

ДУБРОВНА О. В.[✉], СЛИВКА Л. В., ВЕЛИКОЖОН Л. Г.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-4884-7572, 0000-0001-6133-4395, 0000-0002-5935-9363

[✉] dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ОТРИМАННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З ЧАСТКОВОЮ СУПРЕСІЄЮ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Мета. Отримання генетично модифікованих рослин нових перспективних генотипів озимої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази в культурі *in vitro* та визначення вмісту проліну у трансгенних та контрольних рослин. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація в культурі *in vitro*, молекулярно-генетичний аналіз; біохімічне визначення вмісту проліну; математичної статистики. **Результати.** Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці отримано трансгенні рослини, які несуть дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази. Частота трансформації за використання штаму LBA 4404 у досліджених генотипів склала 1,7-2,0 %, а при застосуванні штаму AGL0 2,0-2,3 %. Встановлено, що рослини зі зниженою активністю проліндегідрогенази характеризуються достовірно вищим вмістом вільного L-проліну порівняно з контролем. **Висновки.** Показана порівняно більша ефективність використання штаму AGL0 для отримання трансгенних рослин генотипів озимої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази в культурі *in vitro*. Наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* призводить до підвищення рівня накопичення вільного L-проліну.

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

Пшениця є однією з основних продовольчих культур світу, яка вирощується на більш ніж 17 % орних земель і споживається ~ 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 загальнозростаючу тенденцію виробництва пшениці у світі, кліматичні зміни, що призводять до знач-

них температурних перепадів, непередбачуваних опадів або посух та появи нових рас патогенів і шкідників значно позначаються на її врожайності. Для упередження негативного впливу змін кліматичних умов на продуктивність озимої пшениці необхідно створення високоврожайних сортів з високим адаптивним потенціалом, зокрема, стійких до посухи.

Сучасним напрямом створення посухостійких сортів пшениці є застосування методів генетичної інженерії. В останній час інтенсивно почали розроблятися новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів, шляхом інтеграції у геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості [2]. Для генетичного поліпшення пшениці залучаються біотехнології, пов'язані із використанням генів, що контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин – органічних молекул, здатних у значних концентраціях накопичуватися в клітинах рослин за умов стресу, і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації.

Вільний пролін є одним із найбільш багатofункціональних стресових метаболітів у рослин. Крім добре відомої функції як інертного сумісного осмоліту, пролін за дії стресорів виконує цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів, є джерелом енергії, азоту та вуглецю [3-5]. Значна увага приділяється розробці нового напрямку метаболічної інженерії рослин, який пов'язаний з ідентифікацією та аналізом структурних генів, що контролюють, зокрема, синтез та катаболізм проліну. Рівень вільного L-проліну можливо збільшити, підсиливши його синтез, або знизивши швидкість його деградації. Ген проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаний з катаболізмом проліну, має практичне

© ДУБРОВНА О. В., СЛИВКА Л. В., ВЕЛИКОЖОН Л. Г.

значення для генетичної інженерії, оскільки часткове пригнічення його експресії може приводити до підвищення вмісту проліну і, як наслідок, рівня толерантності рослин до абіотичних стресів [6].

РНК-інтерференція є ефективним природним механізмом посттранскрипційної модуляції генної експресії, яка керує активністю генів за допомогою формування коротких дволанцюгових РНК та синтезу спеціальних рибонуклеаз, що індукують селективну деградацію цільових РНК та/або інгібування їх трансляції чи реплікації [7]. Генетичний сайленсинг має велике практичне значення завдяки ролі коротких РНК як регуляторних механізмів експресії генів, оскільки рівні їх експресії перебувають у зворотній залежності з рівнем транскриптів генів-мішеней.

Технології РНК-інтерференції почали активно використовуватися у сучасній генетичній інженерії рослин. Так, були створені трансгенні форми арабідопсису зі зміненими рівнями *ProPDH* [8], які накопичували більше проліну, ніж рослини дикого типу, були більш толерантними до низьких температур та засолення. Порівняльний аналіз рослин тютюну, трансформованих з використанням векторної конструкції, що містить дволанцюговий РНК-супресор, створеної на основі гена *ProDH* арабідопсису, показав можливість підвищення рівня акумуляції проліну [9]. Рослини, що містили дволанцюговий РНК-супресор характеризувалися підвищеною толерантністю до засолення [10], що супроводжувалося накопиченням проліну у 1,2-6 разів більшим щодо нетрансгенного контролю. Є позитивний досвід введення конструкції, що містить дволанцюговий РНК-супресор гена *ProDH* арабідопсису, у рослини соняшника та кукурудзи, які у результаті накопичували у 1,5-9,0 разів більше цієї амінокислоти і відрізнялися від контрольних підвищеною толерантністю до водного дефіциту та засолення [11, 12]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було отримання генетично модифікованих рослин нових перспективних генотипів озимої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази в культурі *in vitro* та визначення вмісту проліну у трансгенних та контрольних рослин.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували 2 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці Ук322/17 та Ук997/19 з високою регенераційною здатністю. Для трансформації брали калю-

си, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [13]. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д за температури 24°C і 16-годинному фотоперіоді.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили згідно розроблено нами протоколу [14]. В експериментах з трансформації використовували штами *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 та AGL0. Рослини трансформували бінарним вектором pBi2E, що включає інвертований повтор, який складається із фрагментів двох копій першого екзону та інтрону гена проліндегідрогенази *A. thaliana*, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. У його кодуючій частині знаходяться ділянки, які мають значний рівень гомології до генів *ProDH* культурних рослин. Внаслідок своєї компліментарності вони взаємодіють з копією гена-мішені, що є сигналом до його розривання ферментами на короткі фрагменти, які вже не можуть забезпечити синтез повноцінного білка. В результаті формуються короткі інтерферуючі РНК (кіРНК), що призводить до часткової фрагментації ендегенних генів *ProDH* пшениці.

Інтеграцію елементів векторної конструкції встановлювали ПЛП-методом за наявності фрагментів екзона та інтрона гена *ProDH1* арабідопсису та селективного гена неоміцинфосфотрансферази – *nptII*. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. Реакційні суміші включали: специфічні праймери, 2 мкл буфера для ПЛП 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 *pdh* визначали з використанням праймерів до першого екзону

5'-AACAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' (pdh-exF) і

5'-GAGATGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3'

(pdh-exR). ПЛП проводилась на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf згідно з програмою: початкова денатурація при 94 °C 4 хв; 35 циклів (денатурація 94°C – 30 с, відпал 58°C – 45 с, елонгація 72°C – 45 с) і фінальна елонгація 72°C 10 хв. Очікувана довжина амплі-

кону становить 545 п. н. Також, визначали наявність гена *nrpII* з використанням праймерів 5'-AGGCTATTCGGC-TATGACTG-3' (F) та 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3'(R), згідно з наступною програмою: початкова денатурація при 94 °C 4 хв; 35 циклів (денатурація 94°C – 30 с, відпал 54°C – 30 с, елонгація 72°C – 35 с) та фінальна елонгація 72°C 10 хв. Очікувана довжина амплікона складає 700 п.н.

Вміст вільного проліну в листках визначали методом, заснованим на утворенні забарвленого продукту взаємодії між L-проліном і нінгідринном [15].

Результати та обговорення

Для отримання генетично модифікованих рослин пшениці, з частковою супресією гена проліндегідрогенази, застосовували оптимізований нами протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*. Калюси, отримані з апікальних меристем пагонів, зберігають життєздатність та морфогенну активність довше порівняно з культурами іншого походження та достовірно не поступається за частотою регенерації з калюсу, індукованому з незрілих зародків. Загалом, було виділено по 700 апікальних меристем кожного генотипу. Початок калюсогенезу у досліджених генотипів спостерігали вже на другу – третю добу культивування. Утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції. Частота калюсоутворення у генотипу Ук997/19 складала 96,8 %, а у генотипу Ук322/17 – 100,0 %.

Коли калюси набули розміру 5 мм діаметром, їх використовували для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. 600 калюсів було використано для трансформації штамом LBA4404 та 600 штук – AGL0. Відомо, що вік вихідного калюсу може мати вирішальний вплив на ефективність генетичної трансформації. У наших дослідженнях використовували калюс 20-22 добового віку.

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 20 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (близько 30 шт) на живильне середовище для кокультивування. Найбільш оптимального результату для штамів LBA4404 було досягнуто за використання суспензії клітин агробактерії з оптичною щільністю 0,3 опт. од., а для штаму AGL0 – 0,2 опт. од. За такого значення оптичної

щільності в подальшому вдавалося практично у всіх калюсів провести елімінацію клітин агробактерії та отримати, порівно з іншими умовами, більшу кількість канаміцин-стійких регенерантів.

