

В.В. ФЕДОРЧУК, А.І. ЄМЕЦЬ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

вул. Осиповського, 2а, м. Київ, 04123, Україна

nikafedorchuk@gmail.com

ВПЛИВ ОРТОВАНАДАТУ НАТРІЮ, ІНГІБІТОРУ ТИРОЗИНОВИХ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ, НА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНУ ТРАНСФОРМАЦІЮ РОСЛИН

Федорчук В.В., Ємець А.І. Вплив ортованадату натрію, інгібітору тирозинових протеїнфосфатаз, на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію рослин. — Укр. ботан. журн. — 2015. — 72(5): 505—510.

Уперше досліджено вплив різних концентрацій інгібітору тирозинзалежної протеїнфосфатази, ортованадату натрію, на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації листкових експлантів *Nicotiana tabacum*. Вивчено дію різних концентрацій ортованадату натрію (в межах від 0,5 до 250 мкМ) і з'ясовано, що за його вмісту 200 і 250 мкМ і тривалістю використання 24 год частота агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну підвищувалася на 10 та 19 % відповідно. Подовження тривалості його дії під час ко-культивування з агробактерією до 48 год із зазначеними концентраціями спричинювало суттєве зростання частоти генетичної трансформації — на 30 та 40 % відповідно, порівняно з контролем. Наявність перенесення чужорідного гена *gus* і його інтеграцію в геном рослин *N. tabacum* підтверджено молекулярно-генетичним аналізом.

К л ю ч о в і с л о в а: *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, *Nicotiana tabacum*, інгібітори тирозинзалежних протеїнфосфатаз

Вступ

Серед багатьох методів перенесення чужорідної ДНК у рослину, таких як бомбардування мікрочастинками, електропорація та мікроін'єкція, трансформація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* має очевидні переваги. *A. tumefaciens* володіє унікальною здатністю переносити молекулу ДНК у рослинну клітину під час процесу, відомого як горизонтальне перенесення генів (Thomson, 2007).

Метод трансформації, опосередкований *Agrobacterium*, дає змогу вводити в рослину великі за розміром генетичні конструкції, але при цьому не зумовлює суттєвих порушень у послідовності гена, що переноситься. Крім того, цей метод не потребує застосування спеціального обладнання. Не в останню чергу метод трансформації забезпечує й оптимальні можливості для сегрегації маркерних селективних генів в отриманих трансформантів (Rukavtsova et al., 2013). Сьогодні тривають роботи з удосконалення методів генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium* і пошук нових чинників, які могли би сприяти підвищенню частоти отримання трансгенних ліній рослин. Зокрема, розробка таких методичних підходів дедалі більше ґрунтується на поглибленому розумінні молекулярних механізмів утворення індукованих

агробактеріями пухлин у трансформованих рослин і залучення до цього процесу сигнальних внутрішньоклітинних каскадів (Pitzschke, Hirt, 2010).

Не так давно з'ясувалося, що використання інгібіторів Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ (трифлюоперазин) і протеїнфосфатаз (окадаїнова кислота) значно підвищує ефективність агробактеріальної трансформації ембріоїдів сосни білої (Alimohammadi, Bagherieh-Najjar, 2009). У подальшому ми запропонували використовувати трифлюоперазин для підвищення частоти агробактеріальної трансформації тютюну (Fedorchuk et al., 2014), а також продемонстрували, що додавання до середовища для ко-культивування інгібітору Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ W7 зумовлювало значне підвищення частоти регенерації та швидкості росту рослин-регенерантів тютюну порівняно з контролем (Fedorchuk, Yemets, 2015). Тому метою даного дослідження стало вивчення впливу інгібітору протеїнфосфатаз — ортованадату натрію на агробактеріальну трансформацію *Nicotiana tabacum* L. — як потенційно дієвого інструменту для підвищення частоти трансформації рослин.

