

УДК 606. 57.08

ПОКРАЩЕННЯ АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗ ТРИФЛЮОПЕРАЗИНУ ТА ГЕНІСТЕЇНУ

А.І. ЄМЕЦЬ, В.В. ФЕДОРЧУК, Я.Б. БЛЮМ

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ
E-mail: yemets.alla@gmail.com

Досліджено вплив трифлюоперазину – інгібітора серин/треонінових протеїнкіназ, а також геністеїну – інгібітора тирозинових протеїнкіназ на частоту Agrobacterium-опосередкованої трансформації покритонасінних на прикладі тютюну як модельного об'єкта. Вивчено вплив широкого діапазону концентрацій трифлюоперазину від 10 до 300 мкМ та встановлено, що за використання трифлюоперазину у концентрації 10 мкМ частота агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну підвищувалась на 25 %. Паралельно досліджено вплив діапазону концентрацій геністеїну в межах 1–100 мкМ та встановлено найбільш ефективну його концентрацію (100 мкМ) для агробактеріальної трансформації листових дисків тютюну, при якій частота трансформації підвищувалась на 12 %.

Ключові слова: *Agrobacterium-опосередкована трансформація, Nicotiana tabacum, інгібітори серин/треонінових та тирозин-залежних протеїнкіназ.*

Вступ. *Agrobacterium tumefaciens* притаманна унікальна властивість переносити молекулу ДНК в рослинну клітину за допомогою процесу, відомого як горизонтальне перенесення генів [1, 2]. У порівнянні з іншими найбільш вживаними методами перенесення чужорідної ДНК у ядро рослинної клітини, такими як біобалістична трансформація, електропорація та мікроін'єкція, має очевидні переваги трансформація за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [3, 4]. Агробактеріальний метод трансформації дозволяє вводити в рослину великі за розміром ге-

нетичні конструкції, призводить до мінімальних порушень в послідовності гена, що переноситься, а також не потребує використання спеціального устаткування.

Відомо, що взаємодія між агробактерією та рослиною регулюється різноманітними хімічними сигналами, що можуть впливати на вірулентність бактерії, однак молекулярні механізми цього явища до цього часу остаточно не з'ясовані [1, 5–7]. Агробактеріальне інфікування рослин являє собою складне явище, яке зазвичай розпочинається із пошкодження рослинних тканин, що призводить до продукції фенольних сполук, таких як ацетосирінгон [6, 8]. Ацетосирінгон активує регіон вірулентних генів в бактеріальній плазміді. В свою чергу рослина для захисту від інвазії запускає механізми експресії та активації ряду захисних білків, що пригнічують дію патогена та перешкоджають перенесенню Т-ДНК в рослинну клітину [5, 6, 8, 9]. Таким чином, під час процесу взаємодії рослини та агробактерії активуються цілі каскади хімічних реакцій, спрямовані на захист рослинної клітини від бактеріальної інвазії [5, 10].

Визначальну роль в цих сигнальних каскадах відіграють такі фітогормони, як індоліл-3-оцтова кислота, саліцилова кислота та етилен [1, 6, 10]. Відповідно, в опосередкуванні регуляторної дії фітогормонів мають бути задіяні різні групи протеїнкіназ та протеїнфосфатаз, що фосфорилують цільові білки [2, 10, 11].

© А.І. ЄМЕЦЬ, В.В. ФЕДОРЧУК, Я.Б. БЛЮМ, 2016

Зокрема, після того як рослина розпізнала бактерію за допомогою молекул, асоційованих зі специфічним патогеном, активується ряд сигнальних протеїнкіназ, зокрема мітоген-активовані протеїнкінази (МАРК) [2, 10]. Ряд фітогормонів, у тому числі індоліл-3-оцтова кислота, контролюють роботу багатьох типів Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ [12]. З'являється також все більше доказів стосовно участі тирозинкіназ та тирозинфосфатаз в опосередкованні дії фітогормонів [12, 13]. Очевидно, різні типи протеїнкіназ, що здатні фосфорилувати як серин/треонінові, так і тирозинові амінокислотні залишки, залучені не лише до регуляції проникнення агробактеріального патогена у рослинну клітину, але й до регуляції внутрішньоклітинного транспорту Т-ДНК, в тому числі і за участі цитоскелету [11]. Тому логічно припустити, що інгібування участі протеїнкіназ у захисних реакціях рослини може призводити до забезпечення кращих умов для взаємодії *Agrobacterium tumefaciens* з рослинною клітиною та посиленою інтеграцією чужорідної ДНК з реципієнтним геномом.

