

- Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – Vol. 96. – P. 608-614.
9. Sheludko Y.V. *Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants // Recent Patents on Biotechnology. – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208.
  10. Teng Y.-S., Chan P.-T., Li H.-M. Differential Age-Dependent Import Regulation by Signal Peptides // PLOS Biol. – 2012. – Vol. 10. – P. 1-14.
  11. Bruce B.D. Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution // Trends Cell Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 440-447.

**GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine  
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

**HETEROLOGOUS TRANSIT PEPTIDES ALLOW FOR REPORTER PROTEIN IMPORT INTO CHLOROPLASTS WITH VARYING EFFICIENCY**

**Aim.** The stability of recombinant proteins in plants can be improved by targeting into optimal cell compartment. Two transit peptides (TPs), of RuBisCO small subunit from *Nicotiana tabacum* (tpRbs), and RuBisCO activase from *Spinacia oleracea* (tpRca), were tested for their ability to insure chloroplast import and increase stability of a reporter GFP. **Methods.** The sequences encoding TPs were fused with the reporter GFP gene under control of 35S CaMV promoter. The obtained recombinant genes were transiently expressed in *Nicotiana excelsior* leaves. The level of reporter protein was estimated by surface fluorescence, and GFP subcellular localization was investigated microscopically. **Results.** Using of both TPs allowed for reporter protein accumulation at higher levels than with control GFP gene without targeting signals. Chloroplast import efficiency was better with tpRca than tpRbs, that resulted in improved reporter stability after *tpRca::GFP* gene expression. **Conclusions.** Genetic vectors containing TPs with different efficiency were constructed. They can be used to select the best way for production of valuable proteins in plants.  
**Key words:** plant genetic transformation, subcellular localization, transit peptide.

**ГОНЧАРУК О.М.<sup>1</sup>, БАВОЛ А.В.<sup>1</sup>, МОРГУН Б.В.<sup>2</sup>, ДУБРОВНА О.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17; E-mail: dubrovnu@ukr.net*

<sup>2</sup>*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148*

**AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ШЛЯХОМ ІНОКУЛЯЦІЇ БАЗАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ ПАГОНА**

На сьогодні, біотехнологічні рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують, в основному, методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Генетична модифікація рослин може здійснюватись за допомогою *Agrobacterium*- опосередкованого методу або шляхом прямого перенесення генів. Найбільш поширеним методом для рослин є генетична трансформація з використанням агробактерій *Agrobacterium* для перенесення екзогенних Т-ДНК в рослинну клітину. Незважаючи на те, що такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, у зернових спочатку не було отримано успіхів, оскільки ці культури були, природно, не сприйнятливі до *Agrobacterium* [1, 2]. Тим не менш, вдосконалення технологій *Agrobacterium*-

опосередкованої трансформації до середини 1990-х років, призвело до бажаної генетичної модифікації пшениці [3-5].

Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною її перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* буде використовуватися в якості надійного і недорогого вектора для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Розробка відповідного способу

*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, тому що важливо розуміти роль усіх чинників, які впливають на доставку Т-ДНК в клітини, з яких в подальшому буде здійснюватися регенерація рослин. Після отримання фертильних рослин, необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та стабільності Т-ДНК з метою підвищення ефективності трансформації.

Визначено декілька факторів, які впливають на перенесення Т-ДНК у клітини рослин: первинний експлант, штам *Agrobacterium*, векторна конструкція, щільність суспензії агробактеріальних клітин, склад поживних середовищ, умови трансформації (температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування), наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні, антибіотики або селективні маркери та ін. [6-9].

Одним з найбільш визначальних факторів, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин є вибір відповідного типу експланта. Використання в

якості експлантів базальної частини пагонів пшениці має принципові переваги в порівнянні з традиційними типами експлантів, такими як незрілі зародки та ембріогенний калюс [10]. По-перше, при використанні базальної частини пагонів відсутня необхідність індукції калюсу, внаслідок чого не виникає ефект соматональної мінливості. Отримані рослини-регенеранти характеризуються нормальним розвитком і повністю відповідають характеристикам сорту. Цей метод дозволяє використовувати для трансформації широкий перелік сортів, навіть тих, в яких ускладнений процес індукції калюсу та регенерації рослин. По-друге, цей тип експланта характеризується зручністю у використанні, оскільки його отримання не обмежено сезонами року і підготовка до проведення трансформації не потребує багато часу.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження ефективності використання базальної частини пагона пшениці в якості експланта для подальшої *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та отримання канаміцин-стійких рослин.