Об'єкти та методи досліджень

Для введення в культуру *in vitro* як вихідний матеріал використовували насіння *N. tabacum*. Його стерилізували у 5%-му розчині гіпохлориту натрію

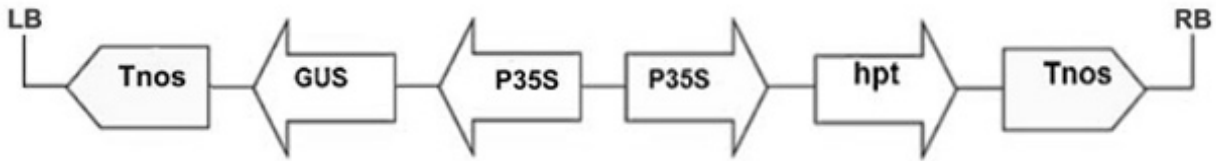


Рис. 1. Схема векторної конструкції pGH217: LB і RB — ліва та права межі Т-ДНК, P35S — 35S промотор ВМЦК, GUS — ген β-глюкуронідази, nos — нопаліновий термінатор, hpt — ген *hpt* стійкості до гігromіцину

Fig. 1. Scheme vector construction pGH217: LB і RB — left and right borders T-DNA, P35S — 35S promoter, GUS — gene β glucuronidase, nos — nopaline terminator, hpt — gene *hpt* resistance to hygromycin

протягом 10 хв із подальшим триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді (Gallois, Marinho, 1995). Пророщування насіння та культивування рослин проводили на безгормональному середовищі МС (Pitzschke, Hirt, 2010) протягом місяця.

Для оцінки регенераційного потенціалу тютюну механічно пошкоджені експланти молодих листків (листові диски) рослин розміром 1,5–2,5 см² висаджували на середовище МС, що містило 1 мг/л 6-бензиламінопурина (БАП) (Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) (Sigma, США). У кожен чашку Петрі висаджували по п'ять листових дисків, загалом було проаналізовано по 125 експлантів у кожному досліді. Частоту регенерації визначали через три тижні після початку культивування як співвідношення експлантів із регенованими пагонами до загальної кількості висаджених експлантів.

Щоб дослідити вплив на частоту агробактеріальної трансформації, застосували інгібітор тирозинових протеїнофосфатаз, ортованадат натрію (Sigma, США), який додавали безпосередньо до середовища для ко-культивування з агробактерією. Для цього інгібітор розчиняли в 1 М NaOH із нагріванням, маточний розчин (10 мМ) зберігали за температури — 20°C. Вивчали вплив широкого діапазону концентрацій ортованадату натрію — від 0,5 до 250 мкМ.

Для генетичної трансформації використали штам AGL1 *A. tumefaciens*, що містив плазмідний вектор pGH217 із репортерним геном β-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 в трансформантів. Плазміда була люб'язно надана канд. біол. наук В.В. Радчуком (Інститут генетики рослин і дослі-

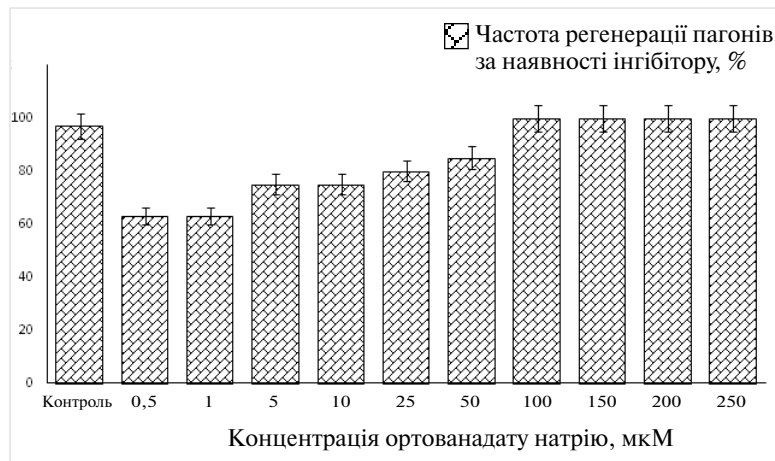
дження культурних рослин, м. Гатерслебен, Німеччина) (рис. 1). Перенесення генетичної конструкції pGH217 у супервірулентний штам AGL1 *A. tumefaciens* здійснювали за описаним раніше методом (Tang et al., 2007). Для цього нічну культуру агробактерії вирощували в 50 мл рідкого середовища LB, доповненого 100 мг/л спектиноміцину та 50 мг/л ріфампіцину, з постійним струшуванням на шейкері за температури +28°C.

З метою підвищення частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації також вивчено вплив оптичної щільності агробактерії (optical density, OD) під час її ко-культивування з листовими експлантами на частоту трансформації *N. tabacum*, використовуючи показники OD₆₀₀ від 0,1 до 0,5. Після ко-культивування експланти на 7 діб переносили на середовище МС, яке містило 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 5 мг/л гігromіцину та 400 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії. Відтак їх пересаджували на аналогічне за складом середовище, але без цефотаксиму. З'ясувалося, що оптимальною оптичною щільністю агробактерії для генетичної трансформації було значення OD₆₀₀ = 0,2. При цьому частота регенерації пагонів з експлантів на селективному середовищі, яке містило 5 мг/л гігromіцину, сягала 50 % (контроль).

