УДК 579.254.2:633.11

МИХАЛЬСЬКА С.І.✉, КОМІСАРЕНКО А.Г., КУРЧІЙ В.М., ТИЩЕНКО О.М.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
✉ *mykhalskasvitlana@gmail.com*

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *IN PLANTA* ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Мета. Оптимізувати спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці озимої, підібрати умови та період інокуляції для ефективного перенесення генів у процесі запилення. ***Методи.*** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.). ***Результати.*** Підібрані умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці озимої в процесі примусового запилення з частотою трансгенезу 4 % та під час самозапилення з частотою приблизно 1 %. ***Висновки***. Показана можливість інтеграції трансгенів у геном рослин пшениці озимої методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* в процесі примусового та природного запилення. Встановлено, що ефективність трансформації в значній мірі залежить від генотипу рослини та способу проведення процедури трансформації. Селекція трансгенних рослин в умовах дії стресового фактора, що створює дефіцит води, дає можливість відбирати рослини з функціональним трансгеном. Ознака функціонування трансгену зберігається в наступному поколінні генетично-зміненої пшениці озимої.
Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta*, трансгенні рослини, насіння.

Технологія генетичної трансформації має великі перспективи для поліпшення цінних ознак важливих сільськогосподарських культур. Перенесення генів з заданими ознаками методом генетичної трансформації – це швидкий альтернативний шлях створення нових продуктивних форм, у тому числі і стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів.

Отримання трансгенних рослин пшениці за допомогою агробактеріальної трансформації довгий час вважалося неможливим у зв'язку зі стійкістю злакових культур до цього патогену. Передбачалося, що несприйняття агробактеріального зараження однодольними викликане відсутністю специфічних сигнальних молекул, які індукують Vir-область та вирізання Т-ДНК. На сьогодні встановлено, що такі молекули виділяються багатьма однодольними і злаками в тому числі, а інтеграція Т-ДНК залежить від віку, фізіологічного стану рослин та умов проведення досліду [1, 2]. На сучасному етапі генетично-модифіковані форми пшениці здебільшого отримують шляхом біолістичної трансформації, що передбачає етапи культивування *in vitro,* в тому числі процеси калюсогенезу, регенерації та укорінення пагонів. Останнім часом увага дослідників спрямована на розробку методів інтеграції рекомбінантних молекул ДНК в геном рослин *in planta,* що є важливим у зв'язку з підвищенням ефективності трансгенезу. Крім того, такий спосіб має ряд переваг, зокрема – менш трудомісткий, економічний, масштабний тощо [3–5].

Загалом за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *in planta,* використовують два головних підходи. Один із них реалізується в процесі запилення, інший під час маніпуляцій з апікальними меристемами зрілого насіння. На сьогодні встановлено, що ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* залежить від багатьох факторів, одним із яких є температурні параметри чутливості білків, що беруть участь у перенесенні Т-ДНК [6, 7]. Аналіз літературних даних та наші попередні дослідження свідчать, що оптимальним для *Agrobacterium-опосередкованого* перенесення Т-ДНК в процесі запилення є температурний діапазон від 20°С до 25°С. Не менш важливим фактором є підбір ефективних гіпервірулентних штамів та оптична щільність суспензії бактеріальних клітин. Нами на прикладі кукурудзи та соняшнику встановлено, що для ефективної генетичної трансформації *in planta* концентрація агробактеріальних клітин у суспензії має досягати приблизно 0,5-0,8 О.О. При цьому для підвищення частоти *Agrobacterium-опосередкованого* перенесення Т-ДНК в процесі запилення ефективним є додавання в середовище для роз-

© **МИХАЛЬСЬКА С.І., КОМІСАРЕНКО А.Г., КУРЧІЙ В.М., ТИЩЕНКО О.М.**

ведення агробактеріальної суспензії тіолового компонента (тіосульфату натрію), навіть без активаторів вірулентності, зокрема таких, як ацетосирингон [8, 9].

На сьогодні оптимальні параметри та механізм передачі Т-ДНК у зародкові клітини пшениці за трансформації *in planta* ще повністю не встановлені, але беззаперечним є факт, що успішність цієї процедури залежить від фізіологічних та генетичних особливостей генотипу рослин, стадії їх розвитку, умов вегетації, тривалості контакту рослинних тканин із бактеріальною суспензією та від строку запилення.

