

<https://doi.org/10.15407/frg2019.04.283>

УДК: 577.21:57.085.1:577.233.3:633.11

## ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ МЕТОДОМ *IN PLANTA*

О.В. ДУБРОВНА, С.С. КУЛЕШ, Л.В. СЛИВКА

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

Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці сорту Зимоярка методом *in planta* за використання штамів LBA4404 та AGL0. Встановлено залежність ефективності зав'язування насіння й частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму та вологості повітря. Показано, що за використання штаму AGL0 найбільший відсоток зав'язування насіння (38,7 %) зафіксовано за температури 20 °С та вологості повітря 45 %, найменшу кількість зерен (16,1 %) отримано за температури 16 °С і високої вологості повітря — 75 %. За температури 27 °С зав'язуваність насіння була вдвічі вищою, ніж за температури 16 °С, тобто зниження температури у поєднанні з високою вологістю негативно впливає на запилення, ніж її підвищення. При порівнянні температур 22 і 27 °С за практично однакової вологості повітря між дослідними варіантами з використанням одного штаму агробактерії не виявлено достовірної різниці за показником зав'язування насіння. Не виявлено також істотних відмінностей стосовно частоти зав'язування насіння за однакової температури при застосуванні різних штамів. Ефективнішою була температура 22 °С, бо в разі її підвищення до 27 °С насіння утворювалось дещо менше. Встановлено, що температурний режим 20 °С і вологість повітря 45 % забезпечили отримання найбільшої кількості (4,3 %) трансформантів пшениці сорту Зимоярка, а за зниження температури до 16 °С ефективність перенесення Т-ДНК у рослинний геном зменшувалась і частота трансформації була найменшою (0,5 %). Виявлено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на процес зав'язування насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta*. Найбільше насіння отримано за використання інокуляційного середовища без сахарози, оптичної густини клітин агробактеріальної суспензії 0,4—0,6 опт. од. та інокуляції на третю добу після кастрації колосів.

*Ключові слова:* *T. aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta*, температура, вологість, інокуляційне середовище.

Більшість робіт з генетичного поліпшення рослин пшениці методами генетичної інженерії ґрунтується на використанні рослинних об'єктів в умовах *in vitro*. Застосування цих методів передбачає: необхідність

дотримання асептичних умов вирощування досліджуваного матеріалу; трудомісткі етапи отримання калюсу; регенерацію та добір трансформованих пагонів; можливість появи соматоклональних варіантів; низький вихід трансгенних рослин та економічні затрати [1, 2]. Низький морфогенетичний потенціал однодольних ускладнює регенерацію трансформантів та отримання фертильних рослин [3]. Крім того, цінні трансгенні рослини можуть бути втрачені на етапі адаптації до нестерильних умов вирощування.

Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta через відсутність етапу культивування тканин має низку істотних переваг. Застосування цього методу не обмежується генотипами з високою регенераційною здатністю; він не потребує трудомістких етапів отримання і культивування ембріогенного калюсу; відсутня соматоклональна мінливість; виключена химерність трансформантів, які розвиваються безпосередньо із зиготи, а не з багатоклітинних меристем, що містять трансформовані й нетрансформовані клітини [4, 5]. Особливістю цього методу є те, що *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію можна проводити на проростках або рослинах, що вільно ростуть в умовах довкілля. Інокуляції агробактеріальною суспензією можна піддавати різні частини (залежно від методу) рослини.

Цей метод сьогодні успішно використовують для генетичної трансформації різних сільськогосподарських культур, у тому числі й пшениці [4–7]. Перші спроби отримати трансгенні рослини пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta були проведені ще у 1990-х роках [8]. Із використанням того самого протоколу, але інших штамів *Agrobacterium* і плазмідних конструкцій, було досягнуто ефективної трансформації пшениці Sawahel і Hassan [9]. Доведено, що частота трансформації пшениці цим методом значно вища, ніж іншими методами генетичної трансформації [10–12].

