

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ В РОДИНІ ORCHIDACEAE

О.О. ОВЧАРЕНКО, В.А. РУДАС

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: ovcharenkoo077@gmail.com

Орхідні є однією з найпоширеніших груп квіткових рослин з широким географічним ареалом та видовим різноманіттям. Низку тропічних та субтропічних видів використовують як декоративні, лікарські та їстівні. Існує підвищений попит на рослинний матеріал, значна частина видів в природі знаходяться під загрозою зникнення, тому вирощування орхідних в культурі є актуальним. Традиційно, нові цікаві форми отримували завдяки гібридизації та селекції, які вимагають значного часу. Не всі вимоги, які висувають до елітних сортів, можуть бути вирішені традиційними методами селекції. Застосування досягнень сучасної молекулярної біології значно розширює можливості селекціонерів. Розвиток методів генетичної інженерії дозволяє вводити як нові гетерологічні гени, так і редагувати гени самих орхідних, що здатне значно прискорити та збільшити успішність традиційного селекційного процесу. Представники родини Orchidaceae можуть бути використані не лише як реципієнти цінних гетерологічних генів, але і як донори унікальних генів для поліпшення культивованих видів інших родин. В огляді розглянуто сучасний стан та перспективи генетичної інженерії орхідних, їх використання як реципієнтів та донорів генів при генетичній трансформації.

Ключові слова: генетична трансформація, Orchidaceae, експресія генів, CRISPR-Cas.

Вступ

Родина Orchidaceae налічує близько 35 тис. видів, що становить 1/7 частину видів квіткових рослин. Орхідні поширені від тропіків до арктичних широт, проте їх найбільше видове різноманіття представлене у тропічній та субтропічній областях. Представники родини Orchidaceae широко відомі завдяки своїм декоративним якостям, крім того деякі представники цієї родини мають лікарське та харчове значення (Kasulo et al, 2009).

Хоча природне різноманіття видів орхідей величезне, є ознаки, введення яких в геном культиварів, здатне значно покращити комерційну цінність останніх. До них відносяться: стійкість до стресів, хвороб та шкідників, зміна форми та кольору квітів, незалежність рослин від чітко вираженого періоду спокою, збільшення періоду життя зрізаних квітів. Методи традиційної селекції, такі як статева гібридизація та подальший відбір, зазвичай, займають досить тривалий час. Крім того, методи традиційної селекції не дають змоги отримати рослини з усіма бажаними ознаками, через обмеженість генетичного матеріалу в межах одного або кількох споріднених видів, значний ювенільний період та тривалі генеративні цикли. Скорочення ювенільного періоду, прискорення переходу до генеративної стадії, створення певних нових кольорових варіацій та рослин зі стійкістю до вірусів – цілі, які важко досягти виключно методами традиційної селекції. Застосування методів генетичної інженерії допомагає у випадках, які традиційна гібридизація не спроможна вирішити.

На сьогодні тривають гарячі суперечки між прихильниками та противниками ГМО (генетично модифікованих організмів), зазвичай мова йде саме про генетично трансформовані рослини, а не мікроорганізми чи тварин. Противники ГМО побоюються вживання таких рослин у їжу та можливого неконтрольованого поширення трансгенів. Виходячи з цих міркувань генетична трансформація декоративно-квітучих тропічних орхідей не викликати ніякої стурбованості, оскільки їх, здебільшого, не споживають у їжу, а перенесення трансгенів з пилком у природні умови неможливе через ентомофільність та високу специфічність

до виду-запилювача та відсутність цих видів у помірній зоні. Пилок більшості представників зібраний у полінії, що додатково зменшує ризик неконтрольованого поширення трансгенів. Таким чином генетична трансформація декоративних орхідних є перспективним напрямком біотехнології.

Генетична трансформація орхідних

В оглядах (Chen et al, 2003; Teixeira da Silva, 2011, 2013) наведено перелік генетично трансформованих видів орхідей з різних родів та проведено аналіз цих досліджень виконаних до 2011 року. При відборі видів-кандидатів для генетичної трансформації в поле зору дослідників потрапили, в першу чергу представники родів, які мають комерційне значення як декоративно-квітучі: *Brassia*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Vanda*. Генетичні вектори, використані в багатьох протоколах, містять лише селективні та репортерні гени, показуючи, таким чином, саму можливість генетичної трансформації. Першими генетично трансформованими видами орхідних, для яких отримали відтворювані протоколи генетичної трансформації, були представники роду *Dendrobium*. Детальний аналіз методів генетичної трансформації *Dendrobium* наведено в огляді (Teixeira da Silva et al, 2016). Представники цього роду мають не лише декоративне, але і важливе лікарське значення (Semiarti et al, 2020a; Teixeira da Silva, 2013), що обумовлює особливий інтерес до отримання цих рослин зі зміненими біосинтетичними шляхами, підвищеною стійкістю до абіотичних та біотичних стресів. Semiarti (2018) запропонував використання генетичної трансформації для прискорення розмноження в культурі цінних зникаючих лікарських видів орхідей (*Coelogyne pandurata*, *Phalaenopsis amabilis*, *Vanda tricolor*).

На нинішній день кількість генетично модифікованих видів, та генів використаних для трансформації значно збільшилася, що потребує систематизації існуючого матеріалу. Оновлений сучасний перелік генетично трансформованих видів орхідних та результати генетичної трансформації наведено в таблиці. В ній узагальнено дані з генетичної трансформації орхідей, зокрема методах генетичної трансформації, використаних експлантах, перенесених

генах та методах, що підтверджували їх інтеграцію в геном, частоту отримання трансгенних рослин.

Методи генетичної трансформації орхідних

До найпоширеніших способів генетичної трансформації рослин належать: агробактеріальна, біолістична та ПЕГ-індукована трансформація протопластів. Оскільки орхідні належать до класу однодольних і не є природними господарями для *Agrobacterium tumefaciens*, перші трансгенні рослини в цій родині були отримані біолістичним методом. Однак, подальші дослідження показали специфічність міжклітинної взаємодії та здатність компетентної бактерії зв'язуватися з поверхнею протокормів. Існує хемотаксис *Agrobacterium tumefaciens* до ексудату останніх, що вказує на відсутність бар'єру для агробактеріальної трансформації (Gnasekaran et al, 2015). Підтвердженням цьому є велика кількість трансгенних рослин родини орхідних, отриманих цим методом (див. таблицю). Для успіху генетичної трансформації невіддатливих видів за допомогою *A. tumefaciens* необхідна оптимізація таких ключових факторів як температура, рН, освітленість, концентрація L-цистеїна та кальцію, наявність ацетосирингону та нітрату срібла (інгібітора біосинтезу етилену) в середовищі при кокультивуванні (Julkifle et al, 2010) та підбір більш вірулентних штамів агробактерій. Детальний аналіз протоколів генетичної трансформації орхідних наведено в роботі (Chen et al, 2003).

Важливим моментом при агробактеріальній трансформації є елімінація агробактерії в рослинних тканинах після кокультивування. Найчастіше з цією метою використовують цефотаксим, проте він вимагає використання високих доз та може викликати некрози в деяких орхідних при тривалому культивуванні. Було запропоновано використання меропонема – нетоксичного для орхідей агента. Ефективна концентрація меропонема, що елімінує агробактерію, становить 5–10 мг/л середовища, порівняно з 600 мг/л цефотоксиму (Sjahril and Mii, 2006; Li and Chan, 2018).

На сьогодні для отримання трансгенних орхідей найчастіше використовують агробактеріальний та біолістичний способи генетичної трансформації, іноді – електропорацію

Генетична трансформація орхідей

Вид та сорти	Метод генетичної трансформації	Тип експланта	Гени (селективні, репортерні або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена(ів)	Частота/ефективність трансформації	Посилання
<i>Brassia rex</i> 'Sacata' × <i>B. verrucosa</i>	Біолістична	Протокорми	<i>bar</i>	ПЛР, Саузерн і Нозерн блотінг	Нв*	Knapp et al, 2000
<i>Brassolaeliocattleya</i> Raye Holmes 'Mendenhall'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>nr11</i> , <i>antisenseCymMV-CP</i>	—	Нв*	Stillwell et al, 2013
<i>Calanthe sedenii</i> 'Cornelius Vanderbilt'	Електрофорез	Протокорми	<i>nr11</i> , <i>gusA</i>	ПЛР, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	53,0–57,0 %	Griesbach, 1994
<i>Cattleya</i> 'Georgiana' × self	Біолістична	Протокорми	<i>bar</i>	ПЛР, Саузерн і Нозерн блотінг	Нв*	Knapp et al, 2000
<i>Cattleya</i> 'CM2450'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hpt11</i> , <i>gusA</i> , <i>acdS</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	>6 рослин/г протокормів	Zhang et al, 2010
<i>Cymbidium</i>	Біолістична	Протокорми	<i>gus-int</i> , <i>nr11</i>	ПЛР, Саузерн блотінг	>15,0 %	Yang et al, 1999
<i>Cymbidium niveomarginatum</i>	Агробактеріальна	Частини ризомів	<i>hpt11</i> , <i>GFP</i> , <i>ORSV CP</i>	ПЛР, GFP флуоресценція, DAS-ELISA	Нв*	Chen et al, 2006
<i>Cymbidium</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>nr11</i> , <i>hpt11</i> , <i>gusA</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	>4 рослин/г протокормів	Chin et al, 2007
<i>Dendrobium</i> × 'Jaquelyn Thomas'	Біолістична	Протокорми	<i>nr11</i> , <i>PRV CP</i>	ПЛР, Саузерн блотінг	4,6 %	Kuehnle and Sugii, 1992
<i>Dendrobium</i> 'White Angel'	Біолістична	Протокорми, калюси	<i>luc</i>	Саузерн і Нозерн блотінг, біолюмінесценція експерименту	27 ліній/3 експерименти	Chia et al, 1994
<i>Dendrobium</i> 'Madame Thong'	Агробактеріальна	Зрізи протокормів	<i>nr11</i> , <i>antisenseDON1</i>	ПЛР, Саузерн і Нозерн блотінг	20,6%	Yu et al, 2001
<i>Dendrobium</i> 'Jaquelyn Thomas'	Біолістична	Протокорми	<i>hpt11</i> , <i>gfp</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, GFP флуоресценція	19,87%	Suwanaketchanattit et al, 2007
<i>Dendrobium</i> 'Madame Thong-In'	Біолістична	Протокорми	<i>bar</i> , <i>DcOSEPI</i>	ПЛР, Саузерн блотінг	2,7 – 14,0%	Chai et al, 2007a

