

КОМІСАРЕНКО А. Г., МИХАЛЬСЬКА С. І.✉, КУРЧІЙ В. М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0003-2081-4055, 0000-0002-6644-5921, 0000-0002-8111-2017

✉ mykhalskasvitlana@gmail.com, (050) 380-65-15

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ – СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ РОСЛИН *TRITICUM AESTIVUM* L.

Мета. Дослідити вплив *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* на зав'язування насіння і частоту трансформації в пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). Проаналізувати зміни рівня вільного L-проліну (Pro) в трансформованих і контрольних проростках в умовах норми/стресу та показники продуктивності біотехнологічних рослин (Т1) за нормальних умов вирощування. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta*; ПЛР-аналіз, електрофорез ДНК; визначення частоти зав'язування насіння і трансформації, вмісту Pro, показників структури врожаю. **Результати.** Отримано трансгенні рослини пшениці. Досліджено рівень Pro в тестованих варіантах за умов норми/стресу та показники продуктивності Т1 рослин та їх вихідної форми за оптимального водопостачання. **Висновки.** Встановлена сприйнятливість досліджуваних генотипів пшениці до агробактеріального інфікування. Частота зав'язування насіння після генетичної трансформації становила 12,7 % і 5,4 % для рослин УК 106/19 і УК 171/19h відповідно. Трансгенні проростки мали підвищений рівень Pro. Повне вбудовування векторної конструкції було ідентифіковано відповідно в 14 і 11 варіантах генотипів УК 161/19 та УК 171/19h. Контрольні і Т1 біотехнологічні рослини за нормальних умов вирощування мали схожі показники врожаю.

Ключові слова: озима пшениця, трансгенні рослини, пролін, частота зав'язування насіння, структурний аналіз врожаю.

У програмах селекційного поліпшення важливих сільськогосподарських культур все більшого значення набувають роботи з генетичної інженерії, одним із перспективних напрямів якої є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація в рослинний геном рекомбінантних молекул ДНК. Проте успішне застосування цього способу потребує вдосконалення та адаптації

для роботи з конкретним рослинним матеріалом.

Отримання генетично модифікованих рослин шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації – це складна задача з багатьма невідомими та непередбачуваними наслідками. Здається, що для її вирішення достатньо мати об'єкт дослідження і рекомбінантний штам із плазмідним вектором, але кінцевий результат самої події трансформації може бути неочікуваним. Наприклад, рослини з трансгенним статусом отримані, а насправді інтегрований ген інтересу не є функціональним. Однією із причин цього може бути потрапляння його в неактивну зону ядерного хроматину. Під час вбудовування чужорідної ДНК в ядерний геном вона може зазнавати істотних змін, що суттєво впливає на рівень експресії транс гена, інсерція якого може порушити первинну структуру будь-якого власного гена рослини хазяїна і тим самим викликати його інактивацію. В наступних поколіннях такий ген може перейти в гомозиготний стан і виявитися мутацією, що проявиться фенотипово [1].

Іншою важливою проблемою генетичної інженерії може бути замовкання трансгенів, яке пов'язане з явищем сайленсінгу, що відбувається відразу або після експресії в кількох поколіннях. Більш того, така подія може мати відношення не тільки до трансгенів, але й до гомологічних їм ендогенних генів. Водночас рівень мовчання їх може бути варіабельним, що залежить від типу конструкції, цільового гена, кількості трансгенних копій, що інтегровані в геном [2].

Безумовно прикро, коли ознака гена інтересу не проявляється, але більш невдалим наслідком є те, що в результаті генетичних маніпуляцій можуть погіршитися інші цінні характеристики вже трансформованих рослин, оскільки завданням ефективною генетичною модифікацією рослин є покращення окремих показників, яке б не призводило до негативного впливу на інші господарсько-цінні ознаки [3]. У багатьох робо-

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

тах дослідники вказують на ті чи інші проблеми, пов'язані з отриманням генетично змінених рослин [2; 4; 5]. У нашому випадку вони стосуються як вибраного об'єкта, так і векторної конструкції, про що свідчать попередньо отримані результати [6]. Однак на ефективність генетичної трансформації впливають й інші супутні чинники, від яких залежить кінцевий результат, – отримання біотехнологічних рослин із стабільною експресією цільового гена [5–8].

