

РОЗРОБКА МЕТОДІВ AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПШЕНИЦІ

Технологія генетичної трансформації має великі перспективи для поліпшення господарсько-цінних ознак рослин. Більшість протоколів отримання генетично модифікованих організмів передбачають етапи культивування *in vitro*, у тому числі процеси калюсогенезу, регенерації та укорінення пагонів. Результати досліджень останніх років показали, що ці трудомісткі та економічно затратні процедури можна замінити на більш практичні способи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *in planta* [1–6].

Загалом, при такому методі використовують два головних підходи. Один із них має відношення до процесу запилення, інший стосується маніпуляцій з апікальними меристемами зрілого насіння. Що стосовно використання першого підходу для культурних злаків, то показана доцільність прямого перенесення ДНК плазмід в геном інтактних рослин кукурудзи [7]. Також запропоновано спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи *in planta*, який заключається в нанесенні суспензії клітин *A. tumefaciens* на попередньо обрізані маточкові нитки із наступним запиленням пилком тієї ж рослини [7].

Відносно другого напрямлення, то запропоновано ряд способів генетичної трансформації, коли агробактеріальній інфекції піддаються апікальні меристеми рослин. Загалом, ця технологія полягає в кокультивуванні проростаючого насіння з обеззброєними штамми *A. tumefaciens*. Важливим моментом при цьому є підвищення доступності агробактерій до клітин меристеми, із яких формуються гамети. Для цього використовують ряд прийомів, серед яких вакуумна інфільтрація суспензії агробактеріальних клітин в тканини рослин, додавання в середовище для інокуляції поверхнево активних речовин таких, як Silwet L-77, Tween 20 для кращого проникнення бактерії в міжклітинний простір та пошкодження рослинних тканин [9].

Для однодольних показана ефективність генетичної трансформації з використанням *A. tumefaciens* на зародках, вичленених з зерен рису, попередньо культивованих на воді [4]. Запропонований також спосіб генетичної транс-

формації кукурудзи, коли за допомогою скальпеля робили поранення проростаючого насіння в зоні меристеми, а потім культивували з суспензією клітин *A. tumefaciens*. При цьому отримані фертильні рослини (T0), 29 % із яких були трансгенними [10].

Метод *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення генів в геном пшениці почали застосовувати на початку 90-х років, але широкого розповсюдження він не знайшов із-за низької частоти трансформації, регенерації та отримання фертильних рослин. На даний час генетично-модифіковані форми пшениці здебільшого отримують шляхом біолістичної трансформації, також запропонований спосіб прямої інокуляції незрілого насіння пшениці *in planta* [5]. Авторами показано, що частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в середньому становила 5 % і отримані трансформанти фенотипово були нормальними.

Метою нашої роботи було оптимізувати параметри *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* вітчизняних сортів озимої пшениці.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для генетичної трансформації слугували сорти озимої пшениці: Достаток, Володарка, Подолянка, Фаворитка та Смуглянка (селекції ІФРГ НАН України).

У якості експлантів використовували сегменти 5–6 добових пагонів (верхню, нижню та середню частину) та апікальну меристему 3-добових асептичних проростків (рис. 1. а, б).

Agrobacterium-опосередковану трансформацію проводили штамом LBA4404, який містить плазмід рBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази *Arabidopsis thaliana* (*pro1*) та селективним геном *nptII* (конструкція люб'язно надана к.б.н. Кочетовим А.В. Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

Суспензію клітин агробактерії нарощували у живильному бульйоні NIMEDIA[®] REF M002, потім розводили у 5 разів модифікованим середо-