На сьогодні типологія методів in planta розроблена недостатньо, здебільшого не з'ясовано, які саме клітини і тканини слугують мішенню для агробактеріальної Т-ДНК. Згідно з цими методами, агробактеріями інокулюють різні тканини рослин на різних стадіях розвитку – від проростання насіння до цвітіння [4–20]. Нині відомі різні способи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta: занурення квіткових бруньок у суспензію агробактерій («floral dip» або «floral spray»), нанесення суспензії *Agrobacterium tumefaciens* на нитки маточок («pistil drip», «pollen tube pathway»), трансформація насіння [11]. Для пшениці запропоновано спосіб прямої інокуляції незрілих зернівок in planta [4].

На ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах in planta впливає багато чинників. Велике значення мають температура, за якої проводять трансформацію, склад інокуляційного середовища, щільність агробактеріальних клітин, використання індукторів генів вірулентності, штам агробактерій, тип векторної конструкції [20–22]. Особливо важливими для генетичної трансформації в умовах in planta є стадія розвитку рослин на час інокуляції, особливості розвитку й будови квітки, тривалість контакту рослинних тканин з агробактеріальною суспензією [20]. На сьогодні для *T. aestivum* клітини-мішені під час *Agrobacterium*-опосередкованої

трансформації *in planta* не описані, залишаються нез'ясованими оптимальні умови та точний механізм передачі Т-ДНК у зародкові клітини.

Обробка кастрованих квіток рослин суспензією клітин *Agrobacterium* — сучасний метод отримання трансгенних рослин *in planta*. Він простий у використанні, має низьку собівартість та відносно високу ефективність. За використання цього методу утворюється насіння з генетично модифікованим зародком. Оскільки зародок ініціюється з єдиної клітини, то можливість утворення рослин-хімер виключається. Генетична трансформація пшениці з використанням генів метаболізму проліну актуальна, оскільки здатна збільшувати вміст *L*-проліну, підвищувати стійкість трансгенних рослин до абіотичних стресорів, зокрема до посухи [16, 17].

У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta*.

### Методика

Матеріалом досліджень був районований сорт м'якої пшениці вітчизняної селекції Зимоярка, створений в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Сорт Зимоярка є дворучкою з високим природним потенціалом продуктивності. Для цього сорту використовували два штами виду *Agrobacterium tumefaciens* — AGL0 та LBA4404. Обидва штами містили бінарну векторну конструкцію pBi2E, до складу якої входили гетерологічний дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису і селективний ген неоміцин-фосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Використовували також штамп AGL0 з плазмідом pBi-OAT, що містила цільовий ген орнітин-δ-амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний ген неоміцин-фосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli* (рис. 1). Ці генетичні конструкції люб'язно надав доктор біологічних наук, член-кореспондент РАН А.В. Кочетов (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, Новосибірськ).

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду протягом 2013—2018 рр. інокуляцією кастрованих суцвіть. Для трансформації обирали колоси завдовжки 5–7 см, які ще не повністю вийшли з піхви прапорцевого листка, середня довжина колоса становила 6,2 см. До початку цвітіння проводили каstrування, залишали по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожен колос надягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу і проводили етикетування (рис. 2).

Інокулювали суцвіття суспензією агробактерій через 3–5 діб після кастрації. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* отримували за методикою Сидорова [23] з певними модифікаціями: з інокуляційного середовища повністю вилучали сахарозу. Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували культивуванням на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л, канаміцину 100 мг/л, за 150 об/хв, 26 °С, в темряві на шейкері. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням за 3500 об/хв протягом 15 хв, ресуспендува-

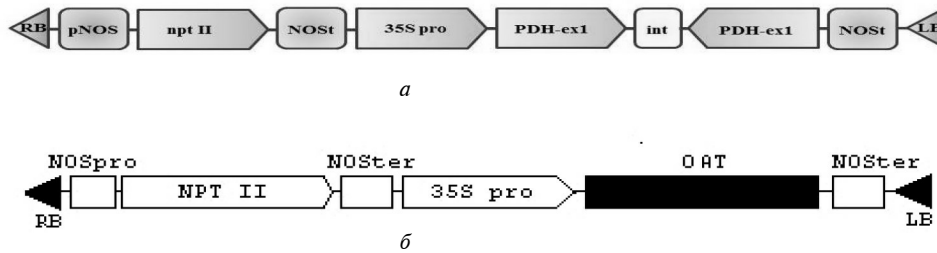


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичних конструкцій pBi2E (а) та pBi-OAT (б)

