

УДК 577.21:57.045

## ОТРИМАННЯ ЛІНІЙ ПЩЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) З ДРІЖДЖОВИМИ ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

А.Ю. КВАСКО<sup>1\*</sup>, С.В. ІСАЄНКОВ<sup>1</sup>, К.В. ДМИТРУК<sup>2</sup>, А.А. СИБІРНИЙ<sup>2</sup>, Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>, А.І. ЄМЕЦЬ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а

<sup>2</sup> Інститут біології клітини НАН України, Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16

\* E-mail: kvasko.anna@ukr.net; yemets.alla@nas.gov.ua

За допомогою двох методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (*in vitro* та *in planta*) перенесено дріжджові (*Saccharomyces cerevisiae*) гени біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2* до ряду сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) задля підвищення їх посухостійкості. Для цього було створено векторні конструкції *pBract214-TPS1* та *pBract214-TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотора убіхітину кукурудзи (*PUBi*), та селективним маркерним геном гігроміцин-фосфотрансферази (*hpt*). Як експланти для трансформації *in vitro* використовували 3–5 добові калюси, отримані з незрілих зародків пшениці. Селекцію трансгенних рослин-регенерантів здійснювали на поживному середовищі, що містило 30 мг/л гігроміцину як селективного агента. У результаті трансформації за допомогою методу *in planta* було отримано насіння (трансгенне покоління  $T_1$ ) пшениці, яке пророщували і відбирали на стійкість до гігроміцину. Перенесення та інтеграцію цільових генів в геном пшениці підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2*.

**Ключові слова:** трегалоза, дріжджові гени, *TPS1*, *TPS2*, генетична трансформація, *Agrobacterium tumefaciens*, *in vitro*, *in planta*, *Triticum aestivum*.

**Вступ.** Відомо, що трегалоза — невідновлювальний дисахарид глюкози, — відіграє важливу роль у захисті рослин від стресів. Трегалоза наявна у різних організмів, включаючи водорості, бактерії, комахи, дріжджі, міцеліальні гриби, вищі тварини та більшість рослин. Завдяки акумуляції за умов різних стресів (перехолодження, високі температури, засолення,

посуха) трегалозу оцінюють як стресопротектор [1]. Наприклад, трегалоза накопичується у ангідробіотиків (до більш ніж 10 % сухої маси), дозволяючи їм пережити повне зневоднення [2, 3] та деяких покритонасінних, стійких до висушування [4]. Навіть за умов наявності у низьких концентраціях трегалоза стабілізує білки та мембранні структури за стресових умов, і це ймовірно пов'язано з температурою кристалізації, її високою пластичністю та хімічною стабільністю [5].

Більшість організмів нагромаджують трегалозу за умов стресу, синтезуючи цей цукор за допомогою двох послідовних реакцій, в яких задіяні трегалозо-6-фосфатсинтаза та трегалозо-6-фосфатфосфатаза. Метаболізм трегалози детально вивчено у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, у яких внутрішньоклітинний рівень трегалози підтримується завдяки збалансованій дії ферментів її синтезу та гідролізу [6]. Синтез трегалози здійснюється великим ферментним комплексом, що складається з трегалозо-6-фосфатсинтази, яка кодується геном *TPS1*, та трегалозо-6-фосфатфосфатази, яка кодується геном *TPS2*. Трегалозо-6-фосфатсинтаза каталізує взаємодію глюкозо-6-фосфату з УДФ-глюкозою з утворенням трегалозо-6-фосфату. У свою чергу, трегалозо-6-фосфат перетворюється до трегалози за участю фермента трегалозо-6-фосфатфосфатази. Посилення експресії принаймі одного з цих генів — *TPS1* — сприяє збільшенню внутрішньоклітинної концентрації трегалози та підвищенню термотолерантності дріжджів *S. cerevisiae* [7].

© А.Ю. КВАСКО, С.В. ІСАЄНКОВ, К.В. ДМИТРУК,  
А.А. СИБІРНИЙ, Я.Б. БЛЮМ, А.І. ЄМЕЦЬ, 2020

Існує незначна кількість робіт, в яких показано, що трансгенні рослини з надекспресованою трегалозо-6-фосфатсинтазою демонструють підвищену посухостійкість. Наприклад, підвищення посухостійкості деяких видів рослин (тютюн, рис) досягалось шляхом перенесення її генів [8–10]. У цих та деяких інших публікаціях описано конструювання трансгенних рослин, які виявляють конститутивну надекспресію генів, що кодують трегалозо-6-фосфатсинтазу та/або трегалозо-6-фосфатфосфатазу, і, як результат, підвищення акумуляції трегалози та посухостійкість. Однак основною проблемою таких трансформацій був плейотропний ефект, що призводив до аномального розвитку рослин [1].

Для вирішення цієї проблеми Wu та Garg (2003) досліджували стресо-індукований промотор для контролю надекспресії генів біосинтезу трегалози (*otsA* та *otsB*) *E. coli* як гібридного гена трегалозо-6-фосфатфосфатази для забезпечення толерантності рису до абіотичних стресів. Трансформація гібридним геном трегалозо-6-фосфатфосфатази призводила до незмінного росту рослин за нестресових умов, а експресія гібридного гена відбувалась лише за умов індукції стресом. Індукований стресом промотор використовували також для створення конструкцій з генами *TPS1-TPS2* задля трансформації модельного рослинного об'єкту *Arabidopsis thaliana* [12]. Лінії з надекспресованим *TPS1-TPS2* конструктором демонстрували нормальний ріст, а також підвищену толерантність до засолення, посухи, переохолодження та високої температури.

З результатів, описаних у всіх цих роботах, випливає, що суттєве покращення посухостійкості рослин може бути досягнуто шляхом генетичної інженерії генів, задіяних у метаболізмі трегалози. Крім того, відсутні дані про надекспресію генів *TPS1* та *TPS2*, що кодують ферменти біосинтезу трегалози у більшості видів злаків, до яких належить одна з найважливіших сільськогосподарських культур — пшениця (*Triticum aestivum* L.). Зовсім не дослідженим є також використання різних типів промоторів для контролю цих генів, зокрема, сильних конститутивних промоторів для експресії цільових генів в однодольних рослинах. Таким чином, отримання трансгенних посухостійких

рослинних ліній пшениці, що будуть характеризуватись нормальним ростом та розвитком, є надзвичайно актуальним, оскільки пшениця як одна з найбільш культивованих зернових культур порівняно з іншими (ячмінь, кукурудза, рис) [13] займає одне з чільних місць у задоволенні харчових потреб людства. Саме тому детальне вивчення клітинно- і молекулярно-біологічних механізмів негативного впливу на пшеницю різних абіотичних чинників сприяє ефективному розвитку біотехнологічних шляхів покращення якості та продуктивності цієї культури [13, 14].

