


ДУБРОВНА О. В. , 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 dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ МЕТОДОМ *IN PLANTA*

Мета. Оптимізація умов проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці (*T. aestivum* L.) методом *in planta*. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація методом *in planta* за використання штаму AGL0 та векторної конструкції pVi2E. **Результати.** Досліджено вплив температури повітря, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії, доби інокуляції та складу інокуляційного середовища на частоту отримання трансгенних рослин нових генотипів озимої пшениці. Встановлено залежність частоти отримання трансгенних рослин від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму. Виявлено, що температурний режим 20–22 °С забезпечив отримання найбільшої кількості (4,7 %) трансформантів пшениці, а за зниження температури до 16–18 °С відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном і спостерігається найменша частота трансформації (0,7 %). **Висновки.** Найбільшу кількість трансформантів отримано за використання інокуляційного середовища без сахарози, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,6 оп. од. та інокуляції на третю добу після касрації колосів.

Ключові слова: *T. aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta*, оптимізація умов.

Основні способи генетичного поліпшення рослин пшениці за допомогою біотехнологічних методів, зокрема і генетичної інженерії, базуються на використанні рослинних об'єктів в умовах *in vitro*. Використання цих методів передбачає необхідність дотримання асептичних умов вирощування досліджуваного матеріалу; трудомісткі етапи отримання калюсу; регенерацію та відбір трансформованих пагонів; можлива поява соматональних варіантів; вони дають низький вихід трансгенних рослин та є економічно затратними [1, 2]. Крім того, цінні

трансгенні рослини можуть бути втрачені на етапі адаптації до нестерильних умов вирощування. У зв'язку з цим актуальним завданням є розробка методів трансформації рослин без стадії культивування *in vitro*.

Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* через відсутність етапу культивування тканин має ряд суттєвих переваг. Його використання не обмежується генотипами з високою регенераційною здатністю; він не потребує трудомістких етапів отримання і культивування ембріогенного калюсу; відсутня соматональна мінливість; виключає химерність трансформантів, які розвиваються безпосередньо із зиготи, а не із багатоклітинних меристем, які містять трансформовані та нетрансформовані клітини [3, 4]. Особливістю цього методу є те, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація може проводитися на проростках або рослинах, що вільно ростуть в умовах довкілля. Інокуляції агробактеріальною суспензією можуть піддаватися різні частини (залежно від методу) рослини. Цей спосіб генетичної трансформації сьогодні успішно використовують для різних сільськогосподарських культур, зокрема і для пшениці [5, 6]. З'ясовано, що частота трансформації пшениці за допомогою цього методу є значно вищою у порівнянні з іншими методами генетичної трансформації [7, 8].

На ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in planta* впливає багато факторів. Велике значення має температура, за якої проводять трансформацію, склад середовища для інокуляції, щільність агробактеріальних клітин, використання індукторів генів вірулентності, штам агробактерій, тип векторної конструкції [9]. Особливе значення для генетичної трансформації в умовах *in planta* має стадія розвитку рослин під час інокуляції, особливості розвитку та будова квітки, тривалість контакту рослинних тканин з агробактеріальною суспензією. На сьогодні для *T. aestivum* клітини-мішені під час *Agrobacterium*-опосеред-

кованої трансформації *in planta* не описані, також залишаються невідомими оптимальні умови та точний механізм передачі Т-ДНК у зародкові клітини.

Обробка кастрованих суцвіть рослин суспензією клітин *Agrobacterium* – сучасний метод отримання трансгенних рослин *in planta*. Він характеризується простотою у використанні, низькою собівартістю та відносно високою ефективністю. Під час використання цього методу утворюється насіння з генетично модифікованим зародком. Оскільки зародок ініціюється з єдиної клітини, то виключається можливість утворення рослин-хімер. Генетична трансформація пшениці з використанням генів метаболізму проліну становить певний інтерес, оскільки може призводити до збільшення вмісту L-проліну та підвищення рівня стійкості трансгенних рослин до абіотичних стресів, зокрема до посухи [10]. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці методом *in planta*.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (Ук 065; Ук95/17; Ук 209h; Ук 322/17). Для трансформації використовували штам виду *Agrobacterium tumefaciens* – AGL0, який містить бінарну векторну конструкцію pBi2E, до складу якої входить гетерологічний дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису, а також селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*, люб'язно надані д. б. н., чл.-кор. РАН Кочетовим А. В. (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження шляхом інокуляції кастрованих суцвіть. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка, середня довжина колосу складала 6,2 см. До початку цвітіння проводили кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування.

