

Корисна модель належить до біотехнології та генетичної інженерії та стосується способу отримання транзійтної експресії генів в тканинах рослин амаранту сортів Кармін, Геліос шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vivo*.

Відомим є те, що для отримання стабільної експресії генів і подальшого синтезу цільових білків використовують метод *Agrobacterium*-опосередкованою трансформації. Так, використовують "класичний" метод трансформації, при якому проводять кокультивування рослинних експлантів (листки, частини стебла або коренів, гіпокотилі, епикотилі) з бактеріальною суспензією в рідкому поживному середовищі, потім отримують культури "бородатих" коренів (у разі використання для трансформації *A. rhizogenes*) або калусну тканину та/або регенеровані пагони (при використанні для трансформації *A. tumefaciens*).

Недоліком класичного методу трансформації для отримання трансформованих рослин амаранту є неможливість його використання через низьку регенераційну здатність більшості видів і сортів рослин цього виду, що практично унеможливляє отримання трансгенних рослин. Крім цього, проведення методу потребує багато часу який проходить від моменту отримання рослинного матеріалу, придатного до трансформації до моменту отримання культури "бородатих" коренів або трансгенних рослин (від півтора місяця до пів року), велику кількість насіння на початку експерименту, наявності спеціального лабораторного обладнання для вирощування рослин в стерильних умовах, додаткових витрат хімічних компонентів та реактивів, які використовуються для приготування поживних середовищ, молекулярно-генетичного аналізу трансформованих рослин (підтвердження їх трансгенного статусу) та спеціально навченого персоналу (який має здійснювати вирощування рослин в стерильних умовах, проведення самого етапу трансформації та етапу молекулярно-генетичного аналізу).

Враховуючи вище перелічені недоліки "класичного" методу трансформації, за необхідності отримання трансгенних рослин тих видів, які мають специфічні фізіологічні особливості, що не дозволяють отримати регенеровані пагони *in vitro* (зокрема, це стосується рослин *Amaranthus caudatus*), постає потреба пошуку нових або удосконалення вже існуючих способів генетичної трансформації, які б дали змогу уникнути етап регенерації пагонів.

Таким способом трансформації є спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації шляхом інфільтрації агробактеріальної суспензії в рослини. Суть методу полягає у зануренні молодих інтактних проростків амаранту в інфільтраційний буфер, з додаванням суспензій агробактерій та подальшим витримуванням проростків в буфері у вакуумній камері з подальшою висадкою рослин у ґрунт.

Найбільш близьким до описаного методу є спосіб *Agrobacterium*-опосередкованою трансформації рису (*Oryza sativa*) [1] та *Arabidopsis thaliana* [2] шляхом інфільтрації. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рису передбачає використання 6-ти-денних проростків рису сорту Kitaake, які вирощують у стерильних умовах на специфічному поживному середовищі HiMedia PW1138; нарощування культур *A. tumefaciens*, штам ЕНА105 з генетичним вектором pCambia1304 (містив ген uidA) та pCambia1302 (містив ген gfp); вакуумну інфільтрацію проростків бактеріальною суспензією при скарифікації першого справжнього листка в спеціальному середовищі, що містило Silwet® L-77, ацетосирингон та глюкозу; застосування стандартних протоколів для виявлення синтезу продуктів, які кодуються геном uidA та gfp шляхом мікроскопіювання, гістохімічного аналізу, Western-блотінг аналізу [1, 3, 4].

Agrobacterium-опосередкована трансформація *Arabidopsis thaliana* передбачає використання 4-денних проростків, які пророщують в стерильних умовах; нарощування культур *A. tumefaciens*, (штам *A. tumefaciens* GV3101, який містить генетичний вектор pVHK-NLS-YFP-GUS з репортерними генами yfp та uidA); інфільтрацію рослин бактеріальною суспензією у спеціальному середовищі MS, що містило Silwet® L-77, ацетосирингон та глюкозу; подальше вирощування проростків після інфільтрації на стерильному середовищі MS (0,8 % агар)+ 1 % цукрози; застосування стандартних протоколів для виявлення синтезу продуктів, які кодуються геном uidA та gfp шляхом мікроскопіювання, гістохімічного аналізу, Western-блотінг аналізу [2].

