

ТРАНСФОРМАЦІЯ ПАЛЬЧАСТОГО ПРОСА ГЕНЕТИЧНОЮ КОНСТРУКЦІЄЮ ДЛЯ РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ ГЕНА ЦИТОКІНІНДЕГІДРОГЕНАЗИ 2

Пальчасте просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) – важлива зернова та фуражна культура для багатьох країн Азії та Африки, яка набуває все більшої популярності в Україні завдяки своїй невибагливості до умов культивування, стійкості до захворювань, поживній цінності, а саме високому вмісту метионіну та кальцію, і добрим властивостям зберігання зерна. В умовах помірного клімату України пальчасте просо має великий потенціал для вирощування як зернова, так і як фуражна культура. Значний інтерес представляє вирощування цієї технічної культури з метою виробництва біоетанолу другого покоління.

Відомо, що цитокініни відіграють важливу роль у регуляції таких господарсько-цінних ознак, як висота рослин, куцистість, розмір та кількість насінин у колоску [1, 2]. Результати останніх досліджень свідчать про те, що маніпулювання рівнями цитокінінів в рослині шляхом генетичної модифікації може бути потужним засобом для створення рослин із високою продуктивністю [1, 3–9]. Активність та функції цитокінінів залежать від їх синтезу *de novo*, кон'югації та деградації, а також від локального і дистанційного транспорту. За рахунок цих процесів підтримується гомеостаз цитокінінів у кожному окремому органі рослин [10]. За застосування методів молекулярної генетики та генетичної інженерії для пригнічення експресії генів цитокінінгідрогеназ може значно покращити продуктивність та врожайність рослин. Слід зазначити, що за допомогою пригнічення експресії генів, які кодують цитокініндегідрогенази (СКХ), було успішно покращено показники продуктив-

ності деяких видів однодольних рослин, а саме ячменю [7, 8].

Отже, створення конструкцій для РНК інтерференції (РНКі) генів *EcCKX* пальчастого проса та подальша трансформація ними *E. coracana* є логічним напрямком роботи для покращення агротехнічних характеристик цієї культури. На попередніх етапах досліджень нами було відібрано специфічну ділянку послідовності гена *EcCKX2* пальчастого проса з низьким рівнем гомології з послідовностями інших генів *EcCKX* для створення РНКі-конструкції, проведено дизайн праймерів та ампліфіковано за допомогою ПЛР фрагмент кДНК *EcCKX2* (413 п.н.). Отриманий фрагмент кДНК *EcCKX2* було клоновано у вектор для інтерференції РНК, а саме pBract207 [11]. Метою наших подальших досліджень стала оптимізація та трансформація пальчастого проса створеною конструкцією для РНК інтерференції гена *EcCKX2*.

Матеріали і методи

У роботі використовували насіння пальчастого проса *E. coracana* (L.) Gaertn. сорту Тропіканка, люб'язно надане відділом нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України. Стерилізацію насіння та індукцію калусогенезу здійснювали відповідно до протоколу [12]. Для трансформації калюсу використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 із конструкцією pBract207-RNAi-*EcCKX2* (рис. 1), яка містила фрагмент послідовності гена цитокініндегідрогенази *EcCKX2* пальчастого проса у сенс- та антисенс-орієнтації,

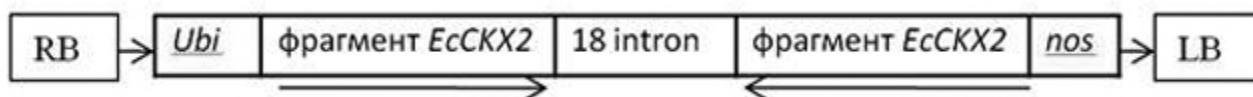


Рис. 1. Схема конструкції pBract207-RNAi-*EcCKX2*

розділених спейсером послідовності інтрона 18S рибосомного гена [11].

Селективну концентрацію гігromіцину визначали через 4 тижні культивування на середовищах для калюсогенезу (Еко) [12] у присутності різних концентрацій антибіотика (0, 10, 20, 30 мг/л). Для кожного дослідження використовували по 3 чашки Петрі з селективним середовищем у трьох повторях. Для агробактеріальної трансформації калюсу використовували нічну культуру трансформованої агробактерії, яку спочатку осаджували, потім осад ресуспендували у рідкому безгормональному середовищі МС до оптичної щільності $OD_{600}=1$. Отриману суспензію бактерій додавали до експлантів, після чого їх обробляли ультразвуком протягом 5 с (UM-2, Unitra-Unima, Польща). У подальшому калюси інкубували протягом 40 хв та переносили на середовище Еко на дві доби, після чого відмивали водою, просушували і переносили на середовище для регенерації рослин [13], до якого додавали 200 мг/л цефотаксиму для інгібування агроінфекції та гігromіцину

(30 мг/л) для селекції трансгенних клітин. Із метою підвищення ефективності трансформації в середовище для кокульттивування з агробактерією додавали екстракт тютюну, відповідно до методики, описаної раніше [13]. Також здійснювали антинекротичну обробку експлантів, для чого в середовище для кокульттивування додавали 300 мг/л L-цистеїну. Експлантати субкультивували кожні 2 тижні протягом 2 місяців, після чого калюси переносили на середовище для регенерації рослин [12].

