

БУЗІАШВІЛІ А. Ю.[✉], ЄМЕЦЬ А. І.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yemets.alla@gmail.com

[✉] buziashvili.an@gmail.com, (095) 302-89-30**AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТЮТЮНУ (*NICOTIANA TABACUM* L.) ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ**

Мета. Отримання ліній тютюну (*Nicotiana tabacum* L.), стабільно трансформованих геном лактоферину людини (*hLf*), та їх аналіз. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію тютюну проводили за використання плазмиди pBin35LF, яка містила ген лактоферину під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV 35S), а також селективний маркерний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*), який забезпечує стійкість до канаміцину. Селекцію трансгенних ліній проводили протягом 3 місяців на середовищі МС за наявності 100 мг/л канаміцину. Інтеграцію гена лактоферину підтверджували за допомогою ПЛР із використанням праймерів, специфічних до гена *hLf*. Дослідження каріотипу трансгенних ліній проводили після фарбування клітин коренів 1 % розчином ацетоорсеїну. **Результати.** У результаті ПЛР-аналізу було виявлено 2 трансгенні лінії тютюну, в геномі яких було підтверджено інтеграцію гена *hLf*. Ефективність трансформації становила 6,4 %. Кількість хромосом у трансгенних та контрольних лініях становила $2n=48$.

Висновки. Отримані трансгенні лінії тютюну мають морфологію та набір хромосом, ідентичний до контрольних рослин, внаслідок чого їх можна розглядати як рослинні системи експресії рекомбінантного лактоферину людини.

Ключові слова: ген лактоферину людини *hLf*, *Nicotiana tabacum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, ПЛР, каріотип, трансгенні рослини.

На сьогодні невід'ємною складовою розвитку агропромисловості та фарміндустрії є застосування провідних досягнень біотехнології, зокрема генетичної інженерії рослин. Завдяки методам генетичної інженерії можливе вирішення актуальних проблем сільського господарства: створення сортів рослин, стійких до несприятливих факторів навколишнього середовища, до патогенних мікроорганізмів та комах-шкідників; покращення смакових та поживних якостей сільськогосподарських культур тощо [1–3]. Серед генів, які використовуються в генетичній інженерії рослин, одним із найбільш перспективних є ген лактоферину людини (*hLf*). Лактоферин – це білок із родини трансферинів, який експресується в секреторних клітинах ссавців та має ряд біологічних функцій. Завдяки здатності зв'язувати йони Fe^{2+} та Fe^{3+} він відіграє важливу роль у транспортуванні та депонуванні заліза. Крім того, лактоферин є невід'ємним компонентом неспецифічного природного імунітету, оскільки має антибактеріальну, противірусну, фунгіцидну та антипухлинну активності [4, 5]. З огляду на широкий спектр корисних властивостей цього білка, наразі трансформацію рослин генами лактоферину здійснюють для різних цілей: для підвищення стійкості культурних рослин до фітопатогенів, для використання рослин у якості біореакторів, для синтезу фармацевтичного продукту, для покращення поживних властивостей зернових та овочевих культур [4]. Для застосування в якості систем експресії рекомбінантними генами лактоферину було трансформовано такі види рослин: рис, ячмінь, тютюн, а також клітинні культури водоростей, женьшеню та батату [4]. Використання тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) для гетерологічної експресії білків має такі переваги: наявність розроблених ефективних методик трансформації, висока продуктивність біомаси та високий рівень експресії рекомбінантних білків [6]. Отже, метою пропонованої роботи було отримання трансгенних ліній тютюну (*Nicotiana tabacum*), що несуть ген лактоферину людини, за використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та аналіз каріотипу трансгенних ліній.

Матеріали і методи
Рослинний матеріал. Насіння тютюну стерилізували за методикою, описаною раніше [7], та висаджували по 20–30 насінин у чашки Петрі (d=9 см) на стерильне живильне сере-

довище МС [8], що містило 4,3 г/л мікро- та макросолей МС, 30 г/л сахарози, 8 г/л агару, рН 5,7. Насіння пророщували протягом 2-ох тижнів за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду до утворення проростків висотою 1–1,5 см. Проростки переносили у скляні баночки із середовищем МС, на якому надалі культивували та мікроклонально розмножували рослини тютюну.

Agrobacterium-опосередкована трансформація рослин тютюну. Трансформацію проводили за використання штаму *A. tumefaciens* ЕНА105, що містив бінарний вектор рВін35Lf, у якому ген лактоферину людини (*hLf*) був розміщений під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV 35S) та октопінового термінатора (*OscT*), а селективний маркерний ген неоміцинофосфотрансферази II – під контролем нопаїнового промотору (*Pnos*) та 35S термінатора (*T35S*) (рис. 1) [7].