Виходячи з цього, метою даної роботи було створення генетичних векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2* та отримання за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (в умовах *in vitro* та *in planta*) ліній рослин пшениці м'якої з надекспресією генів *TPS1* та *TPS2*, що підвищило би їх стійкість до посухи.

**Матеріали та методи.** Векторні конструкції та бактеріальні штами. Застосовуючи методику Gateway-клонування [15, 16] було створено векторні конструкції pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1*, який кодує перший фермент біосинтезу трегалози — трегалозо-6-фосфат синтетазу, та *TPS2*, що кодує другий фермент біосинтезу — трегалозо-6-фосфат фосфатазу. Для цього на основі нуклеотидних послідовностей кодуючих ділянок генів *TPS1* та *TPS2* *S. cerevisiae* були сконструйовані пари специфічних праймерів, що містили у собі специфічні сайти розпізнавання BP-клоназою для Gateway-клонування. Кодуючі послідовності генів *TPS1* та *TPS2* було ампліфіковано для подальшого перенесення у бінарний вектор pBract214 [17]. Реакцію BP-рекомбінації проводили з BP-клоназою (BP Clonase™ II, Thermo Fisher Scientific). Для зупинки реакції до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнкінази K та інкубували при 37 °C протягом 10 хв. Для клонування послідовностей у вектор призначення pBract214 проводили реакцію LR-рекомбінації, використовуючи суміш ферментів LR Clonase™ II (Thermo Fisher Scientific). Для зупинки реакції та подальшої трансформації компетентних клітин кишкової палички (*E. coli*, штам DH5α) до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїна-

зи К та інкубували при 37 °С протягом 10 хв. Створені конструкції переносили у клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 для подальшого використання у дослідах з генетичної трансформації пшениці.

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці м'якої з використанням незрілих зародків як експлантів. Для генетичної трансформації пшениці було використано наступні сорти пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська, Мірхад. Пшеницю вирощували на ділянках у відкритому ґрунті. Як експланти для трансформації використовували незрілі зародки пшениці [17]. Для цього насіння збирали на 16 добу після запилення та поверхнево стерилізували за такою схемою: 70%-ний етанол – 30 с, гіпохлорит натрію (NaOCl) – 12 хв, триразове промивання стерильною дистильованою водою. Ізольовані незрілі зародки розміром 1–1,5 мм відокремлювали від стерильного насіння в умовах ламінарного боксу та розташовували щитками догори в чашки Петрі (по 20–30 експлантів) на модифіковане поживне МС1 для індукції калюсогенезу, до складу якого входили макро- та мікросолі МС [18], вітаміни [19], 2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л мальтози. Культивування проводили при температурі 24–26 °С в темряві впродовж 3–5 дб [20, 21].

Нічні культури агробактерії штаму GV3101, що окремо містили конструкції pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2 з цільовими генами біосинтезу трегалози, нарощували в рідкому середо-

вищі LB з додаванням антибіотиків рифампіцину (50 мг/л) та канаміцину (100 мг/л) при 28 °С на шейкері (150 об/хв) протягом 16–18 год. Коли значення оптичної щільності агробактерії досягало рівня  $OD_{660} = 0,3–0,4$ , клітини бактерій осаджували центрифугуванням (4500–5000 об/хв, 10 хв), а осад ресуспендували в рідкому середовищі МС з половинним набором макросолей, доповненому 0,5 г/л глутаміну, 30 г/л мальтози, 2 г/л MES (морфолін-2-етансульфонові кислоти), 800 мг/л L-цистеїну, 200 мМ ацетосирингону.

Отриманою суспензією агробактерій обробляли 3–5 добу калюси з незрілих зародків пшениці протягом 30–45 хв, після чого експланти підсушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МС1 (табл. 1) для кокультивування з агробактерією на 2 доби в темряві [17]. Після стадії кокультивування експланти розміщували на середовище МСР, до складу якого входили макро- та мікросолі МС [18], вітаміни [19], 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 10 г/л сахароза, 10 г/л глюкоза, а також антибіотики цефотаксим (500 мг/л) та гігromіцин (30 мг/л) для елімінації агробактерії та селекції рослин, відповідно, після трансформації та вирощували при 24–26 °С та 16-денному фотоперіоді.

Для визначення селективної концентрації гігromіцину експланти контрольних рослин кожного сорту пшениці культивували на середовищі МСР, доповненому гігromіцином у концентраціях від 0 до 40 мг/л. Селекцію регенованих рослин проводили на середовищі з

Таблиця 1. Частота регенерація пагонів сортів пшениці в умовах селективного тиску після трансформації конструкціями pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2

Сорт пшениці	Кількість експлантів	Частота регенерації пагонів (%), конструкція pBract214-TPS1	Частота регенерації пагонів (%), конструкція pBract214-TPS2
Вихованка	150	48,9 ± 0,96	46,7 ± 1,35
Зимоярка	150	40,0 ± 2,31	45,0 ± 1,23
Миронівська 47	150	37,6 ± 1,15	48,0 ± 2,69
Щедрість	150	24,0 ± 1,75	39,5 ± 2,87
Журавка Одеська	150	25,0 ± 1,53	35,6 ± 1,98
Кесарія Поліська	150	38,0 ± 1,21	33,0 ± 0,58
Мірхад	150	35,0 ± 0,76	40,0 ± 1,25

Примітка. \* P ≤ 0,05.

гігromіциному у концентрації 30 мг/л впродовж 40 діб, після чого рослини пересаджували на середовище МСК для укорінення. До складу середовища МСК входили 1/2 макро- та мікросолі МС [18], вітаміни [19], 10 г/л глюкози, 300 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л гігromіцину. Частоту регенерації пагонів визначали як співвідношення кількості життєздатних експлантів, на яких утворювалися пагони, до загальної кількості експлантів, що були використані в досліді. Укорінені трансгенні рослини пшениці потім переносили у ґрунт для їх подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

*Трансформація сортів пшениці за допомогою методу in planta.* В досліді з трансформації *in planta* використовували наступні сорти пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) української селекції: Вихованка, Журавка Одеська, Зимоярка, Кесарія Поліська, Щедрість. Для дослідження обирали колоски, які ще не вийшли з прапорцевого листка і не дійшли до стадії цвітіння, кастрували, після чого кожний колос огортали окремим ізолятором з пергаментного паперу [22].