Отже, важливість проблеми вдосконалення способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta Triticum aestivum* L. не втрачає своєї актуальності, особливо коли дії патогена (*A. tumefaciens*) підлягають клітини генеративних тканин. У зв'язку з цим насамперед необхідним є дослідження впливу рекомбінантного штаму з векторною конструкцією на зав'язування насіння та частоту трансформації, а потім на функціональність інтродукованого гена в поколіннях, що відображається на показниках продуктивності біотехнологічних рослин пшениці озимої.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для генетичних маніпуляцій слугували рослини озимої пшениці генотипів УК 106/19 і УК 171/19h. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили з використанням штамів *A. tumefaciens* LBA4404 і AGLO, що несуть бінарний вектор pVi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) *Arabidopsis thaliana* в умовах вегетаційного дослідження за схемою: кастрування → сокультивування з агробактеріальною культурою → запилення [7].

Результативність події трансформації спочатку аналізували за показником зав'язування насіння, потім за наявністю рекомбінантних молекул ДНК в геномі рослин пшениці. Відбір індивідуальних трансформантів проводили *in vitro* за ознаками експресії маркерного і цільового генів. Одночасно в середовище культивування, що моделює умови водного дефіциту (0,5М маніту) або засолення (2,0 % солей морської води), додавали 50 мг/л (AGLO) або 100 мг/л (LBA4404) антибіотика канаміцину сульфату, який блокує роботу гена неоміцинофсфотрансферази, і бактерицидний антибіотик цефотаксим (500 мг/л).

У проростків, які витримували стресове навантаження протягом двох пасажів та залишалися стійкими до дії селективного агента, перевіряли інтеграцію трансгенів (наявність усіх фрагментів цільового гена) шляхом полімеразно-ланцюгової реакції. Вміст вільного L-проліну визначали за модифікованою методикою Чинарда [9]. Відбір зразків для структурного аналізу проводили у фазі повної стиглості насіння [10]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [11].

Результати та обговорення

Основною вимогою до способу генетичної модифікації рослин є отримання трансформантів, у яких успадковується в поколіннях характеристика, набута в результаті трансгенезу, що позитивно відображається на цінних господарських показниках культури. Застосування цього підходу потребує удосконалення всіх ланок протоколу та пристосування до конкретного виду рослини і генотипу. Оскільки патогенної дії *A. tumefaciens* зазнають безпосередньо клітини генеративних тканин, важливим насамперед є дослідження впливу рекомбінантних штамів різного типу та умов проведення процедури трансформації на розвиток зернівок.

Так, аналіз частоти зав'язування насіння показав, що відповідна реакція рослин досліджуваних генотипів *Triticum aestivum* була неоднозначною (табл. 1), причому загальна кількість отриманого насіння свідчить про негативний вплив агробактеріального інфікування на процес його формування. Всього було отримано 1013 Т0 зернівок, зокрема для УК 106/19 – 633 шт., а для УК 171/19 h – 380 шт.

Із табличних даних видно, що для генетичної трансформації рослин пшениці генотипу УК 106/19 (у порівнянні з УК 171/19h) була задіяна майже вдвічі менша кількість колосків, при цьому отримано насіння (за умов проведення однакових робочих прийомів) було більше на 48 %. Загалом рослини генотипу УК 106/19 відзначалися вищим показником зав'язування насіння за використання обох досліджуваних штамів *A. tumefaciens* (LBA4404 і AGLO), що несуть векторну конструкцію pVi2E. Однак під час застосування останнього частота зав'язування насіння знижувалася в 2,2 раза. У рослин генотипу УК 171/19h цей показник був однаковий і в середньому складав 5 %.

