

<https://doi.org/10.15407/frg2023.03.209>

УДК 581.132:633.11

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ IN VITRO

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

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

Ген проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаний з катаболізмом проліну, має практичне значення для генетичної інженерії, оскільки часткове пригнічення його експресії може приводити до підвищення вмісту вільного проліну і, як наслідок, рівня толерантності рослин до абіотичних стресів, зокрема посухи. Мета нашої роботи полягала у проведенні *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отриманні генетично модифікованих рослин з частковою супресією гена проліндегідрогенази. Показано порівняно вищу ефективність використання штаму AGL0 для отримання трансгенних рослин різних генотипів озимої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази в культурі in vitro. Частота вбудовування послідовностей цільового гена *ProDH* арабідопсису за використання штаму LBA4404 у досліджених генотипів становила 0,7–1,7 %, штаму AGL0 — 1,0–2,0 %. Трансгенний статус отриманих рослин-регенерантів підтверджено методом ПЛР-аналізу. Полімеразна ланцюгова реакція зворотних транскриптів (ЗТ-ПЛР) з використанням сумарної РНК засвідчила експресію послідовностей введеного гена проліндегідрогенази арабідопсису на рівні транскрипції у трансгенних рослинах пшениці, отриманих *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією. Встановлено, що рослини зі зниженою активністю проліндегідрогенази характеризуються достовірно вищим вмістом вільного *L*-проліну порівняно з нетрансгенним контролем.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, калюсні культури, ген проліндегідрогенази.

Пшениця (*Triticum aestivum* L., AABBDD, $2n = 42$) є однією з основних продовольчих культур, вирощується на більш як 17 % орних земель і споживається близько 40 % населення світу [1]. Її зерно містить білки, вуглеводи, вітаміни, жири, мікроелементи, добре зберігається і відносно легко переробляється в харчові та кормові продукти [2]. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (ФАО), щорічно у світі виробляється 720–770 млн т зерна цієї культури. Біотичні та абіотичні стреси є важливими обме-

Цитування: Дубровна О.В., Сливка Л.В., Великожон Л.Г., Кулеш С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація перспективних генотипів озимої пшениці в культурі in vitro. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 3. С. 209–224. <https://doi.org/10.15407/frg2023.03.209>

жувальними чинниками, що впливають на врожайність і якість зерна при виробництві пшениці.

Посуха — один з основних несприятливих чинників довкілля, дія якого завдає найбільшої шкоди посівам пшениці внаслідок зміни ростових, фізіологічних і метаболічних процесів у рослинному організмі [3, 4]. У зв'язку з цим, створення сортів із високим адаптивним потенціалом і стійкістю до посухи є актуальною і практично значущою задачею. Проте складність і багатокомпонентність реакції рослинного організму на посуху зумовлює значні труднощі селекції на посухостійкість. Пряма селекція на продуктивність за умов посухи ускладнюється полігенністю ознаки і, як результат, низькою її успадковуваністю, епістатичною взаємодією генів, залежністю від взаємодії генотип—середовище [5].

Використання методів біотехнології, зокрема генетичної інженерії, є одним із перспективних напрямів, що дає можливість підвищити ефективність створення нових генотипів пшениці, стійких до посухи [6—8]. Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного чи декількох генів, які кодують або біохімічні перетворення, або кінцеві точки сигнальних шляхів. Ці генні продукти забезпечують певний захист від екологічних стресів як безпосередньо, так і опосередковано. Останнім часом почали інтенсивно розробляти новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів, інтеграцією в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості [9, 10]. Для генетичного поліпшення культурних рослин залучають біотехнології, пов'язані з використанням генів, що контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин — органічних молекул, здатних у значних концентраціях накопичуватися в клітинах рослин за умов стресу і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації.

Одним із найперспективніших підходів створення посухостійких генотипів пшениці є ідентифікація та використання генів, що контролюють синтез і катаболізм проліну [11—13]. Крім добре відомої функції як інертного сумісного осмоліту він виконує за дії стресорів низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів [14—16], є джерелом енергії, а також депо азоту та вуглецю [17]. Додатковий синтез цієї амінокислоти підвищує загальну стійкість рослин до абіотичних стресів. Численні дослідження виявили, що накопичення проліну здебільшого контролюється підвищенням експресії генів, залучених до його біосинтезу, та зниженням експресії генів його катаболізму коли рослини зазнають впливу різних стресорів [18]. Ген проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаний з катаболізмом проліну, має практичне значення для генетичної інженерії, оскільки часткове пригнічення його експресії може приводити до підвищення вмісту проліну і, як наслідок, рівня толерантності рослин до абіотичних стресів [19].

Для пригнічення експресії генів у рослин нині використовують технології РНК-інтерференції (РНКі), засновані на трансгенних підходах [20—23]. Їх можна застосовувати для зниження експресії будь-яких генів, не порушуючи експресію інших. РНК-опосередковане глушіння генів вважається відносно безпечним, неінвазивним та доволі зручним, оскільки отримана РНКі-рослина не містить трансгенного білка і експресує лише некодуючі РНК. Таким чином, трансгенні рослини з поліпшеними ознаками на основі РНКі є набагато безпечнішими для споживання людиною, ніж культури з надмірною експресією трансгенних білків [24].

