

ВИБІР СЕЛЕКТИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВІДБОРУ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ТЮТЮНУ, ОТРИМАНИХ В РЕЗУЛЬТАТІ ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ АГРОБАКТЕРІЯМИ ТРАНСФОРМАЦІЇ

Осипенко О.А.¹, Банникова М.О.², Нітовська І.О.²

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, osyenko.olena@III.kpi.ua

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Abstract. *Substituting phosphates with phosphites prevents higher plants' regeneration. The *ptxD* gene allows phosphite use and serves as a negative selection marker. Various MSR-based media with differing phosphite-phosphate ratios were tested for transformant selection. Optimal for selection of Petite Havana tobacco transformants will be a medium comprising 50% phosphates and 50% phosphites.*

Keywords: *tobacco plants, selective medium, phosphite, genetic Agrobacterium-mediated transformation by *ptxD* gene*

Вступ. Впровадження нових технологій у сільське господарство надзвичайно важливе для підвищення врожайності та стійкості рослин до стресових умов. Однією з таких технологій є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, яка дає змогу внести зміни в геном рослин шляхом переносу генетичної конструкції від агробактерії в клітини рослини з подальшим вбудовуванням гену/генів інтересу в хромосоми рослини [1].

Однак, для успішної трансформації і подальшого росту тільки трансгенних рослин (тобто для їх відбору) необхідне середовище, яке б задовольняло потреби рослин у поживних речовинах, забезпечувало оптимальні умови для їхнього росту та розвитку і містило селективний агент, що запобігає росту нетрансформованих рослин.

Фосфор є одним із найважливіших макроелементів залучених у енергетичний метаболізм, клітинний сигналінг та є структурним компонентом багатьох сполук, зокрема ДНК, РНК, АТФ, білків, фосфоліпідів, цукрів та фосфорильованих метаболітів. Фосфор надходить у рослину у вигляді неорганічного фосфату (P_i).

Альтернативним джерелом фосфору можуть бути фосфіти (Ph_i), які є побічним продуктом багатьох галузей промисловості. Але рослини та більшість інших організмів не здатні засвоювати фосфіти. Відомо, що навіть трансгенні вищі рослини, які містять ген *ptxD*, що кодує фосфітоксидоредуктазу, яка перетворює фосфіти на фосфати, не можуть рости на середовищах, що містять фосфіти як єдине джерело фосфору.

Фосфітна сполука викликає у рослин захисний відгук, допомагаючи їм боротися з патогенами. Вона пригнічує фосфорилування та конкурує з фосфатами за активні сайти у ферментах, порушуючи метаболізм у шкідливих мікроорганізмів. Це спричиняє активацію захисних молекул, таких як фітоалексини і білки, що пов'язані з патогенами, які блокують проникнення патогенів. Такий захисний механізм активує системні сигнали тривоги, сповіщаючи сусідні клітини про небезпеку, і сприяє відкладенню полісахаридів для зміцнення клітинної стінки [2].

Відомо, що навіть трансгенні вищі рослини, які містять ген *ptxD*, що кодує фосфітоксидоредуктазу, яка перетворює фосфіти на фосфати, не можуть рости на середовищах, що містять фосфіти як єдине джерело фосфору. Тому фосфіти досить часто входять до складу гербіцидів.

Але рослини, що зможуть рости на середовищах/грунтах з фосфітами в поєднанні з фосфатами, є дуже перспективними, оскільки фосфорні добрива виготовляють з фосфатної руди, запаси якої є вичерпними та невідновлювальними. Через внесення добрив в угіддя може виникнути явище евтрофікації – надмірного збагачення водних екосистем поживними речовинами, такими як азот і фосфор, що зумовлює різкий ріст водоростей та їхнє цвітіння. Цвітіння токсичних водоростей, у свою чергу, може призвести до масового відмирання риб та інших водних організмів, а також забруднення води токсинами, що створює загрозу для здоров'я людей, які використовують цю воду. Усунення цих явищ є критично важливим для збереження здоров'я водних екосистем і забезпечення безпечного доступу до води для людей і тварин [3, 4].

Тому створення таких трансгенних рослин методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є актуальною проблемою, а підбір складу селективного середовища для відбору таких рослин – однією із задач вирішення цієї проблеми.

Метою роботи є підбір селективного середовища, яке, крім фосфатів, буде містити фосфіти, що забезпечить ефективний відбір трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* сорту Petite Havana, активування їх метаболічної активності та розвитку.

