

СЛИВКА Л. В., ДУБРОВНА О. В.✉

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

✉ dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ НОВИХ ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Мета. Оптимізація умов проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання трансгенних рослин. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація в культурі *in vitro* з використанням калюсних культур. **Результати.** Досліджено вплив оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії, концентрації антибіотика цефотаксиму, тривалості кокульттивування на частоту отримання канаміцинстійких регенерантів нових генотипів озимої пшениці за генетичної трансформації калюсних культур. Шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці отримано рослини-регенеранти у геномі яких виявлено повне вбудовування генетичної конструкції, що містить трансгени *oat* та *nptII*. **Висновки.** Оптимізовані умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримані трансгенні рослини з цільовим геном орнітин-д-амінотрансферази.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, калюсні культури, ген орнітин-д-амінотрансферази.

Пшениця є однією з основних продовольчих культур світу, яка вирощується на більш ніж 17 % орних земель і споживається приблизно 40 % населення світу [1]. Поширеність цієї культури зумовлена її високою біологічною пластичністю щодо екологічних умов і, перш за все, високою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів. Незважаючи на загалом зростаючу тенденцію виробництва пшениці в світі, кліматичні зміни, що призводять до значних температурних перепадів, непередбачуваних опадів або посух та появи нових рас патогенів і шкідників, неабияк позначаються на її врожайності. Поява нових загроз і

кліматичних змін вимагає більш швидкого реагування на створення сортів, стійких до екстремальних факторів довкілля. Роботи з генетичної трансформації різних видів *Triticum* проводяться в багатьох лабораторіях світу з використанням різних експлантів і бінарних векторів, промоторів і генів, що беруть участь у відповіді на біотичні і абіотичні стресові чинники. Метод трансформації, опосередкований *Agrobacterium tumefaciens*, є найвідомішим і часто використовується для створення трансгенних рослин пшениці в основному завдяки таким перевагам, як проста інтеграція, менша трудомісткість і економічна ефективність [2, 3]. Проте використання цього методу ускладнене тим, що для його ефективного застосування чинні методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом.

Ген орнітин-д-амінотрансферази кодує фермент ОАТ (КФ 2.6.1.13), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (П5К) та глутамату [4], і задіяний у системі взаємоперетворень таких амінокислот, як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний з фіксацією, накопичення і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресів, регуляцією процесів розвитку [5–7]. Тривалий час вважалося, що орнітин-д-амінотрансфераза бере участь у синтезі проліну під час стресу [8], проте багато дослідників спростовують це твердження і постулюють, що ген *oat* регулює деградацію орнітину і пов'язані із системою рециркуляції азоту [5]. Деякі дані свідчать про участь гена *oat* в інших життєво важливих клітинних процесах [9]. Потенційно орнітин-д-амінотрансфераза може бути важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну і шлях біосинтезу поліамінів.

© СЛИВКА Л. В., ДУБРОВНА О. В.

Введення екзогенного гена орнітин-д-амінотрансферази в геном пшениці є одним із перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Встановлено, що його надекспресія підвищувала рівень стійкості рослин рису і тютюну до водного дефіциту та засолення [8, 10]. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калусів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання генетично-модифікованих рослин із гетерологічним геном орнітин-д-амінотрансферази.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (УК 065; УК 95; УК 209; УК 322). Для трансформації брали калуси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [11]. Калусні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили з використанням штаму AGLO, що містить бінарний вектор pVi-OAT з цільовим геном орнітин-д-амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний – неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Ця конструкція люб'язно надана чл.-кор. РАН д. б. н. Кочетовим А. В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення 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 $OD_{600} = 0,1-0,5$. Калус обробляли бактеріальною суспензією протягом 20 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (приблизно 30 шт.) на живильне середовище для кокультивування [12]. Кокультивування тривало 1–5 діб. Подальша елімінація агробактерії проводилася за допомогою антибіотика цефотаксиму за концентрації 200–700 мг/л. У якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 50 мг/л. Культивування калусів проводили за температури 24° С і 16-годинного фотоперіоду. Кожні 10 діб пасажували калуси на свіже регенераційне середовище. Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на живильне середовище для вкорінення. Вкорінення

тривало 3–4 тижні. Рослини з достатньо розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в горщики з ґрунтом. Канаміцинстійкими вважали регенеранти, що утворилися за дії селективного чинника та зберігали зелене забарвлення.