Нічні культури агробактерії з конструкціями pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2 нарощували в рідкому середовищі І1 (індукційне середовище), до складу якого входили 5 г/л пептону, 2,5 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl, 0,250 г/л MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 г/л KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 50 мг/л рифампіцину, 100 мг/л канаміцину та 200 мМ ацетосирингону, при 28 °С на шейкері (150 об/хв) впродовж 16–18 год. Після цього клітини агробактерії осаджували центрифугуванням, а оптичну щільність доводили до значення OD<sub>600</sub> = 1 розчиненням осаду в рідкому середовищі І2 (інокуляційне середовище), до складу якого входили 1/2 макро- та мікросолі МС [18], 0,5 г/л MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота), 5 г/л сахарози та 200 мМ ацетосирингону.

Через 3–5 діб проводили інокуляцію кастрованих колосків пшениці суспензією культури агробактерії на приймочку маточки за допомогою піпет-дозатора. Після повного висихання нанесеної суспензії проводили заповнення кастрованих колосків квітучим колосом того ж сорту та знову огортали індивідуальним ізолятором до повного дозрівання насіння. При досягненні насінням стадії дозрівання (через

21–25 діб) його збирали, оцінювали відсоток зав'язування, середню довжину колоса, загальні морфологічні ознаки. Для оцінки показників проростання зібраного насіння та його молекулярно-генетичного аналізу з метою підтвердження перенесення гена інтересу насіння висаджували в підготовлені горщики з ґрунтом та проводили первинну селекцію відібраних зразків. Для цього листя отриманих проростків насіння пшениці після трансформації та контрольні нетрансформовані проростки на 10–11 добу пророщування відокремлювали та розміщували на чашки Петрі з середовищем МС2, до складу якого входили макро- та мікросолі МС [18], вітаміни МС, 1 мг/л БАП, 0,5 г/л MES, 20 г/л сахарози та гігromіцин (0–50 мг/л), на 5 діб при 24–26 °С та 16-часовому періоді освітлення [21].

До середовища МС2 додавали гігromіцин в концентраціях від 0 мг/л до 50 мг/л для визначення його селективної концентрації для такого методу відбору трансформованих ліній, порівнюючи дослідні рослини у кожному з варіантів середовища з контролем. Листові диски, які змінили забарвлення на жовте, вважались нестійким до селективного агенту, а листові диски рослин, що не змінили забарвлення, залишившись зеленими, використовували для подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

*Молекулярно-генетичний аналіз.* З метою підтвердження перенесення та вбудування цільових генів у геном відібраних ліній рослин пшениці після трансформації *in vitro* та *in planta* було проведено ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2*. Для цього тотальну ДНК екстрагували з листя за допомогою ЦТАБ-методу [23]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг ДНК, по 1 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші дНТФ, 2,5 мкл Taq-полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США) за наступною схемою: початкова денатурація при 95 °С, 5 хв; ампліфікація – 40 циклів (94 °С – 30 с, 55 °С – 45 с, 72 °С – 1 хв, 30 с); кінцева елонгація – 72 °С, 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі в 1 × ТВ – буфері в присутності етидид броміду. Для визначення



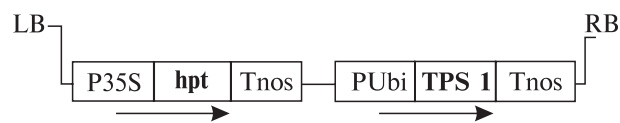
довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер молекулярної маси (Gene-Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel. Експерименти із трансформації пшениці повторювали не менше трьох разів, для оцінки достовірності результатів розраховували критерії Стьюдента при  $P \leq 0,05$ .

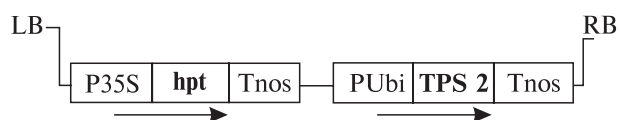
**Результати досліджень та їх обговорення.** Оскільки при створенні конструкцій для генетичної трансформації однодольних найчастіше гени інтересу розташовують під контроль конститутивного промотора гена убіхітину кукурудзи (*Ubi*), нами були створені відповідні генетичні векторні конструкції pBract214-TPS1 і pBract214-TPS2 з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*, де кожен з них знаходився під контролем промотора гена *Ubi*, та селективним маркерним геном *hpt* (ген гігроміцин-фосфотрансферази) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (*P35S*). Обидві конструкції (рис. 1 і 2) було використано у досліджах по *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації пшениці, яку здійснювали в умовах *in vitro* та *in planta* з метою порівняння, який із них є більш ефективним для перенесення генів *TPS1* та *TPS2*.

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *in vitro* як експланти використовували незрілі зародки. Для ефективного відбору трансгенних ліній пшениці було визначено селективну концентрацію гігроміцину. Для цього експланти контрольних рослин кожного з сортів пшениці вирощували на середовищі МСР, доповненому гігроміцином у концентраціях від 0 до 40 мг/л. Загалом було досліджено по 100 експлантів кожного сорту за вирощування на живильному середовищі МСР з додаванням гігроміцину у кожній з відібраних концентрацій, що дозволило визначити концентрацію гігроміцину 30 мг/л як селективну (ЛД70).

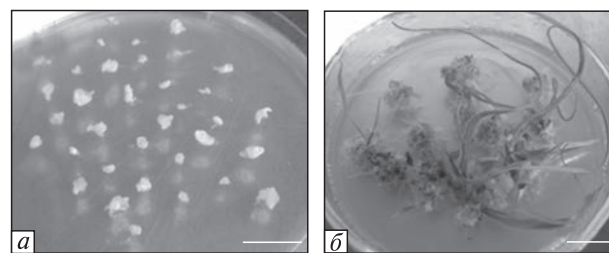
Перед проведенням трансформації в культуру *in vitro* було введено сім сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад. Для кожного з них проводили оцінку морфогенетичних показників, а саме здатності експлантів до ефективного



**Рис. 1.** Бінарний вектор pBract214-TPS1. LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК; *TPS1* – цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат синтетази; *P35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *PUbi* – промотор убіхітину кукурудзи; *Tnos* – термінатор нопалінсинтази; *hpt* – селективний ген гігроміцин-фосфотрансферази