Із метою оптимізації *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці нашим завданням було підібрати умови та період інокуляції для ефективного перенесення генів у процесі запилення, оцінити ефективність використання різних агробактеріальних штамів та проаналізувати збереження ознаки трансгенезу в наступному поколінні.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для генетичної трансформації були такі сорти пшениці озимої: Фаворитка, Володарка, Достаток, Поліська 90 (селекції ІФРГ НАН України).

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовували штами *A. tumefaciens LBA*4404 та AGLO, що містять плазміду pBi2E (люб'язно надані доктором біологічних наук Кочетовим О.В., Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ).

Векторна конструкція pBi2E створена на основі гена проліндегідрогенази (*PDH*) *Arabidopsis thaliana* L. Вона складається із фрагментів першого екзона та інтрона гена *PDH*1 арабідопсису *Arabidopsis thaliana* L., який кодує фермент катаболізму L-проліну. Причому два фрагменти екзона *PDH*1 розташовані як обернений повтор, що охоплює фрагмент інтрона *int*1. Розміщення фрагментів гена *PDH* в антисенсовій орієнтації призводить до пригнічення його експресії шляхом пост транскрипційного сайленсінгу РНК.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду двома способами, які в попередніх наших дослідженнях мали більший позитивний результат трансгенезу [10].

У першому випадку після досягнення рослинами фази колосіння здійснювали видалення пиляків шляхом кастрування та проводили інокуляцію бактеріальної культури на приймочку маточки за 2–3 доби до цвітіння. Запилення проводилося примусовим способом у ранкові часи, переважно на 3–5 добу після кастрації. Після цього колоски ізолювали до повного дозрівання насіння (спосіб 1).

У другому випадку до початку цвітіння примусово відкривали квітку та наносили суспензію агробактерії без видалення пиляків. Після цього суцвіття пшениці ізолювали пергаментними ізоляторами, при цьому запилення відбувалося природним шляхом (самозапилення) в міру дозрівання пилку (спосіб 2).

Для генетичної трансформації використовували добову культуру *A. tumefacins*. Клітини поодиноких колоній розмножували у рідкому живильному бульйоні HIMEDIA^{R} M002. Для інокуляції використовували суспензію клітин агробактерій, оптична щільність яких за 600 нм складала 0,5 – 0,8 О.О.

Селекцію генетично-модифікованих рослин проводили за маркерною ознакою стійкості до канаміцину (100 мг/л) та за ознакою, набутою в результаті часткової супресії гена *PDH*, – підвищена стійкість до водного дефіциту, створеного непроникаючим омотиком манітом (0,5 М/л). Інтеграцію трансгенів підтверджували ПЛР-методом [9]. Експериментально отримані дані обробляли методами математичної статистики [11].

Результати та обговорення

Ефективність інтеграції в рослинний геном трансгенів шляхом нанесення суспензії клітин *A. tumefaciens* у процесі запилення раніше нами показана на рослинах кукурудзи і соняшнику [12, 13]. При цьому бактерії проникають у зав'язь через отвір пилкової трубки і передають Т-ДНК яйцеклітині, подібним чином, як туди потрапляє генеративна клітина. Такої думки дотримуються ряд дослідників, вказуючи при цьому, що проростання пилкової трубки пов'язано з активністю ферментів, які викликають руйнування клітинних стінок і полісахаридів, що містяться в міжклітинному матриксі. Більш того, речовини, що утворюються під час росту пилкової трубки, можуть функціонувати як стимулятори *vir* генів і сприяти переносу Т-ДНК [14].

Процес проникнення клітин *Agrobacterium tumefaciens* до зав'язі у пшениці можна контролювати шляхом кастрації пиляків і пода-

льшого запилення [9]. Нами показано, що час і спосіб нанесення агробактеріальної суспензії та період запилення впливають на можливість отримання повноцінного насіння, а отже, і трансформованих рослин. При цьому середня кількість зернівок із колоса за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації була значно нижча порівняно з контролем, що свідчить про негативний вплив *A. tumefaciens* та примусового запилення на зав'язування насіння у пшениці озимої (рис. 1).

Успішність генетичної трансформації *in planta* у пшениці може бути пов'язана як із генотиповою залежністю, так і з дієвістю використаних генетичних конструкцій та способом проведення процедури трансформації. Між досліджуваними нами генотипами пшениці встановлена достовірна різниця за показником зав'язування насіння під час застосування різних варіантів проведення процедури трансформації (рис. 2).