Оскільки в роботі використано штам AGL1 *A. tumefaciens*, що містив плазміду pGH217 із селективним маркерним геном *hpt*, який забезпечує стійкість до гігromіцину в трансформантів, для визначення його селективної концентрації досліджували вплив 1–15 мг/л гігromіцину на життєздатність експлантів після трьох тижнів їх культивування з даним селективним агентом. Частоту трансформації визначали як співвідношення у відсотках кількості експлантів, здатних до регенерації пагонів за наявності селективної концентрації гігromіцину, до загальної кількості експлантів, використаних у

Рис. 2. Вплив ортованадату натрію (0–250 мкМ) на частоту регенерації пагонів із листових дисків *N. tabacum*

Fig. 2. Influence of sodium ortovanadat (0–250 m) on the shoots regeneration frequency from leaf discs of *N. tabacum*



дослідженні. Встановлено, що концентрація 5 мг/л гігроміцину була найефективнішою для подальшої селекції трансгенних ліній *N. tabacum*.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин і детекції експресії репортерного гена здійснено їх молекулярно-генетичний аналіз. Зі зразків відселектованих на гігроміцині ліній тютюну та контрольних рослин було виділено геномну ДНК за методом ЦТАБ (Murray, Thompson, 1980). Наявність послідовності гена *gus* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Склад реакційної суміші (об'ємом 25 мкл) для ПЛР був таким: 5 × ПЛР-буфера (Helicon, Росія), 2 мкл ДНК, по 0,5 мкл специфічних праймерів до гена *gus* (5'-gc aagcgcacttacaggcgattaagagctgat-3' і 5'-tgtttgcctcctgct gcggtttccaccgaag-3'), 1 мкл dNTP (Sigma, Німеччина) та 0,5 мкл Taq-полімерази (Fermentas, Литва).

Реакцію проводили на ампліфікаторі PCR Applied Biosystem 2720 (США) за таких умов: первинна денатурація 5 хв за температури 95° С; далі 40 циклів — 95° С (30 с), 72° С (40 с), 67° С (40 с); кінцева полімеризація — 72° С (7 хв).

Розмір ампліфікованого фрагменту становив 632 п.н., що відповідає позитивному контролю (розміру ампліконів за використання конструкції pGH217 як матриці для ПЛР) (Jefferson et al., 1987). ДНК нетрансформованих рослин (негативний контроль) і відповідний вектор (позитивний контроль) були ампліфіковані за аналогічних умов. Продукти реакції розділяли в 2%-му агарозному гелі та візуалізували за допомогою етидію броміду.

Результати досліджень та їх обговорення

Оскільки відомо, що частота й ефективність генетичної трансформації, зокрема агробактеріальної,

залежать від типу експланта певного виду обраних для досліду рослин і їхньої здатності до ефективної регенерації пагонів чи повноцінних рослин, ми попередньо оцінили регенераційний потенціал листових експлантів *N. tabacum*. З'ясовано, що частота регенерації пагонів з листових дисків сягає близько 97%. У середньому на кожному окремому експланті *in vitro* формувалися чотири рослини-регенеранти.

Для визначення будь-якого негативного впливу інгібітору ортованадату натрію спочатку було досліджено дію його різних концентрацій на регенерацію пагонів із листових експлантів *N. tabacum*. Виявлено, що частота регенерації з використанням низьких концентрацій (0,5 та 1 мкМ) становила приблизно 63%, тоді як з інгібітором у вищих концентраціях (5 і 10 мкМ) частота утворення пагонів дорівнювала близько 75%, а за дії 150, 200 та 250 мкМ ортованадату натрію вона сягала майже 100%. Варто відзначити, що за використання таких високих концентрацій спостерігалось утворення великої кількості регенерантів на експлант (6–8).

Раніше було встановлено, що ортованадат натрію стимулює фосфорилювання по залишках тирозину білків, оскільки інгібує тирозинфосфатази в тваринних клітинах (Posner, 1994). Ми дослідили, що в умовах гіперфосфорилювання по залишках тирозину прискорювалася диференціація клітин, і це проявлялося в індукції органогенезу.