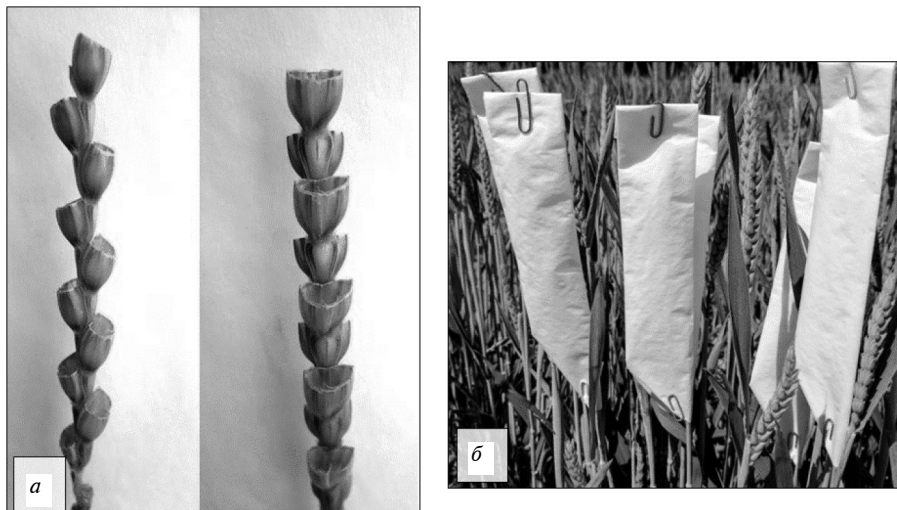


Рис. 2. Кастрація колоса за стандартною методикою:  
а — кастрований колос; б — колос в індивідуальному ізоляторі

ли в індукційному середовищі з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували за 3500 об/хв протягом 15 хв і ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке готували на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей і додаванням 200 мкМ ацетосирінгону, доводили до оптичної густини  $OD_{660} = 0,2 \dots 0,8$ . До суспензії бактерій добавляли 0,05 % Silvet L77, рН доводили до 4,0. Через 3–5 діб після кастрації квіток їх інокулювали суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок автоматичним дозатором, і знову їх ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилом, отриманим з інтактного колоса тієї ж рослини.

У фазу повної стиглості зерна колоси зрізали й підраховували кількість зерен. Частоту зав'язування насіння обчислювали у відсотках відносно контролю (кастровані рослини сорту Зимоярка, оброблені дистильованою водою, зав'язуваність насіння яких брали за 100 %). З метою визначення залежності ефективності трансформації від умов навколишнього середовища отримане насіння пророщували,

у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК і виявлення послідовностей трансгенів. Молекулярно-генетичний аналіз рослин пшениці, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, здійснювали ПЛР-методом [16, 17].

### Результати та обговорення

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta залежить від низки специфічних чинників, одними з яких є умови довкілля, що включають температурний режим, вологість, наявність чи відсутність опадів. Температурний діапазон, придатний для трансформації in planta, обмежується чутливістю до температури білків, що беруть участь у перенесенні Т-ДНК. Оптимальною температурою для функціонування апарату *vir*-залежного перенесення вважають 19 °С, хоча найліпшою для експресії *vir*-генів є температура 25 °С [22]. За температури 28 °С ефективність трансформації зменшується внаслідок негативної дії підвищеної температури на білки VirB-VirD4, що зв'язані з мембраною й беруть участь у перенесенні Т-ДНК і білків крізь мембрану клітини [21, 22]. Крім того, знижується індукція білка VirD2, що відповідає за вирізання Т-ДНК і пілотування Т-нитки [21]. За підвищення температури до 32 °С експресія *vir*-генів повністю пригнічується, оскільки рецепторний білок VirA стає неактивним [24]. Різні дослідники наводять дещо відмінні дані щодо оптимальних значень температури. Так, згідно з результатами досліджень Діллена та співавт. [22], найліпші результати отримано за температури 22 °С. Водночас автори праці [25] найбільшу кількість трансформантів отримали за температури 25 °С. Аналіз літературних даних вказує на температурний оптимум трансформації для злакових 20–25 °С, а в деяких випадках і 28 °С [26–28].

