

УДК 57.084.1

## ОПТИМИЗАЦИЯ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *Wolffia arrhiza*

© 2022 г. А. Н. Шведова<sup>1, \*</sup>, П. А. Хватков<sup>1, 2, \*</sup>, С. В. Долгов<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии” (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва, 127550 Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН” (ФГБУН НБС-ННЦ РАН), Ялта, 298648 Россия

<sup>3</sup>Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

\*e-mail: mntr2008@mail.ru

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 17.10.2022 г.

Растения семейства рясковые (*Lemna*, *Spirodela*) активно используют в качестве растительных экспрессионных платформ для производства рекомбинантных белков вследствие ряда преимуществ перед другими культурами (небольшие размеры растений, быстрое вегетативное размножение, высокое содержание белка в тканях). Перспективным растением-продуцентом из семейства Lemnaceae считается вольфия бескорневая (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm). Эффективность существующих на сегодняшний день протоколов трансформации вольфии бескорневой составляет примерно 0.36%. В результате проведенного исследования по транзientной экспрессии мы определили наиболее эффективный для трансформации *Wolffia arrhiza* агробактериальный штамм — ЕНА105. Подобранный оптимальный баланс регуляторов роста для использования на первом пассаже культивирования и селекции протрансформированных эксплантов: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота в концентрации 2.5 мг/л и 6-бензиламинопурин в концентрации 1.5 мг/л. Эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* составила 0.54%, что в 1.5 раза превышает таковую в известных протоколах.

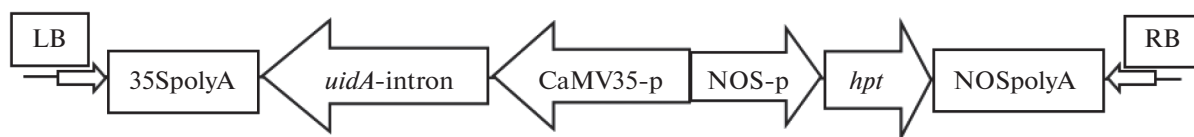
**Ключевые слова:** биофарминг, рекомбинантные белки, трансгенная ряска, агробактериальная трансформация, *Wolffia arrhiza*

DOI: 10.56304/S0234275822060126

Одно из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии — получение растений-продуцентов различных рекомбинантных белков человека и животных, имеющих медицинское и ветеринарное назначение [1–4]. Для производства белков используют различные системы экспрессии на основе бактерий, дрожжей, культур клеток насекомых и млекопитающих [5]. Экспрессионные системы на основе растений имеют существенные преимущества по сравнению с другими экспрессионными платформами с точки зрения скорости, стоимости, масштабируемости и безопасности производства [5, 6]. Кроме того, в клетках растений происходят важные посттрансляционные изменения в укладке белков, их транспортировке, стабильности и биологи-

ческой активности. Эти свойства важны в производстве лекарственных препаратов [5–7]. Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства Lemnaceae. Некоторые особенности рясковых, такие как высокая скорость прироста биомассы, высокое содержание белка в тканях, малый размер, позволяют считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков [8]. В 2000–2003 гг. были получены первые стабильные трансгенные линии растений рода *Lemna* (*L. gibba* и *L. minor*) с генами β-глюкозидазы (*uidA* (gus) — клонирован из *Escherichia coli*), гемоглобина Р (HbP), Р450-оксидазы, интерферона, гормона роста человека, Fab-фрагментов и моноклональных антител [8, 9]. Транзientная наработка рекомбинантных белков была продемонстрирована на видах *Wolffia australiana* и *Wolffia globosa* [10–13]. Стабильная трансформация

Сокращения: 2,4-D — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ВА — 6-бензиламинопурин; ШН — среда Шенка–Хильдебрандта; *uidA* (gus) — ген белка β-глюкозидазы *Escherichia coli*.



