

КВАСКО А.Ю.^{1✉}, ЛАЗАРЕЦЬ А.С.², ІСАЄНКОВ С.В.¹, ЄМЕЦЬ А.І.¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0001-5014-3630, 0000-0002-3119-1642, 0000-0001-6887-0705

² ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка,

Україна, 01601, м. Київ-601, вул. Володимирська, 64/13

✉ kvasko.anna@ukr.net

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РОСЛИН РИЖІЮ ПОСІВНОГО ДРІЖДЖОВИМИ ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

Мета. Метою роботи було отримання рослин рижію (*Camelina sativa* (L.) Crantz) з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* для підвищення їх посухостійкості. **Методи.** Для введення в культуру *in vitro* використовували насіння *C. sativa* форми ФЕОРЖЯФ-1. Експланти гіпокотилів та апікальних меристем 5-денних проростків культивували на трьох варіантах живильних середовищ для регенерації рослин із додаванням різних концентрацій фітогормонів. Для генетичної трансформації використовували векторні конструкції рGWB2-*TPS1* та рGWB2-*TPS2* з генами *TPS1* та *TPS2*. **Результати.** Найвищі показники регенерації рослин *in vitro* було отримано з експлантів гіпокотилів на середовищі з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, з апікальних меристем – з 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Проведено генетичну трансформацію та відібрано лінії рослин рижію зі стійкістю до селективного агента гігromіцину. За допомогою ПЛР-аналізу підтверджено трансгенну природу отриманих ліній рослин. **Висновки.** Досліджено регенераційний потенціал у культурі *in vitro* рослин рижію посівного селекційної форми ФЕОРЖЯФ-1. Проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *C. sativa* з використанням двох типів експлантів та векторних конструкцій рGWB2-*TPS1* і рGWB2-*TPS2* з генами біосинтезу трегалози дріжджів та отримано трансгенні лінії рижію.

Ключові слова: *Camelina sativa* (L.) Crantz, трегалоза, гени *TPS1*, *TPS2*.

Дедалі більший негативний вплив на стан навколишнього середовища видобутку та застосування нафти, вугілля, природного газу, висока вартість викопного палива актуалізують дослідження та впровадження альтернати-

вних відновлювальних джерел енергії [1]. Про перспективність використання олійних культур для виробництва біопалива давно відомо. Однією з таких культур є *Camelina sativa* (L.) Crantz – рижій посівний, вміст олії в насінні якого становить близько 32–49 % (залежно від генотипу та умов його вирощування). Значна увага зосереджена на вивченні агротехнічних характеристик та вмісту жирних кислот у насінні різних сортів рижію посівного (>90 % яких є ненасиченими) [2, 3], проте розвиток селекції, генетичної інженерії та біотехнології такої культури може забезпечити вдосконалення якісних ознак сортів, підвищення стійкості культури до біотичних та абіотичних стресів, з'ясування функцій окремих генів [1]. У культурі *in vitro* основними напрямками досліджень є регенерація рослин рижію шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу, використання культури мікроспор та соматична гібридизація [4]. Серед методів генетичної трансформації *C. sativa* поширеним є метод квіткового занурення, аналогічний «floral dip», розроблений для трансформації *Arabidopsis* [3]. Що стосується *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та регенерації трансгенних ліній у культурі *in vitro*, то в якості експлантів успішно використовують листкові диски [5], сегменти гіпокотилів [2], апікальні та бічні меристеми рижію [1]. Встановлено, що регенераційний потенціал у культурі *in vitro* листкових експлантів є вищим порівняно з експлантами гіпокотилів, в свою чергу вищу частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації забезпечує застосування мезофільних експлантів та апікальних меристем [4].

Слід зазначити, що рослини *C. sativa* невибагливі до умов вирощування порівняно з

© КВАСКО А.Ю., ЛАЗАРЕЦЬ А.С., ІСАЄНКОВ С.В., ЄМЕЦЬ А.І.

