

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *NICOTIANA TABACUM* ДРІЖДЖОВИМИ ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ *TPS1* ТА *TPS2*

А. Ю. КВАСКО¹, С. В. ІСАЄНКОВ¹, О. Є. КРАСНОПЬОРОВА¹, К. В. ДМИТРУК², А. І. ЄМЕЦЬ¹

¹Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

²Інститут біології клітини НАН України
Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16
e-mail: kvasko.anna@ukr.net

Мета. Метою роботи було створення генетичних векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* та їх використання у *Agrobacterium-опосередкованій* трансформації тютюну (*N. tabacum*). **Методи.** Для трансформації рослин було використано штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, який містить конструкції *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно, що знаходились під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти, а також селективним маркерним геном гігроміцин-фосфотрансферази (*hpt*). Як експланти для трансформації використовували листові диски *N. tabacum*. Селекцію трансгенних ліній здійснювали на поживному середовищі з додаванням гігроміцину. **Результати.** Створено векторні конструкції *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2*, апробовані шляхом генетичної трансформації *N. tabacum* як модельного об'єкту. За допомогою методу *Agrobacterium-опосередкованої* трансформації перенесено гени *TPS1* і *TPS2* та відібрано лінії *N. tabacum* на середовищі, що містило селективну концентрацію (25 мг/л) гігроміцину. Трансгенну природу відібраних ліній підтверджено за допомогою методу ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* і *TPS2*. **Висновки.** Отримано трансгенні лінії рослин тютюну з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Встановлено чутливість відібраних трансгенних ліній до різних цукрів у живильних середовищах для індукції пагоноутворення та укорінення рослин *N. tabacum*. Підібрано умови для підвищення частоти трансформації та для укорінення трансгенних ліній, що містять у своєму геномі цільові гени *TPS1* та *TPS2*.

Ключові слова: трегалоза, дріжджові гени *TPS1*, *TPS2*, генетична трансформація, *Nicotiana tabacum*.

Вступ. Трегалоза (α -D-глюкопіранозил α -D-глюкопіранозид) є нередукуючим дисахаридом, який складається з двох молекул глюкози (O'Hara et al., 2013; Paul et al. 2008; Petitjean et al., 2016) та є високостабільною молекулою, що в клітинах живих організмів виконує функції стресопротектора в умовах осмотичного стресу, теплового шоку, дегідратації, екстремального зниження температури та засолення ґрунту (Kwon et al., 2003; Fingueroa et al., 2016; Yatsyshyn, 2017). Трегалоза синтезується у клітинах багатьох живих організмів, зокрема у бактерій (*Escherichia coli*), грибів (*Saccharomyces cerevisiae*), безхребетних тварин (*Nematodes*) та рослин (Lunn et al. 2014; Wang et al., 2004) п'ятьма різними шляхами (Jordachescu et al., 2008). Завдяки подвійній функції трегалози та ферментів її синтезу у клітинах дріжджів, яка полягає у збереженні енергії та стресопротекції, каталізуючі комплекси трегалози та гени, що їх кодують, вже достатньо тривалий час є об'єктом дослідження (Wang et al., 2004; Divate et al., 2017; Yatsyshyn et al., 2017).

На сьогодні, методами генетичної інженерії створено мутантні лінії рослин арабідопсису з надекспресією генів біосинтезу трегалози з *E. Coli* — *otsA*, що кодує трегалозо-6-фосфат синтетазу, та *otsB*, що кодує трегалозо-6-фосфат фосфатазу (Schuluerpmann et al., 2003; Fingueroa et al. 2016). Jung et al. (2003) за допомогою генетичної векторної конструкції, що включала в себе два цільових гена синтезу трегалози *E. coli otsA* та *otsB* під контролем промотора убіквітину кукурудзи (*Ubi:TPSP*) (Seo et al., 2000) успішно трансформовано рослини рису (Jung et al., 2003). Перші роботи з трансформації тютюну були виконані Goddjin et al. у 1997 році та Pilon-Smits et al. у 1998 році за використання конструкцій з генами біосинтезу трегалози з *E. coli otsA* та *otsB* (Pilon-Smits et al., 1998; Goddjin et al., 1997), а також Romero et al. у 1997 році трансформовано тютюн за використання конструкції з дріжджовим геном біосинтезу трегалози *TPS1* (Romero et al., 1997). Karim et al. для трансформації тютюну використовували конструкції або з одним з дріжджових генів *TPS1* або *TPS2* під контролем сильного конститутивного промотору з арабідопсису *AtRBCS1A* або конструкцію з двома цільовими генами під контролем стрес-індуцибельного промотору арабідопсису *AtRAB18* (Karim et al., 2002). Незважаючи на те, що дані цих досліджень вказують на підвищену стійкість створених рослин до стресових умов навколишнього середовища, фенотипічні ознаки внаслідок підвищення вмісту трегалози зазнавали різких змін, зокрема спостерігали затримку пагоноутворення та нетиповий розвиток коренів (Jung et al., 2003; Karim et al. 2002), відсутність цвітіння (Gomes et al., 2006; Jung et al., 2003; Lunn et al., 2014), розвиток ланцетовидного листя (Goddjin et al., 1997; Romero et al., 1997; Gomes et al., 2006), а також зупинку росту і подальшого розвитку трансгенних ліній (Schuluerpmann et al., 2003).

