

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

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0001-6133-4395, 0000-0002-4884-7572, 000-0002-5935-9363

✉ dubrovny@ukr.net, (067) 503-87-30

ОПТИМІЗАЦІЯ СПОСОБУ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ *IN PLANTA* ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Мета. Оптимізація способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* генотипів озимої м'якої пшениці. **Методи.** Генетична трансформація, молекулярно-генетичний аналіз, методи математичної статистики. **Результати.** Досліджено вплив складу інокуляційного середовища та способу нанесення суспензії клітин агробактерії на частоту зав'язування насіння та утворення трансгенних рослин нових перспективних генотипів озимої пшениці. Встановлена залежність отримання кількості зерна та трансформантів від генотипічних особливостей рослин при застосуванні різних умов інокуляції та процедури трансформації. Показана більша ефективність інокуляційного середовища МС-32, яке додатково містило MES, сульфат магнію і хлорид амонію, порівнюючи з середовищем МС-31, доповненого тіосульфатом натрію. Виявлена вірогідна різниця за показником зав'язування насіння при застосуванні різних способів нанесення суспензії клітин *A. tumefaciens*. Найефективнішим виявився спосіб І, коли наносили на приймочку маточки бактеріальну культуру, а після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилом, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини. **Висновки.** Підібрані умови інокуляції для ефективного перенесення генів у процесі запилення за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* нових генотипів пшениці озимої.

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

Створення стійких до посухи високопродуктивних сортів озимої м'якої пшениці може бути однією зі стратегій упередження негативного впливу змін кліматичних умов на продуктивність цієї сільськогосподарської культури [1]. Використання методів біотехнології й, зокрема, генетичної інженерії, є одним із пер-

спективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових генотипів пшениці, стійких до посухи [2]. В останній час інтенсивно почали розробляти новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання посухостійких генотипів, шляхом інтеграції в геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості [3]. Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного чи декількох генів, які кодують або біохімічні шляхи, або кінцеві точки сигнальних шляхів. Ці генні продукти забезпечують певний захист проти екологічних стресів як безпосередньо, так і опосередковано.

Роботи з генетичної трансформації різних видів *Triticum* проводяться в багатьох лабораторіях світу з використанням різних методів, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [4, 5]. Одним із підходів для здійснення перенесення агробактеріальної Т-ДНК в однодольні рослини є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, який використовується через такі переваги, як проста інтеграція, менша трудомісткість і економічна ефективність. Цей метод генетичної трансформації на сьогодні успішно використовується у різних сільськогосподарських культур, у тому числі пшениці [6]. Використання цього методу не обмежується генотипами з високою регенераційною здатністю; він не потребує трудомістких етапів отримання і культивування ембріонного калюсу; відсутня соматональна мінливість; виключена химерність трансформантів, які розвиваються безпосередньо із зиготи, а не з багатоклітинних меристем, які містять трансформовані та нетрансформовані клітини [7]. Особливістю цього методу є те, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація може проводитися на проростках або рослинах, які вільно ростуть в умовах довкілля. Інокуляції агробак-

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

теріальною суспензією можуть піддаватися різні частини рослини (залежно від методу). Показано, що частота трансформації пшениці за допомогою цього методу є значно вищою, порівнюючи з іншими методами генетичної трансформації [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 агробактерії, тип векторної конструкції [7]. 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 [8]. 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 [9].

Обробка кастрованих суцвіть рослин суспензією клітин *Agrobacterium* – сучасний метод отримання трансгенних рослин *in planta* [10]. Він характеризується простою у використанні, низькою собівартістю та відносно високою ефективністю. Вважають [11], 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, що містяться в міжклітинному матриксі, а речовини, що утворюються при рості пилкової трубки, можуть функціонувати як стимулятори *vir* генів і сприяти перенесення Т-ДНК. Під час використання цього методу утворюється насіння з генетично модифікованим зародком. Оскільки зародок ініціюється з єдиної клітини, то виключається можливість утворення рослин-химер. Тому оптимізація цього способу *Agrobacterium* – опосередкованої трансформації в умовах *in planta* є актуальною і практично значимою задачею.