іншими представниками родини *Brassicaceae* (*Cruciferae*), більш стійкі до абіотичних та біотичних стресів, характеризуються коротким вегетаційним періодом та властивістю зростати майже на всіх типах ґрунтів [2]. Незважаючи на пластичність рижію до кліматичних умов, стресові фактори суттєво впливають на його продуктивність. Зокрема, посуха та навіть короточасне підвищення температури до 35°C знижують продуктивність *C. sativa* приблизно на 20 % та негативно впливають на жирнокислотний склад олії насіння [4]. З огляду на це вкрай актуальним є пошук, клонування та перенесення відповідних генів за допомогою біотехнологічних методів із метою отримання посухостійких ліній рижію посівного для його сталого вирощування.

Наприклад, такими генами можуть бути гени синтезу трегалози – нередукуючого дисахариду глюкози, що синтезується у клітинах багатьох живих організмів [6]. У клітинах дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) трегалоза виконує стресопротекторну функцію і синтезується двома послідовними реакціями: синтез трегалозо-6-фосфату з УДФ-глюкози та глюкозо-6-фосфату (каталізується ферментом трегалозо-6-фосфат синтазою, що кодується геном *TPS1*) та подальше дефосфорилування трегалозо-6-фосфату з утворенням трегалози (каталізується ферментом трегалозо-6-фосфат фосфатазою, що кодується геном *TPS2*) [6]. Щодо можливих змін жирнокислотного складу у рижію, то слід зазначити, що на сьогодні відомо та ідентифіковано багато генів *WR11* [7, 9], що регулюють різні етапи синтезу жирних кислот у таких рослин, як *Arabidopsis thaliana*, *C. sativa*, *Brassica napus*, *Zea maize*, *Brachypodium distachyon*. Зокрема, у *C. sativa* ідентифіковано три функціональні гени *CsWR11* (*CsWR1A*, *B* і *C*) [7]. Цікавими є дані, які доводять, що вирощування *B. napus* у присутності трегалозо-6-фосфату, а також експресія гена *otsA* з *E.coli*, який кодує трегалозо-6-фосфат синтазу, у клітинах *N. benthamiana*, сприяють підвищенню вмісту жирних кислот у насінні та вегетативних органах *B. napus* та *N. benthamiana* [8, 9]. Останні дослідження демонструють, що трегалозо-6-фосфат може відігравати пряму сигнальну роль у регуляції біосинтезу жирних кислот [6, 10]. Відомо також, що збільшення концентрації трегалозо-6-фосфату призводить до інгібування ферментативної активності KIN10 (каталітичної субодиниці

протенкінази SnRK1) і відповідно активності самої SnRK1 [11], що стимулює ріст та метаболічну активність клітин, внаслідок цього активується синтез жирних кислот [10].

Враховуючи зазначене вище, метою роботи було перенесення дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* (кодує трегалозо-6-фосфат синтазу – фермент синтезу трегалозо-6-фосфату) та *TPS2* (кодує трегалозо-6-фосфат фосфатазу – фермент дефосфорилування трегалозо-6-фосфату) в геном рижію посівного для отримання посухостійких ліній, а також ліній рослин *C. sativa*, що можуть характеризуватися зміненим складом жирних кислот у насінні чи вегетативних органах.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. У роботі було використано насіння *C. sativa* високоврожайної селекційної форми ФЕОРЖЯФ-1, отриманої у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України (люб'язно надано д. с.-г. н. Д.Б. Рахметовим) [12].

Підбір умов регенерації в культурі in vitro рослин C. sativa. Для введення в культуру *in vitro* насіння стерилізували в 70 % етанолі протягом 1 хв та гіпохлориді натрію з додаванням 100 % Tween-20 – 15 хв із наступним триразовим промиванням стерильною дистильованою водою – по 5 хв [1]. Потім насіння переносили на безгормональне середовище МС (Murashige & Skoog, 1962) з половинним набором макросолей МС та з додаванням 30 г/л сахарози для його подальшого пророщування. Як експланти використовували сегменти гіпокотилів та апікальні меристеми 5-денних проростків *C. sativa* [2], які культивували на середовищі МС, що містило 20 г/л сахарози та різні співвідношення фітогормонів: 1) 4 мг/л 6-бензиламінопурина (БАП; Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК; Sigma, США) [2]; 2) 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК [1]; 3) 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК. Пасаж культур проводили кожні два тижні. Частоту регенерації рослин з експлантів визначали як співвідношення кількості експлантів, на яких відбувалася регенерація рослин, до загальної кількості експлантів, використаних в експерименті, помножене на 100 %. Експерименти проводили не менше, ніж у трьох повторностях. Статистичну обробку проводили з

використанням стандартних програм Microsoft® Office Excel (2013).