Вид та сорти	Метод генетичної трансформації	Тип експланта	Гени (селективні, репортерні або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена(ів)	Частота/ефективність трансформації	Посилання
<i>Dendrobium catenatum</i>	Агробактеріальна, сонікація, детергент	Протокоорми	<i>hptII, DcObg-gusA; hptII, DcObg-GFP</i>	ПЛР, кількісний ЗТ-ПЛР, GFP флуоресценція	56,5 %	Chen et al, 2018
<i>Dendrobium</i> 'Chao Praya Smile'	Біолістична	Калюс з протокоормів	<i>bar, DOSOC1</i>	ПЛР, Саузерн блотінг	7 ліній/експеримент	Ding et al, 2013
<i>Dendrobium</i> 'Chao Praya Smile'	Агробактеріальна	Калюс з протокоормів	<i>bar, DOAPI</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, ПЛР, напівкількісний ЗТ-ПЛР	Нв*	Sawettalake et al, 2017
<i>Dendrobium formidible</i> 'Ugusu'	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>hptII, hptII, gusA</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	3,3–12,2 %	Phlaetita et al, 2015b
<i>Dendrobium lasianthera</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>hptII, KNAT1</i>	ПЛР	65,0%	Utami et al, 2018
<i>Dendrobium lineale</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>hptII, AtRKD4</i>	ПЛР	Нв*	Semiarti et al, 2020a
<i>Dendrobium linguella</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>bar, des C::licBM3</i>	ПЛР, якісне і кількісне визначення активності термостабільної ліхенази	12,5 %	Кутра et al, 2013
<i>D. linguella</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>bar, supIIA1</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР	7,0 %	Rudas et al, 2016
<i>Dendrobium macrophyllum</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>hptII, CRISPR/Cas9</i> (редагування <i>VAR2</i> гена)	ПЛР, сиквенс редагування послідовності <i>VAR2</i>	0,66 % редагування гена	Setiawati et al, 2020
<i>Dendrobium nobile</i>	Біолістична, агробактеріальна	Протокоорми, калюси	<i>hptII, Gus-int</i>	Саузерн і Нозерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	2,0 % біолістична 18,0 % агробактеріальна	Men et al, 2003a, b
<i>D. nobile</i>	Агробактеріальна	Протокоорми	<i>hptII, gusA</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	27,3%	Phlaetita et al, 2015a

Продовження таблиці

Вид та сорти	Метод генетичної трансформації	Тип експланта	Гени (селективні, репортені або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена(ів)	Частота/ефективність трансформації	Посилання
<i>Dendrobium officinale</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>hptII, Gus-int, gfp, CRISPR/Cas9</i> (редагування <i>VAR2</i> гена)	ПЛР, сиквенс редагованих послідовностей: <i>COUMARATE 3-HYDROXYLASE (C3H), CINNAMATE4-HYDROXYLASE (C4H), 4-COUMARATE:COENZYME A LIGASE (4CL), CINNAMOYL COENZYME A REDUCTASE (CCR), IRREGULAR XYLEM5 (IRX)</i>	Нв*	Kui et al, 2017
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>	Біолістична	Протокорми, калуси	<i>hptII, gusA</i>	Саузерн і Нозерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	12,0 %	Men et al, 2003
<i>D. phalaenopsis</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, AtRKD4</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР	12,1 %	Setiari et al. 2018
<i>Dendrobium secundum</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gusA, antisense ACC oxidase</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, ПЛР	Нв*	Atichart et al, 2007
<i>Erycina pusilla</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>hptII, MSRB7 (methioninesulphoxidoreductase B7)</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР, Саузерн блотінг і стійкість до метилвіологена	0,65 %	Lee et al, 2015
<i>Odontoglossum 'Stirling Tiger'</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gus</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, ПЛР	1,3 %	Raffaener et al, 2009
<i>Oncidium 'Sherry Baby'</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gfp, gus, pfp</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, Саузерн і Нозерн блотінг	12,0 %	You et al, 2003
<i>Oncidium 'Sherry Baby'</i>	Біолістична	Протокорми	<i>hptII gfp, gus, pfp</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, Саузерн і Нозерн блотінг	11,8 %	You et al, 2003

Вид та сорти	Метод генетичної трансформції	Тип експланта	Гени (селективні, репортери або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена(ів)	Частота/ефективність трансформції	Посилання
<i>Oncidium</i> 'Sherry Baby'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, Gus-int</i>	Саузерн, Нозерн і Вестерн блотінг	10,8 %	Liau et al, 2003
<i>Oncidium</i> 'Sherry Baby'	Біолістична	Протокорми	<i>hptII, sGFP</i>	ПЛР, GFP флуоресценція	НВ*	Yee et al, 2008
<i>Oncidium</i> 'Sweet Sugar'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII та gus; nptII та etr I-1</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронидази, ПЛР, Саузерн блотінг	1,0–2,7 %	Raffiner et al, 2009
<i>Oncidium</i> 'Gower Ramsey'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gusA, phytoenesynthase-RNAi</i>	ПЛР, кількісний ЗТ-ПЛР	НВ*	Liu et al, 2014
<i>Oncidium</i> 'Gower Ramsey'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>pmi (phosphomannose-isomerase), gfp</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР, Саузерн блотінг	21,0–27,0 %	Thiruvengadam et al, 2011
<i>Oncidium</i> 'Sweet Sugar'	Біолістична	Протокорми	<i>hptII, CymMV-CP, S65Tgfp,</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР, кількісний ЗТ-ПЛР, GFP флуоресценція	2,5 %	Niyomtham et al, 2018
<i>Phalaenopsis</i> 'Dance' × <i>Doritaenopsis</i> 'Dance' Happy Valentine'	Біолістична	Протокорми	<i>gusA, bar</i>	ПЛР, Саузерн, Вестерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронидази	1,1 %	Anzai et al, 1996
<i>Doritaenopsis</i> 'Coral Fantasy' × <i>Phalaenopsis</i> (Baby Hat × Ann Jessica)	Агробактеріальна	Суспензійна культура Протокорми Протокорми	<i>nptII, hptII, gusA hptII, gusA hptII, gfp, gus, CymMV-CP</i>	ПЛР, Саузерн, блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронидази	Для різних штамів агробактерії 8 і 4 рослини/1 г суспензійної калюсної культури відповідно	Belarmino et al, 2000
<i>Phalaenopsis</i> гібриди	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gusA</i>	ПЛР, Саузерн, блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронидази	1,5–14,6%	Chai et al, 2002
<i>Phalaenopsis</i> 'TS340'	Біолістична	Протокорми	<i>hptII, gfp, gus, CymMV-CP</i>	ПЛР, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронидази, Саузерн і Нозерн блотінг, ЗТ-ПЛР, ELISA	НВ*	Liao et al, 2004

Продовження таблиці

Вид та сорти	Метод генетичної трансформації	Тип експланта	Гени (селективні, репортені або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена (ів)	Частота/ефективність трансформачії	Посилання
<i>Phalaenopsis</i> 'TS97K'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, gfp, gus, CP, Pfp</i>	Саузерн і Нозерн блотінг, стійкість до патогенів	Нв*	Chan et al, 2005
<i>Phalaenopsis</i> гібриди	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>hptII, gusA</i>	Гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, ПЛР, Саузерн блотінг	1,3–1,9 %	Mishiba et al, 2005
<i>Phalaenopsis</i> Wataboushi '#6.13'	Агробактеріальна	Ембріогенна суспензійна культура	<i>hptII, nptII, wasabi defensin</i>	ПЛР, Саузерн та Вестерн блотінг, стійкість до <i>Erwinia carotovora</i>	19 стійких до гігроміцину калосів/г суспензійних кліти	Sjahril et al, 2006
<i>Phalaenopsis</i> гібриди	Біолістична	Протокорми	<i>nptII, chitinase</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, аналіз активності хітинази, інокуляційний тест з <i>Fusarium oxysporum</i>	Нв*	Umemura, 2007
<i>Phalaenopsis</i> 'Sogo Vivien'	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, AtRKD4</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР	0,63 %	Mursyanti et al, 2015
<i>Phalaenopsis</i> <i>atabilis</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>nptII, VP/KNAT1</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР	0,1–0,3 % з геном VP/KNAT1	Semiarti et al, 2007
<i>Ph. atabilis</i>	Агробактеріальна	Ембріогенний калос	<i>nptII, LTR</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, стійкість до холодного стресу	1,5–1,7 % в контролі	Qin et al, 2011
<i>Ph. atabilis</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>PaFT (Phalaenopsis atabilis Flowering Locus T)</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР	Нв*	Semiarti et al, 2015
<i>Phalaenopsis</i> <i>violacea</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, eGFP, gusA</i>	ПЛР, Саузерн і Вестерн блотінг	1,2–5,2 %	Hsing et al, 2016
<i>Phalaenopsis</i> <i>atabilis</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>hptII, CRISPR/Cas9</i> (редагування VAR2 гена)	ПЛР, секвенс відредагованих ділянок геному	1,16–1,20 %	Nopitasari et al, 2020