Значною мірою на вбудовування ДНК впливає тривалість кокультивування калюсів з агробактерією. Оптимальний результат для штаму LBA4404 було отримано при кокультивуванні калюсів з агробактерією протягом 3-х діб, в той час, як для штаму AGL0 найефективнішим виявилось 2 доби. При такій тривалості кокультивації понад 50 % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал.

Подальша елімінація агробактерії проводилась за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 500 мг/л. Для підвищення ефективності перенесення генів до інокуляційного середовища часто додають хімічну речовину – ацетосирінгон, оскільки вважається, що ця сполука активізує *vir*-гени. У досліджах ми використовували концентрацію ацетосирінгону 200 мМ, яка вважається оптимальною для злакових культур.

Для індукції морфогенезу та регенерації, трансформовані калюси переносили на модифіковане регенераційне середовище MC-131 у якому 6-бензиламінопурин замінений на тидіазурон, вилучена аскорбінова кислота, зменшена кількість аспарагінової кислоти, цефотаксиму і сахарози, та додатково додано антибіотик цефепім та антиоксидант – емоксипін. При застосуванні модифікованого живильного середовища MC-131 відмічається достовірне збільшення кількості морфогенних калюсів, що за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації утворюють пагони у 1,5-2 рази частіше порівняно з живильним середовищем MC-31. Під час культивування експлантів на середовищі MC-131 калюси швидко переходили до морфогенного стану, регенераційні процеси у калюсів спостерігалися вже протягом 1-го пасажу, тоді як на середовищі MC-31 регенерація перших пагонів спостерігалась не раніше 2-го пасажу. Розроблене регенераційне середовище дозволяє прискорити процес отримання генетично модифікованих рослин-регенерантів пшениці та збільшити їх кількість, що забезпечує скорочення біотехнологічного процесу і зменшення матеріальних затрат для його виконання.

Протягом першого пасажу 53,8±2,9 % відсотка калюсів генотипу Ук322/17, трансформованих з використанням штаму LBA4404, пе-

рейшли до морфогенного стану, в той час, як у генотипу Ук997/19 їх було $51,3 \pm 2,9$ %. При застосуванні штаму AGL0 таких культур виявилося $49,6 \pm 2,9$ % у генотипу Ук 322/17 та $47,3 \pm 2,9$ % у генотипу Ук 997/19. Наприкінці першого пасажу почали відбуватися регенераційні процеси – утворювалися перші пагони. Індукція пагонів йшла поступово, була розтягнута протягом 2-х пасажів.

Етап селекції є одним з найбільш важливих, оскільки дозволяє виділити стійкі до селективного агента форми. Для рослин, які несуть екзогенний ген *nptII*, в 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 дає можливості виділити канаміцин-стійкі форми, а висока – пригнічує ріст навіть трансформованих рослин-регенерантів. Стійкі до канаміцину пагони добирали протягом 2 пасажів методом прямої селекції. В якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 100 мг/л. Канаміцин-стійкими вважали регенеранти, що утворились за дії селективного чинника та зберігали зелене забарвлення та нормально росли та розвивалися на селективному середовищі. Отримані пагони після первинної селекції переносили на живильне середовище для вкорінення. Вкорінення тривало 3-4 тижні. Рослини-регенеранти з достатньо розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в горщики з ґрунтом.

Більшість отриманих канаміцин-стійких регенерантів за дії селективного агента характеризувалася нормальним розвитком. Проте траплялися рослини-мозаїки, що так чи інакше містили тканини, позбавлені хлорофілу. Наявність таких регенерантів може бути свідчен-

ням 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 поживне середовище для укорінення поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Крім того, помічено утворення псевдостійких рослин, які спочатку зберігали зелене забарвлення, але надалі новоутворені листки формувалися безбарвними.

З калюсних культур, трансформованих за участі штаму LBA4404, було отримано залежно від генотипу від 10 до 15 зелених пагонів (табл.) Тобто частота отримання канаміцин-стійких пагонів у генотипу Ук997/19 склала 3,3 %, а у генотипу Ук322/17 – 4,0 %. При використанні штаму AGL0 кількість таких пагонів була дещо більшою – у генотипу Ук997/19 склала 4,3 %, а у генотипу Ук322/17 – 5,0 %.

