

<https://doi.org/10.15407/frg2022.04.311>

УДК 581.132:633.11

## **AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПЕРСПЕКТИВНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ГЕНА ОРНІТИН- $\delta$ -АМІНОТРАНСФЕРАЗИ**

**О.В. ДУБРОВНА, Л.В. СЛИВКА**

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: dubrovny@ukr.net*

Орнітин- $\delta$ -амінотрансфераза (ОАТ) є важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, що каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну та шлях біосинтезу поліамінів. Введення екзогенного гена *oat* в геном рослин є одним з перспективних методів створення стійких до абіотичних стресів генотипів пшениці. Метою нашої роботи була оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання генетично модифікованих рослин з гетерологічним геном орнітин- $\delta$ -амінотрансферази. Досліджено основні параметри протоколу трансформації, зокрема вплив оптичної щільності агробактеріальної суспензії клітин, концентрації антибіотика цефотаксиму, тривалості кокультивування на частоту отримання канаміциностійких регенерантів з калюсних культур апікального походження. Оптимізовано регенераційне середовище, яке дає змогу прискорити процес отримання генетично модифікованих рослин-регенерантів пшениці та збільшити їх кількість, що забезпечує скорочення біотехнологічного процесу і зменшення матеріальних витрат для його виконання. Шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці отримано рослини-регенеранти, у геномі яких виявлено повне вбудовування генетичної конструкції, яка містить трансгени *oat* та *nptII*. Трансгенна природа всіх отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *oat* та *nptII*. Частота трансформації для досліджених генотипів становила 0,75–2,5 %.

*Ключові слова:* *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, калюсні культури, ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази.

Пшениця є однією з основних продовольчих культур, яка вирощується на більш як 17 % орних земель і споживається близько 40 % населення світу [1]. Поширеність цієї культури зумовлена її високою біологічною пластичністю щодо екологічних умов, а також високою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів. Незважаючи на загалом зростаючу тенденцію виробництва пшениці у світі, кліматичні зміни, що призводять до значних температурних пе-

Цитування: Дубровна О.В., Сливка Л.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація перспективних генотипів озимої пшениці за використання гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази. *Фізіологія рослин і генетика*. 2022. 54, № 4. С. 311–327. <https://doi.org/10.15407/frg2022.04.311>

репадів, непередбачуваних опадів або посух та появи нових рас патогенів і шкідників, значно позначаються на її врожайності. Для запобігання негативного впливу змін кліматичних умов на продуктивність озимої пшениці необхідне створення високоврожайних сортів з високим адаптивним потенціалом, зокрема стійких до посухи.

Сучасним напрямом створення посухостійких сортів пшениці є застосування методів генетичної інженерії. Останнім часом інтенсивно почали розроблятися новітні молекулярні біотехнології з використанням різноманітних стратегій, у тому числі спрямованих на отримання стійких генотипів шляхом інтеграції у геном культурних рослин рекомбінантних молекул ДНК, здатних на генетичному рівні контролювати процеси формування стійкості [2, 3]. Для генетичного поліпшення пшениці залучаються біотехнології, пов'язані із використанням генів, що контролюють метаболізм «сумісних» осмотично активних речовин — органічних молекул, здатних у значних концентраціях накопичуватися в клітинах рослин за умов стресу і не чинити токсичної дії на процеси їх росту і диференціації. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, досягнутий в останні десятиріччя в галузі фундаментальних досліджень структурно-функціональної геноміки, теоретичних і практичних аспектів генетичної трансформації злаків [4].

Одним із найбільш перспективних підходів створення посухостійких генотипів пшениці є ідентифікація та використання генів, що контролюють синтез та катаболізм проліну [5–8]. Крім добре відомої функції як сумісного осмоліту, за дії стресорів він виконує цілу низку інших взаємопов'язаних функцій: мембранопротекторну, шаперонну, антиоксидантну, а також бере участь у регуляції експресії деяких генів [9, 10], є джерелом енергії, азоту та вуглецю [11]. Додатковий синтез цієї амінокислоти підвищує загальну стійкість рослин до абіотичних стресів. Для акумуляції вільного проліну основна увага приділяється генам, що контролюють ензими його синтезу та деградації. Використовують додаткове введення копій κДНК, відповідальних за його синтез (P5CS або δ-OAT у сенсовій орієнтації) або часткову супресію ендегенних генів проліндегідрогенази (ProDH), які відповідають за його деградацію [12–16].

Ген орнітин-δ-амінотрансферази кодує фермент OAT (EC 2.6.1.13), що каталізує перенесення дельта-аміногрупи орнітину на альфа-кетоглутарат з утворенням піролін-5-карбоксилату (П5К) та глутамату [17, 18]. Ця реакція є частиною системи взаємоперетворень таких амінокислот як аргінін, орнітин, глутамат і пролін. Метаболізм цих амінокислот пов'язаний з фіксацією, запасанням і ремобілізацією азоту, формуванням і проростанням насіння, стійкістю до різних абіотичних стресорів, регуляцією процесів росту та розвитку [19–23]. Отже, орнітин-δ-амінотрансфераза є важливим регулятором клітинного метаболізму, оскільки реакція, яка каталізується цим ферментом, пов'язує кілька біохімічних систем: цикл сечовини, цикл накопичення і деградації проліну та шлях біосинтезу поліамінів.

Згідно з літературними даними, ген орнітин-δ-амінотрансферази (*oat*) бере участь у відповіді на стрес, проте його конкретна біологічна

роль ще до кінця не встановлена і є предметом обговорення [18]. Тривалий час вважалося, що орнітин- $\delta$ -амінотрансфераза бере участь у синтезі проліну при стресі [24]. Зараз є чимало відомостей, що фермент ОАТ функціонує в альтернативному шляху метаболізму проліну в мітохондріях за стресових умов [17]. Виявлена нещодавно у лійній гексаплоїдній пшениці взаємодія генів AtOAT з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу проліну та катаболізмом аргініну, підтверджує, що вони беруть участь у синтезі проліну та ремобілізації азоту [5]. Крім цього, орнітин є проміжною сполукою у біосинтезі аргініну, де шлях розходиться з утворенням проліну та поліамінів, що залучені у дуже багато функцій рослин, у тому числі пов'язаних з адаптацією до дії стресорів [23, 25].