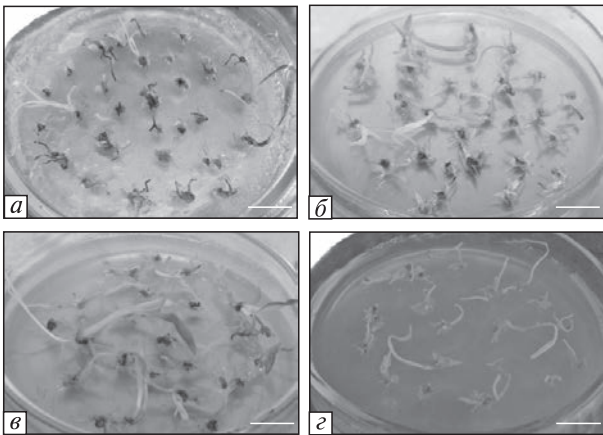


**Рис. 2.** Бінарний вектор pBract214-TPS2. LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК; *TPS2* – цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат фосфатази; *P35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *PUbi* – промотор убіхітину кукурудзи; *Tnos* – термінатор нопалінсинтази; *hpt* – селективний ген гігроміцин-фосфотрансферази

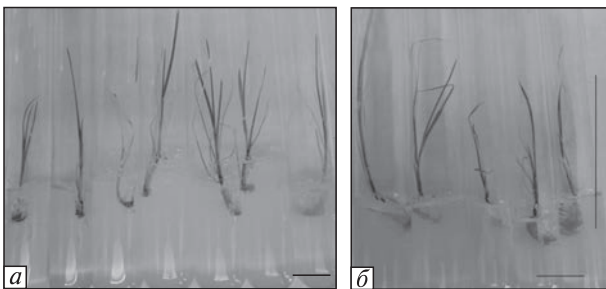


**Рис. 3.** Формування калюсу на експлантах незрілих зародків пшениці сорту Миронівська 67 через 5 діб на середовищі МС1 (а) та регенерація пагонів на середовищі МСР через 30 діб (б). Масштаб – 1 см

калюсогенезу та регенерації пагонів *in vitro* [17] (рис. 3), що є одним із найважливіших показників ефективної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин. За показниками частоти утворення морфогенного калюсу під час культивування незрілих зародків різних сортів виявилось, що цей показник був найвищим для сортів Миронівська 67 ( $68 \pm 2,34$  %) та Мірхад ( $67,8 \pm 1,56$  %), а найнижчим – для сорту Щедрість ( $42,3 \pm 1,95$  %) [17]. Частота утворення пагонів в культурі *in vitro* з незрілих зародків становила для сортів Щедрість –  $24 \pm 1,75$  %; Журавка Одеська –  $25 \pm 1,53$  %; Вихованка –



**Рис. 4.** Експланти пшениці на 14–20 добу після кокультування з агробактерією на середовищі МСР (табл. 1) із селективним агентом – гігromіцином (30 мг/л): *a* – Миронівська 67 (конструкція pBract214-TPS1); *b* – Журавка Одеська (pBract214-TPS2); *c* – Щедрість (pBract214-TPS2); *d* – Зимоярка (pBract214-TPS2). Масштаб – 1 см



**Рис. 5.** Рослини пшениці на 7 добу після перенесення на середовище МСК для укорінення: *a* – рослини сорту Мірхад, трансформовані конструкцією pBract214-TPS1; *b* – рослини сорту Миронівська 47 після трансформації конструкцією pBract214-TPS2. Масштаб – 1 см

35,9 ± 0,96 %; Кесарія Поліська – 38 ± 1,21 %; Зимоярка – 38 ± 2,31 %; Мірхад – 43,9 ± 0,76 % та Миронівська 67 – 47 ± 2,15 %.

Незважаючи на те, що досліджувані сорти мали різні морфогенетичні показники, всі вони були використані в дослідах по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Селекцію трансгенних ліній *in vitro* проводили на середовищі, яке містило 30 мг/л гігromіцину (рис. 4).

Через 40 дб культивування експлантів після трансформації на середовищі МСР у присут-

ності гігromіцину (30 мг/л) визначали частоту регенерації пагонів для кожного сорту пшениці (табл. 1). Так, найвищі показники частоти регенерації пагонів в умовах селективного тиску після трансформації конструкцією pBract214-TPS1 було зафіксовано для сортів Вихованка та Зимоярка (48,9 ± 0,96 та 40 ± 2,31 відповідно), тоді як після трансформації конструкцією pBract214-TPS2 – для сортів Миронівська 67 та Вихованка (48 ± 2,69 та 46,7 ± 1,35 відповідно) (табл. 1). Для всіх інших сортів цей показник коливався в межах від 24 ± 1,75 % (сорт Щедрість) до 38 ± 1,21 % (сорт Кесарія Поліська) за використання конструкції pBract214-TPS1 та від 33 ± 0,58 % (сорт Кесарія Поліська) до 45 ± 1,23 % (сорт Зимоярка) за використання pBract214-TPS2.

Після 40 дб вирощування експлантів на середовищі МСР відселектовані рослини, що зберегли життєздатність та мали нормальні (подібні до контролю) морфологічні ознаки, було перенесено на середовище МСК (рис. 5) для їхнього подальшого укорінення.

Слід зазначити, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація зернових культур, зокрема і пшениці, ускладнюється тим, що ододольні рослини не здатні продукувати моноциклічні фенольні сполуки [24], такі як ацетосирингон та близькі йому ацетофенони, сирінгальдегіди, бензальдегіди, що в природі індують гени вірулентності (*vir*) *A. tumefaciens* лише у дводольних рослин [24, 25].

Cheng et al. у 1997 р. вперше повідомили про вдалу трансформацію агробактерією культури калюсних тканин ізольованих та попередньо культивованих незрілих зародків пшениці [26], пізніше *Wu et al.* (2003) вдалося підвищити ефективність трансформації пшениці з 0,3 до 3,3 % [27]. Хоча увага довгий час була зосереджена на інших методах інтеграції чужорідної ДНК у геном пшениці – біобалістика, електропорація, перенос ДНК за допомогою силіконово-карбідних волокон тощо [28], *Agrobacterium*-опосередкована трансформація має багато переваг у порівнянні з ними, одна з яких – здатність інтегрувати великі за розміром фрагменти ДНК з мінімальними порушеннями в їх послідовностях та без мультикопійних вставок, що сприяє створенню ліній, вільних від селективних маркерних генів [29]. З огля-

