

УДК 579.252.5:577.21:578.85/86

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

В.Н. РЕШЕТНИКОВ, Т.И. ФОМЕНКО, Л.Г. БЕРДИЧЕВЕЦ, М.К. МАЛЮШ

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,
 Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В,
 e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Цель. Получение линий трансгенных растений клевера лугового с целевым геном *licB*.

Методы. Методы регенерации растений в культуре ткани *in vitro*. Агробактериальная трансформация в культуре *in vitro* с использованием векторных конструкций, содержащих гены *GUS* и *licB*. **Результаты.** Разработан метод регенерации клевера лугового в культуре *in vitro* с подбором оптимального типа экспланта и фитогормонов, обеспечивающих наибольший выход растений-регенерантов. Проведена трансформация растений клевера с использованием векторной конструкции, содержащей ген *GUS*, что позволило оптимизировать условия проведения трансформации с целевым геном *licB*. С использованием метода агробактериальной трансформации семядольных листьев клевера лугового сортов Янтарный, Витебчанин, Слуцкий и *Vjursele* получены канамицин-устойчивые регенеранты клевера лугового. **Выводы.** Метод мультиплексной ПЦР позволил из первичных трансформантов клевера лугового выбрать 12 линий трансгенных растений, свободных от агробактериальной контаминации, содержащих в геноме последовательности селективного и целевого генов.

Ключевые слова: клевер луговой *Trifolium pratense* L., культура ткани *in vitro*, морфогенный потенциал, агробактериальная трансформация.

Введение. Наряду с методами традиционной селекции все шире используются биотехнологии создания трансгенных растений, позволяющие за счет расширения источника генов получать растения с целенаправленно измененным геномом [1,2]. Достижения в области модификации генома растений стали возможны благодаря исследованиям по культуре ткани *in vitro* и разработке методов регенерации растений. Наличие видовых и сортовых особенностей регенерации у бобовых в культуре *in vitro* и необходимость отбора сортов, обладающих высоким морфогенным потенциалом, предполагают разработку метода применительно к конкретному генотипу. Оценка эффективности трансформации с репортерным геном *GUS* по наличию окрашенных зон позволяет визуально судить об активности процесса и выявлять преимущество тех или иных типов эксплантов и условий проведения трансформации. Целью исследований явилась разработка метода трансформации клевера лугового ряда сортов с использованием векторных конструкций, содержащих гены *GUS* и *licB*.

Материалы и методы

При введении в культуру *in vitro* клевера лугового *Trifolium pratense* L. сортов Витебчанин, Vjursele, Слуцкий и Янтарный использовали семена, которые проращивали на среде МС при 24 °С, освещенности 3клк и 16-часовом фотопериоде. Оценку развития морфогенных процессов проводили на эксплантах гипокотилей, семядольных листьев и семядольных узлов 6–7-дневных проростков. Экспланты культивировали на среде В5 с различным сочетанием гормонов для получения активной регенерации. Трансформацию эксплантов клевера проводили штаммом *A.tumefaciens* CBE21, содержащим бинарный вектор р35SGUSint, методом кокультивирования их на агаризованной среде [3]. Экспрессию GUS в трансформированных тканях детектировали гистохимически [4].

Трансформацию эксплантов клевера целевым геном проводили с использованием штамма *A. tumefaciens* C58C1 [pGV3850] с плазмидой E35S-licBSK, содержащей ген *licB*, кодирующий фермент b-1,3-1-4-глюканазу. Инокуляцию эксплантов семядольных листьев агробактериальным штаммом проводили в среде В5, содержащей 100 мкМ ацетосирингона и 10 г/л глюкозы, в течение 30 мин. Кокультивирование проводили в темноте при 24 °С в течение трех суток на среде В5, содержащей 0,1 мг/л α -НУК, 4 мг/л БАП. Последующее культивирование проводили с добавлением 500 мг/л цефотаксима.

Результаты и обсуждение

Разработку метода регенерации клевера лугового в культуре *in vitro* проводили с подбором оптимального типа экспланта и фитогормонов, обеспечивающих наибольший выход растений регенерантов [5, 6]. Оценка морфогенного потенциала эксплантов гипокотилей сортов Vjursele, Слуцкий, Янтарный и Витебчанин показа-

ла невысокую частоту регенерации у всех исследованных сортов с максимумом для сорта Витебчанин (14,5%), что недостаточно для проведения эффективной трансформации. Морфогенный потенциал эксплантов семядольных листьев, у которых сохраняли черешок с пазушной меристемой у основания, оценивали на среде В5, содержащей 0,1 мг/л α -НУК и БАП в концентрации 1, 2, 4, 6 мг/л (табл. 1). Оптимальной средой для получения прямого и непрямого морфогенеза являлась среда, содержащая 4 мг/л БАП.