Інокуляцію суспензією агробактерій проводили через три-п'ять діб після кастрації. Бактеріальну суспензію для генетичної транс-

сформації *in planta* готували за модифікованою методикою Сидорова [11]. Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л за 150 об/хв. та 26 °С, в темряві на шейкері. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням за 3500 об/хв протягом 15 хв, ресуспендували в індукційному середовищі з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували за 3500 об/хв протягом 15 хв та ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке готували на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей із додаванням 200 мкМ ацетосирінгону і доводили до оптичної щільності $OD_{600} = 0,4-0,8$. До суспензії бактерій додавали 0,05 % Silvet L77, рН доводили до 4,0. Через три-п'ять діб після кастрації проводили інокуляцію суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини.

На стадії повної зрілості зерна колоси зрізали і підраховували кількість отриманого насіння. Частина насіння пророщували та у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК і виявлення послідовностей трансгенів. Молекулярно-генетичний аналіз рослин пшениці, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, здійснювали ПЛР-методом [12].

Результати та обговорення

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* залежить від низки специфічних чинників. Одними із таких є умови довкілля, які включають температурний режим. Температурний діапазон, який підходить для трансформації *in planta*, обмежується чутливістю до температури білків, що беруть участь у перенесенні Т-ДНК. Оптимальною температурою для функціонування апарату вір-залежного перенесення вважають 19 °С, не зважаючи на те, що найкращою для експресії віргенів є температура 25 °С. За температури 28 °С ефективність трансформації зменшується внаслідок негативної дії підвищеної температури на білки VirB-VirD4, що беруть участь у перенесенні Т-ДНК та білків крізь мембрану клітини. Крім того, знижується індукція білка VirD2, що

відповідає за вирізання Т-ДНК і пілотування Т-нитки. У процесі підвищення температури до 32 °С експресія *vir*-генів повністю пригнічується, оскільки відсутня активність рецепторного білка VirA. Різні дослідники наводять дещо відмінні дані щодо оптимальних значень температури: так, згідно з дослідженнями Dillen та співавт. [13], найкращі результати отримано за температури 22 °С; водночас у роботі Salas та ін. [14] найбільшу кількість трансформантів отримано за температури 25 °С. Аналіз наукових літературних даних вказує на температурний оптимум трансформації для злакових 20–25 °С, а в деяких випадках і 28 °С. Однак, під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in planta* можливість створення сприятливих температурних умов зазвичай відсутня. Температура, за якої проводять інокуляцію *Agrobacterium*, коливається в діапазоні від 22 °С до 26 °С. За даними наукової літератури, температура 18–20 °С є більш сприятливою для перенесення Т-ДНК у рослинний геном злаків (порівняно з 22–25 °С) [10].

Нами було проведено серію експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці за різних температурних режимів (рис. 1). Для різних генотипів за використання штаму AGL0 найбільша частота трансформації спостерігалася за температури 20–22 °С, а найменшу кількість трансформантів отримано за температури 16–18 °С. За температури 20–22 °С частота трансформації була у 2–3 рази вищою порівняно з температурою 16–18 °С.

