УДК 581.143.6:58.085

ГОНЧАРУК О.М., ДУБРОВНА О.В.✉
Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
✉ *dubrovny@ukr.net*

ОТРИМАННЯ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ З ГЕТЕРОЛОГІЧНИМ ГЕНОМ ОРНІТИН-Δ-АМІНОТРАНСФЕРАЗИ

Мета. Отримання генетично-модифікованих рослин м'якої пшениці з гетерологічним геном орнітин-δ-амінотрансферази. ***Методи.*** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур *in vitro*, ПЛР-аналіз. ***Результати.*** Шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці (*Triticum aestivu*m L.) сорту Зимоярка з використанням штаму AGLO, що містить бінарний вектор pBi-OAT із цільовим геном орнітин-δ-амінотрансферази (*oat*) та селективним – неоміцинфосфотрансферази II (*npt*II), отримано трансгенні рослини-регенеранти. ***Висновки.*** В результаті проведення генетичної трансформації калюсів сорту Зимоярка отримано 12 рослин-регенерантів пшениці, у геномі яких виявлено повне вбудовування генетичної конструкції, яка містить трансгени *oat* та *npt*II.
Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, ген орнітин-δ-амінотрансферази, ПЛР-аналіз.

Створення генетично модифікованих рослин сільськогосподарських культур, стійких до абіотичних стресових чинників, є актуальним напрямом сучасних генетичних досліджень. На сьогодні у генетичній інженерії злаків, у тому числі і пшениці, широко використовується метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [1, 2]. Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів; можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною їх перебудовою; простота методик та загалом менша вартість.

Адаптація рослин до несприятливих умов навколишнього середовища вимагає реалізації складних генетичних програм,у яких задіяна скоординована експресія великих генних комплексів, дослідження яких необхідне для розуміння молекулярних механізмів стійкості до стресів. Зокрема, у відповідь на стрес змінюється рівень експресії генів, що контролюють метаболізм деяких амінокислот [3]. До їх числа відноситься ген орнітин-δ-амінотрансферази, який кодує фермент (ОАТ, КФ 2.6.1.13), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням пірролін-5-карбоксилату (П5К) та глутамату [4]. Ця реакція є частиною системи взаємоперетворень таких амінокислот, як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний із фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресів, регуляцією процесів розвитку [5–7]. Згідно з літературними даними, ген *oat* бере участь у відповіді на стрес, проте його конкретна біологічна роль залишається неясною і є предметом обговорення [4]. Довгий час вважалося, що орнітин-δ-амінотрансфераза бере участь у синтезі проліну за стресу [8], проте ряд дослідників спростовують це твердження і постулюють, що ген *oat* регулює деградацію орнітину і пов'язаний із системою рециркуляції азоту [5]. Окремі дані вказують на участь гена *oat* в ряді інших життєво важливих клітинних процесів [9]. Потенційно орнітин-δ-амінотрансфераза може бути важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення та деградації проліну і шлях біосинтезу поліамінів.

Введення екзогенного гена орнітин-δ-амінотрансферази в геном пшениці є одним з перспективних методів створення стійких до несприятливих умов рослин. Встановлено, що його надекспресія підвищувала рівень стійкості рослин рису та тютюну до водного дефіциту та засолення [8, 10]. Однак генетичну трансформацію з використанням агробактеріального рекомбінантного штаму з плазмідою, що містить цільовий ген – *oat*, у рослин пшениці досі не проводили. У зв'язку з цим метою нашої роботи було проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів м'якої

© **ГОНЧАРУК О.М., ДУБРОВНА О.В.**

пшениці та отримання генетично-модифікованих рослин із гетерологічним геном орнітин-δ-амінотрансферази.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували сорт-дворучку м'якої пшениці Зимоярка, який характеризується відносно високим морфогенним потенціалом *in vitro* [11]. Для трансформації застосовували калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили з використанням штаму AGLO, що містить бінарний вектор pBi-OAT із цільовим геном орнітин-δ-амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний – неоміцинфосфотрансферази II (*npt*II) *E. coli* (рис. 1). Ця конструкція люб'язно надана д. б. н. Кочетовим А.В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ.