Agrobacterium-опосередкована трансформація *C. sativa*. З метою ефективної селекції трансгенних рослин після трансформації нами було проведено окреме дослідження щодо визначення селективної концентрації гігроміцину для подальшого відбору трансформованих ліній рослин. Для цього експланти контрольних рослин вирощували на живильному середовищі МС з додаванням гігроміцину у концентраціях 0, 3, 5, 10 та 15 мг/л.

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовували генетичні векторні конструкції рGWB2-*TPS1* та рGWB2-*TPS2* з цільовими генами біосинтезу трегалози дріжджів *TPS1* та *TPS2* відповідно, що знаходилися під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти P35S, та селективними маркерними генами: гігроміцин-фосфотрансферази *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину, та неоміцин-фосфотрансферази *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину у рослин [13]. Для проведення трансформації нічну культуру агробактерії вирощували на середовищі LB із додаванням антибіотиків рифампіцину (50 мг/л) та канаміцину (100 мг/л) за температури 28°C при постійній аерації на шейкері (150 об/хв). Перенесення цільових генів проводили з використанням експлантів гіпокотилів та апікальних меристем відповідно до методик [1,14]. Після 2-добового кокультивування експлантів з агробактерією їх переносили на середовище для регенерації рослин, із додаванням гігроміцину – для селекції трансформованих ліній рослин та 400 мг/л цефотаксиму – для елімінації залишків агробактерії.

Молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній. Підтвердження перенесення та інтеграцію генів *TPS1* і *TPS2* в геноми досліджуваних рослин здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього ізолювали тотальну ДНК контрольних і відібраних ліній рижію за допомогою ЦТАВ-методу. ПЛР проводили за використанням таких пар праймерів до цільових генів: *TPS1* for_{5'} – AGATCATCGGTGTTCCAAGG–3' та *TPS1* rev_{5'} –TGTCTTCCGTGCAAAGAGTG–3'; *TPS2* for_{5'} –ATGGGGCATGATGGAATAA–3' та *TPS2* rev_{5'} –ACCACTGCCCAAGACAATTC–3'. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 10 мкл суміші HotStart ПЛР (Neogene, Україна), 50 нг ДНК, по

1 мкл кожного з праймерів. Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США) за такою схемою: початкова денатурація – 95°C 12 хв, наступні 40 циклів – денатурація 95°C 30 с, відпал праймерів – 57°C 40 с елонгація – 72°C 90 с, та кінцева елонгація – 72°C 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі в 1xTBE-буфері. Для визначення довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер довжин фрагментів ДНК (GeneRuler™ 1 kb; 100 bp PlusDNA Ladder, ready-to-use; Fermentas, Литва). Розміри очікуваних ампліфікованих фрагментів: 640 п. н.– для гена *TPS1*, 758 п. н. – для гена *TPS2*.

Результати та обговорення

У результаті введення в культуру *in vitro* було виявлено, що через 5 діб пророщування стерильного насіння на безгормональному середовищі МС показник його схожості становив 94,5 %, а через 9 діб – майже 98 % (рис. 1). Такі дані свідчать про те, що підібрані умови стерилізації насіння рижію посівного не вплинули на показники проростання насіння *in vitro*.

Варто зазначити, що ефективні протоколи регенерації та трансформації *C. sativa* в культурі *in vitro* з застосуванням меристематичних тканин як експлантів поки не є оптимізованими та широко дослідженими, проте деякі дослідники вважають, що такий спосіб може забезпечити більшу ефективність трансформації та пришвидшити терміни отримання трансгенних рослин [1].