Припущення, що ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази пов'язаний з синтезом проліну підтверджують результати, отримані на генетично модифікованих рослинах. Зокрема, рослини рису з підвищеною експресією гена *oat* накопичують більше проліну, ніж нетрансгенні рослини [26]. Також надекспресія цього гена підвищувала рівень стійкості трансгенних рослин тютюну до посухи і засолення [27]. Проте той факт, що як за оптимальних умов, так і умов стресу мутантні рослини арабідопсису, дефіцитні за ОАТ, мали такий самий рівень проліну, як і контрольні рослини [28] може свідчити про те, що ОАТ безпосередньо не впливає на накопичення цієї амінокислоти, спричинене стресом [28, 29].

Хоча дослідження із введення екзогенного гена *oat* в геном різних злакових культур (рис, кукурудза, сорго) є досить успішними, на пшениці вони розпочалися нещодавно і роботи з цього питання поодинокі [30–32]. Трансгенні рослини пшениці з надекспресією AtOAT також продемонстрували підвищену толерантність до водного дефіциту та засолення за рахунок збільшення накопичення проліну [5]. Автори показали, що власні TaOAT гени брали участь у синтезі цієї амінокислоти та ремобілізації азоту, оскільки вони взаємодіяли з генами, пов'язаними з ферментами біосинтезу проліну та катаболізмом аргініну. Крім того, робиться висновок, що експресія AtOAT підвищує посухостійкість пшениці та толерантність до засолення не лише внаслідок підвищення біосинтезу проліну, а й внаслідок регуляції антиоксидантної системи. Сучасні дослідження також виявили у трансгенних рослин пшениці з надекспресією гена AtOAT активацію глутаматного шляху за дії водного і сольового стресу та підвищену експресію генів TaP5CS1 і TaP5CR [5].

Використання біологічного способу доставки ДНК в рослинні клітини за допомогою *Agrobacterium* має певні переваги: дає змогу вводити порівняно велику генетичну конструкцію, забезпечує включення в геном реципієнта обмеженого числа копій чужорідного гена з високою ефективністю і призводить до мінімальних порушень у його послідовності, що зазвичай відбувається за фізичного способу доставки ДНК, і потенційно зменшує кількість проблем, пов'язаних з косупресією і нестабільністю трансгена [33]. Проте розробка відповідного методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, тому що важливо розуміти роль усіх чинників, які

впливають на доставку Т-ДНК в клітини, з яких може бути регенована рослина. Визначено декілька чинників, які впливають на ефективність перенесення Т-ДНК: первинні експлантати; штами *Agrobacterium*; векторні плазміди; щільність суспензії клітин *Agrobacterium*; склад поживних середовищ; умови трансформації, такі як температура і час передкультивування, інокуляції та кокультивування; наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів за інокуляції та кокультивування; антибіотики або селективні маркери тощо [34–36].

У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримання генетично модифікованих рослин з гетерологічним геном орнітин- $\delta$ -амінотрансферази.

### Методика

У дослідженнях використовували 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (УК 065; УК 095/17; УК 209h; УК 322/17). Для трансформації брали калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [37]. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили з використанням штаму AGLO, що містить бінарний вектор pBi-OAT з цільовим геном орнітин- $\delta$ -амінотрансферази *Medicago truncatula* та селективний — неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*.

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували за культивування на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л. Для кокультивування використовували суспензію агробактерії оптичною щільністю  $OD_{600} = 0,1–0,5$  од. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 20 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (близько 30 шт.) на поживне середовище для кокультивування [38]. Кокультивування тривало 1–5 діб. Подальшу елімінацію агробактерії проводили за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 200–700 мг/л. В якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 100 мг/л. Культивування калюсів проводили за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду. Кожні 10 діб пасажували калюси на свіже регенераційне середовище. Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на поживне середовище для вкорінення. Вкорінення тривало 3–4 тижні. Рослини з достатньо розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в горщики з ґрунтом. Канаміциностійкими вважали регенеранти, що утворились за дії селективного чинника та зберігали зелене забарвлення.

Молекулярно-генетичний аналіз рослин здійснювали ПЛР-методом. Екстракцію ДНК із листків рослин проводили з використанням комплекту реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали на спектрофотометрі. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf. Реакцій-

ні суміші включали: специфічні праймери, 2 мкл буфера для ПЛР 10×DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату (Thermo Fisher Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Наявність гена *oat* визначали з використанням праймерів 5'-CAGTGCCCAACAATT-ACCATCC-3' (RTF) та 5'-CGAATTCTTCCCAATCACAAGCCA-3' (RTR). Очікувана довжина амплікону становить 706 пн. Також визначали наявність гена *nptII* з використанням праймерів 5'-AGGCTATTTCGGSTATGA-CTG-3' (F) та 5'-CAAGCTCTTCAGCAA-TATC-ACG-3' (R). Очікувана довжина амплікона становить 700 пн.

### Результати і обговорення

Тип експлантату є одним з основних чинників за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці, оскільки утворення морфогенного калюсу та індукція пагонів відбувається з тканин з високою регенераційною здатністю і активним поділом клітин. Регенерація в культурі *in vitro* є одним з найважливіших ключових пунктів у протоколах *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці, що значною мірою визначає саме тип експлантату.

В якості вихідних експлантатів ми використовували апікальні меристеми пагонів — один з найперспективніших типів експлантатів для злакових культур [39], оскільки його перевагою є подолання генотипних особливостей рослин, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Нами показано, що всі досліджувані генотипи у культурі апікальних меристем пагонів характеризуються високою здатністю до утворення калюсу, яка варіює від 91 до 100 % (табл. 1). Початок калюсогенезу в усіх досліджених форм спостерігали вже на другу—третю добу культивування. Утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції. Після перенесення на світло через 10—16 діб культивування було виявлено два типи калюсу, які різнилися за морфофізіологічними властивостями: морфогенний калюс — щільний, жовтуватий, глобулярний — виявився здатним утворювати пагони та корені на середовищі для регенерації і неморфогенний калюс — пухкий, водянистий, прозорий.

