

ДУБРОВНА О. В. <sup>✉</sup>, СЛИВКА Л. В.Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,  
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net<sup>✉</sup> dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

## ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ *IN VITRO* ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

**Мета.** Оптимізація умов генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація в культурі *in vitro*. **Результати.** За використання штамів LBA4404 та AGL0 досліджено вплив оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії, концентрації антибіотика цефотаксиму, тривалості кокультування на частоту отримання канаміцинстійких регенерантів нових генотипів озимої пшениці за генетичної трансформації калюсних культур. З'ясовано, що (залежно від штаму) найбільш оптимальною є концентрація агробактерій 0,2-03 опт. од., тривалість кокультування протягом 2–3-х діб та використання цефотаксиму у концентрації 250–500 мг/л. **Висновки.** Підібрано оптимальні параметри проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці.

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

В останні десятиліття спостерігається широке використання різноманітних підходів для введення екзогенної ДНК у пшеницю. Для передачі рекомбінантної ДНК у різних видів цієї культури використовується декілька методичних підходів. Генетична трансформація може бути опосередкована природним біологічним вектором, наприклад, *Agrobacterium tumefaciens* або прямою системою доставки гена (біобалістична трансформація, електропорація, мікроін'єкції, лазери, Ca<sup>2+</sup>-залежна трансформація за наявності поліетиленгліколю, використання волокон карбіду кремнію і наночастинок стільникового мезопористого кремнезему (MSN система), яка використовує фізичні, електричні або хімічні засоби для доставки генів інтересу. Найбільш поширеними методами є бомбардування мікрочастинками і спільне кокультування з *Agrobacterium tumefaciens* [1].

Використання біологічного способу доставки ДНК за допомогою *Agrobacterium* має переваги в інтеграції: дозволяє вводити порівняно велику генетичну конструкцію, забезпечує включення в геном реципієнта обмеженого числа копій чужорідного гена з високою ефективністю і призводить до мінімальних порушень у його послідовності, що зазвичай відбувається за фізичного способу доставки ДНК і потенційно призводить до меншої кількості проблем, пов'язаних із косупресією і нестабільністю трансгена [2]. Проте використання цього методу ускладнене тим, що для його ефективного застосування наявні методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Розробка відповідного методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації – дуже складне завдання, тому що важливо розуміти вагу усіх чинників, які впливають на доставку Т-ДНК в клітини, з яких може бути регенована рослина. Після регенерації необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та стабільності Т-ДНК і підвищення ефективності трансформації. Визначено декілька факторів, які впливають на ефективність Т-ДНК доставки: первинні експланти; штами *Agrobacterium*, векторні плазміди, щільність суспензії клітин *Agrobacterium*, склад живильних середовищ; умови трансформації зокрема такі, як температура і час прекультування, інокуляції та кокультування; наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів за інокуляції та кокультування; антибіотики або селективні маркери [3–7]. Крім того, значні труднощі пов'язані з тим, що клітини м'якої пшениці мало сприйнятливі до дії агробактерії. Тому розробка ефективної методики трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* є актуальною задачею. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці.

### Матеріали і методи

У дослідженнях використовували 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (УК 065; УК 95; УК 209; УК 322). Для трансформації застосовували калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [8]. Калюсні культури культивували на середовищі МС із додаванням 2 мг/л 2,4-Д.

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили з використанням векторної конструкції pVi2E, яка містить дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*) та *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II *E. coli* (штами LBA4404 та AGL0), люб'язно наданої чл.-кор. РАН, д. б. н. А. В. Кочетовим (Інститут цитології і генетики СВ РАН, м. Новосибірськ). Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину (50 мг/л) та канаміцину (100 мг/л). Для кокультивування використовували суспензію агробактерії оптичною щільністю  $OD_{660} = 0,1-0,8$ . Кокультивування тривало 1–5 діб. Подальша елімінація агробактерії проводилася за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 100–800 мг/л. У якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 50 мг/л. Калюси висаджували на регенераційне середовище і культивували до отримання пагонів. Стійкі до канаміцину рослини-регенеранти добирали протягом 2 пасажів методом прямої селекції. Канаміцинстійкими вважали регенеранти, що утворилися за дії селективного чинника, зберігали зелене забарвлення та нормально росли і розвивалися на селективному середовищі.