Наші результати підтвердили висновок, що температура 20–22 °С є кращою для перенесення Т-ДНК у рослинний геном, оскільки (за результатами дослідження) за використання штаму AGL0 з векторною конструкцією pVi2E встановлено, що температурний режим 20–22 °С забезпечив отримання найбільшої кількості (4,7 %) трансформантів пшениці. За зниження температури до 16–18 °С відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном і спостерігається найменша частота трансформації (0,5–1,3 %). За підвищення температури до 25–27 °С частота утворення трансгенних рослин знижується і становить 2,1–3,8 %. Ймовірно, це пов'язано із блокуванням утворення *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК і для яких високі температурні показники є критичними.

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

Для інокуляції рослин *Agrobacterium tumefaciens* методами *in planta* зазвичай використовують середовища, які підходять для росту рослин, наприклад, МС, яке доповнюють різними компонентами, зокрема і сахарозою [15]. Нами проаналізований вплив концентрації сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації різних генотипів пшениці (рис. 2). У наших дослідженнях частота трансформації у варіантах із додаванням сахарози була достовірно нижчою.

За застосування сахарози більшість отриманих колосків були з ознаками грибного зараження, а отримане насіння менш виповнене, ніж у варіанті без сахарози та контролі. На наш погляд, отриманий результат можна пояснити тим, що сахароза є хорошим субстратом для розвитку сапрофітної мікрофлори, що заважає нормальному процесу запилення та запліднення.

У ході дослідження нами застосовувалися інокуляційні середовища з різною оптичною щільністю клітин агробактерій: 0,4; 0,6 та 0,8 оп. од., що готували на основі рідкого середовища МС без сахарози (рис. 3). Показано, що найвища частота трансформації спостерігалася за оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,6 оп. од. За збільшення концентрації клітин агробактерій в інокуляційному середовищі до 0,8 оп. од. частота трансформантів достовірно зменшувалася, що, можливо, зумовлено негативною дією агробактерій на рослинні клітини.

Час інокуляції суспензією агробактеріальних клітин кастрованих суцвіть також є важливим фактором трансформації в умовах *in planta*. Під час інокуляції клітини агробактерій потрапляють під покрови квіткової бруньки, а потім, можливо, потрапляють у міжклітинний простір.

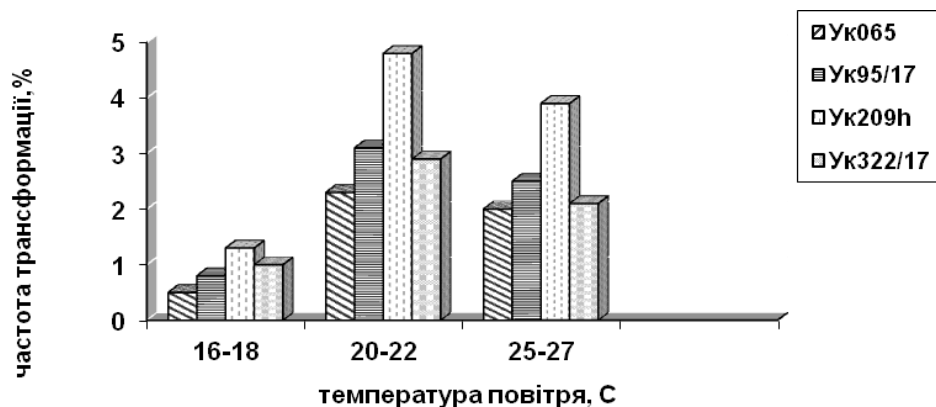


Рис. 1. Вплив температури повітря на частоту трансформації різних генотипів озимої пшениці.