Однак під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах in planta можливість створення сприятливих температурних умов здебільшого відсутня. Температура, за якої проводять інокуляцію *Agrobacterium*, коливається в діапазоні 22–26 °С [26]. За даними літератури, температури 18–20 °С сприятливіші для перенесення Т-ДНК у рослинний геном злаків, ніж 22–25 °С [29].

Ми провели серію експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in planta пшениці за різних температурних режимів і різної вологості повітря (табл. 1). Як видно з даних таблиці, для сорту Зимоярка за використання штаму AGL0 найбільший відсоток зав'язуваності насіння (38,7 %) отримано за температури 20 °С і вологості повітря 45 %, а найменшу кількість зерен (16,1 %) — за температури 16 °С та високої вологості повітря. За температури 27 °С зав'язуваність насіння була вдвічі вищою, ніж за температури 16 °С. Отже, зниження температури в поєднанні з високою вологістю негативно впливає на запилення, ніж її підвищення.

При порівнянні температур 22 і 27 °С й практично однакової вологості повітря між дослідними варіантами за використання одного штаму агробактерій не виявлено достовірної різниці за показником зав'язування насіння. Не виявлено істотних відмінностей і за частотою

ТАБЛИЦЯ 1. Вплив температури та вологості повітря на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці сорту Зимоярка методом *in planta*

Штам агробактерії	Вектор	Температура повітря, °C	Вологість повітря, %	Зав'язуваність насіння, %	Частота трансформації, %
AGL0	pBi2E	16	75	16,1±0,8*	0,5
		20	45	38,7±1,1	4,3
		25	80	30,2±1,0*	1,2
		25	45	37,9±1,1	2,0
		27	40	35,7±1,1	1,3
AGL0	pBi2E	22	46	42,4±1,1	2,8
		27	42	38,9±1,1	1,0
LBA4404	pBi2E	22	46	37,1±1,1	2,4
		27	42	35,8±1,1	0,7
AGL0	pBi-OAT	22	46	39,9±1,1	2,7
		27	42	37,2±1,1	1,2

\*Тут і в табл. 2—4: різниця між варіантами одного штаму достовірна за  $p \leq 0,05$ .

зав'язування насіння за однакової температури при застосуванні різних штамів. Ефективнішою була температура 22 °C, оскільки за її підвищення до 27 °C кількість утвореного насіння дещо зменшувалась.

Ми довели, що температура 18—20 °C ліпша для перенесення Т-ДНК у рослинний геном, оскільки, за результатами дослідження, при використанні штаму AGL0 з векторною конструкцією pBi2E встановлено, що температурний режим 20 °C і вологість повітря 45 % забезпечили отримання найбільшої кількості (4,3 %) трансформантів пшениці сорту Зимоярка. Зі зниження температури до 16 °C ефективність перенесення Т-ДНК у рослинний геном зменшується, частота трансформації найнижча (0,5 %). За підвищення температури до 27 °C частота утворення трансгенних рослин знижується і становить 1,3 %. За використання різних штамів за температури 27 °C отримано меншу кількість трансгенних генотипів, ніж за сприятливішої — 22 °C. Ймовірно, це пов'язано з блокуванням утворення *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК і для яких високі температурні показники є критичними [28].

Слід зазначити, що середня зав'язуваність насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці *in planta* була значно нижчою порівняно з контролем, що свідчить про негативний вплив агробактерій на запилення/запліднення пшениці. Це може бути пов'язано або з прямою дією агробактерій на рослинні клітини, або з їх опосередкованим впливом, оскільки інокуляційне середовище багате на вуглеводи й біологічно активні сполуки, що може стимулювати ріст сапрофітної мікрофлори, яка негативно впливає на процес запилення і розвиток зав'язі.

