

УДК 577.2: 57.088.1

КОМПЛЕКСНАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ АГРОИНФИЛЬТРАЦИИ В СИСТЕМЕ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ НА *Nicotiana tabacum* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИЗУАЛЬНОЙ РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ RUBY

© 2026 г. М. Р. Сорокина, Ю. А. Югай, А. И. Дегтяренко, А. А. Садыков,
Ю. Н. Шкрыль*, академик РАН В. П. Булгаков

Поступило 10.11.2025 г.

После доработки 20.11.2025 г.

Принято к публикации 25.11.2025 г.

Агробактериальная транзистентная экспрессия является одним из наиболее востребованных инструментов в функциональной геномике и растительной биотехнологии, однако эффективность и воспроизводимость метода зависят от множества факторов. В представленной работе проведена комплексная оптимизация условий агроинфильтрации для повышения уровня экспрессии генов биосинтеза беталаина с использованием визуальной репортерной системы RUBY на модельном растении *Nicotiana tabacum*. Оценено влияние концентрации бактериальной суспензии, состава инфильтрационного буфера и способа введения агробактерий в листовую ткань. Наибольшая эффективность экспрессии достигалась при использовании суспензии со значением $OD_{600} = 1,0$, буфера, содержащего ацетосирингон (50 мкМ), МЭС (10 мМ), сахарозу (0,5%) и хлорид магния (10 мМ), а также при предварительном микропрокалывании листьев игольчатым роллером с последующей вакуумной инфильтрацией. Разработанный протокол повышает эффективность транзистентной экспрессии и может быть применен для функциональной характеристики генов, метаболической инженерии и получения биофармацевтических соединений в растениях.

Ключевые слова: агробактериальная транзистентная экспрессия, RUBY, беталаин, *Nicotiana tabacum*

DOI: 10.7868/S3034505726010142

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая трансформация растений является ключевым инструментом в фундаментальных исследованиях и прикладной биотехнологии. Среди существующих методов особое место занимает агробактериальная трансформация.

Агробактерии – это группа грамотрицательных бактерий, к которой относятся бактерии разных родов (в том числе *Rhizobium*), чье систематическое положение все еще является предметом дискуссии среди специалистов [1]. Эти бактерии известны благодаря способности к горизонтальному переносу генов и используются для получения генетически модифицированных растений. В данной работе

был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105, который относится к числу наиболее часто применяемых в протоколах агробактериальной трансформации. Его популярность обусловлена высокой эффективностью переноса Т-ДНК и широким спектром растительных объектов, которым он способен передавать генетический материал. В частности, ЕНА105 был получен путем модификации свёрхвирусного штамма А281 [2], но не содержит онкогенов, что делает его безопасным и удобным для транзистентной экспрессии. Эффективность ЕНА105 неоднократно показана в исследованиях на *Solanum lycopersicum* L., *Artemisia annua* L. и других растениях [3, 4], что обосновывает его выбор в рамках настоящего исследования. При этом существует два основных подхода к трансформации растений: стабильная и транзистентная экспрессия. Каждый из подходов обладает как преимуществами, так и недостатками. Транзистентная экспрессия обладает рядом преимуществ перед стабильной трансформацией, включая высокую скорость получения результатов, высокий уровень

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии”
Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток, Россия

*e-mail: yn80@mail.ru

экспрессии без интеграции ДНК в геном, простоту и воспроизводимость метода, а также широкие возможности для функциональных исследований и биофарминга — быстрого получения рекомбинантных белков, антител и вакцин в растениях [5].

Агроинфильтрация — это метод, используемый для транзientной экспрессии генов в растениях с целью молекулярного фарминга различных соединений. Данный подход широко применяется как для создания стабильных трансгенных линий, так и для транзientной экспрессии гетерологичных генов, что позволяет быстро анализировать работу промоторов, локализацию белков и функционирование генетических конструкций. Учитывая разнообразие подходов к транзientной трансформации и составу инфильтрационных буферов, необходимо подробно оценить влияние ключевых параметров агроинфильтрации на эффективность транзientной экспрессии.

Несколько лет назад была разработана генетическая конструкция RUBY, кодирующая ферменты биосинтеза беталаина — ярко окрашенного пигмента [6]. В настоящее время также широко используются и другие визуальные репортеры, в частности, зеленый флуоресцентный белок (GFP) и β-глюкуронидаза (GUS). RUBY, по сравнению с GUS и GFP, является удобным неинвазивным репортером, поскольку для определения беталаина не требуется облучать растение ультрафиолетом или обрабатывать дорогостоящим субстратом. При этом RUBY позволяет осуществлять визуальный мониторинг уровня экспрессии в реальном времени.

