

УДК 606. 57.08

**ВПЛИВ ІНГІБІТОРУ СЕРИН-ТРЕОНІНОВИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ W7  
НА *AGROBACTERIUM* – ОПОСЕРЕДКОВАНУ  
ТРАНСФОРМАЦІЮ РОСЛИН**

**В. В. ФЕДОРЧУК\***,

**А. І. ЄМЕЦЬ**, професор. доктор біологічних наук

*Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України*

*E-mail: nikafedorchuk@gmail.com*

*Досліджено вплив різних концентрацій інгібітору Ca<sup>2+</sup>-кальмодулін залежної протеїнкінази W7 на частоту агробактеріальної трансформації листкових експлантів *Nicotiana tabacum*. Встановлено, що додавання W7 в концентраціях 25 мкМ до середовища для ко-культивування з агробактерією призводить до значного підвищення частоти регенерації та швидкості росту рослин-регенерантів у порівнянні із контролем.*

***Ключові слова:** агробактеріальна трансформація, *Nicotiana tabacum*, інгібітори протеїнкіназ*

Метод переносу ДНК, опосередкований *Agrobacterium tumefaciens*, має очевидні переваги перед іншими поширеними методами трансформації рослин, такими як біобалістичний, електропорація та мікроін'єкція. Даний метод дозволяє вводити в рослину великі за розміром генетичні конструкції, призводить до мінімальних порушень у послідовності гена, що переноситься, а також не вимагає застосування спеціального устаткування. За допомогою *Agrobacterium tumefaciens* можливо трансформувати широкий спектр рослин, включаючи деревні та культурні рослини. Тим не менш, рослини сильно відрізняються за своєю здатністю до трансформації, навіть серед екотипів одного виду [1]. Взаємодія між агробактерією та рослиною регулюється різноманітними хімічними сигналами, що можуть впливати на вірулентність

---

\* Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор А. І. Ємець

бактерії, однак молекулярні механізми цього явища до сих пір остаточно не з'ясовані [2]. Тому, на сьогоднішній день вдосконалення методу агробактеріальної трансформації та підвищення її ефективності залишається актуальним питанням.

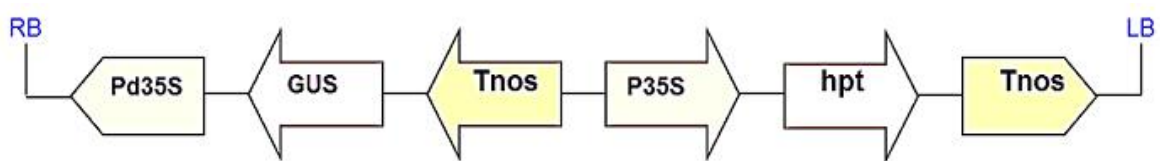
Нещодавно було показано, що використання трифлюоперазину – інгібітору серин/треонінових протеїнказ, значно підвищує частоту агробактеріальної трансформації ембріодів сосни білої [3]. Слід зазначити, що на сьогодні в залежності від субстратної специфічності в еукаріотичних клітинах виділяють два основних класи протеїнказ: серин/треонінові та тирозинові протеїнкази. Також виокремлюють протеїнкази із дуальною активністю, які здатні каталізувати фосфорилування як за залишками серину/треоніну, так і за залишками тирозину [4, 5]. Відомо, що протеїнкази є ферментами, які каталізують реакцію перенесення кінцевого залишку фосфату із АТФ на залишки серину, треоніну та тирозину білкової молекули [6], а використання інгібіторів відповідних типів протеїнказ є ефективним методом встановлення їх функціональної ролі. Нами також було досліджено вплив трифлюоперазину на частоту агробактеріальної трансформації квіткових рослин, а саме тютюну [7]. Було виявлено, що додавання інгібітору до середовища для ко-культивування у концентрації 10 мкМ призводило до підвищення частоти *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації тютюну на 24 – 25 %. Тому, актуальним є дослідження впливу ряду інших інгібіторів серин-треонінових протеїнказ на генетичну трансформацію рослин. Зокрема, в даній роботі представлено результати вивчення впливу інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін залежних протеїнказ, W7, на частоту *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації *Nicotiana tabacum*.