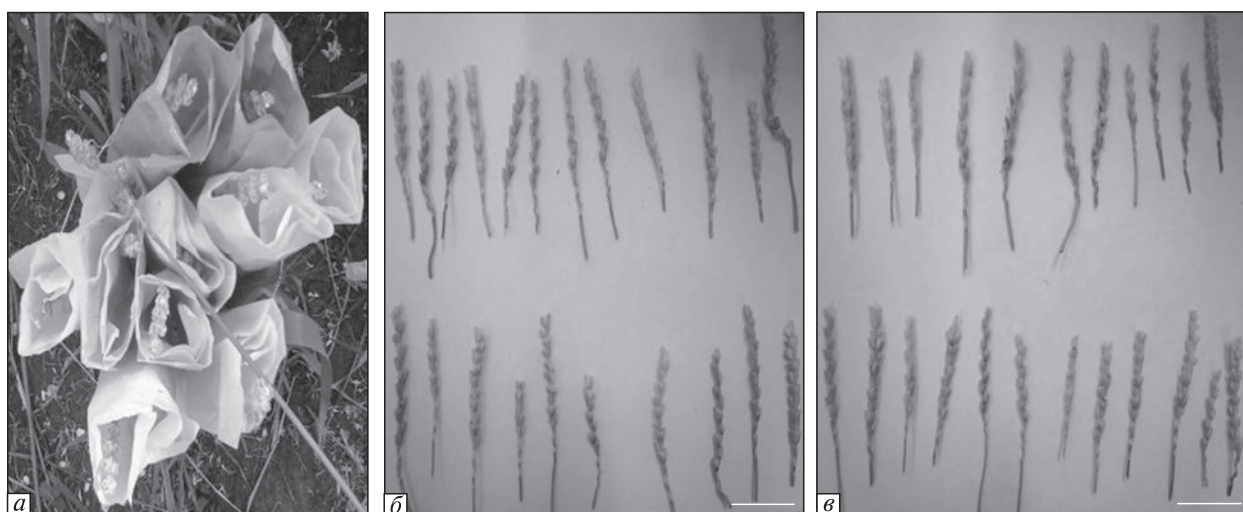


Рис. 6. Отримання трансгенного насіння пшениці після трансформації рослин методом *in planta*: а – ізолятори на колоссях, б, в – зібрані колосся пшениці сорту Шедрість після трансформації за використання конструкцій pBract214-TPS1 (б) і pBract214-TPS2 (в). Масштаб – 1 см

ду на переваги, характерні для *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації рослин, багато питань щодо підвищення частоти регенерації трансформованих рослин та ефективності трансформації таким способом пшениці залишаються нез'ясованими, проте існує декілька підходів для їх вирішення. По-перше, вибір вірулентних штамів *A. tumefaciens*, створення бінарних векторних конструкцій, підбір промоторів та селективних маркерних генів [24, 30]. На ефективність трансформації також впливають генотип рослин пшениці, вибір експлантів, для яких в культурі *in vitro* зафіксовано вищий показник частоти регенерації, склад інокуляційного, кокультиваційного, регенераційного середовищ і такі умови на етапах трансформації та подальшого вирощування, як температура, рН, концентрація ацетосирингону, оптична щільність культури агробактерії та час інокуляції [23, 31].

Оскільки для однодольних рослин на відміну від дводольних зафіксовано значно нижчий показник частоти регенерації з листових експлантів, для отримання трансгенних рослин пшениці використовують альтернативні типи експлантів, такі як культури незрілих та зрілих зародків, пиляків і трансформацію *in planta* [13]. Найчастіше для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації використовують саме калюсону

культуру ізольованих та попередньо культивованих незрілих зародків завдяки їх високому регенераційному потенціалу та швидким темпам утворення ембріогенного калюсу [14, 29]. Проте існують дані про успішну трансформацію за допомогою методів *in planta* зернових однодольних культур, зокрема і пшениці [22]. Привабливість *in planta* трансформації рослин пояснюється відсутністю необхідності не використовувати культуру тканин, не обов'язковістю дотримання стерильних умов та загалом спрощеною процедурою отримання можливих трансгенних ліній [22].

Ishida et al. вдалося досягти ефективності трансформації незрілих зародків пшениці від 40 до 90 %, хоча до цього ефективність трансформації згідно в роботах інших авторів не досягла значень вище 5 %, не зважаючи на певний прогрес у *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації інших зернових культур [21]. Хоча при використанні методу *in planta* можуть існувати певні сезонні обмеження, цей метод має багато переваг, тому актуальним є підбір умов трансформації, складу живильних середовищ, а також, адекватного способу селекції рослин після трансформації, що був би оптимальним при мінімальних зусиллях та витратах.

Саме тому нами також були проведені дослідження по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* в



геном пшениці методом трансформації *in planta*. У результаті проведення експериментів було отримано колосся і насіння (трансгенне покоління T<sub>1</sub>) пшениці досліджуваних сортів пшениці. На рис. 6 показано розміщені ізолятори на кастроване колосся (а), а також колосся з насінням пшениці, отримане після трансформації (б, в). Отже, після проведення трансформації та повного дозрівання насіння, було зібрано колоси та проведено оцінку зав'язування насіння, а також досліджено їх морфологічні показники (табл. 2 та рис. 6–8).

Найвищий відсоток зав'язування насіння було зафіксовано для сорту Вихованка (58 % ± 1,7), а найнижчий для сорту Кесарія Поліська (34 % ± 1,23). Морфологічно колоси (рис. 7) та насіння (рис. 8) були без суттєвих відхилень в розвитку, насіння відрізнялось середньою наповнюваністю.

Для підтвердження перенесення генів *TPS1* та *TPS2* в насіння пшениці за допомогою методу *in planta* проводили молекулярно-генетичний аналіз. З цією метою насіння висаджували у підготовлений ґрунт і пророщували. На 11-ту добу листові диски контрольних та експериментальних рослин після трансформації *in planta* оцінювали за показником стійкості до гігроміцину, проводячи первинну селекцію відібраних зразків на стійкість до селективного агента. Відібрані стійкі до гігроміцину зразки, отримані після трансформації *in planta*, а також лінії пшениці, отримані після агробактеріаль-

Таблиця 2. Морфологічні показники зібраних колосів сортів пшениці після трансформації *in planta* конструкціями з генами біосинтезу трегалози

Сорт пшениці	Кількість зібраних колосів	Середня довжина колоса (см)	Відсоток насіння, що зав'язалось у колосі (%)
Вихованка	29	7,10 ± 0,98	58 ± 1,70
Зимоярка	12	6,89 ± 1,21	45 ± 2,34
Журавка Одеська	15	6,10 ± 1,56	48 ± 1,67
Кесарія Поліська	12	5,67 ± 0,78	34 ± 1,23
Щедрість	35	6,50 ± 1,23	43 ± 1,89

Примітка. \* P ≤ 0,05.

