

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *IN PLANTA* М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ AGLO, ЯКИЙ МІСТИТЬ pVi2E З ДВОЛАНЦЮГОВИМ РНК-СУПРЕСОРОМ ГЕНА ПРОЛІНДЕГІДРОГЕНАЗИ

Як багате джерело енергії та білка, пшениця є однією з найбільш важливих продовольчих культур всього світу, у тому числі й України. Тим не менше у зв'язку з видовими особливостями, пов'язаними з доставкою генів у клітини експлантів і регенерацією пагонів, вона була останньою серед продовольчих зернових культур, які були генетично модифіковані. В останні два десятиліття спостерігається широке використання різноманітних підходів для введення екзогенної ДНК у пшеницю. Найбільш поширеними методами є бомбардуванням мікрочастинками і спільне кокультивування з *Agrobacterium tumefaciens* [1, 2]. Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації має низку переваг порівняно з біобалістичною трансформацією: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальними перебудовами у кодуючих послідовностях генів, що переносяться, простота методик та загалом менша вартість.

Основні способи отримання генетично-модифікованих рослин за використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації базуються на перенесенні Т-ДНК в культивовані *in vitro* рослинні клітини з наступною регенерацією трансформованих пагонів. Однак такий підхід має ряд обмежень і недоліків: по-перше, вимагає стерильних умов; по-друге, досить складна та тривала методика; по-третє, під час культивування *in vitro* в рослинних клітинах досить часто відбуваються соматичні мутації або соматональні зміни; і, нарешті, у деяких генотипів може взагалі не відбуватися регенерація пагонів. У зв'язку з цим, актуальним завданням є розробка методів трансформації рослин без стадії культивування *in vitro*.

Одним з нетрадиційних підходів для здійснення переносу агробактеріальної Т-ДНК в одnodольні рослини є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, який дозволяє уникнути культивування *in vitro* та соматональної мінливості [3–5]. Цей метод генетичної трансформації на даний час успішно використовують у різних сільськогосподарських куль-

тур, у тому числі і пшениці [6, 7]. Перші спроби отримати трансгенні рослини пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* були у 1990 році [8]. Використовуючи той же протокол, але іншими штамами *Agrobacterium* і плазмідні конструкції, була досягнута ефективна трансформація пшениці Sawahel та Hassan [9]. Встановлено, що частота трансформації пшениці за допомогою даного методу є значно вищою порівняно з іншими методами генетичної трансформації [10].

Метою нашої роботи було проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* м'якої пшениці сорту Зимоярка з використанням штаму AGLO, який містить pVi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, а також оптимізація певних етапів протоколу. Генетична трансформація пшениці з використанням ключового гена катаболізму проліну – проліндегідрогенази (ProDH) становить певний інтерес, оскільки його супресія може призводити до збільшення вмісту проліну та підвищенню рівня стійкості трансгенних рослин до абіотичних стресів, зокрема посухи [11].

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували рослини м'якої пшениці сорту Зимоярка (оригінатор Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного дослідження. До початку цвітіння здійснювали кастрацію колоса згідно стандартної методики. На кожний колосок одягався індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування. Інокуляцію суспензією клітин агробактерій проводили через 3–5 діб після кастрації.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили за допомогою штаму AGLO, що містить бінарний вектор pVi2E з цільовим геном – дволанцюговим РНК-супресором проліндегідрогенази, отриманий на основі гена *Arabidopsis* (ds-RNA suppressor *ProDH1*), а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*

