

БУЗІАШВІЛІ А. Ю.[✉], ЄМЕЦЬ А. І.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yemets.alla@gmail.com

[✉] buziashvili.an@gmail.com, (095) 302-89-30

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КАРТОПЛІ ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ

Мета. Створення нових українських сортів картоплі, що мають комплексну стійкість до фітопатогенів. **Методи.** Перенесення гена лактоферину людини (*hLf*), що забезпечує стійкість до різних патогенів, у геном картоплі сортів Вернісаж та Зарево української селекції було проведено за використання *Agrobacterium*-опосередкованого методу трансформації. Для трансформації використовували супервірулентний штам *A. tumefaciens* ЕНА 105 із інтегрованою плазмідною рBin35LF, що містила ген *hLf* та ген стійкості до канаміцину. Селекцію здійснювали протягом 3 місяців на середовищах МСК-С1 та МСК-С2, доповнених 100 мг/л канаміцину. Інтеграцію гена лактоферину підтверджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції за використання специфічних праймерів до гена *hLf*. **Результати.** У результаті селекції було отримано лінії рослин картоплі, стійкі до канаміцину. Інтеграцію цільового гена було підтверджено в 1 лінії сорту Зарево та 3 лініях сорту Вернісаж. Частота трансформації для сорту Вернісаж становила 6,8 %, сорту Зарево – 6,25 %. **Висновки.** Відібрані лінії будуть використані в подальших дослідженнях щодо вивчення стійкості рослин, що експресують ген *hLf*, до бактеріальних та грибних патогенів.

Ключові слова: ген лактоферину людини *hLf*, *Solanum tuberosum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, трансгенні рослини.

Картопля (*Solanum tuberosum*) є однією із найважливіших овочевих культур в Україні і у всьому світі, її значення важко переоцінити. Бульби картоплі мають високі смакові та поживні якості; ця культура широко використовується для прямого споживання, технічної переробки і як корм для тварин [1]. Вирощування картоплі пов'язане із високим ризиком зараження фітопатогенами вірусної, бактеріальної та грибної етіології, що призводить до значних (25–85 %) втрат врожаю [2]. Створення нових сортів кар-

топлі, що мають комплексну довготривалу стійкість до найбільш шкочинних фітопатогенів (фітофтороз, рак, бактеріальні гнилі), є актуальним завданням, яке дозволить вирішити проблеми затрат на засоби хімічного захисту рослин та забруднення навколишнього середовища [3].

Одним із ефективних способів вирішення окресленої проблеми є використання генетичної інженерії для перенесення генів стійкості до широкого спектра фітопатогенних мікроорганізмів у геном важливих у сільському господарстві видів рослин. Одним із таких генів є лактоферин людини – білок із родини трансферинів, що міститься у великій кількості у молоці та інших секреторних рідинах. Цей білок є компонентом неспецифічного природного імунітету людини, оскільки має противірусну, антибактеріальну, фунгіцидну, протизапальну, протипухлинну та ін. властивості [4]. Отже, перенесення гена лактоферину людини (*hLf*) в геном рослин-реципієнтів може підвищити стійкість рослин до бактеріальних, грибних та вірусних патогенів – такі ефекти були підтверджені у попередніх дослідженнях на тютюні, рисі, пшениці, ячмені та ін. сортах рослин [4, 5].

У цій роботі було проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію геном лактоферину людини (*hLf*) двох українських сортів картоплі – Вернісаж та Зарево. Інтеграцію цільового гена підтверджували за допомогою ПЛР-аналізу із праймерами, специфічними до *hLf*.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Як вихідний матеріал використовували сорти картоплі Вернісаж (столовий) та Зарево (технічний) із колекції Інституту картоплярства НААН України. Рослини картоплі розмножували мікроклонально в 20 см пробірках на живильному середовищі МСК (4,3 г/л мікро- та макросолей МС [6], 10 г/л са-

харози, 0,8 мг/л піридоксину, 2 мг/л тіаміну, 10 г/л агару, рН 5.7).