Таблиця 1. Частота зав'язування насіння в рослин пшениці озимої після генетичної трансформації *in planta*, %

Показники	УК 106/19			УК 171/19h		
	4404 pBi2E	AGLO pBi2E	Середнє значення	4404 pBi2E	AGLO pBi2E	Середнє значення
Кількість трансформованих колосків (шт.)	57	60	58,5 ±1,5	105	64	84,5±20,5
Кількість отриманого насіння (шт.)	427	206	316,5±110,5	223	157	190±33,0
Вихід насінин із колоса (шт.)	7,5	3,4	5,5±2,0	2,1	2,5	2,3±0,2
Зав'язування насіння (%)	17,4	7,9	12,7±4,8	4,9	5,8	5,4±0,4

У зв'язку з негативними подіями за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням різних типів векторних конструкцій [6; 12; 13], коли ідентифікації за маркерним геном недостатньо, тестування трансгенних форм здійснюють, створюючи модельні системи добору [14]. В нашому випадку культивування біотехнологічних рослин за дії осмотичних стресів (засухи і засолення) та аналіз вмісту в них вільного L-проліну можуть бути надійною системою селекції рослин із функціональним трансгеном. Крім того, такий підхід дозволяє дослідити реакцію тестованих рослин на різні види стресу та пов'язати її зі змінами рівня Pro, який у клітинах багатьох видів рослин виконує функцію осмоліта, а коливання його вмісту важливі для швидкої адаптації рослин до змін у режимі вологозабезпечення (рис. 1) [15].

Рівень цієї амінокислоти в трансформованих проростках за нормальних умов культиву-

вання перевищував показники вихідних форм в 1,9–2,4 раза. В умовах осмотичного стресу життєздатність генетично змінених і контрольних варіантів також поєднувалася зі збільшенням вільного L-проліну. Так, у проростків вихідної форми в умовах водного дефіциту і засолення його рівень підвищувався в 2,6 і 5,2 раза та 3,5 і 4,7 раза (відповідно для генотипів УК 106/19 і УК 171/19h), тоді як у трансформованих формах різниця була меншою в 2–3 рази за осмотичного та 3–4 рази за сольового стресів. Імовірно, такої кількості Pro достатньо для захисту основних макромолекулярних комплексів клітин на початкових етапах негативного впливу, оскільки ефективність виживання залежить не тільки від стабілізації процесів життєдіяльності, а й забезпечується швидкістю активізації захисних механізмів.

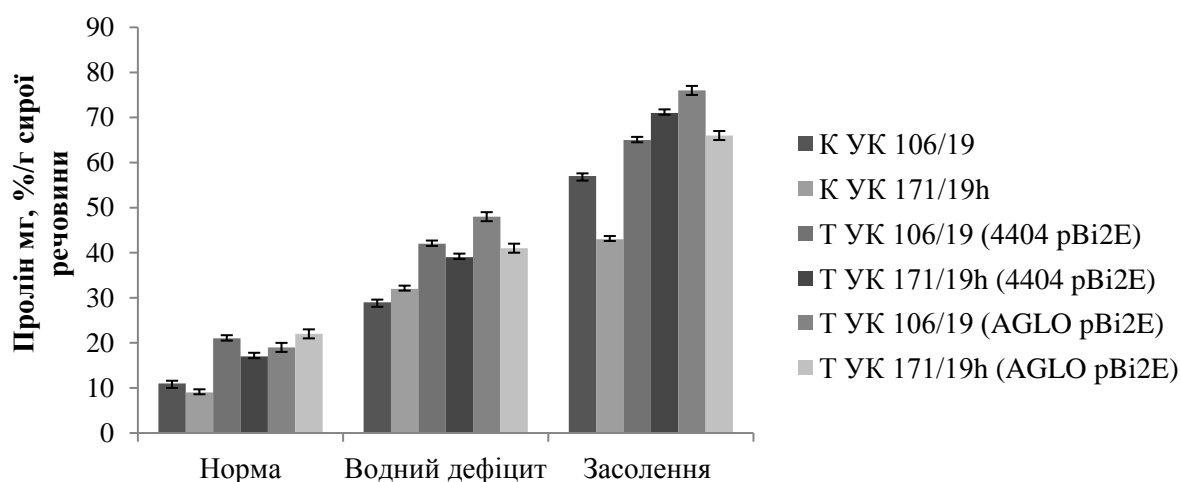


Рис. 1. Рівень вільного L-проліну в контрольних (вихідна форма) та трансформованих проростках в умовах нормального вирощування та за дії осмотичних стресів.