Екстракцію ДНК проводили з листя з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Для аналізу рослин на присутність чужорідних генів застосовували метод ПЛР. Наявність гена *pdh* визначали з використанням праймерів до першого екзону 5'-AACAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' (*pdh*-exF) і 5'-GAGATGTTGGTCTAGATTGGCAGC-3' (*pdh*-exR). ПЛР проводилася на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf згідно з програмою: початкова денатурація за 94 °С 4 хв; 35 циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 58 °С – 45 с, елонгація 72 °С – 45 с) і фінальна елонгація 72 °С – 10 хв. Очікувана довжина амплікону становить 545 п.н. Та-

кож визначали наявність гена *nptII* з використанням праймерів 5'-

5'-AGGCTATTCGGCTATGA-CTG-3' (F) та 5'-CAAGCTCTTCAGCAA-TATCACG-3'(R) за такою програмою: початкова денатурація за 94 °С 4 хв; 35 циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 54 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 35 с) та фінальна елонгація 72 °С – 10 хв. Очікувана довжина амплікона складає 700 п. н.

### Результати та обговорення

Одним із найбільш визначальних факторів, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, є вибір відповідного типу експланта. Для успішного отримання трансгенної пшениці були випробувані різні типи експлантів. Cheng і співавт. [9] повідомили про стабільну трансформацію свіжих виділених незрілих зародків, прекультивованих незрілих зародків та ембріогенного калюсу та підтвердили успішну передачу екзогенних генів у наступні покоління рослин. Крім того, були випробувані деякі інші експланти, зокрема такі, як проростки 1–4 добового віку [10], апікальні меристеми зародків сухого насіння [11], базальні частини листя [12]. Останнім часом значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найбільш перспективного експланта для злакових культур [13], оскільки його перевагою є можливість подолання генотипічних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Протягом останнього десятиліття вчені успішно працюють з апексами пагонів проростків кукурудзи, вівса, сорго, проса, пшениці та ячменю для розробки ефективних і менш залежних від генотипу систем регенерації зернових [13–16]. Нами вперше для генетичної трансформації пшениці був випробуваний морфогенний калюс, отриманий з апікальних меристем 3-х добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [17]. Отримані калюси зберігають життєздатність та морфогенну активність довше (в середньому на 3 пасажі) порівняно з культурами іншого походження та достовірно не поступаються частоті регенерації з калюсу, індукованого з незрілих зародків.

Експериментальними дослідженнями доведено, що оптимальна щільність клітин агробактеріальної суспензії для різних штамів, культур та генотипів знаходиться в діапазоні від 0,1

до 2,0 [18]. Для пшениці встановлено, що найбільша частота трансформації 4,1–12,5 % відбувається під час використання різних штамів за  $OD_{600} = 0,2-1,0$  [19]. Нами було проаналізовано різну оптичну щільність суспензії клітин агробактерії: від 0,1 до 0,8 опт. од. Для кожної концентрації було використано по 200 експлантів. Найбільш оптимального результату для штаму LBA4404 було досягнуто за використання суспензії клітин агробактерії з оптичною щільністю 0,3 опт. од., а для штаму AGL0 – 0,2 опт. од. (рис. 1). За такої оптичної щільності в подальшому вдавалося практично у всіх калюсів провести елімінацію агробактерії та отримати, порівно з іншими умовами, більшу кількість канаміцинстійких регенерантів. При цьому вихід канаміцинстійких регенерантів не перевищував 5,0 %. Збільшення концентрації бактерій у середовищі спричиняло появу некротичних плям, а також сповільнення росту та розвитку пагонів; крім того, значно ускладнювалася подальша елімінація бактерій та регенерація рослин. Застосування суспензії агробактерій з оптичною щільністю менше 0,2 опт. од. сприяло утворенню псевдостійких рослин із кількома зовнішніми зеленими листками, але наступні листки формувалися безбарвними.

Значною мірою на вбудовування ДНК впливає тривалість кокультивування калюсів з

агробактерією. Оптимальний результат для штаму LBA4404 було отримано за кокультивування калюсів з агробактерією протягом 3-х діб, у той час як для штаму AGL0 найефективнішим результатом виявилися 2 доби (рис. 2). За такої тривалості кокультивації понад 50 % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому унеможливило повну елімінацію агробактерії. При цьому спостерігалася поступова загибель калюсів внаслідок негативного впливу бактеріального забруднення. За кокультивуванні менше оптимального періоду спостерігалася зниження частоти утворення канаміцинстійких регенерантів, що, ймовірно, пов'язано з невеликою кількістю трансформованих клітин кожного калюсу.