ної трансформації незрілих зародків *in vitro*, аналізували за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та з метою підтвердження вбудування цільових генів біосинтезу трегалози в геном пшениці (рис. 9, 10). У результаті проведеного ПЛР-аналізу було отримано фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю (векторним конструкціям з генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно) (рис. 9, 10).

За попередніми даними частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих рослин) за допомогою методу *in vitro* з використанням конструкції pBract214-TPS1 була в середньому на рівні 4–5 % для кожного сорту, з pBract214-TPS2 – на рівні 6–7 %. Для трансформації методом *in planta* зафіксовано показники частоти трансформації на рівні 3–5 % для обох конструкцій.

Слід зазначити, що на сьогоднішній час відомо лише про успішну трансформацію такої однодольної рослини, як рис (*Oryza sativa*), генами біосинтезу трегалози з *E. coli otsA* та *otsB* [10], та створення рослин з надекспресією гена *OsTPS1* з *O. sativa* [32]. У наших попередніх дослідженнях за використання створених нами конструкцій з генами біосинтезу трегалози pGWB2-TPS1 та pGWB2-TPS2 було отримано трансгенні лінії тютюну [33], проте такі рослини відрізнялись за формою листя та затримкою коренеутворення порівняно з контролем. Трансгенні ж лінії пшениці з генами *TPS1* та *TPS2*, отримані в цьому дослідженні, суттєво не відрізнялися від контрольних рослин за морфологічними ознаками, однак, дещо відставали у своєму розвитку. Це стосується, зокрема ліній, отриманих методом трансформації *in planta*. Отримані попередні дані також вказують на їх підвищену стійкість до посухи, оскільки вони витримували відсутність поливу довше в умовах закритого ґрунту, ніж вихідні (контрольні) рослини.

Подібні результати були отримані раніше при дослідженні ліній трансгенної картоплі з надекспресією гена *TPS1*, що кодує трегалоб-6-фосфат синтазу, коли спостерігалось підвищення стійкості рослин до посухи [34]. Проте створені лінії характеризувались затримкою росту, зміною форми листя, його пожовтінням



та нездатністю до утворення коренів [35]. Також було зафіксовано підвищення їх стійкості до абіотичних стресів та фотосинтетичної активності при надекспресії генів біосинтезу трегалози *E. coli* – *otsA* (гомолог дріжджового *TPS1*) та *otsB* (гомолог дріжджового *TPS2*) у рослинах тютюну, арабідопсису та рису [36]. Результати досліджень трансгенного рису з надекспресією гена *OsTPS1* виявили підвищення стійкості таких рослин до холоду та посухи на стадії проростання без суттєвих морфологічних змін в порівнянні з диким типом. Ймовірно, що *OsTPS1* забезпечує стійкість до абіотичних стресів саме завдяки здатності впливати на концентрацію трегалози в клітині та на регуляцію експресії генів, що координуються стресовими реакціями [32]. Вперше Liu et al. було проведено дослідження надекспресії гена пшениці *TaTPS11* у трансформованих лініях рослин *Arabidopsis*, та попередньо виявлено вплив його надекспресії на холодостійкість рослин, що, можливо, пов'язано з функціональним зв'язком цього гена з метаболізмом сахарози [37]. Отже, подальші дослідження та аналіз отриманих за допомогою двох методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (*in vitro* та *in planta*) трансгенних рослин пшениці дозволять отримати вичерпні дані щодо їх стійкості до стресових факторів абіотичної природи.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами створено генетичні векторні конструкції pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2 з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Вперше проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію за допомогою методів *in vitro* різних сортів пшениці з використанням калусної культури незрілих зародків як експлантів. Також вперше здійснено трансформацію пшениці за допомогою методу *in planta* з використанням відповідних конструкцій pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2. Перенесення та інтеграція генів *TPS1* та *TPS2* в геном рослин пшениці досліджуваних сортів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів до цільових генів. Результати трансформації за використання обох методів є співставними, хоча слід зазначити, що метод трансформації *in planta* має певні сезонні обмеження в роботі, хоча має

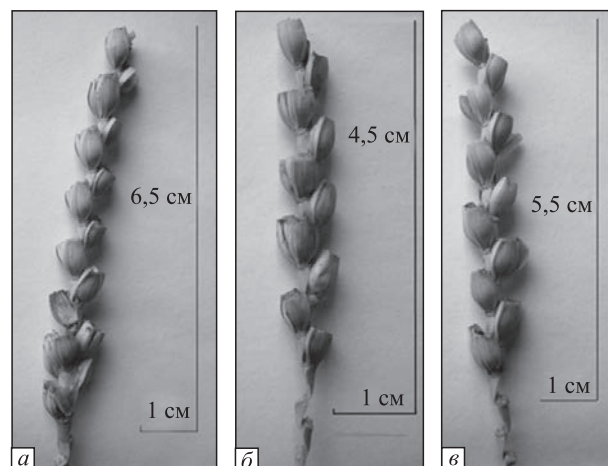


Рис. 7. Загальний вигляд колосків пшениці після трансформації *in planta*: а – колос сорту Вихованка після досягання насіння за трансформації конструкцією pBract214-TPS1; б – сорту Зимоярка після досягання насіння за умов трансформації конструкцією pBract214-TPS2, в – сорту Кесарія Поліська