Як експланти використовували листкові диски тютюну розміром 1x1 см. Прекультивування експлантів проводили протягом 16 год на середовищі МС, доповненому 0,1 мг/л ІОК, 1 мг/л БАП. Нічну культуру *A. tumefaciens* нарощували у рідкому середовищі LB із додаванням 100 мг/л канаміцину, 50 мг/л рифампіцину до оптичної густини $OD_{600}=0,4-0,8$. Інокуляцію експлантів проводили протягом 15 хв, листкові диски просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МС із додаванням 0,1 мг/л ІОК, 1 мг/л БАП. Експланти кокультивували із агробактерією протягом 16 год, після чого переносили на селективне середовище МС, доповнене 0,1 мг/л ІОК, 1 мг/л БАП, 100 мг/л канаміцину, 600 мг/л цефотаксиму. Через 1 місяць селекції, на листкових дисках з'явилися регенеранти, які відокремлювали від експлантів та переносили у скляні баночки із селективним середовищем МС, доповненим 100 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксиму, та продовжували селекцію протягом 2 місяців. Після селекції протягом 3 місяців ті регенеранти, які мали яскраво-зелений колір та морфологію, подібну до нетрансгенних рослин, переносили на середовище МС, доповнене 600 мг/л цефотаксима, для відновлення після селекції та елімі-

нації бактерій. Після місяця культивування трансформованих рослин на середовищі МС із додаванням цефотаксиму проводили ПЛР-аналіз відібраних ліній із праймерами, специфічними до гена *hLf*. ПЛР-позитивні лінії мікроклонально розмножували на середовищі МС для подальшого цитологічного аналізу та адаптації *in vivo*. Трансгенні рослини висаджували в горшки діаметром 15 см у стерильний ґрунт та адаптували в теплиці.

ПЛР-аналіз трансгенних ліній тютюну. Геномну ДНК із трансгенних ліній тютюну виділяли із 200–300 мг рослинної тканини за допомогою цетилтриметил амонію броміду (метод ЦТАБ) [9]. ПЛР здійснювали за описаною раніше методикою [7] за використання праймерів, специфічних до гена лактоферину людини: GLF (5'-TGTCTTCCTCGTCCTGCTGTTCC-3') та GLR (5'-CATACTCGTCCCTTTCAGCCTCG-3'), розмір амплікона становив 731 п. о. Результати ампліфікації візуалізували після проведення електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі за наявності етидіум броміду. Ефективність трансформації обраховували як відношення кількості ПЛР-позитивних ліній до загальної кількості ліній, відібраних у результаті селекції [10].

Аналіз хромосом трансгенних та контрольних ліній. Корені трансгенних та контрольних рослин тютюну, які культивували *in vitro* на середовищі МС протягом 2 тижнів, фіксували у розчині 96 % етанолу із льодяною оцтовою кислотою (3:1) в період активного мітозу (з 8.00 до 10.00 години ранку). Після фіксації корені відмивали 4 рази по 15 хв у 72 % етанолі та фарбували 1 % ацетоорсеїном за стандартною методикою [11]. Надлишки барвника відмивали двічі у молочній кислоті, після чого готували тимчасові препарати, які досліджували під прохідним світлом у 600-кратному збільшенні за використання люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 із вбудованою фотокамерою (Carl Zeiss, Німеччина). Комп'ютерну обробку мікрофотографій проводили за використання програмного забезпечення AxioVision LE 4.8.2.0 («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Німеччина, 2010).

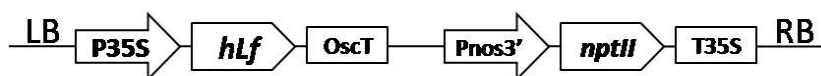


Рис. 1. Схема плазмідного вектора рВін35LF. LB та RB – ліва та права межі Т-ДНК, *OscT* – октопіновий термінатор, *hLf* – ген лактоферину людини, *P35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, *Pnos* – промотор нопаїносинтази, *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази, *T35S* – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.

Результати та обговорення

Agrobacterium-опосередкована трансформація тютюну геном *hLf*, селекція та ПЛР-аналіз трансгенних ліній. Через 1 місяць селекції на трансформованих експлантах тютюну з'явилися регенеранти (рис. 2, а), які переносили у скляні баночки та продовжували селекцію протягом 2 місяців. Після 3 місяців селекції було відібрано 2 лінії, які мали морфологію, ідентичну до контрольних рослин (рис. 2, b, c).

