

СЛИВКА Л. В., ДУБРОВНА О. В.✉

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

✉ dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ
ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ МЕТОДОМ *IN PLANTA*

Мета. Оптимізація умов та проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) методом *in planta*. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація методом *in planta* за використання штаму AGL0 та векторної конструкції pVi-OAT. **Результати.** Досліджено вплив температури повітря, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії, доби інокуляції та складу інокуляційного середовища на частоту отримання трансгенних рослин нових перспективних генотипів озимої пшениці. Виявлено, що температурний режим 20–22 °С забезпечив отримання найбільшої кількості (4,4 %) трансформантів пшениці, а за зниження температури до 16–18 °С відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном і спостерігається найменша частота трансформації. **Висновки.** Найбільшу кількість трансформантів отримано за використання інокуляційного середовища без сахарози, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,4 оп. од. та інокуляції на третю добу після кастрації колосів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, ген орнітин- δ -амінотрансферази.

Основою сучасного сільськогосподарського виробництва є створення високопродуктивних сортів та гібридів із підвищеною стійкістю до посухи, екстремальних температур та засолення – основних абіотичних стресів, які негативно впливають на ріст, розвиток і продуктивність рослин. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією за рахунок впровадження, зокрема і новітніх досягнень біотехнології. Це, насамперед, розроблення нових технологій селекційного процесу на основі вдалого поєднання класичних методів селекції і досягнень генної інженерії. Роботи з генетичної трансформації різних видів *Triticum*

проводяться в багатьох лабораторіях світу з використанням різних методів, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [1, 2]. Одним із підходів для здійснення переносу агробактеріальної Т-ДНК в однодольні рослини є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, який використовується через такі переваги, як проста інтеграція, менша трудомісткість і економічна ефективність. Цей метод генетичної трансформації на сьогодні успішно використовується у різних сільськогосподарських культурах, у тому числі і пшениці [3, 4]. Проте використання цього методу ускладнене тим, що для його ефективного застосування наявні методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом.

В останній час інтенсивно почали розроблятися новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання генотипів, стійких до несприятливих умов довкілля, шляхом інтеграції в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси адаптації / стійкості. Значна увага приділяється розробці нового напрямку метаболічної інженерії, який пов'язаний з ідентифікацією та аналізом структурних генів, що контролюють, зокрема, синтез та катаболізм проліну [5, 6]. Ген орнітин- δ -амінотрансферази кодує фермент (OAT, КФ 2.6.1.13), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (P5CS) та глутамату [7]. Ця реакція є частиною системи взаємоперетворень таких амінокислот, як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний із фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресів, регуляцією процесів розвитку [8, 9]. Окремі дані вказують на участь гена *oat* в ряді інших життєво важливих клітинних проце-

сів [10]. Потенційно ОАТ може бути важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну і шлях біосинтезу поліамінів. Введення екзогенного гена орнітин- δ -амінотрансферази в геном пшениці є одним з перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Встановлено, що його надекспресія підвищувала рівень стійкості трансгенних рослин до водного дефіциту та засолення [11, 12]. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання генетично-модифікованих рослин із гетерологічним геном орнітин- δ -амінотрансферази.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (Ук 065; Ук095/17; Ук 209h; Ук 322/17). Використовували штам виду *Agrobacterium tumefaciens* – AGL0, що містить бінарний вектор pBi-OAT із цільовим геном орнітин- δ -амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний – неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Ця конструкція люб'язно надана чл.-кор. РАН, д. б. н. Кочетовим А. В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження шляхом інокуляції кастрованих суцвіть. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка, середня довжина колосу складала 6,2 см. До початку цвітіння проводили кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування.

Інокуляцію суспензією агробактерій проводили через три-п'ять діб після кастрації. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* готували за методикою Сидорова [13]. Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л за 150 об/хв та 26 °С, в темряві на шейкері. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням за 3500 об/хв протягом

15 хв, ресуспендували в індукційному середовищі з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували за 3500 об/хв протягом 15 хв та ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке готували на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей із додаванням 200 мкМ ацетосирінгону та доводили до оптичної щільності $OD_{660} = 0,4-0,8$. До суспензії бактерій додавали 0,05 % Silvet L77, рН доводили до 4,0. Через три-п'ять діб після кастрації проводили інокуляцію суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилом, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини.