**Рис. 1.** Схематическое представление области Т-ДНК вектора pVec035. CaMV35-p – промотор 35S субъединицы вируса мозаики цветной капусты; uidA-intron – интронсодержащий ген β-глюкуронидазы (gus); NOSSpolyA – терминатор нопалинсинтазы; hpt – белкокодирующая последовательность гена гигромицинфосфотрансферазы; NOS-p – промотор нопалинсинтазы; 35SpolyA – терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты с сигналом полиаденилирования; LB, RB – соответственно левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК.

**Fig. 1.** Schematic presentation of the T-DNA region of pVec035. CaMV35-p – 35S RNA Cauliflower mosaic virus (CAMV) promoter; uidA-intron – intron-containing β-glucuronidase (gus) gene (uidA); NOSSpolyA – nopaline synthase terminator with polyadenylation signal; hpt – hygromycin phosphotransferase (HPT) coding sequence; NOS-p – nopaline synthase promoter; 35SpolyA – CaMV 35S terminator with polyadenylation signal; RB – right border, LB – left border.

вольфии (вид *W. arrhiza*) впервые была продемонстрирована Хватковым с соавт. в 2015 году [14]. В этих исследованиях были получены стабильные трансгенные линии, устойчивые к антибиотику гигромицину и содержащие ген uidA (gus), и продемонстрировано, что вольфия бескорневая может стать перспективным продуцентом чужеродных белков. Одна из важных особенностей растений рода *Wolffia* заключается в том, что в отличие от других представителей семейства Lemnoideae у них нет корневой системы. Это позволяет культивировать их глубинным способом в биореакторах в полностью контролируемых условиях, что может значительно повысить рентабельность производства рекомбинантных белков [15]. Наличие эффективного протокола трансформации служит важным показателем растительной экспрессионной системы. В работах Heenatigala с соавт. [4, 16] продемонстрирована стабильная трансформация *W. globosa* с эффективностью 0.14%. В работах Хваткова эффективность трансформации *W. arrhiza* достигала 0.36% [14, 17, 18]. Таким образом, в этих работах эффективность стабильной агробактериальной трансформации растений рода *Wolffia* была невысокой, поэтому и предпринимаются попытки оптимизировать существующие протоколы.

В задачи проведенного нами исследования входило повышение эффективности протокола агробактериальной трансформации и получение стабильных трансгенных линий *Wolffia arrhiza*.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Растительный материал*

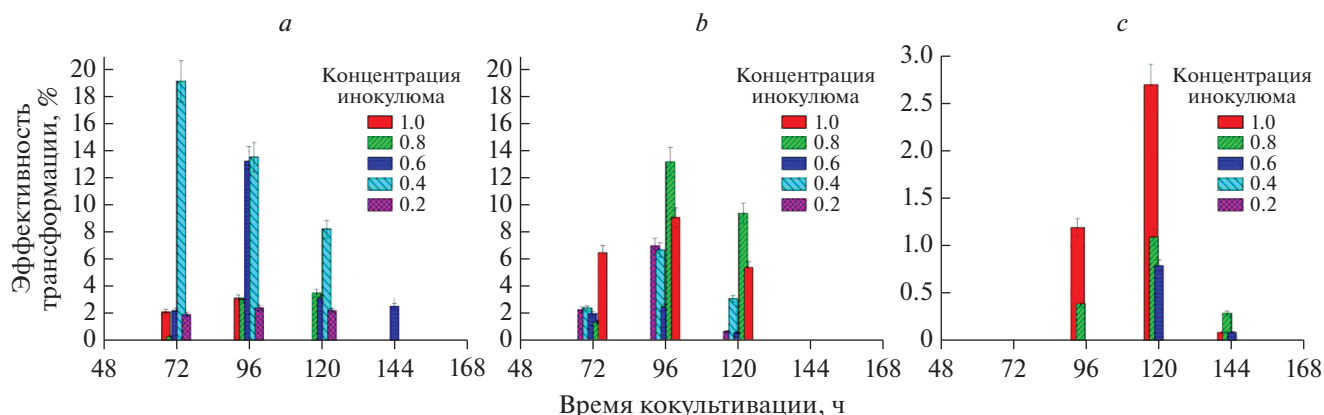
В экспериментах по агробактериальной трансформации были использованы кластерные структуры вольфии (RDSC Clone *Wolffia* 5564), полученные в ходе 4-месячной прекультивации растений на агаризованной среде Шенка–Хильдебрандта (SH) [19], содержащей 1% маннитола, 1% сорбитола, 2% глюкозы в качестве источников углерода, а также 5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) и 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БА). Эксплан-