### Матеріали і методи

В досліджах використовувався сучасний високопродуктивний сорт озимої пшениці Подолянка, створений в Інституті фізіології рослин і генетика НАН України. Насіння пшениці було стерилізовано шляхом інкубації в 70% розчині етанолу протягом 1 хв, потім 2%-вому розчині КМnO<sub>4</sub> - 3 хв, і в подальшому 10 хв в 2%-вому розчині гіпохлориту натрію. Насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою. Стерилізоване насіння пророщували при 25о С на

світлі протягом 2-3 діб на модифікованому середовищі МС.

Для трансформації використовували штам GV 2260 з плазмідом pCB002 (рис. 1), яка містить гени *gus* – ген ферменту β-глюкуронідази та *npt II* – ген неоміцинофосфотрансферази II *E. coli*, який надає стійкість до антибіотиків групи аміноглікозидів, таких як канаміцин, неоміцин та паромоміцин.

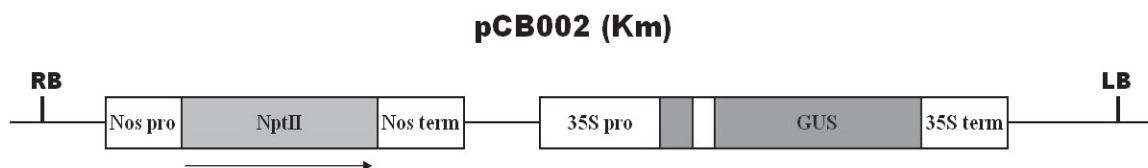


Рис. 1. Схема області Т-ДНК векторної конструкції pCB002 (штам GV2260)

Суспензію клітин *A. tumefaciens* отримували за культивування на рідкому середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л і канаміцину 100 мг/л на ротаційному шейкері протягом 18 год. Для інокуляції експлантів використовували суспензію клітин агробактерій з оптичною щільністю OD<sub>660</sub>=0,8. Культура була осаджена центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 5 хв. Потім її ресуспендували у МС середовище (без фітогормонів), що містило 100 мкМ ацетосірінгону, яке і використовували для інокуляції.

В якості селективного агента застосовували антибіотик канаміцин в концентрації 100 мг/л.

Екстракцію ДНК проводили з молодих листків за використання комплекту реагентів “ДНК–сорб-С” (ФБУН ЦНИИС Роспотребнадзора, Росія). Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Молекулярно-генетичний аналіз стійких до канаміцину форм проводили методом ПЛР. Наявність гена *npt II* визначали з використанням праймерів 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA-3' (F) та

5'-GCTCTAGATCC- AGAGTCCCGCTCAGAAG - 3'(R). ПЛР проводилась на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf згідно наступної програми: початкова денатурація при

94° С 4 хв; 35 циклів (денатурація 94° С - 30 с, відпал 54° С - 30 с, елонгація 72° С - 35 с) та фінальна елонгація 72° С 10 хв. Очікувана довжина амплікона складає 649 п.н.

### Результати та обговорення

Коли колеоптіль досягав довжини 1-2 см, його відрізали стерильним скальпелем під кутом 45° у напрямку повздовжньої осі. Потім відрізали верхню частину в горизонтальному напрямку і таким чином залишалась базальна частина, що містить апікальну меристему пагона, яку і піддавали інокуляції агробактерією. Для трансформації на зріз наносили 2-4 мкл ресуспендованої *A. tumefaciens*. Всього було використано 400 на-

сінин. Після трансформації вижило близько 60% проростків (рис. 2). Отримані рослини висаджували в стерильні чашки Петрі на фільтрувальний папір до появи нових листків, а в подальшому пересаджували в горщики. На стадії 5-го–7-го листка, проводили інсуфляцію сіянців розчином, що містить 100 мг/л канаміцину. Після обробки молодих листків вижило 7 рослин, які мали зелене забарвлення та не сповільнювали ріст.

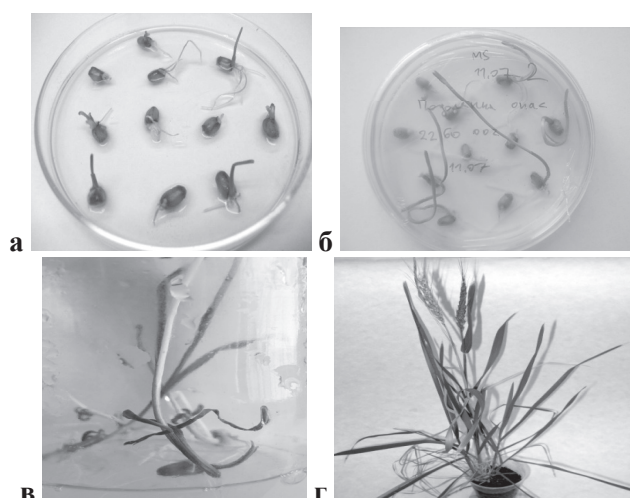


Рис. 2. Етапи *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації клітин базальної частини пагона: а – інокуляція базальної частини пагона; б - відростання листків; в - селекція на середовищі з канаміцином; г- отримання насінневого покоління T<sub>1</sub>

