

УДК 579.254.2:581.143.5

АНАЛІЗ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ КУКУРУДЗИ, ТРАНСФОРМОВАНОЇ IN PLANTA З ВИКОРИСТАННЯМ ОБЕЗЗБРОЄНИХ ШТАМІВ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

О.Ю. МАТВЄЄВА¹, Л.В. СІРАНТ¹, В.М. КУРЧІЙ¹, Б.В. МОРГУН^{1,2},
О.М. ТИЩЕНКО¹, О.В. КОЧЕТОВ³

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: mgirais@mail.ru

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії Національної академії наук
України
03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

³Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук
630090 Новосибірськ, просп. Академіка Лаврентьєва, 10

Досліджували вплив рекомбінантних штамів LBA4404 (pBi2E), GV3101 (pICH5290), GV2260 (pCB002) *Agrobacterium tumefaciens* на синтез запасних білків рослин інбредних ліній кукурудзи, трансформованих in planta на стадії запилення. Аналізом трансгенних (T0) рослин та їх насінневого (T1) покоління підтверджено відсутність вірогідної відмінності спектрів поліпептидів запасних білків зернівок у фазу повної воскової стиглості різних генотипів кукурудзи. Згідно з отриманими даними, у відповідь на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію з використанням зазначених штамів октопінового й нопалінового типів змін експресії генів запасних білків не зафіксовано.

Ключові слова: *Zea mays* L., зеїни, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація in planta.

Agrobacterium tumefaciens — грамнегативна ґрунтова бактерія, здатна переносити T-ДНК Ti-плазміді [9] у клітини рослин; на цій її властивості базується розробка молекулярних біотехнологій. Разом з тим багато питань, пов'язаних із взаємодією агробактеріальних і рослинних клітин, залишається відкритими. Їх вирішенню сприяє детальне дослідження як молекулярно-генетичних основ процесингу й інтеграції рекомбінантних молекул ДНК у геном рослин, так і змін фізіолого-генетичних і метаболічних процесів, що відбуваються в рослинах у відповідь на *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію.

Зеїни — основні запасні протеїни кукурудзи, експресія генів яких розпочинається на перших етапах стадії дозрівання, належать до проламінів і поділяються на 4 класи. Серед них альфа-зеїни становлять основну, а бета, дельта і гамма — мінорну групи [5–7]. Зеїни — окремий тип протеїнів з особливими хімічними властивостями, що визначає їх просторове розміщення у сферичних протеїнових тільцях ендосперму. Бідний на цистеїн α -зеїн локалізований з внутрішнього боку протеїнових тілець з δ -зеїном, в той час як гідрофобні, багаті на цистеїн β - і γ -зеїни виявлено зовні протеїнових тілець [6, 7]. Вони синтезуються на

шорсткуватому ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) і відкладаються в ЕПР-похідних протеїнових тільцях [13].

Білки α -зеїнів, що кодуються мультигенною родиною генів, зазвичай поділяють на два підкласи: 19 і 22 кД [8]. Структурно α -зеїни є вдовженими гідрофобними молекулами, N-термінальний кінець яких складається із 40, C-термінальний кінець — з 10 амінокислотних послідовностей, фланкованих 9 або 10 α -спіральними повторюваними доменами, розділеними короткими розтягненими глутамінзбагаченими пептидами. Порівнянням амінокислотної послідовності виявлено, що β -, γ - і δ -зеїни — члени проламінової суперродини, але тільки γ -зеїни містять повторювані амінокислотні послідовності — 2 або 8 тандемних повторів Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu. На метіонін збагачені β - і γ -зеїни [7, 12]. Reyes та ін. [13] встановили, що гени, які кодують зеїни — α -глобулін і леугмін-1 — транскрибуються не лише в ендоспермі, а й в алейронових клітинах. На відміну від ендосперму алейронові клітини акумулюють ці запасні протеїни не в ЕПР, а у вакуолях, які запасують протеїн [13].