Закінчення таблиці

Вид та сорти	Метод генетичної трансформації	Тип експланта	Гени (селективні, репортерні або цільові)	Методи підтвердження перенесення чи редагування гена (ів)	Частота/ефективність трансформації	Посилання
<i>Ph. amabilis</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>hprtII, CRISPR/Cas9</i> (редагування <i>PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3)</i> гена)	ПЛР, сиквенс відредагованих ділянок геному	0,96 %, відредаговано 0,25 %	Semiarti et al 2020b
<i>Phalaenopsis equestris</i>	Агробактеріальна	Первинні протокорми	<i>hprtII, CRISPR/Cas9</i> (редагування <i>MADS</i> гена)	ПЛР, сиквенс відредагованих ділянок геному	4,8 %	Tong et al, 2020
<i>Raphiopedilum Maudiae</i>	Агробактеріальна трансформація <i>in planta</i>	Зав'язь	<i>hprtII, gusA, CeFT (Symbidium ensifolium Flowering Locus T)</i>	ПЛР, ЗТ-ПЛР, кількісний ЗТ-ПЛР, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	0,60 %	Luo et al, 2021
<i>Vanda 'Tokyo Blue'</i>	Агробактеріальна, сонікація	Протокорми	<i>hprtII, gusA, nptII</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	17 рослин/г протокормів	Shrestha et al, 2007
<i>Vanda 'Kasem's Delight'</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>wheatwin1, wheatwin2, nptII</i>	ПЛР	82,0 та 68,0 %	Gnasekaran et al, 2014
<i>Vanda tricolor</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>nptII, KNAT1</i>	ПЛР	НВ*	Semiarti et al, 2020a
<i>Vanilla</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>gusA, nptII</i>	ПЛР, Саузерн і Но-зерн блотінг	23,4 % <i>gusA</i> , 39,4 % <i>nptII</i>	Malabadi and Bhat, 2007
<i>Vanilla</i>	Агробактеріальна	Протокорми	<i>gusA, nptII</i>	ПЛР, Саузерн блотінг, гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази	47,3 %	Ratheesh et al, 2011

Примітка. *Нв – не вказано; ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція; ЗТ-ПЛР – ПЛР з реакцією зворотної транскрипції; ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) – ферментний імуносорбентний аналіз. Використані генетичні послідовності: *acdS* – ген 1-аміноциклопропан-1-карбоксилатдезамінази; *antisenseACC-oxidase* – антисенсна послідовність гена аміноциклопропан-оксидази; *antisenseCHS* – антисенсна послідовність гена халконсинтази; *antisenseCymMV-CP* – антисенсна послідовність гена капсидного білка вірусу мозаїки цимбідіума; *antisenseDOH1* – антисенсна послідовність гена *DOH1*; *AtRKD4* – ген транскрипційного фактору зиготичного ембріогенезу; *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази; CRISPR/Cas9 – система редагування генома з використанням CRISPR-асоційованої ендонуклеази (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*); *CeFT* (*Cymbidium ensifolium Flowering Locus T*) – ген локусу цвітіння цимбідіума; *chitinase* – ген хітинази гарбуза; *CymMV-CP* – ген капсидного білка вірусу мозаїки цимбідіума; *cyp11A1* – ген цитохрому P450s; *DcOSEP1* – ортолог послідовності *SEPALLATA* з дендробіума; *des C::licBM3* – експресійна касета з генів десатурази *des C* та термостабільної ліхенази; *DOSOC1* – ген дендробіума, ортолог гена *SOC1* з *Arabidopsis*; *eGFP*, *gfp* – варіанти гена зеленого флуоресцентного білка; *etr1-1* – геном рецептора етилену; *gusA* – ген β-глюкуронідази; *gus-int* – ген β-глюкуронідази з інтроном; *hptII* – ген гігроміцинфосфотрансферази; *KNAT1* – ген *KNOTTED1 like Arabidopsis thaliana*; *LTP* – ген ліпідтранспортного білка; *luc* – ген люциферази; *methioninesulphoxidoreductase B7 (MSRB7)* – ген метіонінсульфоксидредуктази B7; *ORSV CP* – ген капсидного протеїна вірусу кільцевої плямистості одонтоглосуму; *pflp* – ген фередоксин-подібного білка з солодкого перцю; *PaFT* (*Phalaenopsis amabilis Flowering Locus T*) – ген локусу цвітіння фаленопсису; *pmi* (*phosphomannose-isomerase*) – ген фосфоманнозоізомерази; *phytoene synthase-RNAi* – ген фітоенсинтази; *PRV CP* – ген капсидного протеїна вірусу кільцевої плямистості папаї; *wasabi defensin* – ген дефензину васабі; *wheatwin1*, *wheatwin2* – гени PR-4 білків пшениці.

або метод генетичної трансформації зав'язі *in planta* (див. таблицю). Метод агробактеріальної трансформації має достатню відтворюваність, поєднує надійність, низьку копійність вбудовування та відсутність потреби в дорогому обладнанні, на відміну від біолістичного. Повідомлень про ПЕГ-індуковану стабільну трансформацію орхідних немає, що пов'язано з недостатньо розробленою методикою культивування протопластів.

Для підтвердження інтеграції та коректної експресії перенесених генів використовують такі класичні методи аналізу як: ПЛР, Саузерн та Нозерн блотінг, ІФА (ELISA), гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази чи флуоресценції GFP. Останнім часом все ширше використовують напівкількісний та кількісний ЗТ-ПЛР, секвенування ампліфікованих за допомогою ПЛР досліджуваних послідовностей. Для визначення рівня експресії генів у орхідних було запропоновано використовувати нові репортерні гени (*licBM3*) (Кирпа et al, 2013).

Селективні та репортерні гени, використані для генетичної трансформації представників родини *Orchidaceae*

При отриманні генетично трансформованих рослин не остання роль для досягнення успіху належить вдалому вибору селективних і маркерних генів (Chai et al, 2007b). При трансфор-

мації орхідей для відбору трансгенних тканин використовували гени стійкості до антибіотиків (*hptII*, *nptII*) та гербіцидів (*bar*). Відмічено вплив вдалого вибору селективного гена та селективного агента на успішність генетичної трансформації певного виду. Так ген бактеріального ферменту неоміцинфосфотрансферази *nptII* забезпечує стійкість трансгенних рослин до низки аміноглікозидних антибіотиків, таких як канаміцин, генетицин і неоміцин. Була показана відмінність у фітотоксичності цих антибіотиків та їх мінімальній інгібуючій концентрації. Генетицин було визнано найефективнішим, тоді як канаміцин не інгібував належним чином ріст нетрансгенних тканин орхідних, а неоміцин проявляв токсичність вже при мінімальних концентраціях (Gnasekaran et al, 2014). Низьку ефективність гена *nptII* та селекції на канаміцині відзначено і в роботі Umemura (2007). Таким чином, низька ефективність селекції, потреба у високих селективних концентраціях робить цей ген не дуже бажаним при створенні генетичних конструкцій для трансформації орхідних. Ізольований з *Escherichia coli* ген гігроміцинфосфотрансферази (*hptII*), який знешкоджує токсичний вплив антибіотику гігроміцину на рослинні клітини (Gritz, Davies 1983), було успішно використано при відборі генетичних трансформантів орхідних (див. табл.). Система селекції, що базується на ви-

користанні гігросцину поєднує досить високу ефективність відбору та відносну дешевизну, оскільки не вимагає високих селективних доз та завдяки помірній ціні препарату. Ген стійкості до фосфінотрицину (*bar*), який кодує фосфінотрицинацетилтрансферазу був ізольований з *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson et al, 1987). Механізм токсичної дії фосфінотрицину полягає в тому, що він інгібує глютамінсинтазу рослин. Це веде до надлишкового накопичення амонійних іонів в рослинних клітинах та вбиває їх. Продукт гена *bar* ацетилює фосфінотрицин та біалапос, чим інактивує їх токсичний вплив на клітину. Цей ген виявився придатним для відбору трансгенних рослин орхідних, завдяки відсутності в них природної стійкості до фосфінотрицину. Хоча для селекції орхідних при використанні гена *bar* необхідні невисокі концентрації селективних сполук (фосфінотрицин, біалапос), недоліком цього способу селекції є їх висока ціна або наявність токсичних домішок в комерційних гербіцидних сумішах. Для вирішення цієї проблеми було запропоновано використання альтернативної речовини L-метионінсульфоксиму, яка має нижчу ціну та низькі дози, необхідні для селекції (Chai et al, 2007a).

Значний інтерес для отримання трансгенних рослин орхідей становить використання гена *pflp*, що кодує клонований з солодкого перцю фередоксин-подібний білок. Цей білок має протимікробну активність, тому було запропоновано використовувати в якості селективного агента саме патогенний мікроорганізм. Тому, можливе його застосування і як селективного, і як цільового, що надаватиме стійкості до патогена орхідей *Erwinia carotovora*. Ефективність трансформації *Oncidium* 'Sherry Baby' при використанні цього гена як селективного становила 11,8 і 12,0 % при біолістичній та агробактеріальній трансформації відповідно, тоді як при селекції з використанням гена *hptII*, ефективність в тих же умовах становила 9,0 та 10,4 %, відповідно (You et al, 2003). Вторинні прокорми трансгенного *Oncidium* були стійкими до *E. carotovora*, в умовах, коли контрольні протокорми, гинули. Таким чином, дослідники показали, що ген *pflp* є перспективним для отримання стійких до бактеріальних патогенів рослин, які не містять додаткових генів стійкос-

ті до антибіотиків чи гербіцидів. В той же час, використання цього гена має такий недолік як необхідність елімінації агробактерії лише через місяць після початку кокультивування. Це веде до надлишкового росту бактерій та пригнічення росту протокормів.