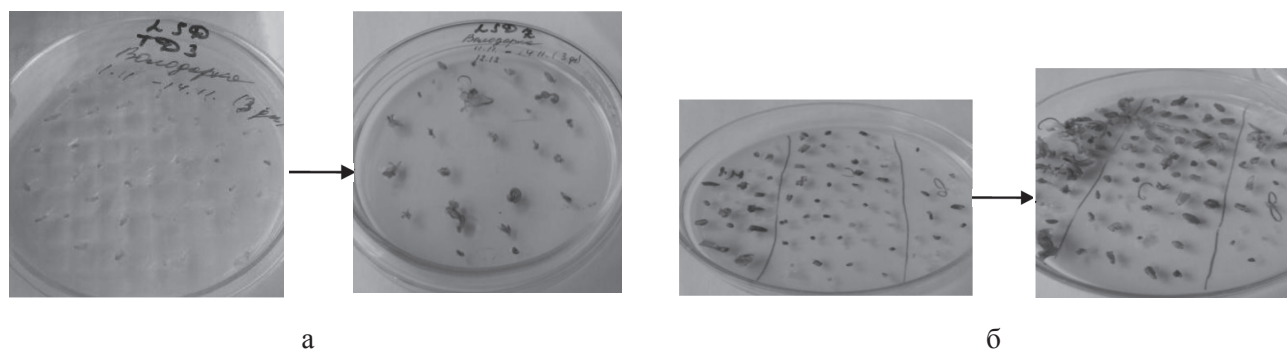


Рис. 1. Експланти для регенерації та процес регенерації у пшениці: а – апікальна меристема, б – сегменти пагону

вищем Гамбурга В5, яке містило 2 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (оптична щільність при 600 нм = 0,5 оптичних одиниць) та інокулювали експланти від 20хв до 1год. Кокультивування проводили протягом 2 діб у темряві при 27 °С на агаризованому безвуглеводному середовищі. Для регенерації пагонів використовували середовище LS [11] з додаванням тидіазурону та зеатину. Селекцію проводили після індукції пагоноутворення, додаючи в середовище культивування канаміцинсульфат в концентрації 50 мг/л. Для елімінації клітин агробактерії в середовище для пагоноутворення додавали антибіотик цефотаксим в кінцевій концентрації 500 мг/л.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в період запилення двома способами. В одному випадку здійснювали попереднє кастрування рослин пшениці та інокуляцію суспензією клітин агробактерії з наступним примусовим запиленням. В іншому – кастрування, примусове запилення і нанесення бактерії здійснювали одночасно. Після чого колоски ізолювали до повного дозрівання зерна. Отриманий насіннєвий матеріал вводили в умови *in vitro* для проведення селекції, яку здійснювали протягом двох пасажів на середовищі з додаванням 50 мг/л канаміцинсульфату. ДНК рослин, які витримували селективний тиск середовища (залишались зеленими), перевіряли на наявність трансгенів методом ПЛР, як описано нами раніше [12].

Результати та обговорення

Обов'язковим етапом при отриманні трансгенних рослин в культурі *in vitro* є регенерація пагонів із рослинних тканин, які піддаються впливу *A. tumefaciens*. При трансформації апікальної меристеми та сегментів пагонів пшениці нами підібрані умови, коли регенерація відбувалась у кінці першого пасажу в обох випадках (рис. 1 а, б). При використанні сегментів пагона, найбільш

вдалим експлантом була його нижня частина, регенерація із якої відбувалась майже у половини експлантів.

Близько 5 % із отриманих після генетичної трансформації регенерантів залишались зеленими після двох пасажів на середовищі з селективною концентрацією канаміцинсульфату. При цьому головною проблемою, з якою ми зіткнулись, було незадовільне укорінення пагонів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (рис. 2). Такі випадки ми спостерігали раніше у регенерантів соняшнику [13].