Agrobacterium tumefaciens — патоген, який за значних концентрацій суспензії клітин може призводити до запрограмованої загибелі рослинних клітин [11], що обмежує ефективність технології отримання трансгенних рослин. Згідно з результатами досліджень, проведених на модельному об'єкті — тютюні, під дією *A. tumefaciens* змінюється експресія сотень генів, у тім числі генів, пов'язаних із рибосомними білками [15]. Метаболічні зміни спостерігали в рослинах ріпаку, інокульованих обеззброєним штамом LBA4404 і пухлиноіндукувальними штамми LBA4001 (октопіновий), LBA4902 (нопаліновий), в яких значно варіювала кількість амінокислот [14]. Ми визначали різницю в кількості розчинних білків у культурі тканин кукурудзи [2]. У зв'язку з цим не виключено, що у відповідь на агробактеріальну інфекцію клітин генеративних органів могла змінюватись експресія генів запасних білків.

Метою цієї роботи було дослідження спектра поліпептидів запасних білків ендосперму зернівок (у фазу повної воскової стиглості) рослин кукурудзи, трансформованих *in planta* на етапі запилення рослин з використанням різних рекомбінантних штамів *A. tumefaciens*: LBA4404, GV3101, GV2260.

Методика

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили частково модифікованим нами способом [4] нанесенням бактеріальної суспензії (нічної культури агробактерії) на попередньо обрізані маточкові нитки з подальшим штучним запиленням пилком тієї ж рослини.

У роботі використано інбредні лінії 250, 370, 390, 1555, 1568, 1580 селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та штам *A. tumefaciens*: 1 — LBA4404, що містить плазмиду з цільовим геном — дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) арабідопсису і селективним геном *nptII* — люб'язно наданий О.В. Кочетовим (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук); 2 — GV3101 з векторною конструкцією pICH5290, що містить ген *bar* стійкості до фосфінотрицину, 3 — GV2260 (pCB002), люб'язно надані відділом генетичної інженерії (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ).

Полімеразну ланцюгову реакцію виконували за методикою, описаною у праці [1], з використанням праймерів до: α -зеїнів кукурудзи — 5'-AGTGCACCCATATTCAG-3' (F), 5'-GACATTGTGGCATCATCATTT-3' (R); гена *nptII* 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA-3' (F), 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3' (R); фрагмента 1-го екзону гена *pdh* — 5'-AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC-3' (F), 5'-GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC-3' (R); гена *bar* — 5'-GCGGTCTGCACCATCGTCAAC-3' (F), 5'-CAGATCTCGGTGACGGCAGGAC-3' (R). Реакцію ампліфікації здійснювали за умов: передденатурація — 94 °С, 4 хв; 35 циклів: денатурація — 94 °С, 30 с; реасоціація — 50 °С, 30 с, 53 °С — 30 с (двічі поспіль), 59 °С — 1 хв для фрагментів генів α -зеїнів, гена *nptII*, 1-го екзону гена *pdh* і гена *bar* відповідно; синтез — 72 °С (20, 30, 35 і 18 с відповідно); кінцева елонгація — 72 °С, 10 хв.

Виділення та електрофорез запасних білків кукурудзи проводили згідно з рекомендаціями Поперелі й Асика [3]. Зеїни екстрагували з подрібненого ендосперму зернівок 70 %-м етанолом протягом 2–3 діб. Шрот осаджували за 2500 об/хв («Beckman», США) протягом 5 хв. Надосадову рідину (0,1 мл) висушували за температури 40 °С, білки розчиняли в 0,1 мл буферу, в 100 мл якого містилось 1,2 мл оцтової кислоти, 48 г сечовини, 5 мл β -меркаптоетанолу, 0,025 % піроніну X. SDS-електрофорез проводили в 8,5 %-му поліакриламідному гелі за напруги 450 В протягом 6,5 год.

Результати та обговорення

Успішність технологічних рішень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* визначається не тільки ідентифікацією трансгенів у геномі рослин, а й аналізом їх фізіолого-метаболічного стану.