Метод відбору генетичних трансформантів з використанням гена фосфоманнозоізомерази (*pmi*) як селективного гена у орхідних було вперше показано Thiruvengadam et al (2011). Продукт гена *pmi* конвертує маннозо-6-фосфат в фруктозо-6-фосфат, що дозволяє трансгенним рослинам рости на селективному середовищі з маннозою. Ефективність такого способу селекції була вищою (21–27 %) ніж при використанні селективного гена *hptII* (14 %).

Метод візуальної селекції полягає у можливості відбору трансгенних тканин за певними ознаками, що кодуються репортерними генами. Гени зеленого флуоресцентного білка (*gfp*), β-глюкуронідази (*gusA*) та люциферази (*luc*) є найбільш вживаними репортерними генами, хоча, для візуальної прижиттєвої селекції придатні лише *gfp* та *luc*, оскільки при візуалізації активності β-глюкуронідази (продукт гена *gusA*) відбувається загибель тканин. В таблиці зазначено випадки, коли при отриманні трансгенних орхідей використовували репортерні гени.

Репортерні гени, у складі експресійних касет з цільовими генами, можуть бути використані для визначення ліній з різним рівнем експресії. Так, в роботі (Кирпа et al, 2013) вперше в родині Orchidaceae було застосовано репортерний ген термостабільної ліхенази *licBM3* (клонований з бактерії *Clostridium thermocellum*) в складі злитого гена *des C::licBM3* для відбору трансформованих ліній дендробиума з високим рівнем експресії гена десатурази *des C*. Хоча візуалізація продуктів *licBM3*, також вимагає руйнування тканин, проте при створенні касет *licBM3* з цільовим геном, вона дає змогу швидко оцінити рівень експресії останнього.

Генетична трансформація *Cattleya* 'CM2450' вектором, який містив, крім селективного та репортерного генів, ген *acdS1*-аміноциклопропан-1-карбоксилатдезамінази (інгібітора біосинтезу етилену), яка, на думку дослідників, по аналогії з тютюном, мала підвищити частоту генетичної трансформації, не виправдала сподівань (Zhang et al, 2010). При використанні для трансформа-

ції *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 лише з вектором pIG121-Hm, частота отримання стійких до гігromіцину рослин була вищою, ніж при використанні комбінації векторів pIG121-Hm та pBBR*acdS* при всіх інших однакових умовах.

Досить оригінальний метод селекції трансгенних рослин запропоновано Semiarti et al (2007). Вони використали ген *KNOTTED1 like Arabidopsis thaliana* (BP/*KNATI*), який змінює морфологію листової пластинки, для візуальної селекції трансформованих рослин. Однак наявність цього гена значно знижувала частоту отримання трансформантів порівняно з контрольним вектором, який не містив BP/*KNATI*. Суттєвим недоліком цього методу є також необхідність в подальшому позбавлятися від цього гена, оскільки його вплив негативно позначається на морфології регенерантів, зокрема у них формуються трубчасті листки. До позитивного впливу цього гена можна віднести утворення множинних пагонів, завдяки яким можна значно підвищити коефіцієнт розмноження (Semiarti et al, 2007). Ген було використано для генетичної трансформації *Phalaenopsis amabilis*, *Coelogyne pandurata* та *Vanda tricolor* (Semiarti et al, 2020a).

Котрансформацію двома незалежними генетичними векторами за допомогою біолістичного методу запропонували Yee et al (2008). В цьому дослідженні було використано вектор pSM-CHS, який містив гени *hptII* та антисенсну послідовність гена халконсинтази (*antisenseCHS*), та вектор p35S – з геном *sgfp*. Відбір трансформантів проводили на гігromіцині, як селективній сполуці. Наявність трансгенів *sgfp*, *hptII* та антисенс *CHS* була показана в 28, 61, and 11 % відібраних стійких до гігromіцину рослин (Yee et al, 2008).

Цільові гени, перенесені до геному представників родини *Orchidaceae* шляхом генетичної трансформації

Перші спроби генетичної трансформації орхідей проводили виключно з використанням селективних (*nrPII*, *bar*, *hptII*) та репортерних (*gus*, *gfp*) генів. В міру того, як накопичувався досвід по отриманню трансгенних рослин цієї родини, перелік використаних генів значно розширився (див. таблицю): селективними (*phosphomannose-isomerase* (*pmi*), *pflp*), ре-

портерними (*luc*, *licBM3*), цільовими (*acdS*, *AtRKD4*, *CymMV-CP*, *cyp11A1*, *DcObg*, *DcOSEP1*, *des C::licBM3*, *DOH1*, *DOSOC1*, *etr1-1*, *KNOTTED1 like Arabidopsis thaliana* (*KNATI*), *LTP*, *methioninesulphoxidoreductase B7* (*MSRB7*), *ORSV CP*, *Phalaenopsis amabilis Flowering LocusT* (*PaFT*), *phytoene synthase-RNAi*, *PRV CP*, *wasabi defensin*, *wheatwin1*, *wheatwin2*) генами. Основною метою таких робіт було підвищення коефіцієнту розмноження, пришвидшення переходу рослин до генеративних циклів, збільшення біомаси, підвищення стійкості до абіотичних стресів та вірусних, бактеріальних і грибкових захворювань, зміна термінів цвітіння, забарвлення квітів та їх здатності зберігати декоративний вигляд протягом тривалого часу. В огляді Mudalige and Kuehnle (2004) розглянуто функції деяких генів, клонованих з орхідних, та їх можливе застосування в біотехнології. З часу опублікування статті частина цих генів вже була використана для генетичної трансформації орхідей шляхом оверекспресії чи, навпаки, супресії.

Орхідеї уражуються більш ніж 30 вірусами (Sastry et al 2019). Серед них – вірус мозаїки цимбідіума *Cymbidium mosaic virus* (ВМЦ) та вірус кільцевої плямистості одонтоглосsuma *Odontoglossum ringspot virus* (ВКПО). Це найпоширеніші збудники захворювань орхідей, які знижують життєздатність рослин, погіршують їх якість та зменшують кількість квітів (хлоротичні та некротичні плями на листі і квітах, деформовані та строкаті квіти). Існує кілька стратегій отримання стійких до вірусів трансгенних рослин, вони відрізняються за механізмами патоген-обумовленої стійкості рослин до вірусів: 1) РНК-обумовлена стійкість, при якій проводять генетичну трансформацію рослини, використовуючи певну послідовність вірусного генома, що веде до замовкання вірусних генів; та 2) білок-обумовлена стійкість, для отримання якої трансформують рослину повною послідовністю гена, що кодує капсидний протеїн. Білок-обумовлена стійкість надає стійкості до ширшого спектру споріднених вірусів, але ефективна лише при невеликій дозі інокулюму. На відміну від цього, при РНК-обумовленій стійкості спостерігають високу видоспецифічність та ефективність при великій дозі інокулюму (Koh et al, 2014). В одній з перших робіт по генетичній трансформації орхідей була зро-

блена спроба ввести ген капсидного протеїна вірусу кільцевої плямистості папаї (*PRV CP*) в рослини *Dendrobium* × ‘Jaquelyn Thomas’, з метою створення моделі по отриманню стійких до вірусу мозаїки цимбідіума – рослин (Kuehnle et al, 1992). На жаль, лише одна з 13 отриманих стійких до канаміцину рослин, містила одночасно і *PRV CP* – ген капсидного протеїна вірусу кільцевої плямистості одонтогლოსуму.

З метою підвищення стійкості до ВМЦ була проведена успішна генетична трансформація *Brassolaeliocattleya* Raye Holmes ‘Mendenhall’ конструкцією, що містила повнорозмірний ген капсидного протеїну ВМЦ в антисенсній орієнтації під контролем 35S промотору ВМЦК (вірусу мозаїки цвітної капусти) (Stillwell et al, 2013).

Для отримання стійких до ВМЦ рослин *Phalaenopsis* ‘TS340’ застосували біолістичну генетичну трансформацію геном капсидного білка *CymMV-CP* (Liao et al, 2004). Отримані трансформанти демонстрували невисокі рівні синтезу мРНК, при відсутності сигналу на Вестерн блоттингу, що вказувало на відсутність синтезу капсидного протеїну. Поряд з цим, рослини демонстрували стійкість до патогена, підтверджену ЗТ-ПЛР та ELISA, а їх дочірні лінії були досліджені в умовах *in vivo*. У 5 з 13 проаналізованих ліній виявлено стійкість у >50 % T₁ нащадків. Аналізи ядерної транскрипції та мРНК показали, що стійкість до вірусу обумовлена РНК-опосередкованим посттранскрипційним сайленсингом, чому підтвердженням була присутність мРНК, а не РНК білка оболонки вірусу (*CP*). Таким чином, було показано, що експресія гетерологічного гена *CymMV-CP* у рослинах *Phalaenopsis* ‘TS340’ надає стійкості до ВМЦ (Liao et al, 2004).

Chen et al. (2019) створили генетичні конструкції на основі білків оболонки вірусів ВМЦ та ВКПО, для подальшого отримання орхідних з комплексною стійкістю до цих вірусів. Конструкції успішно випробували на рослинах *Nicotiana benthamiana*, модельному об’єкті в вірусології рослин. Трансгенні рослини *N. benthamiana* виявилися стійкими завдяки явищу РНК-інтерференції.