Таким образом, цель данной работы — оптимизация ключевых параметров агробактериальной транзientной трансформации на модели *Nicotiana tabacum* с использованием визуального маркера RUBY для повышения эффективности экспрессии генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий, условия культивирования и плазмиды

Для транзientной трансформации был использован штамм *A. tumefaciens* EHA105/pTiBo542, несущий плазмидный вектор 35S:RUBY. Трансформацию агробактерий осуществляли методом электропорации с использованием системы электропорации GenePulser Xcell™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя. Бактерии культивировали на питательной среде LB в модификации по Миллеру, с добавлением рифампицина (90 мг/л), стрептомицина (50 мг/л) и спектиномицина (50 мг/л).

Растения N. tabacum и условия их выращивания

Для всех экспериментов были использованы растения *N. tabacum* возрастом 8 недель. Растения выращивали в почве при температуре 22–24°C, влажности воздуха не менее 70% и фотопериоде 16/8 часов (день/ночь).

Подготовка культуры агробактерий для агроинфильтрации

Для проведения опытов свежую колонию *A. tumefaciens* EHA105 инокулировали в жидкую среду LB и выращивали на орбитальном термощейкере ES-60 (Miwlab, Китай) в течение 16 часов при 28°C при 180 об./мин. После этого бактерии центрифугировали при 3000 g (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Германия), клетки промывали стерильной дистиллированной водой и переносили в дистиллированную воду или соответствующий водный раствор

Таблица 1. Растворы, использованные для агроинфильтрации

Обозначение раствора	Компоненты раствора
АС – 10	Ацетосирингон, 10 мкМ
АС – 50	Ацетосирингон, 50 мкМ
АС – 100	Ацетосирингон, 100 мкМ
МЭС – 5	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, 5 мМ
МЭС – 10	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, 10 мМ
МЭС – 50	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, 50 мМ
Сах – 0,1	Сахароза, 0,1%
Сах – 0,5	Сахароза, 0,5%
Сах – 1	Сахароза, 1%
MgCl ₂ – 5	Хлорид магния, 5 мМ
MgCl ₂ – 10	Хлорид магния, 10 мМ
MgCl ₂ – 20	Хлорид магния, 20 мМ
Буфер для агроинфильтрации, подобранный на основе экспериментальных данных	Ацетосирингон, 50 мкМ; 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, 10 мМ; Сахароза, 0,5%; Хлорид магния, 10 мМ

(таблица 1). Количество бактерий в растворе устанавливали с помощью спектрофотометрии при длине волны 600 нм (OD). МЭС использовали со значением pH 5,5.

Агроинфильтрация табака

Перед проведением агроинфильтрации бактериальные суспензии инкубировали в течение 30 мин в дистиллированной воде или соответствующем водном растворе без добавления антибиотиков, поскольку их присутствие может оказывать ингибирующее действие на физиологическую активность агробактерий и снижать эффективность переноса Т-ДНК. Инкубацию суспензий проводили в течение 30 мин при 28 °С при 180 об/мин для активации вирулентных генов агробактерий перед введением в листовую ткань. Инфильтрацию осуществляли несколькими способами. Первый способ — введение суспензии в абаксальную поверхность листа с помощью шприца без иглы. Остальные 3 способа включали погружение растений в бактериальную суспензию с последующей обработкой вакуумом, при этом листья оставляли целыми, наносили проколы либо шприцевой иглой (единичные, редкие проколы), либо игольчатым роллером с длиной иглы 0,5 мм (100 проколов/см²). В качестве вакуумной камеры использовали эксикатор (400 мм) с подключенным к нему вакуумметром. К эксикатору через регулируемый вентиль был подключен пластинчатороторный вакуумный насос (VE215N, Value, Китай). Также имелся регулируемый вентиль для контролируемого запуска воздуха в камеру (сброса вакуума). Набор рабочего давления осуществлялся в течение 30 с, после чего следовала пауза продолжительностью 120 с и сброс вакуума со скоростью 1 кПа/с.

