УДК 579.254.2:633.11 https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1272

МИХАЛЬСЬКА С. І.✉, КОМІСАРЕНКО А. Г., КУРЧІЙ В. М.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com
✉ *mykhalskasvitlana@gmail.com, (050) 380-65-15*

ТКАНИНИ НЕЗРІЛИХ ТА ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ ЯК МОРФОГЕНЕТИЧНО КОМПЕТЕНТНІ ЕКСПЛАНТАТИ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПШЕНИЦІ

Мета. Аналіз ефективності використання тканин незрілих та зрілих зародків для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* нових селекційно-цінних генотипів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) з метою їх генетичного поліпшення. ***Методи.*** Культура *in vitro*, виділення та електрофоретичне розділення ДНК, ПЛР-аналіз. ***Результати.*** Проаналізовано ефективність індукції калюсогенезу та регенерації пагонів пшениці озимої, де в якості первинних експлантатів слугували тканини незрілих зародків та двохдобових проростків зрілого насіння. Досліджено морфогенетичну реакцію калюсних культур, отриманих із різних експлантатів, за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Проведений молекулярно-генетичний аналіз регенерантів пшениці на наявність трансгенів. ***Висновки***. Тканини незрілих та зрілих зародків нових селекційно-цінних генотипів пшениці є компетентними експлантатами для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. При цьому тканини двохдобових проростів зрілих зародків пшениці характеризуються вищими морфогенетичними показниками, що сприяє отриманню більшого відсотка генетично-змінених варіантів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *in vitro*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, незрілі зародки, зрілі зародки.

На сьогодні проблема підвищення врожайності рослин в умовах дії стресових факторів навколишнього середовища набуває неабиякої актуальності. Поряд із традиційними методами селекції рослин, які спрямовані на отримання високопродуктивних сортів важливих сільськогосподарських культур, широкого застосування набувають біотехнологічні прийоми. Залучення новітніх біотехнологічних розробок молекулярної генетики дає можливість прискорити селекційний процес та сприяє генетичному поліпшенню рослин [1–4].

Розробка способів перенесення генетичного матеріалу в клітину рослини і відновлення в умовах *in vitro* повноцінних трансформантів створює можливість модифікації геномів важливих сільськогосподарських культур. У межах нашої роботи ведеться пошук генотипів із високим морфогенетичним потенціалом, відбираються та вивчаються різні органи та тканини рослин як потенційні первинні експлантати для калюсогенезу або прямої регенерації, модифікуються апробовані та створюються нові модельні системи культивування для гарантованого отримання рослин-регенерантів. При цьому встановлено, що регенераційна здатність є генотипово залежною ознакою, реалізація якої залежить від віку рослини, типу експлантата, і може відбуватися за оптимізованого складу живильного середовища [5–9].

У програмах селекційного поліпшення пшениці також все більшого значення набувають роботи з генетичної інженерії, хоча кількість генотипів, що піддаються біотехнологічним маніпуляціям, залишається обмеженою. В останні десятиріччя доведено, що клітини тканин пшениці є компетентними до генетичної трансформації, та досягнуто стабільного *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів до її геному [10–12]. Проте пшениця залишається складною культурою для проведення біотехнологічних робіт, що насамперед пов'язано з її генетичними характеристиками, включаючи дуже великий і складний геном, а також з відносною несприйнятливістю більшості генотипів до культивування та регенерації *in vitro*. Одним із ключових факторів, що впливає на ефективність отримання генетично-змінених варіантів, є вибір оптимального експлантату, оскільки для злаків саме природа експлантату визначає морфогенетичну здатність клітин до формування калюсу та регенерації рослин [13].

Перші фертильні трансгенні рослин пшениці були отримані із незрілих зародків, використання яких стало звичайною практикою в

© **МИХАЛЬСЬКА С. І., КОМІСАРЕНКО А. Г., КУРЧІЙ В. М.**

біотехнологічних маніпуляціях із цією культурою. Це пов'язано з тим, що вони мають зачатки органів із значною кількістю меристемних клітин, що є головною умовою формування *in vitro* морфогенних калюсів. При цьому широке використання незрілих зародків як експлантатів для *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів у генетичній інженерії пшениці обмежується сезонною доступністю матеріалу. Крім того, морфогенний потенціал їх калюсів зберігається нетривалий час і може залежати від генетичних особливостей донорної рослини [10, 11].