Для пригнічення експресії генів у рослин за допомогою технології РНКі застосовують різноманітні генетичні конструкції. Зокрема, перспективним для часткової супресії гена *ProDH* є використання векторних конструкцій, в яких дволанцюговий РНК-супресор розташований як обернений повтор [25]. Припускають, що така конструкція за рахунок РНК-інтерференції є ефективнішою для збільшення рівня *L*-проліну. Показано, що дволанцюговий РНК-супресор гена *ProDH* арабідопсису підвищував рівень акумуляції проліну (в 1,2—6,0 раза порівняно з нетрансгенним контролем) у рослин тютюну, які характеризувалися підвищеною толерантністю до засолення [26]. Є позитивний досвід введення конструкції із дволанцюговим РНК-супресором гена *ProDH* арабідопсису у рослини соняшника й кукурудзи, які у результаті накопичували у 1,5—9,0 раза більше проліну і відрізнялися від контрольних зразків підвищеною толерантністю до водного дефіциту та засолення [27—29].

На сьогодні у генетичній інженерії пшениці широко використовують метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Застосування біологічного способу доставки ДНК у рослинну клітину за допомогою *Agrobacterium* має переваги в інтеграції: дає змогу вводити порівняно велику генетичну конструкцію, забезпечує включення в геном реципієнта обмеженого числа копій чужорідного гена з високою ефективністю і чинить мінімальні порушення у його послідовності, що зазвичай відбувається за фізичного способу доставки ДНК, а також потенційно зменшує кількість проблем, пов'язаних з косупресією і нестабільністю трансгена [30]. Проте розроблення відповідного методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, оскільки важливо розуміти роль усіх чинників, які впливають на доставку Т-ДНК у клітини, з яких може бути регенована рослина. Виділено декілька чинників, які впливають на ефективність Т-ДНК доставки: первинні експлантати, штами *Agrobacterium*, векторні плазміди, щільність суспензії клітин *Agrobacterium*, склад поживних середовищ, умови трансформації, такі як температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування; наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів за інокуляції та кокультивування; антибіотики або селективні маркери тощо [31—33].

Метою нашої роботи було проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання генетично модифікованих рослин з частковою супресією гена проліндегідрогенази.

Методика

Матеріалом для досліджень слугували 3 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (УК 065, УК 95/17, УК 997/19). Для трансформації брали калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [34]. Експлантати розміром 1,2–2,0 мм розміщували на середовищі так, щоб площа контакту із ним була максимальною. Культивування здійснювали в чашках Петрі на модифікованому середовищі МС, доповненому регулятором росту 2,4-Д концентрацією 2,0 мг/л. Чашки з експлантатами знаходилися у термостаті без освітлення упродовж 14 діб за температури 26 °С до отримання калюсу. Потім його переносили на те саме свіже поживне середовище і далі ще протягом двох тижнів вирощували за освітлення 3–4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили з використанням штамів LBA4404 та AGL0, що містять бінарний вектор pBi2E (рис. 1), який включає інвертований повтор, що складається із фрагментів двох копій першого екзона та інтрона гена проліндегідрогенази арабідопсису, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *Escherichia coli*. У його кодувальній частині є ділянки, які мають значний рівень гомології до генів *ProDH* культурних рослин, зокрема пшениці. Така генетична конструкція за вбудовування й експресії у рослині викликає РНК-інтерференцію, опосередковану короткими інтерферувальними РНК (кіРНК). Внаслідок деградації мРНК відбувається часткова супресія ендегенних генів проліндегідрогенази пшениці, що спричинює підвищення рівня вільного проліну.

Нічну культуру *Agrobacterium tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л і кана-

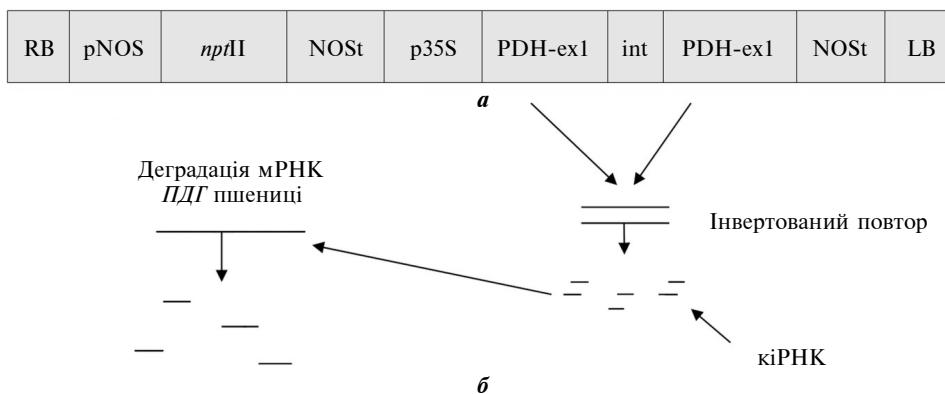


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції pBi2E (а):

pNOS — промотор гена неопалінсинтази; p35S pro — промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); PDH-ex1 — перший екзон гена *ProDH* (у конструкції наявні два фрагменти, розміщені у вигляді інвертованого повтору); int — фрагмент першого інтрона гена *ProDH*; *nptII* — ген неоміцинфосфотрансферази II *Escherichia coli*; NOS_t — термінатор гена неопалінсинтази, сигнал поліаденілювання; LB, RB — ліва і права межі Т-ДНК.

Механізм часткової супресії ендегенних генів *ProDH* пшениці шляхом посттранскрипційного сайленсінгу РНК (б)

міщину 100 мг/л. Для кокультивування використовували суспензію агробактерії оптичною щільністю $OD_{600} = 0,2-0,3$ опт. од. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 20 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (близько 30 шт.) на модифіковане поживне середовище для кокультивування [35]. Кокультивування тривало 2–3 доби. Подальшу елімінацію агробактерії проводили за допомогою антибіотика цефотаксиму концентрацією 500 мг/л. Як селективний агент застосовували антибіотик канаміцин у концентрації 100 мг/л. Культивування калюсів проводили за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду. Кожні 10 діб калюси пасажували на свіже поживне середовище. Стійкі до канаміцину регенеранти добирали протягом двох пасажів методом прямої селекції. Канаміциностійкими вважали регенеранти, що утворились за дії селективного чинника, зберігали зелене забарвлення та нормально росли і розвивалися на селективному середовищі. Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на поживне середовище для вкорінення, яке тривало 3–4 тижні. Рослини з достатньо розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов і переносили в горщики з ґрунтом.