Agrobacterium-опосередкована трансформація. Трансформацію картоплі проводили за використання *A. tumefaciens* штаму ЕНА 105 із стабільно інтегрованою бінарною плазмідною рBin35Lf, що містила ген лактоферину людини (*hLf*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти та октопінового термінатора і ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцину (рис. 1) [7].

Трансформацію здійснювали за такою схемою (рис. 2) [7]. Як експланти використовували міжвузлові ділянки стебла довжиною 1–1,5 см, що містили 1–2 бічні бруньки. Одразу після отримання експлантів проводили їх інюляцію нічною культурою агробактерії, вирощеної в середовищі LB ($OD_{600}=0.4-0.8$). В одному експерименті використовували 20–50 експлантів.

Інокуляцію проводили протягом 30 хв у присутності 40 мМ ацетосирингону, після чого міжвузля просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МСК-К (4,3 г/л мікро- та макросолей МС [6], 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л міо-інозитулу, 0,5 мг/л БАП (бензиланінопурина), 0,25 мг/л 2,4-Д, 10 г/л агару, рН 5,7) для кокультивування протягом 16 год у темряві за 28°C.

Селекцію здійснювали на середовищі МСК-С1 на основі МСК-К із додаванням 100 мг/л канаміцину та 300 мг/л цефотаксиму. Селекцію експлантів на цьому середовищі проводили протягом 1 місяця до появи регенерантів довжиною 1,5–2,5 см, які відокремлювали та переносили у пробірки із середовищем МСК-С2 (на основі МСК із додаванням 100 мг/л канаміцину та 300 мг/л цефотаксиму) для подальшої селекції протягом 2–3 місяців. Частоту трансформації за результатами селекції підраховували через 3 місяці як відношення кількості експлантів, на яких з'явилися рослини-регенеранти, до загальної кількості використаних для трансформації експлантів.

Надалі ті регенеранти, які мали яскраво-зелений колір та морфологію, схожу до контрольних рослин, переносили на середовище МСК-Р для відновлення після селекції та елімінації залишків клітин бактерії. Після цього етапу здійснювали мікроклональне розмноження трансформованих ліній рослин для проведення молекулярно-генетичного аналізу з метою підтвердження інтеграції *hLf* та подальших досліджень.

ПЛР-аналіз трансгенних ліній. Генотипу ДНК виділяли із 200–300 мг рослинної тканини за допомогою цетилтриметил амоній броміду (метод ЦТАБ) [8]. ПЛР здійснювали, використовуючи праймери, специфічні до гена лактоферину людини: GLF (5'-TGTCCTTCCTCGTCCTGC-TGTTCC-3') та GLR (5'-CATACTCGTCCCTTTCAGCCTCG-3'), розмір амплікона становив 734 п. о. Ампліфікацію проводили на апараті PCR Applied Biosystem 2720 (США). Реакційна суміш для ПЛР містила 5x буфер для Taq-полімерази, буфер, що містив йони Mg^{2+} (Helicon), 50–100 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ кожного праймера, 200 мкМ кожного дНТФ та 0,5 од. Taq-ДНК-полімерази (Fermentas, Литва). Умови реакції були такими: первинна денатурація протягом 3 хв за 94°C; 45 циклів по 30 с за 94°C, 30 с за 62°C, та 1 хв за 72°C; остаточний синтез – протягом 7 хв за 72°C. Результати ПЛР візуалізували після проведення електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі за допомогою етидіум броміду. Частоту трансформації за результатами молекулярно-генетичного аналізу обраховували як частку регенерантів, у яких було підтверджено інтеграцію цільового гена, до загальної кількості відібраних у результаті селекції ліній [7].

Статистичний аналіз. Експерименти із трансформації картоплі повторювали 3 або більше разів, достовірність результату підтверджували за t-критерієм Стьюдента для 5 % рівня значущості. Статистичну обробку результатів проводили за використання програмного пакета Microsoft Office Excel 2010.

