

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

КВАСКО АННА ЮРІЇВНА



УДК 57.085.2:577.21

**СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ З ДРІЖДЖОВИМИ
ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі клітинної біології та біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Ємець Алла Іванівна,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України»,
завідувач відділу клітинної біології та
біотехнології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Циганкова Вікторія Анатоліївна,
Інститут біоорганічної хімії та
нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН
України,
провідний науковий співробітник
відділу хімії біоактивних азотовмісних
гетероциклічних основ

кандидат біологічних наук,
Моргун Богдан Володимирович,
Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
заступник директора з наукової роботи,
провідний науковий співробітник
відділу молекулярної генетики

Захист відбудеться «14» квітня 2021 р. о 14:00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел. (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «13» березня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Внаслідок впливу підвищеної температури, а також повітряної та ґрунтової посухи, які викликають осмотичний стрес, в організмах рослин активуються складні фізіологічні, клітинні та молекулярні механізми, що включають індукцію та/або репресію багатьох генів, котрі впливають на синтез білків, цукрів, ліпідів, вторинних метаболітів, будову та структуру біологічних мембран (Sanghera et al., 2011; Kumar et al., 2017). Відомо, що у захисті рослин від стресів важливу роль відіграє трегалоза (Yatsyshyn et al., 2017). Завдяки унікальному поєднанню молекулярної структури та фізико-хімічних властивостей трегалозу характеризують як стресопротектор (Elbein et al., 2003). Тregarloза (α -Д-глюкопіранозил-1,1- α -Д-глюкопіранозид) - нередукуючий дисахарид, що складається з двох молекул глюкози, поєднаних α -1,1-глікозидними зв'язками (Petitjean et al., 2016; Schiraldi et al., 2002; Elbein et al., 2003). Завдяки подібній молекулярній структурі (наявності глікозидного зв'язку між двома залишками Д-глюкози) трегалоза може зв'язуватись з полярними групами макромолекул, стабілізуючи структуру ліпідних двошарових мембран, заміщуючи молекули води навколо них та підтримуючи цілісність клітин за умов дегідратації, дії високих і низьких температур, а також засолення (Richards et al., 2002; Yatsyshyn et al., 2017).

Тregarloза наявна у різних організмів, включаючи водорості, бактерії, комахи, дріжджі, міцеліальні гриби, вищі тварини та більшість рослин. Встановлено, що трегалоза накопичується у ангідробіотиків (до більш ніж 10% сухої маси), дозволяючи їм пережити повне зневоднення (Crowe et al., 1992; Bianchi et al., 1993) та деяких покритонасінних, стійких до висушування (Drennan et al., 1993). Навіть за умов наявності у низьких концентраціях трегалоза стабілізує білки та мембранні структури за стресових умов, і це ймовірно пов'язано з температурою її кристалізації, високою пластичністю та хімічною стабільністю (Colaco et al., 1995).

Більшість організмів накопичують трегалозу за умов стресу, синтезуючи її за допомогою двох послідовних реакцій, в яких задіяні трегалозо-6-фосфатсинтаза та трегалозо-6-фосфатфосфатаза. Метаболізм трегалози детально вивчено у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, у яких внутрішньоклітинний рівень трегалози підтримується завдяки збалансованій дії ферментів її синтезу та гідролізу (Kim et al., 1996). Синтез трегалози здійснюється великим ферментним комплексом, що складається з трегалозо-6-фосфатсинтази, яка кодується геном *TPS1*, та трегалозо-6-фосфатфосфатази, яка кодується геном *TPS2*. Тregarloзо-6-фосфатсинтаза каталізує взаємодію глюкозо-6-фосфату з УДФ-глюкозою з утворенням трегалозо-6-фосфату. У свою чергу, трегалозо-6-фосфат перетворюється до трегалози за участю фермента трегалозо-6-фосфатфосфатази. Посилення експресії принаймі одного з цих генів – *TPS1* – сприяє підвищенню внутрішньоклітинної концентрації трегалози та посиленню термотолерантності дріжджів *S. cerevisiae* (An et al., 2011).