Молекулярно-генетичний аналіз рослин здійснювали ПЛР-методом. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводили 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 дезоксирибонуклеозидтрифосфату (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 *ProDH* визначали з використанням праймерів до його першого екзону 5'-AACAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' (*ProDH*-exF) і 5'-GAGATGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3' (*ProDH*-exR) згідно з програмою: початкова денатурація за 94 °C 4 хв; 34 цикли (денатурація 94 °C 30 с, відпал 57 °C 30 с, елонгація 72 °C 30 с) і фінальна елонгація 72 °C 5 хв. Очікувана довжина амплікона становить 545 пн. Наявність першого інтрона гена *ProDH* визначали згідно з програмою: початкова денатурація за 94 °C 4 хв; 35 циклів (денатурація 94 °C 30 с, відпал 55 °C 30 с, елонгація 72 °C 45 с) і фінальна елонгація 72 °C 10 хв. Також визначали наявність гена *nptII* з використанням праймерів 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA-3' (F) та 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3' (R) згідно з програмою: початкова денатурація за 94 °C 4 хв; 35 циклів (денатурація 94 °C 30 с, відпал 54 °C 30 с, елонгація 72 °C 35 с) та фінальна елонгація 72 °C 50 хв. Очікувана довжина амплікона становить 649 пн.

Експресію послідовностей гена *ProDH* арабідопсису в рослинах пшениці досліджували на рівні транскрипції. Для цього проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією. Загальну РНК виділяли з листків трансгенних рослин та оброб-

ляли дезоксирибонуклеазою I, вільною від рибонуклеаз відповідно до методики [36]. Перед застосуванням препаратів РНК залишкову ДНК гідролізували ензимом ДНКазою I з використанням 1–5 мкг загальної РНК. Реакційну суміш витримували 30 хв за температури 37 °С. Щоб зупинити реакцію додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та витримували 10 хв за 65 °С для денатурації ферменту ДНКазою I. Комплементарну ДНК (кДНК) синтезовано зворотною транскриптазою (РНК-залежною ДНК полімеразою) мРНК транскрипції рослин пшениці за допомогою набору First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) відповідно до інструкцій виробника. Одноланцюгову кДНК надалі аналізували на наявність нуклеотидної послідовності гена проліндегідрогенази методом ПЛР із залученням специфічних праймерів.

Для визначення експресії трансгена використовували такі компоненти: 4 мкл 5× буфера для реакції, 1 мкл Oligo (dT) 18 100 мкМ (0,5 мкг/мкл), 2 мкл 10 мМ еквімолярної суміші дНТФ, 5 мкл (≈600 нг) РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки), 0,5 мкл RiboLock RNase inhibitor, 40 од/мкл, 2 мкл Reverse transcriptase, 20 од/мкл. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q (Merck Millipore). Експресію трансгена визначали шляхом ЗТ-ПЛР, використовуючи 2 мкл продуктів реакції зворотної транскрипції, доданих у 20 мкл реакційної суміші та специфічні праймери до референтного гена пшениці *TaG3PDH* (*actin*) та гена проліндегідрогенази (*ProDH-ex1*). Реакції ампліфікації проводили у термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) і Mastercycler Gradient (Eppendorf). Режим ампліфікації на визначення референтного гена пшениці *actin*, або *TaG3PDH*: денатурація — 94 °С 4 хв та 34 цикли: денатурація — 94 °С 30 с, відпал — 59 °С 30 с, елонгація — 72 °С 30 с, кінцева елонгація — 72 °С 5 хв.

Розмір продуктів ампліфікації визначали маркером молекулярної маси ДНК Ladder Mix (Thermo Scientific). Продукти ампліфікації розділяли у 1,2 %-му агарозному гелі методом електрофорезу з додаванням 5 мкг/мл бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі та фотографували. Для отримання зображення гелів використовували джерело УФ-світла і фотоапарат Canon. Отримане зображення обробляли за допомогою графічного редактора GIMP.

Вміст вільного проліну в листках визначали за методикою Чинарда, що ґрунтується на утворенні забарвленого продукту взаємодії L-проліну з нінгідринним реактивом, з модифікаціями [37].

Результати та обговорення

Для отримання генетично модифікованих рослин пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази застосовували оптимізований нами протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації у культурі *in vitro* [38]. Основні етапи генетичної трансформації перспективних генотипів пшениці представлено на рис. 2.

Зазначимо, що використання апікальних меристем пагонів як експлантатів доволі ефективно, оскільки його перевагою є можливість подолання генотипних особливостей рослин, що мають низь-



Рис. 2. Основні етапи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці:

а — 3-добові стерильні проростки; *б* — виділені апікальні меристеми; *в* — первинний калюс; *г* — морфогенний калюс; *д* — регенерація пагонів; *е* — листок рослини-регенеранта з проявом мозаїцизму; *є* — укорінені канаміциностійкі рослини-регенеранти пшениці; *ж* — адаптація до умов ґрунту трансгенних рослин пшениці

кий регенераційний потенціал, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час [39]. Калюс, отриманий з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, зберігає життєздатність і морфогенну активність довше порівняно з культурами іншого походження та достовірно не поступається за частотою регенерації калюсу, індукованому з незрілих зародків.