Измерение концентрации беталаина

Для определения содержания беталаина из агроинфильтрованных листьев табака из зон экспрессии трансгена вырубали диски диаметром 9 мм. По 4 диска объединяли в пробу, немедленно взвешивали и переносили в пробирку с 700 мкл 100 мМ цитратного буфера (pH 6,0). Гомогенизацию образцов проводили на льду, после чего суспензию центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при 0 °С. Полученный окрашенный супернатант использовали для спектрофотометрического анализа содержания беталаина по методике Sokolova (2022) [7]. Оптическую плотность измеряли в 96-луночном формате на микропланшетном спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, США). Количество беталаина m_b рассчитывали по формуле:

$$m_b / m = [(A_{538} - A_{600}) / A_0] \times C_0 \times [(m / p) + V] / m,$$

где: A_{538} — оптическая плотность при 538 нм; A_{600} — оптическая плотность при 600 нм; A_0 — удельное поглощение раствора беталаина с концентрацией C_0 в кювете длиной 1 см; m — масса образца; p — объемная плотность образца; V — объем буфера для экстракции.

Статистический анализ

Для обработки результатов использовали программное обеспечение IBM SPSS Statistics 26 (IBM, США). Все представленные данные выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка (SE) на основании трех независимых повторов. Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD-тест), при этом различия считались достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние концентрации бактериальных клеток на эффективность биосинтеза баталаина

В работе использовали модельный объект *N. tabacum*, который, несмотря на меньшую чувствительность к агробактериальной трансформации по сравнению с *N. benthamiana*, обладает рядом преимуществ. Во-первых, листья *N. tabacum* имеют более плотную структуру и меньшую вариабельность между экземплярами, что позволяет воспроизводимо оценивать влияние физических параметров инфильтрации. Во-вторых, данный вид является одной из наиболее распространенных модельных культур в физиологии растений, доступен для круглогодичного выращивания и хорошо описан в контексте метаболической инженерии. Таким образом, использование *N. tabacum* в настоящем исследовании направлено на разработку универсального подхода к оптимизации условий транзientной экспрессии, потенциально применимого и к другим видам растений. Для установления зависимости уровня транзientной экспрессии беталаина от количества агробактерий в листья *N. tabacum* были инфильтрованы суспензии бактерий в дистиллированной воде со значениями OD₆₀₀ 0,1; 0,5; 1,0 и 1,5. Накопление беталаина стало обнаруживаться на 4-й день после инфильтрации. Наивысшая экспрессия наблюдалась на 7 сутки после инфицирования (рис. 1а), поэтому в данной точке были сделаны вырубki из листьев. Далее из этих образцов были получены экстракты и определяли содержание беталаина спектрофотометрическим методом (рис. 1б). Обнаружено, что наибольшая концентрация беталаина достигается при агроинфильтрации листьев табака бактериальной

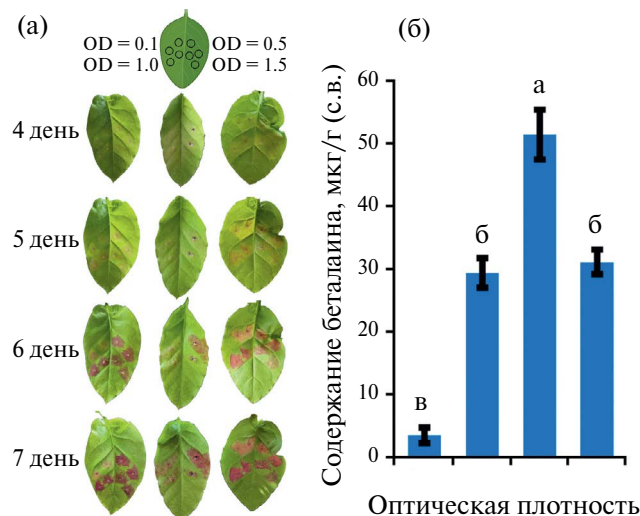


Рис. 1. Влияние концентрации агробактериальной суспензии на уровень транзientной экспрессии ферментов биосинтеза беталаина в листьях *N. tabacum*. (а) – временной профиль накопления пигмента в зонах инфильтрации суспензией *A. tumefaciens* с различной оптической плотностью ($OD_{600} = 0,1; 0,5; 1,0; 1,5$). (б) – количественное определение содержания беталаина в экстрактах вырубков из листьев, выполненных на 7-й день после агроинфильтрации. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка (SE); одинаковые символы указывают на отсутствие достоверных различий по тесту Фишера при уровне доверительного интервала $p < 0,05$. Все измерения проводили в трех биологических повторностях ($n=3$).