Після перенесення калюсів на світло (через 2 тижні вирощування) на частині з них спостерігали появу щільних зелених ділянок. Такі калюси ми відносили до морфогенного типу. При подальшому культивуванні частина з них формувала пагони. Усі вивчені генотипи озимої пшениці були здатні утворювати морфогенний калюс, але з різною частотою. Найбільша частота його утворення виявлена у генотипу УК 322/17 (87,8 %), а найменша — в УК 065. Після перенесення калюсів на регенераційне середовище (МС-31), яке додатково містило 1 мг/л БАП, спостерігали утворення щільних зелених або світло-жовтих глобулярних ділянок. За подальшого культивування на зелених ділянках відзначено інтенсивний ризогенез, тоді як на глобулярних ділянках утворювались пагони. Формування соматичних

ТАБЛИЦЯ 1. Частота морфогенезу в культурі апікальних меристем пагонів нових перспективних генотипів озимої пшениці

Генотип	Кількість отриманих калюсів, %	Кількість морфогенних калюсів, %	Частота регенерації пагонів, %
УК 065	91,3±2,2	66,9±3,7	30,0±3,6
УК 095/17	94,8±2,0	86,1±2,7	41,4±3,8
УК 209h	98,8±0,9	86,3±2,7	43,1±3,9
УК 322/17	100,0	87,8±3,3	47,9±5,0

зародків спостерігали на 5—10-ту добу культивування на регенераційному середовищі. Важливо наголосити, що соматичний ембріогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки у даному випадку рослина формується із зародка, що має зачатки всіх органів. Максимальна частота утворення соматичних зародків була на 20—25-ту добу культивування.

Регенерація пагонів відбувалась у всіх досліджених генотипів, проте серед них виявлено істотні відмінності за здатністю до регенерації. Найбільшою частотою утворення пагонів характеризувався УК 322/17, а найменшою — УК 065. У наших дослідженнях виявлено, що з одного калюсу могло утворюватися від 1 до 5 пагонів.

Ми проаналізували різну щільність суспензії клітин агробактерії для проведення генетичної трансформації у діапазоні від 0,1 до 0,5 опт. од., оскільки при збільшенні значення оптичної щільності спостерігається надмірний ріст *A. tumefaciens*, у результаті чого відбувається загибель експлантатів. Для різних генотипів найефективнішим було використання бактеріальної суспензії клітин оптичною щільністю 0,2—0,3 опт. од., проте вихід канаміциностійких регенерантів не перевищував 3 % (рис. 1).

При використанні бактеріальної суспензії клітин щільністю 0,2—0,3 опт.од. в подальшому майже у 100 % калюсів вдалося провести повну елімінацію агробактерії та отримати порівняно високу кількість регенерантів. Вища концентрація (понад 0,3 опт. од.) клітин бактерій в середовищі спричиняла появу некротичних плям. В такому разі доводилось зменшувати тривалість кокультивування, що було пов'язано з ускладненнями під час елімінації агробактерії. Також знижувалась імовірність вбудовування Т-ДНК.

Значною мірою на вбудовування Т-ДНК впливала тривалість спільного культивування калюсів з агробактерією. Для різних генотипів оптимальним виявилось кокультивування протягом 2—3 діб (рис. 2), при цьому відсоток отриманих морфогенних калюсів становив близько 50 %. За кокультивування упродовж меншого від оптимального періоду спостерігалось зниження частоти утворення канаміциностійких регенерантів, що, імовірно, пов'язано з невеликою кількістю трансформованих клітин кожного калюсу. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому призводило до неможливості повної елімінації агробактерії, внаслідок чого спостерігалась поступова загибель калюсів через негативний вплив бактеріального забруднення.

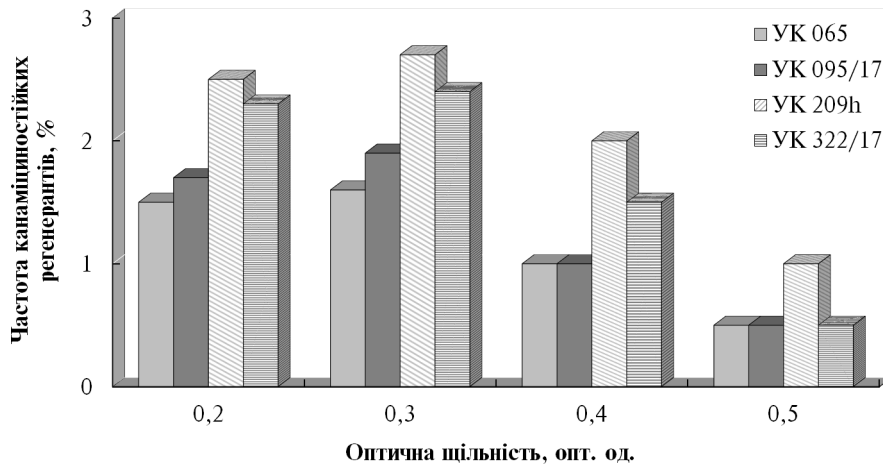


Рис. 1. Частота індукції канаміциностійких регенерантів залежно від оптичної щільності агробактеріальної суспензії клітин