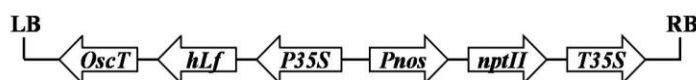


Рис. 1. Схема плазмиди рBin35LF. LB та RB – ліва та права межі Т-ДНК, *OscT* – октопіновий термінатор, *hLf* – ген лактоферину людини, *P35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, *Pnos* – промотор нопалінсинтази, *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази, *T35S* – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.



Рис. 2. Загальна схема експерименту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації картоплі.

Результати та обговорення

Agrobacterium-опосередкована трансформація картоплі та отримання трансгенних ліній, що несуть ген *hLF*. Селекцію трансформованих експлантів картоплі сортів Вернісаж та Зарево проводили протягом 1 місяця на середовищі МСК-С1, аналогічному за складом до середовища МСК-К, але доповненому 100 мг/л канаміцину та 300 мг/л цефотаксиму. Таке середовище містило цитокинін БАП у концентрації 0,5 мг/л та ауксин 2,4-Д у концентрації 0,25 мг/л – для такої комбінації фітогормонів спостерігали високу частоту регенерації трансформованих експлантів картоплі обох сортів (рис. 3, а, б; рис. 4, а) [9]. Через 1 місяць селекції на середовищі МСК-С1 (рис. 3, а, б) помітити високу (вище 50 %) частоту регенерації трансформованих експлантів, що може свідчити про високий потенціал регенерації обох сортів картоплі. При цьому сорт Вернісаж мав вищий потенціал регенерації, ніж сорт Зарево.

Регенеранти, що утворилися із бічних бруньок, відділяли від пагонів та переносили в пробірки з середовищем МСК-С2 для подальшої

селекції протягом 2–3 місяців на середовищі МСК-С2 для забезпечення стабільної інтеграції трансгена в геном трансформованих ліній.

Протягом наступних 2 місяців селекції частина рослин-регенерантів втрачала зелений колір, припиняла ріст та відмирала. Ті регенеранти, що залишалися живими, мали яскраво-зелений колір і морфологію стебел та листя, схожу до контрольних рослин (рис. 3, с–f, h, i). Слід зазначити, що для контрольних рослин картоплі сорту Вернісаж були характерні більш довгі міжвузля (1,5–2,5 см), товсті соковиті стебла та більш великі листки (1,5–2 см), а також інтенсивне утворення мікробульб (рис. 3, с, d), в той час як для сорту Зарево – більш густе розміщення листків (довжина міжвузль – 1–1,5 см), більш жорсткі стебла та менші за розміром листки (1–1,5 см) і відсутність мікробульб (рис. 3, h). Після 3 місяців селекції регенеранти мали морфологію, схожу до контрольних рослин, але в умовах селективного тиску їх ріст значно затримувався (рис. 3, e, f, i). На трансгенних лініях картоплі сорту Вернісаж також спостерігали утворення мікробульб (рис. 3, e), для ліній картоплі сорту Зарево було характерне інтенсивне галузнення пагона (рис. 3, i). Після 3 місяців селекції життєздатні трансгенні лінії переносили на середовище МСК-Р. Через місяць культивування на цьому середовищі в трансформованих рослинах відновлювався метаболізм, і за морфологією вони не відрізнялися від контрольних (рис. 3, с, g, h, j).

Через 3 місяці селекції частота трансформації становила для сорту Вернісаж – 30,2 %, для сорту Зарево – 18,5 % (рис. 4, а). Такі значення частоти трансформації є високими – у [10] повідомляють про частоту трансформації листкових дисків картоплі на рівні 15 %, у [11] – від 9,1 до 46,7 %. Отже, використана нами методика трансформації є досить ефективною.