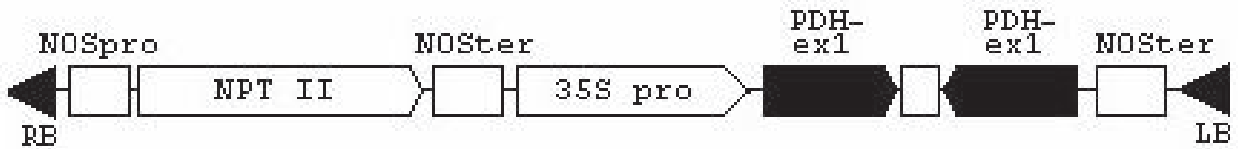


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції рBi2E: рNOS – промотор гена нопалінсинтази; р35S – промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); PDH-ex1 – перший екзон гена PDH (в конструкції присутні два фрагмента, розташовані у вигляді інвертованого повтора); int – фрагмент першого інтрона гена PDH; nptII – ген неоміцинфосфотрансферази II *E.coli*; NOS – термінатор гена нопалінсинтази, сигнал поліаденілювання; RB, LB – повтори, які обмежують Т-ділянку

(рис. 1) (люб'язно наданий к.б.н. Кочетовим А.В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

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., 26 °С, в темряві на шейкері. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 3500 об/хв протягом 15 хв, ресуспендували у індукційному середовищі з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону. Через добу знову центрифугували при 3500 об/хв. протягом 15 хв, та ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке готували на основі середовища МС з половиною вмістом макросолей з додаванням 100 мкМ ацетосирінгону, 68,5 г/л сахарози, 36 г/л глюкози та 0,115 г/л проліну та доводили до оптичної щільності $OD_{660} = 0,5$. Отриману суспензію наносили на прийомочки маточок за допомогою автоматичного піпет-дозатора. Після нанесення суспензії агробактеріальних клітин колоски знову ізолювали. Після повного висихання розчину проводили запилення пилом, який був отриманий з інтактного колосу тієї ж рослини.

Екстракцію ДНК з листя проводили з використанням комплексу реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Наявність цільового гена в геномі досліджуваних рослин визначали методом ПЛР, аналізуючи ДНК з листя отриманих рослин покоління T₁. ПЛР проводилась на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Спочатку здійснювали мультиплекс-ПЛР з праймерами до пшеничного гена-референта *TaTM20* і трансгена *nptII* (5'-CCTGAATGAACTCCA GGAGGAGGCA-3' та 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3') згідно наступної програми: початкова денатурація при 94 °С – 4 хв; 8 циклів (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 68 °С – 45 с, елонгація 72 °С – 30 с) та 25 циклів (дена-

турація 94 °С – 30 с, відпал 60 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 30 с), фінальна елонгація 72 °С – 5 хв. Розмір очікуваних фрагментів для гена *nptII* – 700 п.н., а для гена *TaTM20* – 934 п.н. Для зразків, у яких виявлено позитивний сигнал проводили ПЛР з праймерами специфічними до фрагмента першого екзона гена *pdh* арабідопсису:

5'-AACAAACTGGATCCGGCGATCT TAC-3' та 5'-GAGATGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3' згідно наступної програми: початкова денатурація при 94 °С – 4 хв; 34 цикла (денатурація 94 °С – 30 с, відпал 58 °С – 30 с, елонгація 72 °С – 30 с) та фінальна елонгація 72 °С – 10 хв. Розмір очікуваного амплікону становить 545 п.н. Наявність агробактеріальної домішки контролювали по гену *vir C*.

Продукти ампліфікації розділяли в 1,2 % агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

Результати та обговорення

Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* залежить від багатьох факторів, зокрема температури, при якій проводиться трансформація, складу середовища для інокуляції, особливостей розвитку і будови квітки, оптичної щільності суспензії бактеріальних клітин, тривалості контакту (кокультивування) рослинних тканин з агробактерією, штаму *Agrobacterium*, типу векторної конструкції, генотипу рослини та ін. [4].