Саме тому, метою даної роботи було створення генетичних векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*, а також оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та селекції трансформованих ліній рослин тютюну для підвищення частоти трансформації та вкорінення отриманих ліній., та апробація створених векторів шляхом генетичної трансформації тютюну.

Матеріали та методи

Векторні конструкції та бактеріальні штами. Клони *TPS1* та *TPS2* були люб'язно надані Інститутом біології клітини НАН України, м. Львів. На основі нуклеотидних послідовностей кодуєчих ділянок генів *TPS1* та *TPS2* були сконструйовані пари специфічних праймерів, що містили у собі специфічні сайти розпізнавання BP-клонази для Gateway-клонування:

TPS1 (Gate)_for
5' — ATGACTACGGATAACGCTAAGG — 3':
TPS1 (Gate)_rev
5' — GTTTTTGGTGCCAGAGGAGC — 3';
TPS2 (Gate)_for
5' — ATGGGGCATGATGGAATAA — 3':
TPS2 (Gate)_rev
5' — ACCACTGCCCAAGACAATTC — 3'

Кодуючі послідовності генів *TPS1* та *TPS2* без стоп кодону довжиною 1488 п.н. та 2691 п.н. відповідно було ампліфіковано для подальшого перенесення у бінарний вектор pGWB2 використовуючи метод Gateway клонування (Karimi et al., 2002; Fleuler et al., 2008). Для цього ампліфікований ПЛР фрагмент виділяли із агарозного гелю та використовували для реакції BP-рекомбінації із донорним вектором pDONOR207. Реакцію BP-рекомбінації проводили з BP-клоназою (BP Clonase™ II, Thermo Fisher Scientific) наступним чином: до 6 мкл ампліфікованого ПЛР *TPS1* та *TPS2* фрагмента додавали 1 мкл донорного вектора pDONOR207 (150 нг), 1 мкл ТЕ-буферу (pH 8,0) та 2 мкл BP Clonase™ II. Реакцію інкубували при 25°C протягом 18 годин. Для зупинки реакції та подальшої трансформації компетентних клітин кишкової палички (*E. coli* штам DH5α) до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнкінази K та інкубували при 37 °C протягом 10 хв. Для клонування послідовностей у вектор призначення pGWB2 проводилась реакція LR-рекомбінації, використовуючи суміш ферментів LR Clonase™ II (Thermo Fisher Scientific). До 6 мкл створеного за допомогою BP рекомбінації Entry-клону (100 нг) додавали 1 мкл вектору призначення pGWB2 та 1 мкл ТЕ-буферу (pH 8,0). До 8 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл суміші ферментів LR Clonase™ II. Реакцію інкубували при 25 °C протягом 18 годин. Для зупинки реакції та подальшої трансформації компетентних клітин кишкової палички (*E. coli* штам DH5α) до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнкінази K та інкубували при 37 °C протягом 10 хв. Ство-

рені конструкції були перенесені у клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 для подальшого використання у генетичній трансформації рослин.

Agrobacterium-опосередкована трансформація рослин тютюну *N. tabacum*. З метою опрацювання створених генетичних конструкцій методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин як модельний об'єкт було обрано тютюн *N. tabacum* сорту Самсун. Для перенесення цільових генів застосовували метод трансформації листових дисків (Tuncer et al., 2006). Для цього висічку з листків тютюну розміром 0,5–1,5 см² механічно пошкоджували та проводили їх інокуляцію нічною культурою агробактерії, вирощеної в середовищі LB (OD₆₀₀ = 0.4 – 0.8) з додаванням канаміцину (100 мг/л) та

рифампіцину (50 мг/л). В одному експерименті використовували 20–50 експлантів. Інокуляцію проводили протягом 30 хв в присутності 40 мМ ацетосирингону (Rosales-Campos et al., 2019; Curtis et al., 1995), після чого експланти просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на модифіковане середовище МС (Murashige & Skoog, 1962) – МСР (табл. 1) для кокультивування з агробактерією протягом 48 год при 28 °С у темряві.

Регеновані в умовах селективного тиску пагони відокремлювали та переносили на середовище МС2 (табл. 1) для їх укорінення. Показники частоти та ефективності регенерації в умовах селективного тиску визначали на 30–40 добу культивування.

Таблиця 1. Склад живильних середовищ, використаних в дослідженнях з генетичної трансформації тютюну

| Назва середовища | Основні компоненти | Фітогормони | Сахароза, г/л | Антибіотики |
|------------------|---|--------------------------|---------------|---|
| МСР | Макро- та мікросолі МС, вітаміни МС (Murashige & Skoog, 1962) | 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК | 30 | - |
| МС1 | Макро- та мікросолі МС, вітаміни МС (Murashige & Skoog, 1962) | 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК | 30 | 500 мг/л цефотаксиму, 25 мг/л гігromіцину |
| МС2 | 1/2 макросолі МС, мікросолі МС, вітаміни МС (Murashige & Skoog, 1962) | - | 15 | 300 мг/л цефотаксиму, 25 мг/л гігromіцину |

Важливим завданням було з'ясувати, як різні джерела вуглецю та у яких концентраціях можуть впливати на підвищення частоти регенерації та, особливо, вкорінення досліджуваних

рослин тютюну, оскільки навіть на 40 добу культивування у досліджуваних рослин не спостерігалось утворення коренів в порівнянні з контрольними рослинами.