Для отримання трансгенних рослин кукурудзи оптимізували спосіб, запропонований Чумаковим та співавт. [4]. Серед проаналізованих середовищ інокуляції генетичну трансформацію за допомогою різних обеззброєних штамів *A. tumefaciens* ефективно здійснювали за використання буфера, до складу якого входили MES [10] та детергент Silvet77 («Lehle Seed», США) навіть без ацетосирінгону.

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *in planta* отримано качани зі стиглими зернівками, які за морфологічними ознаками не відрізнялись від контрольних зразків. Молекулярно-генетичним аналізом із використанням праймерів до фрагментів 1-го екзону гена *pdh*, генів *nptII* і *bar* підтверджено перенесення Т-ДНК у клітини та її інтеграцію в ядерний геном кукурудзи (рис. 1). Результати ПЛР-аналізу за генами *virD₁* для штамів GV3101 (pICH5290) і GV2260 (pCB002) та *virC* для штаму LBA4404 (pVi2E) показали відсутність генів вірулентності в ДНК проростків кукурудзи, що свідчить про відсутність агробактеріальних домішок у рослинах кукурудзи, в геном яких інтегровано Т-ДНК.

На рис. 2, 3 наведено електрофореграми поліпептидів запасних білків в ендоспермі контрольних (нетрансформованих) і трансгенних рослин кукурудзи на прикладі ліній 250, 1568, 390. Під час аналізу запасних білків зернівок як стандарт використовували також фрагмент гена α -зеїну рослини кукурудзи, трансформованої *in planta* (рис. 4). Порівняльним аналізом експресії генів запасних білків не виявлено

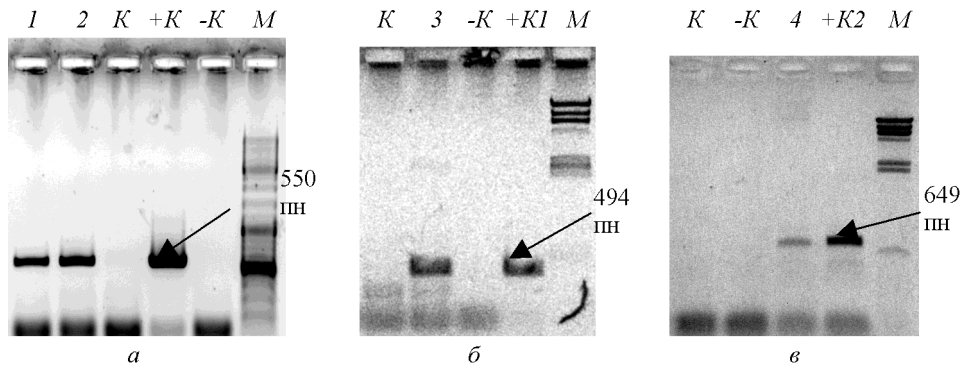


Рис. 1. Электрофореграмма продуктів ампліфікації ДНК трансгенних рослин кукурудзи 370 (а), 1580 (б), 1555 (с), трансформованих in planta з використанням штамів LBA4404 (pBi2E), GV3101 (pICH5290), GV2260 (pCB002) та праймерів до фрагментів 1-го екзону гена *pdh* арабідопсису (а), гена *bar* (б), гена *nptII* (с):

K — ДНК пагонів контрольних (нетрансформованих) рослин; 1–4 — ДНК пагонів T0-рослин *pdh* (1, 2), *bar* (3), *nptII* (4); +K — негативний контроль (ті ж умови ампліфікації без ДНК); +K...+K2 — позитивні контроли, що містять гени *pdh* (+K), *bar* (+K1), *nptII* (+K2); M — маркер молекулярних мас — GeneRuler™ DNA LadderMix, Fermentas (а), ДНК бактеріофага γ , гідролізована *Hind* III (б, с); стрілками вказано амплікони з очікуваними розмірами 550 (а), 494 (б), 649 пн (с)