ПЛР аналіз трансгенних ліній. Після регенерації картоплі на середовищі МСК-Р для ПЛР-аналізу було відібрано 44 рослини сорту Вернісаж та 16 ліній сорту Зарево. В результаті проведення ПЛР із специфічними праймерами до гена лактоферину людини було виявлено 1 лінію картоплі сорту Зарево (рис. 5, а) та 3 лінії сорту Вернісаж (рис. 5, б), що експресують ген *hLf*.

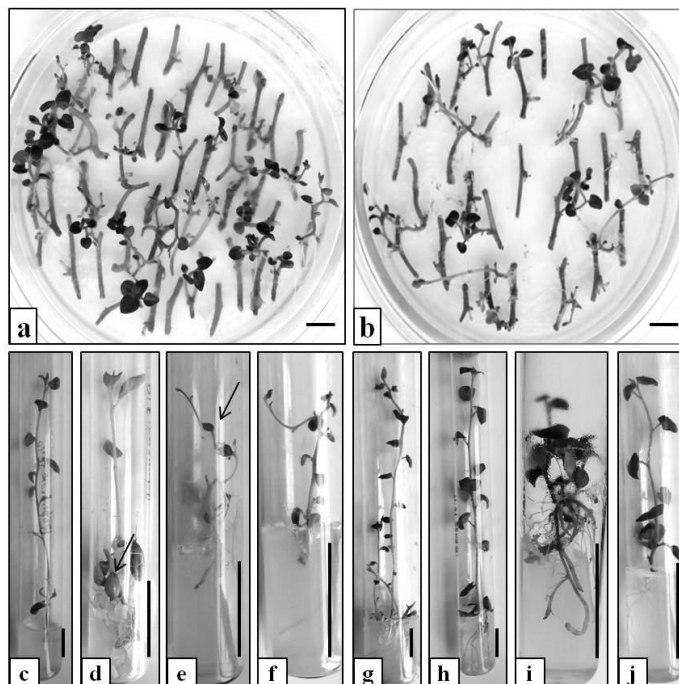


Рис. 3. Регенерація експлантів картоплі, трансформованих *hLf*, через 1 (a, b) та 3 місяці (e, f, i) місяці селекції, а також контрольні рослини (c, d, h) та регенеранти на середовищі МСК-Р (g, j): a, c–g – картопля сорту Вернісаж, b, h–j – картопля сорту Зарево. Масштабна відмітка: 1 см.

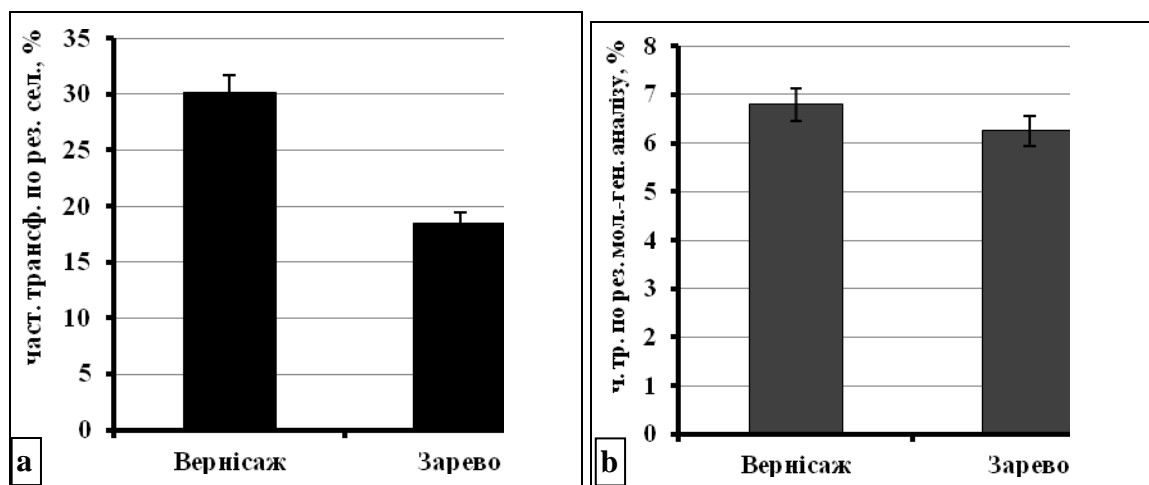


Рис. 4. Частота трансформації картоплі сортів Вернісаж та Зарево за результатам селекції (a) та за результатами молекулярно-генетичного аналізу (b).