**Матеріали і методи дослідження.** Для введення в культуру *in vitro* в якості вихідного матеріалу використовували насіння *Nicotiana tabacum*. Пророщування насіння і культивування рослин проводили на безгормональному середовищі МС [8] протягом одного місяця.

В якості експлантів для агробактеріальної трансформації використовували молоді листочки *Nicotiana tabacum* розміром 1,5-2,5 см<sup>2</sup>. Для дослідження впливу інгібітору протеїназ на підвищення ефективності агробактеріальної трансформації у роботі використовували інгібітор Ca<sup>2+</sup>-кальмодулін залежних протеїназ W7 (Sigma, США), який додавали до середовища для ко-культивування із агробактерією.

Інгібітор розчиняли у воді, маточний розчин (10 мМ) зберігали в морозильній камері за температури -20 °С. В роботі було вивчено вплив широкого діапазону концентрацій W7: від 5 до 100 мкМ.

Для генетичної трансформації було використано штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*, який містив плазмиду рGH217 с репортерним геном β-глюкоронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину у трансформантів. Плазміда була люб'язно надана к.б.н. В. В. Радчуком (Інститут генетики рослин і дослідження культурних рослин, Гатерслебен, Німечинна) (Рис. 1). Перенесення генетичної конструкції рGH217 у супервірулентний штам AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* здійснювали згідно методу [9].



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

Після ко-культивування з агробактерією у присутності інгібітору W7 експланти переносили на середовище МС, що містило 1 мг/л 6-бензилоамінопурина (БАП) (Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) (Sigma, США), доповнене 5 мг/л гігromіцину та 400 мг/л цефатоксиму

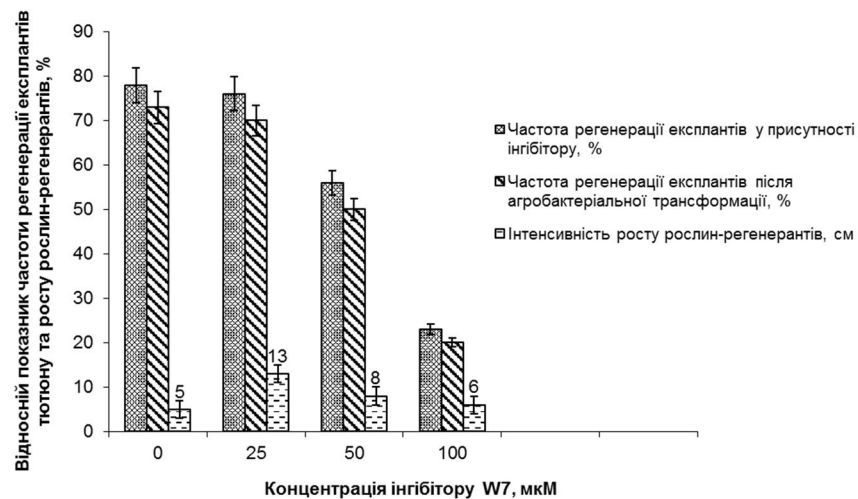
для елімінації агробактерії строком на 7 днів. Далі їх переносили на аналогічне за складом середовище, але без цефотаксиму.

Для вибору селективної концентрації гігроміцину попередньо було досліджено вплив різних концентрацій (1-15 мг/л) цього антибіотику на життєздатність експлантів.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Для визначення будь-якого негативного впливу інгібітору W7 спочатку було досліджено дію його різних концентрацій на регенерацію листових експлантів *Nicotiana tabacum*. Відомо, що W7 є специфічним інгібітором  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін-залежної протеїнкінази, молекула якого зв'язується з двома молекулами кальмодуліну, тим самим блокуючи зв'язування кальмодуліна із іншими молекулами [10]. Кальмодулін, в свою чергу, є повсюдним  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючим білком та первинним внутрішньоклітинним сигнальним рецептором, він передає сигнали за рахунок моделювання активності білків, що зв'язуються з кальмодуліном, і, таким чином, генерує різні фізіологічні відповіді клітини на різні стимули [11, 12, 13].  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін залежне фосфорилування білків є одним із основних механізмів для посилення та розповсюдження  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін-опосередкованих сигналів і приймає участь у регуляції широкого спектру фізіологічних процесів розвитку рослин [14, 15]. Нами було виявлено, що W7 у низьких концентраціях (5, 10 та 20 мкМ) призводив до пригнічення життєздатності та навіть до некрозу листових експлантів *Nicotiana tabacum* через 14 діб після початку їх культивування на середовищі для регенерації, у той час як після додавання до даного середовища W7 в більш високих концентраціях (25, 50, та 100 мкМ), частота регенерації рослин склала відповідно 76, 56 та 23 %, порівнянно з контролем, який був на рівні 78 %.