За нашими спостереженнями, між дослідними варіантами одного штаму за температур 22 і 27 °C не виявлено достовірної різниці за показником зав'язуваності насіння, проте за використання штаму

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив концентрації сахарози в інокуляційному середовищі на зав'язуваність насіння за трансформації *in planta*

Штам агробактерії	Вектор	Дослідний варіант	Зав'язуваність насіння, %
AGL0	pBi2E	Рідке середовище 1/2 МС + 20 г/л сахарози	15,2±1,5
		Рідке середовище 1/2 МС + 10 г/л сахарози	26,4±1,8*
		Рідке середовище 1/2 МС (без сахарози)	42,7±2,0*
AGL0	pBi-OAT	Рідке середовище 1/2 МС + 20 г/л сахарози	16,4±1,5
		Рідке середовище 1/2 МС + 10 г/л сахарози	24,6±1,8
		Рідке середовище 1/2 МС (без сахарози)	37,9±2,0
LBA4404	pBi2E	Рідке середовище 1/2 МС + 20 г/л сахарози	11,8±1,3
		Рідке середовище 1/2 МС + 10 г/л сахарози	20,9±1,7*
		Рідке середовище 1/2 МС (без сахарози)	39,6±2,0*
Контроль		Дистильована вода	85,6±1,4

AGL0 кількість насіння була дещо більшою. За добору на селективному середовищі з канаміцином насіння, отримане у варіанті 22 °С, проростало швидше й загалом вдалося отримати достовірно більшу кількість трансгенних рослин.

Для інокуляції рослин *Agrobacterium tumefaciens* методами *in planta* зазвичай використовують середовища, придатні для росту рослин, наприклад МС, яке доповнюють різними компонентами, зокрема й сахарозою [30]. Ми проаналізували вплив концентрації сахарози в інокуляційному середовищі на зав'язуваність насіння (табл. 2). Для контролю на приймочки наносили стерильну дистильовану воду. У наших дослідах зав'язуваність насіння у варіантах з додаванням сахарози була достовірно нижчою. При застосуванні сахарози більшість колосків мала ознаки грибного зараження, а отримане насіння було менш виповненим, ніж у варіанті без сахарози та в контролі. На наш погляд, це можна пояснити тим, що сахароза є добрим субстратом для розвитку сапрофітної мікрофлори, що заважає нормальному процесу запилення і запліднення. Негативний вплив сахарози на ефективність процесу трансформації був показаний і в дослідах із сортом озимої пшениці Подільянка та штамом GV3101 *A. tumefaciens* із генетичною конструкцією pCB203. За її наявності в інокуляційному середовищі частота трансформації становила 2,3 %, а за відсутності – 15,6 % (ген *bar*) та 20,7 % (ген *nptII*) [31].

У ході дослідження ми застосовували інокуляційні середовища з різною оптичною густиною клітин агробактерій: 0,4; 0,6 та 0,8 опт. од., які готували на основі рідкого середовища МС без сахарози (табл. 3). Показано, що найчастіше насіння утворювалось за оптич-

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив оптичної густини клітин бактеріальної суспензії на зав'язуваність насіння за трансформації *in planta*

Штам агробактерії	Вектор	Оптична густина, опт.од.	Зав'язуваність насіння, %
AGL0	pBi2E	0,4	35,2±1,9
		0,6	40,9±2,0*
		0,8	13,0±1,4*
AGL0	pBi-OAT	0,4	37,9±2,0
		0,6	27,7±1,7
		0,8	15,0±1,5
LBA4404	pBi2E	0,4	32,7±1,9
		0,6	37,9±2,0 *
		0,8	9,8±1,2*
Контроль		Дистильована вода	80,6±1,6

ної густини агробактеріальних клітин 0,6 опт. од. для штамів AGL0 і LBA4404 з векторною конструкцією pBi2E (див. табл. 3), в той час як для штаму AGL0 з векторною конструкцією pBi-OAT цей параметр був нижчий — 0,4 опт. од. З підвищенням концентрації клітин агробактерій в інокуляційному середовищі до 0,8 опт. од. кількість зав'язаного насіння різко зменшувалася, що можливо зумовлено негативною дією агробактерій на рослинні клітини.