суспензией с OD_{600} равным 1,0 (51,45 мкг/1 г свежей ткани), поэтому для дальнейших исследований было использовано это количество бактерий в суспензии. Многими авторами было показано, что концентрация клеток критически важна для эффективности трансформации, поскольку недостаточная концентрация приводит к низкой экспрессии, а из-за избытка бактериальных клеток гибнут обработанные ткани растения. Так, например, для растения *Arabidopsis thaliana* показано, что оптимальным будет значение OD_{600} в диапазоне 0,6-0,9 [8], что совпадает с полученными результатами. При этом для *Lactuca sativa* оптимальное значение OD_{600} лежит в более широких пределах, от 0,3 до 0,8 [9].

Влияние отдельных компонентов буфера для агроинфильтрации на уровень биосинтеза беталаина

Было изучено влияние различных компонентов, часто используемых в буферном растворе, предназначенном для индукции вирулентности агробактерий и инфильтрации.

Среди таких компонентов – ацетосирингон, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, сахара и хлорид магния. Эти вещества были независимо протестированы в разных концентрациях (рис. 2а). В качестве контроля использовали суспензию бактериальных клеток, ресуспендированных в дистиллированной воде. Суспензии бактерий вводили в листья после получасовой инкубации при 28 °С. Образцы листьев были собраны на 7 день после инфильтрации, и в них было измерено содержание беталаина (рис. 2б). В результате выявлено, что наибольший эффект оказывает сахароза в концентрации 0,5%, при ее добавлении концентрация беталаина увеличивается в 2,4 раза. Полученные данные демонстрируют снижение эффективности трансформации в 3 раза при концентрации сахарозы 1%; аналогично в другой работе установлено, что 1% сахарозы тормозит прирост биомассы агробактерий, тогда как оптимальной является концентрация 0,4% [10]. Есть также и противоположные результаты, демонстрирующие высокую эффективность сахарозы в концентрации 1% для транзientной экспрессии генов в *A. thaliana*, *Brassica oleracea*, *Capsella rubella*, *Thellungiella salsuginea*, *Thellungiella halophila*, *Solanum tuberosum*, *Capsicum annuum* и *N. benthamiana* посредством агроинфильтрации [11].

Следующим по значимости оказался ацетосирингон в концентрации 50 мкМ. Его присутствие привело к увеличению содержания беталаина в 1,6 раз. Ацетосирингон является полифенольным соединением, которое выделяется при ранении растения. Он достаточно давно известен как индуктор *vir*-оперона агробактерий [12], белки-продукты которого необходимы для переноса и интеграции Т-ДНК в растительный геном. По этой причине в подавляющем большинстве протоколов по трансформации растений бактерии предварительно инкубируют в присутствии ацетосирингона. При этом его концентрация зависит от штамма агробактерии и растения, и может варьироваться от 20 до 400 мкМ [10, 13]. Результаты, полученные в настоящем исследовании, указывают на то, что повышение концентрации ацетосирингона до 100 мкМ приводит к снижению эффективности транзientной экспрессии беталаина в 5,5 раз по сравнению с контролем. Такой эффект может объясняться тем, что экзогенный ацетосирингон стимулирует у *N. tabacum* генерацию активных форм кислорода – защитную реакцию против патогенных микроорганизмов, известную как «окислительный взрыв» [14]. Это соотносится с результатами, полученными другими исследователями. В работе, посвященной оптимизации трансформации растения *Withania coagulans*, авторы показали, что повышение концентрации ацетосирингона до 200 мкМ приводит к снижению эффективности