Зацікавленість до тканин зрілих зародків як об'єкта для трансформації зумовлена, перш за все, тривалим періодом (протягом року) отримання вихідного матеріалу та компетентністю до агробактеріальної інфекції клітин апікальної меристеми, з яких можуть розвиватися генеративні структури, що формують гамети [12, 14].

Дослідження, у яких поєднано пошук експлантатів із найвищим рівнем тотипотентності клітин та оптимізацією умов культивування, спрямовані на подолання генотипової залежності регенераційної здатності пшениці. Це є важливою складовою системи способів генетичної трансформації рослин. Саме низький морфогенетичний потенціал селекційно-цінних генотипів пшениці стримує широке застосування методів молекулярної біотехнології для їх удосконалення. Тому метою нашої роботи був аналіз ефективності використання тканин незрілих та зрілих зародків за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* нових селекційно-цінних генотипів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) для їх генетичного поліпшення.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були генотипи пшениці озимої: УК 322/17, УК 95/17, УК 209h, УК 065. У якості експлантатів використовували асептичну культуру тканин незрілих зародків, виділених на 10–14 добу після запилення, та тканини двохдобових проростків зрілого насіння.

Для індукції калюсогенезу використовували живильне середовище МС із додаванням вітамінів за B_5 Гамбурга, 2,4 Д і $AgNO_3$. Регенерацію пагонів здійснювали на модифікованому середовищі LS [15] з додаванням тідіазурону і 2,4 Д (LST) та LS, яке містило зеатин і дикамбу (LSZ).

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили в умовах *in vitro* з застосованням штаму *LBA*4404 з бінарним вектором pBi2E [16]. Для процедури *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовували добову культуру клітин агробактерії, оптична щільність яких за 600 нм складала 0,4–0,6 о. о. Селекцію проводили після індукції пагоноутворення, додаючи в середовище культивування антибіотик канаміцинсульфат в концентрації 100 мг/л. Для елімінації клітин агробактерії в середовище для пагоноутворення додавали 500 мг/л бактерицидного антибіотика цефотаксиму. Канаміцин-стійкими вважалися регенеранти, які витримували селективний тиск і залишалися зеленими протягом двох пасажів (тривалість пасажу – 14 діб).

Для встановлення факту інтеграції трансгенів у геном пшениці аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану з використанням у якості детергенту ЦТАБ (цетилтриетиламоній броміду). Концентрацію і чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Ефективність інтродукції чужорідної ДНК у геном пшениці перевіряли методом ПЛР, як описано нами раніше [16]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [17].

Результати та обговорення

Оскільки успішне досягнення регенерації генетично-змінених форм напряму пов'язано з ефективністю калюсогенезу, ми аналізували частоту утворення калюсних культур для обох типів досліджуваних експлантатів. Частоту калюсоутворення оцінювали як співвідношення отриманих калюсів до загальної кількості експлантатів. Частоту пагоноутворення – як відсоток регенерантів до індукованого калюсу (табл.). В цій таблиці представлені результати частоти калюсогенезу та пагоноутворення на середовищі LSZ, оскільки кількість отриманих регенерантів на ньому була вищою для обох експлантатів переважної більшості аналізованих генотипів. Винятком був генотип УК 95/17, індукція пагоноутворення із калюсу якого була вищою за наявності тідіазурону та 2,4 Д для обох типів експлантатів.

Таблиця. Частота утворення калюсних культур та пагонів пшениці озимої із різних експлантатів (%)

Генотип	Незрілі зародки			Зрілі зародки		
	Кількість експлант. (шт.)	Калюсогенез	Регенерація пагонів	Кількість експлант. (шт.)	Калюсогенез	Регенерація пагонів
УК322/17	320	65,40±2,8	39,06±0,9	560	80,20±2,0	58,70±1,3
УК 209h	245	58,20±2,5	23,80±1,4	435	63,50±3,4	39,70±1,5
УК 065	220	45,50±3,2	19,70±2,0	440	50,07±1,6	32,01±0,6
УК 95/17	280	44,80±1,7	22,20±1,1	480	47,80±2,3	29,40±0,7

Примітка. $p \leq 0,05$.

Частота індукції калюсу із незрілих зародків варіювала від майже 45 до 65 % залежно від генотипу. При цьому в ряді випадків паралельно спостерігалося і пряме проростання зародків, що є небажаним явищем для подальшої процедури трансформації. Початок формування перших пагонів фіксували після 10 доби культивування калюсів на середовищі для регенерації. Частота пагоноутворення варіювала в межах ~ 20–40 % від утворених калюсів.