Не так давно встановлено, що використання інгібіторів Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ (трифлюоперазин) та протеїнфосфатаз (окадаїнова кислота) значно підвищує ефективність агробактеріальної трансформації ембріодів сосни білої [14]. У подальшому нами було запропоновано використовувати трифлюоперазин для покращення ефективності агробактеріальної трансформації тютюну [15], а також продемонстровано, що додавання до середовища для ко-культивування інгібітора Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ W7 призводило до значного підвищення частоти регенерації та швидкості росту рослин-регенерантів тютюну у порівнянні з контролем [16]. Тому метою нинішнього дослідження стало поглиблене вивчення закономірностей впливу трифлюоперазину на ефективність агробактеріальної трансформації *Nicotiana tabacum*, а також можливостей застосування з цією ж метою інгібітора тирозинкіназ – геністеїну.

Матеріали і методи. Вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* було насіння *N. tabacum*, яке стерилізували у 5%-ному розчині гіпохлориту натрію протягом 10 хв з наступним триразовим відмиванням у стерильній дис-

тильованій воді [17]. Пророщування насіння та культивування отриманих рослин (протягом одного місяця) здійснювали на безгормональному середовищі Мурасиге–Скуга (МС) [18]. Для оцінки регенераційного потенціалу експериментального матеріалу механічно пошкоджені експланти молодих листків (листові диски) тютюну розміром 1,5–2,5 см² висаджували на середовище МС, яке містило 1 мг/л 6-бензиламінопурина (БАП) («Sigma», США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) («Sigma», США). У кожену чашку Петрі висаджували по п'ять листових дисків. Загалом в кожному досліді було проаналізовано по 125 експлантів. Частоту регенерації визначали через три тижні після початку культивування як співвідношення кількості експлантів з регенерованими пагонами до загальної кількості висаджених експлантів.

Для дослідження впливу інгібіторів протеїнкіназ на частоту агробактеріальної трансформації використовували інгібітор Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ, трифлюоперазин, та інгібітор тирозинових протеїнкіназ, геністеїн («Sigma», США), які додавали до середовища для ко-культивування із агробактерією. Інгібітори розчиняли у воді, маточні розчини (10 мМ) зберігали при –20 °С. У подальшому їх використовували в експериментах у широкому діапазоні концентрацій: трифлюоперазину – від 10 до 300 мкМ та геністеїну – від 1 до 100 мкМ.

Для генетичної трансформації використовували штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*, який містив плазмиду pGH217 з репортерним геном β -глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гіроміцину у трансформантів. Плазміда люб'язно надана д-ром В. Радчуком (Інститут генетики рослин і дослідження культурних рослин, Гатерслебен, Німечина) (рис. 1). Перенесення генетичної конструкції pGH217 у супервірулентний штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* здійснювали згідно з описаним раніше методом [14]. Для цього нічну культуру агробактерії вирощували в 50 мл рідкого середовища LB, доповненого спектиноміцином у концентрації 100 мг/л та рифампіцином у концентрації 50 мг/л при постійному пере-

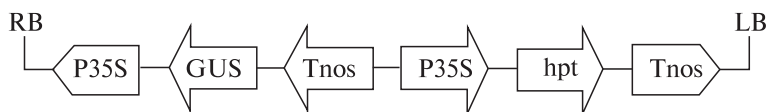


Рис. 1. Схема конструкції рGH217: LB і RB – ліва та права границі Т-ДНК, P35S – 35S промотор ВМЦК, GUS – ген β-глюкуронідази, Tnos – нопалиновий термінатор, hpt – ген стійкості до гігromіцину

мішуванні на орбітальному шейкері за температури 28 °С.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин та детекції експресії гена-інтересу і репортерного гена *gus* проводили їх молекулярно-генетичний аналіз. Зі зразків відселектованих на гігromіцині ліній тютюну та контрольних рослин було виділено геномну ДНК за методом СТАБ [19]. Наявність послідовності гена *gus* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). До складу реакційної суміші (об'ємом 25 мкл) входили 5× ПЛР-буфера («Helicon», РФ), 2 мкл ДНК, по 0,5 мкл специфічних праймерів до гена *gus* (5'-gcaagcgacttacaggcgattaaagagctgat-3' та 5'-tgtttgctcctgctgcggttttcaccgaag-3'), 1 мкл dNTP («Sigma», Німеччина) та 0,5 мкл Taq-полімерази («Fermentas», Литва).

Реакцію проводили на ампліфікаторі PCR Applied Biosystem 2720 (США), 40 циклів за наступних умов: 95 °С (30 с); 72 °С (40 с), 67 °С (40 с); кінцева полімеризація – 72 °С (7 хв).