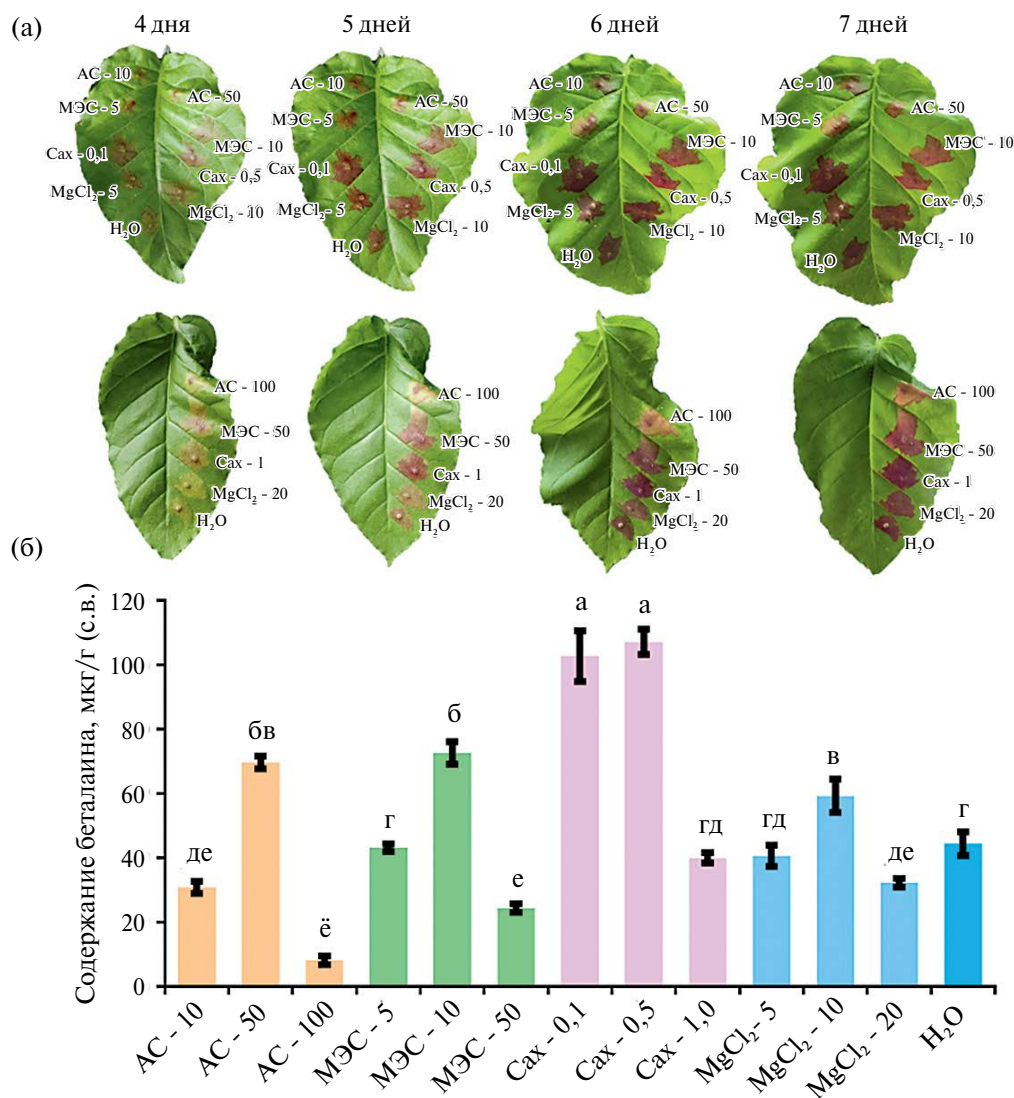


Рис. 2. Влияние состава инфильтрационного буфера и времени после агроинфльтрации на уровень биосинтеза беталаина в листьях табака. (а) — динамика интенсивности окраски участков листьев, инфильтрированных агробактериальной суспензией с добавлением различных компонентов буфера. Репрезентативные фотографии сделаны на 4-й, 5-й, 6-й и 7-й день после агроинфльтрации. Интенсивность окраски на 7-й день была максимальной. (б) — содержание беталаина в листьях табака на 7-й день после агроинфльтрации суспензией с различными вариантами компонентов раствора: ацетосирингон (АС – 10 – 10 мкМ; АС – 50 – 50 мкМ; АС – 100 – 100 мкМ), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (МЭС – 5 – 5 мМ; МЭС – 10 – 10 мМ; МЭС – 50 – 50 мМ), сахароза (Сах – 0,1 – 0,1%; Сах – 0,5 – 0,5%; Сах – 1,0 – 1%), хлорид магния (MgCl₂ – 5 – 5 мМ; MgCl₂ – 10 – 10 мМ; MgCl₂ – 20 – 20 мМ). В качестве контроля использовали суспензию бактериальных клеток, ресуспендированных в дистиллированной воде. Представлены средние значения и их стандартная ошибка; одинаковые символы указывают на отсутствие достоверных различий по тесту Фишера при уровне доверительного интервала $p < 0,05$. Все измерения проводили в трех биологических повторностях ($n=3$).

трансформации в 2,5 раза по сравнению с концентрацией в 50 мкМ [13]. При этом есть и исследования, результаты которых указывают на эффективность очень высоких (500 мкМ) концентраций ацетосирингона, например, для *N. benthamiana* [10].

