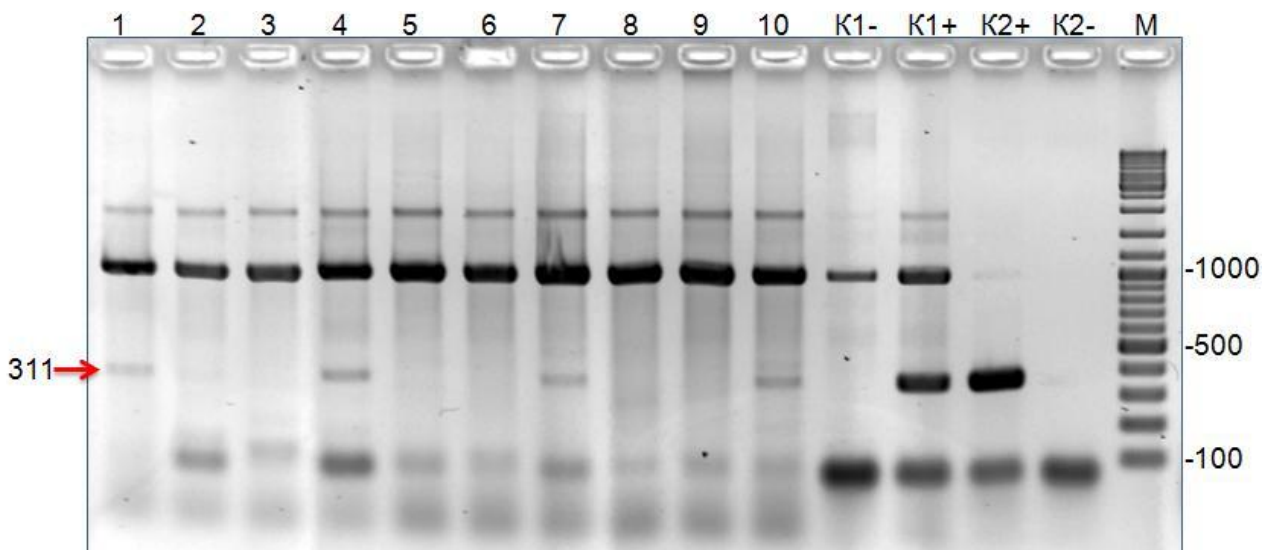


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гену зеленого флуоресцентного білку *sgfp*. Доріжки 1–10 – досліджувані проби, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці, K1+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AVI з генетичною конструкцією p014; K2+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K2- – негативний контроль – ТЕ буфер, M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

Аналогічно, за допомогою ПЛР проводили визначення наявності послідовностей синтетичного гена зеленого флуоресцентного білку у відібраних рослинах, в яких попередньо виявили присутність *nptII* трансгену. У досліджуваних 9-ти зразків присутність послідовності гену *sgfp* – амплікон довжиною 311 п.н. – виявлена тільки у 4-х, що складає 2,3% від протестованих 175 рослин (рис. 4).

Для того щоб виключити можливість бактеріальної контамінації, проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C* (рис. 5.).

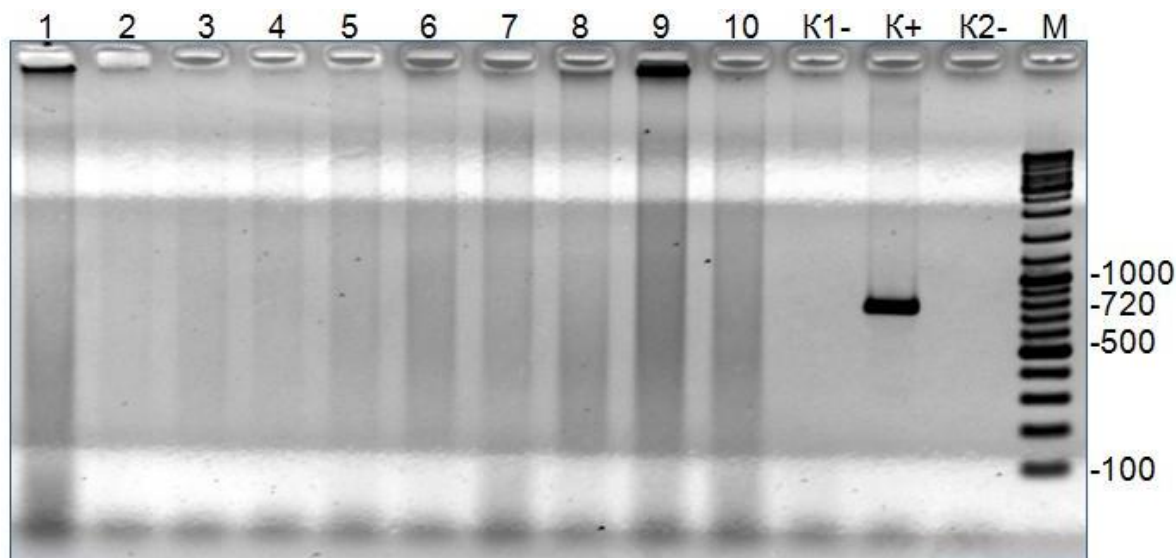


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *Vir C*. Доріжки 1–10 – досліджувані проби, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці, K+ – позитивний контроль – агробактеріальна ДНК штаму AVI, K2- – негативний контроль – ТЕ буфер, M – маркер молекулярної маси DNA LadderMix

Результати полімеразної ланцюгової реакції (рис. 5) свідчать про відсутність бактеріального зараження за умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та дозволяють стверджувати, що Т-ДНК вбудувалась в рослинний геном.