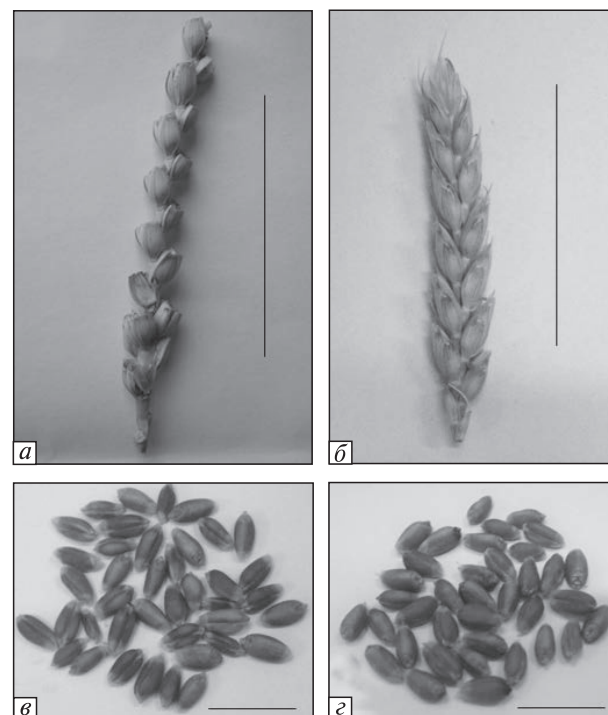
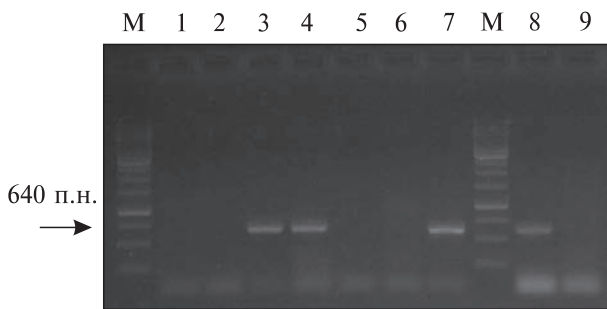
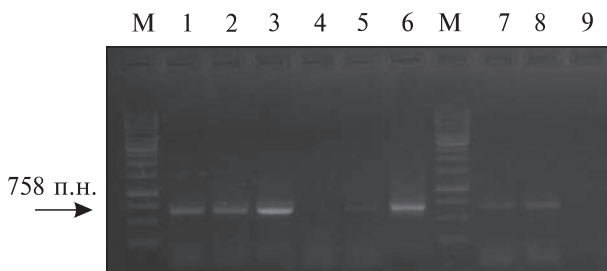


Рис. 8. а – колос пшениці сорту Вихованка після трансформації *in planta*, б – колос контрольної рослини сорту Вихованка (масштаб 5 см); в – насіння пшениці сорту Кесарія Поліська, зібране після трансформації *in planta*, г – насіння контрольних рослин сорту Кесарія Поліська (масштаб 1 см)



**Рис. 9.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці після трансформації *in vitro* та *in planta* з праймерами до гена *TPS1*: М – маркер (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas, Литва); 1, 5 – вода; 2, 6, 9 – ДНК контрольних сортів пшениці; 3–4 – ДНК зразків пшениці, трансформованих *in vitro* конструкцією pBract214-TPS1 з геном *TPS1* (розмір амплікону 640 п.н.); 7 – позитивний контроль (плазмідна ДНК конструкції pBract214-TPS1); 8 – ДНК пшениці після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-TPS1 з геном *TPS1*



**Рис. 10.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці після трансформації *in vitro* та *in planta* з праймерами до гена *TPS2*: М – маркер (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas»); 1–3, 5 – ДНК зразків пшениці, що трансформовані *in vitro* конструкцією pBract214-TPS2 з геном *TPS2* (розмір амплікону 758 п.н.); 4 – вода; 6 – позитивний контроль (плазмідна ДНК конструкції pBract214-TPS2); 7–8 – ДНК пшениці після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-TPS2 з геном *TPS2*; 5, 9 – ДНК контрольних рослин пшениці

інші переваги порівняно з трансформацією в культурі *in vitro*.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів досліджень.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Роботу виконано за фінансової

підтримки проекту «Створення посухостійких ліній рослин за допомогою надекспресії дріжджових генів біосинтезу трегалози» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2015–2019 рр.) (номер державної реєстрації – 0115U005022).

#### OBTAINING OF WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) LINES WITH YEAST GENES OF TREHALOSE BIOSYNTHESIS

A.Yu. Kvasko, S.V. Isayenkov, K.V. Dmytruk, A.A. Sibirny, Ya.B. Blume, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine 04123, Kyiv 123, Osipovskogo st. 2a  
Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Dragomanova st., 14/16

E-mail: kvasko.anna@ukr.net; yemets.alla@nas.gov.ua

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) trehalose biosynthesis genes (*TPS1* and *TPS2*) were transferred into genomes of several common wheat varieties using two methods of *Agrobacterium*-mediated transformation (*in vitro* and *in planta*) to enhance their drought tolerance. For this purpose, vectors pBract214-TPS1 and pBract214-TPS2 were constructed using Gateway-cloning technique. Both vectors contained *TPS1* and *TPS2* genes under the control of the constitutive maize ubiquitin promoter (P<sub>Ubi</sub>) and hygromycin-phosphotransferase (*hpt*) selectable marker gene. Three-five days callus obtained from wheat immature embryos was used as explants for the transformation *in vitro*. Selection of transgenic plants was carried out on nutrient medium supplemented with 30 mg/L hygromycin (as selective agent). Seeds of wheat (transgenic generation T1) were obtained after *in planta* method of transformation. Integration and presence of yeast genes in wheat genomic DNA isolated from transgenic plants were confirmed by PCR analysis using primers specific to *TPS1* and *TPS2* genes.

#### ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) С ДРОЖЖЕВЫМИ ГЕНАМИ БИОСИНТЕЗА ТРЕГАЛОЗЫ

А.Ю. Кваско, С.В. Исаенков, К.В. Дмитрук, А.А. Сибирный, Я.Б. Блюм, А.И. Емец

С использованием двух методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (*in vitro* и *in planta*) перенесены дрожжевые (*Saccharomyces cerevisiae*) гены биосинтеза трегалозы *TPS1* и *TPS2* в ряд сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) для повышения

их засухоустойчивости. Для этого были созданы векторные конструкции pBract214-TPS1 и pBract214-TPS2 с целевыми генами *TPS1* и *TPS2*, соответственно, под контролем промотора убиквитина кукурузы (*PUBi*), и селективным маркерным геном гигромицин-фосфотрансферазы (*hpt*). В качестве эксплантов для трансформации *in vitro* использовали 3–5 дневные калусы незрелых зародышей пшеницы. Селекцию трансгенных растений-регенерантов осуществляли на питательной среде с добавлением 30 мг/л гигромицина (как селективного агента). В результате проведения трансформации с использованием метода *in planta* были получены семена (трансгенное поколение T1) пшеницы, которые проращивали и отбирали на устойчивость к гигромицину. Перенесение и интеграцию целевых генов в геном пшеницы подтверждали с помощью ПЦР-анализа с использованием специфических праймеров к генам *TPS1* и *TPS2*.

