

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯЦІЇ В *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНІЙ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТЮТЮНУ

Вернидуб В.А.^{1,2}, Харчук Г.В.^{2,3}, Парій М.Ф.^{2,4}, Дзуг М.С.^{2,4}, Гринюк І.І.¹

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, vernidub.vadym@iit.kpi.ua

²Всеукраїнський науковий інститут селекції

³Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

⁴Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Abstract

The study shows that the composition of the inoculation medium plays a key role in the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Nicotiana tabacum*. By comparing different media, it was determined that a formulation based on 1/2 MS supplemented with magnesium sulfate significantly improves transformation outcomes.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, inoculation medium.

Вступ. Одним із підходів для покращення характеристик сільськогосподарських рослин є методи генетичної інженерії, які дозволяють модифікувати культурні рослини та надавати їм корисних властивостей, таких як висока урожайність, стійкість до посухи, низьких температур, фітопатогенів та гербіцидів. Трансформація за допомогою ґрунтового патогена *Agrobacterium tumefaciens* вважається оптимальним методом, «золотим стандартом» завдяки високій ефективності та доступності. Метод базується на здатності агробактерії переносити специфічний фрагмент ДНК (Т-ДНК) з Ті-плазмиди безпосередньо в геном рослини. Такий підхід застосовується для введення цільових генів з використанням бінарних векторів та отримання трансгенних рослин з бажаними ознаками [1, 2]. Одним із факторів, що визначають ефективність цього процесу, є середовище для інокуляції *A. tumefaciens*, яке впливає на їх фізіологічну активність та на ефективність генетичної трансформації. На сьогодні, існує декілька варіацій складу даного середовища, які демонструють різну ефективність трансформації *Nicotiana tabacum*, тому актуальною є оптимізація складу середовища для інокуляції *A. tumefaciens* та дослідження його впливу на ефективність генетичної трансформації. Метою роботи є підбір оптимального складу середовища для інокуляції *A. tumefaciens* для генетичної трансформації тютюну.

Матеріали та методи. Тютюн *N. tabacum* вирощували в умовах *in vitro* протягом 1-2 місяців. Для генетичної трансформації використовували листки, які нарізали шматочками площею 1 см². Плазмідний вектор *A. tumefaciens* *pLTest1* штаму *LBA4404*, який містив цільові гени: маркерний – *bar* (відповідає за стійкість до фосфінотрицину) та репортерний – *ZsGreen* (відповідає за кодування білка GFP, що забезпечує зелену флуоресценцію), які використовуються для ефективного відбору трансгенних рослин в культурі *in vitro*.

A. tumefaciens культивували у рідкому середовищі LB (*Luria-Bertani*) із додаванням антибіотиків: рифампіцину (50 мг/л) та канаміцину (100 мг/л),

протягом 12 год на шейкері (150 об/хв). Наступного ранку оновлювали рідку нічну культуру бактерії, додаючи 5 мл бактеріальної суспензії у свіже середовище LB з антибіотиками та інкубували на шейкері (150 об/хв) протягом 5-6 год. Оновлену нічну культуру осаджували (5000 об/хв, $t = +4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15$ хв), отриману біомасу ресуспендували у трьох різних середовищах для інокуляції: 1/2 MS (*Murashige and Skoog*) 1,5 % сахарози (pH = 5,2) (контроль), 1/2 MS 1,5 % сахарози (pH = 5,2) + MgSO_4 (1000 мг/л) та 700J (pH = 5,6). Бактеріальні суспензії доводили до оптичної густини 0,8 та додавали ацетосирингон (100 мМ) для індукції *vir*-генів.

Листові диски *Nicotiana tabacum* поміщали в бактеріальні суспензії, ресуспендовані у трьох різних середовищах для інокуляції та проводили дворазову вакуумну інфільтрацію ($t = 2-3$ хв, $p = 150$ mbar), після чого інкубували 15 хв на шейкері (150 об/хв) та співкультивували 1 добу на фільтрувальному папері в темряві ($t = 24^{\circ}\text{C}$).

Після етапу співкультивування, експланти висаджували на регенераційне середовище MS 2% сахарози (pH = 5,7), доповнене фітогормонами – нафтилоцтовою кислотою (0,1 мг/л) та 6-бензиламінопурином (1 мг/л). Через тиждень листові диски пересаджували на селекційне середовище для відбору трансгенних рослин. Дане середовище окрім фітогормонів, містило антибіотик цефатоксим (400 мг/л) та селективний агент – фосфінотрицин (10 мг/л), який є діючою речовиною гербіциду BASTA.

Ефективність генетичної трансформації визначали як відсоткове співвідношення кількості експлантів із позитивною флуоресценцією до загальної кількості експлантів на чашці Петрі. Для кожного середовища проводили аналіз в трьох повторностях, після чого розраховували значення ефективності (%), стандартне відхилення та виконували Т-тест для оцінки вірогідної різниці.

