

ДУБРОВНА О. В.✉, СЛИВКА Л. В.

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

✉ dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ЗАВ'ЯЗУВАННЯ НАСІННЯ ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ МЕТОДОМ *IN PLANTA*

Мета. Дослідити частоту зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації озимої пшениці методом *in planta* за різних способів нанесення агробактерій і складу інокуляційних середовищ. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація методом *in planta*, молекулярно-генетичний аналіз, методи математичної статистики. **Результати.** У досліджених генотипів озимої пшениці виявлена достовірна різниця за показником зав'язування насіння залежно від використаного штаму *A. tumefaciens* й інокуляційного середовища. За порівняння впливу різних штамів агробактерій на цей показник, достовірних відмінностей між ними не встановлено, проте спостерігалась тенденція до підвищення частоти утворення насіння за використання штаму LBA4404. За використання інокуляційного середовища МС-22, яке додатково містило 12,5 мМ MES, 4 мМ NH₄Cl, 5,5 мМ MgSO₄, також спостерігалось певне підвищення кількості утвореного насіння, порівнюючи з середовищем МС-21, доповненого тіосульфатом натрію; частота зав'язування насіння підвищувалась у середньому на 5 %. **Висновки.** Встановлена генотипова залежність частоти зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин при застосуванні різних інокуляційних середовищ і способу процедури трансформації.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, зав'язування насіння.

Пшениця (*Triticum aestivum* L., AABBDD, 2n = 42) є стратегічною зерновою сільськогосподарською культурою в світі та відіграє провідну роль у харчовому забезпеченні людства [1]. Незважаючи на загалом зростаючу тенденцію її виробництва, кліматичні зміни, що призводять до значних температурних перепадів, непередбачуваних опадів або посух і появи нових рас патогенів і шкідників, значно позна-

чаються на її врожайності [2]. Для збільшення врожайності культури, в умовах клімату, що швидко змінюється, і скорочення природних ресурсів необхідні сорти нового покоління, які широко адаптивні та ефективно використовують ресурси середовища. За останні тридцять років розроблені різні методики трансгенезу, які дозволяють передавати гени від широкого спектра організмів злаковим культурам. Дані технології дозволяють підвищити стійкість рослин до хвороб та абіотичних стресів, покращити якість зерна, збільшити рівень мікроелементів і вітамінів у рослині, модифікувати фотосинтез і підвищити продуктивність й багато іншого [3]. Проте наявність ефективного способу трансформації для введення чужорідної ДНК у геном є суттєвим бар'єром для більшості видів однодольних, у тому числі пшениці.

Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* через відсутність етапу культивування тканин має ряд суттєвих переваг. Використання цього методу не обмежується генотипами з високою регенераційною здатністю; він не потребує трудомістких етапів отримання і культивування ембріогенного калюсу; відсутня соматональна мінливість; виключена химерність трансформантів, які розвиваються безпосередньо із зиготи, а не з багатоклітинних меристем, які містять трансформовані та нетрансформовані клітини [4–7]. Особливістю цього методу є те, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація може проводитися на проростках або рослинах, які вільно ростуть в умовах довкілля. Інокуляції агробактеріальною суспензією можуть піддаватися різні частини (залежно від методу) рослини. Показано, що частота трансформації пшениці за допомогою цього методу є значно вищою, порівнюючи з іншими методами генетичної трансформації [8, 9].

