

КОМІСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСЬКА С.І.[✉], ХРИСТАН О.О.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

[✉] mykhalskasvitlana@gmail.comЧАСТОТА ІНТЕГРАЦІЇ Т-ДНК ЗА ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТЮТЮНУ
(*NICOTIANA TABACUM L.*)

Мета. Дослідження частоти інтеграції генів та їх складових (елементів генетичних конструкцій) у трансгенних рослин-регенерантів тютюну. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну (*Nicotiana tabacum L.*) *in vitro*. **Результати.** Отримані рослини тютюну з інтегрованими цільовими та селективним генами. При цьому встановлено, що відбулося вбудовування повної копії Т-ДНК та окремих елементів векторної конструкції. **Висновки.** Встановлено, що за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *Nicotiana tabacum L. in vitro* з використанням штамів *LBA4404* і *AGLO*, що містять плазмиду *pBi2E* з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази і *pBi-OAT* з геном орнітин амінотрансферази, можлива інтеграція в геном рослин як повної, так і неповної копії Т-ДНК. Частота трансформації з повним вбудовуванням генетичної конструкції становила 91 %, зокрема, за використання векторної конструкції *LBA4404 pBi2E* – 78 %, *AGLO pBi2E* – 100 %, *AGLO pBi-OAT* – 94 %. **Ключові слова:** *Nicotiana tabacum L.*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro*, трансгенні рослини, Т-ДНК.

Розвиток і вдосконалення методів генетичної інженерії, а також розробка способів перенесення генетичного матеріалу в клітину рослини і відновлення в умовах *in vitro* із окремих клітин повноцінних трансформантів дали можливість модифікувати геноми багатьох видів рослин. Технологія отримання трансгенних рослин ґрунтується на інтеграції генів різних гетерологічних систем. Також в останні роки для модифікації експресії генів широко застосовується новий підхід отримання трансгенних рослин із використанням антисенсової РНК, який дозволяє керувати роботою власного гена. Відомо, що інтеграція Т-ДНК в рослинний геном здійснюється випадковим чином шляхом незаконної рекомбінації в різні ділянки геному. При цьому на всіх стадіях процесингу і переносу Т-

ДНК можуть траплятися помилки, в результаті яких у рослинний геном можуть бути інтегровані тільки певні фрагменти векторної ДНК (втрата фрагментів Т-ДНК) та фрагменти ДНК, що лежить за межами кінцевих повторів [1–4].

Отже, за агробактеріальної трансформації в ядерний геном рослин може відбуватися як повне, так і неповне вбудовування Т-ДНК, а також одночасно із трансгенами можуть бути перенесені і фрагменти векторної ДНК, що необхідно враховувати під час отримання трансгенних рослин. На основі вивчення цього феномену розроблені рекомендації для створення різних генетичних конструкцій, що дозволить уникнути вбудовування як фрагментів вектора, так і маркерних генів [5, 6].

Крім того, генетично-модифіковані рослини – цінний модельний об'єкт для вивчення функціонування перенесених генів у новому оточенні генів рослини-реципієнта.

Метою роботи є дослідження частоти інтеграції генів та їх складових (елементів генетичних конструкцій) у трансгенних рослин-регенерантів тютюну (*Nicotiana tabacum L.*).

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були сорти *Nicotiana tabacum* Самсун і Дюбек. Експлантатами для генетичної трансформації слугували листові пластинки. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in vitro* здійснювали штамом *LBA4404* і *AGLO*, що несуть бінарний вектор *pBi2E*, з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*ПДГ*), який складається з інвертованого повтору фрагментів двох копій першого екзону й інтрону гена *ПДГ*, та з використанням штаму *AGLO*, який містить плазмиду *pBi-OAT* з додатковою копією гена орнітинамінотрансферази (*ОАТ*) *Medicago truncatula*, люб'язно наданими доктором біологічних наук Кочетовим О.В. У цих конструкціях гени проліндегідрогенази *A. thaliana* й орнітинамінотрансферази *M. truncatula* є цільовими, а ген неомі-

цинфосфотрансферази *nptII* – селективним.