Таким чином, у зазначених методах використовують штамми *A. tumefaciens* для інфільтрації рослин; молоді інтактні рослини як матеріал для трансформації; стандартні методи для аналізу присутності білків, що кодуються перенесеними генами (прижиттєве мікроскопіювання та стандартний протокол для аналізу присутності ферменту β-глюкуронідази [1].

Однак недоліками відомих способів трансформації є необхідність стерилізації насіння і вирощування в стерильних умовах (додаткові витрати реактивів, часу, необхідне спеціальне лабораторне обладнання); наявність додаткових етапів аналізу (проведення Western-блот аналізу також потребує додаткових витрат реактивів, часу та необхідне спеціальне лабораторне обладнання); специфічне багатоконпонентне середовище для інфільтрації (додаткові витрати реактивів), необхідність скарифікації першого справжнього листка кожного проростку (ускладнення процедури та додаткові витрати часу).

У відомому рівні техніки не виявлені методи, які не мали зазначені недоліки.

Задачею корисної моделі є створення способу ефективної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації зі стандартизованими умовами, який дозволяє технічно просто та швидко проводити скринінг великої кількості рослин різних видів та сортів на предмет їх сприйнятливості до агробактерій для подальшого використання відібраних видів/сортів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та синтезу в них цільових продуктів.

Поставлена задача вирішена способом швидкого отримання транзйентної експресії трансгенів в рослинах *Amaranthus caudatus* L., який включає: (а) отримання проростків рослин; (б) вирощування бактерій *Agrobacterium tumefaciens* у рідкому середовищі; (в) інфільтрацію проростків суспензією бактерій у інфільтраційному буфері у вакуумній камері; (г) підтвердження наявності продуктів експресії генів *uidA* та *gfp* в тканинах рослин за допомогою гістохімічного методу GUS реакції. В зазначеному способі на стадії (а) використовують нестерилізоване насіння; інфільтрацію на стадії (в) проводять у звичайних умовах без додаткової стерилізації, з використанням буфера спрощеного складу: 10 мМ розчин $MgSO_4 \times 7H_2O$; подальше вирощування проростків до початку аналізу результатів проводять у звичайних умовах без стерилізації; на стадії (г) через 24 години гістохімічної реакції оцінюють наявність продукту експресії гена *uidA* по активності білка β -глюкуронідази (GUS) візуально за появою синього забарвлення тканин рослин, а присутність білка GFP, який кодується геном *gfp* аналізують візуально через 4 дні після інфільтрації шляхом опромінення світлом з довжиною хвилі в діапазоні 365-400 нм за появою зеленої флуоресценції тканин при вивченні під флуоресцентним мікроскопом.

Технічним результатом від застосування корисної моделі є: виключення необхідності стерилізації насіння та його вирощування в стерильних умовах до і після інфільтрації, за рахунок чого відбувається скорочення матеріальних витрат та часу;

можливість використання проростків для інфільтрації вже через одну - півтори доби від початку проростання, за рахунок чого відбувається скорочення часу експерименту, оскільки насіння рослин амаранту різних сортів дуже швидко проростає при замочуванні в воді; можливість економії простору в лабораторному приміщенні, оскільки насіння і молоді проростки амарантів мають малий розмір - на 1 м² можливо розмістити тисячі проростків;

пришвидшення процесу отримання трансгенних рослин; скорочення матеріальних витрат шляхом використання інфільтраційного буфера спрощеного складу;

можливість проведення аналізу результатів без застосування Western-блот аналізу, що дозволяє зменшити матеріальні витрати на реактиви, виключити необхідність застосування спеціального лабораторного обладнання та залучення спеціально навченого персоналу, економія часу;

економія електроенергії, оскільки тривалість експерименту становить близько тижня.