Таблиця 2. Концентрації цукрів як джерел вуглецю, які було додано окремо до середовищ на основі середовища МС (Murashige & Skoog, 1962) на етапах кокультивування, регенерації та вкорінення контрольних рослин та рослин, відселектованих після трансформації

| Джерело вуглецю | Концентрація, г/л | | | | | |
|-----------------|-------------------|---|----|----|----|----|
| | 0 | 5 | 10 | 25 | 30 | 45 |
| Мальтоза | 0 | 5 | 10 | 25 | 30 | 45 |
| Глюкоза | Концентрація, г/л | | | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 25 | 30 | 45 |
| Сахароза | Концентрація, г/л | | | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 25 | 30 | 45 |

Частоту регенерації в умовах селективного тиску визначали на 30–40 добу після трансформації як співвідношення кількості життєздатних експлантів до загальної кількості експлантів,

взятих у дослідження, показником ефективності трансформації була середня кількість регенованих пагонів, сформованих в умовах селективного тиску, на один експлант. Для достовір-

ності отриманих результатів, контрольні рослини тютюну, що не зазнавали обробки агробактерією, було висаджено на кожний варіант середовища з відібраними концентраціями цукрів для підбору умов трансформації рослин створеними конструкціями.

Результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Excel. Експерименти із трансформації тютюну повторювали не менше трьох разів, для оцінки достовірності результатів розраховували критерії Стьюдента при $P \leq 0,05$.

Молекулярно-генетичний аналіз створених ліній рослин тютюну *N. tabacum* методом агробактеріальної трансформації. Для молекулярно-генетичного аналізу тотальну ДНК відселектованих ліній екстрагували з листя ЦТАВ-методом (Ausubel et al., 1987). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували наступні пари праймерів до цільових генів:

TPS1 (5' - AGATCATCGGTGTTCCAAGG - 3' та 5' - TGTCTTCCGTGCAAAGAGTG - 3');
TPS2 (5' - ATGGGGCATGATGGAATAA - 3' та 5' - ACCACTGCCCAAGACAATTC - 3').

Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг ДНК, по 1 мМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 мкл Taq-полімерази (Fermentas, Литва). Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США) за наступною схемою: початкова денатурація при 95°C, 5 хв; ампліфікація — 40 циклів (94 °C — 30 с, 55 °C — 45 с, 72 °C — 1 хв 30 с); кінцева елонгація — 72 °C, 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі в 1xTBE — буфері в присутності етидид броміду. Для визначення довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер молекулярної маси (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

Створення векторних конструкцій з генами біосинтезу трегалози. Застосовуючи методику Gateway-клонування (Karimi et al., 2002; Fleuler et al., 2008) було створено векторні конструкції рGWB2-TPS1 та рGWB2-TPS2 з дріжджовими генами біосинтезу трегалози (що кодує перший фермент біосинтезу трегалози — трегалозо-6-фосфат синтетази) та *TPS2*

(що кодує другий фермент біосинтезу — трегалозо-6-фосфат фосфатазу) (рис. 1 і 2).

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин тютюну було використано створені векторні конструкції рGWB2-TPS1 та рGWB2-TPS2 з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* (рис. 1 і 2).



Рис. 1. Схема бінарного вектора рGWB2-TPS1. LB та RB — ліва та права межі Т-ДНК; *TPS1* — цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат синтетази; *P35S* — промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *Pnos*, *Tnos* — промотор та термінатор неопалінсинтази; *nptII* — селективний ген неоміцинфосфотрансферази II; *hpt* — селективний ген гігromіцинфосфотрансферази.

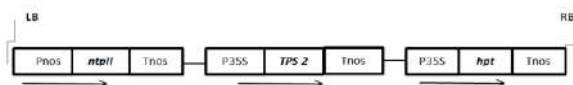


Рис. 2. Схема бінарного вектора рGWB2-TPS2. LB та RB — ліва та права межі Т-ДНК; *TPS2* — цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат фосфатази; *P35S* — промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *Pnos*, *Tnos* — промотор та термінатор неопалінсинтази; *nptII* — селективний ген неоміцинфосфотрансферази II; *hpt* — селективний ген гігromіцинфосфотрансферази.

Підбір селективної концентрації гігromіцину. Для визначення селективної концентрації гігromіцину експланти контрольних рослин культивували на середовищі МС1, що містило гігromіцин в концентрації від 0 до 35 мг/л, для регенерації рослин. Концентрація гігromіцину (ЛД₇₀) у 25 мг/л була визначена нами як селективна для трансформованих рослин (рис. 3).