Результати та обговорення. Згідно літературних даних для інокуляції *A. tumefaciens* на сьогодні найбільш використовують середовища MS, 1/2 MS, а також спеціалізовані середовища, зокрема 700 J [3, 4]. Середовище 1/2 MS – це поживне середовище MS з 50 % вмістом макро- та мікроелементів та сахарози, як джерела вуглецю. Середовище для інокуляції 1/2 MS з додаванням MgSO_4 , використовується для перевірки впливу іонів магнію на ДНК-полімеразу, реплікацію допоміжних-плазмід та загальну ефективність генетичної трансформації. Специфічне середовище 700 J [5], містить в складі лише мальтозу та MgSO_4 , що робить його дешевим та більш доступним в порівнянні з MS, 1/2 MS, однак відсутність макро- та мікроелементів негативно впливає на ріст та розвиток трансгенних рослин після трансформації.

Для перевірки ефективності генетичної трансформації на різних середовищах, проводили дослідження експресії репортерного гену *ZsGreen* на 7, 14 та 21 день після трансформації за допомогою опромінення лазером з довжиною хвилі $\lambda = 490$ нм. При такому опроміненні, хромофор білка GFP переходить у збуджений стан, а при поверненні до вихідного стану відбувається випромінювання світла з довжиною хвилі 509 нм, що відповідає зеленій флуоресценції у видимому спектрі.

Як видно з рис. 1, найбільшу кількість експлантів з детектованим білком GFP спостерігали вже через 7 днів для середовища інокуляції 1/2 MS з додаванням MgSO_4 . З подовженням терміну інкубації кількість листків із зеленою флуоресценцією зростала та була найбільшою на 21 добу інкубації.

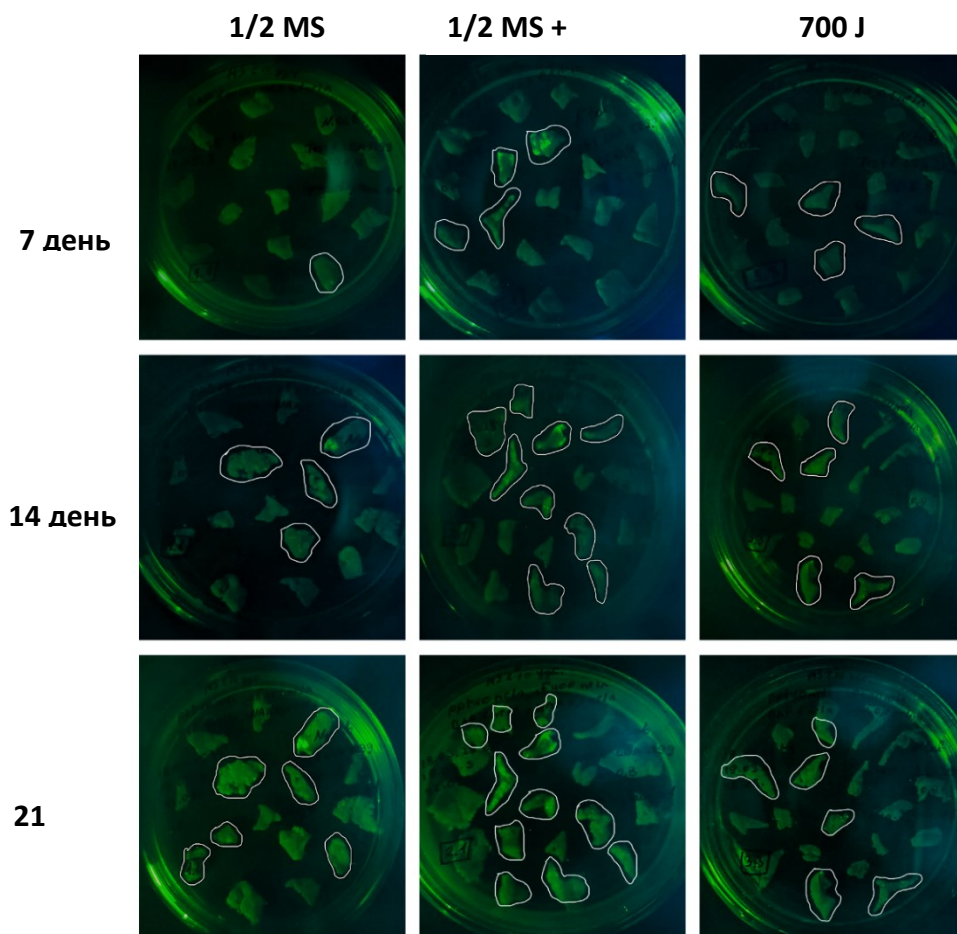


Рис. 1. Детекція білка GFP в трансформованих експлантах тютюну на 7, 14 та 21 день після інкубації у середовищі інокуляції *A. tumefaciens* 1/2 MS, 1/2 MS з додаванням MgSO_4 (1000 мг/л) та 700 J.