У результаті проведених досліджень нами було встановлено, що частота регенерації рослин на середовищі МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК за використання сегментів гіпокотилів як експлантів складала 39,5 % (рис. 2). Калюсні структури, з яких у подальшому формувалися пагони, утворювалися через 7 діб вирощування на середовищі такого складу та на середовищі з додаванням 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК, проте на середовищі з 4 мг/л БАП та 1 мг/л НОК спостерігали затримку калюсоутворення до 10 діб. За використання апікальних меристем як експлантів частота регенерації рослин була вищою порівняно з сегментами гіпокотилів та всіх досліджених варіантів середовищ, проте найвищий показник регенерації спостерігався за вирощування

на середовищі МС, що містило 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК, і становив приблизно 78 % (рис. 2).

Саме ці варіанти живильних середовищ було обрано в подальшому для регенерації та селекції рослин рижію після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

У результаті проведених серій досліджень із *Agrobacterium*-опосередкованої тран-

сформації *C. sativa* з використанням двох типів експлантів і окремо двох векторних конструкцій рGWB2-*TPS1* та рGWB2-*TPS2* з цільовими генами біосинтезу трегалози дріжджів *TPS1* та *TPS2* на селективному середовищі нами було отримано лінії рижію, що були здатні ефективно регенерувати в присутності ефективних концентрацій селективного агента.

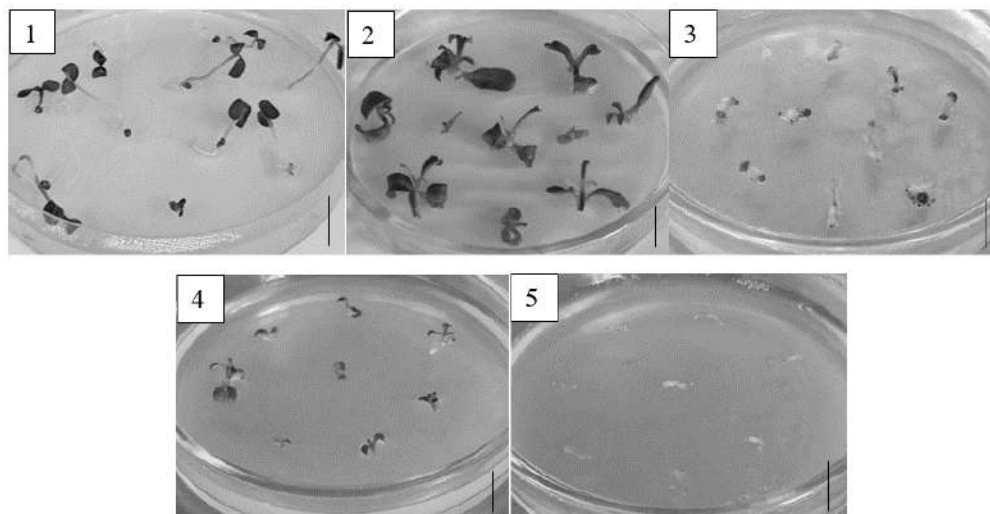


Рис. 1. П'ятидобові проростки *C. sativa* на середовищі МС без фітогормонів – 1; регенерація пагонів з апікальних меристем на середовищі МС з 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК через 25 днів вирощування – 2; експланти гіпокотилів на середовищі МС з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК через 25 днів культивування – 3; експланти апікальних меристем через 7 днів після трансформації конструкцією рGWB2-*TPS2* на середовищі з 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК та селективним агентом – 4; експланти гіпокотилів через 7 днів після трансформації конструкцією рGWB2-*TPS2* на середовищі з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК – 5. Лінійна позначка – 1 см.