Отже, ортованадат натрію у високих мікромолярних концентраціях (100–250 мкМ) позитивно впливав на регенерацію пагонів, підвищуючи показник її ефективності (кількість регенерованих пагонів на експлант), хоча частота залишалася на рівні контролю (рис. 2).

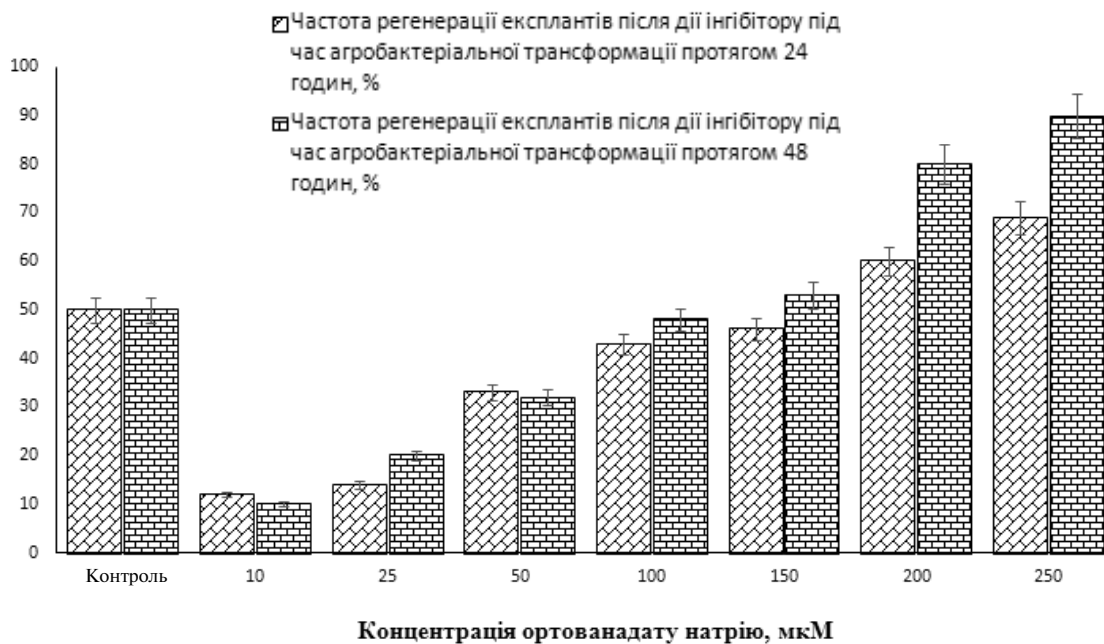


Рис. 3. Вплив різних концентрацій ортованадату натрію та тривалості ко-культивування інгібітору з бактерією на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої *Nicotiana tabacum* трансформації

Fig. 3. Influence of different concentrations of sodium orthovanadate and co-cultivation duration with inhibitor and bacteria on the *Agrobacterium*-mediated *Nicotiana tabacum* transformation frequency

З метою підвищення частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації також вивчено вплив оптичної щільності агробактерії під час її ко-культивування з листовими експлантами на частоту трансформації *N. tabacum*. Після ко-культивування експланти для елімінації агробактерії перенесли на сім діб на середовище МС, яке містило 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 5 мг/л гігromіцину та 400 мг/л цефотаксиму. Потім їх пересажували на аналогічне за складом середовище, але без цефотаксиму. З'ясувалося, що оптимальною оптичною щільністю агробактерії для генетичної трансформації було значення $OD_{600} = 0,2$. При цьому частота регенерації пагонів з експлантів на селективному середовищі, що містило 5 мг/л гігromіцину, сягала 50 % (контроль).

Наступним етапом було дослідження впливу широкого діапазону (від 10 до 250 мкМ) концентрацій ортованадату натрію і тривалості 24–48 год ко-культивування агробактерії за його наявності на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Із додаванням інгібітору до середовища для ко-культивування в концентраціях 10, 25 і 50 мкМ і тривалістю цього процесу в його присутності 24 год частота трансформації становила близько 12,

14 та 33%. Зі збільшенням концентрації інгібітору в середовищі зростала частота регенерації пагонів з експлантів. Зокрема, з додаванням до середовища для ко-культивування бактерії з експлантами 100 і 150 мкМ інгібітору частота трансформації становила приблизно 43 і 46 % відповідно. За використання 200 і 250 мкМ ортованадату натрію частота трансформації підвищувалась до 60 і 69 % відповідно. Тобто така концентрація ортованадату натрію збільшувала частоту трансформації на 10 і 19 % відповідно, порівняно з контролем, показник якого був, як зазначалося раніше, на рівні 50%.