Результати та обговорення

Створена генетична конструкція містила ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину. Оскільки гігromіцин є протимікробним препаратом широкого спектра дії, для встановлення його ефективної селективної концентрації спочатку була вивчена дія цього антибіотика у різних концентраціях на життєздатність калюсу пальчатого проса (рис. 2).

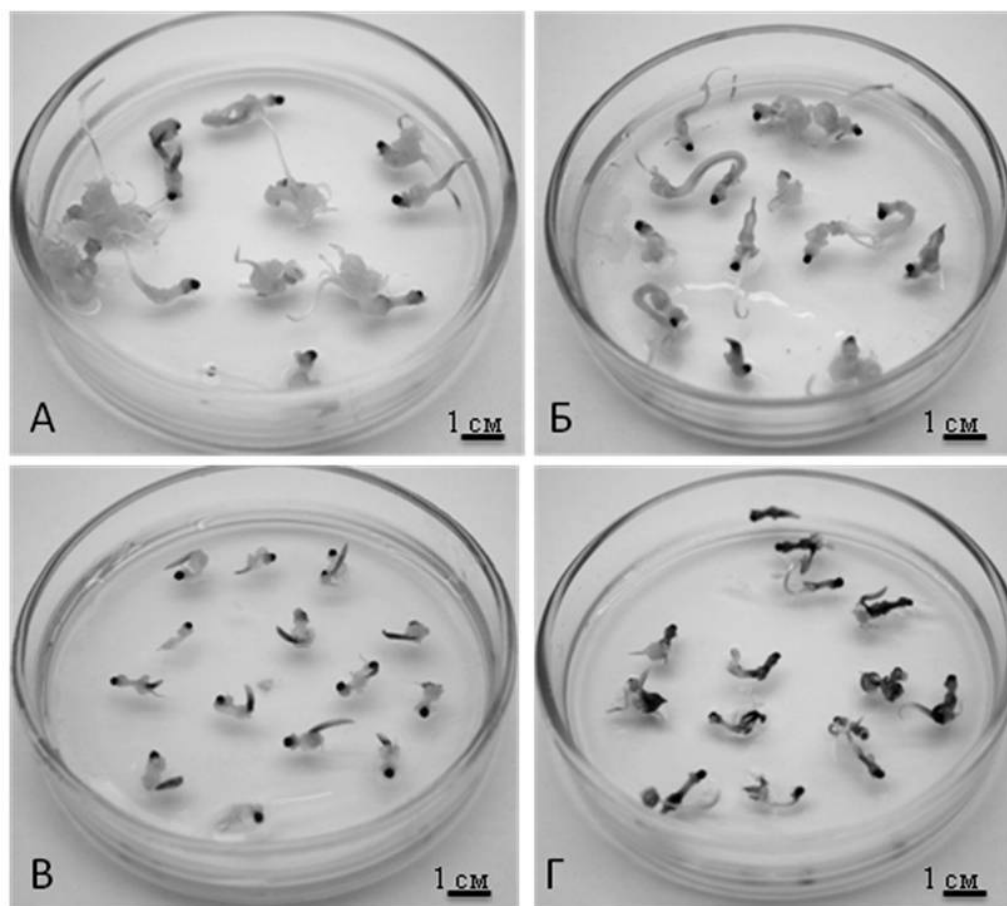


Рис. 2. Калюсогенез пальчатого проса на контрольному середовищі (А) та з додаванням гігromіцину в концентраціях 10 мг/л (Б), 20 мг/л (В) та 30 мг/л (Г)

Було виявлено, що гігromіцин не впливає на проростання насіння, майже 100 % насіння проростало. Однак після одного тижня культивування на селективному середовищі спостерігали відмінності між експлантатами, що знаходились у чашках Петрі з різними концентраціями гігromіцину. Протягом деякого часу експлантати, що росли на середовищі із 30 мг/л гігromіцину, зберігали життєздатність, але після одного місяця культивування спостерігали повну некротизацію тканин. Попри те, що гігromіцин вже давно застосовується для селекції генетично модифікованих ліній рослин, немає жодної публікації, де була б описана оцінка впливу гігromіцину на проростання насіння, калюсогенез та регенерацію пагонів злаків. Тому необхідно було визначити оптимальну концентрацію селективного агента, що забезпечувала б ефективну селекцію трансгенних клітин і в той же час не перешкоджала б морфогенезу та подальшій регенерації рослин. Отже, в ході дослідів із селекцією трансгенних ліній рослин було визначено оптимальну концентрацію селективного агента, а саме гігromіцину, що становила 25 мг/л.