Загалом виділено по 700 апікальних меристем кожного генотипу (див. рис. 2, *б*). Початок калюсогенезу у всіх досліджених генотипів спостерігали вже на 2—3-тю добу культивування. Утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції (див. рис. 2, *в*). Ми показали, що всі досліджувані генотипи у культурі апікальних меристем пагонів характеризуються високою здатністю до утворення калюсу (вище 90 %). Усі вивчені генотипи озимої пшениці були здатні утворювати морфогенний калюс (див. рис. 2, *г*), але з різною частотою. Найбільшу частоту його утворення виявлено у генотипу УК 997/19 (86 %), найменшу — УК 065 (67 %). Регенерація пагонів (див. рис. 2, *д*) відбувалась у всіх досліджених генотипів, але з істотними відмінностями за здатністю до неї. Найбільшою частотою утворення па-

гонів характеризувався генотип УК 997/19 (40 %), а найменшою — УК 065 (30 %).

Коли розмір калюсів досяг діаметра 5 мм, їх використовували для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Використали по 600 калюсів для трансформації штамами LBA4404 і AGL0. Відомо, що вік вихідного калюсу може мати вирішальний вплив на ефективність генетичної трансформації. У дослідженнях ми застосовували калюс 20—22-добового віку.

Калюс обробляли бактеріальною суспензією упродовж 20 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі на поживне середовище для кокультивування. Найоптимальнішого результату для штаму LBA4404 було досягнуто за використання суспензії клітин агробактерії з оптичною щільністю 0,3 опт. од., для штаму AGL0 — 0,2 опт. од. За такого значення оптичної щільності у подальшому вдавалося практично у всіх калюсів провести елімінацію клітин агробактерії та отримати порівно з іншими умовами більшу кількість канаміциностійких регенерантів.

Значною мірою на вбудовування ДНК впливає тривалість кокультивування калюсів з агробактерією. Оптимальний результат для штаму LBA4404 було отримано під час кокультивування калюсів з агробактерією протягом трьох діб, для штаму AGL0 — двох. За такої тривалості кокультивації понад 50 % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал.

Подальшу елімінацію агробактерії проводили за допомогою антибіотика цефотаксиму концентрацією 500 мг/л. Для підвищення ефективності перенесення генів до інокуляційного середовища часто додають хімічну речовину — ацетосирингон, оскільки вважається, що ця сполука активізує *vir*-гени. У дослідях ми використовували концентрацію ацетосирингону 200 мкМ, яка вважається оптимальною для злакових культур.

Для індукції морфогенезу та регенерації трансформовані калюси переносили на модифіковане регенераційне середовище МС-131 [40]. При застосуванні модифікованого поживного середовища МС-131 спостерігали достовірне збільшення кількості морфогенних калюсів, що за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації утворюють пагони у 1,5—2,0 рази частіше порівняно з поживним середовищем МС-31. Під час культивування експлантатів на середовищі МС-131 калюси швидко переходили до морфогенного стану, регенераційні процеси у них відбувалися вже протягом 1-го пасажу, тоді як на середовищі МС-31 регенерацію перших пагонів фіксували не раніше 2-го пасажу.

Протягом 1-го пасажу більше половини калюсів генотипу УК 997/19, трансформованих з використанням штаму LBA4404, перейшли до морфогенного стану, тоді як у генотипу УК 065 їх було значно менше (табл. 1). При застосуванні штаму AGL0 таких культур у генотипу УК 997/19 виявили 47,3 %, у генотипу УК 065 — 39,4 %.

Наприкінці 1-го пасажу почалися регенераційні процеси — утворювалися перші пагони. Індукція пагонів відбувалася поступово, протягом двох пасажів.

ТАБЛИЦЯ 1. Регенераційний потенціал калюсних культур після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

Генотип	Морфогенні калюси, %	Частота регенерації, %
Штам LBA4404		
УК 065	42,6±2,8	9,0±1,7
УК 95/17	47,2±2,9	14,2±2,0
УК 997/19	51,3±2,9	16,4±2,2
Штам AGL0		
УК 065	39,4±2,8	7,8±1,6
УК 95/17	42,2±2,8	11,2±1,8
УК 997/19	47,3±2,9	13,4±2,0

Етап селекції є одним із найважливіших, оскільки дає змогу виділити стійкі до селективного агента форми. Для рослин, що мають екзогенний ген *nptII*, як селективний чинник найчастіше використовують антибіотик канаміцин. Його застосування ефективно лише за умови додавання у середовище оптимальної концентрації. Низька концентрація канаміцину не уможливорює виділення канаміциностійких форм, висока — пригнічує ріст навіть трансформованих рослин-регенерантів.

Більшість отриманих канаміциностійких регенерантів за дії селективного агента характеризувалася нормальним розвитком. Проте траплялися рослини-мозаїки, що мали тканини, тією чи іншою мірою позбавлені хлорофілу (див. рис. 2, *е*). Наявність таких регенерантів може свідчити, що утворення пагона відбувається з групи клітин (із яких частина трансформується, а частина залишається незмінною), або, що в частині клітин порушується експресія чужорідних генів. Частина індукованих пагонів не містила хлорофіл, була нездатна формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина пагонів містила хлорофіл, але під час перенесення на поживне середовище для укорінення поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Крім того, спостерігали утворення псевдостійких рослин, які спочатку зберігали зелене забарвлення, але у подальшому новоутворені листки формувалися безбарвними.

Після формування рослинами-регенерантами розгалуженої кореневої системи (див. рис. 2, *є*) їх переносили на адаптацію до умов ґрунту. Рослини висаджували у пластикові стаканчики, наповнені ґрунтовою сумішшю з чорнозему, нейтралізованого торфу та піску (див. рис. 2, *ж*).