Розмір ампліфікованого фрагмента складав 632 п.н., що відповідає позитивному контролю (розміру амплікону за використання конструкції рGH217 як матриці для ПЛР). ДНК нетрансформованих рослин (негативний контроль) і відповідний вектор (позитивний контроль) ампліфікували за аналогічних умов. Продукти реакції розділяли в 2%-ному агарозному гелі та візуалізували бромистим етидієм.

Для визначення найбільш оптимальних умов агробактеріальної трансформації листових дисків штамом AGL1 проводили серію трансформацій з використанням різної оптичної щільності агробактерії (OD_{600}) та тривалості її кокультивування з експлантами. Для цього бактерію осаджували центрифугуванням (14 000 об/хв) протягом 5 хв, супернатант видаляли, а осад перед інокуляцією ресуспендували у рідкому середовищі МС до досягнення оптичної щільності бактерії у межах 0,2. Тривалість кокультивування експлантів з агробактерією стано-

вила від 24 до 72 год. Для вибору селективної концентрації гігromіцину попередньо досліджували вплив різних концентрацій (1–15 мг/л) цього антибіотика на життєздатність експлантів.

Для гістохімічного визначення експресії репортерного гена *gus* у тканинах *N. tabacum* після агробактеріальної трансформації використовували 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкоронід (X-Gluc) («Sigma», США). У результаті реакції з даним субстратом в області локалізації ферменту в трансгенних клітинах утворювався осад синього кольору [20]. Для оцінки GUS-експресії через три доби після проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації довільно відбирали по десять експлантів з кожної проби. Надалі 2,5 мг X-Gluc змішували з 5 мл буферного розчину (0,1 М фосфатний буфер, 0,5 мМ фериціанід і фероціанід калію, 1%-ний Тритон X-100) та зберігали при –20 °С.

Для детекції GUS-експресії відібрані експланти промивали у фосфатному буфері, підсушували на фільтрувальному папері, після чого додавали розчин X-Gluc та витримували під вакуумом 15 хв. Оброблені тканини інкубували в термостаті за 37 °С протягом доби. Потім експланти промивали 70%-ним етиловим спиртом та залишали у спирті на 3 год для знебарвлення [20]. Висновки про наявність експресії гена *gus* робили, підраховуючи кількість синіх зон на експлант. Для цього брали листки однакового розміру та віку. GUS-експресію оцінювали візуально, встановлюючи інтенсивність забарвлення у синій колір тканин листка, та кількість таких забарвлених зон на листок з наступним підрахунком середнього показника. Експерименти проводили у трьох повторностях, статистичну обробку отриманих даних – згідно з методикою Лакіна [21].

Результати досліджень та їх обговорення. Осільки частота та ефективність генетичної трансформації, зокрема агробактеріальної, залежить від типу експланта та його здатності до ефек-

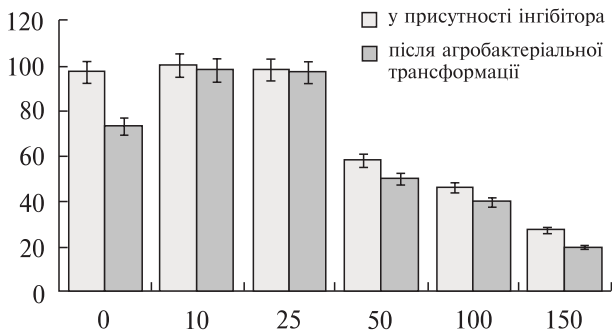


Рис. 2. Частота регенерації пагонів та агробактеріальної трансформації тютюну (по вертикалі, %) за використання різних концентрацій трифлюоперазину (по горизонталі, мкМ)

тивної регенерації, нами попередньо було оцінено регенераційний потенціал листових експлантів (дисків) *N. tabacum*. Встановлено, що частота регенерації пагонів з листових дисків тютюну складає близько 97 %, а в середньому на кожному експланті формувалось чотири рослини-регенеранти. Попередньо для вибору селективної концентрації гідроміцину («Duchefa», Німеччина) досліджували його вплив у різних концентраціях (1–15 мг/л) на життєздатність експлантів після трьох тижнів їхнього культивування у присутності селективного агента. Виявлено, що саме концентрація 5 мг/л цього антибіотика є найбільш ефективною для селекції трансгенних ліній *N. tabacum*. З метою визначення умов для найбільш ефективної трансформації листових дисків *N. tabacum* за допомогою штаму AGL1 *A. tumefaciens*, що містив плазмиду pGH217, проведено вивчення впливу оптичної щільності агробактерії та тривалості її ко-культивування з вихідними експлантами. Виявилось, що найкращі умови для трансформації забезпечувало використання агробактерії з оптичною щільністю $OD_{600} = 0,2$, а найефективніший час ко-культивування вихідного матеріалу з бактерією становив 48 год. При цьому частота регенерації пагонів з експлантів на селективному середовищі, яке містило 5 мг/л гідроміцину, сягала 75 %.