Експлантати (листяві пластинки) механічно пошкоджували і проводили інокуляцію суспензією клітин *Agrobacterium tumefaciens*, оптична щільність яких за 600 нм складала 0,6–0,8 О.О., протягом 30–40 хвилин. Потім підсушували на стерильному фільтрувальному папері та висаджували на безгормональне живильне середовище МС (Murasige і Скуга), яке не містило вуглеводів. Далі кокультивували протягом 2 діб у темряві за температури 25⁰С. Для індукції пагоноутворення експлантати переносили на модифіковане живильне середовище МС, доповнене 28,0 мг/л Fe(SO₄)₃, 10 мг/л AgNO₃ і антибіотиком цефотаксимом (500 мг/л), який широко використовується для елімінації клітин агробактерій. Селекцію з канаміцин сульфатом (100 мг/л) проводили після початку формування пагонів. Для встановлення факту інтеграції трансгенів та їх складових у геном отриманих регенерантів аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ – методом. ПЛР проводили із використанням специфічних праймерів:

nptII – 5'-ССТ GAA TGA АСТ ССА GGA GGA GGC А -3' та 5'-GCT СТА GAT ССА GAG TCC CGC TCA GAA G -3' – 649 п. н.; фрагмент 1-го екзона супресора гена ПДГ – 5'-ААСАА-АСТGG-АТССG-GCGAT-СТТАС-3' та 5'-GAGAT-GTTGG-TСТАG-АТТТG-GCAGC-3' – 545 п. н.; фрагмент 1-го інтрона супресора гена ПДГ – 5'-ААСАА-АСТGG-АТССG-GCGAT-СТТАС-3' та 5'-АТТАА-GCTTT-CGAAC-САААС-АAGT-3' – 700 п. н.; фрагмент гена OAT – 5' CAGTGCCСАСААТТАССАТСС та 5' CGAАСТТСТТСССААТCАСАAGССА –

708 п. н. Відсутність агробактеріальних домішок контролювали за геном *virC*.

Результати та обговорення

Інтеграція трансгенів у геном рослини відбувається випадковим чином, тому кожна подія трансгенезу унікальна і потребує індивідуального дослідження для можливості прогнозування подальшої експресії трансгена. Потрапляння інсерцій Т-ДНК в функціонально значущі райони рослинного геному може призвести до порушення прояву генів, локалізованих у цій ділянці, і виразитися в порушенні будь-яких ознак генетично зміненої рослини.

Зручність використання для генетичної трансформації тютюну пов'язана з його характеристиками культивування, що дозволяють, з одного боку, швидко регенерувати рослини, з іншого – отримувати стабільні швидковідтворювані результати.

Індукція регенерації пагонів тютюну відбувалась із листкової пластинки переважно шляхом прямого органогенезу протягом 4–6 тижнів після проведення процедури трансформації на середовищі з цефотаксимом, який, на відміну від канаміцин сульфату, може підвищувати регенераційну здатність деяких видів рослин, зокрема соняшнику, залежно від його концентрації (рис. 1, а, б, в) [7].

Первинний скринінг імовірних трансформантів здійснювали за маркерним геном *nptII*. Регенеранти, які піддавалися молекулярно-генетичному аналізу, характеризувалися стійкістю до селективної концентрації канаміцину протягом 6-ти пасажів, при цьому термін одного пасажу становив 14 діб.



Рис. 1. Експлантат (а), індукція регенерації (б), регенерант тютюну (в).

Із випадкової вибірки 33 канаміцин-стійких регенерантів двох генотипів наявність селективного гена *nptII* і екзону гена *ПДГ 1* арабідопсису встановлена в усіх проаналізованих варіантах. Присутність цільового гена орнітинамінотрансферази була підтверджена в 15 зразках із 16-ти стійких до селективного агента пагонах. Слід відмітити, що у 2-х зразках не було ідентифіковано фрагмента цільового гена (*ПДГ int*) арабідопсису. Загалом за високого рівня інтеграції селективного гена (100 %) час-

тота вбудовування повної копії Т-ДНК складала 91 % (рис. 2–4).

Інтеграція неповної копії Т-ДНК притаманна й за генетичної трансформації інших культур. Так, за генетичної трансформації пшениці не всі рослини із маркерним геном *nptII* містили цільовий ген [8]. В іншому випадку у рослинах, в яких попередньо виявили наявність *nptII*, взагалі був відсутній синтетичний ген зеленого флуоресцентного білка [9].