ты культивировали при 16-часовом фотопериоде с интенсивностью света 32 Вт/м<sup>2</sup> при 21 ± 1 °С.

### *Транзиентная трансформация*

Для проведения экспериментов по оптимизации генетической трансформации вольфии использовали три супервирулентных штамма *Agrobacterium tumefaciens*: ЕНА105 [20], СВЕ21 [21] и Agl0 [22], – содержащие конструкцию pVec035, в состав которой входит интронсодержащий ген β-глюкуронидазы *Escherichia coli* (uidA) (рис. 1).

Всего в экспериментах по транзиентной трансформации было задействовано 3750 эксплантов. Для трансформации использовали ночную культуру каждого штамма агробактерии, выращенную в шейкере-инкубаторе (180 об/мин) в течение 24 ч при 28 °С в темноте в 50 мл жидкой среды YEP, дополненной соответствующими селективными антибиотиками: 100 мг/л канамицина (Km) для всех штаммов, совместно с 5 мг/л гигромицина (Hyg) для штамма СВЕ21 или 50 мг/л рифампицина (Rif) для штаммов ЕНА105 и Agl0. Для инокуляции эксплантов использовали агробактериальные суспензии, разведенные стерильной дистиллированной водой до оптической плотности при длине волны 600 нм (OD<sub>600</sub>) в диапазоне 0.2–1.0 с шагом 0.2 единицы (т.е. 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0). В колбу объемом 250 мл помещали 20 г растительного материала и добавляли 150 мл бактериальной суспензии. Экспланты выдерживали в течение 30 мин на орбитальном шейкере (90 об/мин) и помещали для кокультивации на чашки Петри с безгормональной средой SH и размещенными на поверхности среды бумажными фильтрами. Кокультивацию эксплантов проводили на свету при 21 °С. Пробы для гистохимического анализа отбирали каждые сутки (в трехкратных повторах для каждого варианта эксперимента) в течение последующих 6 сут кокультивации (24, 48, 72, 96, 120, 148 ч).



**Рис. 2.** Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии в зависимости от штамма агробактерии: ЕНА105 (а), СВЕ21 (b), Аgl0 (с). Концентрации инокулюма указаны в оптических единицах при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ). Гистохимический анализ проведен по методике R. Jefferson [23].

**Fig. 2.** Efficiency of transient expression gene *uidA* in *Wolffia* explant tissues depending on the *Agrobacterium* strain: ЕНА105 (a), СВЕ21 (b), Аgl0 (c). Inoculum concentrations are given in units of optical density at a wavelength of 600 nm ( $OD_{600}$ ). Histochemical analysis was carried out according to the method R. Jefferson [23].

### Гистохимический анализ

Гистохимическое окрашивание на продукт экспрессии гена *uidA* проводили по методике Джефферсона [23]. Образцы растений подвергали вакуумной инфльтрации с 0.1% X-Gluc (циклогексиламмониевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты; Thermo Fisher Scientific, США) в 100 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 0.2 М  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.2 М  $Na_2HPO_4$ , pH 7.0, 10 мМ ЭДТА, 0.1% Тритон X-100 и 10 мМ  $KFe(CN)_6$  (0.1 М  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.1 М  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ), и инкубировали в темноте в течение 18 ч при 37°C. Далее растения отмывали в 80%-ном этаноле.