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л. Для кокультивування експлантів використовували суспензію агробактерії в концентрації OD_{660} = 0,3. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 20 хв., потім просушували на фільтрувальному папері та переносли у чашки Петрі (близько 50 шт.) на живильне середовище для кокультивування [12]. Кокультивування здійснювали протягом 48 год. у термостаті за температури 27ºС. Після цього експланти поміщали на модифіковане живильне середовище для регенерації, яке містило 100 мг/л канаміцину в якості селективного агента для попереднього відбору трансформантів. Культивування здійснювали за температури 24ºС і 16-годинного фотоперіоду протягом 30-ти діб. Кожні 10 діб проводили пасажування на свіже регенераційне середовище. Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на живильне середовище для вкорінення за температури 24ºС і 16 год. фотоперіоду. Вкорінення тривало 2–3 тижні. Рослини з достатньо розвиненою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в горщики з ґрунтом.

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 проводилася на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакційні суміші передбачали: 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.

Результати та обговорення

Загалом було виділено 800 апікальних меристем, із яких індукований калюс. Коли калюси набули розміру 4–5 мм діаметром, їх використовували для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Протягом першого пасажу 54,0±1,4 % калюсів перейшли до морфогенного стану (рис. 2 *а*) Наприкінці першого пасажу почали відбуватися регенераційні процеси – утворювалися перші пагони. Індукція пагонів йшла поступово, була розтягнута протягом 3-х пасажів. Утворювалися пагони трьох типів: зелені (канаміцин-стійкі) (рис. 2 *б*), білі (нестійкі до канаміцину) (рис. 2 *в*) та строкаті біло-зелені (рослини-мозаїки) (рис. 2 *г*).

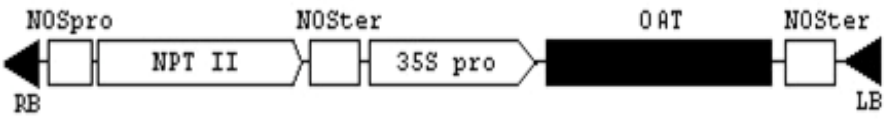
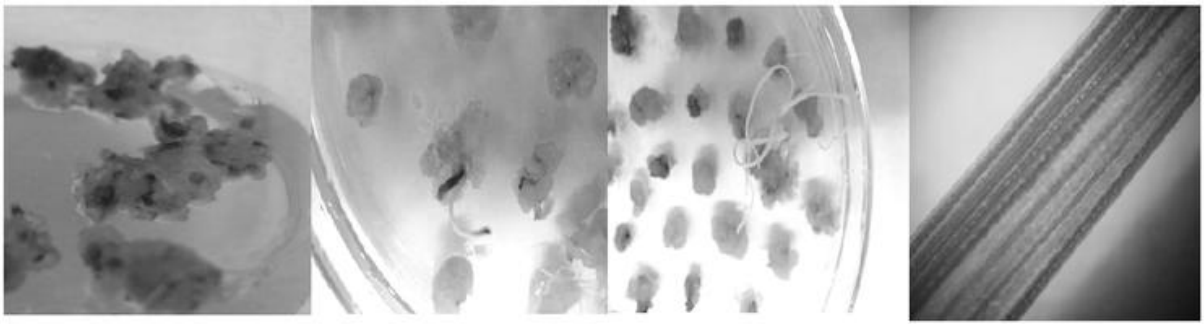


Рис. 1. Блок-схема бінарного вектора pBi-OAT. LB, RB – лівий та правий бордери Т-ДНК; NOSpro, NOSter – промотор та термінатор нопалінсинтази; *npt* II – ген неоміцинфосфотрансферази II *E.coli*; 35S pro – промотор 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV); OAT – ген орнітин-δ-амінотрансферази *Medicago truncatula*.



а *б* *в* *г*

Рис. 2. Регенерація пагонів із калюсних культур пшениці після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: *а* – морфогенний калюс; *б* – стійкі до канаміцину пагони; *в* – регенерант, нестійкий до канаміцину; *г* – листок із проявом мозаїцизму.

Паралельно з регенерацією на калюсах, які були не здатні утворювати пагони, помічалася поява некротичних ділянок. Імовірно, це було пов'язано з негативною дією канаміцину на нестійкі тканини. Загальна частота регенерації становила 34,2±1,7 %, при цьому утворювалося 8,3±0,6 % канаміцин-стійких пагонів.