Орнітин- δ -амінотрансфераза може бути важливим регулятором клітинного метаболізму,

оскільки реакція, яка каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем [12]. Показано, що трансгенні рослини пшениці з надспресією гена *oat* мають підвищену толерантність до стресів (водного дефіциту та засолення) [13]. Також виявлено, що експресія генів *oat* підвищує посухостійкість пшениці та толерантність до засолення не лише за рахунок підвищення біосинтезу проліну, а й за рахунок регуляції антиоксидантної системи [13]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи була оптимізація способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* генотипів озимої м'якої пшениці за різних способів нанесення агробактерій та складу інокуляційних середовищ.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були нові перспективні генотипи озимої м'якої пшениці (Ук 065, Ук 322/17 та Ук 997/19), створені в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Використовували штам виду *Agrobacterium tumefaciens* – AGL0, що містить бінарний вектор pBi-OAT із цільовим геном орнітин- δ -амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний – неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження шляхом інокуляції кастрованих суцвіть. Дослідження виконували впродовж 2021–2023 років. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з прапорцевого листка, середня довжина колосу становила 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 трьома 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 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 пилом рослини відповідного генотипу у ранкові часи, переважно на 3 добу після кастрації. Після цього колоси ізолювали до повного дозрівання насіння. У третьому випадку кастрування, примусове запилення і нанесення суспензії клітин агробактерії здійснювали одночасно, після чого колоски ізолювали до повного дозрівання зерна.

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л при 150 об. / хв, температури 26–28°C, у темряві на шейкері. Добову культуру клітин агробактерії центрифугували при 3500 об. /хв впродовж 15 хв. Потім ресуспендували у двох варіантів середовищ для інокуляції: I – індукційне середовище з додавання 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували при 3500 об. / хв впродовж 15 хв і ресуспендували в інокуляційне середовище, яке готували на основі середовища MC з половинним вмістом макросолей і додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, доповненого тіосульфатом натрію в концентрації 20 мг/л і доводили до оптичної густини $OD_{660} = 0,6$ (MC-31), а друге середовище, також на основі середовища MC з половинним вмістом макросолей і додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, додатково містило 12,5 мМ MES (2-(N-морфоліно) етан-сульфо кислота), 4 мМ NH_4Cl , 5,5 мМ $MgSO_4$ (MC-32). 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. Частину насіння пророщували та у фазу двох листків зрізали частину листка для виділення загальної ДНК і виявлення послідовностей трансгенів.

Молекулярно-генетичний аналіз рослин здійснювали ПЛР-методом. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакційні суміші включали: специфічні праймери, 2 мкл буфера для ПЛР 10 × DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ кожного дезоксирибоз-нуклео-

зидтрифосфату (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 амплікона становить 708 п. н.

Результати та обговорення

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. Відомо, що в умовах штучного запилення та запліднення, зав'язування насіння дуже залежить від зовнішніх умов, зокрема температури та вологості повітря. Нашими попередніми дослідженнями [14] встановлено залежність частоти утворення насіння та отримання трансгенних рослин *T. aestivum* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму та вологості повітря. Виявлено, що за температури 20–22°C була отримана найбільша кількість (4,4 %) трансформантів пшениці, а при зниженні температури до 16–18°C відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном і спостерігається найменша частота трансформації. Тому, температура, за якої проводилася інокуляція *Agrobacterium*, коливалася в діапазоні від 20°C до 24°C.

Для оптимізації способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *in planta* досліджували вплив інокуляційних середовищ MC-31 та MC-32, які відрізнялися за хімічним складом, на частоту зав'язування насіння. Отримані результати показали, що за використання обох середовищ частота зав'язування насіння була вірогідно нижчою, порівнюючи з контролем (табл. 1) – кількість утвореного насіння знижувалася у 3–5 разів. Це може бути обумовлено тим, що *Agrobacterium* є агресивним патогеном, відповідно, нанесення навіть невірулентних штамів зазвичай призводить до пригнічення росту і розвитку зав'язі. У досліджених нами генотипів пшениці середня частота утворення насіння варіювала від 7,4 % у генотипу Ук 065 до 29,9 % у генотипу Ук 997/19. Показник зав'язування насіння після трансфор-

мації у генотипу Ук 065, у середньому, становив 3,1 насінини на колос, а у той час, як у генотипу Ук 997/19 був на рівні 8,2 насінини на колос.

Більш ефективним виявилось інокуляційне середовище МС-32, яке додатково містило MES, сульфат магнію і хлорид амонію. Частота зав'язування насіння підвищувалась на 5–6 % у генотипів Ук 065 та Ук 322/17 та на 8 % у генотипу Ук 997/19, порівнюючи з інокуляційним середовищем МС-31, яке додатково містило тіосульфат натрію. Слід зазначити, що іони відіграють важливу роль у прикріпленні бактерій до рослин і можуть опосередковувати реакції бактерій або рослинних клітин, які підвищують або знижують процес передачі генів, а також можуть впливати на експресію генів бактеріальної вірулентності [15], чим, можливо, і обумовлені відмінності за частотою утворення насіння між інокуляційними середовищами. Тому у подальших дослідженнях ми використовували інокуляційне середовище МС-32.