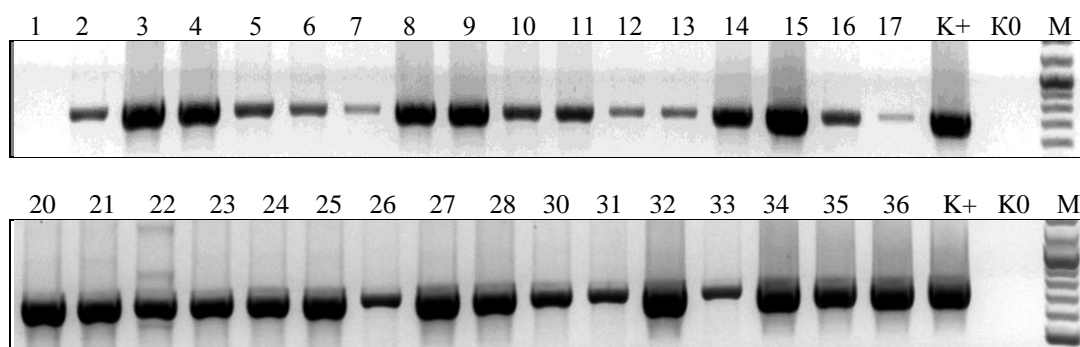


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *nptII*. Доріжки: 1 – контроль Самсун; 2–17, 20–36 зразки ДНК; K+ – контроль позитивний; K0 – ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

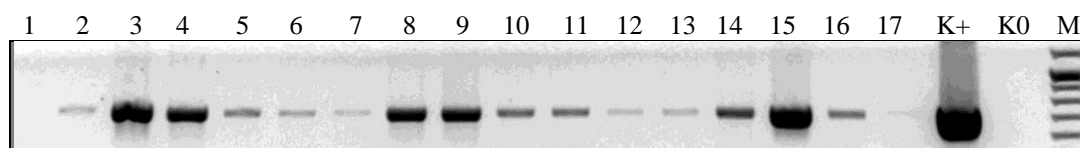


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена ОАТ. Доріжки: 1 – контроль Самсун; 2–17 – зразки ДНК тютюну; K+ – контроль позитивний; K0 – ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

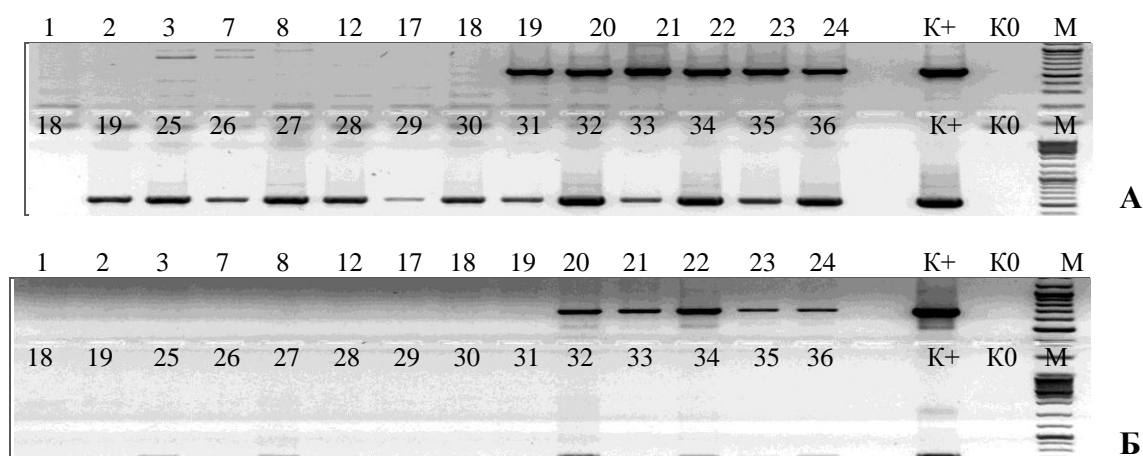


Рис. 4 (А, Б). Електрофореграми продуктів ампліфікації генів *ПДГ ex1* (А) і *ПДГ int* (Б). Доріжки: 1, 18 – контроль Самсун; 19 – контроль Дюбек; 2, 3, 7, 8, 12, 17, 20–36 – зразки ДНК тютюну; K+ – контроль позитивний LBA 4404; K0 – ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

У більшості випадків елімінація послідовностей Т-ДНК спостерігається від середини до її кінця. Порушення в процесі трансгенезу можуть бути потенційним джерелом мутаційних змін, що проявляються у трансгенних рослин у вигляді утворення поліамід, формування пиляків із зниженою фертильністю та тощо [10–13]. Перебудови в Т-ДНК здатні індукувати рекомбінагенні послідовності, до числа яких відносяться паліндроми у широко застосованому 35S-промоторі вірусу мозаїки цвітної капусти, під контролем якого знаходиться дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази [10].