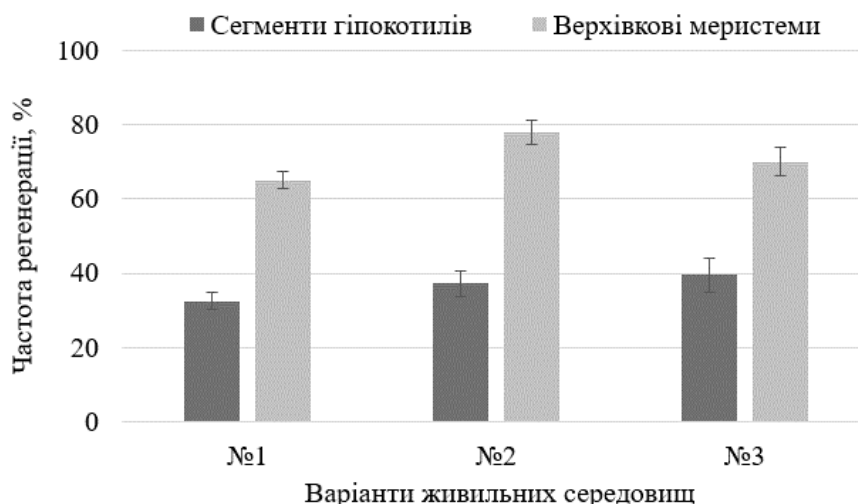


Рис. 2. Частота регенерації (%) експлантів гіпокотилів та верхівкових меристем *C. sativa* на 30 добу культивування на варіантах живильних середовищ, що містили: №1 – 4 мг/л БАП, 1 мг/л НОК; №2 – 1,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК; №3 – 1 мг/л БАП, 0, 1 мг/л НОК.

Отримані лінії за морфологічними ознаками суттєво не відрізнялися від контрольних рослин. Для підтвердження трансгенної природи отриманих ліній рижію було проведено їх молекулярно-генетичний аналіз із використанням відповідних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2*. За попередніми даними, за допомогою методу ПЛР нами було підтверджено інтеграцію цільових генів *TPS1* та *TPS2* у геном досліджуваних рослин та відповідно трансгенну природу отриманих ліній рослин *C. sativa*. В подальшому буде проведено аналіз отриманих трансгенних рослин на стійкість до посухи.

Висновки

Досліджено регенераційний потенціал у культурі *in vitro* рослин рижію посівного – *C. sativa* селекційної форми ФЕОРЖЯФ-1. Для цього було використано два типи експлантів: сегменти гіпокотилів та апікальні меристеми, а

також протестовано три варіанти живильних середовищ, що містили різні концентрації фітогормонів. Встановлено, що за використання експлантів гіпокотилів найвищу частоту регенерації пагонів було зафіксовано за їх вирощування на середовищі з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК. Для апікальних меристем показники частоти регенерації були найвищими на середовищі з 1,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Також було підібрано ефективну концентрацію селективного агента (гігроміцину), здійснено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *C. sativa* за використання конструкцій із цільовими генами *TPS1* та *TPS2*, клонованих із дріжджів *S. cerevisiae*, та відібрано трансформовані лінії рослин рижію. За попередніми даними, за допомогою ПЛР-аналізу було підтверджено трансгенну природу отриманих ліній рослин, які в подальшому будуть протестовані на стійкість до посухи.