Для уникнення довготривалої процедури отримання культури *in vitro* та збільшення виходу генетично модифікованих рослин паралельно відпрацьовували метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *in planta*. Раніше на кукурудзі та соняшнику нами було показано, що нанесення суспензії агробактеріальних клі-



Рис. 2. Відсутність ризогенезу у стійкого до дії канаміцинсульфату регенеранта пшениці

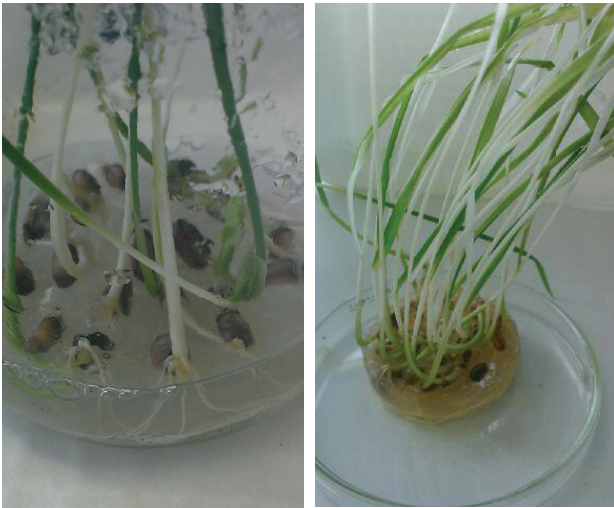


Рис. 3. Селекція рослин пшениці на середовищі з канаміцинусульфатом

тин в процесі запилення ефективно для інтеграції в рослинний геном трансгенів [12, 14].

У випадку, коли суспензію агробактеріальних клітин наносили в період кастрування, а примусове запилення здійснювали через деякий час, спостерігали зав'язування насіння в середньому від 4 до 8 штук на колосі. При одночасному каструванні, нанесенні бактерії та запиленні зав'язуваність зерна була меншою (3–4 на колосі).

Отримане насіння вводили в культуру *in vitro* для селекції та аналізували на присутність трансгенів (рис. 3).

Загалом із 42 зразків ДНК озимої пшениці, які були проаналізовані на наявність фрагмента інтрону цільового гена проліндегідрогенази арабідопсису, амплікон очікуваного розміру 706 п.н., був виявлений у ~15 % варіантів (рис. 4). Тоді як фрагмент екзону гена проліндегідрогенази (розмір очікуваного амплікона – 545 п.н.) ідентифікували у 4 із 16 проаналізованих зразків (рис. 5).

Отримані результати свідчать про ефективність інтеграції трансгенів в геном рослин пшениці запропонованими нами способами *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* в процесі запилення.

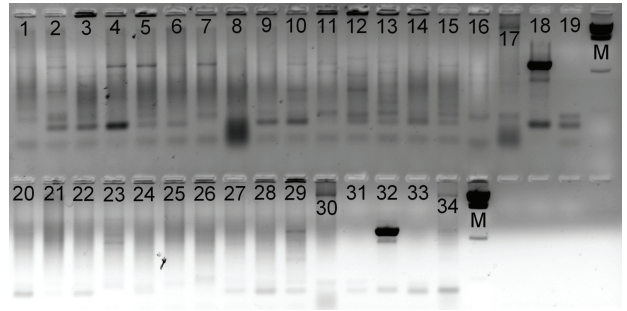


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК зразків пшениці з праймерами до інтрону гена *pdh*: лунки 1–16 – ДНК зразків пшениці, 17 – –К (ДНК *T. aestivum*); 18 – +К (ДНК *A. thaliana*); 19 – К₀ (ТЕ-буфер), М – маркер молекулярної маси – ДНК л, гідролізована *Hind*III

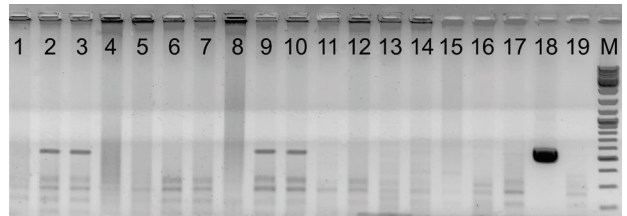


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК зразків пшениці з праймерами до екзону гена *pdh*: лунки 1–16 – ДНК зразків пшениці, 17 – К (ДНК *T. aestivum*); 18 – +К (ДНК *A. thaliana*); 19 – К₀ (ТЕ-буфер), М –маркер молекулярної маси – ДНК л, гідролізована *Hind*III

Висновки

Підібрані експланти та умови для індукції регенерації рослин пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Близько 5 % регенерантів були стійкими до дії канаміцинусульфату, що говорить про експресію селективного гена.