Сопоставимый с ацетосирингоном эффект показал МЭС в концентрации 10 мМ (увеличение

концентрации беталаина в 1,6 раз). В нескольких исследованиях было показано, что одну из значимых ролей в агробактериальной трансформации играет pH среды, так как стабильный слабокислый pH увеличивает эффективность агробактериальной трансформации за счет подавления защитной реакции у растений [15]. При этом МЭС в концентрации выше 10-15 мМ чаще всего показывает

наилучший результат в средах для кокультивации агробактерий с эксплантами, но в составе буфера для агроинфильтрации лучшие результаты по экспрессии показаны для концентраций 5-10 мМ МЭС [16, 17].

Небольшое увеличение концентрации бета-лаина по сравнению с контролем оказал хлорид магния (в 1,3 раза). Роль двухвалентных ионов в агробактериальной трансформации достаточно слабо изучена. В исследовании 1985 года было показано, что двухвалентные ионы способствуют прикреплению агробактерий к клеткам *N. tabacum*, но особую роль в этом процессе могут играть ионы магния и марганца [18]. На основании полученных данных была составлена оптимальная композиция буфера для инфильтрации, который использовался на следующем этапе исследований: ацетосирингон, 50 мкМ; 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота, 10 мМ; сахараза, 0,5%; хлорид магния, 10 мМ.

Влияние способа инфильтрации агробактерий в листья на эффективность транзientной трансформации

Было изучено три способа введения бактериальной суспензии в контексте эффективности экспрессии бета-лаина. Первый — погружение в бактериальную суспензию и обработка вакуумом. Для второго и третьего способа листья прокалывали шприцевой иглой или игольчатым роллером соответственно, а затем погружали

в бактериальную суспензию и подвергали воздействию вакуума. При этом был использован полный буфер для агроинфильтрации, подобранный на предыдущем этапе, а бактерии в нем инкубировали 1 час при 28 °С перед введением в листья. Обнаружено, что эффективнее всего была обработка листьев роллером перед вакуумной инфильтрацией. При такой обработке наблюдалась наибольшая площадь трансформации, листья лучше сохраняли жизнеспособность, а наибольшее покраснение наблюдалось уже на 5-й день. Также этот способ занимает меньше времени по сравнению с нанесением единичных проколов. Меньшую эффективность показал способ нанесения редких проколов шприцевой иглой, поскольку наибольшее покраснение листьев было сопряжено с некрозом тканей. Способ обработки растений вакуумом без предварительного нанесения проколов оказался наименее эффективным, так как интенсивность выработки бета-лаина была низкой, а некроз листьев начался уже на 5-й день и с каждым следующим днем покрывал все большую площадь. Результаты количественного анализа содержания бета-лаина в листьях *N. tabacum* при использовании различных способов агроинфильтрации приведены на рисунке 3б. Наибольший уровень накопления пигмента наблюдался после предварительного прокалывания листьев игольчатым роллером с последующей вакуумной обработкой — 164 мкг/г свежей массы. Применение шприцевой иглы давало менее выраженный эффект — около 119 мкг/г свежей массы, тогда как