References

1. Sither V., Tabatabai B., Enitan O., Dhekney S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Camelina sativa* for production of transgenic plants. *Journal of Biological Methods*. 2018. Vol. 5 (1). e83. doi: 10.14440/jbm.2018.208.
2. Yemets A. I., Boychuk Yu. N., Shysha E. N., Rakhmetov D. B., Blume Ya. B. Establishment of *in vitro* culture, plant regeneration, and genetic transformation of *Camelina sativa*. *Cytology and Genetic*. 2013. Vol. 47, No. 3. P. 138–144. doi: 10.3103/S0095452713030031.
3. Malik M. R., Tang J., Sharma N., Burkitt C., Ji Y., Mykytyshyn M., Bohmert-Tatarev K., Peoples O., Snell K. D. *Camelina sativa*, an oilseed at the nexus between model system and commercial crop. *Plant Cell Report*. 2018. Vol. 37. P. 1367–1381. doi: https://doi.org/10.1007/s00299-018-2308-3.
4. Sainger M., Jaiwal A., Sainger Ahlawat P., Chaudhary D., Jaiwal R., Jawal P.K. Advances in genetic improvement of *Camelina sativa* for biofuel and industrial bio-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017. Vol. 68. P. 623–637. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.023>.
5. Kuvshinov V., Kanerva A., Koivu K., Kuvshinova S., Pehu E. Transformation of *Camelina sativa*. 2011. US Patent 7,910,803.
6. Yatsyshyn V.Y., Kvasko A.Yu., Yemets A.I. Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol. Genet*. 2017. 51. P. 371–383. doi: 10.3103/S0095452717050127.
7. An D., Kim H., Ju S., Go Y.S., Kim H.U., Suh M.C. Expression of *Camelina* WRINKLED1 isoforms rescue the seed phenotype of the *Arabidopsis wri1* mutant and increase the triacylglycerol content in tobacco leaves. *Frontiers in Plant Science*. 2017. 8. P. 34. doi: 10.3389/fpls.2017.00034.
8. Zhai Z., Keereetaweep J., Liu H., Feil R., Lunn J.E., Shanklin J. Trehalose 6-phosphate positively regulates fatty acid synthesis by stabilizing WRINKLED1. *The Plant Cell*. 2018. Vol. 30. P. 2616–2627. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00521>.
9. Zhai Z., Keereetaweep J., Liu H., Feil R., Lunn J.E., Shanklin J. Expression of a bacterial trehalose-6-phosphate synthase *otsA* increases oil accumulation in plant seeds and vegetative tissues. *Frontiers in Plant Science*. 2021. 12. 656962. doi: 10.3389/fpls.2021.656962.
10. Zhai Z., Keereetaweep J., Liu H., Xu C., Shanklin J. The role of sugar signaling in regulating plant fatty acid synthesis. *Frontiers in Plant Science*. 2021. 12. 643843. doi: 10.3389/fpls.2021.643843.
11. Nunes, C., O'Hara, L.E., Primavesi, L.F., Delatte, T.L., Schluepmann, H., Somsen, G.W., Silva, A.B., Fevereiro, P.S., Wingler, A., and Paul, M.J. The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiol*. 2013. Vol. 163, No. 3. P. 1720–1732.
12. Rakhmetov D.B., Rahmetova S.O., Boychuk Yu.N., Blume Ya.B., Yemets A.I. Physiological and morphological characteristics of new forms and varieties of spring false flax (*Camelina sativa*). *Visn. ukr. tov. genet. sel*. 2014. Vol. 12 (1). P. 65–77. [in Ukrainian]
13. Kvasko A.Yu., Isayenkov S.V., Krasnoperova E.E., Dmytruk K.V., Yemets A.I. Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* with yeast genes of trehalose biosynthesis *TPS1* and *TPS2*. *Visn. Ukr. Tov. Genet. i Sel*. 2019. Vol. 18 (2). P. 8–16. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1215. [in Ukrainian]
14. Cardoza V., Stewart C.N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep*. 2003. Vol. 21. P. 599–604.

KVASKO A.Yu.¹, LAZARETS A.S.², ISAYENKOV S.V.¹, YEMETS A.I.¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a*

² *Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of
Kyiv,
Ukraine, 01601, Kyiv-601, Volodymyrska str., 64/13*

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF SPRING CAMELINA WITH YEAST GENES OF TREHALOSE BIOSYNTHESIS

Aim. The aim of the study was the obtaining of *Camelina sativa* (L.) Crantz lines with yeast genes of trehalose synthesis *TPS1* and *TPS2* to increase their resistance to drought. **Methods.** Seeds of *C. sativa* genotype FEORZhYaF-1 were used for *in vitro* culture establishment. For this hypocotyl segments and shoot meristems of 5-days-old camelina seedlings were cultivated on three different nutrient media for regeneration supplemented with various hormone combinations. Vector constructions pGWB2-*TPS1* and pGWB2-*TPS2* with *TPS1* and *TPS2* genes have been used for genetic transformation. **Results.** The highest efficiency of plant regeneration from hypocotyl explants was found on medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA, and from meristem explants – on medium with 1.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA. *Agrobacterium*-mediated transformation was conducted out, and camelina lines were picked up on corresponding medium with selective concentration of hygromycin. Transgenic nature of obtained plants was confirmed by PCR-analysis. **Conclusions.** The efficiency of *in vitro* plant regeneration of *C. sativa* genotype FEORZhYaF-1 has been investigated. Two types of explants and two vector constructions pGWB2-*TPS1* and pGWB2-*TPS2* with *TPS1* and *TPS2* yeast trehalose synthesis genes have been used for obtaining of transgenic camelina lines.

Keywords: *Camelina sativa*, trehalose, *TPS1*, *TPS2* genes.