Отже, в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* рослин пшениці озимого сорту Подолянка отримано 293 насінини з 620 теоретично можливих, що становить $46,4 \pm 2,4$ %. За допомогою ПЛР-аналізу виявлено присутність послідовності трансгена *nptII* у 9-ти рослин із 175-ти.

В результаті проведення полімеразної ланцюгової реакції встановлено наявність послідовності гена *sgfp* у 4-х із 9-ти тестованих рослин, які виявилися трансгенними за послідовністю гена *nptII*. Частота трансформації одночасно за обома генами (*nptII* та *sgfp*) складає 2,3%.

Аналіз даних зразків на присутність генів вірулентності дав змогу виключити бактеріальну контамінацію рослинного матеріалу, оскільки присутність послідовності гена *Vir C* не встановлена.

Таким чином, доведено можливість отримання генетичних трансформантів пшениці *Triticum aestivum* озимого сорту Подолянка шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

Список літератури

- Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць. – 2011. – Т.11. – С. 237–241. /Goncharuk O.M., Baval A.V., Dubrovna O.V. Morfogennyi potentsial vysokoproduktyvnykh sortiv ozymoyi pshenytsi v kul'turi apikal'nykh meristem pagoniv // Faktory eksperimental'noyi evolyutsiyi organizmiv: zbirnik naukovykh prats'. – 2011. – Т. 11. – С. 237–241./
- 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. – 2014. – Т.15. – С. 35–39. /Gorbatyuk I.R., Baval A.V., Morgun B.V. Agrobakterial'na transformatsiya *in planta* pshenytsi ozymogo sortu Podolyanka ta yarogo sortu Bobwhite // Faktory eksperimental'noyi evolyutsiyi organizmiv. – 2014. – Т. 15. – С. 35–39./
- Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // Биотехнология. – 2012. – №1. – С. 8–20. /Chumakov M.I., Moiseyeva Ye.M. Tekhnologii agrobakterial'noy transformatsii rasteniy *in planta* // Biotekhnologiya. – 2012. – №1. – С. 8–20./

- Agarwal S., Loar S., Steber C., Zale J. Floral transformation of wheat // *Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats.* – 2009. – Vol.478. – P. 105–113.
- Chumakov M.I., Rozhok N.A., Velikov V.A. et al. *Agrobacterium* mediated *in planta* transformation of maize via pistil filaments // *Russian J. Genet.* – 2006. – Vol.42, №8. – P. 893–897.
- 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 Research.* – 2001. – Vol.10. – P. 363–371.
- Demeke T., Hucl P., Baga M. et al. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat // *Ther. and Appl. Genet.* – 1999. – Vol.99. – P. 947–953.
- Feldmann K.A., Marks M.D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach // *Molecular and General Genetics.* – 1987. – №208. – P. 1–9.
- Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // *J. of Biological Chemistry.* – 2008. – Vol.283, №23. – P. 15893–15902.
- Kumar A.M., Reddy K.-N., Sreevathsa R. et al. Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annuum* L.): transgenics (uid A::hptII) by a tissue culture independent *Agrobacterium*-mediated *in planta* approach // *Scientia Horticulturae.* – 2009. – Vol.119. – P. 362–370.
- Mamontova E.M., Velikova V.A., Volokhina I.V., Chumakov M.I. *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of maize germ cells // *Russian Journal of Genetics.* – 2010. – Vol.46, №4. – P. 501–504.
- Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method // *British Biotechnology Journal.* – 2014. – Vol.4, №2. – P. 116–125.
- Sawada H., Leki H., Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1995. – Vol.61, №2. – P. 828–831.
- Subramanian M., Subramanyam K., Arun M. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *in planta* seed transformation strategy in sugarcane // *Plant Cell Reports.* – 2013. – Vol.32, №10. – P. 1557–1574.
- Subramanyam K., Rajesh M., Jaganath B. et al. Assessment of factors influencing the *Agrobacterium*-mediated *in planta* seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.) // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – Vol.171, №2. – P. 450–468.
- Supartana P., Shimizu T., Shioiri H. et al. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* – 2005. – Vol.100. – P. 391–397.
- Supartana P., Shimizu Ts., Nogawa M. et al. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* – 2006. – Vol.102, №3. – P. 162–170.
- Tempe J., Petit A., Holsters M. et al. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall // *Proc. Nat. Acad. Sc. USA.* – 1977. – Vol.74, №7. – P. 2848–2849.
- Yasmeen A., Mirza B., Inayatullah S. et al. *In planta* transformation of tomato // *Plant Mol. Biol Report.* – 2009. – Vol.27. – P. 20–28.
- Zale J., Agarwal S., Loar S., Steber C. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Rep.* – 2009. – №28. – P. 903–913.

Представлено: О.М.Тищенко / Presented by: O.M.Tishchenko
Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko
Подано до редакції / Received: 23.01.2015