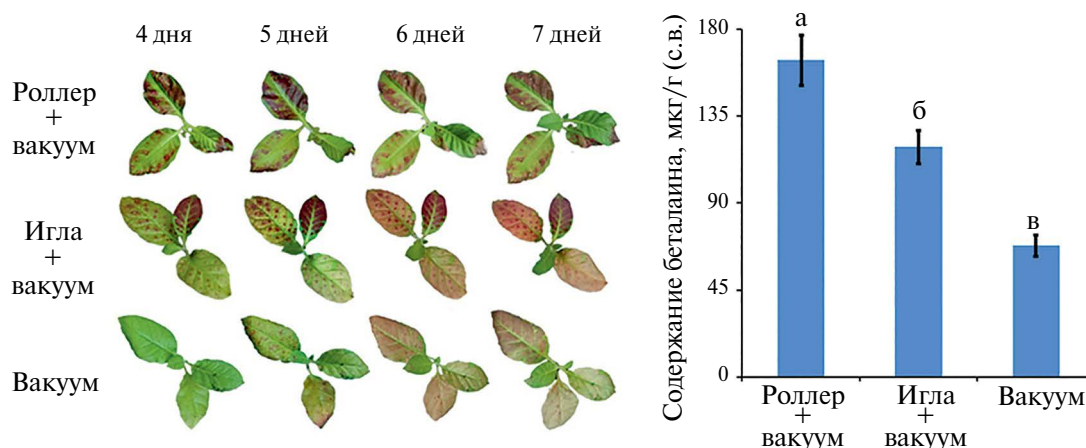


Рис. 3. Влияние способа введения бактериальной суспензии на эффективность агробактериальной транзientной трансформации листьев *N. tabacum*. (а) Результаты 3 разных способов введения: нанесение проколов на абаксиальной стороне листа с помощью игольчатого роллера с длиной иглы 0,5 мм, количество проколов 100 / см² с последующим погружением в бактериальную суспензию и обработку вакуумом; нанесение единичных редких проколов с последующим погружением в бактериальную суспензию и обработку вакуумом; вакуумная инфильтрация без предварительной обработки. (б) Количественное определение содержания бета-лаина в экстрактах вырубков из листьев, выполненных на 7-й день после агроинфильтрации. Представлены средние значения ± стандартная ошибка (SE); одинаковые символы указывают на отсутствие достоверных различий по тесту Фишера при уровне доверительного интервала $p < 0,05$. Все измерения проводили в трех биологических повторностях ($n=3$).

вакуумная инфильтрация без механического повреждения тканей обеспечивала минимальное количество беталаина (68 мкг/г свежей массы), что в 2,4 и 1,75 раза ниже по сравнению с обработкой роллером и иглой соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что микропрокалывание листовой поверхности существенно повышает проникновение бактериальной суспензии и уровень транзientной экспрессии, что подтверждается визуальными наблюдениями (рис. 3а).

В этом разделе не рассматривалась эффективность инфильтрации с помощью шприца без иглы, поскольку стабильность результатов в данном случае зависит от навыка человека, осуществляющего инфильтрацию, а также потому, что этот способ требует гораздо больше времени по сравнению с другими. Полученные результаты соотносятся с результатами другого исследования транзientной трансформации растений рода *Citrus*, в котором авторы отметили увеличение экспрессии, пропорциональное количеству нанесенных проколов [19]. Инфильтрация жидкости в апопласт листьев осуществляется через устьица, и для некоторых растений, например, для *N. benthamiana* [20], такой способ является достаточно эффективным. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что этот подход может быть нецелесообразным для других растений и требует модификаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе представлен оптимизированный, воспроизводимый и масштабируемый протокол агробактериальной транзientной экспрессии на модельном растении *N. tabacum* с использованием визуальной репортерной системы RUBY. Применение данного репортера позволило проводить мониторинг уровня экспрессии генов биосинтеза беталаина в реальном времени без применения сложных аналитических методов. Нами было установлено, что эффективность транзientной экспрессии определяется сочетанием нескольких факторов – концентрацией бактериальной суспензии, составом инфильтрационного буфера и способом ее введения в листовую ткань. Максимальные значения экспрессии достигались при использовании суспензии со значением $OD_{600} = 1,0$, буфера, содержащего ацетосирингон (50 мкМ), МЭС (10 мМ), сахарозу (0,5%) и хлорид магния (10 мМ), а также при предварительной обработке листьев игольчатым роллером с последующей вакуумной инфильтрацией. Полученные результаты позволяют повысить воспроизводимость и эффективность транзientной экспрессии и могут служить основой для стандартизации экспериментальных подходов в растительной биотехнологии.

Разработанный протокол может быть использован для функциональной характеристики генов, метаболической инженерии и задач биофарминга, включая быстрое получение рекомбинантных белков, ферментов и вакцин в растительных системах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012200181-4).

ВКЛАД АВТОРОВ

М.Р.С., Ю.А.Ю. и Ю.Н.Ш. разработали концепцию и план исследования. Ю.А.Ю., М.Р.С., А.И.Д. и А.А.С. провели эксперименты. М.Р.С., А.И.Д. и А.А.С. проанализировали полученные данные. Ю.Н.Ш. и В.П.Б. предоставили реагенты и аналитические инструменты. М.Р.С. и Ю.А.Ю. написали рукопись. Все авторы ознакомились с текстом рукописи и одобрили её окончательную версию.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weisberg A.J., Wu Y., Chang J.H., et al. Virulence and ecology of *Agrobacterium* in the context of evolutionary genomics // Annual Review of Phytopathology. 2023. Vol. 61. N1. P. 1-23.
2. Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S., et al. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants // Transgenic research. 1993. Vol. 2. N4. P. 208-218.
3. Li Y., Chen T., Wang W., et al. A high-efficiency *Agrobacterium*-mediated transient expression system in the leaves of *Artemisia annua* L. // Plant Methods. 2021. Vol. 17. N1. P. 106.
4. Chetty V.J., Ceballos N., Garcia D., et al. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom // Plant cell reports. 2013. Vol. 32. N2. P. 239-247.