Важливим моментом при агробактеріальній трансформації є інгібування росту агробактерії відповідними антибіотиками, однак існує проблема негативного впливу таких речовин на клітини калюсу. Трансформовані калюси розміщували на селективному середовищі для калюсогенезу з цефотаксимом поруч із нетрансформо-

ваним контролем (рис. 3). Субкультивування на свіжому середовищі здійснювали кожні два тижні. Калюси світлого або зеленого кольору розділяли і переносили на середовище для регенерації пагонів без цефотаксиму, після чого селекцію призупиняли. Під час вивчення впливу цефотаксиму, який додавали до середовища для інгібування агробактеріальної інфекції, було помічено, що через два місяці селекції на середовищі з цефотаксимом калюси повністю зберігали життєздатність і регенерували, що свідчить про відсутність інгібуючого впливу антибіотика на калюсогенез та регенерацію пагонів пальчастого проса. Більш того, раніше було описано, що використання цефотаксиму у такій концентрації стимулює регенерацію в культурі *E. coracana* [14].

У результаті проведених експериментів було отримано 9 первинних трансгенних ліній після 8-митижневої селекції, що становить 1,9 %. Калюсні лінії, отримані на середовищі із гігromіцином, переносили на середовище для регенерації рослин [12]. Оскільки рослини із РНК інтерференцією гена *EcCKX2* мають змінений рівень цитокінінів, при подальшій регенерації трансформованих калюсних ліній слід очікувати змін у загальному фенотипі та архітектурі рослин, що повинні забезпечувати їх підвищену кущистість та кількість зернівок. Варто зазначити, що застосування принципів інтерференції РНК для пригнічення експресії генів інтересу є перспективним напрямком розвитку біотехнології рослин, бо потребує менше часу та фінансових затрат у порівнянні з методами класичної селекції. Маніпуляція експресії генів відбувається лише із використанням послідовностей генів господаря, без привнесення будь-яких інших екзогенних ДНК послідовностей. Застосована у нашій роботі технологія підвищення продуктивності рослин шляхом РНК інтерференції гена цитокініндегідрогенази 2 може бути використана у майбутньому для інших видів сільськогосподарських рослин.

Висновки

Із метою підвищення продуктивності рослин пальчастого проса було апробовано методику агробактеріальної трансформації рослин створеною генетичною конструкцією для РНК інтерференції гена цитокініндегідрогенази 2 (*EcCKX2*), що містить часткову послідовність цього гена у сенс- та антисенс-орієнтації, для регуляції та зменшення загального рівня цитокінінів. У результаті проведеної роботи отримано трансфор-

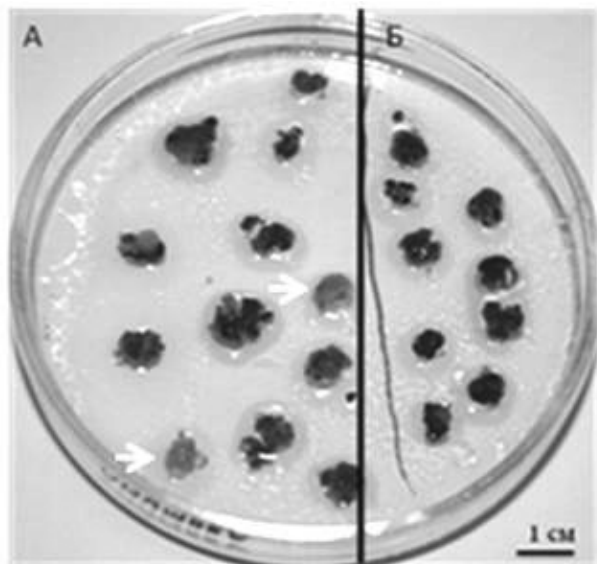


Рис. 3. Культивування трансформованого (А) та нетрансформованого контролю (Б) на селективному середовищі, що містило гігromіцин та цефотаксим

мовані лінії пальчастого проса, стійкі до селективного агента (гігроміцину).

Робота виконувалася в рамках наукового проекту «Отримання високопродуктивних рослин пальчастого проса для виробництва біоетанолу шляхом регуляції експресії генів цитокінін-

дегідрогенази» цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (№ держреєстрації 0113U004718) з використанням приладів Центру колективного користування приладами (ЦККП) «ГЕНТЕСТ».