Тривалість контакту суспензії агробактеріальних клітин і тканин рослини також є важливим чинником трансформації в умовах *in planta*. Під час інокуляції агробактерії потрапляють під покриви квіткової бруньки, а потім, можливо — у міжклітинний простір. Після інокуляції агробактерії деякий час залишаються на поверхні рослин і здатні трансформувати клітини. Ми встановили, що оптимальнішим часом інокуляції квіток є третя доба після кастрації (табл. 4).

Отже, оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці вітчизняного сорту Зимоярка методом *in planta* за використання штамів LBA4404 та AGL0. Встановлено залежність ефективності зав'язування насіння і частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* від температурного режиму і вологості повітря. Показано, що оптимальним температурним

ТАБЛИЦЯ 4. Зав'язуваність насіння залежно від часу інокуляції

Штам агробактерії	Вектор	Доба інокуляції	Зав'язуваність насіння, %
AGL0	pBi2E	3	41,3±3,5*
		5	25,4±3,4
AGL0	pBi-OAT	3	38,2±3,4
		5	20,1±3,4
LBA4404	pBi2E	3	38,2±3,4 *
		5	22,4±3,3



діапазоном є 20—22 °С й помірна вологість повітря. Такий температурний режим сприяє найбільшій частоті зав'язування насіння та отримання трансформантів. За зниження і підвищення температури зменшується ефективність перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Виявлено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на процес зав'язування насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta*. Найоптимальнішими виявились інокуляційне середовище без сахарози, оптична густина клітин агробактеріальної суспензії 0,4—0,6 опт. од. та інокуляція на третю добу після кастрації квіток.

## REFERENCES

1. Hiei, Y., Ishida, Y. & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Sci.*, 5, pp. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
2. Sparks, C., Doherty, A. & Jones, H. (2014). Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.*, 1099, pp. 235-250. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_19)
3. Sramkova, Z., Gregova, E. & Sturdik, E. (2009). Genetic improvement of wheat — a review. *Nova Biotechnologica*, 9, No. 1, pp. 27-51.
4. Risacher, T., Craze, M., Bowden, S., Paul, W. & Barsby, T. (2009). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via *in planta* inoculation. *Methods Mol. Biol.*, 478, pp. 115-124. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_7)
5. Zale, J., Agarwal, S., Loar, S. & Steber, C. (2009). Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 28, pp. 903-913. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0696-0>
6. Zhao, T., Zhao, S., Chen, H., Zhao, Q., Hu, Z., Hou, B. & Xia, G. (2006). Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep.*, 25, pp. 1199-1204. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0184-8>
7. Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. & Kojima, M. (2006). Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, No. 3, pp. 162-170. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.162>
8. Puhalsky, V.A., Smirnov, S.P., Korostyleva, T.V., Bilinskaya, E.N. & Eliseeva, A.A. (1996). Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Genetika*, 32, No. 11, pp. 1596-1600 [in Russian].
9. Sawahel, W. & Hassan, A. (2002). Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnol. Letters*, 24, pp. 721-725. <https://doi.org/10.1023/A:1015294319114>
10. Agarwal, S., Loar, S., Steber, C. & Zale, J. (2009). Floral transformation of wheat. *Methods in Mol. Biol.*, 478, pp. 105-113. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_6)
11. Hussain, J., Manan, S., Ahmad, S., Ahmed, T. & Shah, M. (2013). Biotechnologies used in genetic transformation of *Triticum aestivum*: A mini overview. *Fuuast J. Biol.*, 3, pp. 105-109.
12. Jasdeep, C. & Avijit, T. (2015). Genetic transformation and transgenic wheat development: an overview. *Clon Transgen.*, 5, No. 1, pp. 147-148. <https://doi.org/10.4172/2168-9849.100014>
13. Yang, B., Ding, L., Yao, L., He, G. & Wang, Y. (2008). Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem. *Mol. Plant Breed.*, 6, pp. 358-362.
14. He, D., Li, Z. & Wang, H. (2003). The efficient transformation of wheat *in planta* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Agricultura Sinica*, 36, pp. 1437-1441.