Температурний оптимум для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації обмежується чутливістю до температури білків, що беруть участь в перенесенні Т-ДНК. Різні дослідники вказують на дещо відмінні дані, щодо оптимальних значень температури: так, згідно досліджень Dillen та співавт. [12] найкращі результати отримали за 22 °С; в той же час в роботі Salas та ін. [13] найбільшу кількість трансформантів отримали за температури 25 °С, попри те, що оптимальною температурою

для перенесення Т-ДНК було 19 °С. Хоча, на нашу думку, нема принципових відмінностей між процесами перенесення Т-ДНК у клітини дводольних і однодольних видів, аналіз літературних даних вказує на температурний оптимум трансформації для злакових 20–25 °С, а в деяких випадках і 28 °С [14–16]. З огляду на це трансформацію доцільно проводити в температурних межах 18–29 °С. Нами проводилася *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* в умовах вегетаційного дослідження у другій половині дня за двох температурних режимів: 20–22 °С та 25–27 °С. За нашими спостереженнями між дослідними варіантами не відмічалось достовірної різниці за показником зав'язуваності насіння. Однак за добору на селективному середовищі з канаміцином, насіння отримане у варіанті з 20–22 °С проростало швидше та загалом вдалось отримати більшу кількість канаміцин-стійких проростків (табл.).

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

Загалом за трансформації *in planta* нами було отримано 424 насінини T_0 , які за морфологічними показниками не відрізнялися від контролю (рис. 2). Все отримане насіння пророщували на селективному середовищі та добирали кана-

Таблиця

Порівняльні характеристики насіння, отриманого за різних температурних режимів трансформації

| № | Варіант дослідження | Загальна кількість отриманого насіння, шт. | Зав'язуваність, % | Кількість канаміцин-стійких форм, % |
|---|---------------------|--|-------------------|-------------------------------------|
| 1 | t = 20–22 °С | 218 | 43,6 ± 3,6 | 4,5 ± 1,4 |
| 2 | t = 25–27 °С | 206 | 41,2 ± 3,4 | 3,0 ± 1,2 |
| 3 | Контроль | 448 | 89,6 ± 1,4 | – |

міцин-стійкі форми. Всього одержали 16 рослин, стійких до канаміцину, які вирощували у вегетаційних посудинах об'ємом 0,2 л. По мірі росту їх пересаджували у більші вегетаційні посудини та вирощували до фази повної стиглості зерна.

Оскільки за генетичної трансформації пріоритетним завданням є отримання генетично змінених форм з трансгенами, що стабільно експресуються в геномі та успадковуються у наслідкових поколіннях, то все отримане насіння T_1 аналізували за допомогою ПЛР. Відомо, що інтеграція трансгена в геном подія досить рідкісна, а за добору на селективних середовищах можуть виникати нетрансформовані псевдостійкі форми.

Встановлено, що агробактерії здатні зберігатися в судинній системі рослин протягом декількох поколінь. Присутність агробактерій в рослинних зразках може призвести до псевдопозитивних результатів ПЛР – можуть бути відібрані псевдо-трансформанти рослин. Тому для того, щоб довести, що ампліфікація послідовностей досліджуваних генів проходить з геномної ДНК рослин, а не з експресійного вектора та/або геномної ДНК агробактерій, необхідно провести ампліфікацію зраз-



Рис. 2. Типовий колос та насіння, отримане після обробки *in planta* агробактеріальною суспензією

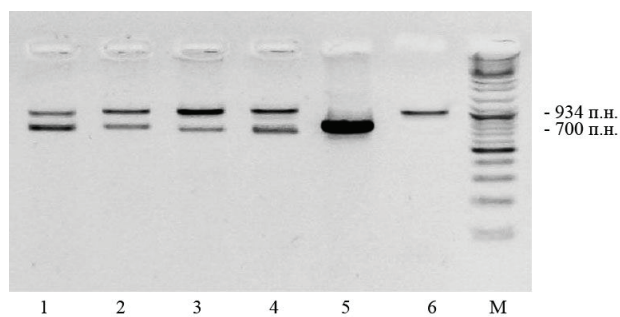


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами специфічними до гена *nptII* (амплікон розміром 700 п.н.) та гена *TaTM20* (амплікон розміром 934 п.н.): 1–4 – досліджувані зразки, 5 – К+ позитивний контроль на ген *nptII* (*A. tumefaciens*), 6 – К- нетрансформована пшениця (негативний контроль на ген *nptII*), М – маркер DNA LadderMix