Після ко-культивування з *A. tumefaciens* експланти на 7 днів переносили у середовище МС, яке містило 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 5 мг/л гідроміцину та 400 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії. Потім їх пересад-

жували на аналогічне за складом середовище, але без цефотаксиму.

Перед початком експериментів з вивчення впливу інгібіторів на ефективність агробактеріальної трансформації необхідно було оцінити вплив різних концентрацій інгібіторів протеїнази на регенерацію листових експлантів *N. tabacum*. При дослідженні трифлюоперазину на регенерацію експлантів виявлено, що застосування цього інгібітора Ca^{2+} -залежних протеїназ у високих концентраціях (200 та 300 мкМ) призводило до некрозу листових дисків через 7 діб після початку їх культивування на середовищі для регенерації пагонів. При додаванні до даного середовища трифлюоперазину в нижчих концентраціях (50–150 мкМ) частота регенерації рослин у порівнянні з контролем становила 58, 46 та 27 % відповідно. Раніше було продемонстровано, що трифлюоперазин в концентрації 50 мкМ інгібує ріст проростків моркви та редьки [22]. У той же час за використання трифлюоперазину у концентраціях 10 та 25 мкМ частота регенерації складала 100 та 99 % відповідно. Отже, трифлюоперазин у концентраціях 10 та 25 мкМ не впливав негативно на регенерацію пагонів і не знижував показників її частоти.

На наступному етапі роботи проаналізували вплив різних концентрацій трифлюоперазину на частоту стабільної трансформації експлантів *N. tabacum*. Так, при додаванні його до середовища для ко-культивування експлантів з агробактерією у концентраціях 10 та 25 мкМ частота трансформації становила 98 та 97 % відповідно, тоді як у присутності цього інгібітора Ca^{2+} -залежних протеїназ у концентраціях 50, 100 та 150 мкМ частота трансформації складала 50, 40 та 20 % відповідно у порівнянні із контролем, для якого цей показник був на рівні 73 % (рис. 2). Таким чином, найбільш ефективними концентраціями трифлюоперазину для підвищення частоти агробактеріальної трансформації листових експлантів тютюну були концентрації 10 та 25 мкМ. За цих умов частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації зростала майже на 25 %. Типові результати регенерації рослин з протрансформованих експлантів тютюну, відібраних на селективному середовищі з 5 мкМ гідроміцину, за умов використання різ-

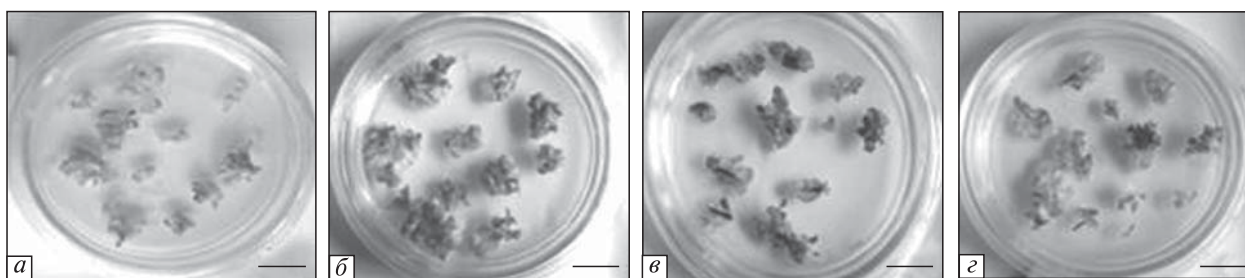


Рис. 3. Регенерація пагонів тютюну після агробактеріальної трансформації за умов використання трифлюоперазину: а – контроль; б – 10 мкМ; в – 25 мкМ; з – 50 мкМ. Масштаб – 1,6 см

них концентрацій трифлюоперазину представлено на рис. 3.