При генетичній трансформації *Phalaenopsis* ‘TS97K’ генами капсидного білка *CymMV-CP* та ферредоксин подібного білка солодкого перцю

pflp, які знаходилися в різних генетичних конструкціях, були отримані подвійні трансформанти, які мали стійкість до ВМЦ та *Erwinia carotovora* (Chan et al, 2005).

Для отримання стійких до широкого спектру патогенів рослин *Phalaenopsis* Wataboushi ‘#6.13’ була проведена генетична трансформація суспензійної культури клітин геном дефензину (*wasabi defensin*), клонованим з японського хрону васабі (*Wasabia japonica*). Дефензини це – цистеїн-багаті поліпептиди розміром 5 кДа, які присутні у багатьох видах рослин і, як вважають, відіграють захисну роль щодо рослинних патогенів: бактерій та грибів. Інтеграція та суперекспресія дефензинів у гетерологічних видах приводила до отримання підвищеної стійкості рослин до патогенів. Для не трансгенних рослин роду *Phalaenopsis* не характерний синтез цієї групи білків. В результаті генетичної трансформації *Phalaenopsis* геном дефензину були отримані високостійкі до *E. carotovora* рослини, які не проявляли симптомів ураження після інокуляції, тоді як контрольні рослини дикого типу гинули протягом тижня. З 15 протестованих клонів трансгенних рослин, лише один мав нижчу стійкість і загинув через 4 тижні після інокуляції патогеном. Оскільки дефензини мають захисну дію проти багатьох патогенів, то автори припускають наявність стійкості в отриманих рослинах і до інших важливих хвороб орхідних, що потребує подальшого тестування (Sjahril et al, 2006).

Для отримання стійких до патогенних грибів гібридних рослин *Phalaenopsis* була проведена біолістична трансформація протокормів орхідеї геном хітинази, виділеним зі стійкого до грибних патогенів гарбуза. Хоча були успішно отримані трансформанти, однозначних результатів при тестуванні стійкості цих рослин до *Fusarium oxysporum* отримано не було. Зокрема, було виявлено лінії з високою активністю фермента та стійкістю до патогена. В той же час деякі лінії з низькою активністю були стійкими, тоді як інші, при високій активності фермента, демонстрували ураження грибом (Umetura, 2007). В іншому дослідженні була зроблена спроба отримати стійкі до широкого кола фітопатогенних грибів рослини *Vanda*, за допомогою генетичної трансформації генами *wheatwin1* та *wheatwin2*, клонованими із зерні-

вок пшениці (Gnasekaran et al, 2014). Ці гени кодуєть PR-4 білки, які здатні інгібувати ріст фітопатогенів як вузькоспецифічних (*Fusarium culmorum*, *F. graminearum*), так і з широким спектром господарів (*Botrytis cinerea*). Припускають, що продукт гена *wheatwin1* здатний накопичуватися позаклітинно та лізувати хітин клітинної стінки грибів. На жаль, у статті не показані результати стійкості отриманих трансформантів до фітопатогенів.

Підвищення стійкості тропічних орхідей до холоду є актуальним завданням для біотехнологів. Так, для *Phalaenopsis amabilis* зниження температури нижче 16 °C може приводити до пошкодження рослин. Генетична трансформація з використанням гена ліпідтранспортного білка *lipid transfer protein (LTP)* приводила до підвищення витривалості рослин до холоду (Qin et al, 2011). Для підвищення холодостійкості рослин, в геном *D. linguella* вводили ген бактеріальної десатурази *des C* (клонувано з *Synechococcus vulcanus*). Завдяки використанню експресійно-репортерної системи *des C::licBM3*, були відібрані лінії з активною експресією цільового гена. Спостерігали зміни складу жирних кислот в листі трансгенних рослин. Аналіз спектра жирних кислот мембранних ліпідів у відібраних лініях показав зменшення вмісту насиченої пальмітинової кислоти та збільшення – С18:3 линоленової кислоти, що підтверджує фізіологічну активність десатурази в клітинах орхідей (Кутра et al, 2013).

Ген цитохрому P450 *cupIIA1* був використаний для генетичної трансформації *D. linguella* як можливий індуктор збільшення біомаси, посилення стійкості до абіотичних стресів та грибів. Експресія трансгена в рослинах була підтверджена за допомогою ЗТ-ПЛР (Rudas et al, 2016).

З метою отримання стійких до стресових факторів рослин проводили генетичну трансформацію *Erycina pusilla*, модельного виду в родині орхідних, геном метіонінсульфоксидредуктази B7 (*MSRB7*). Продукт гена *MSRB7*, клонувано з *A.thaliana*, належить до класу ферментів, які редукують метіонінсульфоксиди білків до метіоніну. Суперекспресія цього гена забезпечує стійкість до хвороб та абіотичних стресів, зокрема оксидативного. Було показано підвищену стійкість отриманих рослин до ме-

тилвіологену, індуктора оксидативного стреса. Рослини T₁ покоління стабільно успадковували цю ознаку (Lee et al, 2015).

Генетична трансформація онцидіума ‘Gower Ramsey’ конструкцією *OgPSY-RNAi* з метою модифікації кольору квіток привела до значних змін у метаболізмі трансгенних рослин (Liu et al, 2014). Використана для генетичної трансформації конструкція, містила інтерферуючу РНК гена фітоенсинтази. Ген фітоенсинтази (*PSY*) є важливим регуляторним ферментом при біосинтезі каротиноїдів. Як показали дослідження, пригнічення активності гена фітоенсинтази змінює експресію багатьох генів, задіяних у метаболічних шляхах біосинтезу ізопреноїдів, включаючи біосинтез каротиноїдів, хлорофілу, гіберелової та абсцизової кислот. Отримані рослини мали дефектний карликовий фенотип, світлозелене забарвлення листя через знижений вміст каротиноїдів та хлорофілів, зменшену кількість гран в хлоропластах, а також знижену стійкість до холодого стресу. Вміст абсцизової та гіберелової кислот знижувався в 4 рази порівняно з контролем (Liu et al, 2014). Таким чином, невдала спроба отримати комерційно значимі зміни в морфології квітки привела до розширення знань про регуляцію та взаємозв'язок між експресією різних генів.

В дослідженні Ding et al, 2013 було показано, що ізольований з *Dendrobium* ‘Chao Praya Smile’ ген *DOSOC1*, ортолог гена *SOC1* з *Arabidopsis*, грає еволюційно консервативну роль при переході до цвітіння в родині орхідних. Дослідниками були отримані трансгенні лінії *Dendrobium*, які експресували цей ген під контролем сильного конститутивного промотора (35SCaMV). Трансгенні рослини переходили до генеративної фази раніше, ніж контрольні рослини дико-го типу, та формували перші видимі квітконоси в умовах *in vitro* на 12–15 тижні культивування, замість 17–24 тижня у контролі. Оскільки в орхідних вегетативна фаза зазвичай досить тривала, визначення генів – ключових регуляторів цвітіння, таких як *DOSOC1*, може дати важливу інформацію, корисну як при традиційному селекційному процесі, так і при генно-інженерних маніпуляціях, з метою прискорення цвітіння (Ding et al, 2013).

Ген *APETALA1 (API)* кодує ключовий транскрипційний фактор MADS-боксу, що визначає

будову квіткових меристем, зокрема розташування та форму квітів. Ортолог *API*, *DOAPI* був клонований з *Dendrobium* 'Chao Praya Smile'. У рослин дендробіума трансформація цим геном пришвидшує закладання квіткових меристем та прискорює цвітіння. За допомогою напівкількісного ЗТ-ПЛР було показано оверекспресію гена *DOAPI* в апексах суцвіть трансгенних рослин порівняно з рослинами дикого типу (Sawettalake et al, 2017).

Генетичну трансформацію геном *PaFT* (*Phalaenopsis amabilis Flowering Locus T*) провели з метою суперекспресії та прискорення переходу фаленопсиса з ювенільного стану до цвітіння (Semiarti et al, 2015). Було показано активацію експресії гена *PaFT* протягом 12 місяців культивування, однак цвітіння не спостерігали.

Для скорочення тривалого ювенільного періоду *Paphiopedilum Maudiae*, його трансформували геном локусу цвітіння, який клонували з цимбідіума *CeFT* (*Cymbidium ensifolium Flowering Locus T*) (Luo et al, 2021). Оскільки отримані трансгенні рослини, належать до виду з тривалим ювенільним періодом, то в даній статті автори не повідомляли про час переходу до генеративної фази.

Оверекспресія антисенсної послідовності гена *DOH1* у трансгенному дендробіумі призводила до фасціації апікальних меристем, розвитку множинних пагонів та раннього цвітіння (Yu et al, 2001). Використання цього гена може становити інтерес для підсилення розмноження та прискорення переходу до цвітіння. Інший ген, експресія якого приводила до збільшення коефіцієнту розмноження орхідей – *AtRKD4*. Ген кодує білок транскрипційного фактору, який експресується на ранніх етапах зиготичного ембріогенезу та індукує ембріогенез з соматичних клітин. Під контролем стероїд-індукованого промотора експресія цього гена протягом короткого періоду приводила до появи здатності у листових експлантів *Phalaenopsis* 'Sogo Vivien' масово утворювати протокорми на зрізах (Mursyanti et al, 2015) та збільшення коефіцієнту розмноження у *Dendrobium phalaenopsis* (Setiari et al, 2018).