Молекулярно-генетичний аналіз рослин здійснювали ПЛР-методом. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплексу реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводилася на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакційні суміші містили: 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 *oat* визначали з використанням праймерів 5'-CAGTGCCCAACAATT-ACCATCC-3' (RTF) та 5'-CGAACTTCTTCCCAATCACAAGCCA-3' (RTR). Очікувана довжина амплікону становить 706 п. н. Також, визначали наявність гена *nptII* з використанням праймерів 5'-AGGCTATTCGGCTATGA-CTG-3' (F) та 5'-CAAGCTCTTCAGCAA-TATCACG-3'(R). Очікувана довжина амплікона складає 700 п. н.

Результати та обговорення

Нами було проаналізовано різну щільність суспензії клітин агробактерії: від 0,1 до 0,5 опт. од., оскільки за збільшення значення оптичної щільності спостерігався надмірний ріст *A. tumefaciens*, в результаті чого відбувалася загибель експлантів. Для різних генотипів найбільш ефективним було використання бактеріальної суспензії клітин оптичною щільністю 0,2–0,3 опт.од., проте вихід канаміцинстійких регенерантів не перевищував 3 % (рис. 1). За використання бактеріальної суспензії клітин із щільністю 0,2–0,3 опт. од. в подальшому майже в 100 % калусів вдалось провести повну елімінацію агробактерії та отримати порівняно максимальну кількість регенерантів. Вища концентрація (понад 0,3 опт. од.) клітин бактеріальної суспензії в середовищі спричиняла появу некротичних плям, тому доводилося зменшувати тривалість кокультивування, що було пов'язано з ускладненнями під час елімінації агробактерії.

При цьому знижувалася імовірність вбудовування Т-ДНК.

Значною мірою на вбудовування Т-ДНК впливає тривалість спільного культивування калюсів з агробактерією. Для різних генотипів оптимальним виявилось кокультивування протягом 2–3 діб (рис. 2). При цьому відсоток отриманих морфогенних калюсів становив приблизно 50 %. За меншого від оптимального періоду кокультивування спостерігалось зниження частоти утворення канаміцинстійких регенерантів, що, ймовірно, пов'язано з невеликою кількістю трансформованих клітин кожного калюсу. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому призводило до неможливості повної елімінації агробактерії. При цьому спостерігалась поступова загибель калюсів внаслідок негативного впливу бактеріального забруднення.

Елімінацію агробактерії здійснювали за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 200–700 мг/л. Нами виявлений позитивний вплив невелих концентрацій (50–75 мг/л) цього антибіотика на морфогенез у культурі

апикальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [13]. Проте зі збільшенням концентрації цефотаксиму в живильному середовищі збільшується його негативний вплив на калюсні тканини, а саме на утворення соматичних зародків. Найбільший вихід регенерантів у всіх досліджених генотипів спостерігався за концентрації цефотаксиму 500 мг/л (рис. 3). Концентрація антибіотика 200–300 мг/л виявилась недостатньою для пригнічення агробактерій – відбувався активний ріст бактеріальних колоній та загибель калюсів. За збільшення концентрації антибіотика понад оптимум зростає негативний вплив цефотаксиму на культуру калюсів, що призводило до зменшення виходу рослин-регенерантів.

Виходячи з результатів, отриманих протягом попередніх дослідів, для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було застосовано оптимізований протокол. Для підвищення ефективності перенесення генів до інокуляційного середовища часто додають хімічну речовину – ацетосирінгон, оскільки вважається, що ця сполука активізує *vir*-гени.

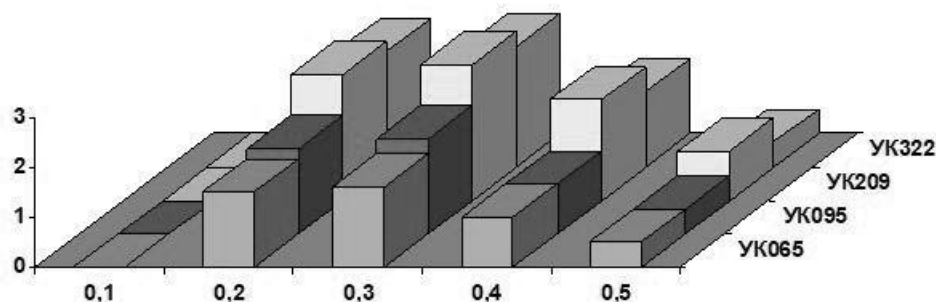


Рис. 1. Залежність індукції канаміцинстійких регенерантів від оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії.