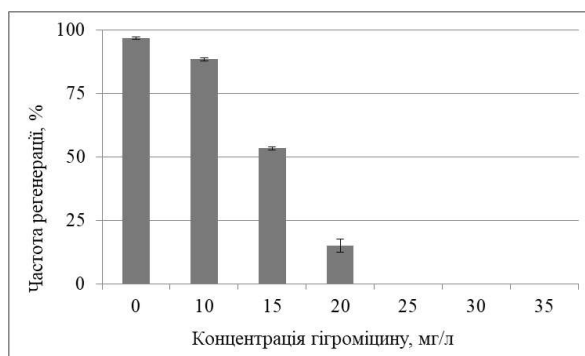


Рис. 3. Частота регенерації рослин тютюну (%) на живильному середовищі, доповненому гігromіцином у концентраціях від 0 до 35 мг/л.

Регенерація рослин тютюну (*N. tabacum*) після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації конструкціями з генами біосинтезу трегалози. На 30 добу селекції рослин тютюну на середовищі МС1 (табл. 1) після генетичної тра-

нформації експлантів конструкціями, що несли у собі гени *TPS1* та *TPS2* частота регенерації експлантів в умовах селективного тиску була на рівні $86,5 \pm 1,78\%$ та $53,3 \pm 1,09\%$ відповідно (рис. 4; рис. 5).

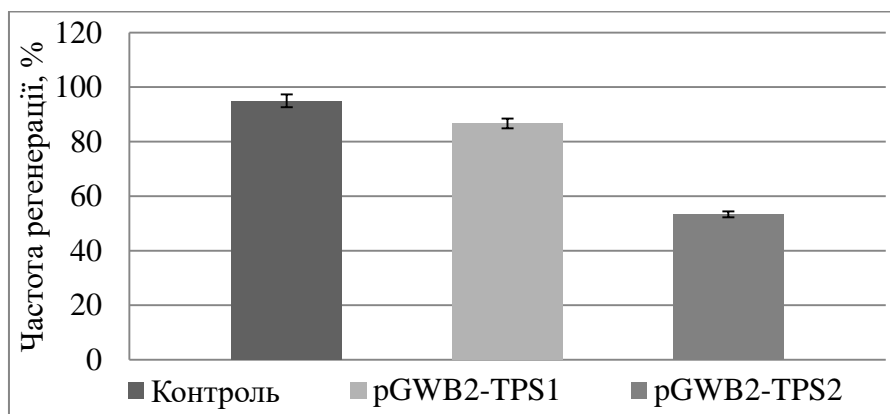


Рис. 4. Частота регенерації (%) дослідних рослин тютюну після агробактеріальної трансформації за культивування на середовищі МС1 (табл. 1) в порівнянні з контрольними рослинами.

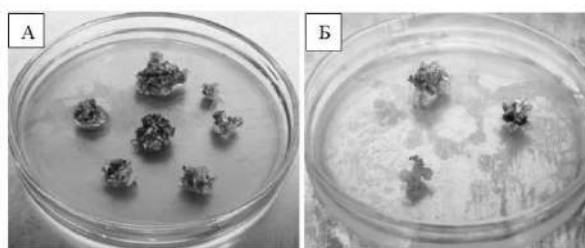


Рис. 5. Експланти тютюну на 30 добу культивування на середовищі МС1 після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням конструкцій з генами біосинтезу трегалози: А — конструкція pGWB2-TPS1; Б — pGWB2-TPS2.

На 30–40 добу вирощування у дослідних рослин на середовищі МС1 (табл. 1) спостерігали затримку росту пагонів в порівнянні з контрольними рослинами, а після їх перенесення на середовище МС2 на 30 добу культивування спостерігали затримку коренеутворення порівняно з контролем (табл. 1). Дослідження з контрольними рослинами на аналогічних термінах вирощування показало частоту регенерації з використанням середовища МС1 (табл. 1) — $95 \pm 2,35\%$, а частоту коренеутворення на середовищі МС2 (табл. 1) — $98 \pm 1,89\%$, загалом було протестовано не менше 200 контрольних експлантів (рис. 6). Опираючись на літературні дані (Karim et al., 2007; Lunn et al., 2014; Schluerpman et al., 2003) було висунуто припу-

щення, що аномалії, які спостерігались у рослин тютюну після етапів трансформації, а саме затримка росту і відсутність коренеутворення, можливо, пов'язані з перенесенням та експресією дріжджових генів *TPS1* та *TPS2* у відібраних в умовах селективного тиску ліній рослин *N. tabacum*.