Частина індукованих пагонів характеризувалася відсутністю хлорофілу, нездатністю формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина пагонів містила хлорофіл, однак під час перенесення на живильне середовище для укорінення поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Крім того, помічено утворення псевдостійких рослин, які спочатку зберігали зелене забарвлення, але в подальшому новоутворені листки формувалися безбарвними. На нашу думку, їх виникнення є наслідком того, що апікальна меристема соматичного ембріоїда залишається нетрансформованою, відповідно всі новоутворені клітини (тканини), які з неї формуються, не проявляють ознаки стійкості до канаміцину.

Більшість отриманих канаміцин-стійких регенерантів за дії селективного агента характеризувалися нормальним розвитком. Проте траплялися рослини-мозаїки, що в тій чи іншій мірі містили тканини, позбавлені хлорофілу (рис. 2 *г*). На наш погляд, наявність таких регенерантів може бути свідченням 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.

Із метою підтвердження наявності послідовності трансгена *npt*II в регенерованих пагонах проводили аналіз за допомогою ПЛР. Відповідно до його результатів, позитивний сигнал присутності послідовності гена – амплікон розміром 700 пн (рис. 3) – виявлено у 12 рослин-регенерантів сорту Зимоярка, що становить 1,5 % від загальної кількості трансформованих калюсів відповідно (табл.).

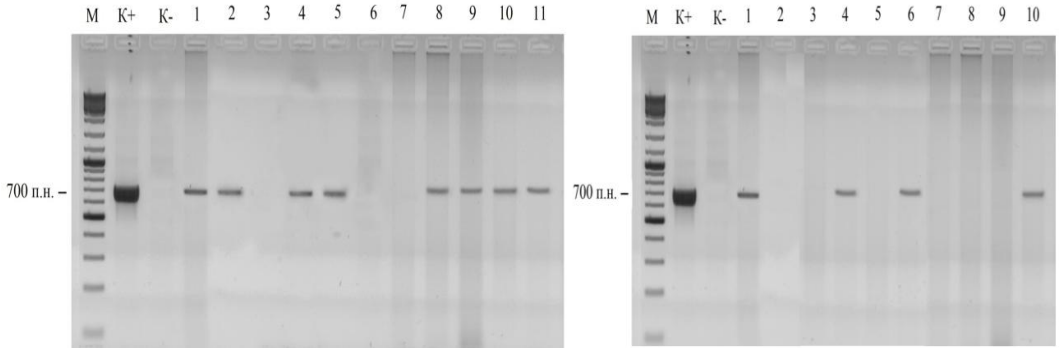


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до гена *npt*II. Доріжки 1–11 – досліджувані зразки; К- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці; К+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGLO з генетичною конструкцією pBi-OAT; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

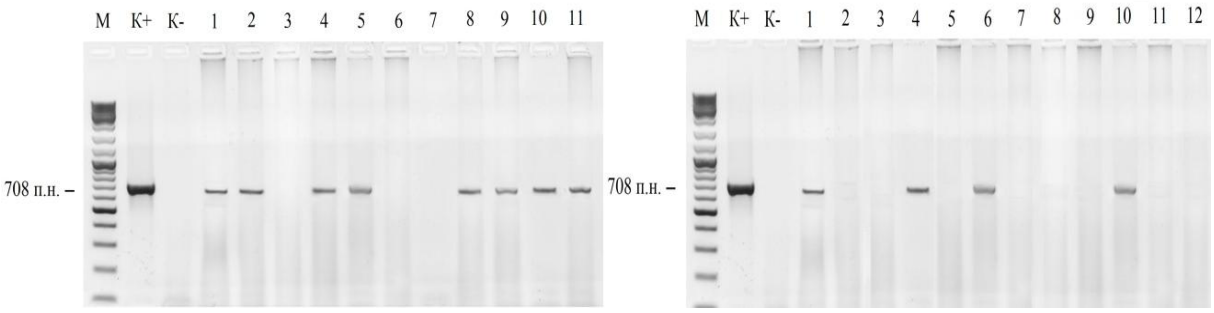


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до цільового гена *oat*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки; К- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці; К+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGLO з генетичною конструкцією pBi-OAT; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Оскільки генетична конструкція pBi-OAT, якою трансформували калюси, містить цільовий ген *oat*, то за допомогою ПЛР було проведено визначення присутності послідовності цього трансгена в рослинах, у яких попередньо виявили наявність трансгена *npt*II. За результатами аналізу (рис. 4) послідовності гена орнітин-δ-амінотрансферази виявлено в усіх досліджених зразках.