Эффективность трансформации ( $E$ ) рассчитывали как частное от деления числа точек транзientной экспрессии ( $N_e$ ) на общее число эксплантов в варианте ( $N_o$ ), результат выражали в процентах (%):  $E = (N_e/N_o) \times 100$  (рис. 2).

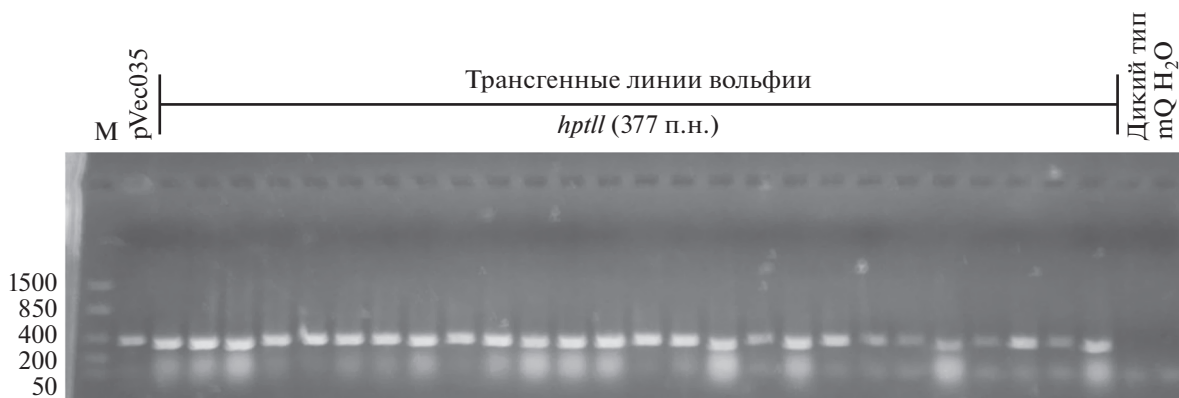
### Стабильная трансформация

В эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4-D и ВА (2,4-D в концентрациях 0.5–2.5 мг/л с шагом 0.5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0.5–2.5 мг/л с шагом 0.5 мг/л) в трех повторах. Итого было задействовано около 1600 эксплантов с использованием 65 чашек Петри в каждом повторе. Трансформацию проводили инокулюмом агробактериального штамма ЕНА105 ( $OD_{600} = 0.4$ ), содержащим конструкцию с геном устойчивости к гигромицину (*hptII*). Для оптимизации условий культивирования трансформированных эксплантов использовали среду SH с добавлением 100 мг/л тиментина для элиминации агробактерии и 5 мг/л гигромицина для селекции трансгенной ткани.

Первый пассаж, через 2 недели после трансформации, проводили на средах с добавлением 2,4-D и ВА, затем экспланты культивировали на безгормональной среде SH с добавлением соответствующих антибиотиков. Все растения, сформировавшиеся на одной чашке Петри, принимались за одну трансгенную популяцию. Для подтверждения, что полученная гигромицинустойчивая популяция представлена одной клоновой линией, из каждой популяции случайным образом отбирали три единичных растения, которые в дальнейшем формировали изолированные самостоятельные популяции в присутствии селективного антибиотика в культивационной среде. Через один месяц для ПЦР-анализа из трех изолятов отбирали тот, который сформировал наибольшую биомассу. Эффективность трансформации рассчитывали, как указано выше для транзientной экспрессии, используя вместо числа точек число эксплантов, сформировавших трансгенные популяции, и общее число эксплантов в эксперименте.

### ПЦР-анализ

Геномную ДНК *Wolffia* выделяли из трансформированных и нетрансформированных растений по методике S. Dellaporta и др. [24]. Для проведения ПЦР использовали следующие пары праймеров для гена *hptII*: 5'-ACATTGTTGGAGC-CGAAATC-3' (прямой) и 5'-GACATTGGG-GAGTTTACCGA-3' (обратный); – и для гена *virC*: 5'-GCASTATCTACCTACCGCTACGTCATC-3' (*virC1*) и 5'-GTTGTTCGATCGGGACTGTAAATGTG-3' (*virC2*). Объем ПЦР смеси составлял 25 мкл и содержал 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера, 0.5 мкл 10 мМ dNTPs, по 1 мкл 10 пкМ пары праймеров, 1 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы, 17 мкл



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов гигромицинустойчивых регенерантов вольфии. М – маркер длин ДНК FastRuler™ Low Range DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, США); Дикий тип – образец ДНК нетрансгенного растения; mQ H<sub>2</sub>O – отрицательный контроль для проверки чистоты реактивов.