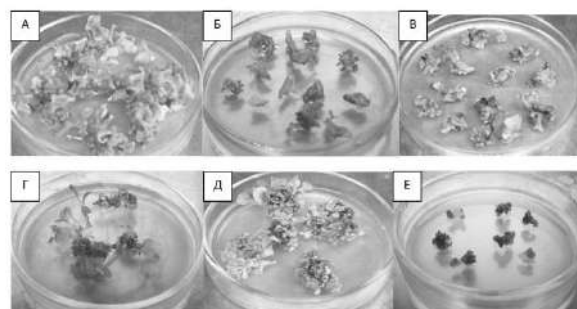


Рис. 6. Контрольні рослини без обробки агробактерією та експериментальні експланти тютюну на 30 добу культивування після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням конструкцій з генами біосинтезу трегалози: А — контрольні експланти на середовищі МС1; Б — контрольні рослини на середовищі для регенерації з сахарозою — 5% (табл. 2); В — контрольні рослини на селекційному середовищі з додаванням гідроміцину 25 мг/л та цефотаксиму 500 мг/л (табл. 2); Г — експланти тютюну після трансформації з конструкцією pGWB2-TPS1, вміст сахарози 5% (табл. 2); Д — конструкція pGWB2-TPS2, вміст сахарози 5% (табл. 2); Е — конструкція pGWB2-TPS1, середовище з мальтозою 5% (табл. 2).

Молекулярно-генетичний аналіз рослин тютюну після агробактеріальної трансформації. Для підтвердження трансгенної природи отриманих ліній рослин тютюну було проведено їх молекулярно-генетичний аналіз (рис. 7). Наявність послідовностей генів інтересу TPS1 та TPS2 визначали за допомогою ПЛР. У результаті проведеного аналізу було отримано очікувані фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають за розмірністю позитивному контролю.

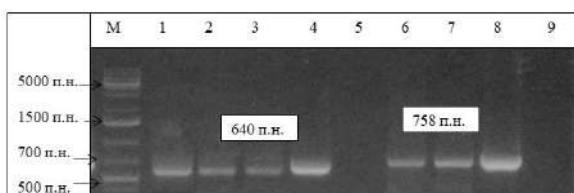


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків тютюну з праймерами до генів TPS1 та TPS2: М — маркер (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas»); 1–3 — ДНК зразків тютюну, що трансформовані конструкцією rGWB2-TPS1 з геном TPS1 (розмір амплікону 640 п.н.); 4 — позитивний контроль (плазмідна ДНК конструкції rGWB2-TPS1); 5 — негативний контроль (ДНК контрольної нетрансформованої рослини тютюну); 6–7 — ДНК зразків тютюну, що трансформовані конструкцією rGWB2-TPS2 з геном TPS2 (розмір амплікону 758 п.н.); 8 — позитивний контроль (плазмідна ДНК конструкції rGWB2-TPS2); 9 — негативний контроль (реакційна суміш для ПЛР без ДНК).

Вплив різних концентрацій цукрів у складі поживного середовища на регенерацію та вкорінення рослин тютюну *N. tabacum*

після агробактеріальної трансформації конструкціями з генами біосинтезу трегалози. Оскільки, існують дані, що вміст трегалози в рослинній клітині, а також рівень експресії генів її біосинтезу здатні впливати на розподіл метаболітів під час енергетичного обміну, регулюють кількість та розподіл цукрів всередині та поза клітиною (Fingueroa et al., 2016; Jung et al., 2003), важливим завданням було з'ясувати, як концентрація різних джерел вуглецю в регенераційному середовищі може впливати на ріст та розвиток трансформованих рослин. Для вирішення поставленої задачі було проведено дослідження з модифікації складу середовища МС (Murashige & Skoog, 1962) додаванням до нього глюкози, сахарози та мальтози у різних концентраціях (табл. 2).

За результатами дослідження, найвищі показники частоти та ефективності трансформації за використання конструкції rGWB2-TPS1 зафіксовано для рослин, які регенерували на середовищах із концентраціями глюкози, сахарози або мальтози від 25 до 45 % (табл. 3). За цих умов найвищий показник частоти регенерації в умовах селективного тиску становив $88,5 \pm 2,23$ % на середовищі з 45 г/л сахарози, а найбільший показник ефективності трансформації — 4. При вирощуванні рослин на середовищі, що містило глюкозу ефективність трансформації була вища і складала в середньому 5 регенератів на експлант, а показник частоти регенерації в умовах селективного тиску був на рівні $81,67 \pm 3,24$ %.

Таблиця 3. Частота регенерації рослин тютюну після трансформації конструкцією rGWB2-TPS1 на середовищах з різними концентраціями цукрів в порівнянні з контролем в умовах селективного тиску

| Частота регенерації, % | Концентрація цукрів, г/л | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|
| | Мальтоза | | | | | |
| | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | 17,4 ± 2,03 | 30 ± 1,75 | 55 ± 0,97 | 73,7 ± 2,5 | 88 ± 3,1 | 80 ± 1,5 |
| Дослід | 10,3 ± 1,6 | 16,6 ± 2,34 | 28,3 ± 1,8 | 43,5 ± 3,1 | 53,42 ± 2,71 | 63,91 ± 2,62 |
| | Глюкоза | | | | | |
| % | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | 15 ± 2,34 | 38 ± 1,7 | 50,5 ± 2 | 88,5 ± 2,1 | 96 ± 1,45 | 72 ± 2,3 |
| Дослід | 11,6 ± 0,87 | 31,2 ± 2,5 | 35,4 ± 2,2 | 47 ± 3,8 | 86 ± 3,9 | 81,67 ± 3,24 |
| | Сахароза | | | | | |
| % | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | 18 ± 0,95 | 35 ± 1,46 | 58 ± 0,85 | 80 ± 2,8 | 93 ± 2,2 | 76 ± 1,6 |
| Дослід | 18,3 ± 2,89 | 20 ± 2,32 | 56,7 ± 2,67 | 68,9 ± 3,9 | 85,3 ± 3,93 | 88,5 ± 3,23 |

Примітка: $P^* \leq 0,05$.