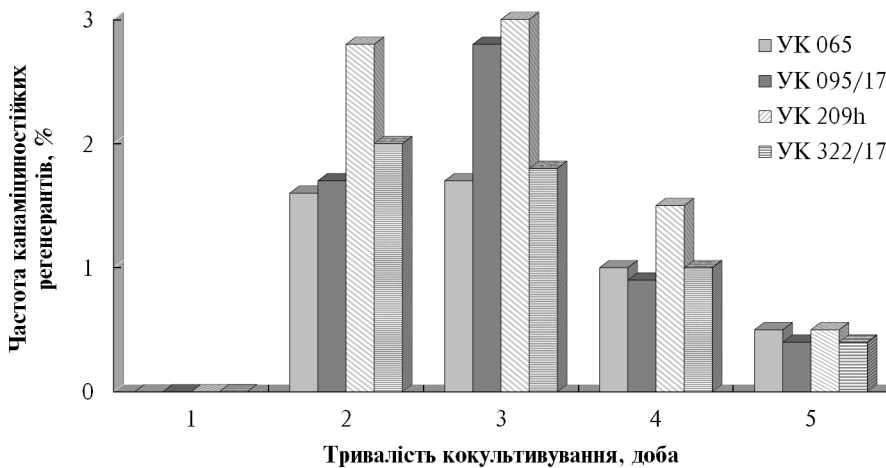


Рис. 2. Частота індукції канаміциностійких регенерантів залежно від тривалості кокульттивування

Елімінацію агробактерії здійснювали за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 200–700 мг/л. Ми показали позитивний вплив низьких концентрацій (50–75 мг/л) цього антибіотика на морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [40]. Проте зі збільшенням концентрації цефотаксиму в поживному середовищі збільшується його негативний вплив на калусні тканини, зокрема на утворення соматичних зародків. Найбільший вихід регенерантів у всіх досліджених генотипів спостерігався за концентрації цефотаксиму 500 мг/л (рис. 3). Концентрація антибіотика 200–300 мг/л виявилась недостатньою для пригнічення агробактерій — відбувався активний ріст бактеріальних колоній та загибель калусів. При підвищенні концентрації антибіотика понад оптимум зростав негативний вплив цефотаксиму власне на культуру калусів, що призводило до зменшення виходу рослин-регенерантів.

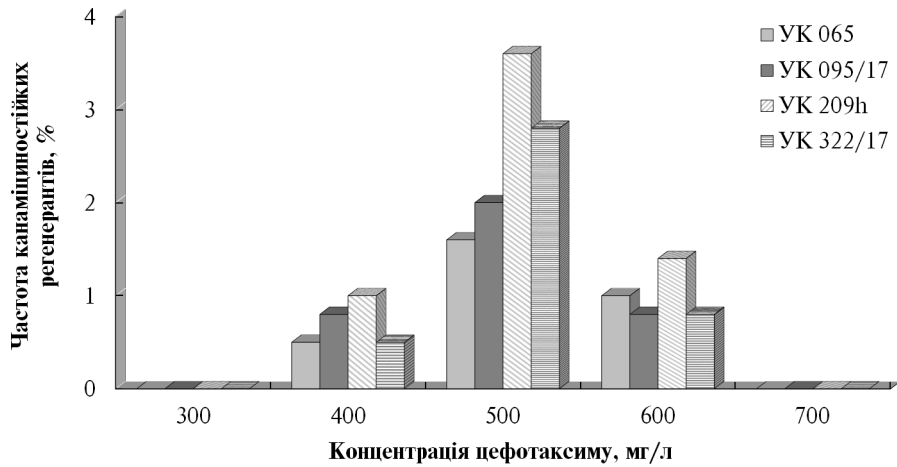


Рис. 3. Вплив концентрації цефотаксиму на частоту індукції канаміциностійких регенерантів

На підставі результатів, отриманих протягом попередніх дослідів, для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було застосовано оптимізований протокол. Так, для підвищення ефективності перенесення генів часто додають до інокуляційного середовища хімічну речовину — ацетосирингон, оскільки вважається, що ця сполука активізує *vir*-гени. За літературними даними, наявність ацетосирингону є визначальним фактором для успішного проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації багатьох культур, в тому числі й злаків [41]. У досліді ми використовували концентрацію ацетосирингону 200  $\mu$ M, яка вважається оптимальною для злакових культур [42].

Відомо, що одним з головних факторів, який контролює процес регенерації в культурі *in vitro*, є наявність фітогормонів групи цитокінінів. При цьому велике значення має не тільки концентрація цитокініну, а і його тип. Цитокінін 6-БАП широко використовується в культурі *in vitro*. Проте у випадку культивування особливо вибагливих до складу поживного середовища культур, зокрема пшениці, використання цього цитокініну недостатньо ефективно, бо призводить до гіпергідратації тканин експлантатів, а ефективність індукції регенерації буде низькою.

Нами був розроблений спосіб підвищення регенераційної здатності калюсних культур м'якої пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації шляхом використання модифікованого поживного середовища, у якому 6-бензиламінопурин замінений на тидіазурон, вилучена аскорбінова кислота, зменшена кількість аспарагінової кислоти, цефотаксиму і сахарози, та додано антибіотик цефепім і антиоксидант емоксипін [43]. При застосуванні модифікованого поживного середовища МС-131 відзначалося достовірно збільшення кількості морфогенних калюсів, які за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації утворювали пагони у 1,5–2 рази частіше порівняно з поживним середовищем МС-31 (табл. 2). Під час культивування експлантатів на середовищі МС-131 калюси швидко пе-



ТАБЛИЦЯ 2. Регенераційний потенціал калюсів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