**Fig. 3.** Electrophoretic analysis of PCR products of hygromycin-resistant regenerants of wolffia. M – DNA length marker FastRuler™ Low Range DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); Wild type – a DNA sample of a non-transgenic plant; mQ H<sub>2</sub>O is a negative control to check the purity of reagents.

mQ H<sub>2</sub>O и 2 мкл (~60 нг) ДНК-матрицы образца. ПЦР проводили в амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в следующем режиме: 5 мин при 95°C, затем 35 циклов (45 с при 93°C, 45 с при 60°C, 45 с при 72°C) и 5 мин при 72°C. ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле.

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением частных средних и оценки их по критерию Дункана (<https://www.statisticshowto.com/duncans-multiple-range-test/>) с использованием программы AGROS (разработчик д.б.н. Мартынов С.П.) [25]

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность использования вольфии как растительной экспрессионной платформы для биофарминга требует не только исследования ее потенциала каллусогенеза и регенерации [13, 26], но и подбора условий для эффективной агробактериальной трансформации. Для этого мы сначала провели оптимизацию условий транзиторной трансформации. Установлено, что после инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0.4 (OD<sub>600</sub>) через 72 ч кокультивации эффективность транзиторной экспрессии была максимальной – на уровне 19% (рис. 2а). При использовании штамма СВЕ21 наибольшая эффективность транзиторной экспрессии была отмечена при использовании инокулюма с оптической плотностью 0.8 (OD<sub>600</sub>) через

4 суток кокультивации. В этом варианте эффективность трансформации составила 14% (рис. 2б). После кокультивирования эксплантов со штаммом Agl0 с оптической плотностью 1.0 (OD<sub>600</sub>) эффективность транзиторной экспрессии не превышала 3% (рис. 2с).

Теперь мы провели детальное исследование влияния регуляторов роста в течение первых двух недель селекции и культивирования эксплантов на эффективность трансформации вольфии. В результате трансформации около 40 тыс. эксплантов было получено 47 независимых гигромицинустойчивых линий вольфии. ПЦР-анализ выявил наличие последовательности гена *hptII* во всех линиях, контаминации генами *vir*-группы не обнаружено (рис. 3).

Ранее нам неоднократно удавалось получать трансгенные популяции вольфии с интеграцией в геном различных векторных конструкций [14, 17, 18], хотя эффективность трансформации не превышала 0.4%. Нами было показано, что для успешной трансформации вольфии бескорневой необходимо присутствие в среде 2.5 мг/л 2,4-D совместно с 1.5 мг/л ВА (табл. 1). Предпочтительное время культивирования эксплантов на среде с добавлением регуляторов роста составляет не более двух недель [26].

В табл. 1 представлены результаты распределения величин наблюдаемых средних. Анализ представленных данных эффективности трансформации вольфии в присутствии в среде регуляторов роста (2,4-D и ВА) проводили с использованием критерия Дункана в программе AGROS [25]. Как видно из представленных результатов, распределение величин, отличалось от нормального. Так, при увеличении концентрации 2,4-D с 1.0

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций 2,4-D и ВА, а также их комбинаций на эффективность трансформации *Wolffia arrhiza***Table 1.** Influence of various concentrations of 2,4-D and BA, and their combinations on the efficiency of *Wolffia arrhiza* transformation