Таблица 1. Влияние концентрации БАП на морфогенную активность семядольных листьев сортов клевера лугового

Сорт	Концентрация БАП, мг/л	Частота регенерации, %
Vjursele	1	24,5
	2	36,0
	4	45,8
	6	43,4
Витебчанин	1	18,9
	2	19,5
	4	25,7
	6	22,1
Янтарный	1	31,0
	2	35,3
	4	38,9
	6	28,6

Наибольшую морфогенную активность на этой среде проявил сорт Vjursele (45 %). Несколько ниже этот показатель у семядольных листьев сортов Янтарный (39 %) и Витебчанин (26%). Таким образом, семядольные листья, обладающие достаточно высоким морфогенным потенциалом, можно использовать в качестве эксплантов при проведении трансформации.

Экспланты семядольных узлов показали высокую морфогенную активность на среде В5 в широком диапазоне концентраций БАП (1-6 мг/л). Определено влияние генотипа клевера лугового и концен-

траций БАП на частоту побегообразования на эксплантах семядольных узлов сортов клевера лугового в первом и втором пассаже (табл.2). Показана высокая морфогенная активность для всех исследованных генотипов во втором пассаже в интервале концентраций 2–6 мг/л БАП.

Прямой стеблевой органогенез у основания семядольных узлов развивается одновременно с образованием морфогенного каллуса с плотной крупнозернистой структурой, компетентного к регенерации растений. Наибольшая каллусогенная активность для всех генотипов наблюдалась на среде, содержащей 4 мг/л БАП. Отмечено, что интенсивность этого процесса у сортов Витебчанин, Слуцкий и Янтарный на этой среде была приблизительно одинаковой, а на эксплантах сорта Vjursele каллусогенез протекал менее активно. Последующее пассирование семядольных узлов на среды с таким же гормональным составом повышало частоту регенерации побегов.

Одновременно с увеличением частоты регенерации увеличивалось число побе-

гов, образовавшихся на одном экспланте. Среднее число регенерантов на эксплант варьировало от $1,5 \pm 0,8$ побегов у сорта Янтарный на среде, содержащей 1 мг/л БАП, до $11,3 \pm 8,8$ побегов у сорта Слуцкий на среде, содержащей 6 мг/л БАП. Хотя наибольшую индукцию побегов у всех исследуемых сортов наблюдали на этой среде, однако полученные регенеранты отличались мелким размером и низкой жизнеспособностью. Достоверные отличия между сортами по числу побегов, образовавшихся на одном экспланте, не были установлены из-за большого разброса данных в выборке (табл.3).

Проведенные исследования морфогенных процессов на эксплантах семядольного узла сортов клевера лугового показали их высокий морфогенный потенциал и активное побегообразование в результате развития прямого и непрямого морфогенеза (рис. 1). При концентрации БАП в среде культивирования 4 мг/л у всех исследованных сортов отмечен сравнительно высокий уровень как прямого (выше 80%), так и непрямого морфогенеза (выше

Таблица 2. Влияние генотипа клевера лугового и концентраций БАП на частоту побегообразования на эксплантах семядольных узлов сортов клевера лугового в первом и втором пассажах

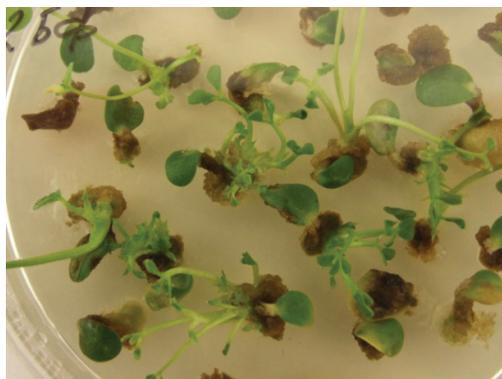
Концентрация БАП, мг/л	Частота множественного побегообразования, %							
	Сорт, пассаж							
	Витебчанин		Vjursele		Слуцкий		Янтарный	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	21,7	64,7	15,0	56,3	0	55,6	0	30,0
2	49,2	76,2	32,0	70,8	9,5	78,9	5,2	80,1
4	50,3	90,9	36,4	87,5	9,5	89,5	8,2	86,4
6	56,5	95,9	47,4	89,5	14,3	93,5	12,0	90,4