Трансгенну природу регенерантів перевірено методом ПЛР. Частота трансформації за використання штаму LBA 4404 у досліджених генотипів склала 1,7- 2,0%, а при застосуванні штаму AGL0 2,0-2,3 %. Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *ProPDH* перевірялися на присутність гена *nptII*. Результат аналізу засвідчив, що вказаний ген був присутній у всіх досліджуваних зразків. Нами також контролювалася відсутність домішок *A. tumefaciens* в досліджуваних зразках по гену *vir C*. За результатами аналізу в зразках ДНК отриманих рослин показано відсутність агробактеріального зараження (рис.).

Таблиця. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці

Генотип	Штам агробактерії	Кількість трансформованих калюсів, шт	Кількість канаміцин-стійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
			шт	%	шт	%
Ук 997/19	LBA 4404	300	10	$3,3 \pm 1,1$	5	$1,7 \pm 0,8$
	AGL0	300	13	$4,3 \pm 1,2$	6	$2,0 \pm 0,8$
Ук 322/17	LBA 4404	300	12	$4,0 \pm 1,1$	6	$2,0 \pm 0,8$
	AGL0	300	15	$5,0 \pm 1,3$	7	$2,3 \pm 0,9$

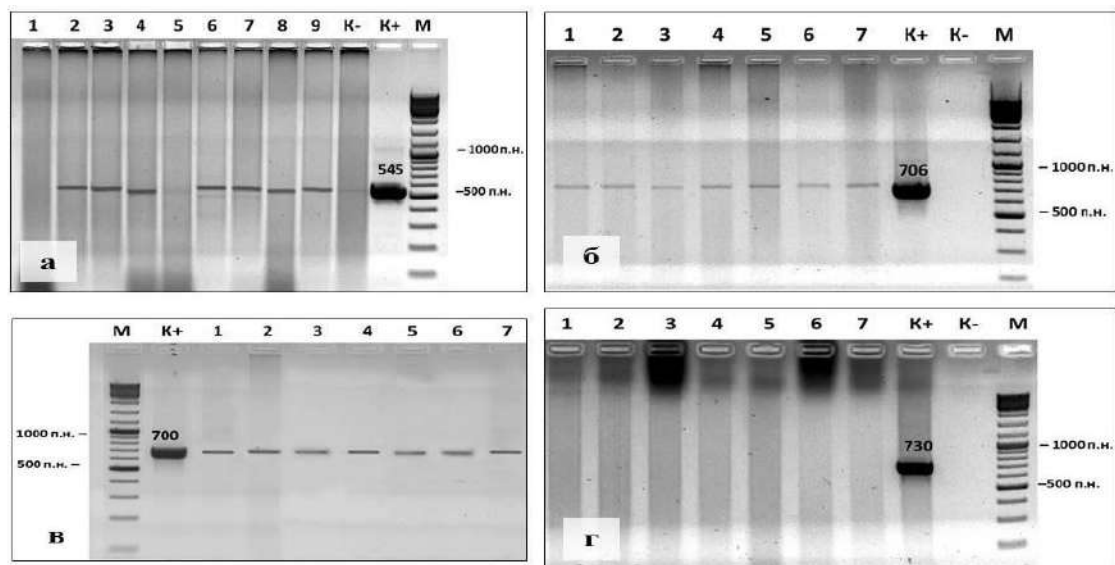


Рис. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК генотипу Ук 322/17 з праймерами до генів: а – 1 екзона гена *ProPDH*; б – 1 інтрона гена *ProPDH*; в – гена *nptII*; г – гена *vir C*; 1 – 9 – досліджувані зразки, K+ – позитивний контроль (*A. tumefaciens*), K – нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix.

Рівень вільного проліну вимірювали в зеленому листі рослин, що росли чотири тижні на стандартному середовищі. Вміст вільного L-проліну в листках рослин-регенерантів вихідного генотипу Ук 997/19 був на рівні $28,6 \pm 3,1$ мк %/г сирої маси, а у регенерантів генотипу Ук322/17 дорівнював $32,4 \pm 3,2$ мк %/г сирої маси. Цей показник у трансгенних рослин був у 1,5–1,6 раза більшим, відповідно $42,8 \pm 3,9$ мк %/г сирої маси у генотипу Ук997/19 та $51,5 \pm 4,1$ мк %/г сирої маси у генотипу Ук322/17. Отже, наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* призводить до підвищення рівня накопичення вільного L-проліну порівняно з нетрансгенними.