З подовженням тривалості ко-культивування експлантів, за наявності інгібітору, до 48 год показники частоти трансформації значно зростали. Зокрема, з концентраціями інгібітору 100, 150, 200 і 250 мкМ частота трансформації становила приблизно 48, 53, 80 і 90 % відповідно, порівняно з контролем. Тобто найефективнішими концентраціями ортованадату натрію були 200 та 250 мкМ. За їх використання протягом 48 год під час ко-культивування частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації підвищувалася приблизно на 30 та 40 % відповідно (рис. 3).

Таким чином, у результаті здійснених експериментів продемонстровано, що використання інгібітору тирозинових протеїнофосфатаз, зокрема ортованадату натрію, суттєво підвищує частоту агробактеріальної трансформації листових експлантів *N. tabacum*. Досліджено вплив різних концентрацій ортованадату натрію (10—250 мкМ) і тривалості кокультивування за наявності інгібітору (24 і 48 год) на частоту агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну та встановлено найефективніші концентрації інгібітору. За тривалості кокультивування 24 год (200 і 250 мкМ) частота агробактеріальної трансформації підвищувалася приблизно на 10 та 19 % відповідно, а за кокультивування експлантів з інгібітором (200 і 250 мкМ) протягом 48 год цей показник зростав на 30 і 40 % відповідно.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин і наявності перенесеного гена *gus* здійснено ПЛР-аналіз ліній, селективно відібраних і резистентних до гігromіцину, після проведення трансформації з використанням 250 мкМ ортованадату натрію. Розмір ампліфікованого фрагменту становив 632 п.н. Результати аналізу трансгенних ліній подано на рис. 4.

Висновки

Отже, нами досліджено вплив ортованадату натрію — інгібітору тирозинових протеїнофосфатаз на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації покритонасінних на прикладі тютюну як модельного об'єкта. Вивчено дію різних концентрацій ортованадату натрію — в межах 0,5—250 мкМ. Встановлено, що за використання інгібітору в концентраціях 200 і 250 мкМ і тривалості кокультивування з ним протягом 24 год частота агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну підвищувалася на 10 і 19 % відповідно. В разі продовження тривалості кокультивування до 48 год частота трансформації з цими ж концентраціями інгібітору зростала порівняно з контролем на 30 та 40 % відповідно.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Fedorchuk V.V., Yemets A.I. Vplyv inhibitoru seryn-treoninovykh proteyinkinaz W7 na *Agrobacterium*-oposeredkovanu transformatsiyu roslin, *Naukov. Visnyk NUBiP*, 2015, **5**(54), pp. 261—264 [Федорчук В.В., Ємець А.І. Вплив інгібітору серин-треонінових протеїніназ W7 на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію рослин. — *Наук. вісник НУБіП*. — 2015. — **5**(54). — С. 261—264].

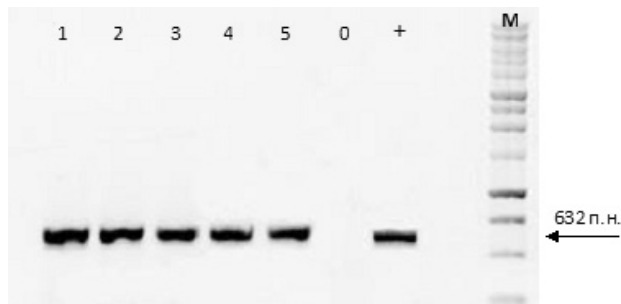


Рис. 4. Результати ПЛР-аналізу геномної ДНК, отриманої з ліній тютюну, трансформованого з використанням ортованадату натрію (250 мкМ): 1, 2, 3, 4, 5 — лінії тютюну, резистентні до гігromіцину, «0» — негативний контроль (нетрансформована рослина), «+» — плазмід pGH217, M — маркер

Fig. 4. Results of PCR analysis of genomic DNA obtained from tobacco lines, transformed with the use of sodium ortovanadate (250 μM): 1, 2, 3, 4, 5 — tobacco lines resistant to hygromycin, «0» — negative control (non-transformed plant), «+» — plasmid pGH217, M — marker