Відомо, що критерій зміни вмісту проліну може характеризувати фізіологічний стан рослинних організмів. Візуальна оцінка, що демонструвала втрату інтенсивності забарвлення та відставання в рості контрольних варіантів, дає можливість зробити припущення, що збільшення рівня Pго в них після стресу можливе як за рахунок його синтезу, так і за фізіологічної деструкції клітинних стінок. Збереження життєздатності генетично змінених проростків за аналогічних умов, очевидно, пов'язано з підвищенням вмісту Pго, що регулюється рівнем активності ферментів його синтезу та деградації. А можливо, саме підвищений рівень L-проліну в трансгенних формах за нормальних умов культивування здатний пом'якшити наслідки перших етапів впливу стресу, а також зменшити енергетичне навантаження на клітини та знизити ймовірність їх метаболічного самопошкодження [15].

Таким чином, застосування комбінації методів тестування є необхідним підходом, який може виявити переваги нової форми над вихідною і дозволить більш детально схарактеризувати отримані генетично змінені рослини. У випадку трансгенезу – це цінна особливість, оскільки кожна біотехнологічна рослина може мати власну унікальну властивість. Також слід брати до уваги той факт, що ефект стійкості до осмотичних стресів отриманих нами генетично модифікованих рослин ґрунтується на механізмі РНК інтерференції, і він може бути нестабільним. У зв'язку зі зміною експресії трансгена стійкість нащадків може знижуватися у порівнянні з T0. Тому необхідно аналізувати збереження цієї ознаки в наступних поколіннях.

Слід відзначити, що під час тестування досліджуваного матеріалу створення надзорських умов селекції (0,8 М маніту та 2,5 % солей морської води) спричиняло як загибель контрольних варіантів, так і, ймовірно, могло зменшувати

відсоток добору генетично змінених форм із низьким рівнем експресії трансгена.

Інтеграцію Т-ДНК досліджували за наявністю в тотальній ДНК листків пшениці екзона (*pdh ex1*) та інтрона (*pdh int*) гена проліндегідрогенази арабідопсису відповідно (рис. 2).

Молекулярно-генетичний аналіз із випадкової вибірки трансформованих зразків пшениці з використанням праймерів до фрагмента першого екзона та інтрона гена *pdh Arabidopsis thaliana* показав присутність усіх елементів векторної конструкції рВі2Е відповідно в 11 і 14 проростках генотипів УК 171/19h та УК 161/19. При цьому частота трансформації з повним вбудуванням генетичної конструкції становила 6–7 %.

Отже, підібрані селективні концентрації стресорів та аналіз рівня вільного проліну є ефективним способом добору форм пшениці із стабільною експресією трансгена. Однак тільки поєднання функціональності перенесеного гена з належними показниками продуктивності може бути результатом успішної трансформації.

Для визначення господарської продуктивності рослин пшениці проводили порівняльний аналіз показників структури врожаю першого покоління біотехнологічних рослин із вихідною формою за нормальних умов вирощування (табл. 2).

Продемонстровані дані показали, що в умовах достатнього вологозабезпечення генетично модифіковані рослини обох тестованих генотипів за елементами продуктивності достовірно не відрізняються від рослин вихідних форм. Результат був очікуваним, тому що ефект від експресії привнесених генів, більш ймовірно, має проявитися в умовах дії осмотичного стресу. Але сам факт отримання трансгенних рослин без прояву негативних або погіршення наявних ознак є позитивним наслідком події.