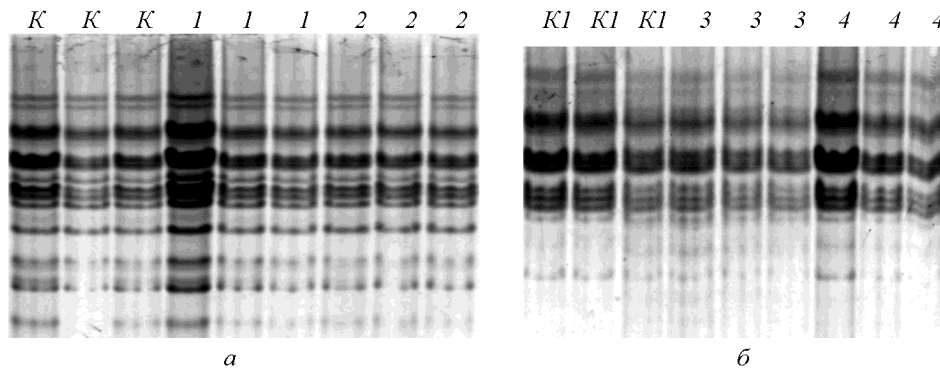
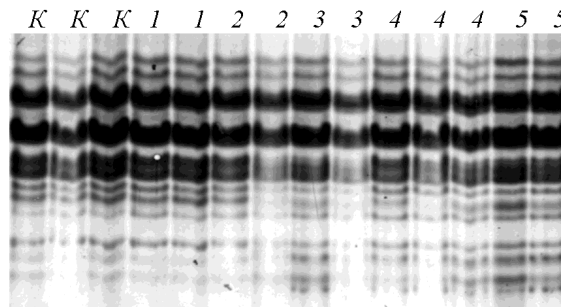


Рис. 2. Спектр поліпептидів запасних білків рослин інбредних ліній кукурудзи 1568 (а), 390 (б), інфікованих in planta штамми LBA4404 (pBi2E), GV3101 (pICH5290):

K, K1 — контрольні рослини ліній відповідно 1568 і 390; 1–4 — T0-рослини ліній 1568 (1, 2) та 390 (3, 4), інфіковані in planta штамми відповідно LBA4404 (1, 3) і GV3101 (2, 4)

Рис. 3. Спектр поліпептидів запасних білків рослин інбредної лінії кукурудзи 250, інфікованих in planta штамми LBA4404 (pBi2E), GV2260 (pCB002), GV3101 (pICH5290):

K — контрольні рослини лінії 250; 1–4 — відповідно T0- і T1-рослини лінії 250 за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації штамми LBA4404 (1, 2), GV2260 (3, 4); 5 — T0-рослини лінії 250 за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації штамом GV3101



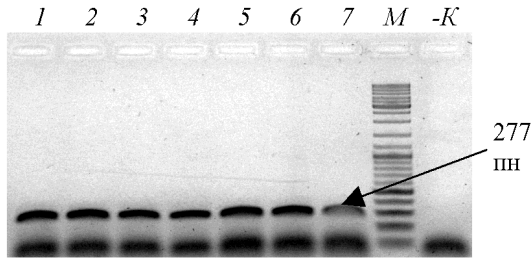


Рис. 4. Электрофореграма продуктів ампліфікації фрагмента гена α -зеїну рослин кукурудзи, трансформованих in planta з використанням штамів GV2260, pCB002 (2, 3), LBA4404, pBi2E (4, 5) на прикладі інбредних ліній відповідно 250 і 1555:

1 — ДНК листків контрольних (нетрансформованих) рослин; 2–7 — ДНК листків трансформованих рослин; –K — TE-буфер — негативний контроль; M — маркер молекулярних мас — GeneRuler™ DNA LadderMix, Fermentas; стрілкою вказано фрагмент з очікуваним розміром 277 пн

вірогідних відмінностей у спектрах поліпептидів запасних білків за повної стиглості зерна. Аналогічні результати отримано й для інших проаналізованих генотипів.

У наших попередніх дослідженнях було виявлено варіювання вмісту легкокорозчинних білків в етіологованих і фотосинтезувальних тканинах за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Тому для обґрунтування доцільності використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta окрім експресії генів

запасних білків ми проаналізували також такі основні фізіолого-біохімічні показники, як вміст легкокорозчинних білків і крохмалю (рис. 5).