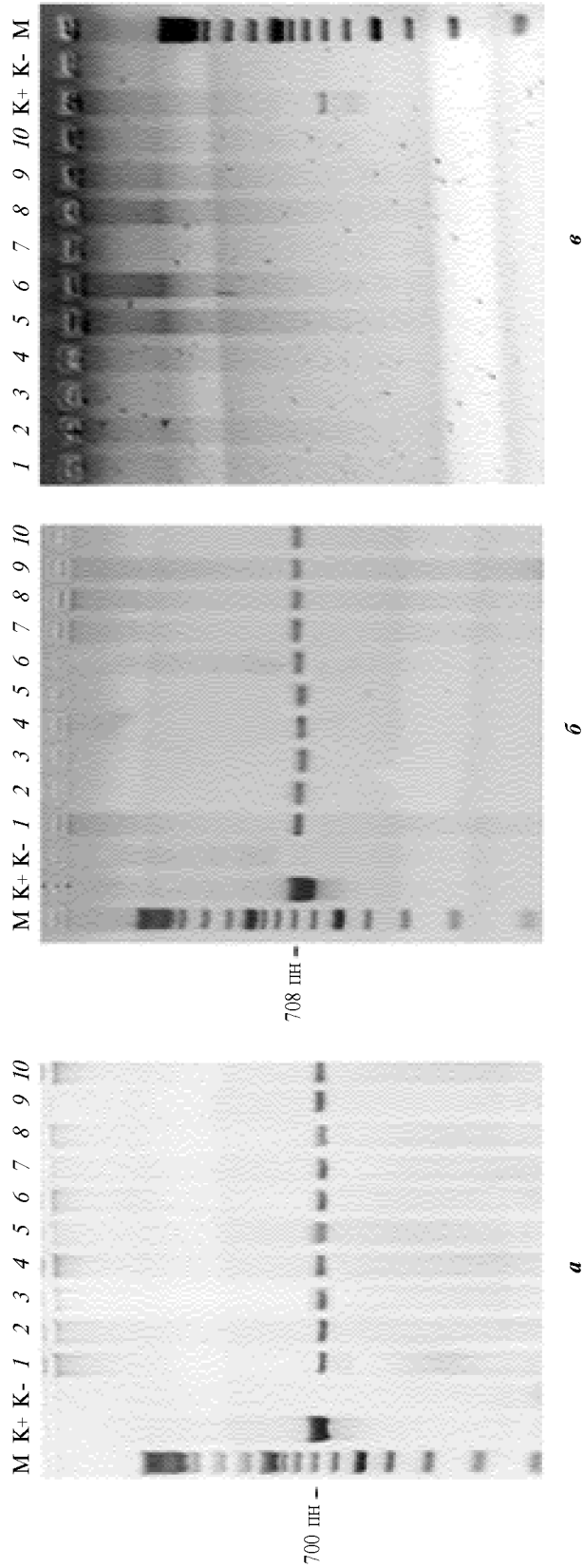
Генотип	Поживне середовище	Кількість морфогенних калюсів, %	Частота регенерації, %
УК 065	МС-31	8,2±1,4	5,0±1,1
УК 095/17		10,0±1,5	7,0±1,3
УК 209h		16,5±1,9	10,0±1,5
УК 322/17		13,0±1,7	9,0±1,4*
УК 065	МС-131	13,0±1,7*	9,0±1,4*
УК 095/17		18,3±1,9*	14,2±1,7*
УК 209h		23,0±2,1*	16,4±1,8*
УК 322/17		20,1±2,0*	15,8±1,8*

Примітка. \* — різниця між варіантами достовірна за  $p \leq 0,05$ .

реходили до морфогенного стану, регенераційні процеси у калюсів спостерігалися вже протягом 1-го пасажу, тоді як на середовищі МС-31 регенерація перших пагонів виявлялась не раніше 2-го пасажу. Розроблене регенераційне середовище дає змогу прискорити процес отримання генетично модифікованих рослин-регенерантів пшениці та збільшити їх кількість, що забезпечує скорочення біотехнологічного процесу і зменшення матеріальних витрат для його виконання.

Етап селекції є одним з найважливіших, оскільки дає змогу виділити стійкі до селективного агента форми. Для рослин, що мають екзогенний ген *nptII*, як селективний чинник найчастіше застосовують антибіотик канаміцин. Використання цього антибіотика є ефективним лише за умови додавання в середовище оптимальної його кількості. Низька концентрація канаміцину не дає можливості виділити канаміциностійкі форми, а висока — пригнічує ріст навіть трансформованих рослин-регенерантів. Ми використовували цей антибіотик у концентрації 100 мг/л, оскільки цю дозу вважають оптимальною для добору.

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили згідно з оптимізованим протоколом. Наприкінці першого пасажу почалися регенераційні процеси — утворювалися перші пагони. Індукція пагонів тривала поступово протягом 3-х пасажів. Більшість отриманих канаміциностійких регенерантів за дії селективного агента характеризувалася нормальним розвитком. Проте траплялися рослини-мозаїки, що тією чи іншою мірою містили тканини, позбавлені хлорофілу. Наявність таких регенерантів може свідчити, що утворення пагона відбувається з групи клітин (із яких частина трансформується, а частина залишається незмінною) або того, що в частині клітин порушується експресія чужорідних генів. Частина індукованих пагонів не містила хлорофілу, була нездатна формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина пагонів містила хлорофіл, однак під час перенесення на поживне середовище для укорінення поступово знебарвлювалась, не утворюючи коренів. Крім того, спостерігалось утворення псевдостійких рослин, які спочатку зберігали



**Рис. 4.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК рослин-регенерантів з праймерами до послідовностей генів: *a* — *oat*; *б* — *virD*; *в* — *Vir C*; доріжки 1–10 — досліджувані зразки, K- — негативний контроль (TE буфер), K+ — позитивний контроль (ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штам AGLO з генетичною конструкцією pVi-OAT), M — маркер молекулярної маси DNA LadderMix

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ

ТАБЛИЦЯ 3. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці (кількість трансформованих калюсів для кожного генотипу становила 400 шт.)

Генотип	Кількість канаміциностійких пагонів		Кількість трансгенних регенерантів	
	шт.	%	шт.	%
УК 065	4	1,0	3	0,75±0,4
УК 095/17	8	2,0	6	1,5±0,6
УК 209h	12	3,0	10	2,5±0,8
УК 322/17	9	2,25	6	1,5±0,6

зелене забарвлення, але в подальшому новоутворені листки формувалися безбарвними.

Оскільки генетична конструкція рВі-ОАТ, якою трансформували калюси, містила цільовий ген *oat*, то за допомогою ПЛР ми визначали наявність послідовності даного трансгена в рослинах-регенерантах. За результатами аналізу (див. рис. 4) послідовності гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази виявлено у 3–10 регенерантів, залежно від генотипу (табл. 3).