15. Langridge, P., Brettschneider, R., Lazzeri, P. & Lorz, H. (2002). Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment. *Plant J.*, 2, pp. 631-638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00631.x>
16. Voronova, S.S., Baval, A.V. & Dubrovna, O.V. (2015). In planta genetic transformation of bread wheat, using AGL0 strain, containing pBi2E with dsRNA suppressor of ProDH gene. *Fakty eksperymental'noi evoliucii orhanizmiv*, 17, pp. 126-130 [in Ukrainian].
17. Goncharuk, O.M., Baval, A.V. & Dubrovna, O.V. (2015). *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat with ornithine-aminotransferase gene by an in planta method. *Fakty eksperymental'noi evoliucii orhanizmiv*, 17, pp. 131-135 [in Ukrainian].
18. Gorbatiuk, I.R., Baval, A.V., Bannikova, M.O. & Morgun, B.V. (2015). *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of bread winter wheat cv. Podolianka. *Visnyk Kharkivskoho nacionalnoho universytetu im. V.N. Karazina, Ser. Biol., Iss. 24 (1153)*, pp. 47-53 [in Ukrainian].
19. Cheng, M. (2004). Invited Review: Factors Influencing *Agrobacterium*-mediated Transformation of Monocotyledonous Species. *In Vitro Cellular Develop. Biology Plant*, 40, No. 1, pp. 31-45.
20. Chumakov, M. I. & Moiseeva, E. M. (2012). *Agrobacterial transformation technology of plants in planta*. *Biotehnologiya*, 1, pp. 8-20.
21. Fullner, K. J. & Nester, E. W. (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 178, pp. 1498-1504.
22. Dillen, W., De Clereq, J., Kapila, J., Zamnre, M., Van Montagu, M. & Angenon, G. (1997). The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* method of gene transfer to plants. *Plant J.*, 12, pp. 1459-1462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12061459.x>
23. Sidorov, V. & Duncan, D. (2009). *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.*, 526, pp. 47-58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)
24. Chumakov, M. I., Rozhok, N.A., Velikov, V.A., Tyrnov, V.S. & Volokhina, I.V. (2006). *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments. *Russian J. Genet.*, 42, No. 8, pp. 893-897.
25. Salas, M., Park, S., Srivatanakul, M. & Smith, R. (2001). Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Rep.*, 20, pp. 701-705. <https://doi.org/10.1007/s002990100374>
26. Dale, P., Marks, M., Brown, M., Woolston, C., Gunn, H., Mullineaux, P., Lewis, D., Kemp, J., Chen, D., Gilmour, D. & Flavell, R. (1989). Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos. *Plant Sci.*, 63, pp. 237-245. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90249-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90249-5)
27. Arencibia, A., Carmona, E., Tellez, P., Chan, M., Yu, S., Trujillo, L. & Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation diated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.*, 7, pp. 213-222.
28. Hashizume, F., Tsuchiya, T., Ugaki, M., Niwa, Y., Tachibana, N. & Kowyama, Y. (1999). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and the usefulness of a synthetic GFP reporter gene in leading varieties of japonical rice. *Plant Biotechnol.*, 16, pp. 397-401.
29. Moiseeva, Y.M., Velikhov, V.A., Volokhina, I.V., Gusev, Yu.S., Yakovleva, O.S. & Chumakov, M.I. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with anti-sense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method. *British Biotechnology Journal*, 4, No. 2, pp. 116-125.
30. Frame, B., McMurray, J., Fonger, T., Main, M., Taylor, K., Torney, F., Paz, M. & Wang, K. (2006). Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep.*, 25, pp. 1024-1034. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0145-2>
31. Gorbatiuk, I.P. (2016). Optimization of *Agrobacterium*-mediated biotechnology of transformation of *Triticum aestivum* in culture in vitro and method in planta (Extended abstract of Doctor thesis). Institute of Cells Biology and Gene Engineering of NAS of Ukraine. Kyiv, Ukraine [in Ukrainian].