Вплив етилену на рослини орхідних приводить до швидкого в'янення їх квітів. Тому зменшення утворення етилену в рослинах може вплинути на цей комерційно-важливий показ-

ник. В роботі Atichart et al (2007) для генетичної трансформації використали антисенсну послідовність гена АЦК-оксидази (*antisense ACC-oxidase*) – фермента, що каталізує конверсію S-аденозилметіоніну в 1-аміноциклопропан-1-карбоксильну кислоту, і, таким чином, бере участь у біосинтезі етилену. На жаль, в роботі не вказано результатів експресії цього гена в трансгенних рослинах *Dendrobium secundum*.

Здатність зрізаної квіткової продукції зберігатися без втрати декоративних якостей дуже важливий показник. Квітки *Oncidium* мають значно меншу тривалість життя після зрізу, ніж у *Phalaenopsis*, що обмежує їх використання у флористиці. З метою подовження тривалості цвітіння було проведено генетичну трансформацію протокормів *Oncidium* 'Sweet Sugar' мутантним геном рецептора етилену *etr1-1*, клонованим з *Arabidopsis*. Етилен, як фітогормон, відіграє важливу роль в утворенні коріння, стійкості до абіотичних стресів та патогенів. Для запобігання плейотропному впливу змінених рецепторів етилену на життєвоважливі процеси в метаболізмі трансформованих рослин, ген *etr1-1* було розташовано під контроль квіткоспецифічного промотора *fbp1*. В зазначеній роботі експресія *etr1-1* в *Oncidium* не була показана, хоча існують повідомлення про успішне функціонування цього гена в гвоздиці та петунії (Raffener et al, 2009).

CRISPR-Cas9 редагування геномів орхідних

Редагування генів шляхом нокауту, заміни, точкової мутації, регуляції роботи, можливість впливу на будь-який визначений локус дає величезні можливості для вивчення функціонування генів та генетичного покращення різноманітних видів рослин (Aroga and Narula, 2017). Особливий інтерес редагування геномів може становити для модифікації лікарських видів орхідних, оскільки редагуючи гени, продукти яких відповідають за певні ланки метаболічних шляхів, можна інгібувати синтез токсичних та отримати нові лікарські сполуки, змінити співвідношення певних метаболітів та їх прекурсорів. Для ефективного розвитку технології редагування генів за допомогою CRISPR-Cas9 систем необхідні суттєві знання з функціональної геноміки. Сиквенування геномів допомагає розширити знання про важливі функціональні

гени. Редагування цих генів матиме практичне значення для отримання цінних вторинних метаболітів, збільшення біомаси або розширення розуміння роботи певних метаболічних шляхів. У випадку лікарських рослин, можливо, виникне потреба в редагуванні не лише окремих генів, а в мультиплексному редагуванні, щоб вплинути на цілий біохімічний ланцюг реакцій (Guo et al, 2022). На сьогоднішній день серед орхідних повністю сиквененовано геноми таких видів, як *Apostasia shenzhenica*, *Dendrobium catenatum* і *Phalaenopsis equestris* (Hsiao et al, 2021). Для низки видів орхідних (*Neuwiedia malipoensis*, *Apostasia shenzhenica*, *Paphiopedilum armeniacum*, *Cypripedium singchii*, *Cymbidium sinense*, *Phalaenopsis equestris*, *Hemipilia forrestii*, *Habenaria delavayi*, *Vanilla shenzhenica*, *Galeola faberi*) описано транскриптомні послідовності, які асоційовані з цвітінням (Hsiao et al, 2021), що дозволяє ефективно розвивати технологію редагування генів.

У *Dendrobium officinale* було проведено агро-бактеріальну трансформацію та редагування 5 генів, пов'язаних з шляхом біосинтезу лігніну: *COUMARATE 3-HYDROXYLASE (C3H)*, *CINNAMATE4-HYDROXYLASE (C4H)*, *4-COUMARATE:COENZYME A LIGASE (4CL)*, *CINNAMOYL COENZYME A REDUCTASE (CCR)*, *IRREGULAR XYLEM5 (IRX)*. У проаналізованих лініях спостерігали заміни, інсерції та делеції. Мутаційний рівень становив: 16,7 % для *C3H*, 20 % для *C4H*, 33,3 % для *4CL*, 33,3 % для *CCR* та 6,7 % для *IRX* (Kui et al, 2017). У іншого виду дендробіума (*D. macrophyllum*) проводили редагування гена *VAR2* (Setiawati et al, 2020). Ген *VAR2 (YELLOW VARIEGATED)* кодує родину пластидних металопротеаз. Нульовий алель цього гена в геномі арабідопсису приводить до появи строкатистості (Chen, et al 2000). У *D. macrophyllum* редагування гена *VAR2* фенотипово проявлялося в появі білих секторів у протокормів, повільнішому рості протокормів, відсутності коренів та блідішому забарвленні листя, порівняно з рослинами дикого типу на відповідних етапах розвитку (Setiawati et al, 2020).

Редагування геному провели також для двох видів фаленопсису *Phalaenopsis equestris* (Tong et al, 2020) та *Ph. amabilis* (Semiarti et al 2020b; Nopitasari et al, 2020). У рослин *Ph.*

equestris редагували гени *MADS*. В роботі було використано дві стратегії редагування геному: три цільових *MADS* сайта в одному векторі та окремі сайти були представлені в різних векторах і трансформацію проводили одночасно сумішшю трьох векторів. У випадку застосування одного вектора, отримували рослини з усіма трьома відредагованими локусами, тоді як при використанні іншої стратегії переважно отримували рослини з одним редагованим сайтом. При використанні другої стратегії відсоток хімеризму отриманих рослин був вищий. Ці результати вказують на те, що множинні sgRNA можуть бути поєднані в бібліотеки та використані для трансформації та створення бібліотеки редагованих рослин (Tong et al, 2020). У *Ph. amabilis* було успішно проведено редагування генів *PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3)* (Semiarti et al, 2020b) та *VAR2* (Nopitasari et al, 2020), які були використані як маркерні гени, зручні для детекції події редагування. Ген фітоендесатурази (*PDS3*) кодує фермент, залучений до біосинтезу каротиноїдів, таким чином мутації гена приводитимуть до хлорофілдефектного фенотипу. Дослідження показали, що CRISPR-Cas9 можна використовувати для отримання мутантів з нульовими алелями генів, що становлять інтерес, у видів з довгим ювенільним періодом, багаторічних або поліплоїдних видах (Tong et al, 2020).

Для успішного впровадження цієї технології для редагування певних видів потрібно розробляти методи доставки в клітину її компонентів, що робить необхідним поєднання успіхів з сиквенування геномів, розробки методів трансформації та регенерації у кожному конкретному випадку.

Застосування генів представників-*Orchidaceae* у генетичній інженерії інших родин

Представники родини орхідних не лише є об'єктом для введення гетерологічних генів, а й джерелом для клонування нових, які можуть бути використані для генетичної трансформації інших господарсько-цінних видів рослин.

Гастродіанін-подібні білки (gastrodianin-like proteins – GLIPs) було виділено як новий клас протигрибних білків, які можуть надавати стійкість до широкого спектру патогенів. Ген *GAFP-1*, що кодує білок гастродіанін з про-

тигрибною активністю (*Gastrodia anti-fungal protein GFP*), було клоновано з орхідеї *Gastrodia elata* і використано для генетичної трансформації тютюну (Cox et al, 2006) та сливи (Nagel et al, 2008). В безхлорофільної *G. elata*, життєвий цикл якої залежить від симбіозу з опеньком (*Armillaria mellea*), грибні гіфи потрапляють лише до старих псевдобульб і не пошкоджують нові, ті, що формуються. З останніх і було виділено гастродіанін, гомологічний мономерним маннозозв'язуючим білкам інших орхідних (Wang et al, 2001). Протигрибна активність цього білка була підтверджена *in vitro*, крім того білок має структурну подібність до інсектицидних лектинів. Трансгенні рослини тютюну мали більшу життєздатність та менший прояв симптомів захворювань при ураженні такими грибними патогенами, як *Rhizoctonia solani* та *Phytophthora nicotianae*, мали меншу кількість галів при зараженні галовою нематодою *Meloidogyne incognita*. В той же час, не було помічено відмінності між чутливістю рослин дикого типу та трансгенних рослин до бактерії *Ralstonia solanacearum*. Подібні результати були отримані при зараженні трансгенних, за цим же геном, ліній сливи (*Prunus domestica*) збудником кореневої гнилі *Phytophthora cinnamomi* та нематодою *M. incognita*. Наведені дані показують, що ген *GAFP-1* може бути корисним для створення сільськогосподарських культур, стійких до корневих захворювань, викликаних нематодами та грибами.

З *Dendrobium officinale* було клоновано ген глюкозо-4-епімерази *DoUGE*, фермента, який локалізований в цитоплазмі та каталізує оборотне перетворення УДФ-глюкози в УДФ-галактозу. Експресія гена високоспецифічна і проходить у тканинах стебла. Найвища експресія цього гена відбувається на S3 (середній генеративній) стадії розвитку при переході рослин до цвітіння. Існує позитивна кореляція між рівнем водорозчинних полісахаридів та рівнем експресії цього гена. Рослини арабідопсису, отримані в результаті генетичної трансформації геном *DoUGE*, містили на 34,84–44,78 % більше водорозчинних полісахаридів, мали на 26,24–32,79 % вищу активність глюкозо-4-епімерази та вміст хлорофілу в 1,19–1,31 раз вищий, ніж у рослин дикого типу. Середній вміст глюкози та галактози підвищувався на 50,84 та

34,33 % відповідно. Отримані рослини арабідопсису виявилися стійкішими за контрольні до сольового (150 мМ NaCl) та осмотичного (200 мМ маннітол) стресів, що робить перспективним використання цього гена для генетичної трансформації сільськогосподарських, лікарських та декоративних видів рослин. Дослідження демонструють зв'язок *DoUGE* з накопиченням водорозчинних полісахаридів впродовж онтогенезу та підвищеною стійкістю до сольового та осмотичного стресів (Yu et al, 2017).