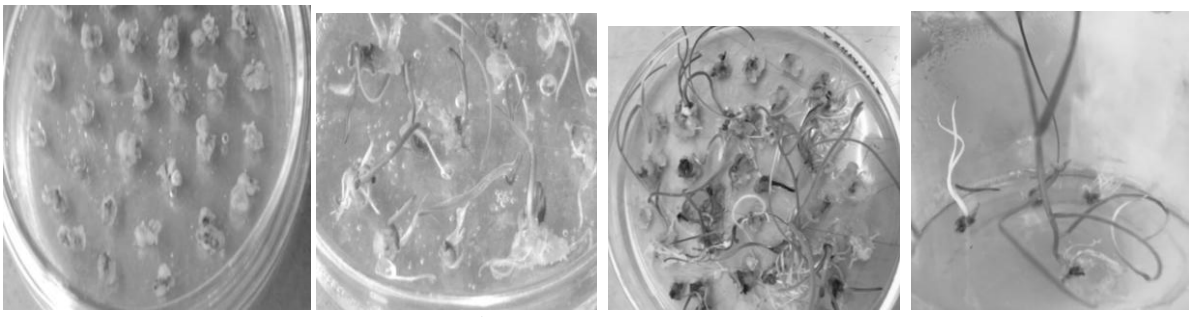
У разі використання в якості експлантатів двохдобових проростків зрілого насіння пшениці індукція морфогенних калюсів відбувалася з більшим відсотком від майже 50 % (УК 95/17) приблизно 80 % (УК 322/17), що можливо за рахунок меристемних зон зародків, які містять клітини, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу.

Калюс із тканин зрілого насіння індукували протягом 15–18 діб, після чого переносили на середовище для регенерації. Формування перших меристемних осередків спостерігалося вже на 5–8 добу, а початок індукції пагонів на 14–16 добу культивування. Слід також відмітити, що на цей період вже на одному експлантаті утворювалося по 2–3 регенеранти. Для всіх досліджуваних генотипів пагоноутворення відбувалося шляхом непрямого органогенезу. Паралельно для всіх варіантів із різною частотою спостерігався й ризогенез (рис. 1 а, б).

Значну розбіжність за частотою індукції калюсоутворення та регенерації пагонів можна пояснити тим, що ці ознаки є генотипово залежними і контролюються різними генетичними системами регуляції [13]. В наших дослідженнях доведено вплив генотипу на регенераційну здатність культивованих тканин пшениці, при цьому помічено більшу морфогенетичну здатність тканин зрілих зародків.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію пшениці проводили з використанням калюсної маси тканин незрілих та зрілих зародків. Після процедури генетичної трансформації калюс переносили на середовище для індукції регенерації з додаванням антибіотика цефотаксиму. Селекцію ймовірних трансформантів здійснювали на середовищі з канаміцинсульфатом (рис. 1 в, г).

За генетичної трансформації калюсів, отриманих із незрілих зародків пшениці, після контакту з *Agrobacterium tumefaciens* частково спостерігався некроз калюсної маси, що призводило до зменшення частоти регенерації.



а б в г

Рис. 1. Типи органогенезу: калюсогенез (а), індукція пагоноутворення (б), початок селекції трансформантів (в), відбір канаміцин-стійких регенерантів (г).

Із отриманих у результаті генетичної трансформації пагонів після двох пасажів на середовищі з селективною концентрацією канаміцинсульфату залишалися зеленими від 3 % (УК 209h) до 6 % (УК 322/17) ймовірних трансформантів. При цьому необхідно зазначити, що для генотипу УК 95/17 здебільшого спостерігалося утворення неморфогенного калюсу з повільними темпами наростання та з поодинокими випадками індукції регенерації. Такий вплив агробактеріальної культури на регенерацію рослин в умовах *in vitro* може бути пов'язаний з особливістю генотипу та гормональним складом тканини експлантату [13, 15].

Середня частота регенерації канаміцинстійких пагонів, отриманих із калюсу тканин зрілих зародків, варіювала від 6 % (УК 95/17) до 9 % (УК 322/17). Заслуговує на увагу особливість морфогенетичної відповіді в умовах *in vitro* варіанта УК 95/17. У наших дослідженнях для цього генотипу регенерація рослин із калюсу незрілих зародків суттєво знижувалася після його культивування з агробактеріальною культурою, тоді як для калюсної маси отриманої із двохдобових проростків, такого ефекту не спостерігалось, і відсоток регенерантів після генетичної трансформації був досить високим, що свідчить про залежність успішності *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для такого генотипу від вибору експлантата.