Слід зазначити, що отримані результати дещо відрізняються від тих, що одержано при дослідженні впливу різних концентрацій трифлюоперазину (50–350 мкМ) на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ембріодів сосни білої [14]. Авторами наведеної роботи виявлено, що додавання до середовища для ко-культивування даного інгібітора Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ в концентрації 150 мкМ підвищувало ефективність трансформації сосни у 2,5 рази. У той же час використання трифлюоперазину у такій концентрації для трансформації листових дисків тютюну призводило до інтенсивної некротизації тканин протягом першого тижня культивування, а найбільш ефективними для стабільної трансформації тютюну виявились концентрації 10 та 25 мкМ. Але в цілому результати проведених нами дослідів підтверджують ефективність цього інгібітора Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ для підвищення частоти агробактеріальної трансформації. Ще раніше встановлено, що такий блокатор Ca^{2+} -каналів та антагоніст кальмодуліну, як хлорпромазин, також здатен підвищувати інфекційність *A. tumefaciens* [23]. Свого часу при дослідженні диференціальної експресії на початкових етапах агробактеріальної трансформації суспензійної культури клітин *N. tabacum* лінії ВУ-2 було показано зміни рівня експресії Ca^{2+} -залежної протеїнкінази [24], що може слугувати логічним поясненням отриманих результатів.

Оскільки вже зазначалось, що найважливішу роль в сигнальних каскадах, які супроводжують процес взаємодії рослини та агробактерії, відіграють такі фітогормони, як індоліл-3-

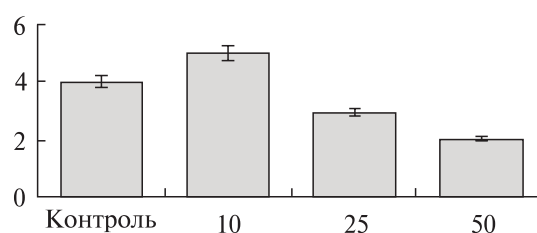


Рис. 4. Інтенсивність транзйентної експресії гена *gus* після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів *N. tabacum* за використання різних концентрацій трифлюоперазину (по горизонталі, мкМ). По вертикалі – середня кількість локалізованих синіх зон на експлант

оцтова кислота, саліцилова кислота та етилен [6, 8], то є цілком очевидним, що в опосередкуванні регуляторної ролі цих фітогормонів мають бути задіяні різні групи протеїнкіназ та протеїнфосфатаз [2, 10, 11]. Зокрема, до фітогормонів, які регулюють активність Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, належать не лише індоліл-3-оцтова кислота, а й абсцизова, гіберелінова та жасмонова кислоти і кінетин [12]. В серії експериментів з різними генотипами та мутантами *Arabidopsis thaliana* продемонстровано, що прекультивування експлантів з такими фітогормонами, як 2,4-Д, кінетин, БАП, 2iP, НОК та індоліл-3-оцтова кислота, підвищує частоту трансформації за використання *A. tumefaciens* на 10–25 % [25].

Після з'ясування оптимальних умов агробактеріальної трансформації здійснено також паралельне дослідження щодо визначення інтенсивності транзйентної трансформації *N. tabacum* за використання найбільш ефективних концентрацій трифлюоперазину, а саме 10, 25 та 50 мкМ. Зокрема, через три доби після

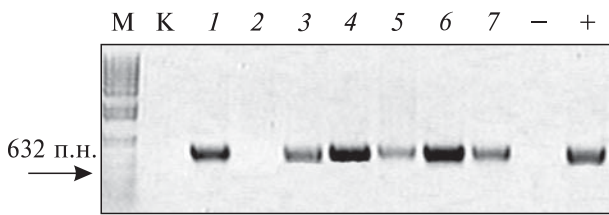


Рис. 5. Результати ПЛР-аналізу геномної ДНК, отриманої із контролю, та ліній тютюну, що були трансформовані за використання 10 мкМ трифлюоперазину: М – маркер, К – контрольна рослина, 1–7 – лінії тютюну, отримані після селекції на гігromіцині; «-» – негативний контроль (H₂O), «+» – плазмід рGH217

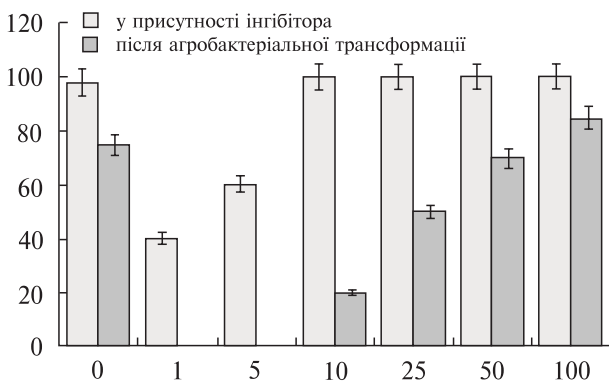


Рис. 6. Вплив геністеїну на частоту регенерації пагонів та трансформації експлантів тютюну: по вертикалі – відносний показник частоти регенерації та трансформації, %; по горизонталі – концентрація геністеїну, мкМ

трансформації проведено гістохімічний аналіз та оцінено рівні транзійтної експресії гена *gus* у протрансформованих експлантів. Дані оцінювали за допомогою субстрату X-Gluc (рис. 4), як описано у розділі «Матеріали і методи». Найбільш інтенсивну *gus*-експресію фіксували за використання трифлюоперазину в концентрації 10 мкМ, в той час як при концентраціях 25 та 50 мкМ фіксували зниження інтенсивності експресії репортерного гена у 1,3–2 рази порівняно з контролем.

