

## AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ *IN PLANTA* З ВИКОРИСТАННЯМ ГЕНА ОРНІТИНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ

В останні два десятиліття спостерігається широке використання різних підходів для генетичної трансформації пшениці. Найбільш поширеними методами є бомбардування мікрочастинками і спільне культивування з *Agrobacterium tumefaciens* [1, 2]. Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації має ряд переваг у порівнянні з біобалістичною трансформацією: в генотипі реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальними перебудовами в кодуючих послідовностях генів, що переносяться, простота методик і більш низька вартість. Основні способи отримання генетично модифікованих рослин з використанням методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації засновані на перенесенні Т-ДНК в культивовані *in vitro* рослинні клітини з наступною регенерацією трансформованих пагонів. Однак такий підхід має ряд обмежень і недоліків: по-перше, вимагає стерильних умов; по-друге, досить складна і тривала методика; по-третє, під час культивування *in vitro* в рослинних клітинах досить часто відбуваються соматичні мутації або соматональної зміни; і, нарешті, у деяких генотипів може взагалі не відбуватися регенерація пагонів. Одним з нетрадиційних підходів для здійснення переносу агробактеріальної Т-ДНК в однодольні рослини є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, який дозволяє уникнути культивування *in vitro* і соматональної мінливості [3, 4]. Цей метод генетичної трансформації на даний час успішно використовується у різних сільськогосподарських культур, у тому числі і пшениці [5, 6].

Відомо, що стійкість до посухи та засолення – комплексні ознаки, і повний набір генів, що визначають такий фенотип, невідомий. Є ряд досліджень, що пов'язують ці ознаки з вмістом проліну в тканинах рослини, який активно синтезується у відповідь на різні стресові впливи, виступаючи в якості осмопротектора [7]. Для генетичного поліпшення культурних рослин розглядаються можливості використання генів, які контролюють рівень сумісних осмолітів, зокрема метабо-

лізм проліну [8, 9]. У ряді випадків доведена кореляція між вмістом вільного проліну і підвищенням рівня стійкості.

Введення екзогенного гену орнітинамінотрансферази (ОАТ) в генотип пшениці є одним з перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Виявлено, що експресія гену ОАТ підвищує рівень стійкості трансгенних рослин рису та тютюну до посухи і засолення [10–12]. Показано, що інтеграція в генотип реципієнта гену ОАТ арабідопсису забезпечує підвищену концентрацію проліну в клітинах, що корелює з підвищенням стійкості рослин до осмотичного стресу, викликаного такими чинниками як посуха, підвищений вміст солей у ґрунті, зниження температури нижче 0 °С. Є дані, які вказують на можливість успішного вирощування пшениці з генотипом ОАТ арабідопсису в ґрунті, який містить понад 100 мМ NaCl. Крім того, пролін виступає і в якості джерела енергії, вуглецю та азоту в умовах викликаного стресом дефіциту ресурсів і зниження активності ферментів синтезу.

Метою нашої роботи було проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* м'якої пшениці з використанням гену синтезу проліну – орнітин амінотрансферази.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували рослини м'якої пшениці сорту Зимоярка (оригінальним Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду. До початку цвітіння здійснювали кастрацію колоса згідно стандартної методики. На кожному колосі одягався індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування. Інокуляцію суспензією клітин агробактерій проводили через 3–5 діб після кастрації.

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили за допомогою штаму AGLO, що містить вектор pBi-OAT з цільовим генотипом – орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula*, а також селективний ген неоміцинфосфоттрансферази



**Рис. 1.** Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції рВі-ОАТ: рNOS – промотор гена нопалінсинтази; р35S – промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); OAT – ген орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula*; NOST – термінатор гена нопалінсинтази, сигнал поліаденілювання; RB, LB – повтори, які обмежують Т-ділянку

П (*nptII*) *E. coli* (рис. 1) (люб'язно надана к.б.н. Кочетовим А.В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ) (рис. 1).

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л при 150 об/хв, та 26 °С, в темряві на шейкері. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 3500 об/хв протягом 15 хв, ресуспендували у індукційному середовищі з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували при 3500 об/хв протягом 15 хв, та ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке готували на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, 68,5 г/л сахарози, 36 г/л глюкози та 0,115 г/л проліну та доводили до оптичної щільності  $OD_{660} = 0,2-0,8$  залежно від варіанта досліду. Отриману суспензію наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного піпет-дозатора. Після нанесення суспензії агробактеріальних клітин колоски знову ізолювали. Після повного висихання розчину проводили запилення пилком, який був отриманий з інтактного колосу тієї ж рослини.

Екстракцію ДНК з листя проводили з використанням комплексу реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Наявність трансгенів в геномі досліджуваних рослин визначали методом ПЛР, аналізуючи ДНК з листя отриманих рослин покоління Т1. ПЛР проводилась на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Спочатку здійснювали мультиплекс-ПЛР з праймерами до пшеничного гена-референта *TaTM20* і трансгена *nptII* (5'-CCTGAATGAACTCCA GGAGGAGGCA-3' та 5'-GCTCTAGATCCA-GAGTCCCGCTCAGAAG-3') згідно наступної програми: початкова денатурація при 94 °С 4 хв; 8 циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 68 °С – 45 с, елонгація 72 °С – 30 с) та 25

циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 60 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 30 с), фінальна елонгація 72 °С 5 хв. Розмір очікуваних фрагментів для гена *nptII* – 700 п.н., а для гена *TaTM20* – 934 п.н. Для зразків, у яких виявлено позитивний сигнал проводили ПЛР з праймерами специфічними до гена OAT *Medicago truncatula*: 5'-CAGTGCC-CACAATTACCATCC-3' та 5'-CGAACTTCTTCCCAATCACAAGCCA-3' згідно наступної програми: початкова денатурація при 94 °С 3 хв; 30 циклів (денатурація 94 °С – 1 хв, відпал 57 °С – 1 хв, елонгація 62 °С – 1 хв) та фінальна елонгація 62 °С 8 хв. Розмір очікуваного амплікону становить 708 п.н. Наявність агробактеріальної домішки контролювали по гену *vir C*.

Продукти ампліфікації розділяли в 1,2 % агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

Отримане насіння висівали в контейнери для вирощування на дослідній ділянці. Протягом вирощування перевіряли стійкість сіянців до канаміцину нанесенням розчину на листя.

### Результати та обговорення

На *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* впливає багато чинників, зокрема склад середовища та кількість агробактеріальних клітин в робочому розчині [3].

*Agrobacterium* є агресивним патогеном, відповідно нанесення навіть невірулентних штамів зазвичай призводить до пригнічення росту і розвитку рослин. Відомо, що в умовах штучного запилення та запліднення, зав'язування насіння дуже залежить від зовнішніх умов. Цей показник визначає можливість отримання насіння, а отже і трансформованих рослин. Одним із таких факторів, що впливає на зав'язування насіння за трансформації *in planta*, є хімічний склад робочої суспензії агробактеріальних клітин та її оптична щільність. В ході до-

Таблиця

Вплив оптичної щільності та складу інокуляційного середовища на зав'язування насіння пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*

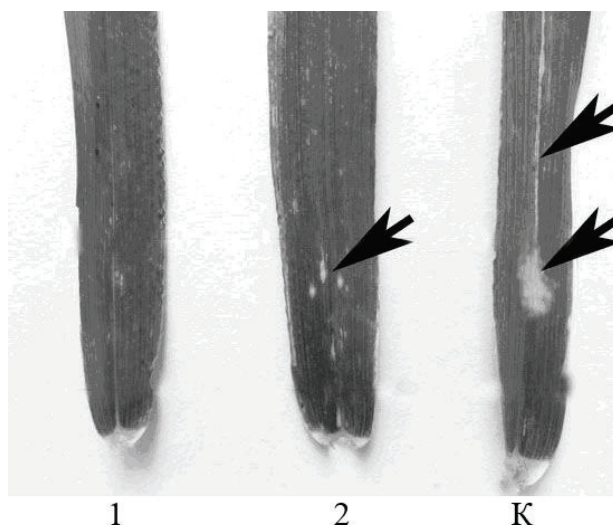
№	Інокуляційне середовище	OD	Зав'язування насіння, %
1	Контроль (дистильована вода)	–	85,4 ± 1,2
2	Рідке MS + 20 г/л сахарози	0,2	17,5 ± 2,8
		0,4	22,6 ± 2,3
		0,8	8,2 ± 1,7
3	Рідке MS (без сахарози)	0,2	24,2 ± 2,3
		0,4	37,9 ± 3,3
		0,8	13,0 ± 1,6

слідження нами застосовувалися робочі розчини з різною оптичною щільністю: 0,2, 0,4 та 0,8 оп. од., що готували на основі рідкого середовища MS із сахарозою та без неї (табл.). Для контролю на приймочки наносили стерильну дистильовану воду.

У наших дослідженнях зав'язування насіння у варіанті з додаванням сахарози була нижчою. У цьому варіанті більшість отриманих колосків були з ознаками грибного зараження, а 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/запліднення. Також показано, що найвище зав'язування насіння спостерігалась за оптичної щільності агробактеріальних клітин 0,4 оп. од. Таким чином, нами встановлені оптимальні параметри інокуляційного робочого розчину агробактеріальних клітин для трансформації пшениці сорту Зимоярка *in planta*.

Загалом нами було отримано 411 насінин T<sub>0</sub>. Все отримане насіння пророщували на селективному середовищі та добирали канаміцин-стійкі форм. Всього одержали 11 рослин, стійких до канаміцину, які вирощували у вегетаційних посудинах об'ємом 0,2 л. По мірі росту їх пересаджували у більші вегетаційні посудини та вирощували до фази повної стиглості зерна.

З метою підтвердження переносу та експресії трансгенів, на листки отриманих канаміцин-стійких рослин наносили розчин канаміцину 100 мг/л та накривали місце нанесення пергаментним папером. У контрольних (нестійких) рослин на місці контакту з антибіотиком спостерігали некротич-



**Рис. 2.** Фенотиповий прояв ознаки стійкості до канаміцину на листках пшениці *in vivo* після нанесення розчину антибіотика: 1, 2 – канаміцин-стійкі рослини пшениці; К – контроль (нестійка рослина). Стрілками вказані місця некрозів

ні плями на листковій пластинці та знебарвлення центральної жилки (рис. 2).

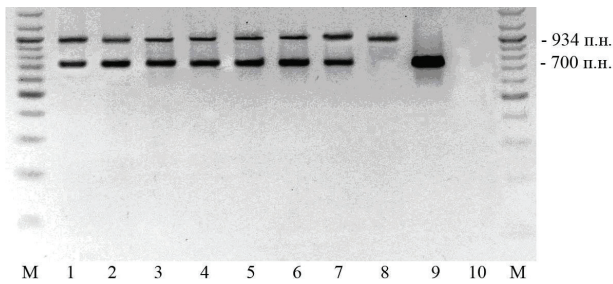
У стійких рослин спостерігали відсутність характерних плям некрозу або їх незначні прояви.

Оскільки значний вплив на результат ПЛР має якість препарату ДНК, ряд авторів для контролю рекомендує додатково проводити ампліфікацію з праймерами до генів домашнього господарства (house-keeping genes), що дозволяє виключити псевдонегативні результати, пов'язані з поганою якістю виділеного зразка або недостатньою концентрацією ДНК. Тому, в роботі нами застосовувалася мультиплексна ПЛР, що дозволяє за один цикл ампліфікації визначити в досліджуваному зразку конститутивний ген пшениці *TaTM20* та трансген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину.

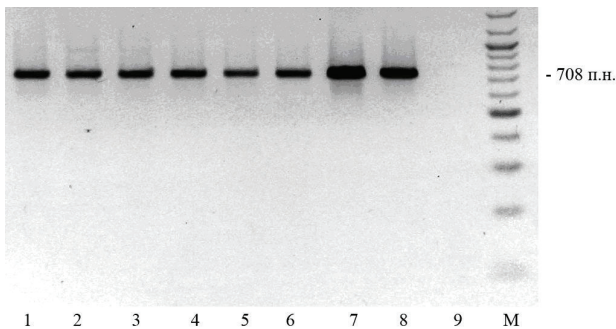
Загалом серед 129 проаналізованих зразків (ДНК виділяли з кожного проростка T1 індивідуально) тільки в 42 підтверджено присутність гена *nptII* (рис. 3).

Всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *nptII* перевіряли на присутність гена OAT. Результат аналізу засвідчив, що вказаний ген був наявний тільки в семи зразках (рис. 4). ПЛР проводили повторно тільки з попередньо відібраними зразками.

Нами, також продемонстровано, що в досліджуваних зразках відсутня бактеріальна контамінація, що контролювалася за геном *virC* (рис. 5).



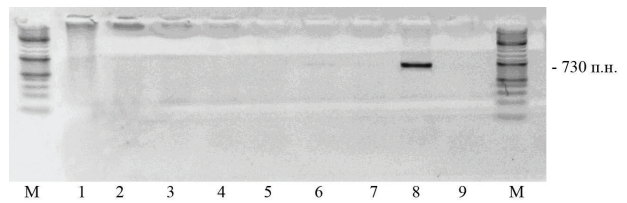
**Рис. 3.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами, специфічними до гена *nptII* (амплікон розміром 700 п. н.) та гена *TaTM20* (амплікон розміром 934 п. н.): 1–7 – досліджувані зразки, 8 – нетрансформована пшениця (негативний контроль на ген *nptII*); 9 – позитивний контроль на ген *nptII* (*A. tumefaciens*); 10 – негативний контроль; М – маркер DNA LadderMix



**Рис. 4.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на присутність трансгена ОАТ (амплікон розміром 708 п. н.): 1–7 – досліджувані зразки, 8 – K+ (*A. tumefaciens*), 9 – нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix

#### ЛІТЕРАТУРА

1. El-Mangoury K.A., Abdrabou R.Th., Yasien M., Fahmy A.H. Optimization of a transformation system for three Egyptian wheat cultivars using immature embryo-derived callus via microprojectile bombardment // Arab. J. Biotech. – 2006. – 9, N 1. – P. 175–188.
2. Xia G., Li Z., He C., Chen H., Richard B. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Physiol. Sin. – 1999. – 25. – P. 22–28.
3. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 8–20.
4. Moiseeva Y.M., Velikov 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, N 2. – P. 116–125.
5. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2006. – 102, N 3. – P. 162–170.
6. Zhao T., Zhao S., Chen H., Zhao Q., Hu Z., Hou B., Xia G. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Rep. – 2006. – 25. – P. 1199–1204.
7. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. – 2009. – 15, N 2. – P. 89–97.
8. Kishor P., Sangam S., Amrutha R. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Curr. Sci. – 2005. – 88, N 3. – P. 424–438.
9. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // Mol. Breed. – 2002. – 9, N 2. – P. 73–80.
10. Wu L., Fan Z., Guo L. Over-expression of an *Arabidopsis* OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice // Chinese Sci. Bull. – 2003. – 48, N 23. – P. 2594–2600.



**Рис. 5.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на присутність бактеріального гена *vir C* (амплікон розміром 730 п. н.): 1–7 – досліджувані зразки, 8 – позитивний контроль (*A. tumefaciens*), 9 – нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix

#### Висновки

Проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* м'якої пшениці сорту Зимоярка з використанням штаму AGLO, який містить плазмідну рВи-ОАТ з цільовим геном орнітинамінотрасферази *Medicago truncatula*. У результаті було отримано 411 насінин T<sub>0</sub>, які пророщували на селективному середовищі та добирали канаміцин-стійкі рослини. В ході роботи був апробований експрес метод визначення стійкості до канаміцину, шляхом нанесення розчину антибіотику на листові пластинки рослин *in vivo*. Відібрано 11 канаміцин-стійких рослин з яких отримано насіннєве покоління T<sub>1</sub>. За використання ПЛР аналізу у насіннєвому поколінні T<sub>1</sub> виявлено 7 зразків в яких встановлено наявність двох трансгенів – *nptII* та ОАТ. Частота трансформації з повним вбудовуванням генетичної конструкції складає 5,43 %. Аналіз даних зразків на присутність гена вірулентності (*VirC*) дав змогу виключити бактеріальну контамінацію рослинного матеріалу.

11. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // Mol. Breed. – 2002. – 9, N 2. – P. 73–80.
12. Vendruscolo E., Schuster I., Pileggi M. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat // Plant Physiol. – 2007. – 164, N 10. – P. 1367–1376.

**GONCHARUK O.M., BAVOL A.V., DUBROVNA O.V.**

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
Ukraine, 03022, Kyiv, Brother str., 31/17, e-mail: bavo11@rambler.ru*

**AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF WHEAT WITH ORNITHINE-AMINOTRANSFERASE GENE BY AN *IN PLANTA* METHOD**

**Aims.** The effectiveness of (*Triticum aestivum* L.) transformation *in planta* using strain AGLO harboring plasmid pBi-OAT with ornithine-aminotransferase gene and selective neomycin phosphotransferase II gene (*nptII*) has been analyzed.

**Methods.** *Agrobacterium*-mediated genes transfer *in planta* during wheat pollination. **Results.** Seeds, RCR-analysis of which confirmed availability *oat* gene, of T<sub>1</sub>- wheat's plants have been obtained. **Conclusions.** It has been shown the possibility of stable integration of the transgenes at the wheat's genome under *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.