Із калюсних культур, трансформованих за участі штаму LBA4404, залежно від генотипу отримали від 7 до 10 зелених пагонів (табл. 2). Тобто, частота отримання канаміциностійких пагонів залежно від генотипу варіювала від 2,3 до 3,3 %. За використання штаму AGL0 кількість таких пагонів була дещо більшою — у генотипу УК 065 вона становила 2,7 %, УК 997/19 — 4,3 %.

Генетична конструкція pBi2E містить гетерологічний РНК-супресор гена *pdh*, тому за допомогою ПЛР визначили наявність

ТАБЛИЦЯ 2. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці

Генотип	Штам агробактерії	Кількість трансформованих калюсів, шт.	Кількість канаміциностійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
УК 065	LBA 4404	300	7	2,3±0,9	2	0,7±0,5
	AGL0	300	8	2,7±0,9	3	1,0±0,6
УК 95/17	LBA 4404	300	9	3,0±1,0	3	1,0±0,6
	AGL0	300	11	3,7±1,1	4	1,3±0,7
УК 97/19	LBA 4404	300	10	3,3±1,1	5	1,7±0,8
	AGL0	300	13	4,3±1,2	6	2,0±0,9

першого екзона та першого інтрона даного гена в канаміциностійких рослинах, отриманих з використанням різних штамів (рис. 3).

За результатами ПЛР-аналізу, дані послідовності виявлено у 2 із 7 проаналізованих рослин генотипу УК 065, у 3 з 9 регенерантів генотипу УК 95/17 та у 6 з 13 регенерантів генотипу УК 997/19. Отже, частота вбудовування послідовностей цільового гена *ProDH* арабідопсису за використання штаму LBA4404 у досліджених генотипів становила 0,7—1,7 %, штаму AGL0 — 1,0—2,0 %. Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *ProDH*, перевіряли на наявність гена *nrpII*. Визначено, що цей ген був у всіх досліджуваних зразках. Ми також контролювали відсутність домішок *A. tumefaciens* в досліджуваних зразках за геном *VirC*. Результати аналізу зразків ДНК отриманих рослин показали відсутність агробактеріального зараження.

Для підтвердження експресії послідовностей гена *ProDH* арабідопсису в трансгенних рослинах пшениці генотипу УК 997/19 проведено полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією. Виділену РНК трансгенних рослин використано для синтезу кДНК. Домішки ДНК у препаратах РНК виявляли ПЛР-аналізом із використанням відповідних праймерів, специфічних до референтного гена пшениці *TaG3PDH*, а також гена *ProDH* (рис. 4). Як позитивний контроль для визначення гена проліндегідрогенази використовували рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, трансформовані векторною конструкцією pBi2E.

Відсутність сигналу на доріжках 1—3 (див. рис. 4) (на виявлення гена *ProDH*) та 11—13 (на виявлення гена *TaG3PDH*) вказує на чистоту РНК-препаратів. ПЛР-аналіз у ході реакції зворотної транскрипції кДНК показав наявність експресії послідовностей гена *ProDH* арабідопсису в досліджуваних зразках (див. рис. 4, доріжки 6, 7), що засвідчує ідентифікація амплікона розміром 545 пн. Вихідний генотип УК 997/19 пшениці характеризувався відсутністю такого фрагмента (див. рис. 4, доріжка 5). Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *TaG3PDH* (кДНК, синтезована за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин пшениці) підтвердила наявність ампліконів розміром 507 пн для кДНК як для трансгенних рослин (див. рис. 4, доріжки 9, 10), так і для вихідного генотипу пшениці (див. рис. 4, доріжка 8). У тих самих пробах, але без викорис-