Висновки

Таким чином, нами методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калусів отримано генетично модифіковані рослини нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці. Частота трансформації за використання штаму LBA4404 у досліджених генотипів склала 1,7–2,0%, а при застосуванні штаму AGL0 2,0–2,3%. Показана порівняно більша ефективність використання штаму AGL0 для отримання трансгенних рослин генотипів озимої пшениці з частковою супресією гена проліндегідрогенази в культурі *in vitro*. Наявність у трансгенних рослин дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* призводить до підвищення рівня накопичення вільного L-проліну.

References

1. Shewry P. R. Wheat. *J. of Exp. Bot.* 2009. 60 (6). P. 1537–1553. doi: 10.1093/jxb/erp058.
2. Wang K., Liu H., Du L., Ye X. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotech J.* 2017. 15. P. 614–623. doi: 10.1111/pbi.12660.
3. Kolupaev Yu. E., Vainer A. A., Yastreb T. O. Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *The bulletin of Kharkiv national agrarian university. Ser. Biol.* 2014. 2 (32). P. 6–22.
4. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Andleeb Z., Vaishali S., Mukesh Y., Upadhyay R. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon.* 2019. 5 (12). 02952. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02952.
5. Sarker U., Oba S. The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Front Plant Sci.* 2020. 11. 1354. doi:10.3389/fpls.2020.559876.
6. Dubrovna O. V., Mikhalska S. I., Komisarenko A. G. Using of proline metabolism genes in plant genetic engineering. *Cytology and Genetics.* 2022. 56 (4). P. 361–378. doi: 10.3103/S009545272204003X.
7. Dalakouras A., Wassenegger M., Dadami E., Ganopoulos I., Pappas M. L., Papadopoulou K. Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiol.* 2020. 182. P. 38–50. doi: 10.1104/pp.19.00570.

8. Mani S., Van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen, N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2002. 128 (1). P. 73–83. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/1854/LU-153944>.
9. Ibragimova Ya. S., Gerasimova S. V., Kochetov A. V. The role of the proline dehydrogenase gene in maintaining stress resistance in plants. *Plant physiology*. 2012. 59 (1). P. 99–107. doi: 10.1104/pp.110.167163.
10. Tateishi Y., Nakagama T., Esaka M. Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique. *Physiologia Plantarum*. 2005. 125. P. 1399–3054. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00553.x.
11. Mykhalska S. I., Sergeeva L. E., Matveeva A. Yu., Kobernik N. I., Kochetov A. V., Tishchenko E. N., Morgun V. V. The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. *Plant Physiology and Genetics*, 2014. 46 (6). P. 482–489. Retrieved from: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159462>. [in Russian]
12. Komisarenko A. G., Mykhalska S. I., Kurchii V. M., Tishchenko O. M. The characterization of transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants with suppressor of proline dehydrogenase gene. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2016. Vol. 19. P. 143–147. [in Ukrainian]
13. 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. 5 (1–2). P. 3–10. [in Ukrainian]
14. Dubrovna O. V., Slyvka L. V. Optimization of the conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation of prospective winter wheat genotypes in *in vitro* culture. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2020. Vol. 26. P. 190–195. [in Ukrainian]
15. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soils*. 1973. 39. P. 205–207. doi: 10.1007/BF00018060.

DUBROVNA O. V., SLYVKA L. V., VELIKOZHON L. G.

Institute of Plant Physiology and Genetics of the Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

OBTAINING GENETICALLY MODIFIED WINTER WHEAT PLANTS WITH PARTIAL SUPPRESSION OF THE PROLIN DEHYDROGENASE GENE

Aim. Production of genetically modified plants of new promising winter wheat genotypes with partial suppression of the proline dehydrogenase gene in *in vitro* culture and determination of proline content in transgenic and control plants. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation in culture *in vitro*, molecular genetic analysis; biochemical determination of proline content; of mathematical statistics. **Results.** Using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation of callus cultures of new promising genotypes of winter wheat, transgenic plants carrying a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene were obtained. The frequency of transformation with the use of the LBA 4404 strain in the studied genotypes was 1.7–2.0 %, and with the use of the AGL0 strain, it was 2.0–2.3 %. It was established that plants with reduced activity of proline dehydrogenase are characterized by a significantly higher content of free L-proline compared to the control. **Conclusions.** The relatively greater efficiency of using the AGL0 strain for obtaining transgenic plants of winter wheat genotypes with partial suppression of the proline dehydrogenase gene in *in vitro* culture is shown. The presence of a double-stranded RNA suppressor of the *ProDH* gene in transgenic plants leads to an increase in the level of free L-proline accumulation.

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