Елімінацію агробактерії здійснювали за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 100–800 мг/л. Виявлено позитивний вплив цього антибіотика на морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [20]. Проте, зі збільшенням концентрації цефотаксиму в живильному середовищі, збільшується негативний вплив на калюсні тканини, а саме на утворення соматичних зародків. Найбільший вихід регенерантів спостерігався за концентрації цефотаксиму 250–500 мг/л, залежно від штаму агробактерії (рис. 3).

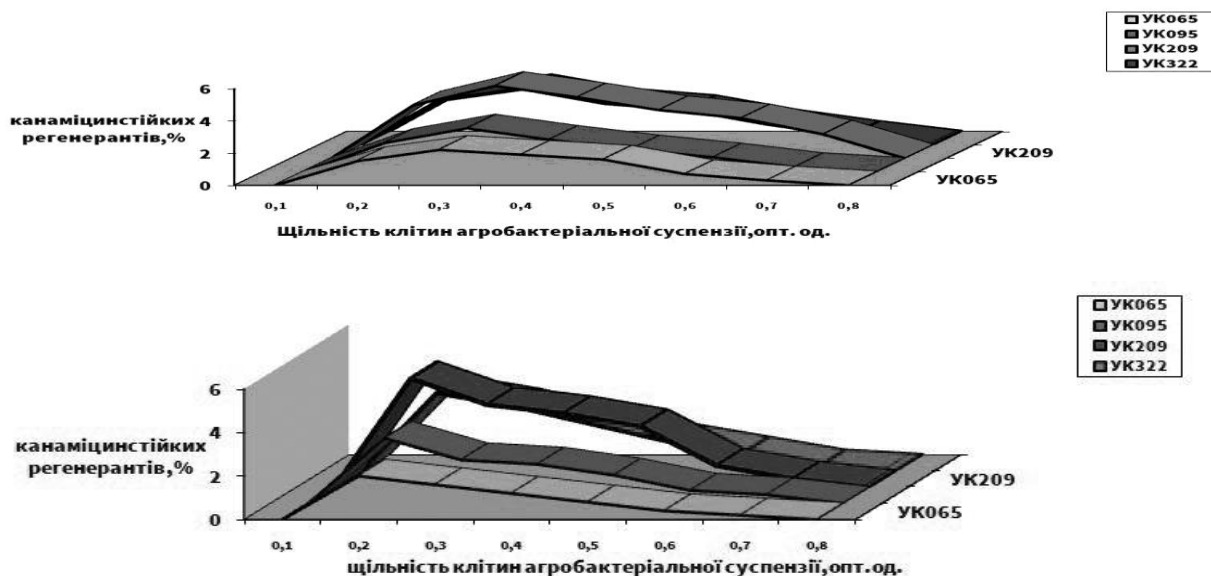


Рис. 1. Залежність індукції канаміцинстійких регенерантів від оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії: А – штаму LBA4404; Б – штаму AGL0.