Корисна модель є універсальною у використанні і може бути застосована при використанні різних штамів агробактерій та різних генетичних векторів для швидкої трансформації широкого спектру рослин, що було показано авторами [6-8]. Завдяки простоті виконання корисної моделі один дослідник може провести скринінг більше ніж 1000 рослин за 1-2,5 тижні, виконуючи самостійно всі етапи експерименту. Також до беззаперечних переваг слід віднести високу ефективність трансформації, оскільки у більшості інфільтрованих молодих проростків, які інфільтрували через добу після проростання, виявляли синтез специфічних репортерних білків в усіх органах.

Таким чином, основними перевагами даної корисної моделі є простота виконання, швидке отримання результатів для великої кількості експериментальних рослин (що є дуже важливим, якщо її застосовувати при широкомасштабному виробництві), мінімум матеріальних витрат та мінімум необхідного технічного обладнання, максимальна ефективність трансформації для різних видів рослин.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Схематичне зображення ділянки Т-ДНК генетичних векторів pICBV19(A), pNMD2501 (Б).

Фіг. 2. Проростки *A. caudatus* сорт Геліос (6-денні) після гістохімічної реакції (А - неінфільтровані контрольні проростки сорту Геліос, Б - проростки, інфільтровані (у віці 1 доба) *A. tumefaciens*, генетичний вектор pCBV19).

Фіг. 3. Проростки *A. caudatus* сорт Кармін (А, Б), сорт Геліос (В, Г) (15-денні) після гістохімічної реакції (А, В) - проростки, інфільтровані у віці 10 діб *A. tumefaciens*, генетичний вектор pCBV19, Б, Г - неінфільтровані контрольні проростки.

Фіг. 4. Сім'ядольні листки проростків *A. caudatus* (15-денного віку), інфільтрованих у віці 10 діб *A. tumefaciens*, генетичний вектор pNMD2501 під ультрафіолетовим світлом (А, Б, В): А - сорт Геліос (при збільшенні x100); Б - сорт Кармін (збільшення x100); В - верхівка сім'ядольного листка сорту Геліос (при збільшенні x100); Г - лист неінфільтрованої контрольної рослини (сорт Геліос).

Фіг. 5. Проростки сорту Геліос (у 6-тиденному віці), який був інфільтрований у віці 1 доби *A. tumefaciens*, що містила генетичний вектор pNMD2501 під ультрафіолетовим світлом (А, Б, В, Г); А - черешок і нижня частина сім'ядольних листків (збільшення x100), Б - верхівка сім'ядольного листка (збільшення x100), В - гіпокотиль (збільшення x200), Г - гіпокотиль (збільшення x100), Д - сім'ядольні листки неінфільтрованих контрольних рослин (збільшення x100), Ж - гіпокотиль неінфільтрованої

контрольної рослини (збільшення x200).

Фіг. 6. Проростки сорту Кармін (6-денні), які були інфільтровані у віці 1 доби *A. tumefaciens*, що містила генетичний вектор pNMD2501 під ультрафіолетовим світлом (А, Б); А - гіпокотилі (збільшення x100), Б - гіпокотилі та частина сім'ядольних листків (збільшення x100), В - гіпокотиль неінфільтрованих контрольних сім'ядольних листків (збільшення x200), Г - частина неінфільтрованих сім'ядольних листків (збільшення x100)

Суть корисної моделі пояснюється прикладами та схемами.

Приклад виконання способу

Рослинний матеріал. В роботі використовують рослини *A. caudatus* сортів Геліос та Кармін, насіння отримане з відділу нових культур Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (д.б.н., професор, завідувач відділу нових культур Рахметов Д.Б., к.б.н. Андрущенко О.Л.). Насіння попередньо пророщують у нестерильних умовах в чашках Петрі при 22-26 °С, 14-годинному світловому періоді, при освітленні - 3000-4500 лк.

Бактеріальні штами та векторні конструкції. В роботі використовують *A. tumefaciens* штам GV3101 з генетичними векторами pICBV19 з репортерним геном uidA, який кодує синтез β-глюкуронідази, та pNMD2501 з репортерним геном gfp, який кодує синтез зеленого флуоресцентного білка. (Фіг.1).

Agrobacterium-опосередкована трансформація.