ЛІТЕРАТУРА

1. Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Sato Y., Matsuoka M. Ectopic expression of knotted1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice // *Plant Physiol.* – 2006. – 142. – P. 54–62.
2. Radchuk V., Radchuk R., Pirko Y., Vankova R., Gaudinova A., Korkhovoy V., Yemets A., Weber H., Weschke W., Blume Y.B. A somaclonal line SE7 of finger millet (*Eleusine coracana*) exhibits modified cytokinin homeostasis and increased grain yield // *J. Exp. Bot.* – 2012. – 63, N 15. – P. 5497–5506.
3. Patent US 8222483. Cytokinin oxidase sequences and methods of use / Brugiere N., Habben J.E. July 17, 2012.
4. Jameson P.E., Song J. Cytokinin: a key driver of seed yield extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots // *J. Exp. Bot.* – 2014. – 2. – P. 244–254.
5. Jiskrová E., Novák O., Pospíšilová H., Holubová K., Karády M., Galuszka P., Robert S., Frébort I. Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots // *New Biotechnol.* – 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.010>
6. Pospíšilová H., Jiskrová E., Vojta P., Mrázová K., Kokáš F., Čudejková M.M., Bergougnoux V., Plíhal O., Klimešová J., Novák O., Dzuřová L., Frébort I., Galuszka P. Transgenic barley overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to drought stress // *New Biotechnol.* – 2016. doi: 10.1016/j.nbt.2015.12.005.
7. Mrázová K., Jiskrová E., Vyroubalová S., Novák O., Ohnoutková L., Pospíšilová H., Frébort I., Harwood W. A., Galuszka P. Overexpression of cytokinin dehydrogenase genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) fundamentally affects morphology and fertility // *PLoS One.* – 2013. – 8, N 11. – e79029. doi: 10.1371/journal.pone.0079029.
8. Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W. et al. Silencing of the HvCKX1 gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity // *J. Exp. Bot.* – 2010. – 61. – P. 1839–1851.
9. Mameaux S., Cockram J., Thiel T., Steuernagel B., Stein N., Taudien S., Jack P., Werner P., Gray J.C., Greenland A.J., Powell W. Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the Poaceae // *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – 10. – P. 67–82.
10. Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins // *J. Integr. Plant Biol.* – 2010. – 52. – P. 53–60.
11. Ісаєнков С.В., Баєр Г.Я., Корховий В.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Регуляція експресії гена цитокініндегідрогенази для отримання високопродуктивних рослин пальчастого проса // *Мат-ли наукової конференції «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив»* (9–11 вересня 2014 р., Київ). – 2014. – С. 142–146.
12. Yemets A.I., Bayer G.Ya., Blume Y.B. An effective procedure for *in vitro* culture of *Eleusine coracana* (L.) and its application // *ISRN Bot.* – 2013. – 7 p. Article ID 853121. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/853121>.
13. Баєр Г.Я., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Получение трансгенных растений пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. с устойчивостью к динитроанилину // *Цитология и генетика.* – 2014. – 48, N 3. – С. 3–11.
14. Eapen S., George L. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet // *Plant Tissue Org. Cult.* – 1990. – 22. – P. 87–93.

BAYER G.YA., ISAYENKOV S.V., BAYER O.O., YEMETS A.I., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyповskogo str., 2a, e-mail: galabayer@ukr.net

FINGER MILLET (*ELEUSINE CORACANA*) TRANSFORMATION BY GENETIC COSTRUCT FOR RNA INTERFERENCE OF CYTOKININE DEHYDROGENASE 2 GENE

Aim. Development of protocol for finger millet transformation by *EcCKX2*-RNAi construct in order to reduce the expression level of gene encoding cytokinin dehydrogenase. **Methods.** The *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of plant calli was conducted. The plants were transformed by agrobacterial strain GV3101 carrying binary construct pBract 207-RNAi-*EcCKX2*. **Results.** The optimal hygromycin concentration for the selection of transformants was found. The transformed plant lines with resistance to this selective agent were obtained. The regeneration of fully developed plants from transformed cell cultures remains a big challenge that need to be solved. **Conclusion.** During this study the effective concentration of hygromycin for transgenic plant selection was 25 mg/l. The estimated transformation efficiency was around 1.9%. Suggested approach to suppress *EcCKX2* gene expression has a great potential for the further application in plant biotechnology and agro technology. Whatever, our results strongly indicate about necessity of transformation conditions optimisation and improvement of genetic construct.

Keywords: *Eleusine coracana*, *ckx* gene, plant transformation, plant productivity improvement.