Отже, нами встановлено, що найбільш ефективною концентрацією виявилася 10 мкМ трифлюоперазину. Всього за використання цієї концентрації трифлюоперазину відібрали 84 стійких до гігromіцину та здатних до укорінення

ліній рослин *N. tabacum*. Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин здійснили їх ПЛР-аналіз за використання відповідних праймерів до гена *gus* (рис. 5). Розмір ампліфікованого фрагмента становив 632 п.н., що відповідає позитивному контролю (розміру амплікону при використанні вектора рGH217). Із проаналізованих рослин деякі були нетрансгенними, як це видно з рис. 5, де у лінії 2 не виявлено даного фрагмента, тоді як інші містили перенесений ген *gus*.

Паралельно проведено експерименти з вивчення впливу геністеїну на частоту агробактеріальної трансформації тютюну. За результатами дослідів з оцінки впливу геністеїну на частоту регенерації листових експлантів тютюну виявлено, що при додаванні до середовища для регенерації пагонів геністеїну в низьких концентраціях (1 та 5 мкМ) частота регенерації експлантів становила 40 та 60 % відповідно. В той же час використання цього інгібітора тирозинкіназ в більш високих концентраціях (10, 25, 50 та 100 мкМ) забезпечувало частоту регенерації у 100 % пагонів порівняно з контролем.

Аналогічно до експериментів з трифлюоперазином проведено дослідження впливу геністеїну на частоту стабільної та інтенсивності транзійтної трансформації. Оскільки показники частоти регенерації експлантів в присутності цього інгібітора у концентраціях 1 та 5 мкМ були нижчими за контроль, у подальших експериментах із стабільної та транзійтної трансформації ці концентрації інгібітора не використовували. Отже, при додаванні до середовища для ко-культивування геністеїну у концентраціях 10, 25, 50 та 100 мкМ частота трансформації складала приблизно 20, 50 та 74 % відповідно, а за концентрації 100 мкМ – близько 87 % у порівнянні із контролем, який становив 75 % (рис. 6).

Таким чином, найбільш ефективною концентрацією геністеїну для підвищення частоти агробактеріальної трансформації листових експлантів тютюну (рис. 7) вважається концентрація 100 мкМ. Результати проведених досліджень свідчать про зростання частоти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації за цих умов на 12 %. Знову ж таки отримані результати можна пояснити участю тирозинкіназ, а точніше так

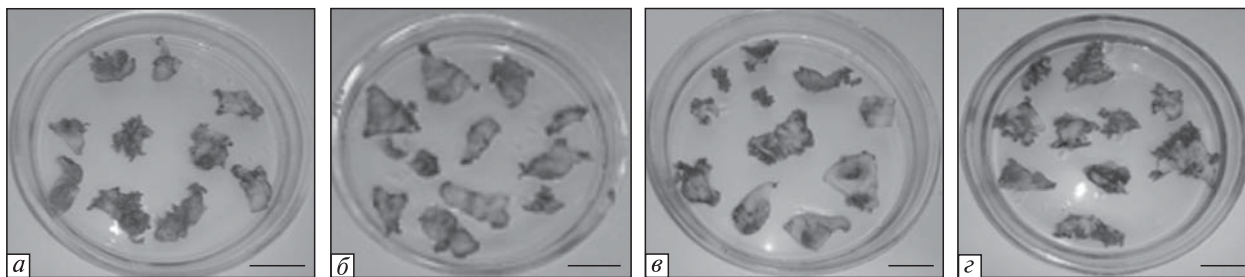


Рис. 7. Регенерація пагонів тютюну після агробактеріальної трансформації за умов використання геністеїну: а – контроль; б – 25 мкМ; в – 50 мкМ; з – 100 мкМ. Масштаб – 1,6 см

званих дуальних протеїнкіназ, та тирозинфосфатаз в опосередкованні дії фітогормонів [12, 13], залучених до опосередкування взаємодії рослинних клітин з агробактерією.