Зазначимо, що в ендоспермі нетрансформованих рослин (встановлено на прикладі інбредних ліній 250, 370, 1555) вміст легкокорозчинних білків відрізнявся до 30 % (див. рис. 5) і більше. За дії різних штамів їх кількість також була неоднаковою. Так, за дії pBi2E у T-2 поколінні ліній 250 і 1555 вміст білків зростав на 67 %, в той час як у лінії 370 залишався на рівні контролю. Під впливом GV3101 вміст білків підвищувався для ліній 250 і 1555, для ліній 1580, 390, 1568 — навпаки, знижувався. Отримані дані дають підставу припустити, що в компетентних до агробактеріальної інфекції клітинах, здатних до органогенезу, відбуваються зміни у процесах біосинтезу білків та (або) їх стабільності.

Накопичення крохмалю в ендоспермі зернівок змінювалось у доволі вузьких межах, що свідчить про неістотний вплив агробактеріальної інфекції на біосинтез крохмалю. Однак в ендоспермі насінневого покоління (T1) біотехнологічних рослин кукурудзи накопичення крохмалю могло перевищувати його вміст відносно вихідної інбредної лінії.

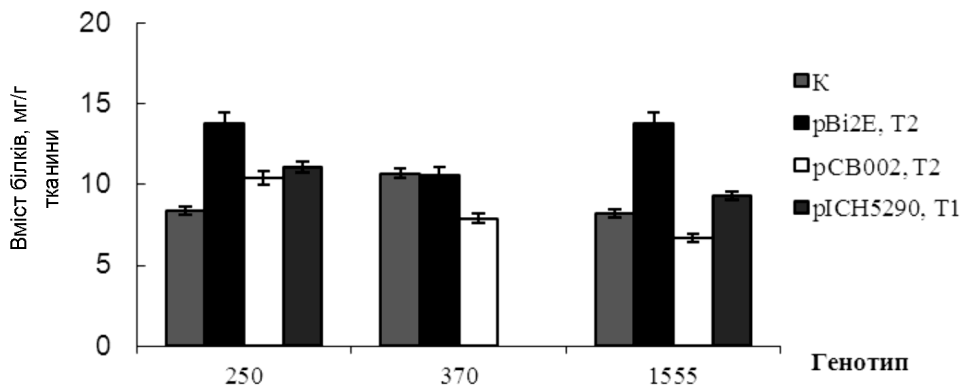


Рис. 5. Вміст легкокорозчинних білків в ендоспермі зернівок кукурудзи у фазу молочної стиглості в контрольних і трансформованих in planta рослин

Збільшення кількості цього основного запасного вуглеводу вказує на можливість добору за цим показником варіантів з поліпшеними характеристиками.

Отже, у результаті проведених досліджень оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta інбредних ліній кукурудзи, отримано рослини кукурудзи із супресором гена проліндегідрогенази та геном *bar* стійкості до фосфінотрицину. Аналізом якості зернівок доведено, що генетична трансформація in planta з використанням різних типів рекомбінантних штамів не впливала на синтез поліпептидів запасних білків — зеїнів.

Робота підтримана грантом спільних наукових проектів: НАН України (16.05.2012) та Сибірського відділення Російської академії наук (№ 11).

1. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М. и др. Активность сахарозосинтазы и инвертазы эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированной in planta обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2011. — 9, № 1. — С. 55—64.
2. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активность сахарозосинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // Там же. — 2010. — 8, № 1. — С. 18—24.
3. Попереля Ф.А., Асыка Ю.А. Методические указания по электрофорезу зерна кукурузы для определения процента гибридности семян F1. — Одесса: ВСГИ, 1988. — 37 с.
4. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А. и др. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей in planta // Генетика. — 2006. — 42, № 8. — С. 1083—1088.
5. Bagga S., Adams H.P., Rodriguez F.D. et al. Coexpression of the maize delta-zein and beta-zein genes results in stable accumulation of delta-zein in endoplasmic reticulum-derived protein bodies formed by beta-zein // Plant Cell. — 1997. — 9 (9). — P. 1683—1696.
6. Coleman C.E., Clore A.M., Ranch J.P. Expression of a mutant α -zein creates the floury2 phenotype in transgenic maize (endosperm/prolamin) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — 94. — P. 7094—7097.
7. Coleman C.E., Yoho P.R., Escobar S., Ogawa M. The accumulation of α -zein in transgenic tobacco endosperm is stabilized by co-expression of α -zein // Plant Cell Physiol. — 2004. — 45 (7). — P. 864—871.
8. Galili G., Kawata E.E., Larkins B.A. Characterization of polypeptides corresponding to clones of maize zein of mRNAs // Plant Physiol. — 1987. — 84. — P. 291—297.
9. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the «Gene-Jockeying» tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2003. — 67. — P. 16—37.
10. Grimsley N., Hohn B., Ramos B. et al. DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or *Brassica* by agroinfection is dependent on bacterial virulence functions // Mol. Gen. Genet. — 1989. — 217 (2—3). — P. 309—316.
11. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells // Mol. Plant-Microbe Interact. — 2000. — 13. — N 6. — P. 649—657.
12. Kim C.S., Y.-min Woo, Clore A.M. et al. Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm // Plant Cell. — 2002. — 14. — P. 655—672.
13. Reyes F.C., Chung T., Holding D. et al. Delivery of prolamins to the protein storage vacuole in maize aleurone cells // Ibid. — 2011. — 23. — P. 769—784.
14. Simoh S., Quintana N., Kim H.K. et al. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens*-infected *Brassica rapa* // J. Plant Physiol. — 2009. — 166, N 10. — P. 1005—1014.
15. Veena Jiang H., Doerge R.W., Gelvin S.B. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression // Plant J. — 2003. — 35. — P. 219—236.

Отримано 29.04.2013

АНАЛИЗ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ
IN PLANTA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБЕЗОРУЖЕННЫХ ШТАММОВ
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

А.Ю. Матвеева¹, Л.В. Сирант¹, В.М. Курчий¹, Б.В. Моргун^{1,2}, Е.Н. Тищенко¹, А.В. Кочетов³

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Исследовали влияние рекомбинантных штаммов LBA4404 (pBi2E), GV3101 (pICH5290), GV2260 (pCB002) *Agrobacterium tumefaciens* на синтез запасных белков растений инбредных линий кукурузы, трансформированных in planta на стадии опыления. Анализом трансгенных растений (T0) и их семенного (T1) поколения подтверждено отсутствие достоверного различия спектров полипептидов запасных белков зерновок в фазу полной восковой спелости разных генотипов кукурузы. Согласно полученным данным, в ответ на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию с использованием указанных штаммов октопинового и нопалинового типов изменения экспрессии генов запасных белков не зафиксированы.

THE STUDY OF STORAGE PROTEINS OF MAIZE TRANSFORMED IN PLANTA
USING DISARMED STRAINS OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

O.Yu. Matveyeva¹, L.V. Sirant¹, V.M. Kurchiy¹, B.V. Morgun^{1,2}, O.M. Tyshchenko¹, A.V. Kochetov³

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetics Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

³Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
10 Acad. Lavrenteva avenue, Novosibirsk, 630090, Russia

Influence of the *Agrobacterium tumefaciens* recombinant strains LBA4404 (pBi2E), GV3101 (pICH5290), GV2260 (pCB002) on the synthesis of storage proteins of maize plants, transformed in planta during pollination was investigated. Analysis of transgenic plants (T0) and their next generation (T1) showed the absence of reliable difference in spectrum of storage proteins polypeptides of the full-waxy ripeness seeds of the different maize genotypes. No changes in storage proteins genes expression in response to *Agrobacterium*-mediated transformation using this strains of the octopine and nopaline types were found.

Key words: *Zea mays* L., zeins, *Agrobacterium*-mediated transformation in planta.