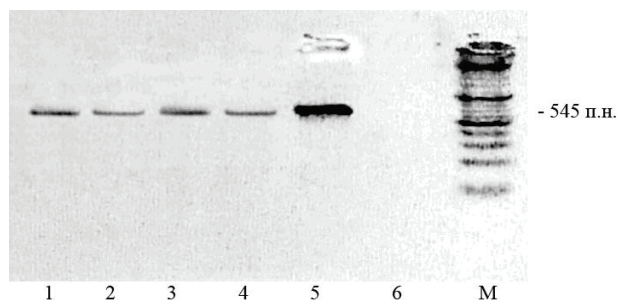


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на присутність гена *pro* (амплікон розміром 545 п.н.): 1–4 – досліджувані зразки, 5 – К+ (*A. tumefaciens*), 6 – К- нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix

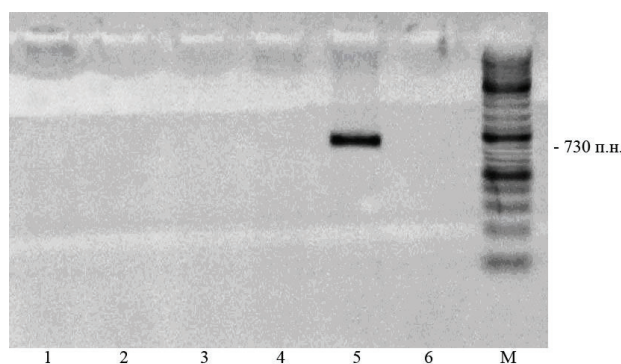


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на присутність бактеріального гена *vir C* (амплікон розміром 730 п.н.): 1–4 – досліджувані зразки, 5 – К+ (*A. tumefaciens*), 6 – К- нетрансформована пшениця (негативний контроль), М – маркер DNA LadderMix

ків з праймерами, підібраних або до хромосомних генів агробактерій, або до генів, присутніх у векторній конструкції поза областю Т-ДНК. Оскільки значний вплив на результат ПЛР має якість препарату ДНК, ряд авторів для контролю рекомендує додатково проводити ампліфікацію з праймерами до генів домашнього господарства (house-keeping genes), що дозволяє виключити псевдонегативні результати, пов'язані з поганою якістю виділеного зразка або недостатньою концентрацією ДНК. Тому, в роботі нами застосовувалася мультиплексна ПЛР, що дозволяє за один цикл ампліфікації визначити в досліджуваному зразку конститутивний ген пшениці *TaTM20* та трансген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину.

Загалом, серед 261 проаналізованих зразків (ДНК виділяли з кожного проростка T_1 індивідуально) тільки в 37 підтверджено присутність гена *nptII* (рис. 3).

Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *nptII* перевіряли на присутність гена *pdh* за наявністю екзона 1. Результат аналізу засвідчив, що вказаний ген був присутній тільки в чотирьох зразках (рис. 4). ПЛР ставили повторно вже тільки з відібраними попередньо зразками.

Нами також контролювалася відсутність домішок *A. tumefaciens* в досліджуваних зразках по гену *vir C* (рис. 5).

За результатами аналізу в зразках ДНК отриманих рослин показано відсутність агробактеріального зараження.