Між досліджуваними нами генотипами озимої пшениці виявлена вірогідна різниця за показником зав'язування насіння при застосуванні різних способів нанесення суспензії клітин *A. tumefaciens* (табл. 2). Серед вивчених генотипів Ук 997/19 характеризувався вірогідно більшою частотою утворення насіння, порівнюючи з іншими за різних способів нанесення агробактерій. При використанні різних способів інокуляції виявлено найбільшу ефективність способу І, коли наносили на прийомочку маточки бактеріальну культуру, а після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отрима-

ним з інтактного колосу тієї ж рослини. Кількість утвореного насіння залежно від генотипу в середньому коливалась від 2 до 12 штук на колосі.

Показано, що подвійне нанесення суспензії клітин агробактерій негативно позначалося на частоті зав'язування насіння у генотипів Ук 065 та Ук 322/17 (показник зав'язування насіння знижувався у 1,6–1,9 раза), що може бути пов'язаним зі стресовим впливом на генеративні клітини. Водночас 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. Найменш ефективним виявився спосіб ІІІ за одночасного кастрування, нанесення бактерії та запилення. У всіх вивчених генотипів зав'язування зерна не перевищувала 10 %, а його кількість у колосі коливалась від 0 до 3–4 штук.

Молекулярно-генетичний аналіз (рис. 1) з використанням специфічних праймерів до гена *oat* підтвердив перенесення та вбудовування цільового гена в геном пшениці. Середня частота трансформації за різних способів інокуляції рослин (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих), отриманих методом *in planta* за використання конструкції pVi-OAT, була на рівні 0,3–2,4 %. У генотипу Ук 997/19 вона була значно більшою, порівнюючи з іншими генотипами, що може бути обумовленим як більшою частотою утворення повноцінного насіння, так і більшою компетенцією клітин рослин цього генотипу до генетичної трансформації.

Таблиця 1. Частота зав'язування насіння при використанні різних інокуляційних середовищ

Генотип	Інокуляційне середовище	Середня частота зав'язування насіння, %
Ук 065	МС-31	7,4 ± 1,5
	МС-32	12,7 ± 1,9
контроль		63,8 ± 2,8
Ук 322/17	МС-31	11,2 ± 1,8
	МС-32	17,4 ± 2,2
контроль		68,7 ± 2,7
Ук 997/19	МС-31	21,8 ± 2,4*
	МС-32	29,9 ± 2,6*
контроль		73,3 ± 2,6

Примітка. *різниця між показниками достовірна при $p \leq 0,05$.

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

Генотип	Спосіб інокуляції	Середня частота зав'язування насіння, %	Середня частота трансформації, %
Ук 065	I	13,8 ± 2,0*	1,2 ± 0,8
	II	8,0 ± 1,6*	0,7 ± 0,6
	III	3,2 ± 1,0	0,3 ± 0,3
Ук 322/17	I	19,2 ± 2,3*	2,0 ± 1,0
	II	10,4 ± 1,8*	1,0 ± 0,7
	III	5,2 ± 1,3	0,3 ± 0,3
Ук 997/19	I	30,8 ± 2,6	2,4 ± 1,1
	II	26,9 ± 2,6	2,4 ± 1,1
	III	9,7 ± 1,7	0,8 ± 0,6

Примітка. *різниця між генотипами достовірна при $p \leq 0,05$.

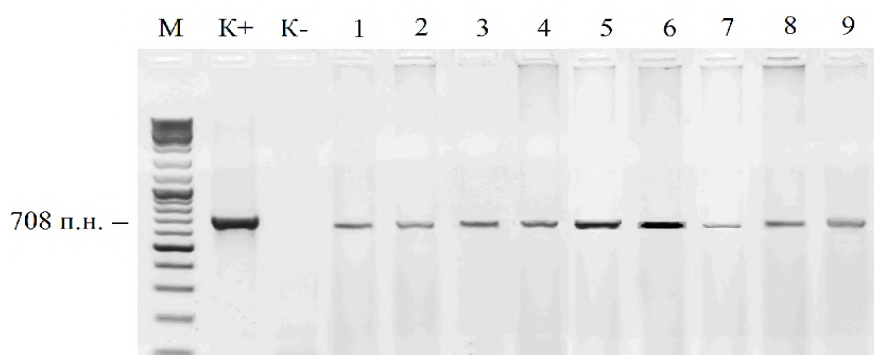


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці генотипу Ук 997/19 з праймерами до гена *oat* (амплікон розміром 708 п. н.): 1–9 – досліджувані зразки, К+ – *A. tumefaciens*, К- – нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix.