На сьогодні типологія методів *in planta* розроблена недостатньо, зазвичай не зрозуміло, які саме клітини та тканини слугують мішенню для агробактеріальної Т-ДНК. У цих методах

агробактеріями інокують різні тканини рослин на різних стадіях розвитку – від проростання насіння до стадії цвітіння [10]. Обробка кастрованих суцвіть рослин суспензією клітин *Agrobacterium* – сучасний метод отримання трансгенних рослин *in planta* [11]. Він характеризується простою у використанні, низькою собівартістю та відносно високою ефективністю. Вважають [9], що за опосередкованого агробактеріями перенесенні генів у процесі запилення вони проникають у зав'язь рослин через отвір пилкової трубки й передають Т-ДНК яйцеклітині, подібно тому, як туди попадає генеративна клітина. Проростання пилкової трубки пов'язано з активністю ферментів, які викликають руйнування клітинних стінок і полісахаридів, які містяться в міжклітинному матриксі, а речовини, що утворюються при рості пилкової трубки, можуть функціонувати як стимулятори *vir* генів і сприяти переносу Т-ДНК. Під час використання цього методу утворюється насіння з генетично модифікованим зародком. Оскільки зародок ініціюється з єдиної клітини, то виключається можливість утворення рослин-хімер.

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 агробактерії, тип векторної конструкції [6]. 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 [5]. На сьогодні, для *T. aestivum* клітини-мішені під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* не описані, також залишаються невідомими оптимальні умови та точний механізм передачі Т-ДНК у зародкові клітини. 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 посухи [12]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження частоти зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації озимої пшениці методом *in planta* за різних спо-

собів нанесення агробактерій і складу інокуляційних середовищ.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були 2 нові перспективні генотипи озимої м'якої пшениці (Ук 322/17 та Ук 997/19), створені в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. В експериментах з трансформації використовували штами *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 та AGL0. Рослини трансформували бінарним вектором pBi2E, до складу якого входить гетерологічний дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження шляхом інокуляції кастрованих суцвіть. Дослідження виконували протягом 2021–2023 рр. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка, середня довжина колосу складала 6,0–6,2 см. Контролем слугували кастровані суцвіття, оброблені стерильною дистильованою водою, яку наносили на приймочки. До початку цвітіння проводили кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Трансформацію проводили двома способами. У першому випадку за 2–3 доби до початку цвітіння проводили кастрування, після цього на кожен колос надягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу і проводили етикетування. Перед запиленням вперше наносили на приймочку маточки бактеріальну культуру, а після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини. У другому випадку після досягнення рослинами фази колосіння здійснювали видалення пиляків шляхом кастрування та увечері того ж дня наносили бактеріальну культуру вперше, а другий раз проводили інокуляцію на приймочку маточки суспензії клітин агробактерій безпосередньо перед запиленням. Запилення проводилося примусовим способом пилком рослини відповідного генотипу у ранкові години, переважно на 3 добу після кастрації. Після цього колоси ізолювали до повного дозрівання насіння.

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л і канаміцину 100 мг/л

за 150 об. / хв, температури 26–28°C, у темряві на шейкері. Добову культуру клітин агробактерії центрифугували за 3500 об. / хв впродовж 15 хв. Потім ресуспендували у двох варіантах середовищ для інокуляції. I – індукційне середовище з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували за 3500 об. / хв впродовж 15 хв і ресуспендували в інокуляційне середовище, яке готували на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей і додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, доповненого тіосульфатом натрію в концентрації 20 мг/л і доводили до оптичної густини $OD_{660} = 0,8$ (МС-21). Друге середовище, також на основі середовища МС з половинним вмістом макросолей і додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, додатково містило 12,5 мМ MES (2-(N-морфоліно) етан-сульфо кислота), 4 мМ $NH_4 Cl$, 5,5 мМ $MgSO_4$ (МС-22). До суспензії клітин бактерій додавали 0,05 % Silvet L77. Суспензією культури агробактерій наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. На стадії повної зрілості зерна колоси зрізали й підраховували кількість отриманого насіння. Частина насіння пророщували та у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК і виявлення послідовностей трансгенів.