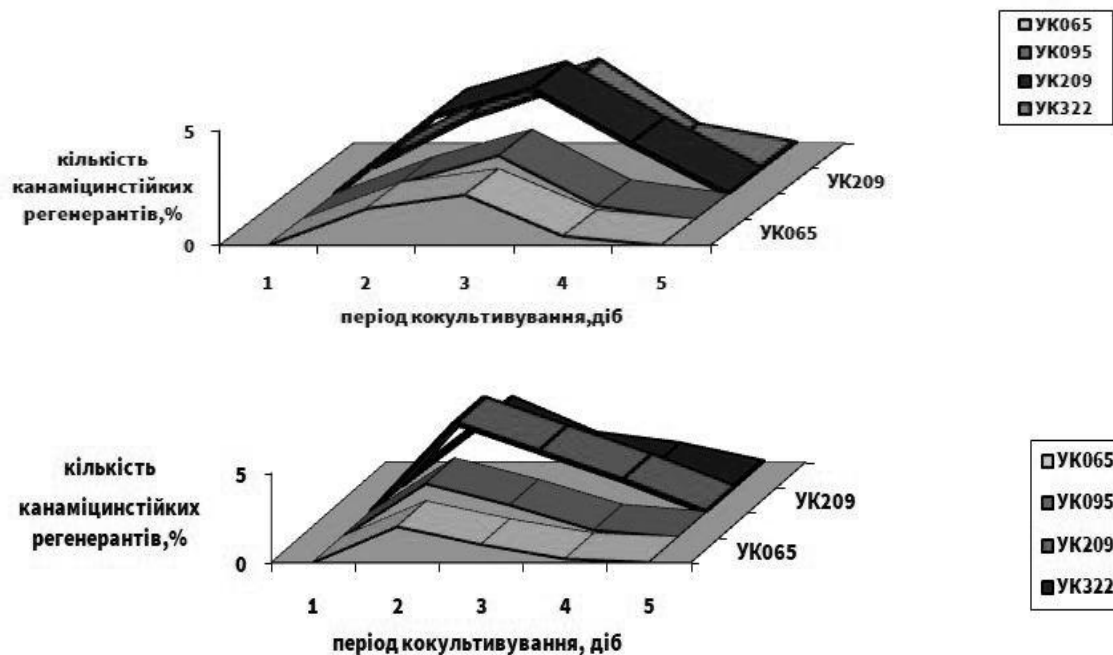


Рис. 2. Залежність індукції канамициностійких регенерантів від тривалості кокультивації: А – штам LBA4404; Б – штам AGL0.

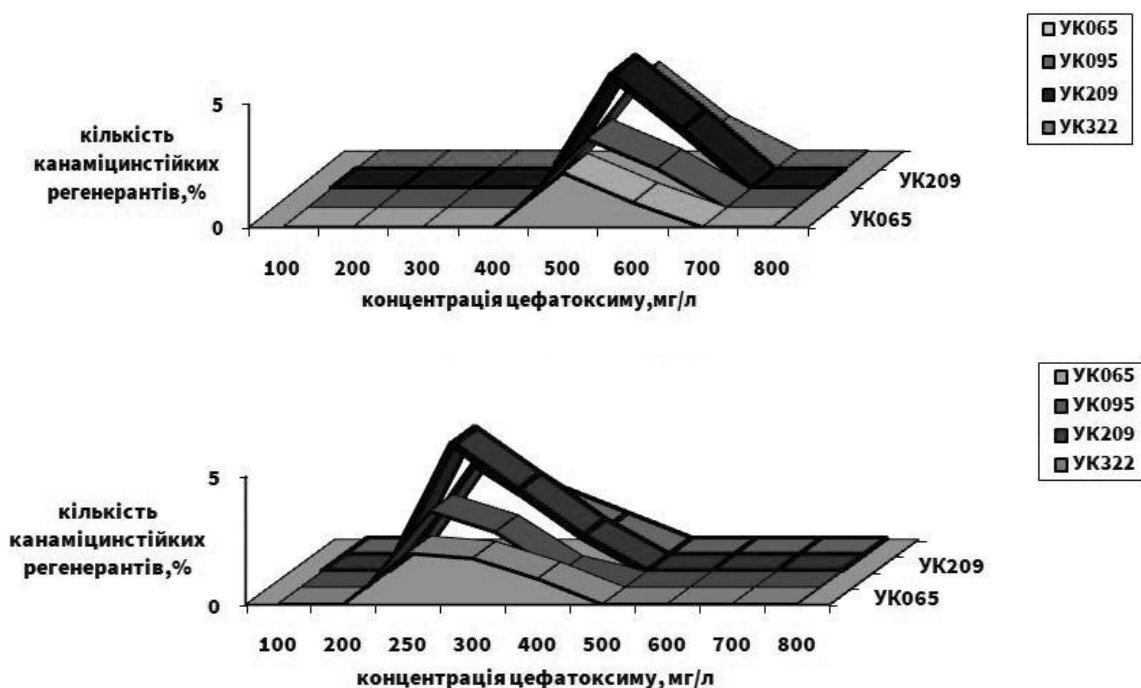


Рис. 3. Вплив концентрації цефотаксиму на частоту появи канамициностійких регенерантів сорту Зимоярка. А – штам LBA4404; Б – штам AGL0.

Концентрація антибіотика 100 мг/л виявилася недостатньою для пригнічення бактерій. Відбувався активний ріст бактеріальних колоній та загибель калюсів. За збільшення

концентрації антибіотика понад оптимум зростає негативний вплив цефотаксиму на культуру калюсів, що призводить до зменшення виходу рослин-регенерантів.