Інший ген – *DoMYC2*, клонований з *D. officinale*, бере участь в процесі синтезу терпенових індольних алкалоїдів, шляхом регуляції мевалонового шляху біосинтезу. Було показано, що оверекспресія цього гена в арабідопсисі підвищувала стійкість до солей та прискорювала перехід до цвітіння (Zhu et al, 2017).

З *Phalaenopsis* 'TS444' [(‘New Eagle’ × ‘Pinlong Cinderella’) × ‘Dtps. Taisuco Red’] було отримано кДНК гена флавоноїд-3',5'-гідроксилази представника родини цитохрому P450, що грає ключову роль у біосинтезі антоціанінів, які надають блакитний колір квітам. При наявності флавоноїд-3',5'-гідроксилази можливе отримання 3',5'-гідроксильованого блакитного дельфінідину чи пурпурного мальвідину. Для комерційного квітництва останні становлять значний інтерес для модифікації фенотипу різних видів рослин (троянд, гвоздик та хризантем), яким в природі не притаманне подібне забарвлення (Su and Hsu, 2003).

Висновки

На сьогоднішній день генетична інженерія досягла значних успіхів у змінненні геномів орхідних. Проте, розширення переліку застосованих генів та кількості модифікованих видів залишається актуальним і на майбутнє. Отримання рутинних протоколів генетичної трансформації часто і досі є тим «вузьким місцем», яке обмежує використання клонованих генів для введення в геноми орхідей та рослин інших видів. Модифікація геномів орхідних за допомогою генетичної трансформації та/або редагування CRISPR-Cas дозволить пришвидшити розмноження, скоротити час до переходу з ювенільного до дорослого стану, покращити їх стійкість до абіотичних та біотичних стресів.

сів, змінити запах, колір та тривалість цвітіння квітів, а у випадку лікарських видів, ще і змінювати метаболізм рослин для збільшення накопичення цінних вторинних метаболітів та для можливого біосинтезу нових сполук.

Фінансування. Робота фінансувалася в межах фундаментальної тематики відділу генетичної інженерії ІКБГІ: III-1-20 «Цілеспрямовані зміни геному та плейотропні ефекти у генетично трансформованих рослинних системах».

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів.

MODERN APPROACHES TO GENETIC ENGINEERING IN THE ORCHIDACEAE FAMILY

O. Ovcharenko*, V. Rudas

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, 148, Zabolotnoho str., Kyiv, Ukraine 03143

E-mail: ovcharenkoo77@gmail.com

Orchids are one the most widespread groups of flowering plants with a wide geographical range and species diversity. A number of tropical and subtropical species are used as decorative, medicinal and edible. The increased demand for plant material, while a large number of species are under threat of extinction in nature, makes growing of orchids in culture relevant. Traditionally, new interesting forms have been obtained through hybridization and selection, which require considerable time. Not all requirements for elite varieties can be solved by traditional breeding methods. The application of the achievements of modern molecular biology significantly expands the possibilities of breeders. The development of genetic engineering methods allows introducing both new heterologous genes to orchids and editing their own genes, which can significantly speed up and increase the success of the traditional selection process. Members of the Orchidaceae family can be used not only for introduction of valuable heterologous genes, but also as source of unique genes for the improvement of cultivated species of other families. The review examines the current state and prospects of genetic engineering of orchids, their use as recipients and donors of genes for genetic transformation.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, et al (1996) Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Cult Lett* 13:265–272. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology1984.13.265>.
- Arora L and Narula A (2017) Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci* 8:1932. <https://doi.org/10.3389/fpls.201701932>.
- Atichart P, Bunnag S and Theerakulpisut (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (BL) Lindl with antisense ACC oxidase. *Asian J Plant Sci* 6(7):1065–1071. <https://doi.org/10.3923/ajps.2007.1065.1071>.
- Belarmino MM, Mii M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep* 19:435–442. <https://doi.org/10.1007/s002990050752>.
- Chai D, Lee SM, Ng JH, Yu H (2007a) L-methionine sulfoximine as a novel selection agent for genetic transformation of orchids. *J Biotechnol* 131:466–472. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.951>.
- Chai D, Yu H (2007b) Recent advances in transgenic orchid production. *Orchid Science and Biotechnology* (Global Science Books) 1(2):34–39
- Chai ML, Xu CJ, Senthil KK et al (2002) Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Sci Hortic* 96:213–224. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00084-5).
- Chan YL, Lin KH, Liao LJ et al (2005) Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgenic Res* 14:279–288. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-0106-5>.
- Chen THH, Han K-H, Huang P-L (2003) Genetic transformation of orchids. pp. 197–221. In Singh RP, Jaiwal PK *Plant genetic engineering (Improvement of commercial plants)* Sci Tech Publishing LLC, USA.
- Chen J, Wang L, Chen J et al (2018) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the important medicinal plant *Dendrobium catenatum* Lindl. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 54:228–239. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9903-4>.
- Chen L, Kawai H, Oku H et al (2006) Introduction of *Odontoglossum ringspot virus* coat protein gene into *Cymbidium niveo-marginatum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to produce transgenic plants. *J Japan Soc Hort Sci* 75(3):249–255. <https://doi.org/10.2503/jjshs.75.249>.
- Chen M, Choi Y, Voytas DF et al (2000) Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant J* 22:303–313. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00738.x>.
- Chen TY, Pai H, Hou LY et al (2019) Dual resistance of transgenic plants against *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. *Sci Rep*. Jul 15;9(1):10230. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46695-7>.
- Chia TF, Chan YS, Chua NH (1994) The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. *Plant J* 6:441–446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.06030441.x>.

- Chin DP, Mishiba K, Mii M (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. *Plant Cell Rep* 26:735–743. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0284-5>.
- Cox KD, Layne DR, Scorza R et al (2006) *Gastrodia* anti-fungal protein from the orchid *Gastrodia elata* confers disease resistance to root pathogens in transgenic tobacco. *Planta* 224:1373–1383. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0322-0>.
- Ding L, Wang Y and Yu H (2013) Overexpression of *DOSOC1*, an ortholog of *Arabidopsis SOC1*, promotes flowering in the orchid *Dendrobium Chao Parya Smile*. *Plant Cell Physiol* 54(4):595–608. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct026>.
- Gnasekaran P, Antony JJJ, Uddain J et al (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of the recalcitrant *Vanda Kasem's Delight* orchid with higher efficiency. *Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal* 2014, Article ID 583934, 10 p. <https://doi.org/10.1155/2014/583934>.
- Gnasekaran P, Subramaniam S (2015) Mapping of the interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and *Vanda Kasem's Delight* orchid protocorm-like bodies *Indian J Microbiol* 55(3):285–291. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0519-7>.
- Griesbach RJ (1994) An improved method for transforming plants through electrophoresis *Plant Sci* 102: 81–89. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)03936-4](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)03936-4).
- Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90223-8).
- Guo M, Chen H, Dong S et al (2022) CRISPR-Cas gene editing technology and its application prospect in medicinal plants. *Chin Med* 17: 33. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00584-w>.
- Hsiao YY, Fu CH, Ho SY et al (2021) OrchidBase 4.0: a database for orchid genomics and molecular biology. *BMC Plant Biol* 21:371. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03140-0>.
- Hsing HX, Lin YJ, Tong ChG et al (2016) Efficient and heritable transformation of *Phalaenopsis* orchids. *Bot Stud* 57:30. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0146-6>.
- Julkifle AL, Rathinam X, Sinniah UR et al (2010) Optimisation of transient green fluorescent protein (GFP) gene expression in *Phalaenopsis violacea* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. *Aust J Basic Appl Sci* 4:3424–3432.
- Kasulo V, Mwabumba L and Cry M (2009) A review of edible orchids in Malawi. *J Hort Forestry* 1(7):133–139. <http://www.academicjournals.org/jhf>.
- Knapp JE, Kausch AP, Chandlee JM (2000) Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep* 19:893–898. <https://doi.org/10.1007/s002990000202>.
- Koh KW, Lu H-Ch, Chan M-T (2014) Virus resistance in orchids. *Plant Science* 228:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.015>.
- Kuehnle AR and Sugii N (1992) Transformation of *Dendrobium* orchid using particle gun bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11:484–488. <https://doi.org/10.1007/BF00232696>.
- Kui L, Chen H, Zhang W et al (2017) Building a Genetic Manipulation Tool Box for Orchid Biology: Identification of Constitutive Promoters and Application of CRISPR/Cas9 in the Orchid, *Dendrobium officinale*. *Front Plant Sci* 7:2036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02036>.
- Kyrpa TM, Rudas VA, Ovcharenko OA, et al. (2013) Heterologous expression of $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase of cyanobacteria in orchid *Dendrobium linguella* RCHB. F. Factors of experimental evolution of organisms 12:244–249. <http://utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/article/view/80>.
- Lee Sh, Li Ch, Liao Ch et al (2015) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation procedure for the experimental model orchid *Erycina pusilla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 120:211–220. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0596-z>.
- Li CW and Chan MT (2018) Recent Protocols on Genetic Transformation of Orchid Species. In: Lee, YI., Yeung, ET. (eds) *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_20.
- Liao LJ, Pan IC, Chan YL et al (2004) Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium Mosaic Virus* is a manifestation of RNA-mediated resistance. *Mol Breed* 13:229–242. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000022527.68551.30>.
- Liao CH, You SJ, Prasad V et al (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep* 21:993–998. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0614-9>.
- Liu J-X, Chiou Ch-Y, Shen Ch-H et al (2014) RNA interference-based gene silencing of *phytoene synthase* impairs growth, carotenoids, and plastid phenotype in *Oncidium* hybrid orchid. *SpringerPlus* 3:478. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-478>.
- Luo B-X, Zhang L, Zheng F et al (2021) Ovule development and in planta transformation of *Paphiopedilum Maudiae* by *Agrobacterium*-mediated ovary-injection. *Int J Mol Sci* 22:84. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22010084>.