Використовують інтактні рослини віком 1 доба та 10 діб. Інтактні рослини занурюють на 5-10 хв при 22-24 °С у колбу з інфільтраційним буфером (10 мМ розчин $MgSO_4 \times 7H_2O$), що містить добову культуру *A. tumefaciens*. Процедура проводять у вакуумній камері під тиском 0,01 мПа. Для кожного варіанта експерименту (інфільтрація рослин суспензією агробактерій, які несли генетичний вектор з uidA або gfp геном) використовують по 100 молодих проростків кожного сорту. Як негативний контроль використовують проростки сорту Геліос та Кармін, які не інфільтрували. Після інфільтрації рослини вирощують при 22-26 °С, 14-годинному світловому фотоперіоді та освітленні 3000-4500 лк. У подальшому рослини аналізують з використанням стандартної гістохімічної реакції [3]. Як позитивний контроль використовують листки трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* зі стабільною експресією uidA гена.

Протоколи аналізу присутності продуктів експресії генів uidA та gfp. Для оцінки функціонування в тканинах амаранту після проведеної інфільтрації генної конструкції pCBV19, яка містить ген uidA, використовують гістохімічну реакцію (GUS реакцію) [3]. Для цього проростки інкубують у буфері, що містить 50 мМ фосфату натрію, рН 7,0; 50 мМ EDTA, рН 8,0; 0,5 мМ $K_3Fe(CN)_6$; 0,5 мМ $K_4Fe(CN)_6$; 0,1 % Тритону X-100; 1 мМ X-gluc. Гістохімічну реакцію зупиняють через 24 години інкубації при 37 °С у темряві з наступними п'ятьма промиваннями в 70 % етанолі. Активність білка β-глюкуронідази (GUS) оцінюють візуально за появою синього забарвлення тканин рослин.

Присутність білка GFP, який кодується геном gfp аналізують візуально через 4 дні після інфільтрації шляхом опромінення світлом з довжиною хвилі в діапазоні 365-400 нм. Для контролю наявності зеленого світіння використовують мікроскоп Zeiss axiophot fluorescent microscope® (Німеччина) з насадкою зі спеціальним фільтром (Plan-Neofluar) при збільшенні x100 і x200. Результат вважають позитивним при появі зеленої флуоресценції тканин.

Результати аналізу присутності ферменту β-глюкуронідази, який кодується геном uidA. При проведенні гістохімічного дослідження встановлюють, що інтенсивність забарвлення синього кольору є різною у тканинах різних вікових груп рослин, а також є відмінності у площі забарвленої поверхні у рослин різного віку. У проростків, які були інфільтровані у одноденному віці, забарвлюються всі частини рослини (корінь, гіпокотиль та сім'ядолі) (фіг. 2). Відсоток рослин, у яких виявляють експресію гена uidA, складає для сорту Геліос 95 %, для сорту Кармін - 93 %.

Ділянки, в яких виявляють синтез репортерного білка GUS у 10-денних проростків, розташовуються переважно уздовж середньої жилки і займають більшу частину поверхні листової пластинки (більше 80 %) (фіг. 3). Відсоток рослин, в тканинах яких виявляють експресію гена uidA (інфільтровані у віці 10 днів) для сорту Геліос становить 61,26 %, для сорту Кармін - 41,55 %.

Аналіз присутності продуктів експресії гена gfp. У проростків обох сортів, які були інфільтровані у віці 10 діб, спостерігають зелену флуоресценцію в гіпокотиліях та по краях листових пластинок (фіг. 4). Найбільш інтенсивну транзійентну експресію гена gfp спостерігають у судинних пучках гіпокотиліа та в середній жилці листової пластинки (фіг. 4, 5). При мікроскопіюванні проростків, які інфільтровані в одноденному віці, виявляють дуже інтенсивну зелену флуоресценцію у всіх тканинах вищезгаданих органів проростків (фіг. 5, 6).

Таким чином, розроблений спосіб Agrobacterium-опосередкованої трансформації рослин *A. caudatus* сортів Геліос та Кармін дозволяє швидко детектувати експресію репортерних генів у тканинах та отримати рослини з позитивним сигналом. Отже, описом та прикладами підтверджено зазначений технічний результат.