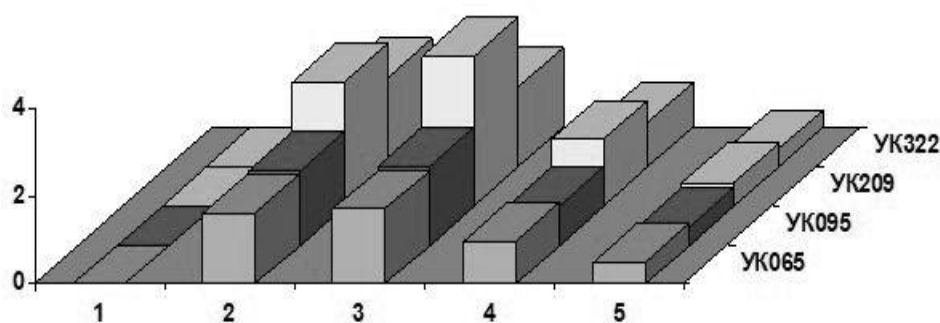


Рис. 2. Залежність індукції канаміцинстійких регенерантів від тривалості кокультивуації.

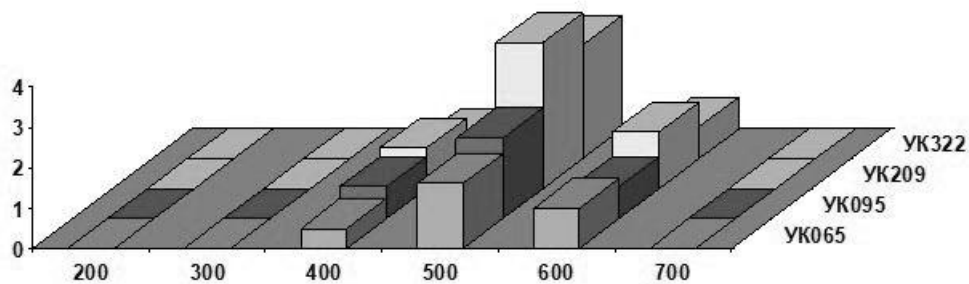


Рис. 3. Вплив концентрації цефотаксиму на частоту появи канаміцин-стійких регенерантів сорту.

За літературними даними, наявність ацетосирінгону є визначальним фактором для успішного проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації багатьох культур, в тому числі і злаків [14]. У досліджах ми використовували концентрацію ацетосирінгону 200 μ M, яка вважається оптимальною для злакових культур [12].

Етап селекції є одним із найбільш важливих, оскільки дозволяє виділити стійкі до селективного агента форми. Для рослин, які несуть екзогенний ген *nptII*, у якості селективного чинника, найчастіше використовують антибіотик канаміцин. Використання цього антибіотика є ефективним лише за умови додавання в середовище оптимальної його концентрації. Низька концентрація канаміцину не надає можливості виділити канаміцин-стійкі форми, а висока – пригнічує ріст навіть трансформованих рослин-регенерантів. Нами було використано цей антибіотик у концентрації 100 мг/л, оскільки вважається, що ця доза є найбільш оптимальною для добору [12].

Для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації згідно з оптимізованим протоколом було виділено 400 апікальних меристем. Коли калюси набули розміру 4–5 мм діаметром, їх використовували для досліджень. Для індукції морфогенезу та регенерації, трансформовані калюси переносили на регенераційне середовище МС-131 [15]. Для елімінації клітин *Agrobacterium* використовували цефотаксим у концентрації 500 мг/л.