Таблица 3. Влияние генотипа клевера лугового и концентраций БАП на количество побегов, образовавшихся на семядольных узлах

Концентрация БАП, мг/л	Среднее число побегов на эксплант, шт.			
	Витебчанин	Vjursele	Слуцкий	Янтарный
1	$3,4 \pm 3,1$	$4,7 \pm 3,8$	$2,6 \pm 2,0$	$1,5 \pm 0,8$
2	$5,2 \pm 2,3$	$5,8 \pm 5,1$	$4,0 \pm 3,1$	$3,2 \pm 1,9$
4	$9,1 \pm 6,7$	$6,9 \pm 4,3$	$8,8 \pm 6,1$	$8,2 \pm 5,9$
6	$9,9 \pm 8,1$	$9,0 \pm 6,0$	$11,3 \pm 8,8$	$8,4 \pm 7,5$



а



б

Рис. 1. Множественное побегообразование на эксплантах семядольных узлов (а) и черешках семядольных листьев (б) клевера лугового сорта Витебчанин на среде Б5, содержащей 4 мг/л БАП

50%), что дает возможность использовать эти экспланты при проведении трансформации.

При разработке метода генетической трансформации использовали репортерный ген GUS, позволивший визуально оценивать активность транзientной экспрессии по окрашенным зонам в фиксированном растительном материале. С целью установления оптимальных условий агробактериальной трансформации проводили анализ эффективности транзientной экспрессии GUS при кокультивировании эксплантов с погружением части экспланта семядольного узла в среду или на агробактериальном газоне. Для кокультивирования использовали среду B₅, содержащую 4мг/л БАП и 0,1мг/л α-НУК, которое проводили в темноте при 24 °С в течение четырех суток. Наибольшая частота экспрессии GUS в меристемной зоне семядольного узла получена при погружении части экспланта (гипокотыля) в среду (рис. 2). Этот вариант отмечен нами как оптимальный, так как эффективная регенерация растений клевера осуществляется за счет развития меристемных зон и поэтому возрастает вероятность получения трансформированных регенерантов. Также

провели оценку экспрессии GUS на эксплантах семядольных листьев, которые отделялись от семядольного узла с участком меристемы у основания черешка. Хотя частота экспрессии на листовых пластинках была выше, чем в других частях экспланта, интерес представляла экспрессия гена GUS в области черешка, базальная часть которого обладает высоким морфогенным потенциалом и возможностью развития как прямого, так и непрямого морфогенеза.

Эффективность переноса Т-ДНК в ткани растений зависит от присутствия в среде веществ, активирующих гены вирулентности *Agrobacterium tumefaciens*. С целью исследования влияния ацетосирингона на процесс инфицирования агробактерией семядольных узлов клевера проводили анализ эффективности транзientной экспрессии GUS при добавлении ацетосирингона в концентрации 100 мкМ только в среду для инокуляции, а во втором варианте – дополнительно и в среду для кокультивирования (рис. 2). После 30-минутной инокуляции экспланты высаживали на среду B₅, содержащую 4мг/л БАП, 0,1мг/л α-НУК. Кокультивирование прово-