Слід відмітити, що за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи з використанням векторної конструкції, до складу якої входить длРНК-супресора гена проліндегідрогенази, теж були ідентифіковані варіанти з неповною копією Т-ДНК. Так, серед проаналізованих трансформованих рослин-регенерантів (Т0) інбредних ліній кукурудзи присутність селективного гена (*nptII*) і гена інтересу зафіксована у лінії Л250, тоді як у ліній Л1544 і Л1552 були виявлені окремі елементи векторної конструкції рВі2Е [14]. За *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації соняшника з використанням LBA4404 (рВі2Е) частота інте-

рації повної копії Т-ДНК складала для сорту Прометей 16,0 %, а для інбредної лінії 96 А/3 – 8,3 %. Водночас відсоток регенерантів із геном *nptII* для цих генотипів складав 32 % і 25 % відповідно, а для інбредної лінії 16А/3 взагалі варіанти з длРНК-супресором проліндегідрогенази не були ідентифіковані [15].

Таким чином, нестабільність перенесення рекомбінантних молекул – характерне явище під час трансгенезу, яке в подальшому може стати джерелом мутаційних змін генетично-змінених рослин і проявитися в подальших поколіннях.

Висновки

Встановлено, що за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* з використанням штамів LBA4404 і AGLO, що містять плазмиду рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази і рВі-ОАТ з геном орнітінамінотрансферази, можлива інтеграція в геном рослин як повної, так і неповної копії Т-ДНК. Частота трансформації з повним вбудовуванням генетичної конструкції становила 91 %, зокрема, за використання векторної конструкції LBA4404 рВі2Е – 78 %, AGLO рВі2Е – 100 %, AGLO рВі-ОАТ – 94 %.

Література

1. Пермякова (Пухначева) Н.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности встраивания векторных последовательностей в геном трансгенных растений. *Генетика*. 2007. Т. 43, № 11. С. 1501–1510.
2. Tifira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*. 2004. Vol. 20, № 8. P. 375–383.
3. Ziemienowircz A. *Obyssey of Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*. 2001. Vol. 48, № 3. P. 623–635.
4. Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant: a feast of fundamental insights. *Plant J*. 2000. Vol. 23, № 1. P. 11–28.
5. Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E., Gutterson N. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J*. 1999. Vol. 9. P. 727–734.
6. Coutu C., Brandle J., Brown D., Brown K., Miki B., Simmonds J., Hegedus D.D. pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res*. 2007. Vol. 16, № 6. P. 771–781.
7. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника. *Биотехнология*. 2010. Т. 3, № 4. С. 67–74.
8. Степанова А.Ю., Терешок Д.В., Осипова Е.С., Гладков А.Е., Долгих Ю.И. Получение трансгенных растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) методом агробактериальной трансформации. *Биотехнология*. 2006. № 2. С. 20–27.
9. Горбатьок І.Р. Оптимізація *Agrobacterium*-опосередкованої біотехнології трансформації *Triticum aestivum* в культурі *in vitro* та методом *in planta*: дис. ... канд. біол. наук. К., 2016. 192 с.
10. Kohli A., Griffiths S., Palacios N., Twyman R.M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. Molecular characterization of transforming plasmid arrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J*. 1999. Vol. 17. P. 591–601.
11. Rai M., Datta K., Parkhi V., Tan J., Oliva N., Chawla H.S., Datta S.K. Variable T-DNA linkage configuration affects inheritance of carotenogenic transgenes and carotenoid accumulation in transgenic indica rice. *Plant Cell Rep*. 2007. Vol. 26. P. 1221–1231.
12. Offringa R., de Groot M.J.A., Haagsman H.J., Does M.P., van den Elzen P.J.M., Hooykaas P.J.J. Extra-chromosomal homologous recombination and dehe targeting in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *EMBO J*. 1990. Vol. 9. P. 717–728.
13. Risseeuw E., Franke-van Dijk M.E.J., Hooykaas P.J.J. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* N-DNA loci in the plant genome. *The Plant J*. 1997. Vol. 11, № 4. P. 717–728.