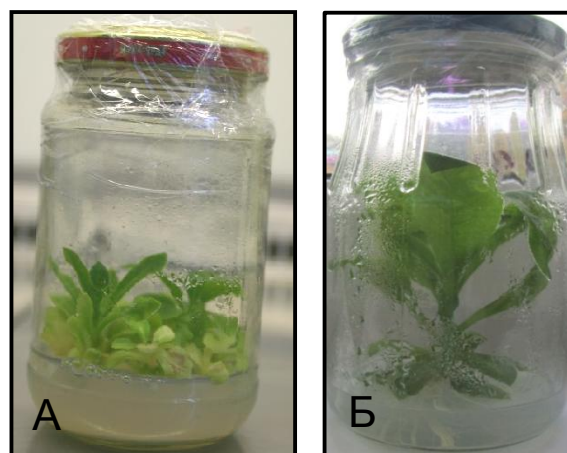
Далі було перевірено вплив різних концентрацій W7 на частоту стабільної агробактеріальної трансформації. За додавання інгібітору до середовища для ко-культивування у концентраціях 25, 50 та 100 мкМ частота трансформації склала 70, 50 та 20 % порівнянно з контролем, в той час як частота трансформації останнього становила 73 % (рис. 2). Після ко-культивування експланти

переносили на середовища МС, доповнене 5 мг/л гігromіцину. Для вибору селективної ( $LD_{50}$ ) концентрації гігromіцину попередньо було досліджено вплив різних концентрацій гігromіцину (1-15 мг/л) на життєздатність експлантів та встановлено, що саме концентрація 5 мг/л цього антибіотику є найбільш ефективною для селекції трансгенних ліній *Nicotiana tabacum*.



**Рис. 2.** Вплив різних концентрацій W7 на частоту трансформації тютюну та інтенсивність росту рослин-регенерантів

Проте, варто зазначити, що, не дивлячись на те, що частота трансформації не перевищувала контроль, використання у досліджах даних концентрації W7, призводило до значного підвищення ефективності регенерації та швидкості росту рослин-регенерантів у порівнянні з контролем (Рис.3).



**Рис. 3.** Швидкість росту рослин-регенерантів, відселектованих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: А – контроль; Б – 25 мкМ W7

Зокрема, через 10 діб на селективному середовищі із вмістом 5 мг/л гігromіцину спостерігали регенерацію пагонів з експлантів *Nicotiana tabacum*, а через місяць після агробактеріальної трансформації за використанням W7 отримували повноцінні рослини-регенеранти, що досягали 13 см у довжину, в той час як в контролі регенеранти не перевищували 5 см (Рис. 3).

На відміну від іншого інгібітору серин/треонінових протеїнкіназ, а саме трифлюоперазину, використання якого підвищувало на 24-25 % частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну [7], W7 лише прискорював ріст рослин-регенерантів, не впливаючи на частоту їх утворення.

### **Висновки**

Нами вперше було досліджено вплив W7 на частоту агробактеріальної трансформації рослин *Nicotiana tabacum*. В результаті проведених досліджень було продемонстровано, що за використання інгібітору серин-треонінових протеїнкіназ W7 у концентрації 25 мкМ частота трансформації не перевищувала контроль, проте значно підвищувалася швидкість росту рослин-регенерантів. Зокрема, за використання цієї концентрації під час проведення агробактеріальної трансформації рослини-регенеранти в 2-2,5 рази швидше росли в довжину, ніж рослини на контролі. Отже, додавання даного інгібітору сприяє прискоренню темпів регенерації рослин за проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, що може бути застосовано під час отримання генетично змінених рослин із класу дводольних.