Джерела інформації:

1. Burman N., Chandran D., Khurana J.P. A rapid and highly efficient method for transient gene

expression in rice plants // Front. Plant Sci. - 2020 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584011>

2. Li J.F., et al. The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species // Plant Methods - 2009. V. 5, N 6 (2009). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-6>

3. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep.- 1987. - Vol. 5. - P. 387-405. doi:10.1007/bf02667740.

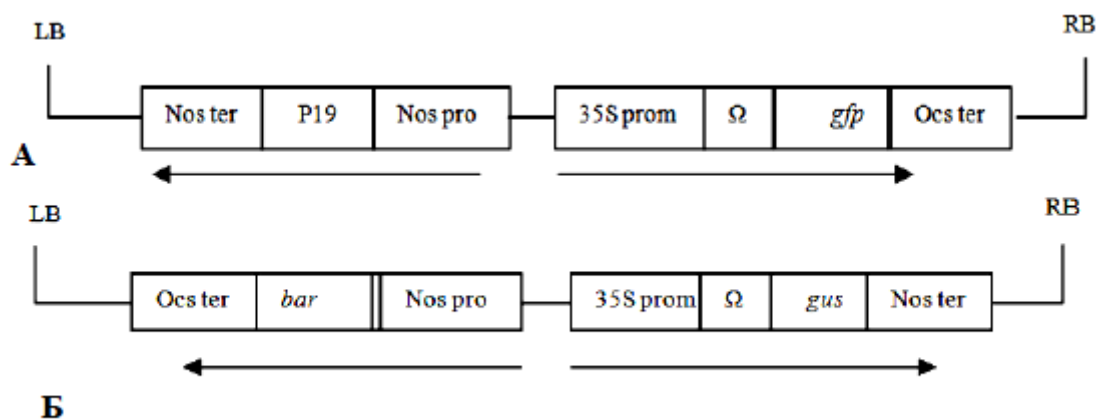
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. - V. 72, № 1-2, - P.248-254 doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

5. Luria S.E., et al.: Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles // Virology - 1960. - V. 12, № 3, - P. 348-390 doi:10.1016/0042-6822(60)90161-6.

6. Ярошко О., та ін.: Транзйентна експресія uidA і gfp генів у *Physalis peruviana* // Фізіологія рослин і генетика - 2021. – V. 53, № 5, - P. 415-424 doi: <https://doi.org/10.15407/frg2021.05.415>

7. Yaroshko O., Matvieieva N. Transient expression uidA gene in *Physalis peruviana* L. and *Physalis ixocarpa* Broth. The 5th International scientific conference Agrobiodiversity for improving the nutrition, health, quality of life and spiritual human development, 3 November 2021, Nitra, Slovak republic. - P. 147. DOI: <https://doi.org/10.15414/2021.9788055224015>

8. Yaroshko O. Transient expression of reporter genes in seedlings of *Helianthus annuus* L./ Транзйентна експресія репортерних генів у проростках *Helianthus annuus* L. // XV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ з міжнародною участю. Науковий журнал ІМБГ "Біополімери і клітина", Травень 26 - 27 2021, Київ. - с. 189.



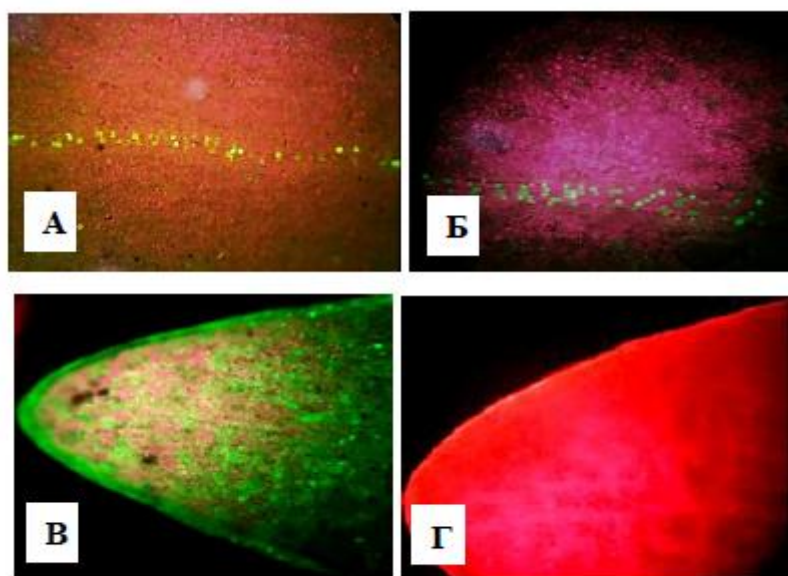
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