Нижчі показники ефективності регенерації в умовах селективного тиску були отримані при додаванні у поживне середовище мальтози в концентрації 30–45 г/л, як єдиного джерела вуглецю (1–2 регенеранти), ріст пагонів затримувався або зовсім не відбувався (рис. 6), а найвищий показник ефективності регенерації в умовах селективного тиску був $63,91 \pm 2,62$ % (табл. 3). На 60 добу вирощування на середовищі для коренеутворення (з додаванням цефотаксиму 300 мг/л, гідроміцину 25 мг/л) — вдалося досягнути $25 \pm 1,98$ % вкорінення пагонів (рис. 5) при додаванні сахарози або глюкози у всіх протестованих концентраціях (табл. 3).

За трансформації рослин конструкцією pGWB2-TPS2 найвищі показники ефективності та частоти трансформації було зафіксовано на 40 добу культивування на середовищі з низьким

вмістом цукрів — 5–10 г/л (табл. 4). Найбільший показник частоти регенерації в умовах селективного тиску був на рівні $73,5 \pm 2,34$ %, найбільший показник ефективності регенерації — 4 та 5 добре розвинених регенерованих пагонів на одному експланті. На середовищі з мальтозою у концентрації 25–30 г/л ефективність утворення регенерантів також була нижча, у середньому 2–3 регенерованих пагонів на кожному з експлантів. За культивування на середовищах з сахарозою або глюкозою у концентраціях 25–45 г/л (табл. 3), у експлантів спостерігали затримку росту. Після їх перенесення на середовище для ризогенезу (з додаванням цефотаксиму 300 мг/л та гідроміцином 25 мг/л) — $20 \pm 2,78$ % регенерованих пагонів вдалося укорінити через 60 днів культивування (рис. 8).

Таблиця 4. Частота регенерації рослин тютюну після трансформації конструкцією pGWB2-TPS2 на середовищах з різними концентраціями цукрів в порівнянні з контролем в умовах селективного тиску

| Частота регенерації, % | Концентрація цукрів, г/л | | | | | |
|------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| | Мальтоза | | | | | |
| | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | $16,5 \pm 1,78$ | $23,4 \pm 0,68$ | $48 \pm 2,34$ | $65 \pm 2,8$ | $83 \pm 3,4$ | $78 \pm 5,6$ |
| Дослід | $10 \pm 1,1$ | $23,5 \pm 1,6$ | $58,4 \pm 1,95$ | $45 \pm 1,9$ | $40 \pm 2,2$ | $25 \pm 2,63$ |
| | Глюкоза | | | | | |
| | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | $14 \pm 2,1$ | $40,15 \pm 1,76$ | $56 \pm 0,98$ | $78,12 \pm 1,23$ | $93 \pm 4,3$ | $76 \pm 1,25$ |
| Дослід | $12 \pm 1,8$ | $58 \pm 2,11$ | $73,5 \pm 2,34$ | $56 \pm 2,6$ | $26,57 \pm 1,98$ | $11,23 \pm 1,7$ |
| | Сахароза | | | | | |
| | 0 г/л | 5 г/л | 10 г/л | 25 г/л | 30 г/л | 45 г/л |
| Контроль | $23,4 \pm 1,4$ | $40 \pm 1,47$ | $60 \pm 1,98$ | $76 \pm 1,56$ | $97 \pm 2,34$ | $87 \pm 1,89$ |
| Дослід | $11,6 \pm 1,7$ | $52 \pm 2,5$ | $71,3 \pm 1,25$ | $68 \pm 2,15$ | $58 \pm 1,6$ | $31 \pm 2,46$ |

Примітка: $P^* \leq 0,05$.

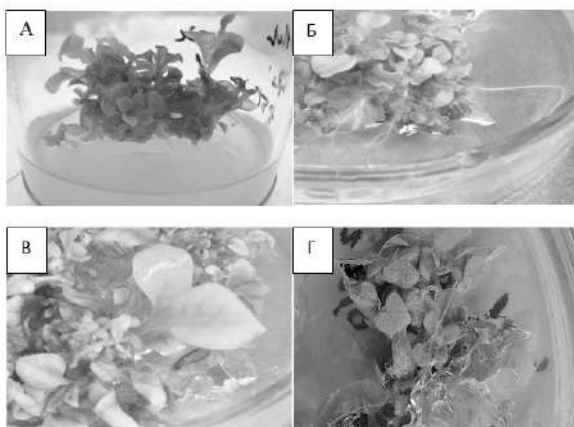


Рис. 8. Регенеранти тютюну після трансформації плазмідом pGWB2-TPS1 (А,Б) та pGWB2-TPS2 (В, Г): А, В — на 30–40 день після трансформації на регенераційному середовищі (утворення пагонів та розгортання листків); Б, Г — на 60 добу на середовищі для вкорінення.