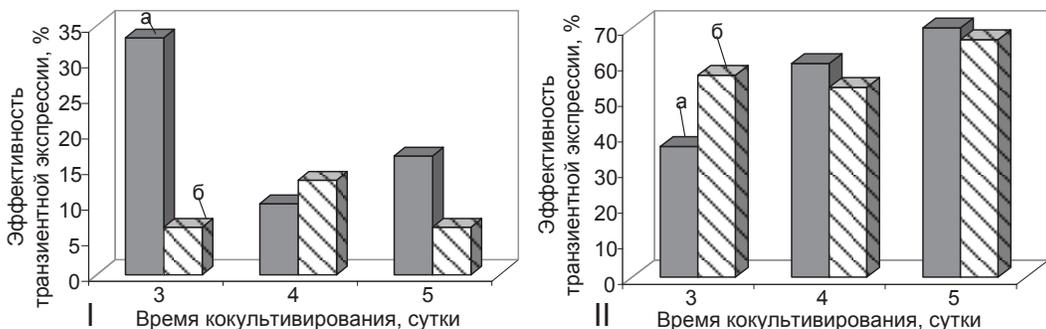


Рис. 2. Влияние продолжительности периода кокультивирования с *A. tumefaciens* CBE21 и положения экспланта (I, II) на среде культивирования на транзистентную экспрессию GUS в различных эксплантах клевера лугового сорта Янтарный: а – семядольный лист; б – меристемная зона семядольного узла; I – на фильтровальной бумаге, лежащей на поверхности агаризованной среды; II – при погружении гипокотыля в среду культивирования

дили в течение 3 суток в темноте при 24,5 °С.

Добавление 100 мкМ ацетосирингона в среду на разных этапах трансформации повышало частоту транзистентной экспрессии GUS в 1,8 раза по сравнению с контролем. Использование ацетосирингона не только при инокуляции, но и при кокультивировании увеличивало частоту транзистентной экспрессии как в сравнении с контролем, так и с другим вариантом (в 2,2 и 1,2 раза соответственно). Показано, что при добавлении в среду инокуляции ацетосирингона частота транзистентной экспрессии GUS в области меристемной зоны семядольного узла и гипокотыля увеличивалась по сравнению с контролем (в 2,4 и 1,2 раза соответственно). Использование глюкозы при трансформации клевера лугового штамм *A. tumefaciens* CBE21 повышало экспрессию GUS. Наибольшую эффективность экспрессии GUS наблюдали в варианте, в котором экспланты, подвергшиеся поранению, кокультивировали на среде, содержащей 10 г/л глюкозы. Отсутствие глюкозы приводило к понижению частоты экспрессии GUS в 1,6 раза. Одновременно в 1,4 раза понизилось и количество окрашенных зон на эксплантах. Подобная зависимость наблюдалась и в вариантах, в

которых были использованы экспланты не подвергшиеся поранению.

При оптимизации времени и концентрации агробактерий при кокультивировании эксплантов семядольных листьев показано, что использование агробактериальной суспензии с оптической плотностью (OD_{600}) 0,6 оказалось предпочтительнее по сравнению с оптической плотностью 0,8. Среднее число окрашенных зон на эксплантах в этом варианте также было выше, а после кокультивирования в течение 6 дней было множественным. Хотя наилучшие результаты были получены при 6-дневном кокультивировании, в последующем при проведении агробактериальной трансформации целесообразно проводить кокультивирование в течение 4 дней, так как в этом случае уменьшается опасность нежелательного развития агробактерии при дальнейшем культивировании эксплантов даже на среде с антибиотиками. Также исследовано влияние поранения эксплантов семядольных листьев на эффективность транзистентной экспрессии GUS при трансформации клевера лугового. Анализ результатов показал, что частота транзистентной экспрессии была сравнительно высокой (55–60%). Локализация зон с транзистентной экспрессией GUS на-

блюдалась во всех частях экспланта. В то же время отмечено, что поранение эксплантов семядольных листьев клевера увеличило частоту транзientной экспрессии GUS в области базальной части черешка в 1,3 раза, что может являться одним из факторов повышения эффективности трансформации.

На основании результатов проведенных исследований по трансформации агробактериальным штаммом с векторной конструкцией, содержащей ген GUS, проведена агробактериальная трансформация клевера лугового сортов Янтарный, Витебчанин и Vjursele с использованием штамма *A.tumefaciens* E35S-licBSK. В качестве эксплантов использовали семядольные листья 7-дневных проростков клевера лугового сортов Янтарный, Витебчанин и Vjursele. Инокуляцию эксплантов агробактериальным штаммом проводили в среде B5, содержащей 100 мкМ ацетосирингона и 10 г/л глюкозы, в течение 30 минут. Кокультивировали в темноте при 24 °С в течение трех суток на среде, содержащей 4 мг/л БАП и 0,1 мг/л α -НУК. Культивирование проводили на аналогичной среде для индукции морфогенеза, содержащей 500 мг/л цефотаксима, в люминостате при температуре 22 °С, освещенности 3 клк и 16-часовом фотопериоде. После 3 недель культивирования экспланты переносили на среду с более низким содержанием БАП (2 мг/л).