- Malabadi RB, Nataraja K (2007) Genetic transformation of *Vanilla planifolia* by *Agrobacterium tumefaciens* using shoot tip sections. *Bot Res J* 2:86–94. <https://doi.org/10.3923/rjb.2007.86.94>.
- Men S, Ming X, Liu R et al (2003a) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:63–71. <https://doi.org/10.1023/A:1024627917470>.
- Men S., X. Ming, Y. Wang et al (2003b) Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep* 21:592–598. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0559-4>.
- Mishiba K, Chin DP, Mii M (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep* 24:297–303. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0938-8>.
- Mudalige RG and Kuehnle AR (2004) Orchid biotechnology in production and improvement. *Hort Science* 39(1):11–17. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.1.11>.
- Mursyanti E, Purwanto A, Moeljopawiro S, et al (2015) Induction of somatic embryogenesis through overexpression of *ATRKD4* genes in *Phalaenopsis* “Sogo Vivien” Indonesia *J Biotechnol* 20(1):42–53. <http://doi.org/10.22146/ijbiotech.15276>.
- Nagel AK, Schnabel G, Petri C, et al (2008) Generation and characterization of transgenic plum lines expressing the *Gastrodia* antifungal protein. *Hort science* 43(5):1514–1521. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.5.1514>.
- Niyomtham K, Bhinija K, Huehne PS (2018) A direct gene transferring system for *Oncidium* orchids, a difficult crop for genetic transformation. *Agric Nat Res* 52(5):424–429. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.006>.
- Nopitasari S, Setiawati Y, Lawrie MD (2020) Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 for *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume genome editing system. *AIP Conference Proceedings* 2260, 060014 <https://doi.org/10.1063/5.0015868>.
- Phlaetita W, Chin DP, Otanga NV et al (2015) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* orchid using protocorms as a target material. *Plant Biotechnol* 32:1–5. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.0804a>.
- Phlaetita W., Chin DP, Tokuhara K et al (2015) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Dendrobium* Formidible ‘Ugusu’ *Plant Biotechnol* 32:225–231. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.0619a>.
- Qin X, Liu Y, Mao S et al (2011) Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance. *Euphytica* 177:33–43. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0246-4>.
- Raffener B, Serek M, Winkelmann T (2009) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:125–134. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9545-7>.
- Ratheesh ST, Bhat AI (2011) Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from protocorm like bodies of vanilla using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Biochem Biotechnol* 20(2):262–269. <https://doi.org/10.1007/s13562-011-0057-2>.
- Rudas VA, Markovskui OV, Schinkarchuk MV, et al. (2016) Production of transgenic orchid *Dendrobium linguella* RCHB. F. plants, carrying *bar* gene and *cyp11a1* gene of cytochrome p450scc. Factors of experimental evolution of organisms 19:185–187. <http://utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/article/view/662>.
- Sastry KS, Mandal B, Hammond J et al (2019) *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids*. Springer, New Delhi Springer Nature India Private Limited, 2936 p. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3912-3>.
- Sawettalake N, Bunnag S, Wang Y et al (2017) *DOAPI* Promotes flowering in the orchid *Dendrobium* Chao Praya Smile. *Front Plant Sci* 23;8:400. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00400>.
- Semiarti E, Indrianto A, Purwanto A et al (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant* –272. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.265>.
- Semiarti E, Indrianto A, Purwanto A et al (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of Indonesian orchids for micropropagation. In (Ed.), *Genetic Transformation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/24997>
- Semiarti E, Mercuriani IS, Rizal R, et al (2015) Overexpression of *PaFT* gene in the wild orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume *AIP Conference Proceedings* 1677, 090005. <https://doi.org/10.1063/1.4930750>.
- Semiarti E (2018) Orchid biotechnology for Indonesian orchids conservation and industry *AIP Conference Proceedings* 2002, 020022(2018). <https://doi.org/10.1063/1.5050118>.
- Semiarti E, Purwanto A, Puspita Sari I (2020a). Biotechnology approaches on characterization, mass propagation, and breeding of Indonesian orchids *Dendrobium lineale* (Rolfe.) and *Vanda tricolor* (Lindl.) with its phytochemistry. In: Merillon, JM., Kodja, H. (eds) *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_12-1.

- Semiarti E, Nopitasari S, Setiawati Y et al (2020b) Application of CRISPR/Cas9 genome editing system for molecular breeding of orchids. *Indones J Biotechnol* 25(1):61–68. Application of CRISPR/Cas9 genome editing system for molecular breeding of orchids | Semiarti | *Indones J Biotechnol* (ugm.ac.id).
- Setiari N, Purwantoro A, Moeljopawiro S, et al (2018) Micropropagation of *Dendrobium phalaenopsis* Orchid Through Overexpression of Embryo Gene *AtRKD4*. *AGRIVITA. J Agric Sci* 40(2):284–294. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v40i2.1690>.
- Setiawati Y, Nopitasari S, Lawrie MD et al (2020) *Agrobacterium*-mediated transformation facilitates the CRISPR/Cas9 genome editing system in *Dendrobium macrophyllum* A. Rich orchid. *AIP Conference Proceedings* 2260, 060016. <https://doi.org/10.1063/5.0016200>.
- Shrestha BR, Chin DP, Tokuhara K et al (2007) Efficient production of transgenic plants of *Vanda* through sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies. *Plant Biotechnol* 24:429–434. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.429>.
- Sjahril R, Mii M (2006) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* using meropenem, a novel antibiotic to eliminate *Agrobacterium*. *J Hort Sci Biotech* 81:458–464. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512088>.
- Sjahril R, Chin D, Khan R, et al (2006) Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defense gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotechnol* 23:191–194. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.191>.
- Stillwell N, McCafferty H, Zhu YJ et al (2013) Characterization of *Brassolaeliocattleya* Raye Holmes ‘Mendenhall’ – putatively transformed for resistance to *Cymbidium mosaic virus*. *Lankesteriana Inter Orchidol* 13(1–2):153–154. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11632>.
- Su V and Hsu B (2003) Cloning and expression of a putative cytochrome *P450* gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnol Letters* 25:1933–1939. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.000003989.19657.53>.
- Suwanaketchanatit C, Piluek J, Peyachoknagul S et al (2007) High efficiency of stable genetic transformation in *Dendrobium* via microprojectile bombardment. *Biologia plantarum* 51(4):720–727. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0148-z>.
- Teixeira da Silva JA, Chin DP, Van PT, Mii M (2011) Transgenic orchids. *Scientia Horticulturae* 130(4):73–680.
- Teixeira da Silva JA (2013) Orchids: Advances in Tissue Culture, Genetics, Phytochemistry and Transgenic Biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 7(1):1–52.
- Teixeira da Silva JA, Dobránszki J, Cardoso JC et al (2016) Methods for genetic transformation in *Dendrobium*. *Plant Cell Rep* 35:483–504. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1917-3>.
- Thiruvengadam M, Hsu WH and Yang CH (2011) Phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic orchid plants (*Oncidium Gower Ramsey*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:239–246. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9827-0>.
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R et al (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *The EMBO J* 6: 2519–2523 <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02538.x>.
- Tong C-G, Wu F-H, Yuan Y-H et al (2020) High-efficiency CRISPR /Cas-based editing of *Phalaenopsis* orchid MADS genes. *Plant Biotechnol J* 18: 889–891. <https://doi.org/10.1111/pbi.13264>.
- Umamura F (2007) Expression analysis of *Phalaenopsis* orchid introduced disease resistance gene *Chitinase*. Master’s course of agro-environmental studies. Graduate school of Obihiro University.
- Utami ESW, Hariyanto S and Manuhara YSW (2018) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm: An important medicinal orchid *J Genet Engineer Biotechnol* 16: 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.002>.
- Wang X, Bauw G, Van Damme EJ, et al (2001). Gastrodin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with antifungal properties. *Plant J.* 25:651–661. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00999.x>.
- Yang J, Lee H-J, Shin DH, et al (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 18:978–984. <https://doi.org/10.1007/s002990050694>.
- Yee N, Abdullah JO, Mahmood M, et al (2008) Co-transfer of *gfp*, *CHS* and *hptII* genes into *Oncidium Sharry Baby* PLB using the biolistic gun. *African J Biotechnol* 7(15):2605–2617. <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- You S-J, Liao Ch-H, Huang H-En, et al (2003) *Sweet pep-per ferredoxin-like protein (pflp)* gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta* 217:60–65. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0970-7>.
- Yu H, Yang SH and Goh CJ (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class I knox gene *DOH1*. *Plant Cell Rep* 20:301–305. <https://doi.org/10.1007/s002990100334>.
- Yu Z, He C, Teixeira da Silva JA, et al. (2017) Molecular

cloning and functional analysis of *DoUGE* related to water-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale* with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 131:579–599. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1308-2>.

Zhang L, Chin DP, Mii M (2010) *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cattleya*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:41–47. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9751-3>.

Zhu Y, Meng C, Zhu L *et al* (2017) Cloning and characterization of *DoMYC2* from *Dendrobium officinale*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129, 533–54. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1198-3>.

Надійшла в редакцію 05.12.22
Після доопрацювання 16.12.22
Прийнята до друку 18.03.23