На стадії повної зрілості зерна колоси зрізали і підраховували кількість отриманого насіння. Частину насіння пророщували та у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК та виявлення послідовностей трансгенів. Молекулярно-генетичний аналіз рослин здійснювали ПЛР-методом. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили із використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводилася на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакційні суміші включали: специфічні праймери, 2 мкл буфера для ПЛР 10×DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ кожного дезоксирибознуклеозидтрифосфату (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Наявність гена *oat* визначали з використанням праймерів 5'-CAGTGCCCAATT-ACCATCC-3' (RTF) та 5'-CGAACTTCTTCCCAATCACAAGCCA-3' (RTR). Очікувана довжина амплікону становить 708 п. н.

Результати та обговорення

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* залежить від багатьох факторів, зокрема температури, за якої проводять трансформацію, складу середовища для інокуляції, щільності клітин агробактеріальної суспензії, використання індукторів генів вірулентності, штаму агробактерій, типу векто-

рної конструкції [14]. Значний вплив на частоту утворення трансформантів має температурний режим. Температура, за якої зазвичай проводять інокуляцію *Agrobacterium*, коливається в діапазоні від 22 °С до 26 °С, проте встановлено, що температура 18–20 °С є більш сприятливою для перенесення Т-ДНК у геном злаків [15].

Нами було проведено серію експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці за різних температурних режимів (рис. 1). Для різних генотипів за використання штаму AGL0 з векторною конструкцією pVi-OAT найбільша частота трансформації спостерігалася за температури 20–22 °С, а найменшу кількість трансформантів отримано за температури 16–18 °С. За температури 25–27 °С частота трансформації була значно вищою порівняно з температурою 16–18 °С.

Між досліджуваними нами генотипами виявлена достовірна різниця за показником зав'язування насіння. Найбільший відсоток його утворення (36 %) був отриманий у генотипу Ук209h, а найменша кількість (7 %) – Ук065. Показник зав'язування насіння після трансформації у генотипу Ук 209/17 в середньому становив 7,1 насінин на колос. За температури 25–27 °С зав'язування насіння було вдвічі вищим порівняно з температурою 16–18 °С. При цьому кількість отриманих зернівок із колоса за трансформації *in planta* була значно нижчою порівняно з нетрансформованим контролем, що свідчить про негативний вплив *A. tumefaciens* та примусового запилення на запліднення у пшениці.

Нами проаналізований вплив концентрації сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації у різних генотипах пшениці. У наших дослідженнях частота трансформації у варіантах із додаванням сахарози була достовірно нижчою (рис. 2).

Під час застосування сахарози отримане насіння менш виповнене, ніж у варіанті без сахарози та контролі. На наш погляд, отриманий результат можна пояснити тим, що сахароза є хорошим субстратом для розвитку сапрофітної мікрофлори, що заважає нормальному процесу запилення та запліднення.

У ході дослідження нами застосовувалися інокуляційні середовища з різною оптичною щільністю клітин агробактерій: 0, 4; 0,6 та 0,8 оп. од., що готували на основі рідкого середовища МС без сахарози (рис. 3). *Agrobacterium* є агресивним патогеном, тому нанесення навіть невірулентних штамів зазвичай призводить до пригнічення росту і розвитку зав'язі. Виявлено, що найвища частота утворення трансформантів спостерігалася за оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,4 оп. од. За збільшення концентрації клітин агробактерій в інокуляційному середовищі до 0,8 оп. од. частота трансформантів достовірно зменшувалася, що, можливо, зумовлено негативною дією агробактерій на рослинні клітини.

Час нанесення суспензії агробактеріальних клітин на кастровані суцвіття також є важливим фактором трансформації в умовах *in planta*. Нами з'ясовано, що більш оптимальним часом інокуляції колосів є третя доба після кастрації порівняно з п'ятою (рис. 4).

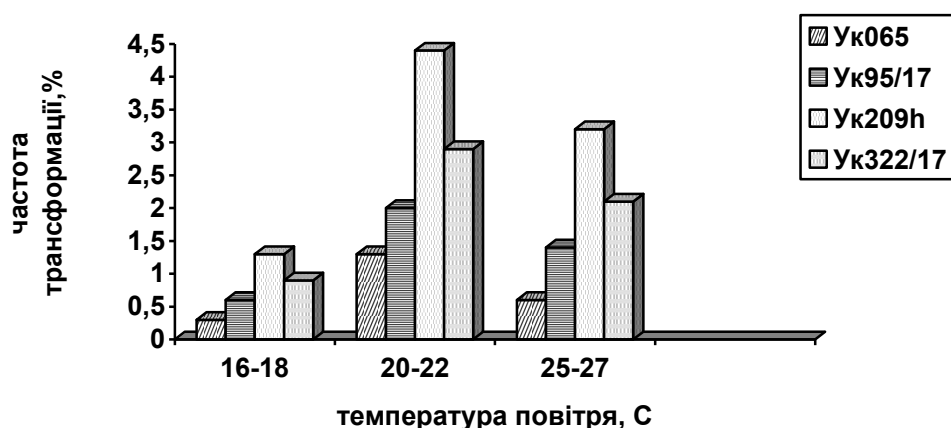


Рис. 1. Вплив температури повітря на частоту трансформації різних генотипів озимої пшениці.