ПЛР-аналіз ДНК канаміцин-стійких рослин підтвердив наявність селективного та елементів цільового генів у ряді регенерантів, отриманих із різних експлантатів. При цьому найбільший відсоток трансгенних варіантів був зафіксований для генотипу УК 322/17, де в якості експлантата використовувалися зрілі тканини проростка, і становив майже 1,8 %. Для цього генотипу частота виявлення трансгенів у регенерантів із незрілих зародків була також найвищою і складала приблизно 1,0 %.

Таку різницю між кількістю проростків, що мали стійкість до селективної концентрації антибіотика, та варіантами, в яких підтверджено шляхом молекулярно-генетичного аналізу наявність трансгенів, можна пояснити як недостатнім терміном селекції в результаті прискореного періоду вегетації в культурі *in vitro*, так і певною природною стійкістю злаків до канаміцинсульфату та більшим відсотком інтеграції селективного гена в порівнянні з цільовим. Недостатня селекція також пов'язана із проблемою незадовільного укорінення регенерантів на середовищі з антибіотиком та їх втратою в процесі культивування. Раніше нами вже повідомлялися дані щодо генетичної трансформації *in vitro* сортів озимої пшениці, де в якості експлантата слугували сегменти 5–6 добових проростків. Хоча відсоток отриманих після генетичної трансформації пагонів складав приблизно 5 %, проблемою отримання фертильних рослин була відсутність ризогенезу. Незадовільне укорінення є поширеним явищем за культивування регенерантів на селективному середовищі з канаміцинсульфатом як для пшениці, так і для інших культур [7].

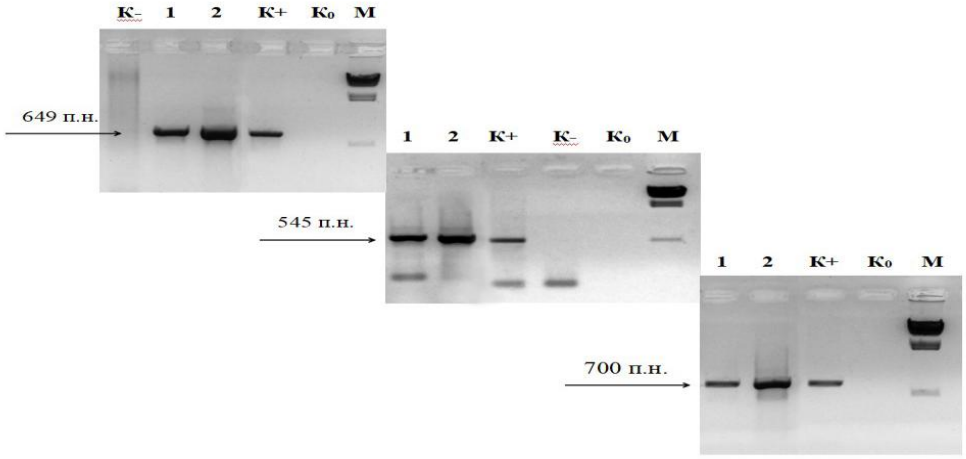


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікації сумарної ДНК зразків пшениці з праймерами до генів: *nptII* (649 п. н.); *pdh ex1* арабідопсису (545 п. н.); *pdh int* арабідопсису (700 п. н.). 1–2 – зразки генетично-зміненої пшениці; К- – пшениці не трансформованої; К+ – ДНК *A. thaliana*; $К_0$ – ТЕ-буфер; М – маркер молекулярної маси ДНК *л,* гідролізована *Hind* III.

Незважаючи на те, що для більшості аналізованих генотипів отримана досить висока частота регенерації пагонів із незрілих зародків, все ж існує ряд проблем, які обмежують можливості використання цього типу експлантата для генетичної трансформації пшениці. Зокрема, це схильність до некрозу калюсу, сезонна доступність матеріалу та складність отримання фертильних рослин. Тканини зрілих зародків пшениці характеризуються більшою морфогенетичною відповіддю як в процесі культивування *in vitro*, так і за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Висновки

Дослідження тканин незрілих та зрілих зародків пшениці нових селекційно-цінних генотипів у якості експлантатів для генетичних маніпуляцій показало їх компетентність до *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. При цьому ефективність формування калюсів із високою регенераційною здатністю залежить від використаного експланта і зумовлена вибором генотипу. Зниження морфогенної здатності калюсів, отриманих із незрілих зародків, у процесі культивування з патогеном *Agrobacterium tumefaciens* накладає певні обмеження на використання експлантата цього типу. Тканини двохдобових проростів зрілих зародків пшениці характеризуються високими морфогенетичними показниками і здатністю до агробактеріального інфікування.