Таблиця. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці

Генотип	Штам агробактерії	Кількість канаміцинстійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
		шт.	%	шт.	%
УК065	LBA 4404	4	2,0	2	1,0±0,7
	AGL0	4	2,0	2	1,0±0,7
УК095	LBA 4404	6	3,0	4	2,0±1,0
	AGL0	7	3,5	5	2,5±1,1
УК209	LBA 4404	8	4,0	5	2,5±1,1
	AGL0	10	4,5	6	3,0±1,2
УК322	LBA 4404	6	3,0	3	1,5±0,9
	AGL0	6	3,0	4	2,0±1,0

Примітка. \* – кількість трансформованих калюсів для кожного генотипу склала 200 шт.

Згідно з оптимізованим протоколом була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці, отримані канаміцинстійкі регенеранти та здійснено молекулярно-генетичний аналіз рослин на наявність елементів векторної конструкції. Наявність першого екзона гена проліндегідрогенази була виявлена у 2–6 регенерантів залежно від генотипу (табл.). Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *pdh*, перевірялися на наявність гена *nptII*. Результат аналізу засвідчив, що названий ген був у всіх досліджуваних зразках (рис. 4).

Нами також контролювалася відсутність домішок *A. tumefaciens* у досліджуваних зразках за геном *vir C*. За результатами аналізу в зразках ДНК отриманих рослин зафіксовано відсутність агробактеріального зараження.

## Висновки

Оптимізовано умови кокультивації та елімінації бактерій за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур м'якої пшениці за використання штамів LBA4404 та AGL0. Виявлено залежність оптимальної щільності клітин суспензії агробактерій, тривалості кокультивування калюсів з агробактерією та концентрації антибіотика цефотаксиму від використаного штаму агробактерій. З'ясовано, що (залежно від штаму) найбільш оптимальною є концентрація агробактерій 0,2–0,3 опт. од., тривалість кокультивування калюсів з агробактерією протягом 2–3-х діб та використання антибіотика цефотаксиму у концентрації 250–500 мг/л. За таких умов понад 50 % калюсів зберігали морфогенний потенціал.

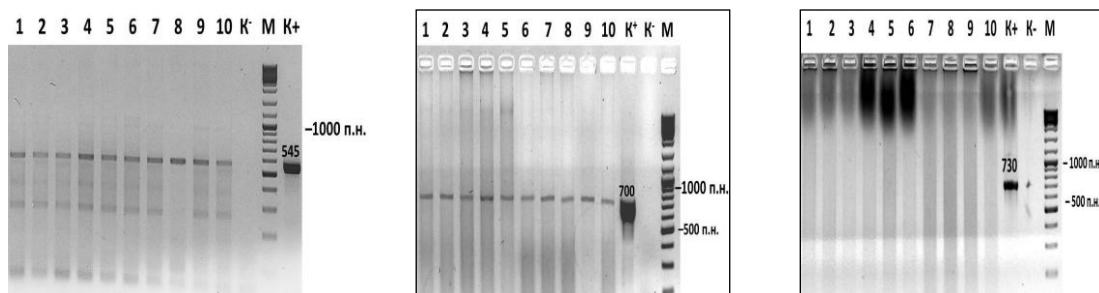


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин-регенерантів із праймерами до генів: а – 1екзону гена *pdh* арабідопсису; б – *nptII*; в – *Vir C*. Доріжки 1–10 – досліджувані зразки, К- – негативний контроль – ТЕ буфер, К+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGL0 з генетичною конструкцією pBi2E, М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

## References

- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2014.00628.
- Dubrovna O.V., Morgun B.V. Current status of research of *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant physiology and genetics*. 2018. Vol. 50, No. 3. P. 187–217. [in Ukrainian] / Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіол. рослин і генетика*. 2018, Т. 50, № 3. С. 187–217.