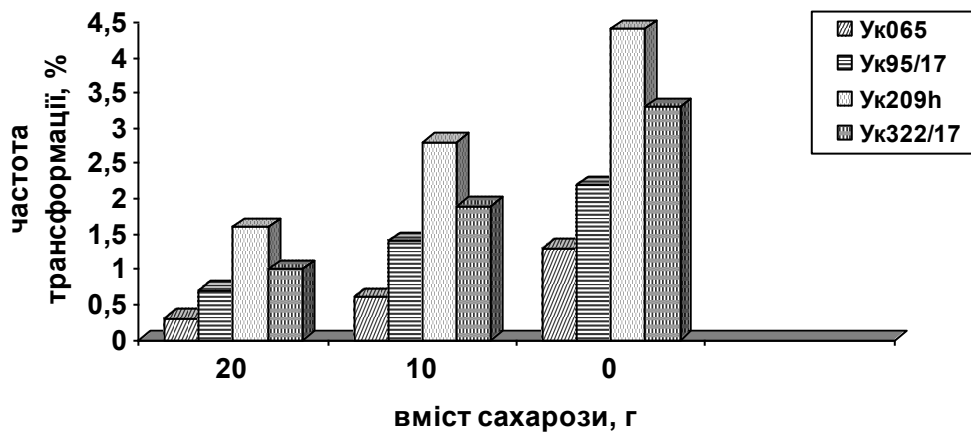


Рис. 2. Вплив вмісту сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації різних генотипів озимої пшениці.

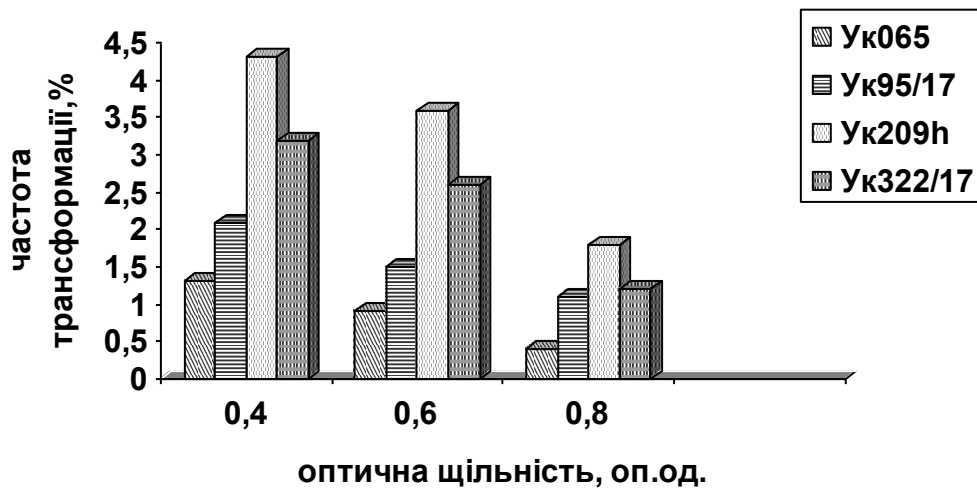


Рис. 3. Частота трансформації різних генотипів озимої пшениці залежно від оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії.