Інтеграцію елементів векторної конструкції встановлювали ПЛР-методом за наявності фрагментів екзона та інтрона гена *ProDH1* арабідопсису та селективного гена неоміцинофосфотрансферази – *nptII*. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплексу реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. Реакційні суміші включали: 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 *pdh* визначали з використанням праймерів до першого екзону 5'-AACAAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' (*pdh-exF*) і 5'-GATGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3' (*pdh-exR*). ПЛР 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 амплікону становить 545 п. н. Також визначали наявність 1 інтрона гена *pdh* з використанням праймерів 5'-AACAAACTGGATCCGGCGATCTTAC-3' (*pdh-inF*) і 5'-ATTAAGCTTTCGAACCAAACAAGT-3' (*pdh-inR*) згідно з програмою: початкова денатурація при 94°C 4 хв; 35 циклів (денатурація 94°C – 30 с, відпал 55°C – 30 с, елонгація 72°C – 45 с) і фінальна елонгація 72°C 10 хв. Очікувана довжина амплікона складає 706 п. н.

Результати та обговорення

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* залежить від низки специфічних чинників. Одними із таких є умови довкілля, які включають температурний режим, вологість, наявність чи відсутність опадів. Нашими попередніми дослідженнями [8, 13] встановлено залежність частоти зав'язування насіння та отримання трансгенних рослин *T. aestivum* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму та вологості повітря. Показано, що при використанні штаму AGL0 та інокуляційного середовища, яке готували за модифікованою методикою Сидорова, Дункана [14] найбільший відсоток зав'язування насіння одержано за температури 20–22°C та вологості повітря 45 %. Виявлено, що такий температурний режим забезпечив отримання найбільшої кількості (4,7 %) трансформантів пшениці, а при зниженні температури до 16–18°C відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном і спостерігається найменша частота трансформації. Температура, за якої проводилася інокуляція *Agrobacterium* досліджуваних генотипів, коливалася в діапазоні 20–24°C.

Частота зав'язування насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є важливим показником, яка впливає на частоту отримання трансгенних рослин. Вірогідність отримання трансформантів збільшується за більшої кількості отриманого насіння. Слід зазначити, що середня зав'язуваність насіння за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці *in planta* у досліджених генотипів була значно нижча, порівнюючи з контролем, що свідчить про негативний вплив агробактерій на запилення / запліднення у пшениці. Між досліджуваними нами генотипами пшениці виявлена достовірна різниця за показником

зав'язування насіння залежно від використаного штаму *A. tumefaciens* та інокуляційного середовища (табл. 1). Так, частота зав'язування насіння у генотипу Ук 322/17 коливалась від 14,2 % до 23,1 %, у той час, як у генотипу Ук 997/19 цей показник був вірогідно вищим і змінювався від 26,8 % до 35,3 %. При порівнянні впливу різних штамів агробактерій на частоту зав'язування насіння вірогідних відмінностей між ними не встановлено, проте спостерігалась тенденція до підвищення частоти утворення насіння за використання штаму LBA4404. За використання інокуляційного середовища МС-22 також спостерігалось певне підвищення кількості утвореного насіння, порівнюючи з середовищем МС-21, частота зав'язування насіння підвищувалась у середньому на 5 %. Тому у подальших дослідженнях ми використовували інокуляційне середовище МС-22.

Між досліджуваними нами генотипами озимої пшениці Ук 322/17 та Ук 997/19 встановлена вірогідна різниця за показником зав'язування насіння при застосуванні одноразового та подвійного нанесення суспензії клітин *A. tumefaciens* з однаковою векторною конструк-

цією (табл. 2). Генотип Ук 997/19 характеризувався значно більшою частотою (майже у 1,5 рази) утворення насіння, порівнюючи з генотипом Ук 322/17 за різних способів нанесення агробактерій. За використання різних способів інокуляції показано, що подвійне нанесення клітин агробактерій негативно позначалося на частоті зав'язування насіння у генотипу Ук 322/17 (показник зав'язування насіння знижувався майже у 2 рази), що може бути пов'язано із стресовим впливом на генеративні клітини. В той же час, у генотипу Ук 997/19 середня частота утворення насіння хоча і дещо зменшувалась, проте вірогідних відмінностей за одноразового та подвійного нанесення клітин агробактеріальної суспензії не виявлено.