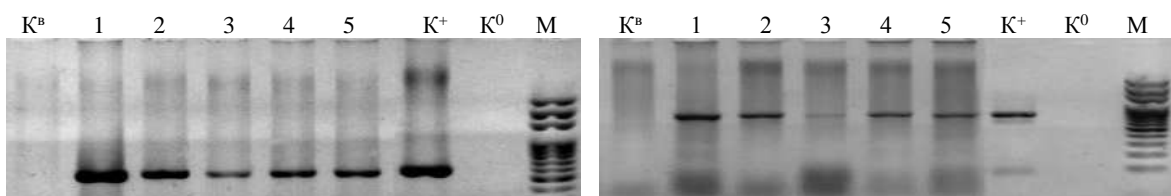


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами на визначення гена *pdhex1* та *pdh int*. Доріжки: 1–5 – № зразка ДНК біотехнологічних рослин пшениці; K^B – вихідна форма; K⁺ – позитивний контроль; K⁰ – негативний контроль (без додавання ДНК); М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix.

Таблиця 2. Структурний аналіз врожаю контрольних і T1 генетично змінених (з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази) рослин пшениці озимої за нормальних умов вирощування

Генотип пшениці	УК 106/19			УК 171/19h		
	Вихідна форма	T1 4404 pBi2E	T1 AGLO pBi2E	Вихідна форма	T1 4404 pBi2E	T1 AGLO pBi2E
ДС	84,4±2,6	88,6±1,9	83,3±3,2	78,3±4,0	77,6±2,4	80,3±3,0
КПС	4,0±1,2	4,0±1,1	4,3±1,4	4,3±1,4	4,0±1,1	4,5±1,8
ДГК	11,4±0,7	11,6±0,5	12,3±0,9	9,1±0,6	9,0±0,4	9,3±0,2
ККГК	19,6±1,1	19,3±1,6	20,3±0,8	18,6±1,0	18,4±1,4	19,0±1,2
КЗГК	76,0±6,4	74±11,2	83,4±9,5	64,7±3,2	56,6±4,8	66,7±2,7
МЗГК	3,4±0,4	3,6±0,8	3,8±0,5	3,1±0,5	2,6±0,1	2,9±0,3
МЗР	13,4±2,5	13,7±4,4	14,1±3,9	10,4±3,5	9,0±2,0	10,9±2,2

Примітки. ДС (см) – довжина стебла; КПС (шт.) – кількість продуктивних стебел; ДГК (см) – довжина головного колоса; ККГК (шт.) – кількість колосків у головному колосі; КЗГК (шт.) – кількість зерен у головному колосі; МЗГК (г) – маса зерна з головного колоса; МЗР (г) – маса зерна з рослини.

Отже, вдосконалення всіх складових протоколу отримання генетично змінених рослин шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* є перспективним напрямом як для отримання рослин із новими властивостями, так і для проведення фундаментальних досліджень у генетиці рослин, насамперед, пов'язаних із підвищенням рівня їх стійкості до абіотичних стресів.

Висновки

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів *in planta* отримані біотехнологічні рослини *Triticum aestivum* з елементами дволанцюгового РНК-супресора

гена проліндегідрогенази. Досліджено вплив рекомбінантних штамів LBA4404 і AGLO з векторною конструкцією pBi2E на показник зав'язування насіння та частоту трансформації. Створено умови гарантованого добору *in vitro* рослин із функціональними трансгенами. Досліджено рівень вільного L-проліну в генетично модифікованих і контрольних проростках в умовах норми/стресу. Виявлено, що суттєва перевага за його вмістом була на боці генетично змінених форм. Отримано насіннєве покоління T1 біотехнологічних рослин пшениці та досліджено їх основні показники продуктивності за нормальних умов вирощування.