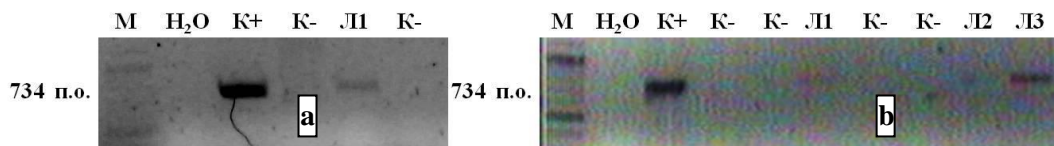


Рис. 5. Результати ПЛР аналізу трансгенних ліній картоплі сорту Зарево (a) та Вернісаж (b): М – молекулярний маркер GeneRuler 100 bp Plus (ThermoScientific, USA), К+ – позитивний контроль (плазміда рВін35LF), Н₂О – ампліфікація без і ДНК, К- – контрольні нетрансгенні лінії Л1, Л2, Л3 – трансгенні лінії, з інтегрованим в їх геном геном *hLf*.

Отже, за результатами молекулярно-генетичного аналізу було встановлено, що частота трансформації геном лактоферину людини становила 6,8 % для сорту Вернісаж та 6,25 % для сорту Зарево (рис. 4, б).

Отримані нами значення частоти трансформації за результатами молекулярно-генетичного аналізу є досить високими та відповідають даним, отриманим іншими авторами. Так, у [12] частота трансформації картоплі за результатами ПЛР-аналізу була на рівні 0,5–18,4 %.

Висновки

Проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію картоплі сортів Вернісаж та Зарево геном лактоферину людини та підтверджено інтеграцію *hLf* в геном відібраних у результаті селекції ліній за допомогою ПЛР. Частота

трансформації за результатами становила 6,8 % для сорту Вернісаж та 6,25 % для сорту Зарево – такі значення частоти трансформації за результатами ПЛР-аналізу відповідають даним, отриманим в інших роботах [12]. Одержані нами трансгенні лінії картоплі із геном лактоферину людини будуть використані в подальших дослідженнях із вивчення у них стійкості до бактеріальних та грибних патогенів.

Робота виконана за підтримки проекту «Застосування гена лактоферину для створення стійких до фітопатогенів ліній рослин родини Solanaceae» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2015–2019 рр.)