Слід зазначити, що середня частота отримання трансформантів за різних способів інокуляції у генотипу Ук 997/19 також була більшою у 1,5 рази, порівнюючи з генотипом Ук 322/17, що може бути обумовленим як більшою частотою утворення повноцінного насіння, так і більшою компетенцією клітин рослин цього генотипу до генетичної трансформації (рис. 1).

Таблиця 1. Частота зав'язування насіння за використання різних інокуляційних середовищ

Генотип	Штам бактерії	Інокуляційне середовище	Середня частота зав'язування насіння, %
Ук 322/17	AGL0	МС-21	14,2 ± 2,0*
		МС-22	19,4 ± 2,3*
	LBA4404	МС-21	18,6 ± 2,2
		МС-22	23,1 ± 2,4
контроль			68,7 ± 2,7
Ук 997/19	AGL0	МС-21	26,8 ± 2,6*
		МС-22	31,4 ± 2,7*
	LBA4404	МС-21	30,7 ± 2,7
		МС-22	35,3 ± 2,8
контроль			73,3 ± 2,6

Примітка. *різниця між генотипами вірогідна за $p \leq 0,05$.

Таблиця 2. Частота зав'язування насіння та утворення трансформантів за різних способів інокуляції бактеріальною суспензією

Генотип	Штам бактерії	Спосіб інокуляції	Середня частота зав'язування насіння, %	Середня частота трансформації, %
Ук 322/17	AGL0	I	21,2 ± 2,4*	2,1 ± 1,0
		II	10,7 ± 1,8	1,5 ± 0,9
	LBA4404	I	24,6 ± 2,5	2,0 ± 1,0
		II	11,3 ± 1,8*	1,5 ± 0,9
Ук 997/19	AGL0	I	31,9 ± 2,7*	3,1 ± 1,2
		II	28,8 ± 2,6	2,9 ± 1,2
	LBA4404	I	34,9 ± 2,8	3,1 ± 1,2
		II	30,7 ± 2,7*	3,0 ± 1,2

Примітка. *різниця між генотипами вірогідна за $p \leq 0,05$.