Наприкінці першого пасажу почали відбуватися регенераційні процеси: утворювалися перші пагони. Індукція пагонів йшла поступово, була розтягнута протягом 3-х пасажів. Утворені пагони пересаджували для добору канаміцин-стійких регенерантів на селективне середовище з 100 мг/л канаміцину. Більшість отриманих канаміцин-стійких регенерантів за дії селективного

агента характеризувалася нормальним розвитком. Проте траплялися рослини-мозаїки, що в тій чи іншій мірі містили тканини, позбавлені хлорофілу. Наявність таких регенерантів може бути свідченням того, що утворення пагона відбувається з групи клітин (із яких частина трансформується, а частина залишається незмінною) або того, що в частині клітин порушується експресія чужорідних генів. Частина індукованих пагонів характеризувалася відсутністю хлорофілу, нездатністю формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина пагонів містила хлорофіл, однак під час перенесення на живильне середовище для укорінення поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Крім того, помічено утворення псевдостійких рослин, які спочатку зберігали зелене забарвлення, але в подальшому новоутворені листки формувалися безбарвними.

Оскільки генетична конструкція рВі-ОАТ, якою трансформували калюси, містить цільовий ген *oat*, то за допомогою ПЛР було проведено визначення наявності послідовності цього трансгена в рослинах-регенерантах. За результатами аналізу (рис. 4), послідовності гена орнітин-д-амінотрансферази виявлено у 3–10 регенерантів залежно від генотипу (табл.). Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *oat*, перевіряли на присутність гена *nptII*. Відповідно до результатів, позитивний сигнал наявності послідовності гена неоміцинфосфотрансферази II – амплікон розміром 700 п. н. – виявлено, залежно від генотипу, також у 3–10 рослин-регенерантів. Із метою унеможливлення бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме гена *Vir C*. Довжина очікуваного амплікона складає 730 п. н. Результати аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції свідчать про відсутність агробактеріального забруднення в рослинних зразках.

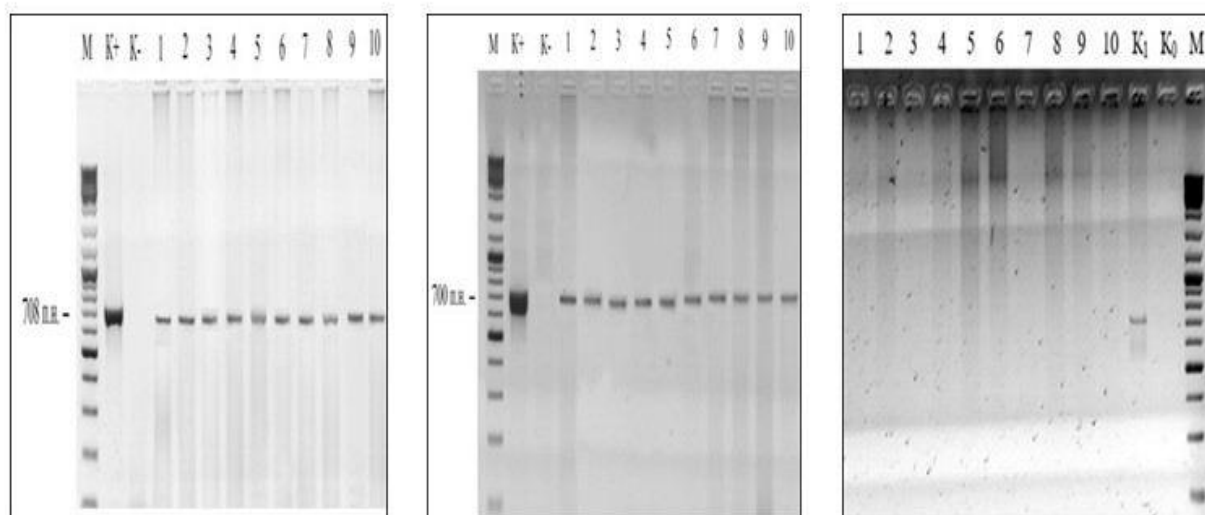


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин-регенерантів з праймерами до послідовностей генів: а – *oat*; б – *nptII*; в – *Vir C*. Доріжки 1-10 – досліджувані зразки, К- – негативний контроль – ТЕ буфер, К+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGLO з генетичною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

Таблиця. Частота трансформації морфогенних калусів м'якої пшениці*

Генотип	Кількість канаміцинстійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
	шт.	%	шт.	%
УК065	4	1,0	3	0,75±0,4
УК095	8	2,0	6	1,5±0,6
УК209	12	3,0	10	2,5±0,8
УК322	9	2,25	6	1,5±0,6

Примітка. *кількість трансформованих калусів для кожного генотипу склала 400 шт.