Висновки

Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації нових генотипів озимої м'якої пшениці методом *in planta* за використання штаму AGL0 та векторної конструкції рВи-ОАТ. Досліджено вплив складу інокуляційного середовища та способу нанесення суспензії клітин агробактерії на частоту зав'язування насіння й утворення трансгенних рослин. Показана більша ефективність інокуляційного середовища МС-32, яке додатково містило MES, сульфат магнію та хлорид амонію, порівнюючи з середовищем МС-31,

доповненого тіосульфатом натрію. Виявлена вірогідна різниця за показником зав'язування насіння при застосуванні різних способів нанесення суспензії клітин *A. tumefaciens*. Найефективнішим виявився спосіб I, коли наносили на прийомочку маточки бактеріальну культуру, а після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилком, отриманим з інтактного колосу тієї ж рослини. Розроблений спосіб трансформації може бути використаний для покращення пшениці за допомогою трансгенного підходу.

Referenses

1. Bapela T., Shimelis H., Tsilo T., Mathew I. Genetic Improvement of Wheat for Drought Tolerance: Progress, Challenges and Opportunities. *Plants*. 2022. Vol. 11. 1331. doi: 10.3390/plants11101331.
2. El-Mouhamady A., El-Hawary M., Habouh M. Transgenic Wheat for Drought Stress Tolerance: A Review. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 2023. Vol. 12 (1). P. 77–94. doi: 10.36632/mejar/2023.12.1.7.
3. Khan S., Anwar S., Yu M., Sun Z., Yang Z., Gao Z. Development of Drought-Tolerant Transgenic Wheat: Achievements and Limitations. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 8. 3350. doi: 10.3390/ijms20133350.
4. Dubrovna O. V., Morgun B. V. Current status of research on *Agrobacterium*-mediated wheat transformation. *Fiziol. rast. genet.* 2018. Vol. 50 (3). P. 187–217. doi: 10.15407/frg2018.03.187. [in Ukrainian]

5. Liu S., Wang K., Geng S., Hossain M., Ye X., Li A., Mao L., Kogel E. Enemies at peace: Recent progress in *Agrobacterium*-mediated cereal transformation. *The Crop Journal*. 2024. doi: 10.1016/j.cj.2023.12.009.
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. 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.
8. 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
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19. P. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>.
13. Anwar A., Wang K., Wang J. Expression of Arabidopsis Ornithine Aminotransferase (AtOAT) Encoded Gene Enhances Multiple Abiotic Stress Tolerances in Wheat. *Plant Cell Rep*. 2021. Vol. 40 (7). P. 1155–1170. doi: 10.1007/s00299-021-02699-0.
14. Slyvka L. V., Dubrovna O. V. Genetic transformation of promising genotypes of winter soft wheat by the *in planta* method. *Factors of experimental evolution of organisms*. Vol. 28. P. 106–111. doi: 10.7124/FEEO.v28.1384. [in Ukrainian]
15. Azadi P., Bagheri H., Nalouisi A., Nazari F., Chandler S. Current status biotechnology advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnol Adv*. 2016. Vol. 34 (6). P.1073–1090. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.06.006.

SLIVKA L. V., DUBROVNA O. V., VELIKOZHON L. H.

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

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF *AGROBACTERIUM*-MEDIATED *IN PLANTA* TRANSFORMATION OF WINTER WHEAT GENOTYPES

Aim. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of winter wheat genotypes. **Methods.** Genetic transformation, molecular genetic analysis; of mathematical statistics. **Results.** The influence of the composition of the inoculation medium and the method of application of the *agrobacterium* cell suspension on the frequency of seed setting and the formation of transgenic plants of new promising genotypes of winter wheat was studied. The dependence of obtaining the amount of grain and transformants on the genotypic characteristics of plants when using different inoculation conditions and transformation procedures was established. The higher efficiency of the MC-32 inoculation medium, which additionally contained MES, magnesium sulfate, and ammonium chloride, was shown compared to the MC-31 medium supplemented with sodium thiosulfate. A significant difference in the rate of seed setting was revealed when using different methods of applying *A. tumefaciens* cell suspension. Method I proved to be the most effective, when a bacterial culture was applied to the pistil receptacle, and after the liquid in which the *agrobacteria* were resuspended completely dried, pollination was carried out with pollen obtained from an intact ear of the same plant. **Conclusions.** Selected inoculation conditions for efficient gene transfer in the pollination process for *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of new winter wheat genotypes.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, optimization.