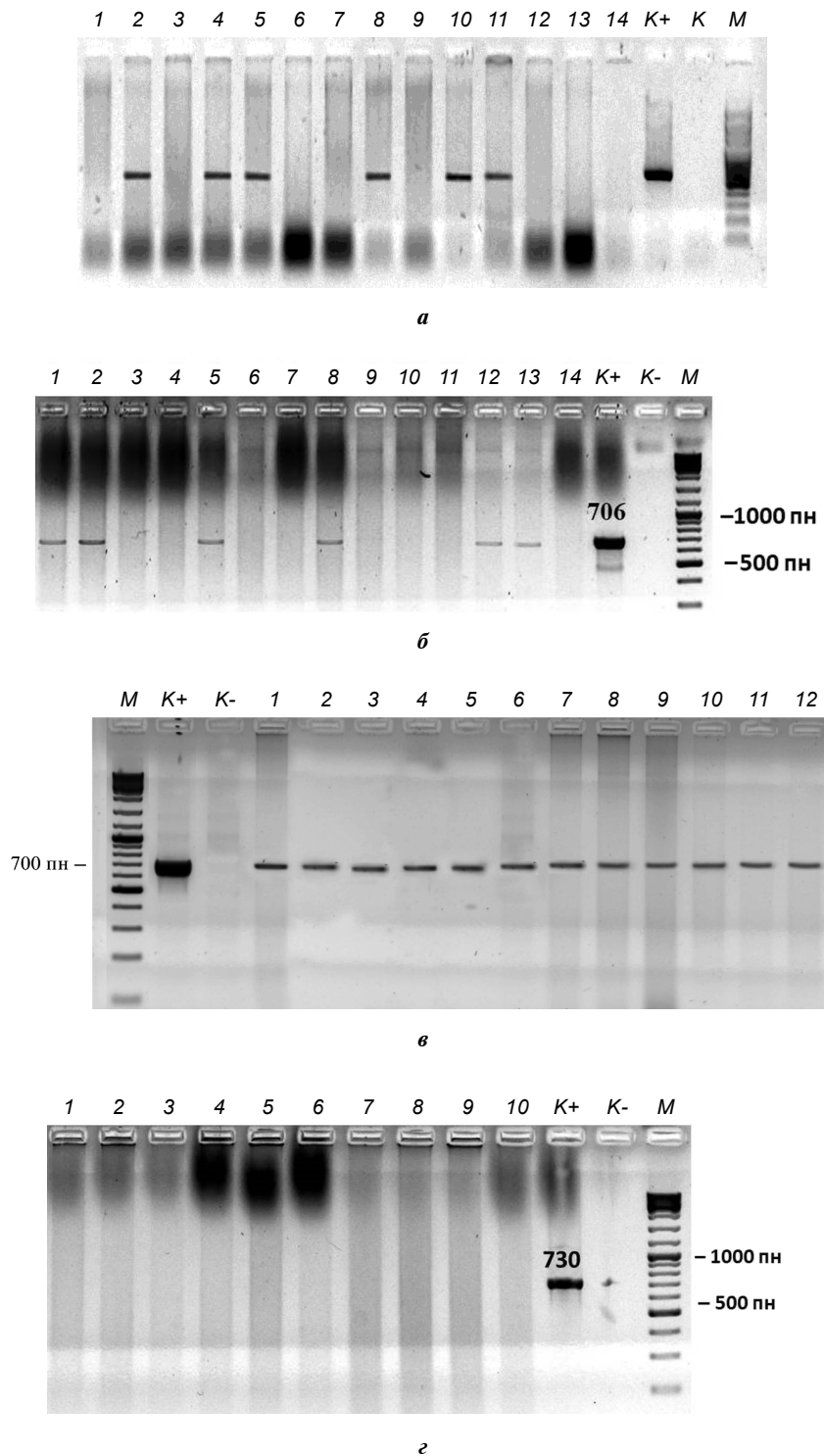


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці генотипу УК 997/19 з праймерами до генів:

а — першого екзона гена *ProDH*; *б* — першого інтрона гена *ProPDH*; *в* — гена *nptII*; *г* — гена *virC*; 1–14 — досліджувані зразки; *K+* — позитивний контроль (*Agrobacterium tumefaciens*); *K-* — не-трансформована пшениця (негативний контроль); *M* — маркер DNA LadderMix

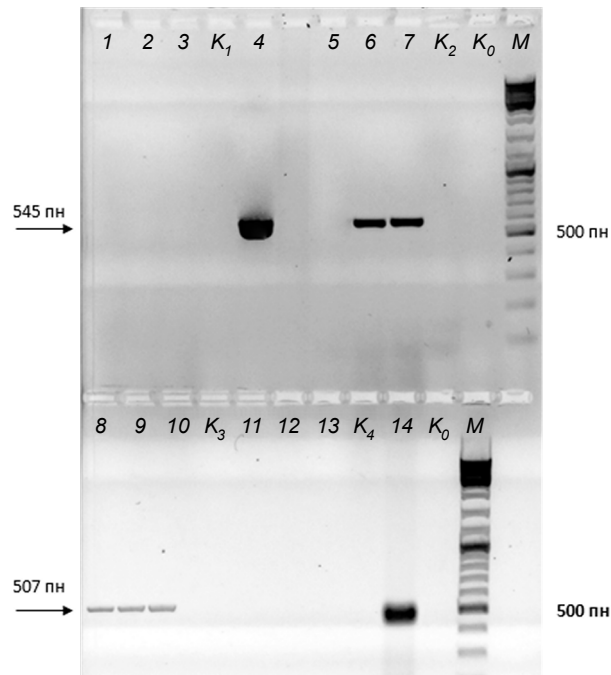


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації зворотних транскриптів на перший екзон гена *ProDH*:

1 — контроль, РНК пшениці (вихідний генотип УК 997/19), без інвертази; 2, 3 — РНК (зразки трансгенної пшениці генотипу УК 997/19), без інвертази; 4 — позитивний контроль (кДНК, синтезована з РНК трансгенної рослини *Nicotiana tabacum*, трансформованої плазмідною рВі2Е); 5 — контроль, РНК пшениці (вихідний генотип УК 997/19), з інвертазою; 6, 7 — РНК (зразки трансгенної пшениці генотипу УК 997/19) з інвертазою; на ген *actin*: 8 — контроль, РНК пшениці (вихідний генотип УК 997/19), з інвертазою; 9, 10 — РНК (зразки трансгенної пшениці генотипу УК 997/19), з інвертазою; 11 — контроль, РНК пшениці (вихідний генотип), без інвертази; 12, 13 — РНК (зразки трансгенної пшениці генотипу УК 997/19), без інвертази; 14 — позитивний контроль (кДНК, синтезована з РНК трансгенної рослини *Nicotiana tabacum*, трансформованої плазмідною рВі2Е). K_1 – K_4 — контроль без матриці РНК (після гідролізу ДНК); K_0 — ТЕ-буфер (без додавання ДНК); M — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

тання реверсивної транскриптази, такі амплікони були відсутні (див. рис. 4, доріжки 11–13). Проведені дослідження підтвердили експресію генів *ProDH* у трансгенних рослинах пшениці генотипу УК 997/19, отриманих *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією в культурі *in vitro*.

Щоб оцінити, якою мірою часткова супресія гена *ProDH* впливає на рівень вільного проліну, визначили його вміст у зелених листках регенерантів вихідних і трансгенних рослин, що росли 4 тижні на стандартному середовищі (табл. 3). Вміст вільного *L*-проліну в листках рослин-регенерантів вихідних генотипів коливався від $0,215 \pm 0,025$ мг/г сирої речовини у генотипу УК 065 до $0,286 \pm 0,031$ мг/г сирої речовини у генотипу УК 997/19. У трансгенних рослин цей показник був у 1,5–1,7 раза вищим, відповідно $0,357 \pm 0,034$ мг/г сирої речовини у генотипу УК 065 та $0,428 \pm 0,039$ мг/г сирої речовини у генотипу УК 95/17. Отже, наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* підвищує рівень накопичення вільного *L*-проліну порівняно з нетрансгенними.