Після того, як рослини-регенеранти формували розгалужену кореневу систему, їх переносили на адаптацію до умов ґрунту. Рослини висаджували в пластикові стаканчики, наповнені ґрунтосумішю, яка складалася з чернозему, нейтралізованого торфу та піску. Адаптація відбувалася в умовах підвищеної вологості. Помічено, що найкраще процес адаптації відбувався за температури +5...+15°C.

Висновки

Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калусних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримано трансгенні рослини, які несуть цільовий ген орнітин-амінотрансферази. Трансгенна природа всіх отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, характерними для генів *oat* та *nptII*. У результаті проведення генетичної трансформації, залежно від генотипу, отримано від 3 до 10 трансгенних рослин. Ефективність трансформації для досліджених генотипів становить 0,75–2,5 %.

References

1. Shewry P.R. Wheat. *J. of Exp. Bot.*, 2009. Vol. 60, No. 6. P. 1537–1553. doi.org/10.1093/jxb/erp058.
2. Mamrutha H.M., Kumar R., Venkatesh K., Sharma P., Kumar R., Tiwari V., Sharma I. Genetic transformation of wheat – present status and future potential. *J. of Wheat Research*. 2014. Vol. 6 (2). P. 107–119.
3. Binka F., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection Cassettes. *J. of Applied Genetics*. 2012. Vol. 53. P. 1–8. doi: 10.1007/s13353-011-0064-y.

4. Stranska J., Kopečný D., Kopečná M., Šňágaroff J., Sebelá M. Biochemical characterization of pea ornithine-daminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*. 2010. Vol. 92 (8). P. 940–948.
5. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol*. 2008. doi: 10.1186/1471-2229-8-40.
6. Cacas R.A., Villalobos D.P., Dñaz-Moreno S.M., Cбnovas F.M., Cantyn F.R. Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine-d-Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination. *Plant Physiol*. 2008. Vol. 148. P. 77–88. doi: 10.1104/pp.108.122853.
7. Mattioli R., Costantino P., Trovato M. Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav*. 2009. Vol. 4 (11). P. 1016–1018. doi: 10.4161/psb.4.11.9797.
8. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed*. 2002. Vol. 9 (2). P. 73–80.
9. Page A., Minocha R., Minocha S. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells. *Amino Acids*. 2012. Vol. 42 (1). P. 295–308. doi: 10.1007/s00726-010-0807-9.
10. Wu L., Fan Z., Guo L., Wu L. Over-expression of an *Arabidopsis* OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Chinese Sci. Bull*. 2003. Vol. 48, № 23. P. 2594–2600.
11. 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.
12. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol*. 2009. Vol. 526. P. 47–58. doi: 10.1007/978-1-59745-494-0_4.
13. 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. *Фізіологія і біохімія культ. рослин*. 2012. Т. 44 (3). С. 218–224.
14. 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.
15. Dubrovna O.V., Baval A.V., Goncharuk O.M., Voronov S.S. A method of increasing the regenerative capacity of callus cultures of bread wheat by *Agrobacterium*-mediated transformation. Patent for utility model. No. 111284 (2016). Publ. 10.11.2016. Bul. № 21.

SLIVKA L.V., DUBROVNA O.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

GENETIC TRANSFORMATION OF NEW PERSPECTIVE WINTER WHEAT GENOTYPES *IN VITRO*

Aim. Optimization of conditions for genetic transformation of new perspective winter wheat genotypes and production of transgenic plants. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro* culture using callus cultures. **Results.** The influence of the optical density of cells of 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. By *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calluses of new perspective winter wheat genotypes were obtained plant-regenerants in the genome of which revealed the complete incorporation of a genetic construct containing *oat* and *nptII* transgenes. **Conclusions.** *Agrobacterium*-mediated transformation of callus cultures of new perspective winter wheat genotypes was optimized, and transgenic plants with the target gene of ornithine-d-aminotransferase were obtained.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, callus cultures, ornithine-d-aminotransferase gene.