References

1. Jauhar P. Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. *Crop science*. 2006. Vol. 46. P. 1841–1859.
2. Morgun B.V., Tishchenko E.N. Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. 2014. Kyiv: Logos, 219 p. [in Russian] / Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурних злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. 219 с.
3. Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E. Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*. 2016. Vol. 28. P. 1510–1520.
4. Wang K., Riaz B., Ye X. Wheat genome editing expedited by efficient transformation techniques: progress and perspectives. *The Crop Journal*. 2018. Vol. 6, № 1. P. 22–31.
5. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2006. Vol. 1. P. 12–20.
6. Dubrovna O.V., Morgun B.V. Current state of research of *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Fyzyolohyya rastenyy y henetyka*. 2018. T. 50, № 3. P. 187–217. [in Ukrainian] / Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опоседкованої трансформації пшениці. *Физиология растений и генетика.* 2018. Т. 50, № 3. С. 187–217.
7. Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Tishchenko O.M. Development of methods of wheat *Agrobacterium*-mediated transformation. *Faktory eksperym. evolyutsiyi orhanizmiv*. 2015. Vol. 17. P. 213–216. [in Ukrainian] / Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Тищенко О.М. Розробка методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 213–216.
8. Goncharuk O.M., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Morphogenesis in the apical meristem culture of shoots of high-yielding winter wheat varieties. *Fyzyolohyya rastenyy y henetyka.* 2014. T. 46. P. 245–251. [in Ukrainian] / Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенез в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46. С. 245–251.
9. Liu X., Liu J., Guo A., Zhao H. Study on the tissue culture and plant regeneration of different explant from wheat. *J. of Triticeae Crops.* 2008. Vol. 28. P. 568–572.
10. Ishida M., Tsunashima Y., Hiei Y., Komari T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *In Agrobacterium Protocols*. 2015. Vol. 1223. *Of Methods in Molecular Biology*. New York: Springer New York. P. 189–198.
11. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006. Vol. 102, № 3. P.162–170.
12. Wang M., Xu G., Yin L., Tao D., Wang X.Ye. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues. *Cereal Research Communications*. 2009. Vol. 37. P. 1–12.
13. Shrawat A.K., Armstrong C.L. Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2018. Vol. 37, № 5. P. 335–421.
14. Sticklen M.B., Oraby H.F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2005. Vol. 41. P. 187–200.
15. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature protocols*. 2007. Vol. 2, № 7. P. 1614–1621.
16. Tishchenko E.N., Komisarenko A.G., Mykhalskaya S.I., Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using strain LBA4404 carrying the pBi2E plasmid with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Tsitologiya i genetika*. 2014.

Т. 48, № 4. Р. 19–30. [in Russian] / Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.И., Моргун Б.В., Кочетов А.В. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма *LBA4404*, несущего плазмиду pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Цитология и генетика*. 2014. Т. 48, № 4. С. 19–30.

17. Dospekhov B.A. Methods of field experiment. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p. [in Russian] / Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

MYKHALSKA S.I., KOMISARENKO A.G., KURCHII V.M.
Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

TISSUES OF IMMATURE AND MATURE EMBRYOS AS MORPHOGENIC COMPETENT EXPLANTS FOR GENETIC TRANSFORMATION OF WHEAT

Aim. To analyze the efficiency of using tissues of immature and mature embryos for *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro* of new breeding-valuable genotypes of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) for the purpose of their genetic improvement. ***Methods***. Culture of *in vitro*, extraction and electrophoresis of DNA, PCR analysis. ***Results.*** The efficiency of induction of callusogenesis and regeneration of winter wheat shoots was analyzed. The morphogenetic response of callus cultures obtained from different explants under *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro* was investigated. Molecular genetic analysis of wheat regenerants for transgenes was performe**.** ***Conclusions***. The tissues of immature and mature embryos of novel breeding-valuable wheat genotypes are competent explants for *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*. In this case, the tissues of two daily sprouts of mature wheat germ are characterized by higher morphogenetic parameters, which helps to obtain a greater percentage of genetically modified variants.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *in vitro*, *Agrobacterium*-mediated transformation, immature embryos, mature embryos.