Це свідчить про те, що під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генетично конструкція повністю перенеслася у ядерний геном. Із метою вилучення бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме гена *Vir* C. Довжина очікуваного амплікона складає 730 п. н. Результати аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (рис. 5) свідчать про відсутність агробактеріального забруднення в рослинних зразках.

Після того, як рослини-регенеранти формували розгалужену кореневу систему, їх переносили на адаптацію до умов ґрунту. Адаптація відбувалася в умовах підвищеної вологості. Було помічено, що найкраще процес адаптації відбувався за температури +5...+15°С.

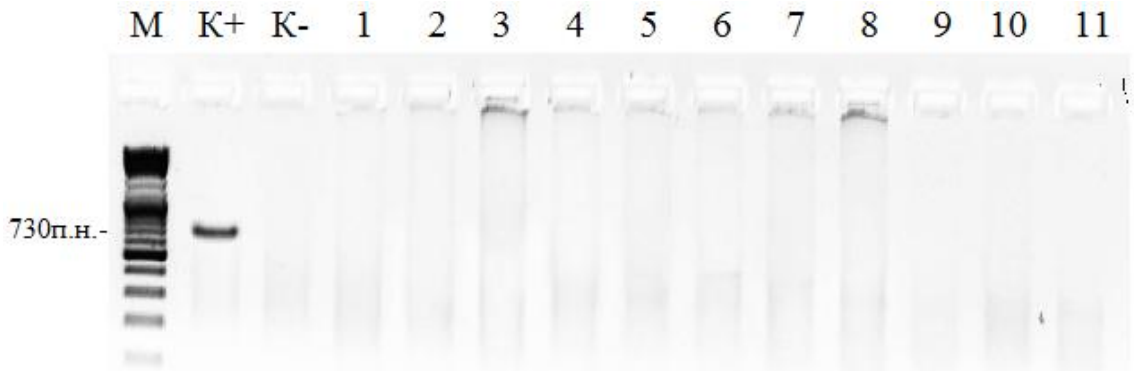


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до послідовності гена *Vir* C. Доріжки 1–11 – досліджувані зразки; К- – негативний контроль – ТЕ буфер; К+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGLO з генетичною конструкцією pBi-OAT; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix.

Таблиця. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці

Векторна конструкція	Кількість трансформованих калюсів, шт.	Кількість канаміцинстійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
		шт.	%	шт.	%
pBi-OAT (штам AGLO)	800	66	8,3±1,0	12	1,5±0,4

Висновки

Використовуючи в якості експлантів апікальні меристеми пагонів 3-добових стерильних проростків, за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні рослини пшениці, які несуть цільовий ген орнітин-δ-амінотрансферази. Трансгенна природа всіх отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *oat* та *npt*II. В результаті проведення генетичної трансформації калюсів сорту Зимоярка отримано 12 рослин-регенерантів пшениці, в геномі яких виявлено повне вбудовування генетичної конструкції, яка містить трансгени *oat* та *npt*II. Ефективність трансформації для сорту Зимоярка становить 1,5 %.