Висновки

Таким чином, нами було створено векторні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* (ген трегалозо-6-фосфатсинтетази) та *TPS2* (ген трегалозо-6-фосфат фосфатази) для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослинних об'єктів. Генетичну трансформацію здійснювали за використання *N. Tabacum* як модельного об'єкту, оптимізуючи протокол регенерації та укорінення трансгенних ліній з метою отримання рослин, стійких до посухи за рахунок експресії цільових генів, проте без проявів аномалій розвитку (затримки пагонеутворення, росту, розгортання листя, коренеутворення та затримки цвітіння). Отримані результати свідчать про те, що рослини, трансформовані конструкцією з геном біосинтезу трегалози *TPS1* (pGWB2-TPS1) менш чутливі до наявності в середовищі для регенерації цукрів у будь-яких досліджених нами концентраціях, для цих рослин характерним був найвищий показник частоти регенерації в умовах селективного тиску — $88,5 \pm 2,23$ % та ефективності регенерації в умовах селективного тиску (5). У рослин, трансформованих конструкцією з геном біосинтезу трегалози *TPS2* (pGWB2-TPS2) найвищі показники частоти регенерації в умовах селективного тиску — $73,5 \pm 2,34$ % та її ефективності (5) були зафіксовані на варіантах (табл. 2) поживних середовищ зі зниженою концентрацією цукрів (5–10 г/л). Загалом, у результаті дослідження з оптимізації умов вирощування, вдалося збільшити показник частоти регенерації в умовах селективного тиску та отримати рослини тютюну після перенесення генів *TPS1* та *TPS2* з достатньо розвиненими пагонами. Також було підібрано умови для укорінення регенованих пагонів після трансформації генами *TPS1* та *TPS2*, відсоток таких рослин був $25 \pm 1,98$ % та $20 \pm 2,78$ % відповідно, що дало змогу провести молекулярно-генетичний аналіз вкорінених рослин.

За результатом молекулярно-генетичного аналізу було отримано трансгенні рослини тютюну з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Наступним етапом дослідження буде перевірка створених ліній на посухостійкість, а також порівняння рівня вмісту трегалози у трансгенних та контрольних рослин тютюну.

Робота була виконана в рамках проекту цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медици-

ни, промисловості та сільського господарства» (затверджена постановою Президії НАН України від 11.02.15 № 22) «Створення посухостійких ліній рослин за допомогою надекспресії дріжджових генів біосинтезу трегалози» (2015–2019 pp.)

References

1. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley, 1987. P. 431–433.
2. Curtis I. S., Davey M. R., Power J. B. Leaf Disk Transformation. *Agrobacterium Protocols*. 1995. Vol. 5. P. 59–70. doi: 10.1385/0-89603-302-3:59.
3. Divate N. R., Chen G.-H., Divate R. D., Ou B. R., Chung Y. C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. *Bioengin.* 2017. Vol. 5. P. 524–535. doi: 10.1080/21655979.2016.1257449.
4. Finguroa C. M., Feil R., Ishihara H., Watanabe M., Kolling K., Krause U., Hohne M., Encke B., Plaxton W. C., Zeeman S. C., Li Z., Schulze W. X., Hoefgen R., Stitt M., Lunn J. E. Trehalose-6-phosphate coordinates organic and amino-acid metabolism with carbon availability. *Plant J.* 2016. Vol. 85. P. 410–423. doi: 10.1104/pp.16.00417.
5. Fleuler F., Stettler T., Meyerhofer M., Leder L., Mayr I. M. Development of a novel Gateway-based vector system for efficient, multiparallel protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.* 2008. Vol. 59. P. 232–241. doi: 10.1016/j.pep.2008.02.003.
6. Goddijn J. M., Verwoerd Th. C., Voogd E., Krutwagen R. W. H. H., de Graaf P. T. H., Poéis J., van Dun K., Ponstein A. S., Damm B., Pen J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 113. P. 181–190. doi: 10.1104/pp.113.1.181.
7. Gomes D. L., Baud S., Gilday A., Li Y., Graham A. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.* 2006. Vol. 46. P. 69–84. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02662.x.
8. Iordachescu M., Imai R. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 2008. Vol. 50. P. 1223–1229. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00736.x.
9. Jung I.-C., Oh S.-J., Seo J.-S., Choi W.-B., Song S. J., Kim Ch. H., Kim Y. Sh., Seo H.-S., Choi Y. D., Nahm B. H., Kim J.-K. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 131. P. 516–524. doi:10.1073/pnas.1322135111.