Так, за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням штаму AGLO, що містить pBi2E, для сорту пшениці озимої Поліська 90 найбільший показник зав'язування насіння спостерігався у процесі самозапилення без процесу видалення пиляків (спосіб 2) і становив у середньому 37 зернівок на колос; цей показник для сорту Фаворитка дорівнював 20. У ході проведення процедури трансформації із застосуванням кастрації квіток і примусового запилення (спосіб 1) у сорту Поліська 90 зав'язувалося в середньому по 2 насінини на колос, тоді як у сорту Фаворитка – 8.

Слід відзначити, що сорт Фаворитка також мав високий вихід сформованого насіння і за генетичної трансформації *A. tumefaciens* штамом *LBA* 4404, що несе pBi2E. Цей показник для названого генотипу за примусового запилення після процесу кастрації та нанесення бактерії становив близько 18, тоді як за другого способу інокуляції бактеріальної культури та природного запилення в середньому отримували по 25 насінин на суцвітті.

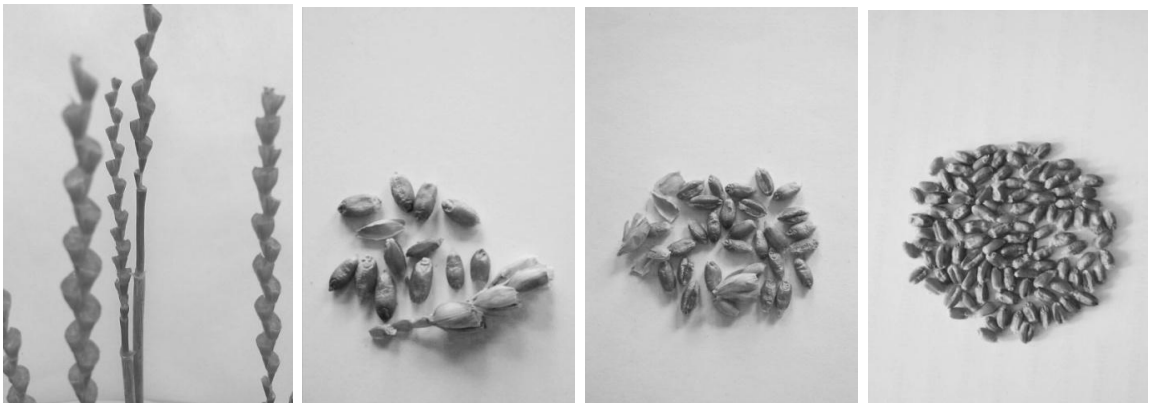


Рис. 1. Формування насіння у пшениці після генетичної трансформації в процесі запилення.

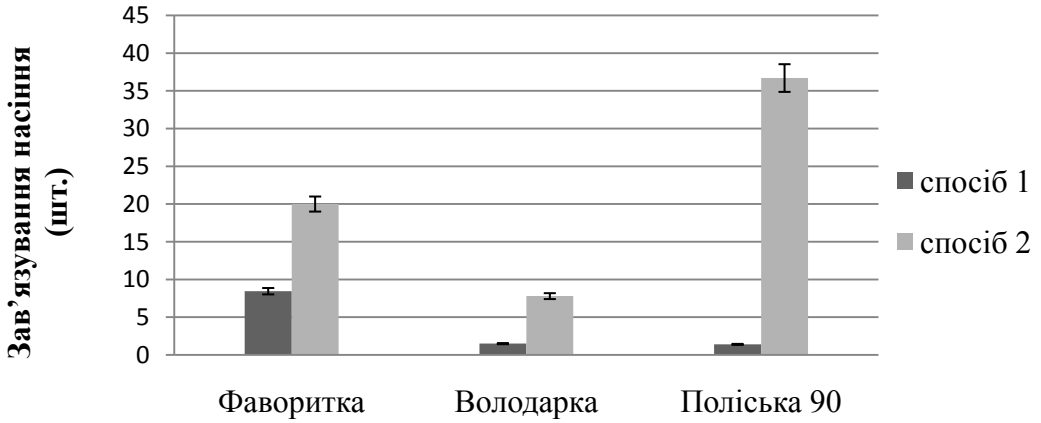


Рис. 2. Зав'язування насіння у пшениці після генетичної трансформації *in planta*.

Для сорту Володарка помічено низький показник зав'язування насіння під час проведення обох способів генетичної трансформації. У процесі застосування способу 2 цей показник не перевищував 6 насінин на колос, тоді як за способу 1 – в середньому становив 2 насінини. Аналогічна закономірність встановлена і для сорту Достаток.

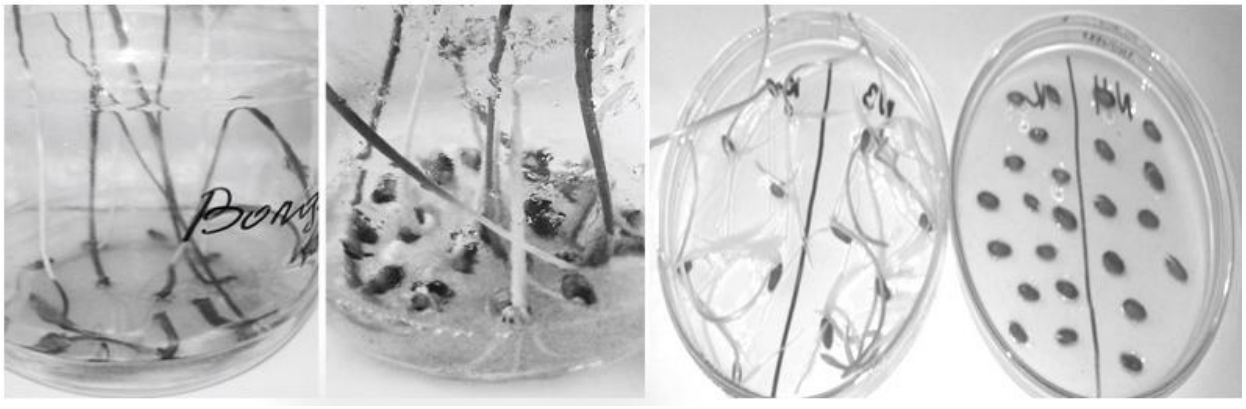
Таким чином, під час генетичної трансформації *in planta* пшениці озимої для всіх досліджуваних генотипів (за використання обох агробактеріальних штамів) найбільший показник зав'язування насіння отримано у ході попередньої інокуляції бактерій та самозапилення (спосіб 2). Достовірної різниці в зав'язуванні насіння залежно від використання штаму *A. tumefaciens* нами встановлено не було.

Формування повноцінного насіння важливий показник, але він не відображає кінцевого результату – інтеграції трансгена в геном. У випадку масового отримання Т0 нами запропонований та успішно апробований на кукурудзі та соняшнику спосіб відбору генетично-змінених варіантів із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази з використанням жорстких умов селекції на стійкість до модельованого осмотичного стресу, створеного додаванням у середовище для культивування непроникаючого осмотика маніту (0,5 М) [15]. Такий підхід дозволяє встановити залежність, пов'язану з рівнем експресії генів і стрес-стійкістю рослин, та дати відповідь на питання про доцільність часткової супресії ендогенних генів катаболізму проліну для підвищення стійкості рослин. Крім того, такі дослідження дозволяють відразу відбирати варіанти, стійкі до водного дефіциту (рис. 3).

Під час відбору трансгенних рослин в умовах дії селективного тиску канаміцину та летальної для контрольних варіантів дози маніту життєздатними залишалися рослини, молекулярно-генетичний аналіз яких підтверджував наявність у їх тотальній ДНК елементів цільового та селективного генів. При цьому (хоча спосіб 2 мав переваги щодо показника зав'язування насіння) вихід трансгенних рослин був незначним і складав у середньому близько 1 %. Більш вдалим для отримання біотехнологічних рослин був спосіб 1, за якого частота трансформації становила 4 %. Така тенденція спостерігалася у ході використання обох агробактеріальних штамів.

Важливою умовою генетичної трансформації є успішне успадкування і стабільна експресія перенесених генів. Молекулярно-генетичний аналіз випадкової вибірки насіння Т2, відібраного в умовах дії осмотичних стресів, підтвердив наявність екзону гена проліндегідрогенази арабідопсису в усіх досліджуваних зразках (рис. 4).

Таким чином, у результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці озимої з використанням штамів *LBA*4404 та *AGLO* із векторною конструкцією pBi2E і різних способів інокуляції бактеріальної культури в процесі запилення отримані генетично-змінені рослини з функціональним трансгеном.



А Б

Рис. 3. Селекція генетично-змінених рослин пшениці: А – на середовищі з канаміцином; Б – на середовищі з 0,5 М маніту.

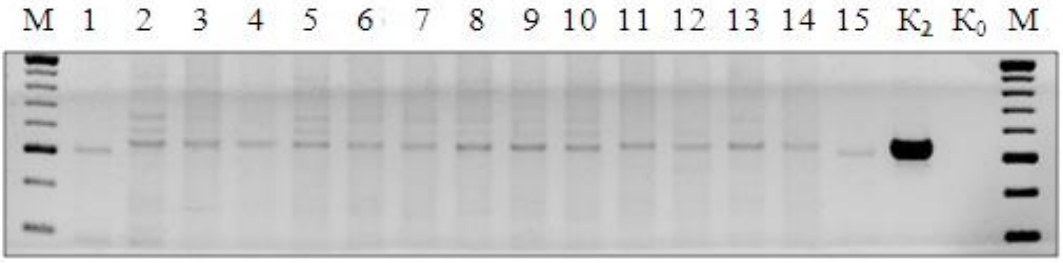


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами на визначення гена *PDH ex1*. Доріжки 2–14 – зразки пшениці; $К_2$ – позитивний контроль (*Arabidopsis thaliana*); $К_0$ – негативний контроль (без додавання ДНК); М – маркер молекулярної маси ДНК LadderMix.

Висновки

Показана ефективність інтеграції трансгенів у геном рослин пшениці озимої методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* в процесі примусового та природного запилення. Підібрані умови, коли під час проведення кастрації квітів і примусового запилення частота трансгенезу становить 4 % та у процесі самозапилення – приблизно 1 %. Ефективність трансформації значною мірою залежить від генотипу рослини, способу проведення процедури трансформації та строку запилення. Селекція трансгенних рослин в умовах дії стресового фактора, що створює дефіцит води, дає можливість відбирати рослини з функціональним трансгеном. Ознака функціонування трансгену зберігається в наступному поколінні генетично-зміненої пшениці озимої.

Література

1. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды. *Соросовский образовательный журнал*. 2000. Т. 6, № 10. С. 10–17.
2. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений. *Физиология растений*. 1999. Т. 46, № 2. С. 282–291.
3. 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. Vol. 478. P. 115–124.
4. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakaqima T., Haramoto N., Nozue M., Koqima M. Development of simple end efficient in Planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biosci Bioeng*. 2006. Vol. 102, № 3. P. 162–170.
5. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технология агробактериальной трансформации растений *in planta*. *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 8–20.
6. Dillen W., De Clereq J., Kapila J., Zamnbre M., Van Montagu M., Angenon G. The effect of temperature on Agrobacterium tumefaciens method of gene transfer to plants. *Plant J*. 1997. Vol. 12. P. 1459–1463.
7. Горбатюк І.Р. Оптимізація *Agrobacterium*-опосередкованої біотехнології трансформації *Triticum aestivum* в культурі *in vitro* та методом *in planta*: дис. … канд. биол. наук. К., 2016. 192 с.
8. 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 *LBA*4404, несущего pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2013. Т.15, № 3 (5). С. 1662–1666.
9. Тищенко Е.Н., Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Адаменко Н.И., Моргун Б.В., Кочетов А.В. Анализ эффективности использования двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы для повышения уровня устойчивости подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) к водному дефициту и засолению. *Цитология и генетика*. 2014. Т. 4. С. 19–30.
10. Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Тищенко О.М. Розробка методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. К., 2015. Т. 17. С. 213–216.
11. Доспехов Б.А. Методы полевой статистики. М.: Агрохимия, 1985. 351 с.
12. Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Тищенко О.М. Спосіб застосування *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* для отримання трансгенних рослин соняшника (*Helianthus annuus* L.). Патент України на корисну модель № 86108 від 10.12.2013.
13. Матвєєва О.Ю., Тищенко О.М., Моргун Б.В. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta.* Патент на корисну модель № 77331 від 11.02. 2013.
14. Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S., Maba B., Vezon D., Voisin R., Pelletier G. The Maternal Chromosome Set Is the Target of the T-DNA in the In Planta Transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2000. Vol. 155. P. 1875–1887. V. 12. P. 509–517.
15. Сергєєва Л.Є., Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Тищенко О.М. Спосіб відбору трансгенних рослин із підвищеним рівнем стійкості до водного стресу. Патент України на корисну модель № 97229 від 10.03.2015.