#### REFERENCES

1. Yatsyshyn, V.Y., Kvasko, A.Y., and Yemets, A.I., Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants, *Cytol. Genet.*, 2017, vol. 51, pp. 371–83.
2. Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M., Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 1992, vol. 54, pp. 579–99.
3. Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F., and Bartels, D., The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*, *Physiol. Plant.*, 1993, vol. 87, pp. 223–6.
4. Drennan, P.M., Smith, M.T., Goldsworthy, D., and Van Staden, J., The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw., *J. Plant Physiol.*, 1993, vol. 142, pp. 493–6.
5. Colaco, K., Kampinga, J., and Roser, B., Amorphous stability and trehalose, *Sci.*, 1995, vol. 268, pp. 788–9.
6. Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A., and Klionsky, D.J., Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, pp. 1563–9.
7. An, M.-Z., Tang, Y.-Q., Mitsumasu, K., Liu, Z.-S., Shigeru, M., and Kenji, K., Enhanced thermo-tolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase, *Biotechnol. Lett.* 2011, vol. 33, pp. 1367–74.
8. Romero, C., Belles, J.M., Vaya, J.L., Serrano, R., and Culiandezmacia, F.A., Expression of the yeast trehalose 6 phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: Pleiotropic phenotypes include drought tolerance, *Planta*, 1997, vol. 201, pp. 293–7.
9. Karim, S., Aronsson, H., Ericson, H., Pirhonen, M., Leyman, B., Welin, B., Mäntylä, E., Palva, E.T., Van Dijck, P., and Holmström, K.O., Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose, *Plant Mol Biol*, 2007, vol. 64, pp. 371–86.
10. Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, W.B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.S., Choi, Y.D., Nahm, B.H., and Kim, J.K., Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth, *Plant Physiol.*, 2003, vol. 131, no. 2, pp. 516–24.
11. Wu, R., Garg, A., Engineering rice plants with trehalose-producing genes improves tolerance to drought, salt, and low temperature, *ISB News Report.*, 2003, <https://www.seedquest.com/News/releases/2003/march/5456.htm>
12. Miranda, J.A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J.M., Dijck, P.V., and Iturriaga, G., A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic Arabidopsis, *Planta*, 2007, vol. 226, no. 6, pp. 1411–21.
13. Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., and Kumlehn, J., Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize, *Int. J. Plant Genomics*, 2009, vol. 1, pp. 1–9.
14. Manfroi, E., Yamazaki-Lau, E., Grando, M.F., and Roesler, E.A., Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*, *Genet. Mol. Biol.*, 2015, vol. 38, no. 4, pp. 470–6.
15. Karimi, M., Inze, D., and Depicher, A., GATE-AWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Trends Plant. Sci.*, 2002, vol. 7, pp. 193–5.
16. Fleuler, F., Stettler, T., Meyerhofer, M., Leder, L., and Mayr, I.M., Development of a novel Gateway-based vector system for efficient, multiparallel protein expression in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, 2008, vol. 59, pp. 232–41.
17. Kvasko A.Yu., Isayenkov S.V., Krasnoperova E.E., Dmytruk K.V., and Yemets A.I., Obtaining of wheat plants with yeast genes of trehalose biosynthesis *TPS1* and *TPS2*, *Reports Natl. Acad. Sci. Ukraine*, 2020, no. 5, in press.
18. Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–97.



19. Gamborg, O.L., Eveleigh, D., Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley, *Can. J. Biochem.*, 1968, vol. 46, no. 5, pp. 417–21.
20. Hensel, G., Marthe, C., and Kumlehn, J., Agrobacterium-mediated transformation of wheat using immature embryos, *Meth. Mol. Biol.*, 2017, vol. 1679, pp. 129–39.
21. Ishida, Y., Tsunashima, M., Heiei, Y., and Komari, T., Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos, *Meth. Mol. Biol.*, 2015, vol. 1223, pp. 189–98.
22. Zale, J.M., Agarwal, S., Loar, S., and Steber, C.M., Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Rept.*, 2009, vol. 28, no. 6, pp. 903–13.
23. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., and Smith, S.A., *Current Protocol in Molecular Biology*, New York: John Wiley., 1987, pp. 431–3.
24. Amoah, B.K., Wu, H., Sparks, C., and Jones, H.D., Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue, *J. Exp. Bot.*, 2001, vol. 52, no. 358, p. 1135–42.
25. Fortin, C., Nester, E.W., and Dion, P., Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone, *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, no. 17, pp. 5676–85.
26. Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W., and Wan, Y., Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Physiol.*, 1997, vol. 115, pp. 971–80.
27. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B., and Jones, H.D., Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat, *Plant Cell Rept.*, 2003, vol. 21, pp. 659–68.
28. Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang G., and He, G., Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat, *Mol. Biol. Rept.*, 2009, vol. 36, pp. 29–36.
29. Jones, H.D., Doherty, A., and Wu, H., Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat, *Plant Methods*, 2005, vol. 1, pp. 1–9.
30. Han, J., Yu, X., Chang, J., Yang, G., and He, G., Overview of the wheat genetic transformation and breeding status in China, *Meth. Mol. Biol.*, 2017, vol. 1679, no. 3, pp. 37–60.
31. Shrawat, A. K., Lorz, H., *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers, *Plant Biotechnol. J.*, 2006, vol. 4, pp. 575–603.
32. Li, H.W., Zang, B.S., Deng, X.W., and Wang, X.P., Overexpression of the trehalose-phosphate synthase gene *OsTPSI* enhances abiotic stress tolerance in rice, *Planta*, 2011, vol. 234, pp. 1007–18.
33. Kvasko, A.Yu., Isayenkov, S.V., Krasnoperova, E.E., Dmytruk, K.V., and Yemets, A.I., Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* with yeast genes of trehalose biosynthesis *TPS1* and *TPS2*, *Visnyk Ukr. Tovarystva Genet. Seleksioneriv*, 2019, vol. 18, no. 2, pp. 8–16.
34. Yei, E.T., Kwom, H.B., Han, S.E., Lee, J.T., Ryu, J.C., and Byun, M.O., Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPSI*) gene from *Sacharomyces cerevisiae*, *Mol. Cells*, 2000, vol. 10, pp. 263–8.
35. Lawlor, D.W., Paul, M.J., Source/sink interaction underpin crop yield: the case for trehalose-6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat, *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 418, pp. 1–16.
36. Ihan, S., Ozdemir, F., Bor, M., Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf., *Plant Biol.*, 2015, vol. 17, pp. 402–7.
37. Liu, X., Fu, L., Qin, P., Sun, Y., Liu, J., Wang X., Overexpression of the wheat trehalose-6-phosphate synthase 11 gene enhances cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Gen.*, 2019, vol. 710, pp. 210–7.

Надійшла в редакцію 15.01.20  
Після доопрацювання 27.02.20  
Прийнята до друку 18.07.20