У результаті ПЛР-аналізу було підтверджено інтеграцію гена *hLF* в геном обох трансгенних ліній тютюну (рис. 3). Ефективність трансформації тютюну геном *hLf* становила 6,4 %. Таке значення є цілком порівняним із результатами інших досліджень [12-14]. Отримані лінії культивували протягом 1 місяця на середовищі МС із додаванням 600 мг/л цефотаксиму, після чого рослини мікроклонально розмножували на середовищі МС. Трансгенні лінії було успішно адаптовано до умов закритого ґрунту (рис. 2, d, e).

Аналіз кариотипу трансгенних ліній тютюну. Під час цитологічного дослідження

кількості та морфології хромосом у клітинах коренів рослин трансгенних ліній 1 та 2 і контрольних рослин було помічено високу мітотичну активність клітин трансгенних та контрольних ліній. Кількість хромосом у клітинах коренів трансгенних та контрольних ліній була $2n=48$, всі хромосоми мали нормальну морфологію (рис. 10, a-j, g-j).

Висновки

У запропонованому дослідженні було проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію тютюну геном лактоферину людини. Отримано трансгенні лінії тютюну, в двох із яких підтверджено перенесення та інтеграцію гена *hLf* за використання ПЛР із специфічними праймерами. Ефективність трансформації становила 6,4 %. Таке значення відповідає даним, отриманим в інших дослідженнях [12-14]. У результаті цитологічного аналізу трансгенних рослин було виявлено, що кількість хромосом трансгенних рослин не відрізняється від контрольних та становить $2n=48$.



Рис. 2. Регенерація на трансформованих експлантах тютюну через 1 місяць селекції (а), а також трансгенні лінії 1 (b) і 2 (c) через 2 місяці селекції та лінії 1 (d) і 2 (e), адаптовані *in vivo*. Масштаб: а, b, с – 1 см, d, e – 3 см.

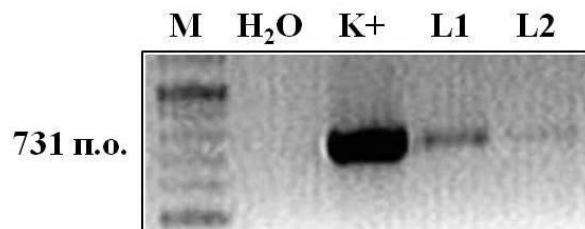


Рис. 3. Результати ПЛР-аналізу ліній тютюну, трансформованих геном *hLf*: М – маркер молекулярної ваги GeneRuler 100 bp Plus (ThermoScientific, USA), H₂O – ампліфікація у відсутності ДНК, K⁺ – позитивний контроль (плазмід рBin35LF), L1, L2 – трансгенні лінії, у геномі яких підтверджено інтеграцію гена *hLf*.

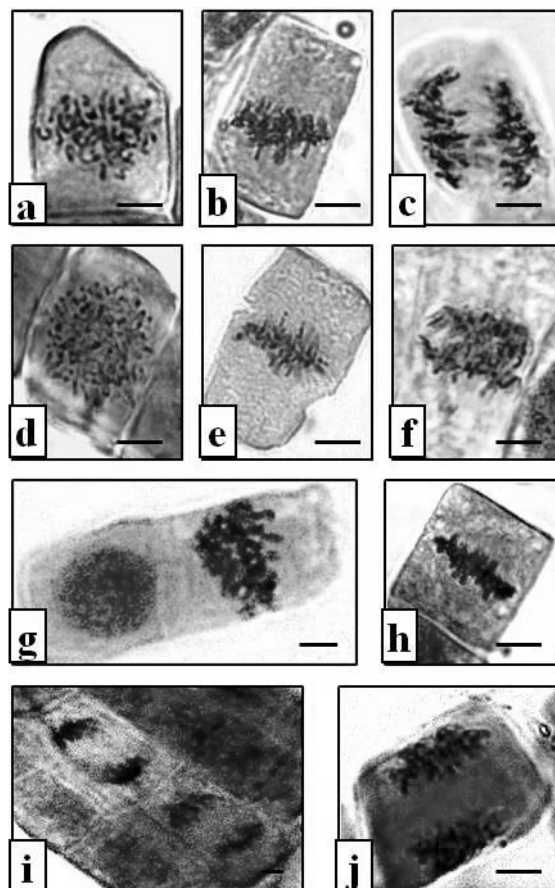


Рис. 4. Морфологія клітин кореня та хромосом рослин тютюну, трансформованих геном лактоферину людини: а, b, с – стадії мітозу у клітинах нетрансформованих рослин (контроль), d, e, f – стадії мітозу у клітинах трансгенної лінії 1, g, h, I, j – стадії мітозу у клітинах трансгенної лінії 2. Масштаб: 5 мкм.