14. Михальська С.І., Адаменко Н.І., Моргун Б.В., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Компетентність к *Agrobacterium*-опосередованной трансформации сегментов побега элитных инбредных линий кукурузы. *Биотехнология*. 2012. Т. 5, № 3. С. 98–105.
15. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.І., Моргун Б.В., Кочетов А.В. Анализ эффективности использования двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы для повышения уровня устойчивости подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) к водному дефициту и засолению. *Цитология и генетика*. 2014. Т. 4. С. 19–30.

References

1. Permyakova (Pukhnacheva) N.V., Deineko E.V., Shumny V.K. Features of embedding vector sequences in the genome of transgenic plants. *Genetics*. 2007. Vol. 43, № 11. P. 1501–1510.
2. Tifira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*. 2004. Vol. 20, № 8. P. 375–383.
3. Ziemienowircz A. Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*. 2001. Vol. 48, № 3. P. 623–635.
4. Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant: a feast of fundamental insights. *Plant J*. 2000. Vol. 23, № 1. P. 11–28.
5. Hanson V., Engler D., Moy Y., Newman W., Ralston E., Gutterson N. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J*. 1999. Vol. 9. P. 727–734.
6. Couto C., Brandle J., Brown D., Brown K., Miki W., Simmonds J., Hegedus D.D. pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res*. 2007. Vol. 16, № 6. P. 771–781.
7. Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Kochetov A.V., Tishchenko O.M. Induction of regeneration *in vitro* under *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower inbred line. *Biotechnology*. 2010. Vol. 3, № 4. P. 67–74.
8. Stepanova A.U., Tereshok D.V., Osipova E.S., Gladkov A.E., Dolgikh U.I. Preparation of transgenic wheat plants (*Triticum aestivum* L.) by the method of *agrobacterial* transformation. *Biotechnology*. 2006. № 2. P. 20–27.
9. Gorbatyuk I.R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated biotechnological transformation of *Triticum aestivum* in cultures *in vitro* and *in planta* method: dis. ... cand. Biol. sciences. K., 2016. 192 p.
10. Kohli A., Griffiths S., Palacios N., Twyman R.M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. Molecular characterization of transforming plasmid arrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J*. 1999. Vol. 17. P. 591–601.
11. Rai M., Datta K., Parkhi V., Tan J., Oliva N., Chawla H.S., Datta S.K. Variable T-DNA linkage configuration of infection, inheritance of carotenogenic transgenes and carotenoid accumulation in transgenic indica rice. *Plant Cell Rep*. 2007. V. 26. P. 1221–1231.
12. Offringa R., de Groot M.J.A., Haagsman H.J., Does M.P., van den Elzen P.J.M., Hooymaas P.J.J. Extra-chromosomal homologous recombination and dehe targeting in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *EMBO J*. 1990. Vol. 9. P. 717–728.
13. Risseuw E., Franke-van Dijk M.E.J., Hooymaas P.J.J. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* N-DNA loci in the plant genome. *The Plant J*. 1997. Vol. 11, № 4. P. 717–728.
14. Mykhalska S.I., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V., Tishchenko O.M. Competance to *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot nodal section segments of corn elite inbred lines. *Biotechnology*. 2012. Vol. 5, № 3. P. 98–105.
15. Tishchenko O.M., Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using LBA4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, № 4. P. 19–30.

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., KHRYSTAN O.O.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

THE FREQUENCY OF T-DNA INTEGRATION DURING THE GENETIC TRANSFORMATION OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.)

Aim. Investigation of the is integration frequency of the genes and their components (elements of genetic constructions) in transgenic tobacco-regenerating plants. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) *in vitro*. **Results.** There were obtained tobacco plants with integrated target and selective genes. It was found that a complete copy of T-DNA or its certain elements were embedded. **Conclusions.** The possibility of the integration of complete and incomplete DNA copies during *in vitro* *Agrobacterium*-mediated transformation of the *Nicotiana tabacum* were established. This event were observed both during manipulations with pBi2E plasmid with the double-stranded RNA PHD gene suppressor and pBi-OAT plasmid with OAT gene. The transformation frequency with the complete integration of the genetic construction was 91 %. The integration frequencies for various plasmids were: LBA4404 pBi2E – 78 %; AGLO pBi2E – 100 %; AGLO pBi-OAT – 94 %.

Keywords: *Nicotiana tabacum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*, transgenic plants, T-DNA.