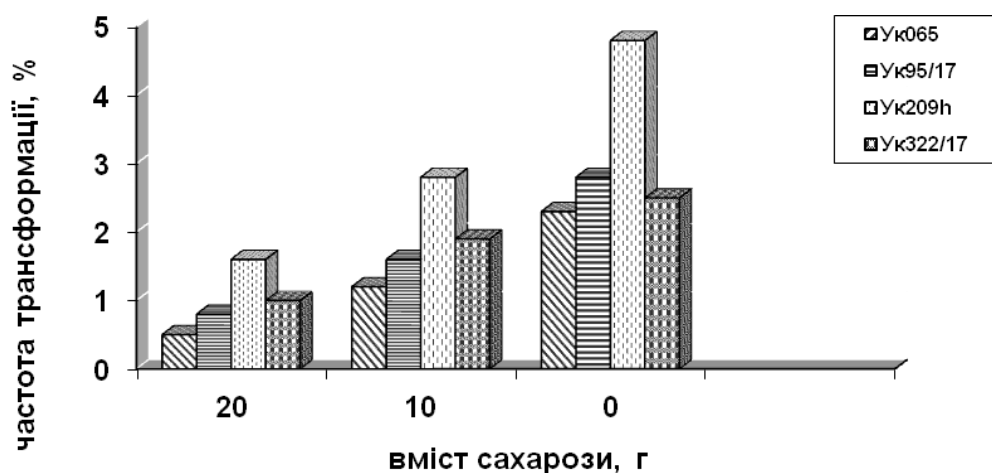


Рис. 2. Вплив вмісту сахарози в інюкаційному середовищі на частоту трансформації різних генотипів озимої пшениці.



Рис. 3. Частота трансформації різних генотипів озимої пшениці (залежно від оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії).

Певно, після інокуляції агробактеріальні клітини деякий час залишаються на поверхні рослин і здатні трансформувати клітини. Ряд дослідників вважають, що бактерії проникають у зав'язь через отвір пилкової трубки і передають Т-ДНК яйцеклітині таким чином, як туди потрапляє генеративна клітина. Проростання пилкової трубки пов'язано з активацією ферментів, які викликають руйнування клітинних стінок і полісахаридів, що містяться в міжклітинному матриці, а речовини, що утворюються під час її росту, можуть функціонувати як стимулятори віг генів і сприяти переносу Т-ДНК [10]. Нами встановлено, що більш оптимальним часом інокуляції колосів є третя доба після кастрації (рис. 4).

Висновки

Оптимізовано умови проведення генетичної трансформації нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці (*T. aestivum* L.) мето-

дом *in planta* за використання штаму AGL0 та векторної конструкції рВі2Е. Встановлено залежність частоти отримання трансгенних рослин від температурного режиму. Встановлено, що оптимальним температурним діапазоном є 20–22 °С. Такий температурний режим сприяє найбільшій частоті зав'язування насіння та отримання трансформантів. За зниження температури або її підвищення спостерігається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Встановлено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту отримання трансгенних рослин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці методом *in planta*. Найбільшу кількість трансформантів отримано за використання інокуляційного середовища без сахарози, оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,6 оп. од. та інокуляції на третю добу після кастрації колосів.

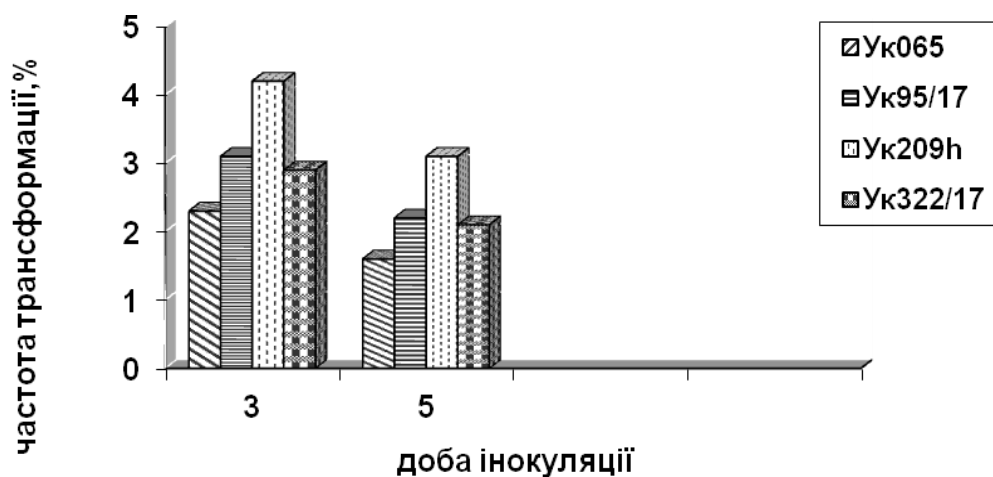


Рис. 4. Частота трансформації різних генотипів озимої пшениці (залежно від доби інокуляції).

Referenses

- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Sci.* 2014. Vol. 5. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>.
- Sparks C., Doherty A., Jones H. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1099. P. 235–250. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_19.
- Risacher T., Craze M., Bowden S., Paul W., Barsby T. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via *in planta* inoculation. *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 478. P. 115–124. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_7.
- Zale J., Agarwal S., Loar S., Steber C. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports.* 2009. Vol. 28. P. 903–913. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0696-0>.
- Borisjuk N., Kishchenko O., Eliby S., Schramm C., Anderson P., Jatayev S., Kurishbayev A., Shavrukov Y. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. *BioMed Research International.* 2019. Article ID 6216304. 18 p. <https://doi.org/10.1155/2019/6216304>.
- Agarwal S., Loar S., Steber C., Zale J. Floral transformation of wheat. *Methods in Mol. Biol.* 2009. 478. P. 105–113. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_6.
- Razzaq A., Hafiz I., Mahmood I., Hussain A. Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *African Journal of Biotechnology.* 2011. Vol. 10, No. 5. P. 740–750.

8. 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, No. 3. P. 162–170. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.162>.
9. Chumakov M.I., Moiseeva E.M. Agrobacterial transformation technology of plants in planta. *Biotekhnologiya*, 2012. No. 1. P. 8–20.
10. Moiseeva Y.M., Velikhov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method. *British Biotechnology Journal*. 2014. Vol. 4, No. 2. P. 116–125. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2014/6504>.
11. Sidorov V., Duncan D. Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 526. P. 47–58. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4.
12. Voronova, S.S., Baval, A.V., Dubrovna, O.V. In planta genetic transformation of bread wheat, using AGLO strain, containing pBi2E with dsRNA suppressor of ProDH gene. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2015. Vol. 17. P. 126–130 [in Ukrainian].
13. Dillen W., De Clereq J., Kapila J., Zambré M., Van Montagu M., Angenon G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* method of gene transfer to plants. *Plant J.* 1997. Vol. 12. P. 1459–1462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1997.12061459.x>.
14. Salas M., Park S., Srivatanakul M., Smith R. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Rep.* 2001. Vol. 20. P. 701–705. <https://doi.org/10.1007/s002990100374>.
15. Frame B., McMurray J., Fonger T., Main M., Taylor K., Torney F., Paz M., Wang K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep.* 2006. Vol. 25. P. 1024–1034. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0145-2>.

DUBROVNA O.V., SLIVKA L.V.

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

OPTIMIZATION OF AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION CONDITIONS OF PROSPECTIVE GENOTYPES OF WINTER BREAD WHEAT BY *IN PLANTA* METHOD

Aim. Optimization of conditions for genetic transformation of new promising genotypes of winter bread wheat (*T. aestivum* L.) by *in planta* method. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation by *in planta* method using the strain AGLO and vector construct pBi2E. **Results.** The influence of air temperature, optical density of cells of agrobacterial suspension, inoculation day and composition of inoculation medium on the frequency of obtaining transgenic plants of new winter wheat genotypes was studied. The dependence of the frequency obtaining of transgenic plants from environmental conditions, in particular temperature, has been established. It was found that the temperature regime of 20–22°C provided the largest number (4.8%) of wheat transformants, and when the temperature is reduced to 16–18°C there is a decrease in the efficiency of T-DNA transfer into the plant genome and the lowest frequency of transformation (0.7%). **Conclusions.** The largest number of transformants was obtained using a inoculation medium without sucrose, the optical density of cells of the agrobacterial suspension of 0.6 op.od. and inoculation on the third day after castration of ears.

Keywords: *T. aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*, optimization of conditions.