5. Garabagi F., McLean M. D., Hall J.C. Transient and stable expression of antibodies in *Nicotiana* species // Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition. Totowa (NJ): Humana Press, 2012. P. 389–408.
6. He Y., Zhang T., Sun H., et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation // Horticulture research. 2020. Vol. 7.
7. Соколова Д.В. Динамические изменения содержания бетанина в столовой свекле в течение вегетационного периода: их взаимодействие с абиотическими факторами // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. Т. 26. №. 1. С. 30.
8. Kim M.J., Baek K., Park C.M. Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis* // Plant Cell Reports. 2009. Vol. 28. N8. P. 1159–1167.
9. Wroblewski T., Tomczak A., Micheltore R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis* // Plant biotechnology journal. 2005. Vol. 3. N2. P. 259–273.
10. Leth I.K., McDonald K.A. Media development for large scale *Agrobacterium tumefaciens* culture // Biotechnology Progress. 2017. Vol. 33. N5. P. 1218–1225.
11. Zhang Y., Chen M., Siemiatkowska B., et al. A highly efficient agrobacterium-mediated method for transient gene expression and functional studies in multiple plant species // Plant communications. 2020. Vol. 1. N5.
12. Engström P., Zambryski P., Van Montagu M., et al. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone // Journal of molecular biology. 1987. Vol. 197. N4. P. 635–645.
13. Mishra S., Sangwan R.S., Bansal S., et al. Efficient genetic transformation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal mediated by *Agrobacterium tumefaciens* from leaf explants of in vitro multiple shoot culture // Protoplasma. 2013. Vol. 250. N2. P. 451–458.
14. Baker C.J., Mock N.M., Whitaker B.D., et al. Involvement of acetosyringone in plant–pathogen recognition // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005. Vol. 328. N1. P. 130–136.
15. Wang Y.C., Yu M., Shih P.Y., et al. Stable pH suppresses defense signaling and is the key to enhance *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Arabidopsis* seedlings // Scientific reports. 2018. Vol. 8. N1. P. 17071.
16. Fang L.I., Na L.I., Yi L.I. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Citrus* // Journal of Integrative Agriculture. 2017. Vol. 16. N3. P. 572–579.
17. Erickson J.L., Ziegler J., Guevara D., et al. *Agrobacterium*-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. N1. P. 127.
18. Krens F.A., Molendijk L., Wullems G.J., et al. The role of bacterial attachment in the transformation of cell-wall-regenerating tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens* // Planta. 1985. Vol. 166. N3. P. 300–308.
19. Acanda Y., Welker S., Orbović V., et al. A simple and efficient agroinfiltration method for transient gene expression in *Citrus* // Plant Cell Reports. 2021. Vol. 40. N7. P. 1171–1179.
20. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins // Journal of visualized experiments: JoVE. 2013. N77. P. 50521.

COMPREHENSIVE OPTIMIZATION OF AGROINFILTRATION IN A TRANSIENT EXPRESSION SYSTEM ON *Nicotiana Tabacum* USING THE RUBY VISUAL REPORTER SYSTEM

**M. R. Sorokina, Y. A. Yugay, A. I. Degtyarenko, A. A. Sadykov, Y. N. Shkryl*,
Academician of the RAS V.P. Bulgakov**

*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity
of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

*e-mail: yn80@mail.ru

Agrobacterium-mediated transient expression is one of the most widely used tools in functional genomics and plant biotechnology; however, its efficiency and reproducibility depend on multiple factors. In this study, a comprehensive optimization of agroinfiltration conditions was carried out to enhance the expression level of betalain biosynthetic genes using the visual reporter system RUBY in the model plant *Nicotiana tabacum*. The effects of bacterial suspension concentration, infiltration buffer composition, and delivery method were evaluated. The highest expression efficiency was achieved with a suspension of $OD_{600} = 1.0$, using a buffer containing acetosyringone (50 μ M), MES (10 mM), sucrose (0.5%), and magnesium chloride (10 mM), combined with preliminary leaf micropuncturing by a needle roller followed by vacuum infiltration. The developed protocol significantly improves the efficiency of transient expression and can be applied for gene functional analysis, metabolic engineering, and the production of biopharmaceutical compounds in plants.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transient expression, RUBY, betalain, *Nicotiana tabacum*