References

1. Nemerytska L.V. The causals of the mixed potato rots and limitation measures of their spreading under the Ukrainian Polissya conditions: avtoref. dys. of cand. of biol. nauk. Kyiv, 2005. 23 p. [in Ukrainian] / Немерицька Л.В. Збудники змішаних гнилей картоплі та заходи з обмеження їх розвитку в умовах Полісся України: автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2005. 23 р.
2. Klyachenko O.L., Koltunov V.A., Boroday V.V., Kozhemyakina L.M., Voyceshina N.I. The features of *in vitro* growth and development of different potato cultivars depending on the composition of culture medium. *Potato Gr.* 2012. Vol. 41. P. 103–111. [in Ukrainian] / Кляченко О.Л., Колтунов В.А., Бородай В.В., Кожемякіна Л.М., Войцешина Н.І. Особливості росту і розвитку різних сортів картоплі в культурі *in vitro* залежно від складу поживного середовища. Картоплярство. 2012. Т. 41. С. 103–111.
3. Zaviriuha P.D., Tymoshenko I.I. Potato selection in Lviv NAU: theoretical and applied aspects. *Mater. of Internat. scientif. and pract. forum.* Lviv, 2009. Vol. 1. P. 122–127. [in Ukrainian] / Завірюха П.Д., Тимошенко І.І. Селекція картоплі у Львівському НАУ : теоретичні і прикладні аспекти. *Матер. Міжнар. наук.-практ. форуму.* Львів, 2009. Т. 1. С. 122–127.
4. Yemets A., Tanasienko I., Krasylenko Yu., Blume Ya. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* 2014. Vol. 38. P. 989–1002. doi: 10.1002/cbin.10304.
5. Lakshman D.K., Natarajan S., Mandal S., Mitra A. Lactoferrin derived resistance against plant pathogens in transgenic plants. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61, № 48. P. 11730–11735. doi: 10.1021/jf400756t.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
7. Buziashvili A., Yemets A. Obtaining of tomato and potato plants with human lactoferrin gene *hLf*. *Rep. of the Nat. Acad. Of Sci. of Ukraine.* 2018. Vol. 10. P. 88–94. doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088 [in Ukrainian] / Бузіашвілі А., Ємець А. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. *Доповіді НАН України.* 2018. Т. 10. С. 88–94.
8. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molec. Biol.* 1985. Vol. 5. P. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
9. Zhuk V.P., Oliynyk T.M., Yemets A.I., Blume Ya.B. Regeneration and genetic transformation of Ukrainian potato cultivars with synthetic CRY-genes. *Collent. of scientif. papers of Nikit. bot. garden.* 2009. Vol. 131. P. 197–201. [in Ukrainian] / Жук В.П., Олійник Т.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Регенерація українських сортів картоплі та їх генетична трансформація синтетичними CRY-генами. *Сб. научн. трудов Никит. бот. сада.* 2009. Т. 131. С. 197–201.
10. Veale M.A., Slabbert M.M., van Emmenes L. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato cv. Mnandi for resistance to the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*). *South Afr. Jour. of Bot.* 2012. Vol. 80. P. 67–74. doi: 10.1016/j.sajb.2012.02.007
11. El-Shawaf I., Hasan A., Bekhit M., Hasanein E., Salim T., Hagemann M. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato. *Arab J. Biotech.* 2013. Vol. 16, № 1. P. 91–104.
12. Han E.H., Goo Y.M., Lee M.K., Lee S.W. An efficient transformation method for a potato (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic). *J. Plant Biotechnol.* 2015. Vol. 42. P. 77–82. doi: 10.5010/JPB.2015.42.2.77.

BUZIASHVILI A. Yu., YEMETS A. I.

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: buziashvili.an@gmail.com

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF POTATO WITH HUMAN LACTOFERRIN GENE

Aim. Obtaining of the new Ukrainian potato cultivars with complex resistance to phytopathogens. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation of potato cultivars Vernisage and Zarevo with human lactoferrin gene possessing antimicrobial activity was carried out. For transformation, supervirulent *A. tumefaciens* strain EHA 105 with *hLf* gene and gene for the resistance to kanamycine was used. Selection was carried out for 3 months on MSK-S1 and MSK-S2 media supplemented with 100 mg/l kanamycine. Integration of lactoferrin gene in transgenic plant lines was confirmed by polymerase chain reaction with specific for *hLf* gene primers. **Results.** After selection, potato lines with the resistance to kanamycine were obtained. The transgenic potato lines with integrated into their genomes *hLf* gene were obtained. Integration of lactoferrin gene was confirmed for 1 line of Zarevo cultivar and 3 lines of Vernisage cultivar. Transformation frequency was of 6.8% for cv. Vernisage and 6.25% for cv. Zarevo. **Conclusions.** Selected potato lines would be used in further studies on their resistance to bacterial and fungal pathogens.

Keywords: human lactoferrin gene *hLf*, *Solanum tuberosum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, transgenic plants.