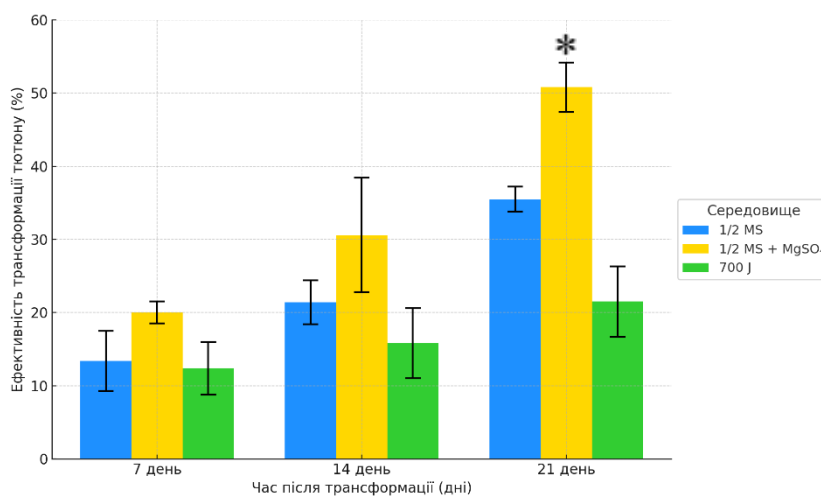


Рис. 2. Ефективність генетичної трансформації (%) *Nicotiana tabacum* на 7, 14 та 21 день після інкубації у середовищі інокуляції *A. tumefaciens* 1/2 MS, 1/2 MS з додаванням MgSO_4 (1000 мг/л) та 700 J.

Як видно з рис. 2, середовище 1/2 MS без додавання MgSO₄ продемонструвало задовільні результати, однак частка експлантів із позитивною експресією та інтенсивністю зеленої флюоресценції білка GFP була нижчою, порівняно з середовищем 1/2 MS + MgSO₄. Найвищий показник ефективності спостерігали за умови інкубації *A. tumefaciens* у середовищі 1/2 MS з додаванням MgSO₄ (1000 мг/л). Такий ефект може бути пов'язаний із тим, що магній є кофактором ДНК- полімерази, яка відповідає за синтез ДНК та сприяє реплікації великих допоміжних плазмід (30 тис.п.н.) в клітинах *A. tumefaciens*, які відповідають за синтез *vir*-генів, тим самим покращуючи загальну ефективність трансформації експлантів тютюну.

Середовище 700 J, що містить лише MgSO₄ та мальтозу, виявилось найменш ефективним. Найбільш вірогідною причиною є відсутність макро- та мікроелементів, вітамінів, які є критично важливими для підтримки життєдіяльності рослин тютюну.

Висновки. Отже, підібрано оптимальний склад середовища для інокуляції *A. tumefaciens* для генетичної трансформації тютюну. Найвищу ефективність трансформації на 21 день (50,8 %) продемонструвало середовище 1/2 MS з додаванням MgSO₄ (1000 мг/л), порівняно з середовищами 1/2 MS (35,5 %) та 700 J (21,5 %). Це свідчить про позитивний ефект іонів магнію на підвищення ефективності генетичної трансформації тютюну.

Підібраний склад найбільш ефективного середовища для інокуляції *A. tumefaciens* буде використаний для оптимізації протоколу трансформації тютюну та більш якісної перевірки роботи генетичних векторів. Середовище для інокуляції 1/2 MS з 1,5 % сахарози (pH = 5,2) з додаванням MgSO₄ може бути застосоване не тільки для трансформації тютюну, а й для трансформації інших культурних рослин, важливих для сільського господарства (кукурудза, соя, ріпак тощо), потенційно підвищуючи ефективність процесу та експресію цільових генів.

Список використаної літератури:

1. Arya A., Kumar A. *Agrobacterium* pathology and ti plasmid based vector design. *High Value Note*. Vol. 03, no. 1. 2018. pp 1 -19. URL: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29899.90406/2>.
2. Amilia Pratiwi R., Imam Surya M. *Agrobacterium*-mediated transformation. In *Genetic Transformation in Crops*. 2020. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.91132>.
3. Rosales-Campos A., Gutiérrez-Ortega A. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaf explants. *BIO-PROTOCOL*. 2019. Vol. 9, no. 2. URL: <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3150>.
4. *In vitro* regeneration of *Nicotiana tabacum* L. from callus culture / S.S. Shinde et al. 2022. Vol. 10, no. 12. P. 904-908. URL: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22131.30248>.
5. Leaf transformation for efficient random integration and targeted genome modification in maize and sorghum / N. Wang et al. *Nature Plants*. 2023. Vol. 9, no. 2. P. 255-270. URL: <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01338-0>.