Показано, что уже в первом пассаже наблюдалась инициация морфогенеза у всех исследованных сортов (табл. 4). У сортов Витебчанин и Янтарный частота морфогенеза была близкой (21,9 и 21,6% соответственно). Морфогенная активность у сорта Vjursele была в 1,7 раза выше, чем у остальных сортов. В последующем пассаже частота регенерации возрастала у всех сортов. Частота морфогенеза на эксплантах сортов Янтарный и Vjursele приближалась к 40%. У сорта Витебчанин она была несколько ниже

(29,1%). Следует отметить, что морфогенная активность на эксплантах, не подвергшихся трансформации, для всех сортов была выше, чем у трансформированных эксплантов. Так у сорта Vjursele, характеризующегося наибольшей морфогенной активностью, частота регенерации в первом пассаже составила 45,8%. Если в первом пассаже частота некроза у сортов отличалась и не превышала 14,2% (сорт Витебчанин), то в последующем пассаже у всех сортов этот показатель был приблизительно одинаковым (около 30%). Такая высокая частота некрозов объясняется негативным влиянием агробактериальной трансформации на развитие эксплантов.

При последующем культивировании были использованы селективные среды, в которых концентрация канамицина постепенно увеличивалась. Отмечено, что уже при концентрации селективного агента 20 мг/л наблюдали побеление и гибель части регенерантов (табл. 5). Повышение концентрации канамицина до 50 мг/л увеличивало число погибших регенерантов.

В результате проведенных исследований по агробактериальной трансформации семядольных листьев клевера лугового сортов Янтарный, Витебчанин и Vjursele было получено 15 канамицин-устойчивых регенерантов клевера лугового сорта Витебчанин, 6 регенерантов сорта Янтарный и 4 регенеранта Vjursele.

Проведен анализ канамицин-устойчивых первичных трансформантов клевера лугового сорта Витебчанин на присутствие в геноме перенесенных генов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции [7]. Проанализирована геномная ДНК 15 растений-регенерантов клевера лугового, укоренившихся на среде с селективным агентом. Анализ проводили с использованием трех пар праймеров, специфических к последовательностям: 1) целевого гена *licB*; 2) селективного гена *nptII*; 3) гена вирулентности *virE* использованного

Таблица 4. Влияние генотипа клевера лугового на морфогенную активность семядольных листьев, трансформированных штаммом *A. tumefaciens* C58 des12licB

Сорт	Частота каллусогенеза, %		Частота морфогенеза, %		Частота некроза, %	
	I пассаж	II пассаж	I пассаж	II пассаж	I пассаж	II пассаж
Вјursele	88,2	93,5	36,5	38,9	8,9	33,5
Витебчанин	93,7	97,8	21,9	29,1	14,2	30,6
Янтарный	74,4	88,8	21,6	37,6	2,4	33,2

Таблица 5. Устойчивость регенерантов сортов клевера лугового к канамицину

Сорт	Количество канамицин-устойчивых регенерантов, %	
	Км 20 мг/л	Км 50 мг/л
Вјursele	23,5	4,7
Витебчанин	11,0	3,3
Янтарный	20,8	2,4

штамма *A. tumefaciens* (для подтверждения отсутствия агробактериальной контаминации в образцах геномной ДНК). Метод мультиплексной ПЦР позволил из первичных трансформантов клевера лугового выбрать 12 линий трансгенных растений, свободных от агробактериальной контаминации, содержащих в геноме последовательности селективного и целевого генов.

Выводы

Разработанный метод регенерации растений позволил определить экспланты семядольных листьев и семядольного узла как наиболее подходящие для проведения трансформации. Оценка уровня транзientной экспрессии GUS эксплантов семядольного узла и семядольных листьев клевера лугового сорта Янтарный также показала перспективность использования этих эксплантов при проведении трансформации. Анализ эффективности транзientной экспрессии GUS позволил использовать полученные результаты для оптимизации условий трансформации клевера целевым геном. В результате трансформации клевера целевым геном licB сортов Витебчанин и Янтарный получены опытные образцы трансгенных растений.