Крім того, після інокуляції та відростання листя частина рослин була висаджена на поживне середовище з 100 мг/л канаміцину та культивувалися на ньому протягом 2-4 тижнів (1-2 пасажі). Канаміцин-стійкими вважались рослини, що за дії селективного чинника зберігали зелене

забарвлення. У рослин, які не набули стійкості до антибіотика спостерігалось знебарвлення тканин внаслідок руйнування хлоропластів, вони повільно росли, загалом були менш розвинені (рис. 3.а) та поступово гинули. На середовищі з канаміцином було виділено 5 зелених рослин.

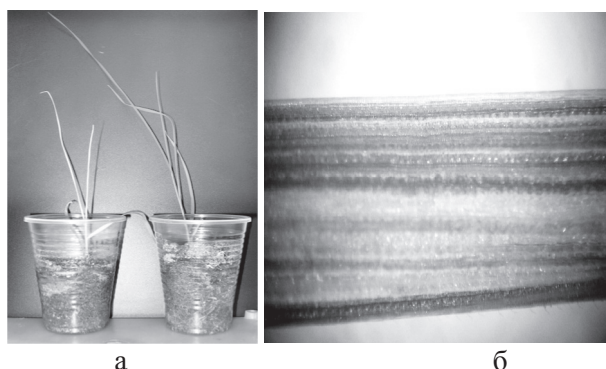


Рис. 3. Стійкі та нестійкі до канаміцину рослини пшениці; а – рослини отриманні після селекції на середовищі з канаміцином: зліва – безхлорофільна рослина, справа –рослина зеленого кольору, з нормальною швидкістю росту; б – листок рослини-химери (збільшення x35)

Всі отримані зелені рослини для яровизації витримували 45 діб за температури 4° С, а в подальшому вирощували в умовах вегетаційного експерименту для отримання насіннєвого покоління.

Також було отримано рослини, які характеризувались наявністю тканин двох типів: стійких до канаміцину, які утворилися після перенесення екзогенної ДНК, та нестійких до селективного агента, в яких не відбулося вбудовування

чужорідної ДНК. За дії канаміцину, такі химерні рослини набували строкатого кольору: ділянки зеленого кольору змінювались безхлорофільними секторами (Рис. 3. б).

Після добору зелених рослин проводили їх ПЛР-аналіз з використанням праймерів, специфічних до селективного гена *npt II*. Результати ампліфікації для 12 зразків ДНК, виділених із отриманих рослин, що були інюкульовані штамом GV 2260 приведені на рис. 4.

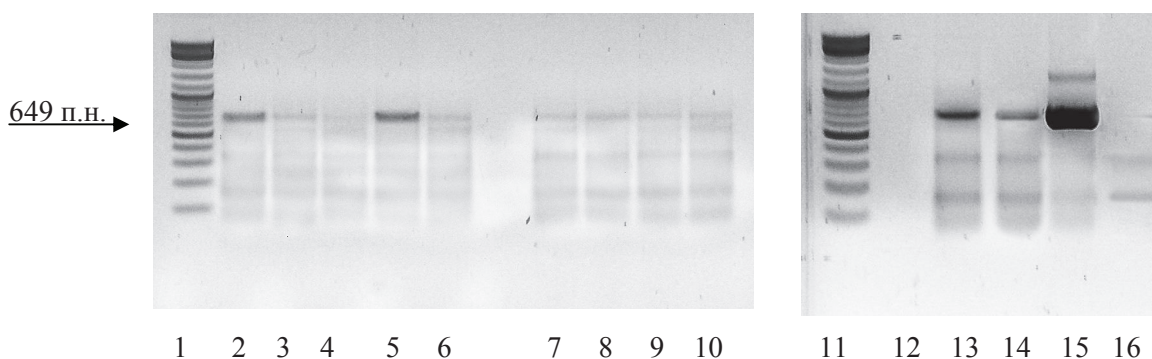


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР за використання праймерів, специфічних до гена *npt II* (очікувана довжина амплікона 649 п.н.): 1, 11 – ДНК-маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder; 2-6 – ДНК рослин, стійких до канаміцину (отриманих на селективному середовищі); 7-10, 12-14 – ДНК рослин, отриманих за добору методом інсуфляції; 15 – позитивний контроль (GV 2260); 16 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої пшениці)

Загалом серед 12-ти проаналізованих зразків тільки у чотирьох підтверджено наявність гена *npt II*. Нами також контролювалася відсутність домішок *A. tumefaciens* у досліджуваних зразках за геном *vir C*. За результатами аналізу у зразках ДНК отриманих рослин показано відсутність агробактеріального зараження.