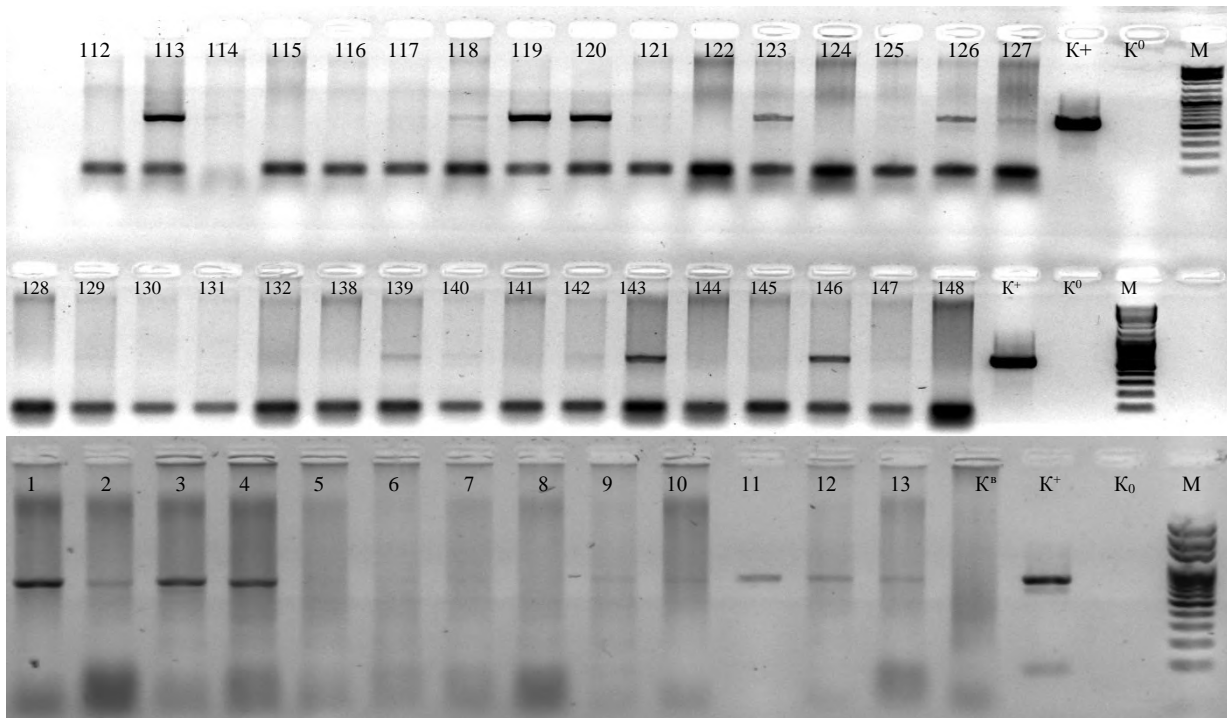


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці генотипу Ук 997/19 з праймерами до: а – 1 ексона гена *ProDH*; б – 1 інтрона гена *ProPDH*; 1 – 13; 112–148 – досліджувані зразки, K+ – позитивний контроль (*A. tumefaciens*), K – нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix.

Таким чином, нами досліджена частота зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації озимої пшениці методом *in planta* за різних способів нанесення агробактерій і складу інокуляційних середовищ. Оскільки на сьогодні оптимальні параметри та механізм передачі Т-ДНК у зародковій клітині пшениці при трансформації *in planta* ще повністю не встановлені, отримані результати беззаперечно підтверджують той факт, що успішність цієї процедури залежить від генотипічних особливостей рослин пшениці, які є основним чинником, який впливає на ефективність трансформації [15]. Успішність генетичної трансформації у пшениці цим методом також може бути пов'язана з дієвістю використаної генетичної конструкції, складом інокуляційних середовищ і способом проведення процедури трансформації.

References

1. Shewry P. R. Wheat. *J. of Exp. Bot.* 2009. Vol. 60 (6). P. 1537–1553. doi: doi.org/10.1093/jxb/erp058.
2. Nowsherwan I., Shabbir G., Malik S., Ilyas M. Effect of drought stress on different physiological traits in bread wheat. *SAARS J Agric.* 2018. Vol. 16. P. 1–6. doi: 10.3329/sja.v16i1.37418.

Висновки

Встановлена генотипова залежність частоти зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин озимої пшениці при застосуванні різних інокуляційних середовищ і способу процедури трансформації. Показано негативний вплив обробки суцвіть суспензією клітин агробактерій на процес запилення / запліднення пшениці та частоту утворення насіння. Підібрані умови інокуляції для ефективного перенесення генів у процесі запилення за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* нових генотипів пшениці озимої. За порівняння впливу різних штамів агробактерій на цей показник вірогідних відмінностей між ними не встановлено, проте спостерігалась тенденція до підвищення частоти утворення насіння за використання штаму LBA4404.

Показано вплив складу інокуляційного середовища на показник зав'язування насіння та отримання генетично модифікованих рослин пшениці озимої за трансформації *in planta*.