References

1. Naglaa A., Channapatna P., McHughen A. Genome editing for crop improvement: challenges and opportunities. *GM Crops Food*. 2015. Vol. 6. P. 183–205. doi: 10.1080/21645698.2015.1129937.
2. Zeng-Yu W., Brummer C. Is genetic engineering ever going to take off in forage, turf and bioenergy crop breeding? *An. Bot.* 2012. Vol. 110. P. 1317–1325. doi: 10.1093/aob/mcs027.
3. Pimentel D., Hunter M., LaGro J., Efroymsen R., Landers J., Mervis F., McCarthy C., Boyd A. Benefits and risks of genetic engineering in agriculture. *BioSci.* 1989. Vol. 39, № 9. P. 606–614. doi: 10.2307/1311090.
4. Yemets A., Tanasienko I., Krasylenko Yu., Blume Ya. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* 2014. Vol. 38. P. 989–1002. doi: 10.1002/cbin.10304.
5. Lakshman D., Natarajan S., Mandal S., Mitra A. Lactoferrin derived resistance against plant pathogens in transgenic plants. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61, № 48. P. 11730–11735. doi: 10.1021/jf400756t.
6. Conley A., Zhu H., Le L., Jevnika A., Lee B., Brandle J., Menassa R. Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotech. J.* 2011. Vol. 9. P. 434–444. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00563.x.
7. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Blume Y., Yemets A. Obtaining of transgenic potato plants expressing human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. *Cytol. Genet.* 2020. Vol. 54, № 3. P. 3–15.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
9. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985. Vol. 5. P. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
10. Baskaran P., Soós V., Balázs E., Van Stadena J. Shoot apical meristem injection: A novel and efficient method to obtain transformed cucumber plants. *South African J. Bot.*, 2016. Vol. 103. P. 210–215. doi: 10.1016/j.sajb.2015.09.006.
11. Syakhril B. Aceto-orcein staining for counting somatic chromosomes in castor (*Ricinus communis* L.). *Biosci. Res.* 2019. Vol. 16, № 2. P. 2336–2342.26.
12. Rosales-Campos A., Gutiérrez-Ortega A. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaf explants. *Bio-protocol.* 2019. Bio101: e3150. doi: 10.21769/BioProtoc.3150.
13. Suleiman A. Transformation of *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens* carrying salt and drought tolerance gene. *Advances Environ. Biol.* 2016. Vol. 10. P. 150–154. doi: 10.1016/j.sajb.2007.03.011

14. Gallois P., Marinho P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. *Methods Mol. Biol.* 1995. Vol. 49. P. 39–48. doi: 10.1385/0-89603-321-X:39.

BUZIASHVILI A.Yu., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: buziashvili.an@gmail.com*

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.) WITH HUMAN LACTOFERRIN GENE AND ANALYSIS OF TRANSGENIC LINES

Aim. Obtaining of tobacco lines (*Nicotiana tabacum* L.) stably transformed with human lactoferrin gene (*hLf*), analysis of transgenic lines. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco was carried out with the use of pBin35LF plasmid containing human lactoferrin gene under control of 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) and selective *npt II* gene encoding neomycine phosphotransferase II providing the resistance to kanamycin. The selection of transgenic lines was carried out for 3 months on MS medium supplemented with 100 mg/l of kanamycin. Integration of lactoferrin gene was confirmed with the use of PCR with primers specific to *hLf* gene. The investigation of karyotype of transgenic lines was carried out after the staining of the root cells with 1 % solution of acetoorseine. **Results.** After selection, 2 transgenic tobacco lines with confirmed integration of *hLf* gene were obtained. The transformation efficiency was 6.4 %. The chromosome number in transgenic and control lines was $2n=48$. **Conclusions.** The obtained transgenic tobacco lines have the similar morphology and karyotype to control lines, so they could be considered to use as plant systems for the expression of recombinant human lactoferrin.

Keywords: human lactoferrin gene *hLf*, *Nicotiana tabacum* L, *Agrobacterium*-mediated transformation, PCR, chromosomes, transgenic plants.