3. Bhalla P., Ottenhof H., Singh M. Wheat transformation an update of recent progress. *Euphytica*. 2006. Vol. 149. P. 353–366. doi.org/10.1007/s10681-006-9087-6.
4. Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae. *Breeding Science*. 2009. Vol. 59. P. 553–560. doi.org/10.1270/jsbbs.59.553.
5. Opabode J. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology*. 2006. Vol. 1. P. 12–20.
6. Chauhan H., Khuran P. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnol. J.* 2011. Vol. 9. P. 408–417. doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00561.
7. Chugh A., Vikrant A., Mahalakshmi A., Khurana P. A novel approach for *Agrobacterium*-mediated germ line transformation of Indian bread wheat (*Triticum aestivum*) and Pasta wheat (*Triticum durum*). *J. of Phytol.* 2012. Vol. 4, No. 2. P. 22–29.
8. Baval A.V., Dubrovna O.V., Lyalko I.I. Regeneration of plants from the explants of the top of wheat seedlings shoots. *Bul. Ukr. Soc. Genet. Breeders*. 2007. Vol. 5, № 1–2. P. 3–10. [in Ukrainian] / Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5, № 1–2. С. 3–10.
9. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 115. P. 971–980. doi.org/10.1104/pp.115.3.971.
10. Sparks C., Doherty A., Jones H. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol Biol.* 2014. Vol. 1099. P. 235–250. doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\_19.
11. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems. *Transgenic Res.* 1992. Vol. 1. P. 93–100. doi.org/10.1007/BF02513026.
12. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Biochem Biotechnol.* 1995. Vol. 4. P. 55–59. doi.org/10.1007/BF03262953.
13. Sharma V., Hansch R., Mendel J. Node-derived cultures with high-morphogenetic competence in barley and wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2007. Vol. 88 (1). P. 21–33.
14. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro cellular and development biology*. 2002. Vol. 38, No. 2. P. 163–168. doi.org/10.1079/IVP2001267.
15. Gorbatiuk I.R., Shcherbak N.L., Bannikova M.O., Velikozhon L.H., Kuchuk M.V., Morgun B.V. Obtaining herbicide phosphinotricin transgenic plants of wheat varieties Zymoyarka *in vitro* transformation. *Plant physiol. genetics*. 2016. Vol. 48, No. 1. P. 65–74. [in Ukrainian] / Горбатюк І.Р., Щербак Н.Л., Банникова М.О., Великожон Л.Г., Кучук М.В., Моргун Б.В. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Физиол. раст. генетика*. 2016. Т. 48, № 1. С. 65–74.
16. Sharma V., Hdnsh R., Mendel R., Schulze J. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. *Plant Cell Rep.* 2004. Vol. 23. P. 9–16.
17. Baval A.V., Dubrovna O.V., Goncharuk O.M., Voronova S.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using calli culture. *Faktory eksper. evoliucii orhanizmv.* 2015. Vol. 15. P. 16–19. [in Ukrainian] / Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 15. С. 16–19.
18. Rashid H., Afza A., Khan M., Chaudhry Z., Malik S. Effect of bacterial culture density and acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat. *Pakistan Journal of Botany*. 2010. Vol. 42. P. 4183–4189.
19. Vasil I.K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 2007. Vol. 26. P. 1133–1154. doi.org/10.1007/s00299-007-0338-3.
20. Dubrovna O.V., Baval A.V., Zinchenko M.O., Goncharuk O.M. Effect of cefotaxime on morphogenesis in the culture of apical meristems and mature embryo of wheat. *Physiol. Biochem. Cult. plants*. 2012. Vol. 44, No. 3. P. 218–224. [in Ukrainian] / Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Гончарук О.М. Вплив цефотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2012. Vol. 44 (3). P. 218–224.

#### DUBROVNA O.V., SLIVKA L.V.

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

#### OPTIMIZATION OF AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PERSPECTIVE WINTER WHEAT GENOTYPES *IN VITRO*

**Aim.** Optimization of conditions for genetic transformation of new perspective winter wheat genotypes. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation in culture *in vitro*. **Results.** The influence of the optical density of cells of the agrobacterial suspension, the concentration of the antibiotic cefotaxime, the duration of coculture on the frequency of obtaining kanamycin-resistant regenerants of new winter wheat genotypes by genetic transformation of callus cultures were investigated using LBA4404 and AGL0 strains. It is shown that depending on the strain the most optimal is the concentration of agrobacteria 0.2–0.3 o.d, duration of coculture for 2–3 days and the use of cefotaxime at a concentration of 250–500 mg/l. **Conclusions.** The optimal parameters for conducting *Agrobacterium*-mediated transformation of callus cultures of new perspective winter wheat genotypes were selected.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, callus cultures.