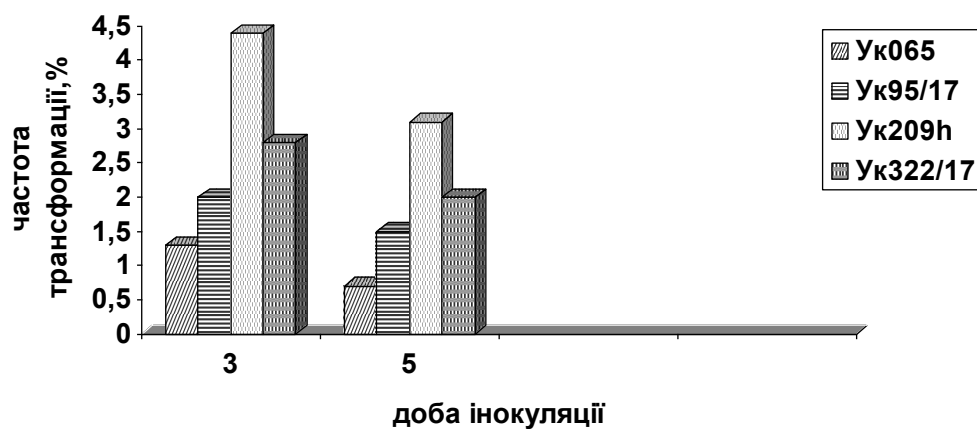


Рис. 4. Частота трансформації різних генотипів озимої пшениці залежно від доби інокуляції.

Згідно з оптимізованим протоколом була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці. У фазу повної стиглості зерна збирали насіння T_0 . Із рослин T_0 шляхом самозапилення було одержано насінневе покоління T_1 . Зібране насіння T_1 висаджували в стаканчики з ґрунтосумішшю та проводили первинну селекцію відібраних зразків. Частину листків двотижневих проростків виокремлювали і висаджували на чашки Петрі з поживним середовищем МС-131, доповненим селективною концентрацією канаміцину сульфату (100 мг/л). Стійкими до канаміцину вважали рослини, листкові диски яких залишалися зеленими на селективному середовищі, а нестійкими – які поступово ставали жовто-білими. Для молекулярно-генетичного аналізу використовували рослини, відібрані за первинної селекції.

Оскільки генетична конструкція рВі-ОАТ, якою трансформували рослини, містить цільовий ген *oat*, то за допомогою ПЛР було проведено визначення присутності послідовності цього трансгена в рослинах (рис. 5).

Молекулярно-генетичний аналіз (рис. 5) із використанням специфічних праймерів до гена *oat* підтвердив перенесення та вбудовування цільового гена в геном пшениці. Частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих) отриманих методом *in planta* за вико-

ристання конструкції рВі-ОАТ була на рівні 1,3–4,4 %. Найбільшу кількість трансформантів виявлено у генотипу озимої пшениці Ук 209h, а найменшу – Ук065.

Висновки

Оптимізовано умови проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці (*T. aestivum* L.) методом *in planta* за використання штаму AGL0 та векторної конструкції рВі-ОАТ. Встановлено залежність частоти отримання трансгенних рослин від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму. З'ясовано, що оптимальним температурним діапазоном є 20–22 °С. Такий температурний режим сприяє найбільшій частоті зав'язування насіння та отримання трансформантів. За зниження температури або її підвищення спостерігається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Виявлено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту отримання трансгенних рослин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta*. Найбільшу кількість трансформантів отримано за використання інокуляційного середовища без сахарози, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,4 оп. од. та інокуляції на третю добу після кастрації колосів.

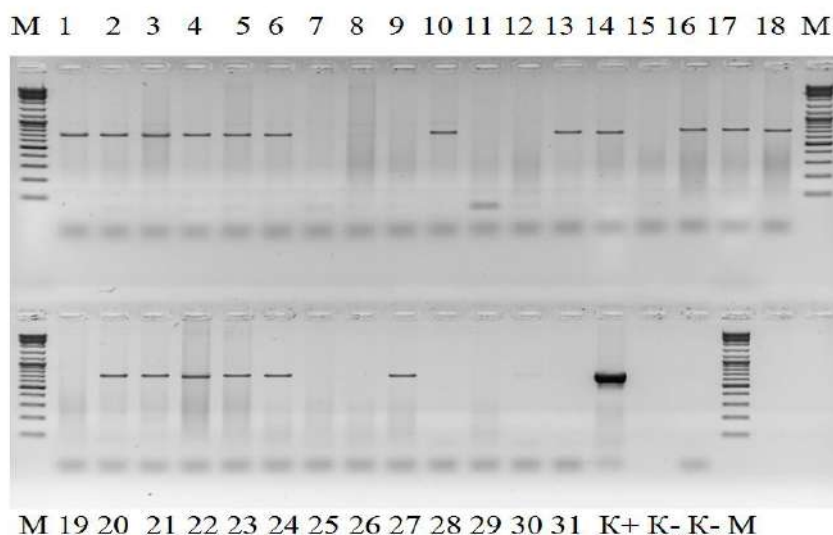


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до гена *oat* (амплікон розміром 708 п. н.): 1–31 – досліджувані зразки, K+ – *A. tumefaciens*, K– – нетрансформована пшениця (негативний контроль), M – маркер DNA LadderMix.