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Subramoni S. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules / Subramoni S., Nathoo N., Klimov E. and Yuan Z.C. // Plant Science. – 2014. – Vol. 5. – P.322
2. Nam J. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration / Subramoni S., Nathoo N., Klimov E. and Yuan Z.C. // PlantCell. – 1997. – Vol. 9. – P. 317–333.

3. Tang W. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine / Tang W., Lin J., Newton R // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26. – P. 673 – 683.
4. Chunhua Z. Composition and function of the Arabidopsis WAVE complex during epidermal morphogenesis / Z. Chunhua, S. Brankle, E. Mallery, D.B. Szymanski // 16th Int. Conf. on *Arabidopsis* Res: 15–19 June, 2005: Abstracts. – 2005. – P. 131
5. Hanks S. K. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members / Hanks S. K., Quinn A. M. // Methods in Enzymology. – 1991. – Vol.200. – P.38 – 62
6. Wang H. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana* / Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho S.K., Walkera J.C. // Arabidopsis Book. – Rockville, 2007. – P. 1–38.
7. Інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїнкіназ, трифлюоперазин, підвищує ефективність агробактеріальної трансформації тютюну / В. В.Федорчук, І. В. Танасієнко, А. І. Ємець, Я. Б. Блюм. // Доповіді НАН України. – 2014. – №11. – С. 165.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / Murashige T., Skoog F.// Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
9. Wise A.A. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium* / Wise A.A, Liu Z., Binns A.N. // Methods in Molecular Biology. – 2006. – . Vol. 343. – P. 43–53.
10. Trewavas A. Calcium signaling in plant cell: the big network / A. Trewavas, R. Mahlo // Curr. Opin. Plant Biol. – 1998. – Vol. 1. – P. 428–433.
11. Chin D. Calmodulin, a prototypical calcium sensor / D. Chin, A. Means // Trend. Cell Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 332–328.

12. Park C. Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of system acquired resistance / C. Park, W. Heo, J. Yoo, J. Lee // *Mol. Cells.* – 2004. – Vol. 18. – P. 207–213.

13. Tirichine L. Deregulation of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development / L. Tirichine, H. Imaizumi-Ankaru, S. Yoshida, Y. Murakami // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 694–701.

14. Sathyanarayanan P. Decoding  $Ca^{2+}$  signals in plants / Sathyanarayanan P. // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2004. – P. 23. – Vol. 1–11.

15. Osawa M. Solution structure of calmodulin-W-7 complex: basis of diversity NMR in molecular recognition / M. Osawa, M. B. Swindells, J. Tanikawa, T. Tanaka // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 276. – P. 165–176.

**ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРА СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ  
ПРОТЕИНКИНАЗ W7 НА AGROBACTERIUM –ОПОСРЕДОВАННУЮ  
ТРАНСФОРМАЦИЮ РАСТЕНИЙ**

**В. В. Федорчук, А. И. Емец**

*Исследовано влияние различных концентраций ингибитора  $Ca^{2+}$ -кальмодулин зависимой протеинкиназы W7 на частоту агробактериальной трансформации листовых эксплантов *Nicotiana tabacum*. Установлено, что добавление W7 в концентрациях 25 мкМ в среду для культивирования с агробактерией приводит к значительному повышению интенсивности роста растений-регенерантов по сравнению с контролем.*

***Ключевые слова:** агробактериальная трансформация, *Nicotiana tabacum*, ингибиторы протеинкиназ*

**INFLUENCE OF SERIN-THREONINE PROTEINE-KINASES INHIBITOR  
W7 ON AGROBACTERIUM-MEDIATED PLANT TRANSFORMATION**

**V. Fedorchuk, A. Yemets**

*In this study effects of W7 on the efficiency of Agrobacterium-mediated of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) were investigated. Despite the fact that the*



*transformation efficiency did not exceed control, significant increase the growth rate of regenerated plants was observed after W7 treatment.*

**Key words:** *agrobacterium transformation, Nicotiana tabacum, inhibitors of protein kinase*