Розроблений спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* озимої пшениці в процесі запилення та отримано насіннєве покоління з цільовим геном.

ЛІТЕРАТУРА

1. Luo Z.-X., Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway // *Molecular Biology Reporter*. – 1989. – 7. – P. 69–77.
2. Touraev A., Stüger E., Voronin V., Heberle-Bors E. Plant male germ line transformation // *The Plant Journal*. – 1997. – 12, N 4. – P. 949–956.
3. Yang A., Su Q., An L. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector- and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear *gfp* cassette transformation // *Planta*. – 2009. – 229. – P. 793–801.
4. Supartana P., Shimizu T., Shioiri H., Nogawa M., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Biosci. Bioeng.* – 2005. – 100, N 4. – P. 391–397.
5. Risacher T., Craze M., Bowden S., Paul W., Barsby T. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via *in planta* inoculation // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – 478. – P. 115–124.
6. Wang M., Zhang B., Wang Q. Cotton transformation via pollen tube pathway // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – 958. – P. 71–77.
7. Моргун В.В., Кордюм В.А., Ларченко Е.А., Ткаченко Л.В. Передача наследственных признаков с помощью экзогенной ДНК у кукурузы // *Молекулярная биология*. – 1980, № 26. – С. 9–12.
8. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А. и др. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // *Генетика*. – 2006. – 42, № 8. – С. 1083–1088.
9. Bent A.F. *Arabidopsis in Planta* Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species // *Plant Physiology*. – 2000. – 124. – P. 1540–1547.
10. Wang J., Sun Y., Li Y. Maize (*Zea mays*) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens* // *Biotechnol Appl. Biochem.* – 2007. – 46, (Pt 1). – P. 51–55.
11. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize // *Nature protocols*. – 2007. – 2, N 7. – P. 1614–1621.
12. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.И., Моргун Б.В., Кочетов А.В. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* и *in planta* с использованием штамма LBA4404, несущего плазмиду pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // *Цитология и генетика*. – 2014. – 48, № 4. – С. 19–30.
13. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // *Біотехнологія*. – 2010. – 3, № 4. – С. 67–74.
14. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных *in planta* с использованием LBA4404, несущего pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // «Известия Самарского научного центра РАН». – 2013. – № 3 (5). – С. 1662–1666.

MYKHALSKA S.I., KOMISARENKO A.G., TISHCHENKO O.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

DEVELOPMENT OF METHODS OF WHEAT *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION

Aims. *Agrobacterium* – mediated wheat transformation is marked by a number of limitations. Low frequencies of regeneration, genetic transformation, obtain of fertile plants are among them. The optimization of protocols of *Agrobacterium* – mediated transformation *in vitro* and *in planta* can increase the effectiveness of the whole method.

Methods. *Agrobacterium* – mediated transformation of *Triticum aestivum* L. was established. Various explants of bread wheat were used. There are apical meristems from 3-day aseptic seedlings, upper, middle, low parts of 5–6 –days seedlings. The selection of transformants was carried out on cultural media with the 50 mg/l of kanamycin sulfate. **Results.** The procedures of *Agrobacterium* – mediated transformation *in vitro* and *in planta* were improved. Using LBA4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene transgenic wheat plants were obtained. PCR-analysis showed that exon as well as intron of ProDH of *Arabidopsis* were introduced into wheat genome.

Conclusions. Protocols of wheat *Agrobacterium* – mediated transformation may be using for wheat genetic improvement

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium* – mediated transformation *in vitro* and *in planta*, dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene.