

УДК: 577.21: 57.085.1:577.233.3:633

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ МЕТАБОЛИЗМА ПРОЛИНА

С.С. ВОРОНОВА, А.Н. ГОНЧАРУК, А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНАЯ

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17  
e-mail: s.voronova.s@gmail.com

**Цель.** Проведение *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* мягкой пшеницы сорта Зимоярка с использованием штамма AGLO с векторными конструкциями, содержащими гены метаболизма пролина: *rVi2E* с целевым геном – двухцепочечным РНК-супрессором пролиндегидрогеназы, полученном на основе гена арабидопсиса *ProDH1* (*ds-RNA suppressor ProDH1*) и *rVi-OAT* с целевым геном орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*. **Методы.** *Agrobacterium*-опосредованная трансформация пшеницы *in planta* при цветении растений. Наличие трансгенов в геноме растений определяли методом ПЦР, анализируя ДНК из листьев полученных растений поколения T<sub>1</sub>. **Результаты.** Частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции составляет 1,53 %, при использовании векторной конструкции *rVi2E* и 5,43 % при использовании векторной конструкции *rVi-OAT*. **Выводы.** Экспериментально доказана возможность генетической трансформации мягкой пшеницы с использованием штамма AGLO, содержащего плазмиду *rVi2E* с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы или *rVi-OAT* с геном орнитинаминотрансферазы методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*.

**Ключевые слова:** *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, *Triticum aestivum*, гены метаболизма пролина.

**Введение.** В последние два десятилетия наблюдается широкое использование различных подходов для генетической трансформации пшеницы. Наиболее распространенными методами являются бомбардировка микрочастицами и совместное культивирование с *Agrobacterium tumefaciens* [1, 2]. Метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации имеет ряд преимуществ по сравнению с биобаллистической трансформацией: в геном реципиента включается ограниченное число копий генов, возможность передачи относительно больших генетических конструкций с минимальными перестройками в кодирующих последовательностях переносимых генов, простота методик и более низкая стоимость.

Основные способы получения генетически модифицированных растений с использованием метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации основаны на переносе Т-ДНК в культивируемые *in vitro* растительные клетки с последующей регенерацией трансформированных побегов. Однако такой подход имеет ряд ограничений и недостатков: во-первых, требует стерильных условий; во-вторых, достаточно сложная и длительная методика; в-третьих, во время культивирования *in vitro* в растительных клетках довольно часто происходят соматические мутации или соматональные изменения; и, наконец, у некоторых генотипов может вообще не происходить регенерация побегов. Одним из нетрадиционных подходов для осуществления переноса агробактериальной Т-ДНК в однодольные растения являются метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*, который позволяет избежать культивирования *in vitro* и соматональной изменчивости [3, 4]. Этот метод генетической трансформации в настоящее время успешно используется у различных сельскохозяйственных культур, в том числе и пшеницы [5, 6].

© С.С. ВОРОНОВА, А.Н. ГОНЧАРУК, А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНАЯ, 2015

Известно, что устойчивость к засухе и засолению – комплексные признаки, и полный набор генов, определяющих такой фенотип, неизвестен. Есть ряд исследований, связывающих эти признаки с содержанием пролина в тканях растения, который активно синтезируется в ответ на различные стрессовые воздействия, выступая в качестве осмопротектора [7].

Для генетического улучшения культурных растений рассматриваются возможности использования генов, которые контролируют уровень совместных осмолитов, в частности метаболизм пролина [8, 9]. В ряде случаев доказана корреляция между содержанием свободного пролина и повышением уровня устойчивости. Так, у трансгенных растений арабидопсиса, пшеницы и риса показано повышение устойчивости к засолению, засухе и низким температурам [10–13]. Выявлено, что экспрессия гена орнитинаминотрансферазы повышает уровень устойчивости трансгенных растений риса и табака к засухе и засолению [9, 14, 15].

Для повышения уровня накопления пролина применяются две основные стратегии: 1 – дополнительное введение копий кДНК, ответственных за его синтез (*P5CS* или  $\gamma$ -OAT в смысловой ориентации трансгена); 2 – частичная супрессия эндогенных генов катаболизма пролина, например *ProDH*, контролирующих первый этап его гидролиза, используя фрагменты генов пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации или в форме обращенного повтора.

Целью нашей работы было проведение *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* мягкой пшеницы с использованием штамма AGLO и двух векторных конструкций, одна содержащая ген синтеза, а другая – катаболизма пролина. Обе конструкции любезно предоставлены к.б.н. Кочетовым А.В. (Институт цитологи и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск).

### Материалы и методы

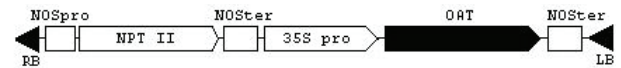
Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы современного высокоурожайного сорта Зимоярка (оригинатор Институт физиологии растений и генетики НАН Украины). Трансформацию *in planta* проводили с использованием двух векторных конструкций. Первая конструкция со-

держит бинарный вектор pBi2E с целевым геном – двухцепочечным РНК-супрессором пролиндегидрогеназы, полученный на основе гена *Arabidopsis* (ds-RNA suppressor *ProDH1*), а также селективный ген неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli* (рис. 1).



**Рис. 1.** Схема Т-ДНК генетической конструкции pBi2E: pNOS – промотор гена нопалинсинтазы; p35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV); PDH-ex1 – первый экзон гена PDH (в конструкции присутствуют два фрагмента, расположенные в виде инвертированного повтора); int – интрон; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II *E. coli*; NOS – терминатор гена нопалинсинтазы, сигнал полиаденирования; RB, LB – повторы, ограничивающие Т-область

Вторая конструкция содержит бинарный вектор pBi-OAT с целевым геном – орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*, а также селективный ген неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli* (рис. 2).



**Рис. 2.** Схема Т-ДНК генетической конструкции pBi-OAT: pNOS – промотор гена нопалинсинтазы; p35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV); OAT – ген орнитинаминотрансферазы люцерны; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II *E. coli*; NOS – терминатор гена нопалинсинтазы, сигнал полиаденирования; RB, LB – повторы, ограничивающие Т-область

Ночную культуру *A. tumefaciens* получали при культивировании на среде LB с добавлением рифампицина 50 мг/л и канамицина 100 мг/л при 150 об/мин, 26 °С, в темноте на шейкере. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3500 об/мин. в течение 15 мин, ресуспендировали в индукционной среде с добавлением 100 мкМ ацетосирингона. Инокуляционную среду готовили на основе среды MC с половинным содержанием макросолей, которую доводили до оптической плотности  $OD_{660} = 0,5$  и добавлением 100 мкМ ацетосирингона. К началу цветения осуществляли кастрацию колоса согласно стандартной методики. На каждый колосок одевался индивидуальный изолятор из пергаментной бумаги и проводили этикетирование. Инокуляцию суспензией клеток агробактерий проводили через 3–5 суток после кастрации.

Полученную суспензию клеток наносили на рыльца пестиков с помощью автоматического пипет-дозатора. После нанесения суспензии агробактериальных клеток колоски снова изолировали. После полного высыхания раствора проводили опыления пыльцой, которая была получена из интактного колоса того же растения.

Экстракцию ДНК из листьев проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНИИ Роспотребнадзора, Россия). Концентрацию и чистоту ДНК определяли спектрофотометрически. Наличие целевого гена в геноме испытываемых растений определяли методом ПЦР, анализируя ДНК из листьев полученных растений поколения T<sub>1</sub>. ПЦР проводилась на амплификаторе Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Сначала осуществляли мультиплекс-ПЦР с праймерами к пшеничному гену-референту *TaTM20* и трансгену *nptII* (5'-ССТГААТГААСТССАГГАГГАГГА-3' и 5'-GCTC TAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3') согласно следующей программе: начальная денатурация при 94 °C 4 мин; 8 циклов (денатурация 94 °C – 30 с, отжиг 68 °C – 45 с, элонгация 72 °C – 30 с) и 25 циклов (денатурация 94 °C – 30 с, отжиг 60 °C – 30 с, элонгация 72 °C – 30 с), финальная элонгация 72 °C 5 мин. Размер ожидаемых фрагментов для гена *nptII* – 700 п.н., а для гена *TaTM20* – 934 п.н. Для образцов, у которых выявлен положительный сигнал, проводили ПЦР с праймерами, специфичными к фрагменту первого экзона гена *pdh* арабидопсиса (5'-ААСАААСТГГАТССГГАТСТТАС-3' и 5'-GAGA TGTTGGTCTAGATTTGGCAGC-3') по следующей программе: начальная денатурация при 94 °C 4 мин; 34 цикла (денатурация 94 °C – 30 с, отжиг 58 °C – 30 с, элонгация 72 °C – 30 с и финальная элонгация 72 °C 10 мин, или гена OAT (5'- CAGTGCCCAАТТАССАТ СС-3' и 5'-CGAАСТТСТССААТСААГССА-3') по программе: начальная денатурация при 94 °C 4 мин; 30 циклов (денатурация 94 °C – 1 мин, отжиг 57 °C – 1 мин, элонгация 62 °C – 1 мин) и финальная элонгация 62 °C 8 мин. Размер ожидаемого ампликона составляет 545 п.н. для экзона гена *pdh* и 708 п.н. для гена OAT. Наличие агробактериальной примеси контролировали по гену *virC*. Продукты амплификации разделяли в 1,2 % агарозном геле, окрашенном раствором бромистого этидия, визуализировали в ультрафиолетовом свете и фотографировали.

## Результаты и обсуждение

Эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* зависит от многих факторов, в частности температуры, при которой проводится трансформация, состава среды для инокуляции, особенностей развития и строения цветка, оптической плотности суспензии бактериальных клеток, продолжительности контакта (кокультивирования) растительных тканей с агробактерией, штамма *Agrobacterium*, типа векторной конструкции, генотипа растения и др. [2].

Нами проводилась *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta* в условиях вегетационного опыта во второй половине дня при различных температурных режимах: от 20 до 28 °C. По нашим наблюдениям между температурными вариантами не отмечалось достоверной разницы по показателю завязывания семян. Однако по отбору на селективной среде с канамицином, семена, полученные в варианте с 20–22 °C проросли быстрее и, в целом, удалось получить большее количество канамицин-устойчивых проростков.

Всего при трансформации *in planta* векторной конструкцией rVi2E нами было получено 424 семени T<sub>0</sub>, а при трансформации векторной конструкцией с rVi-OAT – 411 семян, которые по морфологическим показателям не отличались от контроля. Все полученные семена проращивали на селективной среде и отбирали канамицин-устойчивые формы.

С целью подтверждения переноса трансгенов на листья канамицин-устойчивых растений нанесли раствор канамицина 100 мг/л и накрывали место нанесения пергаментной бумагой. У контрольных (неустойчивых) растений в месте контак-

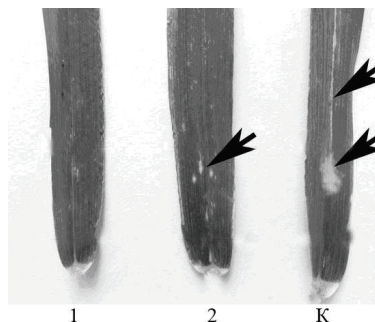


Рис. 3. Фенотипическое проявление устойчивости к канамицину на листьях пшеницы *in vivo* после нанесения раствора антибиотика: 1, 2 – канамицин-устойчивые растения пшеницы; К – контроль (неустойчивое растение). Стрелками указаны места некрозов

Таблица. Эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* мягкой пшеницы

Штамм	Векторная конструкция	Получено семян T <sub>0</sub> , шт.	Устойчивых к канамицину		Получено семян T <sub>1</sub> , шт.	Получено трансгенных форм, шт.	Частота трансформации, %
			шт.	%			
AGLO	pBi2E	424	16	3,77	261	4	1,54
	pBi-OAT	411	11	2,68	129	7	5,43

та с антибиотиком наблюдали некротические пятна на листовой пластинке и обесцвечивание центральной жилки (рис. 3).

У устойчивых растений наблюдали отсутствие характерных пятен некроза или их незначительные проявления.

При использовании pBi2E получили 16 канамицин-устойчивых растений, а при трансформации pBi-OAT – 11 растений, устойчивых к антибиотику (табл.). Устойчивые формы выращивали до полной зрелости зерна и получения семян T<sub>1</sub>. Все полученные семена T<sub>1</sub> анализировали с помощью ПЦР.

Поскольку значительное влияние на результат ПЦР имеет качество препарата ДНК, ряд авторов для контроля рекомендуют дополнительно проводить амплификацию с праймерами к генам домашнего хозяйства (house-keeping genes), что по-

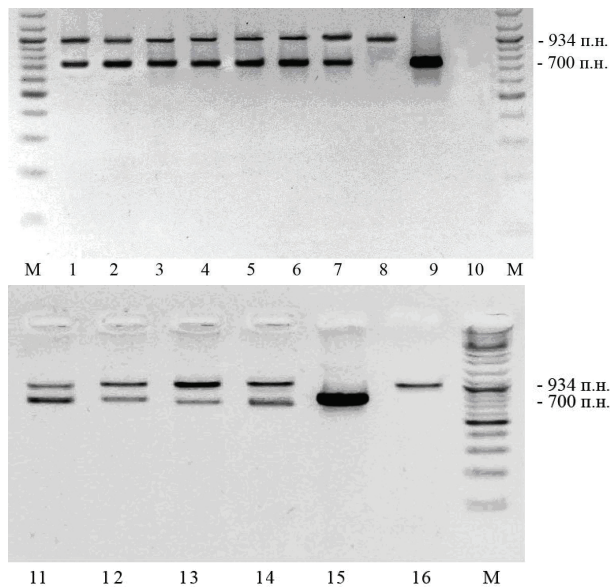


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймерами, специфичными к гену *nptII* (ампликон размером 700 п.н.) и *TaTM20* (ампликон размером 934 п.н.): 1–7, 11–14 – исследуемые образцы; 8, 16 – нетрансформированная пшеница (отрицательный контроль на ген *nptII*); 9, 15 – положительный контроль на ген *nptII* (*A. tumefaciens*); 10 – отрицательный контроль; М – маркер DNA LadderMi

зволяет исключить ложноотрицательные результаты, связанные с плохим качеством выделенного образца или недостаточной концентрацией ДНК. Исходя из этого, в работе нами применялась мультиплексная ПЦР, которая позволяет за один цикл амплификации определить в исследуемом образце конститутивный ген пшеницы *TaTM20* и трансген *nptII*, что обеспечивает устойчивость к канамицину (рис. 4).

Среди 261 проанализированных семян T<sub>1</sub>, с конструкцией pBi2E (ДНК выделяли из каждого проростка T<sub>1</sub> индивидуально) только у 37 подтверждено присутствие гена *nptII*. Дополнительно все образцы, в которых подтверждено наличие гена *nptII*, проверяли на присутствие гена *pdh* по наличию экзона 1. Результат анализа показал, что указанный ген присутствовал только у четырех растений (рис. 5). Таким образом, частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции составляет 1,53 %.

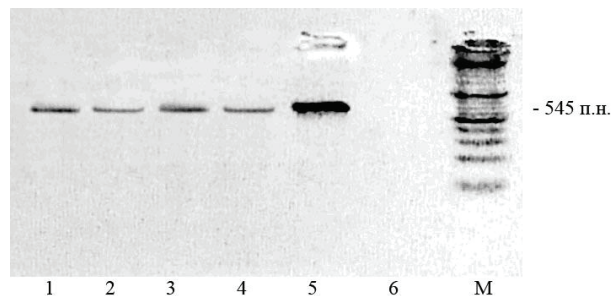
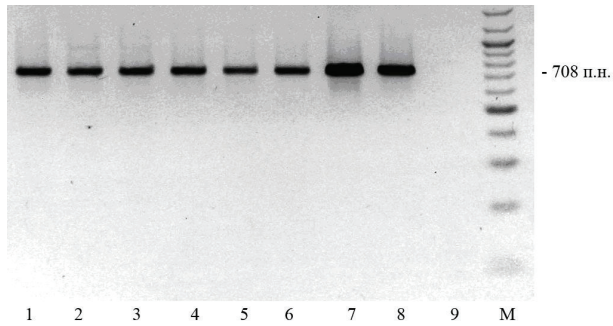


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК на присутствие гена *pdh* (ампликон размером 545 п.н.): 1–4 – изучаемые образцы, 5 – К+ (*A. tumefaciens*), 6 – К– нетрансформированная пшеница (отрицательный контроль), М – маркер DNA LadderMix

Среди 129 семян T<sub>1</sub>, полученных с использованием конструкции pBi-OAT (ДНК выделяли из каждого проростка T<sub>1</sub> индивидуально), у 46 подтверждено присутствие гена *nptII*. Все образцы, у которых подтверждено наличие гена *nptII*, проверяли на присутствие гена OAT. Результат анализа по-

казал, что указанный ген присутствовал только у семи растений (рис. 6).



**Рис. 6.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК на присутствие гена OAT (ампликон размером 708 п.н.): 1–7 – изучаемые образцы, 8 – K+ (*A. tumefaciens*), 9 – K– нетрансформированная пшеница (отрицательный контроль), M – маркер DNA LadderMix

Таким образом, частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции рВи-OAT составляет 5,43 %. Анализ образцов на присутствие генов вирулентности позволил исключить бактериальную контаминацию растительного материала, поскольку присутствие последовательности гена *VirC* в исследуемых образцах не установлена.

### Выводы

Экспериментально доказана возможность генетической трансформации мягкой пшеницы с использованием штамма AGLO, содержащего плазмиду рВи2Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы или рВи-OAT с геном орнитинаминотрансферазы методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*. Наличие трансгенов подтверждено методом ПЦР анализа. Частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции составляет 1,53 %, при использовании векторной конструкции рВи2Е и 5,43 % при использовании векторной конструкции рВи-OAT. Анализ образцов на присутствие гена вирулентности (*VirC*) позволил исключить бактериальную контаминацию растительного материала.

### Список литературы

1. El-Mangoury K., Abdrabou R., 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. – Vol. 9, № 1. – P. 175–188.

2. Xia A., Li Z., He C., Chen H., Richard B. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Acta Physiol. Sin. – 1999. – Vol. 25. – P. 22–28.

3. Чумаков М. И., Моисеева Е. М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // Биотехнология. – 2012, № 1. – С. 8–20.

4. 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. – Vol. 4, № 2. – P. 116–125.

5. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto T., Nozue T., 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. – Vol. 102, № 3. – P. 162–170.

6. Zhao T., Zhao S., Chen H., Zhao Q., Hu Z., Hou Z., Xia Z. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 1199–1204.

7. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 89–97.

8. Kishor P., Sangam P., Amrutha R. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Curr. Sci. – 2005. – Vol. 88, № 3. – P. 424–438.

9. Roosens N., Bitar F., Loenders F. Overexpression of ornithine-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants // Mol. Breed. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 73–80.

10. Nanjo F., M. Kobayashi M., Yoshiba Y. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. – 1999. Vol. 461. – P. 205–210.

11. Kumar V., Shriram V., Kishor K. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing *P5CSF129A* gene // Plant Biotechnol. Rep. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 37–48.

12. Hur J., Jung K., Lee C. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice // Plant Sci. – 2004. – Vol. 167. – P. 417–426.

13. Karthikeyan A., Pandian S., Ramesh M. Transgenic indica rice cv. ADT 43 expressing a D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene from *Vigna aconitifolia* demonstrates salt tolerance // Plant Cell, Tissue, Organ Culture. – 2011. – Vol. 107, № 3. – P. 383–395.

14. Wu L., Fan Z., Guo L. Over-expression of an *Arabidopsis* OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice // Chinese Sci. Bull. – 2003. – Vol. 48, № 23. – P. 2594–2600.

15. Vendruscolo E., Schuster I., Pileggi M. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat // Plant Physiol. – 2007. – Vol. 164, № 10. – P. 1367–1376.

Представлена Б.В. Моргуном  
Поступила 20.01.2015

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ  
З ВИКОРИСТАННЯМ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ,  
ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ МЕТАБОЛІЗМУ ПРОЛІНУ

С.С. Воронова, А.Г. Гончарук, А.В. Бавол, О.В. Дубровна

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України  
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: s.voronova.s@gmail.com

**Мета.** Проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* м'якої пшениці сорту Зимоярка з використанням штаму AGLO з векторними конструкціями, що містять гени метаболізму проліну: pBi2E з цільовим геном – дволанцюговим РНК-супрессором проліндегідрогенази, отриманого на основі гена арабідопсису ProDH1 (ds-RNA suppressor ProDH1) і pBi-OAT з цільовим геном орнітинамінотрансферази *Medicago truncatula*. **Методи.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці *in planta* в умовах вегетаційного експерименту. Наявність трансгенів у геномі рослин визначали методом ПЛР, аналізуючи ДНК з листя отриманих рослин покоління T1. **Результати.** Частота трансформації з повним вбудовуванням генетичної конструкції становить 1,53 %, при використанні векторної конструкції pBi2E і 5,43 % при використанні векторної конструкції pBi-OAT. **Висновки.** Експериментально доведено можливість генетичної трансформації м'якої пшениці з використанням штаму AGLO, що містить плазмиду pBi2E з дволанцюговим РНК-супрессором гена проліндегідрогенази або pBi-OAT з геном орнітинамінотрансферази методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

**Ключові слова:** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, *Triticum aestivum*, гени метаболізму проліну.

GENETIC TRANSFORMATION OF BREAD WHEAT USING  
VECTOR CONSTRUCTS CONTAINING THE GENES  
OF PROLINE METABOLISM

S.S. Voronova, A.M. Goncharuk, A.V. Baval, O.V. Dubrovnaya

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

**Aim.** To perform *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* of plants of the bread wheat variety Zymoyarka using the strain AGLO with vector constructs containing the genes of proline metabolism: pBi2E containing the double stranded RNA suppressor of proline dehydrogenase developed on the basis of Arabidopsis ProDH1 gene (ds-RNA suppressor of ProDH1) and pBi-OAT containing the gene of ornithine aminotransferase of *Medicago truncatula*. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated genes transfer *in planta* was carried out during wheat pollination. The presence of transgenes within the genome of transformed plants was determined by PCR analysis of DNA isolated from the leaves of plants of T1 generation. **Results.** The frequency of transformation with the full insertion of the genetic construct was 1.53 % using the vector construct pBi2E and 5.43 % using a vector construct pBi-OAT. **Conclusions.** It is experimentally proved the possibility of genetic transformation of wheat with the strain AGLO, containing the plasmid pBi2E with double-stranded RNA suppressor of proline dehydrogenase gene and the plasmid pBi-OAT containing the gene of ornithine aminotransferase by *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

**Keywords:** *Agrobacterium*-mediated transformation, *Triticum aestivum*, genes of proline metabolism.