Эффективность трансформации*, %						
концентрация 2,4-D, мг/л	концентрация ВА, мг/л					среднее
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	
0.5	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0
1.0	0.0 a	0.37 lm	0.08 cdef	0.10 defg	0.0 a	0.14
1.5	0.0 a	0.32 ijklm	0.11 efg	0.17 fghi	0.0 a	0.15
2.0	0.0 a	0.28 hijklm	0.21 ghijklm	0.36 jklm	0.0 a	0.21
2.5	0.0 a	0.05 bcde	<b>0.54 m</b>	0.37 klm	0.0 a	0.24
Среднее	0.0	0.20	0.19	0.20	0.0	

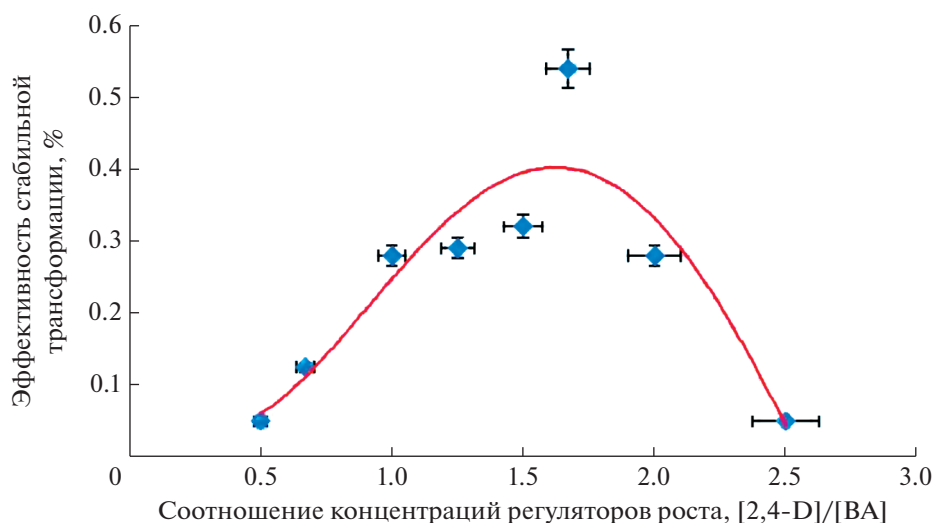
\* *Примечание:* Различные буквы указывают на достоверную принадлежность данных к отдельному (в случае присвоения одной буквы) или множественному (в случае присвоения нескольких букв) кластеру согласно методике Дункана. Среднее – среднее значение эффективности трансформации по содержанию 2,4-D и ВА соответственно.

\* *Note:* Various letters indicate the reliable belonging of the data to a single (in the case of assigning one letter) or multiple (in the case of assigning several letters) cluster according to the Duncan multiple range test. Average – the average value of the transformation efficiency in terms of the content of 2,4-D and BA, respectively.

до 2.0 мг/л в присутствии 1.0 мг/л ВА эффективность трансформации была одинаковой, а при 2.5 мг/л 2,4-D снижалась, в то время как в присутствии 1.5 мг/л ВА неизменно повышалась – вплоть до 2.5 мг/л 2,4-D. В присутствии 2.0 мг/л ВА эффективность трансформации повышалась при увеличении концентрации 2,4-D с 1.0 до 2.0 мг/л, но дальше оставалась неизменной. Средние же показатели влияния ВА в результативных вариантах (в концентрациях 1.0, 1.5 и 2.0 мг/л) на эффективность трансформации вольфии статистически достоверными отличиями не облада-

ли и составляли 0.2%. Средние показатели влияния 2,4-D на эффективность трансформации вольфии в результативных вариантах (1.0, 1.5, 2.0 и 2.5 мг/л) росли по мере увеличения концентрации этого регулятора роста, хотя четкой зависимости между вариантами не выявлено.