Слід зазначити, що можливість отримання трансформованих рослин пшениці з використанням як експланта базальної частини пагона вперше була показана у роботі Зао і співавторів [11], у якій дослідники підтвердили трансгенний статус та успадковування перенесених генів у насіннєвому поколінні T<sub>2</sub>. Зокрема, Чен та Дейл [12] вважають, що таким способом можливо отримати трансформанти на підставі наступних міркувань: 1) *A. tumefaciens* переносить трансгени не тільки в геном клітин апікальної меристеми, а й в геном вже диференційованих клітин; 2) трансгени, інтегровані у вже диференційовані клітини, можуть визначити тільки фенотип нижньої частини зрілих рослин, проте не верхньої

частини рослини; 3) трансгени, інтегровані в геном ще недиференційованих клітин меристеми пагона, з якої в подальшому формується колос, визначають фенотип верхньої частини зрілої рослини; 4) оскільки статеві клітини генеративних органів (яйцеклітини і пилок) утворюються з меристеми верхнього інтеркалярного вузла, то в подальшому при заплідненні утворюється зигота, що містить трансгени. Таким чином, насіння T<sub>1</sub> і наступні покоління, не повинні бути химерами, а істинними трансформантами.

Отримані нами дані свідчать про те, що інюкляція базальної частини пагонів пшениці суспензією клітин *A. tumefaciens*, може використовуватися для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці. Встановлено, що використання методу інсуфляції дозволяє за короткий період вибракувати нетрансформовані форми, оскільки вони швидко гинуть. Методом ПЛР підтверджено трансгенний статус чотирьох отриманих рослин.

### Література

1. Potrykus I. Gene transfer to cereals: as assessment // Biotechnology. – 1990. – Vol. 8. – P. 535-542.
2. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Annual Review of Plant Biology since 2002). – 1991. – Vol. 42. – P.



205-225.

3. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 971–980.
4. Peters N., Ackerman S. Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant Molecular Biology Reporter. –1999. – Vol. 17. – P. 323-331.
5. Jones, H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics, In: Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November - 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomon. (Ed.). – 2007. – P. 693-699.
6. Jones H., Doherty A., Wu. H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant methods. – 2005. – Vol. 1. – №5.
7. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh, M.B. Wheat transformation—an update of recent progress // Euphytica. – 2006. – Vol. 149. – P. 353-366.
8. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2006. – Vol. 1. – P. 12-20.
9. Kumlehn, J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // Breeding Science. – 2009. – Vol. 59. – P. 553-560.
10. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum Aestivum* L) // Plant Sci. – 1990. – Vol. 72. – P. 233–244.
11. Zhao T.J., Zhao S.Y., Chen H.M., Zhao, Q.Z., Hu, Z.M., Hou B.K., Xia, G.M. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 25. – P. 1199-1204.
12. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // Transgenic Res. – 1992. – Vol. 1. – P. 93–100.

**GONCHARUK O.M.**<sup>1</sup>, **BAVOL A. V.**<sup>1</sup>, **MORGUN B. V.**<sup>2</sup>, **DUBROVNA O. V.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine*

03022, 31/17 Vasylkivska St., 03680, Kyiv, Ukraine, e-mail: dubrovny@ukr.net

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine*

148 Acad. Zabolotnoho St., 03680, Kyiv, Ukraine

#### **AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF THE BASAL PORTION OF WHEAT SEADLING**

**Aims.** The aim of our work was to study the effectiveness of the basal portion of wheat seedlings as explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. **Methods.** We has been used the method of *Agrobacterium*-mediated transformation and PCR to display results. **Results.** As a result of genetic transformation we obtained resistant to kanamycin plants. Transgenic status of the four obtained forms was confirmed by PCR. **Conclusions.** The data suggest that basal portion of wheat seedlings can be used for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, wheat.

**ГУЛЯЄВА Г.Б., БОГДАН М.М**

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,*

*Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: prasya\_2010@ukr.net*

#### **ВПЛИВ ОБРОБКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ**

Сучасні сорти рослин мають досить обмежений потенціал стійкості проти шкідливих організмів. Тому захист рослин є невід'ємним компонентом агротехнології та може підвищувати врожайність сільськогосподарських культур на 23 % і більше [5, 7, 9]. Найвищу рентабе-

льність можна отримати, застосовуючи препарати, що діють проти комплексу хвороб [5, 7].

Відомо три групи механізмів стійкості рослин до стресових факторів: 1) стрес-індуковане новоутворення макромолекул із захисними властивостями, 2) синтез спільних осмолітів з мно-