References

1. Lutova L.A. Genetic engineering of plants:achievements and hope. *Soros Educational Journal*. 2000. Vol. 6. P. 10–17.
2. Zakharchenko N.S., Kalyaeva M.A., Burianov Ya.I. Induction of processing of agrobacterial T-DNA by exudates of monocotyledonous plants. *Physiology of plants*. 1999. Vol. 46, № 2. P. 282–291.
3. 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. Vol. 478. P. 115–124.
4. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakaqima T., Haramoto N., Nozue M., Koqima M. Development of simple end efficient in Planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biosci Bioeng*. 2006. Vol. 102, № 3. P. 162–170.
5. Chumakov M.I., Moiseeva E.M. Technology of agrobacterial transformation of plants in planta. *Biotechnology*. 2012. № 1. P. 8–20.
6. Dillen W., De Clereq J., Kapila J., Zamnbre M., Van Montagu M., Angenon G. The effect of temperature on Agrobacterium tumefaciens method of gene transfer to plants. *Plant J*. 1997. Vol. 12. P. 1459–1463.
7. Gorbatyuk I.R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated biotechnology of the transformation of *Triticum aestivum* in culture *in vitro* and *in planta* method: diss. ... Candidate biol. sciences. K., 2016. 192 p.
8. Mykhalska S.I., Matveeva AY., Sergeeva L.E., Kochetov A.V., Tishchenko O.M. Investigation of the free proline contents in corn plants transformated *in planta* using *LBA*4404, harboring pBi2E with double-stranded RNA-suppressor proline dehydrogenase. *Izvestiya of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2013. Vol. 15, № 3 (5). P. 1662–1666.
9. Tishchenko O.M., Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in* vitro and *in* planta using LBA4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, № 4. P. 19-30.
10. Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Tishchenko O.M. Development of methods of wheat *Agrobacterium*-mediated transformation. *Factors of Experimental Evolution of Organisms*. K., 2015. Vol. 17. P. 213–216.
11. Dospekhov B.A. Field statistic methods. Moscow: Agrochemistry, 1985. 351 p.
12. Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Tishchenko O.M. Method of *Agrobacterium*-mediated transformation in planta for the production of transgenic sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). Patent of Ukraine for Utility Model No. 86108 dated 10.12.2013.
13. Matveeva O.Yu., Tishchenko O.M., Morgun B.V. Method of obtaining transgenic corn plants using *Agrobacterium*-mediated transformation in planta. Patent for Utility Model No. 77331 dated 11.02. 2013.
14. Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S., Maba B., Vezon D., Voisin R., Pelletier G. The Maternal Chromosome Set Is the Target of the T-DNA in the In Planta Transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2000. Vol. 155. P. 1875–1887. Vol. 12. P. 509–517.
15. Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G., Tishchenko O.M. Method of selection of transgenic plants with increased level of resistance to water stress. Patent of Ukraine for Utility Model No. 97229 dated March 10, 2015.

MYKHALSKA S.I., KOMISARENKO A.G., KURCHII V.M., TISHCHENKO O.M.
Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: mykhalskasvitlana@gmail.com

AGROBACTERIUM-MEDIATED *IN PLANTA* GENETIC TRANSFORMATION OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Aim. To optimize the agrobacterium-mediated method of winter wheat transformation (*Triticum aestivum* L.); to select the conditions and period of inoculation to effectively transfer the genes during pollination. ***Methods.*** Agrobacterium-mediated *in planta* genetic transformation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) during pollination. ***Results.*** The conditions for agrobacterium-mediated transformation method of winter wheat during natural (frequency pollination was 1 %) and non-natural (frequency pollination was 4 %) pollination were defined. ***Conclusions.*** The possibility of integrating transgenes into the genome of winter wheat plants by the method of Agrobacterium-mediated transformation *in planta* in the process of forced and natural pollination is demonstrated. It is found that the transformation efficiency to a large extent depends on the plant genotype and the method of carrying out the transformation procedure. The selection of transgenic plants under water deficit conditions allowed to identify the plants with functional transgene. The signs of functioning transgene have been remaining in the next generation of genetically modified winter wheat.
Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*, transgenic plants, seeds.