References

- Deineko E.V. Plant Genetic Engineering. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014. Vol. 18 (1). P. 125–137. [in Russian]
- Morgun B.V., Tishchenko E.N. Molecular biotechnology to improve the resistance of cultivated cereals to osmotic stress. Kyiv: Logos, 2014. 219 s. [in Russian]
- Morgun V.V., Kirisii D.A. Prospects and modern strategies for improving the physiological characteristics of wheat to increase its productivity. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 2012. Vol. 44 (6). P. 463–483. [in Ukrainian]
- Tifira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*. 2004. Vol. 20 (8). P. 375–383.
- Dubrovna O.V., Morgun B.V. Modern *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Fiziologiya rasteny i genetika*. 2018. Vol. 50 (3). P. 187–217. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>. [in Ukrainian].
- Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Kurchiy V.M., Tishchenko O.M. Genetic transformation in planta of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Factors of experimental evolution of organisms*. 2018. Vol. 22. P. 293–298. <https://doi.org/10.7124>. [in Ukrainian]
- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci*. 2014. Vol. 5 (628). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>.
- Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Kurchii V.M. Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2021. Vol. 28. P. 94–99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.964>. [in Ukrainian]
- Andriushchenko V.K., Sayanova V.V., Zhuchenko A.A., Diyachenko N.I., Chilikina L.A., Drozdov V.V., Korochkina S.K., Cherep G.I., Medvedev V.V., Niutin, Yu.I. The modification of proline estimation method for detection drought tolerant forms of genus *Lycopersicon Tourn.* *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR*. 1981. Vol. 4. P. 55–60. [in Russian]

10. Komisarenko A.G., Mikhalskaya S.I., Kurchiy V.M. Investigation of transgene functionality in T2 biotechnological plants of winter wheat on the basis of osmostability. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2021. Vol. 28. P. 88–93. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1381>. [in Ukrainian]
11. Dospekhov B.A. Methods of field experiment. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p. [in Russian]
12. Stepanova A.Yu., Tereshok D.V., Osipova E.S., Gladkov A.E., Dolgih Yu.I. Production of transgenic wheat plants (*Triticum aestivum* L.) by agrobacterial transformation. *Biotechnologia*. 2006. Vol. 2. P. 20–27. [in Russian]
13. Gorbatyuk I.R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated biotechnology of the transformation of *Triticum aestivum* in culture *in vitro* and *in planta* method: dyss. ... cand. biol. nauk. Kyiv, 2016. 192 p. [in Ukrainian]
14. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Tishchenko O.M. Method of selection of transgenic plants with increased level of resistance to water stress. Patent for utility model 97229 Ukraine. No u07437; applied on 02.07.2014, published on 10.03.2015, bulletin № 5. [in Ukrainian]
15. Kolupaev Yu. E., Vainer A.A., Yastreb T.O. Proline: physiological functions and regulation of the content in plants under stress conditions Newsletter. *Kharkiv. nat. agrarian. un-tu. Ser. Biol.* 2014. Vol. 2. P. 6–22. [in Russian]

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION – METHOD OF GENETIC MODIFICATION OF TRITICUM AESTIVUM L. PLANTS

Aim. Investigate the effect of *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* on seed tying and the frequency of transformation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). To analyze changes in the level of free L-proline (Pro) in transformed and control seedlings under normal / stress conditions and productivity indicators of biotechnological plants (T1) under normal growing conditions. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*; PCR analysis, DNA electrophoresis; determination of seed tying frequency and transformation, Pro content, yield structure indicators. **Results.** Obtained transgenic wheat plants. The level of Pro in the tested variants under normal / stress conditions and indicators of T1 productivity of plants and their initial form under optimal water supply were studied. **Conclusions.** The susceptibility of the studied wheat genotypes to agrobacterial infection is shown. The frequency of seed tying after genetic transformation was 12.7 % and 5.4 % for plants of UK 106/19 and UK 171/19h, respectively. Transgenic seedlings had elevated levels of Pro. Complete incorporation of the vector construct was identified in 14 and 11 variants of genotypes UK 161/19 and UK 171/19h, respectively. Control and T1 biotechnological plants under normal growing conditions had similar yields.

Keywords: winter wheat, transgenic plants, proline, seed tying frequency, structural analysis of yield.