Висновки

Проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* м'якої пшениці сорту Зимоярка з використанням штаму AGLO, який містить плазмідну рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогепази. В результаті було отримано 424 насінини T_0 , які пророщували на селективному середовищі та добирали канаміцин-стійкі рослини. Відібрано 16 канаміцин-стійких рослин з яких отримано насіннєве покоління T_1 . За використання ПЛР аналізу у насіннєвому поколінні T_1 виявлено 4 зразки в яких встановлено наявність двох трансгенів – *nptII* та *pdh*. Частота трансформації з повним вбудовуванням генетичної конструкції складає 1,53 %. Аналіз даних зразків на присутність гена вірулентності (*Vir C*) дав змогу виключити бактеріальну контамінацію рослинного матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА

1. El-Mangoury K.A., Abdrabou R.Th., Yasien M., Fahmy A. Optimization of a transformation system for three Egyptian wheat cultivars using immature embryo-derived callus via microprojectile bombardment // Arab. J. Biotech. – 2006. – 9, N 1. – P. 175–188.
2. Xia G., Li Z., He C., Chen H., Richard B. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Physiol. Sin. – 1999. – 25. – P. 22–28.
3. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh M.B. Wheat transformation – an update of recent progress // Euphytica. – 2006. – 149. – P. 353–366.
4. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 8–20.
5. Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method // British Biotechnology Journal. – 2014. – 4, N 2. – P. 116–125.
6. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2006. – 102, N 3. – P. 162–170.
7. Zhao T., Zhao S., Chen H., Zhao Q., Hu Z., Hou B., Xia G. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Rep. – 2006. – 25. – P. 1199–1204.
8. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Science. – 1990. – 72. – P. 233–244.
9. Sawahel W.A., Hassan A.H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline // Biotechnology Letters. – 2002. – 24. – P. 721–725.
10. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Plant Biochem. Biotechnol. – 1995. – 4. – P. 55–59.
11. Ибрагимова Я.С. Герасимова С.В., Кочегов А.В. Роль гена пролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений // Физиология растений. – 2012. – 59. – С. 99–107.
12. Dillen W., De Clereq J., Kapila J., Zamnre M., Van Montagu M., Angenon G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* method of gene transfer to plants // Plant J. – 1997. – 12. – P. 1459–1462.
13. Salas M., Park S., Srivatanakul M., Smith R. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells // Plant Cell Rep. – 2001. – 20. – P. 701–705.
14. Frame B., McMurray J., Fonger T., Main M., Taylor K., Torney F., Paz M., Wang K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts // Plant Cell Rep. – 2006. – 25. – P. 1024–1034.
15. Arencibia A., Carmona E., Tellez P., Chan M., Yu S., Trujillo L., Oramas P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L) transformation diated by *Agrobacterium tumefaciens* // Transgenic Res. – 1998. – 7. – P. 213–222.
16. Hashizume F., Tsuchiya T., Ugaki M., Niwa Y., Tachibana N., Kowayama Y. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and the usefulness of a synthetic GFP reporter gene in leading varieties of japonical rice // Plant Biotechnol. – 1999. – 16. – P. 397–401.
17. Mannerlof M., Tuveesson S., Steen P., Tenning P. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate // Euphytica. – 1997. – 94. – P. 83–91.

VORONOVA S.S., BAVOL A.V., DUBROVNA O.V.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: s.voronova.s@gmail.com*

IN PLANTA GENETIC TRANSFORMATION OF BREAD WHEAT, USING AGLO STRAIN, CONTAINING PB12E WITH DSRNA-SUPPRESSOR OF PRODH GENE

Aims. The effectiveness of (*Triticum aestivum* L.) transformation *in planta* using strain AGLO harboring plasmid pBi2E with dsRNA-suppressor (double sequence RNA-suppressor) of prolinedehydrogenase gene and selective neomycin phosphotransferase II gene (*nptII*) has been analyzed. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated genes transfer *in planta* during wheat pollination. **Results.** Seeds, RCR-analysis of which confirmed availability *pro1* gene exon, of T1- wheat's plants have been obtained. **Conclusions.** It has been shown the possibility of stable integration of the transgenes at the wheat's genome under *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.