ТАБЛИЦЯ 3. Вміст вільного проліну в листках регенерантів вихідних генотипів і трансформантів

Генотип	Вміст вільного проліну, мг/г сирової речовини	
	Контроль	Трансформанти
УК 065	0,215±0,025	0,357±0,034
УК 95/17	0,268±0,030	0,412±0,042
УК 997/19	0,286±0,031	0,428±0,039

Таким чином, методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів ми отримали генетично модифіковані рослини нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази. Показано порівняно більшу ефективність використання штаму AGL0 для отримання трансгенних рослин різних генотипів озимої пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази в культурі *in vitro*. Частота вбудовування послідовностей цільового гена *ProDH* арабідопсису за використання штаму LBA4404 у досліджених генотипів становила 0,7—1,7 %, штаму AGL0 — 1,0—2,0 %. Трансгенний статус отриманих рослин-регенерантів підтверджено методом ПЛР-аналізу. ЗТ-ПЛР з використанням сумарної РНК довела експресію введеного гена *ProDH* арабідопсису на рівні транскрипції у трансгенних рослинах пшениці. Встановлено, що рослини зі зниженою активністю проліндегідрогенази характеризуються достовірно вищим вмістом вільного *L*-проліну порівняно з нетрансгенними рослинами.

REFERENCES

- Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60, No. 6, pp. 1537-1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
- Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H., Duveiller, E., Reynolds, M. & Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5, pp. 291-317. <https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y>
- Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Sharma, A., Ramakrishnan, M. & Sharma, A. (2020). The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied Science*, 10, No. 16, pp. 5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>
- Kiriziy, D.A. & Stasik, O.O. (2022). Effects of drought and high temperature on physiological and biochemical processes, and productivity of plants. *Fyziolohiya rastenyi i henetyka*, 54, No. 2, pp. 95-122 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2022.02.095>
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. & Stanca, A.M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Research*, 105, No. 1, pp. 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.07.004>
- Khan, S., Anwar, S., Yu, S., Sun, M., Yang, Z. & Gao, Z. (2019). Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, p. 3350. <https://doi.org/10.3390/ijms20133350>
- Bapela, T., Shimelis, H., Tsilo, T.J. & Mathew, I. (2022). Genetic improvement of wheat for drought tolerance: progress, challenges and opportunities. *Plants*, 11, p. 1331. <https://doi.org/10.3390/plants11101331>
- El-Mouhamady, A., El-Hawary, M. & Habouh, M. (2023). Transgenic wheat for drought stress tolerance: a review. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 12, No. 1, pp. 77-94. <https://doi.org/10.36632/mejar/2023.12.1.7>

9. Wang, K., Liu, H., Du, L. & Ye, X. (2017). Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnology Journal*, 15, pp. 614-623. <https://doi.org/10.1111/pbi.126603>
10. Joshi, R., Anwar, K., Das, P., Singla-Pareek, S. & Pareek, A. (2017). Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. *Wheat Biotechnology*. Springer: New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5
11. Anwar, A., Wang, K. & Wang, J. (2021). Expression of *Arabidopsis* ornithine aminotransferase (*AtOAT*) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Reports*, 40, No. 7, pp. 1155-1170. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-175437/v1>
12. Dubrovna, O.V., Priadkina, G.O., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2021). Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- δ -aminotransferase gene. *Agricultural Science and Practice*, 8, No. 1, pp. 25-39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
13. Mykhalska, S.I., Komisarenko, A.G. & Kurchii, V.M. (2021). Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability. *Fakty i eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmv*, 28, pp. 94-99 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
14. Hossain, M.A., Hoque, M.A., Burritt, D.J. & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In Ahmad, P. (Ed.). *Oxidative Damage to Plants. Antioxidant Networks and Signaling*; Academic Press is an imprint of Elsevier, pp. 477-521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
15. Kolupaev, Yu.E., Vainer, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Seriya Biologiya*, 2, No. 32, pp. 6-22 [in Russian]. <https://repo.btu.kharkov.ua/handle/123456789/9047>
16. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Andleeb, Z., Vaishali, S., Mukesh, Y. & Upadhyay, R. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5, No. 12, p. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
17. Mansour, M.M.F. & Ali, E.F. (2017). Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry*, 140, pp. 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
18. Tishchenko, E.N. (2013). Genetic engineering with use of L-proline metabolism genes for increase the of plants osmotolerance. *Fiziol. rast. genet.*, 45, No. 6, pp. 488-500 [in Ukrainian]. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
19. Dubrovna, O.V., Mikhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2022). Using of proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology and Genetics*, 56, No. 4, pp. 361-378. <https://doi.org/10.3103/S009545272204003X>
20. Bharathi, J., Anandan, R., Benjamin, L., Muneer, S. & Prakash, M. (2023). Recent trends and advances of RNA interference (RNAi) to improve agricultural crops and enhance their resilience to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 194, pp. 600-618. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.035>
21. Bilir, O., Gol, D., Hong, Y., McDowell, J.M. & Tor, M. (2022). Small RNA-based plant protection against diseases. *Frontiers in Plant Science*, 13, p. 951097. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.951097>
22. Halder, K., Chaudhuri, A., Abidin, M.Z. & Datta, A. (2023). Tweaking the small non-coding RNAs to improve desirable traits in plant. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, No. 4, p. 3143. <https://doi.org/10.3390/ijms24043143>
23. Hernandez-Soto, A. & Chacon-Cerdas, R. (2021). RNAi crop protection advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, No. 22, p. 12148. <https://doi.org/10.3390/ijms222212148>
24. Kaur, R., Choudhury, A., Chauhan, S., Ghosh, A., Tiwari, R. & Rajam, M. (2021). RNA interference and crop protection against biotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, No. 10, pp. 2357-2377. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01064-5>
25. Rajam, M.V. (2020). RNA silencing technology: A boon for crop improvement. *Journal of Biosciences*, 45, pp. 118-122. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00082-x>