Додатково всі зразки, у яких підтверджено наявність гена *oat*, перевіряли на присутність гена *nptII*. Відповідно до результатів, позитивний сигнал присутності послідовності гена неоміцинфосфотрансферази II — амплікон розміром 700 пн — виявлено також у 3–10 рослин-регенерантів, залежно від генотипу. З метою виключення бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, зокрема гена *Vir C*. Довжина очікуваного амплікона становила 720 пн. Результати аналізу за допомогою ПЛР свідчать про відсутність агробактеріального забруднення в рослинних зразках.

Після формування рослинами-регенерантами розгалуженої кореневої системи, їх адаптували до умов ґрунту: висаджували в пластикові посудини, наповнені ґрунтовою сумішшю, яка складалася з чорнозему, нейтралізованого торфу та піску. Адаптація відбувалась за умов підвищеної вологості. Найкраще процес адаптації тривав за температури +5...+15 °С.

Таким чином, нами оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур нових перспективних генотипів озимої м'якої пшениці та отримано трансгенні рослини, які мають цільовий ген орнітин- $\delta$ -амінотрансферази. Трансгенна природа всіх отриманих рослин підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *oat* та *nptII*. В результаті здійснення генетичної трансформації отримано від 3 до 10 трансгенних рослин, залежно від генотипу. Частота трансформації для досліджених генотипів становила 0,75–2,5 %.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Shewry P.R. Wheat. *J. Exp. Bot.* 2009. **60**, N 6. P. 1537–1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
2. Wang K., Liu H., Du L., Ye X. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotech. J.* 2017. **15**. P. 614–623. <https://doi.org/10.1111/pbi.12660>

3. Joshi R., Anwar K., Das P., Singla-Pareek S., Pareek A. Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. *Wheat Biotechnology*. 2017. P. 83–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5)
4. Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* 2014. **5**. P. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
5. Anwar A., Wang K., Wang J. Expression of Arabidopsis ornithine aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Rep.* 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-175437/v1>
6. Dubrovna O.V., Stasik O.O., Priadkina G.O., Zborivska O.V., Sokolovska-Sergiienko O.G. Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricult. Sci. Pract.* 2020. **7**, N 2. P. 24–34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
7. Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Курчій В.М. Гени метаболізму проліну в біотехнології підвищення осмостабільності пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організму*. 2021. **28**. С. 94–99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382>
8. Hossain M.A., Hoque M.A., Burritt D.J., Fujita M. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. Ahmad. P. (Ed.): *Oxidative damage to plants antioxidant networks and signaling*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. P. 477–521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
9. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Пролін: фізіологічні функції і регуляція його вмісту в рослинах в умовах стресу. *Вісник Харківського національного університету імені В.Г. Шквеченка*. 2014. **2**, № 32. С. 6–22
10. Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., Zehra A., Vaishali S., Mukesh Y., Upadhyay R. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*. 2019. **5**, N 12. P. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
11. Sarker U., Oba S. The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Front. Plant Sci.* 2020. **11**. P. 1354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559876>
12. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений. *Физиология растений и генетика*. 2013. **45**, № 6. С. 488–500. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371>
13. Borgo L., Marur C.J., Vieira L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. *Acta Sci. Agron.* 2015. **37**. P. 191–199. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19097>
14. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D., Pereira L., Vieira L. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo*. *Mol. Biol. Rep.* 2013. **40**. P. 3269–3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
15. Chen C., Cui X., Zhang P., Wang Z., Zhang J. Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 2021. **168**. P. 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.004>
16. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine amino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biol.* 2020. **20**. P. 187–187. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2>
17. Anwar A., She M., Wang K., Ye X. Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *J. Mol. Sci.* 2018. **19**. P. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>
18. Stranska J., Kopečný D., Kopečná M., Snegaroff J., Sebelá M. Biochemical characterization of pea ornithine-daminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*. 2010. **92**, N 8. P. 940–948 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.026>
19. Szabados L., Savoure A. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2009. **15**. P. 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>

20. Liu C., Xue Z., Tang D., Shen Y., Shi W., Ren L., Du G., Li Y., Chenget Z. Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant J.* 2018. **5**. P. 89–97. <https://doi.org/10.1111/tpj.14072>
21. Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 2011. **157**. P. 292–304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
22. Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.* 2013. **19**. P. 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
23. Kalamaki M.S., Merkouropoulos G., Kanellis A.K. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in Arabidopsis? *Plant Signal. Behav.* 2009. **4**, N 11. P. 1099–1101. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9873>
24. Roosens N.H., Thu T.T., Iskandar H.M., Jacobs M. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1998. **117**. P. 263–271. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.263>
25. Колупаев Ю.Е., Кокорев О.И. Участие полиаминов в регулировании окислительно-восстановительного гомеостаза растений. *Вестник Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. Биол.* 2019. **1**, № 46. С. 6–22. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006>
26. Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Zhang W., Qu L., Chen Z. Over-expression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Sci. Bull.* 2003. **48**, N 23. P. 2594–2600. <https://link.springer.com/article/10.1360/03wc0218>
27. Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K. Overexpression of ornithine- $\delta$ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 2002. **9**, N 2. P. 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1026791932238>
28. Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 2008. **8**, N 40. P. 173–180. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
29. Gerasimova S.V., Kolodyazhnaya Ya.S., Titov S.E., Romanova A.V., Koval V.S., Kochetov A.V., Shumnyi V.K. Tobacco transformants expressing the *Medicago truncatula* ornithine aminotransferase cDNA. *Russ. J. Genet.* 2010. **46**, N 7. P. 1000–1003. <https://doi.org/10.1134/S102279541007015X>
30. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці in planta з використанням гена орнітин амінотрансферази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. **17**. С. 131–135.
31. Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Курчій В.М. Продуктивність рослин озимої пшениці з додатковою копією гена орнітин- $\delta$ -амінотрансферази в умовах дефіциту води. *Фактори експериментальної еволюції організму*. 2019. **25**. С. 247–252. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171>
32. Dubrovna O.V., Priadkina G.O., Mykhalska S.I., Komisarenko A.G. Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene. *Agricult. Sci. Pract.* 2021. **8**, N 1. P. 25–39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
33. Sparks C., Doherty A., Jones H. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.* 2014. **1099**. P. 235–250. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_19)
34. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2018. **50**, № 3. С.187–217. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187>
35. Mamrutha H.M., Kumar R., Venkatesh K., Sharma P., Kumar R., Tiwari V., Sharma I. Genetic transformation of wheat — present status and future potential. *J. Wheat Research*. 2014. **6**, N 2. P. 107–119.
36. Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Sci.* 2009. **59**. P. 553–560.
37. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин з експлантів верхівки пагонів проростків пшениці. *Вісник укр. товариства генетиків і селекціонерів*. 2007. **5**, № 1–2. С. 3–10.
38. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.* 2009. **526**. P. 47–58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)

39. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L). *In vitro Cellular & Developm. Biology Plant*. 2002. **38**, N 2. P. 163–167. <https://doi.org/10.1079/IVP2001267>
40. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Гончарук О.М., Лялько І.І. Вплив пектотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2012. **44**, № 3. С. 218–224.
41. Wu H., Sparks S., Amoah B., Jones H. Factors influencing successful *Agrobacterium* mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*. 2003. **21**, N 7. P. 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>.
42. Ding L., Li S., Gao J. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol. Biol. Rep.* 2009. **36**. P. 29–36. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9148-5>.
43. Дубровна О.В., Бавол А.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. Спосіб підвищення регенераційної здатності калосних культур м'якої пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Пат. на корисну модель UA № 111284 (2016). Опубл. 10.11.2016.

Отримано 15.06.2022

#### REFERENCES

1. Shewry, P.R. (2009). Wheat. *J. Exp. Bot.*, 60, No. 6, pp. 1537-1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
2. Wang, K., Liu, H., Du, L. & Ye, X. (2017). Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotech. J.*, 15, pp. 614-623. <https://doi.org/10.1111/pbi.12660>
3. Joshi, R., Anwar, K., Das, P., Singla-Pareek, S. & Pareek, A. (2017). Overview of methods for assessing salinity and drought tolerance of transgenic wheat lines. In *Wheat Biotechnology*. Springer: New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_5)
4. Hiei, Y., Ishida, Y. & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.*, 5, pp. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
5. Anwar, A., Wang, K. & Wang, J. (2021). Expression of Arabidopsis ornithine aminotransferase (AtOAT) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Rep.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-175437/v1>
6. Dubrovna, O.V., Stasik, O.O., Priadkina, G.O. Zborivska, O.V. & Sokolovska-Sergiienko, O.G. (2020). Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agricult. Sci. Pract.*, 7, No. 2, pp. 24-34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
7. Mykhalska, S.I., Komisarenko, A.G. & Kurchii, V.M. (2021). Genes of proline metabolism in biotechnology of increasing wheat osmostability. *Factors of experimentation evolution of organism*, 28, pp. 94-99. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1382> [in Ukrainian].
8. Hossain, M.A., Hoque, M.A., Burritt, D.J. & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. Ahmad, P. (Ed.): *Oxidative damage to plants antioxidant networks and signaling*. Academic Press is an imprint of Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
9. Kolupaev, Yu.E., Vainer, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *The bulletin of Kharkiv national agrarian university. Ser. Biol.*, 2, No. 32, pp. 6-22 [in Russian].
10. Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Vaishali, S., Mukesh, Y. & Upadhyay, R. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, trans-

- port, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5, No. 12, p. 02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
11. Sarker, U. & Oba, S. (2020). The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Front. Plant Sci.*, 11, pp. 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559876>
  12. Tishchenko, E.N. (2013). Genetic engineering using genes of L-proline metabolism to increase the osmotolerance of plants. *Plant Physiol. Gen.*, 45, No. 6, pp 488-500. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159371> [in Russian].
  13. Borgo, L., Marur, C.J. & Vieira, L.G.E. (2015). Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. *Acta Sci. Agron.*, 37, pp. 191-199. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19097>
  14. Carvalho, K., Campos, M.K., Domingues, D., Pereira L. & Vieira, L. (2013). The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.*, 40, pp. 3269-3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
  15. Chen, C., Cui, X., Zhang, P., Wang, Z. & Zhang, J. (2021). Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.*, 168, pp. 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.004>
  16. Anwar, A., She, M., Wang, K. & Ye, X. (2020). Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithine amino transferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biol.*, 20, pp. 187-187. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02396-2>
  17. Anwar, A., She, M., Wang, K. & Ye, X. (2018). Biological roles of ornithine amino-transferase (OAT) in plant stress tolerance: present progress and future perspectives. *J. Mol. Sci.*, 19, p. 3681. <https://doi.org/10.3390/ijms19113681>
  18. Stranska, J., Kopečný, D., Kopečna, M., Snegaroff, J. & Sebelá, M. (2010). Biochemical characterization of pea ornithine-daminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines. *Biochimie*, 92, No. 8, pp. 940-948. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.026>
  19. Szabados, L. & Savoure, A. (2009). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15, pp. 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
  20. Liu, C., Xue, Z., Tang, D., Shen, Y., Shi, W., Ren, L., Du, G., Li, Y. & Chenget, Z. (2018). Ornithine- $\delta$ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. *Plant J.*, pp. 89-97. <https://doi.org/10.1111/tpj.14072>
  21. Sharma, S., Villamor, J.G. & Verslues, P.E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.*, 157, pp. 292-304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
  22. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. & Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, pp. 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
  23. Kalamaki, M.S., Merkouropoulos, G. & Kanellis, A.K. (2009). Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signal. Behav.*, 4, No. 11, pp. 1099-1101. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9873>
  24. Roosens, N.H., Thu, T.T., Iskandar, H.M. & Jacobs, M. (1998). Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 117, pp. 263-271. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.263>
  25. Kolupaev, Y.U.E. & Kokorev, O.I. (2019). Participation of polyamines in regulation of redox homeostasis in plants. *The bull. Kharkiv nat. agrar. un-ty. Ser. Biol.*, 1, No. 46, pp. 6-22. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.01.006> [in Russian].
  26. Wu, L., Fan, Z., Guo, L., Li, Y., Zhang, W., Qu, L. & Chen, Z. (2003). Over-expression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chinese Sci. Bull.*, 48, No. 23, pp. 2594-2600. <https://link.springer.com/article/10.1360/03wc0218>
  27. Roosens, N.H., Bitar, F.A. & Loenders, K. (2002). Overexpression of ornithine- $\delta$ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in trans-