- Fedorchuk V.V., Yemets A.I. Vplyv inhibitoru tyrozynovykh proteyinkinaz genisteinyu na ahrobakteryal'nu transformatsiyu roslin, *Factors of experimental evolution of organisms*, 2015, **17**, pp. 261—264, available at: <http://nd.nubip.edu.ua> [Федорчук В.В., Ємець А.І. Вплив інгібітору тирозинових протеїніназ геністеїну на агробактеріальну трансформацію рослин // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. — 2015. — **17**. — С. 261—264. <http://nd.nubip.edu.ua>]
- Fedorchuk V.V., Tanasienko I.V., Yemets A.I., Blum Y.B. Inhibitor Ca²⁺-zaleznykh proteyinkinaz tryflyuoperazyn pidvyshchuye efektyvnist' ahrobakteryal'noyi transformatsiyi tyutyunu, *Dop. NAN Ukrainy*, 2014, **11**, pp. 165—171 [Федорчук В.В., Танасієнко І.В., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Інгібітор Ca²⁺-залежних протеїніназ трифлюоперазин підвищує ефективність агробактеріальної трансформації тютюну // *Доп. НАН України*. — 2014. — **11**. — С. 165—171].
- Gallois P., Marinho P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens* — expression of heterologous genes in tobacco, *Methods Mol. Biol.*, 1995, **49**, pp. 39—48.
- Jefferson R., Kavanagh T., Bevan M. GUS fusions β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *The EMBO J.*, 1987, **6**, pp. 3901—3907.
- Murray M.G. Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, 1980, **8**, pp. 4321—4325.
- Pitzschke A., Hirt H. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation, *The EMBO J.*, 2010, **29**(6), pp. 1021—1032.
- Posner V. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are

insulin mimetics, *The J. of Biol. Chem.*, 1994, **269**(6), pp. 4596–4604.

Rukavtsova E.B., Lebedev A.A., Zakharchenko N.S., Buryanov Y.I., *Plant Physiol.*, 2013, **60**(1), pp. 17–30.

Tang W., Lin J., Newton R. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine, *Plant Cell Rep.*, 2007, **26**, pp. 673–683.

Thomson J.A. Genetic engineering of plants, *Biotechnology J.*, 2007, **3**, pp. 94–110.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 06.10.2015 р.

Федорчук В.В., Емец А.И. Влияние ортованадата натрия, ингибитора тирозиновых протеинфосфатаз, на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию растений. — Укр. ботан. журн. — 2015. — **72**(5): 505–510.

Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»
ул. Осиповского, 2а, г. Киев, 04123, Украина

Впервые исследовано воздействие различных концентраций ингибитора тирозинзависимой протеинфосфатазы, ортованадата натрия, на частоту *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых эксплантов *Nicotiana tabacum*. Изучено влияние различных концентраций ортованадата натрия в пределах от 0,5 до 250 мкМ. Установлено, что при использовании ингибитора в концентрации 200 и 250 мкМ частота агробактериальной трансформации листовых дисков табака повышалась на 10 и 19 % соответственно, при ко-культивировании в течение 24 часов. Увеличение продолжительности ко-культивирования с агробактерией до 48 часов при указанных концентрациях ингибитора приводило к возрастанию частоты трансформации на 30 и 40 % соответственно, по сравнению с контролем. Наличие переноса чужеродного гена *gus* и интеграцию его в геном растений *N. tabacum* подтверждено с помощью молекулярно-генетического анализа.

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, *Nicotiana tabacum*, ингибиторы тирозинзависимых протеинфосфатаз.

Fedorchuk V.V., Yemets A.I. **The influence of protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium ortovanadate, on *Agrobacterium*-mediated transformation of plants.** — Ukr. Bot. J. — 2015. — **72**(5): 505–510.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine
2a, Osipovskogo Str., Kyiv, 04123, Ukraine

The effect of different concentrations of protein tyrosine phosphatase inhibitor, sodium ortovanadate, on the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants of *N. tabacum* was described for the first time. The influence of different concentrations of sodium ortovanadate in the range from 0.5 to 250 μM was investigated. It was found that inhibitor concentrations of 200 and 250 μM provoked the increase of the frequency of agrobacterial transformation of tobacco leaf on 10 and 19 %, respectively, after 24 h of co-cultivation. Increasing of co-cultivation period to 48 h at the same inhibitor concentrations led to an increase in the frequency of transformation on 30 and 40 %, respectively, when compared to control. The presence of the *gus* gene in the genome of *N. tabacum* plants after transformation was confirmed by molecular genetic analysis.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, *Nicotiana tabacum*, tyrosine depended protein phosphatase inhibitors.