26. Tateishi, Y., Nakagama, T. & Esaka, M. (2005). Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique. *Physiologia Plantarum*, 125, pp. 1399-3054. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00553.x>
27. Tishchenko, O.M., Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I., Sergeeva, L.E., Adamenko, N.I., Morgun, B.V. & Kochetov, A.V. (2014). Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using the LBA4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*, 48, No. 4, pp. 218-226. <https://doi.org/10.3103/S0095452714040094>
28. Mykhalska, S.I., Sergeeva, L.E., Matveeva, A.Y., Kobernik, N.I., Kochetov, A.V., Tishchenko, E.N. & Morgun, V.V. (2014). The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. *Fiziol. rast. genet.*, 46, No. 6, pp. 482-489 [in Russian]. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159462>
29. Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I., Kurchii, V.M. & Tishchenko, O.M. (2016). The characterization transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants with suppressor of proline dehydrogenase gene. *Fakty eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmiv*, 19, pp. 143-147 [in Ukrainian]. <https://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Fakty/article/view/653>
30. Sparks, C., Doherty, A. & Jones, H. (2014). Genetic transformation of wheat via Agrobacterium-mediated DNA delivery. *Methods in Molecular Biology*, 1099, pp. 235-250. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_19
31. Dubrovna, O.V. & Morgun, B.V. (2018). Current status of research of Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Fiziol. rast. genet.*, 50, No. 3, pp. 187-217 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>
32. Mamrutha, H.M., Kumar, R., Venkatesh, K., Sharma, P., Kumar, R., Tiwari, V. & Sharma, I. (2014). Genetic transformation of wheat — present status and future potential. *Journal Wheat Research*, 6, No. 2, pp. 107-119. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/JWRRReview>
33. Kumléhn, J. & Hensel, G. (2009). Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Science*, 59, pp. 553-560. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.59.553>
34. Bovol, A.V., Dubrovna, O.V. & Lyalko, I.I. (2007). Regeneration of plants from the explants of the top of wheat seedlings shoots. *Visnyk Ukrayinskoho tovarystva henetykiv i selektsioneriv*, 5, No. 1-2, pp. 3-10 [in Ukrainian].
35. Sidorov, V. & Duncan, D. (2009). Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods in Molecular Biology*, 526, pp. 47-58. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4
36. Box, M., Coustham, V., Dean, C. & Mylne, J. (2011). Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. *Plant Methods*, 7, pp. 1-10. <http://www.plantmethods.com/content/7/1/7>
37. Dubrovna, O.V. & Slivka, L.V. (2020). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation of perspective winter wheat genotypes in vitro. *Fakty eksperymentalnoy evolyutsiyi orhanizmiv*, 26, pp. 190-195 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1264>
38. Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soils*, 39, pp. 205-207. <https://dx.doi.org/10.1007/BF00018060>
39. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W. & Sticklen, M. (2002). Shoot apical meristem: in vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro Cellular & Development Biological Plant*, 38, No. 2, pp. 163-167. <https://doi.org/10.1079/IVP2001267>
40. Pat. 111284 UA. A method of increasing the regenerative capacity of callus cultures of bread wheat by Agrobacterium-mediated transformation, Dubrovna, O.V., Bovol, A.V., Goncharuk, O.M., Voronova, S.S., Publ. 10.11.2016 [in Ukrainian].

Received 14.06.2023

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PROMISING WINTER WHEAT GENOTYPES IN CULTURE IN VITRO

O.V. Dubrovna, L.V. Slivka, L.H. Velikozhon, S.S. Kulesh

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: dubrovny@ukr.net

The proline dehydrogenase (*ProDH*) gene associated with proline catabolism is of practical importance for genetic engineering, as partial inhibition of its expression can lead to an increase in the content of free proline and, as a result, the level of plant tolerance to abiotic stresses, in particular drought. The aim of our work was to carry out *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calli of new winter bread wheat promising genotypes and obtain genetically modified plants with partial suppression of the proline dehydrogenase gene. The relatively greater efficiency of using the AGL0 strain for obtaining transgenic plants of various genotypes of winter wheat with partial suppression of the proline dehydrogenase gene in culture in vitro was shown. The frequency of the *Arabidopsis ProDH* target gene sequences insertion when using the LBA4404 strain in the studied genotypes was 0.7–1.7 %, and when using the AGL0 strain — 1.0–2.0 %. The transgenic status of the obtained regenerants was confirmed by PCR analysis. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) using total RNA confirmed the expression of the introduced *Arabidopsis* proline dehydrogenase gene at the transcription level in transgenic wheat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. It was established that plants with reduced activity of proline dehydrogenase are characterized by a significantly higher content of free *L*-proline compared to the non-transgenic control.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, callus cultures, proline dehydrogenase gene.

ORCID

О.В. ДУБРОВНА — O.V. Dubrovna <https://orcid.org/0000-0002-4884-7572>

Л.В. СЛИВКА — L.V. Slivka <https://orcid.org/0000-0001-6133-4395>

Л.Г. ВЕЛИКОЖОН — L.H. Velikozhon <https://orcid.org/0000-0002-5935-9363>

С.С. КУЛЕШ — S.S. Kulesh <https://orcid.org/0009-0004-7337-000X>