3. Borisjuk N., Kishchenko O., Eliby S., Schramm C., Anderson P., Jatayev S. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. *BioMed. Res. Int.* 2019. 6216304. doi: 10.1155/2019/6216304.
4. Hamada H., Linghu Q., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. 11443. doi: 10.1038/s41598-017-11936-0.
5. Hayta S., Smedley M. A., Demir S. U., Blundell R., Hinchliffe A., Atkinson N. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods.* 2019. Vol. 15. doi: 10.1186/s13007-019-0503-z.
6. Singh P., Kumar K. *Agrobacterium*-mediated *In-planta* transformation of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. of Plant Biochem. and Biotechnology.* 2021. Vol. 31 (1). P. 206–212. doi: 10.1007/s13562-021-00669-x.
7. Tarafdar A., Vishwakarma H., Gothandapani S., Bhati M., Biswas K., Prakash A., Chaturvedi U., Solanke A., Padaria J. A quick, easy and cost-effective *in planta* method to develop direct transformants in wheat. *Biotech.* 2019 Vol. 9. P. 180–191 doi: 10.1007/s13205-019-1708-6.
8. Dubrovna O. V., Kulesh S. S., Slivka L. V. Optimization of conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat by the *in planta* method. *Fiziol. rast. genet.* 2019. Vol. 51 (4). P. 283–294. doi: 10.15407/frg2019.04.283.
9. Razzaq A., Hafiz I., Mahmood I., Hussain A. Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *Afr J Biotechnol.* 2011. Vol. 10. P. 740–750. doi: 10.5897/AJB10.1304.
10. Jasdeep C., Avijit T. Genetic transformation and transgenic wheat development: an overview. *Clon Transgen.* 2015. Vol. 5 (1). P. 147–148. doi: 10.4172/2168-9849.100014.
11. Risacher T., Craze M., Bowden S., Paul W., Barsby T. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via *in planta* inoculation. *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 478. P. 115–124. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_7.
12. Voronova S. S., Bavol A. V., Dubrovna O. V. *In planta* genetic transformation of bread wheat, using AGLO strain, containing pBi2E with dsRNA suppressor of ProDH gene. *Faktry eksperymental'noi evoliucii orhanizmiv.* 2015. Vol. 17. P. 126–130. [in Ukrainian]
13. Dubrovna O. V., Slivka L. V. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions of prospective genotypes of winter bread wheat by *in planta* method. *Faktry eksperymental'noi evoliucii orhanizmiv.* 2021. Vol. 28 P. 66–71. doi: 10.7124/FEEO.v28.1377.
14. 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.
15. Chugh A., Vikrant S., Mahalakshmi A., Khurana A. A novel approach for *Agrobacterium*-mediated germ line transformation of Indian bread wheat (*Triticum aestivum*) and pasta wheat (*Triticum durum*). *J Phytol.* 2012. Vol. 4 (2). P. 22–29. Retrieved from: <http://journal-phytology.com/>.

DUBROVNA O. V., SLIVKA L. V.

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

SETTING OF SEEDS DURING AGROBACTERIUM-MEDIATED WINTER WHEAT TRANSFORMATION BY IN PLANTA METHOD

Aim. To investigate the frequency of seeds setting and the formation of transgenic plants during *Agrobacterium*-mediated transformation of winter wheat by the *in planta* method using different methods of applying agrobacteria and the composition of inoculation media. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation by *in planta* method, molecular genetic analysis, methods of mathematical statistics. **Results.** A significant difference was found in the studied genotypes of winter wheat according to the indicator seed setting depending on the *A. tumefaciens* strain used and the inoculation medium. When comparing the effect of different strains of agrobacteria on this indicator, no significant differences between them were established, however, a tendency to increase the frequency of seed formation was observed when using the LBA4404 strain. When using the MS-22 inoculation medium, which additionally contained 12.5 mM MES, 4 mM NH₄Cl, 5.5 mM MgSO₄, a certain increase in the number of formed seeds was also observed compared to the MS-21 medium supplemented with sodium thiosulfate, the frequency of seed setting increased in on average by 5%. **Conclusions.** The genotypic dependence of the frequency of seed setting and the formation of transgenic plants with the use of different inoculation media and the method of the transformation procedure was established.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, seed setting.