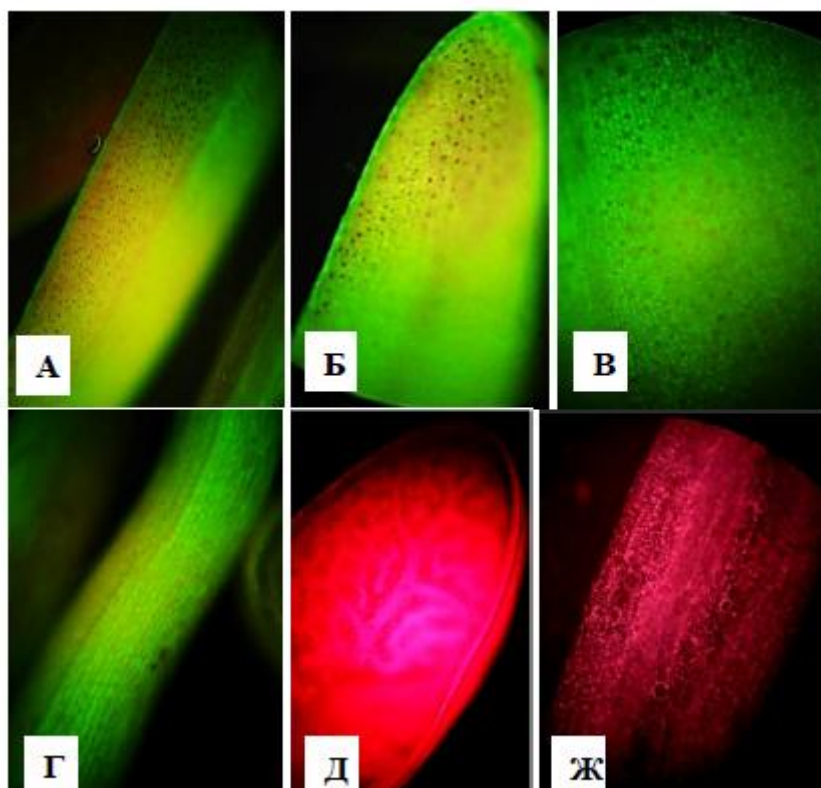


Fig. 5

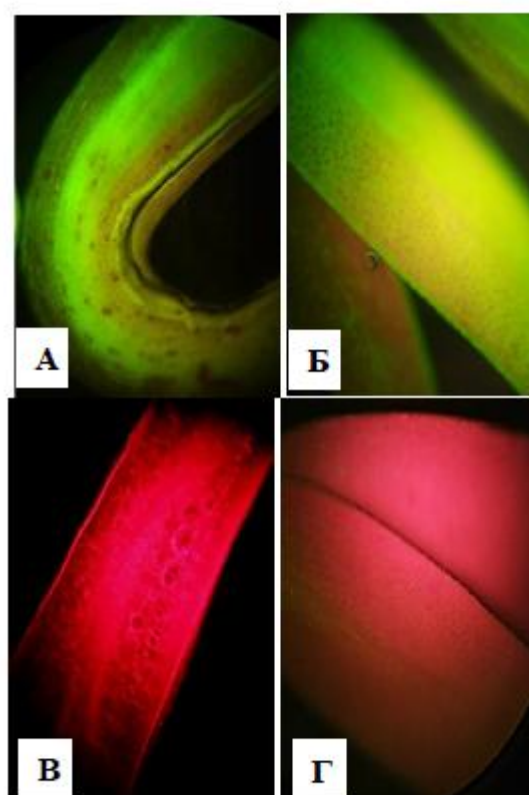


Fig. 6