10. Karim S., Aronsson H., Ericson H., Pirhonen M., Leyman B., Welin B., Mantyla E., Palva E. T., Dijck P. V., Holmstrom K. O. Improved drought tolerance without undersired side effect in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol. Biol.* 2007. Vol. 64. P. 371–386. doi:10.1007/s11103-007-9159-6.
11. Karimi M., Inze D., Depicker A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends. Plant Sci.* 2002. Vol. 7. P. 193–195. doi: 10.1038/nature05286.
12. Kwon H. B., Yeo E. T., Hahn S. E., Bae S. C., Kim D. Y., Byun M. O. Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) and trehalose-6-phosphate phosphatase (TPS2) from *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast Research.* 2003. Vol. 3. P. 433–440. doi: 10.1016/S1567-1356(03)00035-7.
13. Lunn J. E., Delorge I., Figueroa C. M., Dijck P. V., Stitt M. Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 2014. P. 544–567. doi: 10.1111/tpj.12509.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
15. O'Hara L. E., Paul M. J., Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Mol. r Plant.* 2013. Vol. 8. P. 261–274. doi: 10.1093/mp/sss120.
16. Paul M. J., Primavesi L. F., Jhurreea D., Zhang Y. Trehalose metabolism and signaling Annual Rev. *Plant Biol.* 2008. Vol. 59. P. 417–441. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945.
17. Petitjean M., Teste M. A., Leger-Silvestre I., Francois J. M., Parrou J.-L. A new function for the yeast Trehalose-6P Synthase (Tps1) protein, as key pro-survival factor during growth, chronological ageing and apoptotic stress. *Mechanisms Ageing Dev.* 2016. doi:10.1016/j.mad.2016.07.011.
18. Pilon-Smits E. A., Terry N., Sears T. Trehalose — producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Plant Physiol.* 1998. Vol. 152. № 4/5. P. 525–532.
19. Romero C., Belles J. B., Vaya J. L., Serrano R., Cullianez-Macia A. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta.* 1997. Vol. 201. P. 293–297.
20. Rosales-Campos A. L., Gutierrez-Ortega A. Agrobacterium-mediated Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaf Explants. *Bio-101.* 2019. E3150. doi: 10.21769/BioProtoc.3150.
21. Schluepmann H., Pellne T., van Dijken A., Smeekers S., Paul M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci (USA).* 2003. Vol. 100. P. 6849–6854. doi: 10.1073/pnas.1132018100.
22. Seo H. S., Koo Y. J., Lim J. Y., Song J. T., Kim C. H., Kim J.-K., Lee J. S., Choi Y. D. Characterization of a bifunctional fusion enzyme between trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol.* 2000. Vol. 66. P. 2484–2490. doi: 10.1128/aem.66.6.2484-2490.2000.
23. Tuncer T. Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) with antimicrobial pflp gene and analysis of transgenic plants. In: Partial Fulfillment of the Requirements the Degree of Masters of Science in Biotechnology. 2006. P. 110.
24. Wang Y. J., Hao Y. J., Zhang Z. G., Chen T., Zhang J. S., Chen S. Y. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. *J. Plant Physiol.* 2004. Vol. 162. P. 215–223. doi: 10.1016/j.jplph.2004.06.014.
25. Yatsyshyn V. Yu., Kvasco A. Yu., Yemets A. I. Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol Genet.* 2017. Vol. 51, № 5. P. 62–78. doi: 10.3103/S0095452717050127.

GENETIC TRANSFORMATION OF NICOTIANA TABACUM WITH YEAST GENES OF TREHALOSE BIOSYNTHESIS TPS1 AND TPS2

A. Yu. Kvasco¹, S. V. Isayenkov¹, E. E. Krasnoperova¹, K. V. Dmytruk², A. I. Yemets¹

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine
Ukraine 04123, Kyiv, Osipovskogo st., 123

²Institute of Cell Biology NAS of Ukraine
Ukraine, 79005, Lviv, Dragomanova st., 14/16
e-mail: kvasko.anna@ukr.net

Aim. The aim of the study was the creation of vector constructions with yeast genes of trehalose synthesis TPS1 and TPS2 and their using for Agrobacterium-mediated transformation of *N. tabacum*. **Methods.** Strain of Agrobacterium tumefaciens GV3101 carrying vector constructions — pGWB2-TPS1 and pGWB2-TPS2 with TPS1 and TPS2 target genes respectively under 35S promoter of cauliflower mosaic virus and selectable hpt gene of hygromycin phosphotransferase has been used for plants transformation. *N. tabacum* leaf explants were used for Agrobacterium-mediated transformation. The medium with the addition of hygromycin was applied to transgenic lines selection. **Results.** The created vector constructions pGWB2-TPS1 and pGWB2-TPS2 has been used in genetic *N. tabacum* transformation. Target genes TPS1 and TPS2 were integrated applied of Agrobacterium-mediated transformation and transgenic lines of *N. tabacum* were selected with addition at 25 mg/l hygromycin into the medium. Molecular analysis confirmed the transgenic nature of selected lines. **Conclusions.** Sensitivity of selected lines for sugars content into the medium was established for shoots and roots formation of tobacco plants. Conditions for increase of transformation frequency and rooting of transgenic lines of plant after integrated of target TPS1 and TPS2 genes were investigated.

Keywords: trehalose, yeast genes TPS1, TPS2, genetic transformation, *Nicotiana tabacum*.