Referenses

- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Sci.* 2014. Vol. 5. P. 1–11. doi.org/10.3389/fpls.2014.00628.
- Dubrovna O.V., Morgun B.V. Current status of research on *Agrobacterium*-mediated wheat transformation. *Fiziol. rast. genet.* 2018. Vol. 50 (3). P. 187–217. doi.org/10.15407/frg2018.03.187.
- Hussain J., Manan S., Ahmad S., Ahmed T., Shah M. Biotechnologies used in genetic transformation of *Triticum aestivum*: A mini overview. *FUUAST J. BIOL.* 2003. 3. P. 105–109.
- Borişjuk N., Kishchenko O., Eliby S., Schramm C., Anderson P., Jatayev S., Kurishbayev A., Shavrukov Y. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. *BioMed Research International.* 2019. 18 p. doi.org/10.1155/2019/6216304.
- Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Matveyeva A.Yu., Kobernik N.I., Kochetov A.V., Tishchenko O.M., Morgun V.V. The free proline elevated levels of osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor proline dehydrogenase gene. *Plant Physiology and Genetics.* 2014. Vol. 46, № 6. P. 482–489. [in Ukrainian]
- Anwar A., She M., Wang K. Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithineamino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biol.* 2020. 20, 187. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2.
- Stránská J., Tylichová M., Kopečný D., Sněgaroff J., Sebelá, M. Biochemical characterization of pea ornithine- δ -aminotransferase: substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie.* 2010. Vol. 92. P. 940–948. doi: 10.1016/j.biochi.2010.03.026.
- Anwar Alia, She Maoyun, Wang Ke, Riaz Bisma, Ye, Xing-guo. Biological Roles of Ornithine Aminotransferase (OAT) in Plant Stress Tolerance: Present Progress and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018. 19. 3681. 10.3390/ijms19113681.
- You J., Hu H., Xiong L. An ornithine δ -aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 2012. 197. P. 59–69.
- Liu C., Xue Z., Tang D., Shen Y., Shi W., Ren L., Du G., Li Y., Cheng Z. Ornithine δ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant J.* 2018. 96. P. 842–854.
- Комисаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М. Продуктивність рослин пшениці озимої з додатковою копією гена орнітин- δ -амінотрансферази. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2019. Vol. 25. P. 211–214. https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171. [in Ukrainian]
- Gerasimova S.V., Kolodazhnaya Y.S., Titov S.E., Romanova A.V., Koval V.S., Kochetov A.V., Shumny V.K. Tobacco transformants expressing kDNA the ornithine amino transferase gene *Medicago truncatula*. *Genetics.* 2010. Vol. 46. P. 1000–1003. [in Russian]
- Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 526. P. 47–58. doi: 10.1007/978-1-59745-494-0_4.
- Chumakov M.I., Moiseeva E.M. *Agrobacterial transformation technology of plants in planta.* *Biotechnologiya,* 2012. No. 1. P. 8–20.
- Moiseeva Y.M., Velikhov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method. *British Biotechnology Journal.* 2014. 4, No. 2. P. 116–125. doi: 10.9734/BBJ/2014/6504.

SLIVKA L.V., DUBROVNA O.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics of the Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

GENETIC TRANSFORMATION OF PROMISING GENOTYPES OF WINTER BREAD WHEAT BY *IN PLANTA* METHOD

Aim. Optimization of conditions and genetic transformation of new promising genotypes of winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by *in planta* method. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation by the *in planta* method using strain AGL0 and vector construct pBi-OAT. **Results.** The influence of air temperature, optical density of cells of agrobacterial suspension, inoculation day and composition of inoculation medium on the frequency of obtaining transgenic plants of new promising genotypes of winter wheat was studied. The dependence of the frequency of obtaining transgenic plants on environmental conditions, in particular temperature, has been established. It was found that the temperature regime of 20–22 °C provided the largest number (4.4%) of wheat transformants, and when the temperature is reduced to 16–18 °C there is a decrease in the efficiency of T-DNA transfer into the plant genome and the lowest frequency of transformation is observed. **Conclusions.** The largest number of transformants was obtained using a inoculation medium without sucrose, the optical density of cells of the agrobacterial suspension of 0.4 op.od. and inoculation on the third day after castration of ears.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, ornithine- δ -aminotransferase gene.