Література

1. Mamrutha H.M., Kumar R., Venkatesh K., Sharma P., Kumar R., Tiwari V., Sharma I. Genetic transformation of wheat – present status and future potential. *J. of Wheat Research*. 2014. Vol. 6, (2). p. 107–119.
2. Binka F., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale Wittmack*): role of the binary vector system and selection Cassettes. *J. of Applied Genetics*. 2012. Vol. 53. p. 1–8.
3. Martinelli T., Whittaker A., Bochicchio A., Vazzana C., Suzuki A., Masclaux-Daubresse C. Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. *J Exp. Bot*. 2007. Vol. 58, Issue 11. P. 3037–3046.
4. Stranska J., Kopecny D., Kopecna M., Snégaroff J., Sebela M. Biochemical characterization of pea ornithine-d-aminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie.* 2010. Vol. 92 (8). P. 940–948.
5. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol*. 2008. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419821 (дата звернення: 25.02.2018).
6. Cañas R.A., Villalobos D.P., Díaz-Moreno S.M., Cánovas F.M., Cantón F.R. Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine-d-Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination. *Plant Physiol*. 2008. Vol. 148. P. 77–88.
7. Mattioli R., Costantino P., Trovato M. Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav*. 2009. Vol. 4, (11). P. 1016–1018.
8. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002. Vol. 9 (2). p. 73–80.
9. Page A., Minocha R., Minocha S. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells. *Amino Acids.* 2012. Vol. 42 (1). P. 295–308.
10. Wu L., Fan Z., Guo L., Wu L. Over-expression of an *Arabidopsis OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Chinese Sci. Bull*. 2003. Vol. 48, № 23. P. 2594–2600.
11. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенез в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 45, № 3. С. 245–251.
12. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol*. 2009. Vol. 526. P. 47–58.

Reference

1. Mamrutha H.M., Kumar R., Venkatesh K., Sharma P., Kumar R., Tiwari V., Sharma I. Genetic transformation of wheat – present status and future potential. *J. of Wheat Research*. 2014. Vol. 6, (2). p. 107–119.
2. Binka F., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale Wittmack*): role of the binary vector system and selection Cassettes. *J. of Applied Genetics*. 2012. Vol. 53. p. 1–8.
3. Martinelli T., Whittaker A., Bochicchio A., Vazzana C., Suzuki A., Masclaux-Daubresse C. Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. *J Exp. Bot*. 2007. Vol. 58, Issue 11. P. 3037–3046.
4. Stranska J., Kopecny D., Kopecna M., Snégaroff J., Sebela M. Biochemical characterization of pea ornithine-d-aminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie.* 2010. Vol. 92 (8). P. 940–948.
5. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol*. 2008. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419821 (last accessed: 25.02.2018).
6. Cañas R.A., Villalobos D.P., Díaz-Moreno S.M., Cánovas F.M., Cantón F.R. Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine-d-Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination. *Plant Physiol*. 2008. Vol. 148. P. 77–88.
7. Mattioli R., Costantino P., Trovato M. Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav*. 2009. Vol. 4, (11). P. 1016–1018.
8. Roosens N., Bitar F., Loenders K. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002. Vol. 9 (2). p. 73–80.
9. Page A., Minocha R., Minocha S. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells. *Amino Acids.* 2012. Vol. 42 (1). P. 295–308.

10. Wu L., Fan Z., Guo L., Wu L. Over-expression of an *Arabidopsis OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Chinese Sci. Bull*. 2003. Vol. 48, № 23. P. 2594–2600.
11. Honcharuk O.M., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Morphogenesis in the culture of apical meristems of high-yielding winter wheat varieties. *Plant physiology and genetics*. Vol. 45, No. 3. P. 245–251.
12. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol*. 2009. Vol. 526. P. 47–58.

HONCHARUK O.M., DUBROVNA O.V.
Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

RECEIVING OF GENETIC-MODIFIED WHEAT PLANTS WITH HETEROLOUS ORNITIN-Δ-AMINOTRANSFERASE GENE

Aim. Receiving of genetically modified plants of bread wheat with heterologous ornithine-δ-aminotransferase gene. ***Methods***. *Agrobacterium*-mediated transformation of callus cultures *in vitro*, PCR-analysis. ***Results***. By *Agrobacterium*-mediated transformation of the morphogenic calluses of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using the AGLO strain containing the binary vector pBi-OAT with the target ornithine-δ-aminotransferase (oat) and selective neomycin-phosphotransferase II (*nptII*), transgenic plants-regenerators have been obtained. ***Conclusions***. As a result of the genetic transformation of Zimoyarka variety, 12 wheat regenerants were obtained in the genome which revealed a complete integration of the genetic construct containing the oat and *nptII* transgenes.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, ornithine-δ-aminotransferase gene, PCR-analysis.