Received 21.05.2019

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ  
ТРАНСФОРМАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ IN PLANTA*О.В. Дубровная, С.С. Кулеш, Л.В. Сливка*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины,  
Киев

Оптимизированы условия проведения *Agrobacterium*-опосредованной трансформации мягкой пшеницы сорта Зимоярка методом in planta при использовании штаммов LBA4404 и AGL0. Установлена зависимость эффективности завязывания семян и частоты получения трансгенных растений *T. aestivum* от условий окружающей среды, в частности температурного режима и влажности воздуха. Показано, что при использовании штамма AGL0 наибольший процент завязывания семян (38,7 %) зафиксирован при температуре 20 °C и влажности воздуха 45 %, наименьшее количество зерен (16,1 %) получено при температуре 16 °C и высокой влажности воздуха — 75 %. При температуре 27 °C завязываемость семян была вдвое выше, чем при температуре 16 °C, т. е. снижение температуры в сочетании с высокой влажностью более негативно влияет на опыление, чем ее повышение. При сравнении температур 22 и 27 °C и практически одинаковой влажности воздуха между исследованными вариантами при использовании одного штамма агробактерии не обнаружено достоверной разницы по показателю завязывания семян. Не выявлены также существенные различия по частоте завязывания семян при одинаковой температуре при применении различных штаммов. Более эффективной была температура 22 °C, так как при ее повышении до 27 °C зерен образовывалось несколько меньше. Установлено, что температурный режим 20 °C и влажность воздуха 45 % обеспечили получение наибольшего количества (4,3 %) трансформантов пшеницы сорта Зимоярка, а при снижении температуры до 16 °C эффективность переноса Т-ДНК в растительный геном уменьшалась и частота трансформации была наименьшей (0,5 %). Выявлено негативное влияние сахарозы в инокуляционной среде на процесс завязывания семян при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации мягкой пшеницы методом in planta. Наибольшее количество семян получено при использовании инокуляционной среды без сахарозы, оптической плотности клеток агробактериальной суспензии 0,4–0,6 опт. ед. и инокуляции на третьи сутки после кастрации колосьев.

**Ключевые слова:** *T. aestivum*, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация in planta, температура, влажность, инокуляционная среда.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF *AGROBACTERIUM*-MEDIATED  
TRANSFORMATION OF BREAD WHEAT BY THE IN PLANTA METHOD*O.V. Dubrovna, S.S. Kulesh, L.V. Slivka*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17, Vasylkivska St., 03022, Kyiv, Ukraine  
e-mail: dubrovny@ukr.net

The conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat of Zymoyarka variety by the in planta method with the use of strains LBA4404 and AGL0 have been optimized. The dependence of the seed setting efficiency and the frequency of obtaining transgenic *T. aestivum* plants on the environmental conditions, in particular, temperature and air humidity, have been established. It was shown that using the AGL0 strain, the largest percentage of seed set (38.7 %) was obtained at a temperature of 20 °C and humidity of 45 %, and the smallest amount of grains (16.1 %) was obtained at a temperature of 16 °C and high air humidity 75 %. At a temperature of 27 °C, the setting of seeds was twice higher compared to 16 °C, that is, lowering the temperature in combination with high humidity has a more negative effect on pollination than it increasing. When comparing temperatures of 22 °C and 27 °C at practically the same air humidity between the experimental variants with using

one strain of *Agrobacterium*, there was no significant difference in the seed setting index. Also, there were no significant differences in the frequency of seeds setting at the same temperature when using different strains. The temperature of 22 °C was more effective, as with its increase to 27 °C the number of grains formed somewhat decreased. It was established that the temperature regime of 20 °C and air humidity of 45 % ensured the greatest number (4,3 %) of Zimoyarka wheat transformants, and when the temperature decreased to 16 °C, the efficiency of T-DNA transfer to the plant genome decreased and the lowest transformation frequency was observed (0.5 %). The negative effect of sucrose in the inoculation medium on the process of seed setting during the *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat by the in planta method was revealed. The largest number of seeds was obtained using an inoculation medium without sucrose, the optical density of cells in the agrobacterial suspension was 0.4–0.6 o.u. and under inoculation on the third day after castration of the ears.

*Key words:* *T. aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation in planta, temperature, humidity, inoculation medium.