Нами також паралельно перевірено інтенсивність транзійтної трансформації *N. tabacum*, а саме за використання концентрацій 25, 50 та 100 мкМ. Знову ж таки було проведено гістохімічний аналіз та оцінено рівні транзійтної експресії гена *gus* у протрансформованих експлантів тютюну. Найвищі рівні експресії цього гена у порівнянні із контролем спостерігали за умов присутності інгібітора геністеїну у концентрації 50 та 100 мкМ (рис. 8). За його використання у концентрації 25 мкМ інтенсивність експресії репортерного гена знижувалась у 1,3 разу порівняно з контролем, що узгоджується з даними по стабільній трансформації. Використання 100 мкМ геністеїну призводило до підвищення майже в два рази транзійтної трансформації *N. tabacum*. У результаті використання такої концентрації інгібітора під час агробактеріальної трансформації та селекції пагонів в присутності 5 мкг/л гігromіцину відібрано 68 рослин, здатних до укорінення в умовах селективного тиску.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин здійснили їх ПЛР-аналіз (рис. 9). У результаті майже у всіх рослин виявили ампліфікований фрагмент розміром 632 п.н., що підтверджує успішне перенесення та інтеграцію в геном *N. tabacum* гена *gus*.

Підводячи підсумок, слід підкреслити, що нами вперше систематично досліджено вплив трифлюоперазину (інгібітор Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ) на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації покрито-

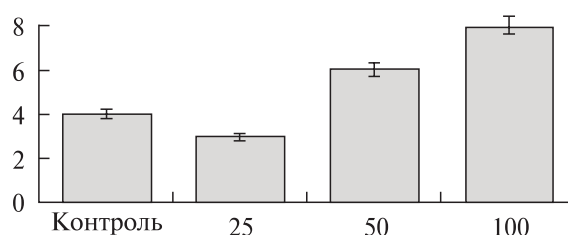


Рис. 8. Інтенсивність транзійтної експресії гена *gus* після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів *N. tabacum* за використання різних концентрацій геністеїну (по горизонталі, мкМ). По вертикалі – середня кількість локалізованих синіх зон на експлант

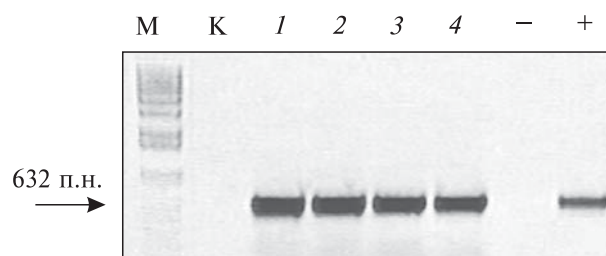


Рис. 9. Результати ПЛР-аналізу геномної ДНК, отриманої із контролю, та ліній трансформованого тютюну за використання 100 мкМ геністеїну: М – маркер; К – контроль; 1–4 – трансформовані лінії тютюну, отримані після селекції на гігromіцині; «-» – негативний контроль (H_2O); «+» – плазмід рGH217

насінних на прикладі тютюну як модельного об'єкта. Результати застосування геністеїну (інгібітор тирозинових протеїнкіназ) з цією ж метою дозволяють стверджувати, що пошук ефективних індукторів агробактеріальної трансформації можна вести і серед сполук, які регулюють тирозинкіназну активність у рослин. Таким чином, отримання нових доказів того,

що використання інгібіторів різних типів протеїнкіназ може істотно підвищувати частоту генетичної трансформації у дводольних рослин, свідчить на користь необхідності продовження поглиблених досліджень у цьому напрямку.

ENHANCEMENT OF AGROBACTERIAL TRANSFORMATION OF PLANTS USING PROTEIN KINASE INHIBITORS TRIFLUOPERAZINE AND GENISTEIN

A.I. Yemets, V.V. Fedorchuk, Ya.B. Blume

Institute Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: nikafedorchuk@gmail.com

The effect of different concentrations of protein tyrosine kinase inhibitor, genistein and serine/threonine protein kinase inhibitor, trifluoperazine, on the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants of *N. tabacum* was investigated. The influence of different concentrations of trifluoperazine in the range from 10 to 300 μM was investigated. It was found that 10 μM trifluoperazine provoked the increase of the frequency of agrobacterial transformation of tobacco leaf disks on 25 %. In parallel, the influence of different concentrations of genistein in the range from 10 to 100 μM was investigated. It was found 100 μM genistein provoked the increase of the frequency of agrobacterial transformation of tobacco leaf disks on 12 %.

УЛУЧШЕНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ ТРИФЛЮОПЕРАЗИНА И ГЕНИСТЕИНА

А.И. Емец, В.В. Федорчук, Я.Б. Блюм

Исследовано влияние трифлюоперазина – ингибитора серин/треониновых протеинкиназ, а также генистеина – ингибитора тирозиновых протеинкиназ на частоту *Agrobacterium*-опосредованной трансформации покрытосеменных на примере табака как модельного объекта. Изучение влияния широкого диапазона концентраций трифлюоперазина в пределах от 10 до 300 мкМ позволило установить, что при использовании трифлюоперазина в концентрации 10 мкМ частота *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков табака повышалась на 25 %. Параллельно исследовано влияние широкого диапазона концентраций генистеина от 1 до 100 мкМ и определена наиболее эффективная его концентрация (100 мкМ) для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации листовых дисков

табака, при которой частота трансформации повышалась на 12 %.