Матеріали та методи. Для введення в культуру *in vitro* насіння дикого типу тютюну *Nicotiana tabacum* сорту Petite Havana стерилізували за стандартною методикою. Після стерилізації насіння пророщували на агаризованому середовищі Мурасіге-Скуга (MS) без додавання гормонів і культивували за температури 22 °С та світлового режиму 16/8 (год) світло/темрява протягом одного місяця [5]. Проростки пересаджували у банки зі свіжим MS середовищем. Рослини культивували 6 місяців, пересаджуючи їх на свіже середовище кожні 3-4 тижні. Для відбору трансформованих рослин підбирали селективне середовище, яке містить фосфіти і на якому можуть регенеруватись лише рослини, що містять цільовий ген.

Результати та обговорення. Для створення селективного середовища для відбору трансформантів (середовище MS, на якому відбувається регенерація рослин) MSR(Ph_i), в безфосфорне середовище MSR замість дигідрофосфату калію як джерела фосфору додавали дигідрофосфіт калію. Необхідно зауважити, що калій дигідрофосфіт нестабільний у разі нагрівання, тому додавали стерильний розчин 20 мМ дигідрофосфіту калію в стерилізоване безфосфорне середовище MSR перед застиганням.

Було встановлено, що після додавання розчину дигідрофосфіту калію в безфосфорне середовище MSR кінцеве рН середовища становило 5,1. Це може бути причиною відсутності регенерантів – регенерація відбувається за рН 5,6-5,7. Для стабілізації рН до середовища MSR(Ph_i) додавали MES (2-(N-морфоліно)етансульфонову кислоту).

З літературних джерел відомо, що буфер 0,05 М MES є токсичним для культур тютюну, проте буфер 0,01 М MES є нетоксичним і ефективним буфером [6]. Заради забезпечення сталого рН середовища нами було проведено ряд досліджень з додаванням різних кількостей буферу та визначено, що на 1 л середовища MSR(Ph_i) треба додавати 1,9 г MES.

Для визначення оптимального співвідношення фосфатів та фосфітів у селективному середовищі готували серію середовищ на базі MSR, які містили різні співвідношення дигідрофосфату та дигідрофосфіту калію, оскільки трансгенні вищі рослини не ростуть на середовищах з дигідрофосфітом калію як єдиним джерелом фосфору.

За селективне вважали середовище, на якому не відбувається регенерація з листових дисків (1 см²) асептичних нетрансгенних рослин тютюну.

Під час підбору селективного середовища для відбору трансформантів тютюну за геном *ptxD* було зафіксовано відсутність зміни кольору листових дисків та регенерацію з нетрансформованих рослин на середовищах, які містили 100%, 75% та 50% фосфатів; на середовищах, що містили 25% та 0% фосфатів спостерігали побіління та некроз листових дисків. Отже, селективним виявилось середовище, що має 50% фосфатів та 50% фосфітів. Після трансформації на цьому селективному середовищі для відбору успішних трансформантів має відбуватись регенерація пагонів трансформованих рослин. Водночас, на селективному середовищі на чашках Петрі з рослинами, що не були піддані трансформації, має бути виявлено відсутність регенерації.

Висновки. Встановлено, що селективним для відбору трансформантів тютюну сорту Petite Havana за геном фосфітоксидоредуктази є середовище на базі MSR, що містить 50% фосфатів та 50% фосфітів, до якого необхідно додавати буфер 1,9 г/л MES для підтримки сталого рН середовища на рівні 5,6-5,7.

Список використаної літератури:

1. Hwang H.-H., Yu M., Lai E.-M. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications // The Arabidopsis Book. 2017. Vol. 15. P. e0186. DOI: 10.1199/tab.0186.
2. Li J., Jin Q., Liang Y., Geng J., Xia J., Chen H., Yun M. Highly Efficient Removal of Nitrate and Phosphate to Control Eutrophication by the Dielectrophoresis-Assisted Adsorption Method. International journal of environmental research and public health. 19 (3) : 1890. 2022. DOI: 10.3390/ijerph19031890
3. Yang X., Wu X., Hao H., He Z. Mechanisms and assessment of water eutrophication. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 9 (3) : 197–209. 2008. DOI: 10.1631/jzus.b0710626
4. Achary VMM, Ram B, Manna M, Datta D, Bhatt A, Reddy MK, et al. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. Plant Biotechnol J. 2017 Dec;15(12): 1493-508. DOI: 10.1111/pbi.12803.
5. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Дедиференціація та вторинна диференціація в культурі *in vitro*. Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навчальний посібник для здобувачів ступеня магістра за освітньою програмою «Біотехнології» спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / І. С. Гнатюк, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова; КПІ ім. Ігоря Сікорського, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 79 с.
6. Parfitt D.E., Almehdi A.A., Bloksberg L.N. Use of organic buffers in plant tissue-culture systems // Scientia Horticulturae. 1988. Vol. 36, № 3–4. P. 157–163. DOI: 10.1016/0304-4238(88)90049-0.