Анализ показал, что кластеру **m** (кластер родственных выборок в нашем исследовании, согласно критерию Дункана) принадлежит 7 из 12 результативных вариантов комбинаций регуляторов роста. На основе этих данных мы предполо-

**Рис. 4.** Влияние соотношения концентраций регуляторов роста ([2,4-D]/[BA]) на эффективность стабильной трансформации *Wolffia arrhiza*.**Fig. 4.** Influence of the concentration ratio of growth regulators ([2,4-D]/[BA]) on the efficiency of stable transformation of *Wolffia arrhiza*.

жили, что для эффективной трансформации важна не столько концентрация каждого регулятора роста, как их баланс (соотношение) в среде для культивирования эксплантов. В результате анализа вариантов по показателю отношения [2,4-D]/[ВА] установлено, что наибольшую эффективность стабильной трансформации вольфии статистически достоверно регистрировали при соотношении 1.67 (рис. 4). Таким образом, максимальная эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* составила 0.54% при использовании для селекции и культивирования инокулированных эксплантов на первом пассаже среды SH с 2.5 мг/л 2,4-D и 1.5 мг/л ВА.

Проведенные исследования по изучению факторов, влияющих на трансформацию *Wolffia arrhiza*, показали, что наиболее эффективно для инокуляции использовать агробактериальный супервирулентный штамм ЕНА105 с оптической плотностью 0.4 (OD<sub>600</sub>). Это позволяет добиться эффективности транзientной трансформации вольфии на уровне 19% через трое суток кокультивации эксплантов с агробактерией. Наибольшей эффективностью стабильной трансформации вольфии на уровне 0.54% можно добиться, используя на первом пассаже среду SH с 2.5 мг/л 2,4-D и 1.5 мг/л ВА. В ходе работы показано, что для эффективной стабильной трансформации наиболее важен именно баланс (соотношение) указанных гормонов в среде для культивирования эксплантов. В результате проведенного исследования эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола [14, 17, 18] удалось повысить в 1.5 раза (с 0.36 до 0.54%). В дальнейших исследованиях мы продолжим работу по оптимизации протокола трансформации *Wolffia arrhiza* или поиску альтернативных вариантов для повышения эффективности получения трансгенных линий этого растения.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rader R.A., Langer E.S. Biopharmaceutical manufacturing: historical and future trends in titers, yields, and efficiency in commercial-scale bioprocessing. *J. BioProcess*, 2015, 13(4), 47–54. <https://doi.org/10.12665/J134.Langer>
2. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
3. Sysuev B.B., Pokrovskaya J.S. Recombinant microorganisms and cell culture in the technology of protein preparations. *Dev. Registr. Drugs*, 2015, 4, 96–109.
4. Heenatigala P.P.M., Sun Z., Yang J., Zhao X., Hou H. Expression of LamB vaccine antigen in *Wolffia globosa* (duckweed) against fish vibriosis. *Front. Immunol.*, 2020, 11, 1857. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01857>
5. Савельева Н.В., Бурлаковский М.С., Емельянов В.В., Лутова Л.А. Трансгенные растения-производители веществ медицинского и ветеринарного назначения. *Экологическая генетика*, 2015, 13(2), 2015, 77–99. <https://doi.org/10.17816/ecogen13277-99>
6. Dubey K.K., Luke G.A., Knox C., Kumar P., Pletschke B.I., Singh P.K., Shukla P. Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. *Brief. Funct. Genomics*, 2018, 17(5), 295–307. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely020>
7. Schillberg S., Finnern R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins – critical evaluation of achievements and future challenges. *Plant Physiol.*, 2021, 258–259. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153359>
8. Stomp A.M., Rajbhandari N. Genetically engineered duckweed. Patent US6040498, Publ. 21.03.2000. <https://www.freepatentsonline.com/6040498.html>
9. Gasdaska J.R., Spenser D., Dickey L. Advantages of the therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna*. *BioProcess J.*, 2003, 2, 49–56. <https://doi.org/10.12665/J22.Gasdaska>
10. Boehm R., Kruse C., Veste D., Barth S., Schnabl H. A transient transformation system for duckweed *Wolffia columbiana* using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *J. Appl. Bot.*, 2001, 75, 107–111.
11. Kruse C., Boehm R., Veste D., Barth S., Schnabl H. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment. *Aquat. Bot.*, 2002, 72, 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00219-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00219-4)
12. Friedrich A.S. Transformation und fermentation von *Wolffia spec.* Dissertation, Untersuchungen zu Kultivierung, 2005. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5N-06052>
13. Pham T.L.T., Nguyen H.A., Pham T.H., Nguyen T.H., Le H.H. Improvement of transformation procedure into duckweed (*Wolffia sp.*) via *Agrobacterium tumefaciens*. *Tapchi' Congnghe Sinhhoc*, 2010, 8, 53–60 (in Vietnam).
14. Khvatkov P., Chernobrovkina M., Okuneva A., Pushin A., Dolgov S. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2015, 123, 299–307. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0834-z>
15. Хватков П.А., Чернобровкина М.А., Синев В.В., Долгов С.В. Изучение условий глубинного культивирования вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm) в модифицированном биореакторе. *Биотехнология*, 2013, 6, 51–56.
16. Heenatigala P.P.M., Yang J., Bishopp A., Sun Z., Li G., Kumar S., Hu S., Wu Z., Lin W., Yao L., Duan P., Hou H. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia globosa* using *Agrobacterium*. *Front. Chem.*, 2018, 6, 227. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00227>
17. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Shaloiko L., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Tarasenko I., Chaban I., Dolgov S. Development of *Wolffia arrhiza* as a producer for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Front. Chem.*, 2018, 6, 304. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304>

18. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Shaloiko L., Dolgov S. *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin. *3 Biotech*, 2021, 11, 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02762-3>
19. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 1972, 50, 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
20. Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S., Hoekema A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen. Res.*, 1993, 2, 208–218. <https://doi.org/10.1007/BF01977351>
21. Bagyan I.L., Revenkova E.V., Pozmogova G.E., Kraev A.S., Skryabin K.G. 5'-Regulatory region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b directs organ-specific, wound-inducible and auxin-inducible expression in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 29, 1299–1304. <https://doi.org/10.1007/BF00020470>
22. Lazo G.R., Stain P.A., Ludwig R.A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nat. Biotechnol.*, 1991, 9, 963–967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
23. Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D.  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8447–8451. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.84>
24. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1983, 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
25. Мартынов С.П. Пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции. Тверь, 1999.
26. Khvatkov P., Chernobrovkina M., Okuneva A., Shvedova A., Chaban I., Dolgov S. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2015, 120, 263–273. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0603-4>

## Optimization of Factors Affecting the Efficiency of *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Wolffia arrhiza*

A. N. Shvedova<sup>a, #</sup>, P. A. Khvatkov<sup>a, b</sup>, and S. V. Dolgov<sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

<sup>b</sup>Nikitsky Botanical Gardens National Scientific Center, Yalta, 298648 Russia

<sup>c</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Pushchino, 142290 Russia

<sup>#</sup>e-mail: mntr2008@mail.ru

**Abstract**—Plants of the duckweed family (*Lemna*, *Spirodela*) are actively used as expression platforms for the production of recombinant proteins due to a number of their advantages over other crops (small size, rapid vegetative reproduction and high protein content in tissues). Rootless *Wolffia* (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm) is a promising producer from the Lemnaceae family. Current *Wolffia* transformation protocols have an efficiency of approximately 0.36%. Based on transient expression, we have identified the most efficient *Agrobacterium* strain, EHA105, for the *Wolffia arrhiza* transformation. An effective balance of growth regulators was selected for use at the first passage of cultivation and selection of pro-transformed explants: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – 2.5 mg/L and 6-benzylaminopurine – 1.5 mg/L. The transformation efficiency of *Wolffia arrhiza* was 0.54%, which is 1.5 times higher than in known protocols.

**Keywords:** biopharming, recombinant proteins, transgenic duckweed, *Agrobacterium*-mediated transformation, *Wolffia arrhiza*