СПИСОК ЛІТУРАТУРИ

1. Gelvin, S.B. Finding a way to the nucleus, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2010, vol. 13, no. 1, pp. 53–58.
2. Zaltsman, A., Krichevsky, A., Kozlovsky, S.V., Yasmin, F. and Citovsky, V. Plant defense pathways subverted by *Agrobacterium* for genetic transformation, *Plant Signal. Behav.*, 2010, vol. 5, pp. 1245–1248.
3. Alimohammadi, M. and Bagherieh-Najjar, M.B. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors, *Afr. J. Biotech.*, 2009, vol. 8, no. 20, pp. 5142–5148.
4. Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S. and van Lijsebettens, M. Higher plant transformation: principles and molecular tools, *Int. J. Dev. Biol.*, 2013, vol. 57, pp. 483–494.
5. Gohlke, J. and Deeken, R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development, *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, p.155.
6. Lacroix, B. and Citovsky, V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, *Int. J. Dev. Biol.*, 2013, vol. 57, pp. 467–481.
7. Nam, J., Matthyse, A.G. and Gelvin, S.B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration, *Plant Cell.*, 1997, vol. 9, pp. 317–333.
8. Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E. and Yuan, Z.C. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules, *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, p. 322.
9. Bourras, S., Rouxel, T. and Meyer, M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and non-plant organisms. *Phytopathology*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0380-RVW>.
10. Pitzschke, A. *Agrobacterium* infection and plant defense-transformation success hangs by a thread, *Front. Plant Sci.*, 2013, vol. 4, p. 519.
11. Hwang, E.E., Wang, M.B., Bravo, J.E. and Banta, L.M. Unmasking host and microbial strategies in the *Agrobacterium*-plant defense tango, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, p. 200.
12. Chen, Y., Hoehenwarter, W. and Weckwerth, W. Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment, *Plant J.*, 2010, vol. 63, no. 1, pp. 1–17.
13. Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B. and Jeannette, E. Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are

- involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells, *Plant. Physiol.*, 2008, vol. 148, no. 3, pp. 1668–1680.
14. Tang, W., Lin, J. and Newton, R. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine, *Plant Cell Rep.*, 2007, vol. 26, no. 2, pp. 673–683.
 15. Fedorchuk, V., Tanasienko, I.V., Blume, Ya.B., and Yemets, A. An inhibitor of CaI²⁺-dependent protein kinases, trifluoperazine, increases the efficiency of agrobacterium-mediated transformation of tobacco, *Dop. NAS Ukraine*, 2014, № 11, pp. 165–171.
 16. Fedorchuk, V., and Yemets, A. Influence of serin-threonine protease-kinases inhibitor W7 on *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Nauk. dop., Nat. Univ. Life and Environ. Sci. Ukraine*, 2015, vol. 5, № 54, http://nd.nubip.edu.ua/2015_5/13.pdf.
 17. Gallois, P. and Marinho, P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco, *Meth. Mol. Biol.*, 1995, vol. 49, pp. 39–48.
 18. Pitzschke, A. and Hirt, H. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation, *EMBO J.*, 2010, vol. 29, no. 6, pp. 1021–1032.
 19. Murray, M.G. and Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucl. Acids Res.*, 1980, vol. 8, no. 19, pp. 4321–4325.
 20. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, 1987, vol. 6, no. 13, pp. 3901–3907.
 21. Лакин Г.Ф. *Биометрия*, Москва, Высшая школа, 1990, 352 с.
 22. Thomas, T.H. Calcium and calmodulin inhibitor effects on the growth of carrot (*Daucus carota* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.) in nutrient culture, *Plant Growth Regul.*, 1995, vol. 16, pp. 299–303.
 23. Heberlein, G.T. Enhancement of *Agrobacterium tumefaciens* infectivity by chlorpromazine hydrochloride, *Infect. Immun.*, 1970, vol. 2, no. 4, pp. 468–473.
 24. Veena, Jiang H., Doerge, R.W. and Gelvin, S.B. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression, *Plant J.*, 2003, vol. 35, no. 2, pp. 219–236.
 25. Chateau, S., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S. Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones, *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, no. 353, pp. 1961–1968.

Надійшла 09.09.14