Список литературы

1. Christiansen P., Gibson J.M., Moore A., Pedersen C., Tabe L., Larkin P.J. Transgenic *Trifolium repens* with foliage accumulating the high sulphur protein, sunflower seed albumin // *Transgenic Research*. – 2000. – Vol.9, № 2. – P. 103–113.
2. Sullivan M.L., Quessenberry K.H. Agrobacterium protocols. Red clover (*Trifolium pratense*) // *Methods mol. Biol.* – 2006. – Vol. 343. – P. 369–383.
3. Horsch, R.B., Fry J., Hoffman N. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science*. – 1985. – Vol. 227. – P. 1229–1231.
4. Jefferson R. β -glucuronidase from *Escherihia coli* as a Gene-Fusion Marker // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. – Vol. 83. – P. 8447–8451.
5. Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Индуцированный морфогенез в культуре тканей клевера лугового (*Trifolium Pratense* L.) // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы III Междунар. науч. конф. – Минск, 2005. – С. 29.
6. Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К. Разработка методов регенерации побегов клевера лугового в культуре ткани *in vitro* // Земледелие и селекция в Беларуси: Сб. науч. тр./ РУП «Науч.-практ. центр НАН Беларуси по земледелию» – 2007. – № 43 – С. 394–407.
7. Berdichevets I. N., Shimshilashvili H. R., Gerasymentko I. M., Sindarovska Y. R., Sheludko Y. V., Goldenkova-Pavlova I. V. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol. 397. – P. 2289–2293.

Представлена М.В. Кучуком
Поступила 11.10.2012

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН
КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ (*TRIFOLIUM
PRATENSE* L.) З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ
АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

В.Н. Решетников, Т.И. Фоменко,
Л.Г. Бердичевец, М.К. Малюш

ДНУ «Центральний ботанічний сад НАН Білорусі»
Білорусь, 220012, Мінськ, вул. Сурганова, 2В
e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Мета. Отримання ліній трансгенних рослин конюшини лучної з цільовим геном *licB*. **Методи.** Методи регенерації рослин в культурі тканини *in vitro*. Агробактеріальна трансформація в культурі *in vitro* з використанням векторних конструкцій, що містять гени *GUS* і *licB*. **Результати.** Розроблено метод регенерації конюшини лучної в культурі *in vitro* з підбором оптимального типу експланта і фітогормонів, що забезпечують найбільший вихід рослин-регенерантів. Проведено трансформацію рослин конюшини з використанням векторної конструкції, яка містить ген *GUS*, що дозволило оптимізувати умови проведення трансформації з цільовим геном *licB*. Із застосуванням методу агробактеріальної трансформації сім'ядольних листків конюшини лучної сортів Янтарний, Вітебчанин, Слуцький і Bjursele отримані канамицин-стійкі регенеранти. **Висновки.** Метод мультиплексної ПЛР дозволив з первинних трансформантів конюшини лучної вибрати 12 ліній трансгенних рослин, вільних від агробактеріальної контамінації, що містять в геномі послідовності селективного та цільового генів.

Ключові слова: конюшина лучна *Trifolium pratense* L., культура тканини *in vitro*, морфогенний потенціал, агробактеріальна трансформація.

TRANSGENIC RED CLOVER (*TRIFOLIUM
PRATENSE* L.) PLANTS OBTAINING BY AGRO-
BACTERIAL TRANSFORMATION METHOD

V.N. Reshetnikov, T.I. Fomenko, L.G. Berdichevets, M.K. Malyush

GSI «Central botanical garden of NAS of Belarus»
Belarus, 220012, Minsk, Surganov st., 2V
e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Aim. The obtaining of red clover transgenic lines carrying *licB* target gene. **Methods.** Methods of plant regeneration *in vitro* culture. Agrobacterial transformation *in vitro* culture with use of vector constructions containing *gus* and *licB* genes. **Results.** The method of red clover regeneration *in vitro* culture with selection of optimum type explants and phytohormones providing the greatest amount of plant regenerants was developed. Transformation of clover plants with use of vector construction containing gene *gus* is carried out that allowed to optimize transformation conditions with target gene *licB*. With use cotyledonous leaves agrobacterial transformation method of red clover cultivars Yntarny, Vitebchanin, Slutskiy and Bjursele kanamycin resistant regenerants were obtained. **Conclusions.** The method of multiplex PCR allowed to choose 12 lines of transgenic plants from primary red clover transformants free from agrobacterial contamination and carrying within genome sequences of selective and target genes.

Key words: red clover *Trifolium pratense* L., *in vitro* tissue culture, morphogenic potential, agrobacterial transformation.