- genic plants. *Mol. Breed.*, 9, No. 2, pp. 73-80. <https://doi.org/10.1023/A:1026791932238>
28. Funck, D., Stadelhofer, B. & Koch, W. (2008). Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol.*, 8, No. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-40>
  29. Gerasimova, S.V., Kolodyazhnaya, Ya.S., Titov, S.E., Romanova, A.V., Koval', V.S., Kochetov, A.V. & Shumnyi, V.K. (2010). Tobacco transformants expressing the *Medicago truncatula* ornithine aminotransferase cDNA. *Russ. J. Genet.*, 46, No. 7, pp. 1000-1003. <https://doi.org/10.1134/S102279541007015X>
  30. Goncharuk, O.M., Baval, A.V. & Dubrovna, O.V. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of soft wheat in planta using the ornithine aminotransferase gene. *Factors of experimental evolution of organisms*, 17, pp. 131-135 [in Ukrainian].
  31. Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I. & Kurchii, V.M. (2019). Productivity of winter wheat plants with the additional copy of ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene under water deficit conditions. *Factors of experimental evolution of organisms*, 25, pp. 247-252. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1171> [in Ukrainian].
  32. Dubrovna, O.V., Priadkina, G.O., Mykhalska, S.I. & Komisarenko, A.G. (2021). Water deficiency tolerance of genetically modified common wheat cv. Zymoyarka, containing a heterologous ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene. *Agricult. Sci. Pract.*, 8, No. 1, pp. 25-39. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.014>
  33. Sparks, C., Doherty, A. & Jones, H. (2014). Genetic transformation of wheat via Agrobacterium-mediated DNA delivery. *Methods Mol. Biol.*, 1099, pp. 235-250. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_19)
  34. Dubrovna, O.V. & Morgun, B.V. (2018). Current status of research of Agrobacterium-mediated transformation of wheat. *Plant Physiol. Genet.*, 50, No. 3, pp. 187-217. <https://doi.org/10.15407/frg2018.03.187> [in Ukrainian].
  35. Mamrutha, H.M., Kumar, R., Venkatesh, K., Sharma, P., Kumar, R., Tiwari, V. & Sharma, I. (2014). Genetic transformation of wheat — present status and future potential. *J. Wheat Research*, 6, No. 2, pp. 107-119. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/JWRReview>
  36. Kumlehn, J. & Hensel, G. (2009). Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Sci.*, 59, pp. 553-560.
  37. Baval, A.V., Dubrovna, O.V. & Lyalko, I.I. (2007). Regeneration of plants from the explants of the top of wheat seedlings shoots. *Bul. Ukr. Soc. Genet. Breeders*, 5, No. 1-2, pp. 3-10 [in Ukrainian].
  38. Sidorov, V. & Duncan, D. (2009). Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol. Biol.*, 526, pp. 47-58. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)
  39. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W. & Sticklen, M. (2002). Shoot apical meristem: in vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L). *In vitro Cellular & Developm. Biol. Plant*, 38, No. 2, pp. 163-167. <https://doi.org/10.1079/IVP2001267>
  40. Dubrovna, O.V., Baval, A.V., Zinchenko, M.O., Goncharuk, O.M. & Lyalko, I.I. (2012). Influence of cefotaxime on morphogenesis in culture of apical meristems and mature wheat germs. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 44, No. 3, pp. 218-224 [in Ukrainian].
  41. Wu, H., Sparks, S., Amoah, B. & Jones, H. (2003). Factors influencing successful Agrobacterium mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.*, 21, No. 7, pp. 659-668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>
  42. Ding, L., Li, S. & Gao, J. (2009). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol. Biol. Rep.*, 36, pp. 29-36. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9148-5>
  43. Pat. 111284 UA. A method of increasing the regenerative capacity of callus cultures of bread wheat by Agrobacterium-mediated transformation, Dubrovna, O.V., Baval, A.V., Goncharuk, O.M. & Voronova, S.S. Publ. 10.11.2016 [in Ukrainian].

Received 15.06.2022



AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PROMISING GENOTYPES OF WINTER WHEAT USING THE ORNITHINE- $\delta$ -AMINOTRANSFERASE GENE

O.V. Dubrovna, L.V. Slivka

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine  
e-mail: dubrovny@ukr.net

Ornithine- $\delta$ -aminotransferase (OAT) is an important regulator of cellular metabolism because the reaction catalyzed with this enzyme binds several biochemical systems: the urea cycle, the proline accumulation and degradation cycle, and the polyamine biosynthesis pathway. The introduction of the exogenous *oat* gene into the plant genome is one of the promising methods for creating abiotic stress-resistant wheat genotypes. The aim of our work was to optimize the conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calluses of new promising genotypes of winter bread wheat, and to obtain genetically modified plants with the heterologous gene of ornithine- $\delta$ -aminotransferase. The main parameters of the transformation protocol were studied, in particular the influence of optical density of agrobacterial cells suspension, concentration of the antibiotic cefotaxime, the effect of duration of cocultivation on the frequency of kanamycin-resistant regenerants from callus cultures of apical origin. The regeneration environment has been optimized, which allows to accelerate the process of obtaining genetically modified wheat regenerants, and increase their number. This reduces the biotechnological process, and the material costs for its implementation. Through *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calluses of new promising genotypes of winter bread wheat, regenerants were obtained in the genome of which the complete incorporation of the genetic construct containing *oat* and *nptII* transgenes was revealed. The transgenic nature of all plants obtained was confirmed by PCR with primers specific for the *oat* and *nptII* genes. The frequency of transformation for the studied genotypes was 0.75–2.5 %.

Key words: *Triticum aestivum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, callus cultures, ornithine- $\delta$ -aminotransferase gene.