Відомо декілька робіт, в яких показано, що трансгенні рослини з надекспресією трегалозо-6-фосфатсинтази демонструють підвищену

посухостійкість. Наприклад, підвищення посухостійкості деяких видів рослин (тютюн, рис) досягалось шляхом трансформації геном *TPS* (Romero et al., 1997; Karim et al., 2007; Jang et al., 2003). У цих та деяких інших публікаціях описано конструювання трансгенних рослин, які виявляють конститутивну надекспресію генів, що кодують трегалозо-6-фосфатсинтазу та/або трегалозо-6-фосфатфосфатазу, і, як наслідок, характеризуються підвищенням рівня акумуляції трегалози та посухостійкістю. Однак основною проблемою таких трансформацій був плейотропний ефект, що призводив до аномального розвитку рослин (Yatsyshyn et al., 2017). Для вирішення цієї проблеми Wu та Garg (2003) використовували стресо-індукований промотор для контролю надекспресії генів біосинтезу трегалози (*otsA* та *otsB*) *E. coli* для забезпечення толерантності рису до абіотичного стресу. Індукований стресом промотор використовували також для створення конструкцій з генами *TPS1-TPS2* для трансформації *Arabidopsis thaliana* (Miranda et al., 2007). Отримані лінії характеризувались нормальним ростом, а також підвищеною толерантністю до засолення, посухи, переохолодження та високих температур.

З результатів, описаних у цих роботах, випливає, що суттєве покращення посухостійкості рослин може бути досягнуто шляхом перенесення генів, задіяних у метаболізмі трегалози. На сьогодні відсутні дані про надекспресію генів *TPS1* та *TPS2*, що кодують ферменти біосинтезу трегалози, у більшості видів злаків, до яких належить одна з найважливіших сільськогосподарських культур – пшениця (*Triticum aestivum* L.). Зовсім недослідженим є також використання різних типів промоторів для контролю цих генів, зокрема, сильних конститутивних промоторів для їх експресії в однодольних рослинах.

Таким чином, отримання трансгенних посухостійких ліній пшениці, що будуть характеризуватись нормальним ростом та розвитком, є надзвичайно актуальною проблемою, оскільки пшениця як одна з найбільш культивованих зернових культур порівняно з іншими (ячмінь, кукурудза, рис) (Hensel et al., 2009) займає одне з чільних місць у задоволенні харчових потреб людства.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано у відділі клітинної біології та біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках проекту «Створення посухостійких ліній рослин за допомогою надекспресії дріжджових генів біосинтезу трегалози» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації – 0115U005022, 2015-2019 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було створення генетичних векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2* та отримання за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (в умовах *in vitro* та *in planta*) ліній рослин пшениці м'якої з надекспресією генів *TPS1* та *TPS2* для підвищення їх стійкості до посухи.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Створити генетичні векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S) для трансформації дводольних рослин та промотору убіхітину кукурудзи (PUbi) для трансформації однодольних рослин, зокрема пшениці.

2. Ввести в культуру *in vitro* досліджувані сорти пшениці та оцінити їх морфогенетичний потенціал.

3. Провести *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію модельної рослини *Nicotiana tabacum* за умов використання створених векторних конструкцій pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2*.

4. Здійснити перенесення генів *TPS1* та *TPS2* за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in vitro* в досліджувані сорти пшениці, використовуючи векторні конструкції pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2*.

5. Здійснити *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію сортів пшениці методом *in planta* з використанням сконструйованих векторів pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2*.

6. Провести молекулярно-генетичний аналіз створених ліній рослин тютюну та пшениці з метою підтвердження перенесення генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* до геномів досліджуваних рослин.

7. Проаналізувати відібрані трансгенні рослини пшениці на стійкість до посухи.

Об'єкт дослідження – *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин дріжджовими генами біосинтезу трегалози.

Предмет дослідження – створення посухостійких ліній пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* за допомогою методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*.

Методи дослідження. Метод Gateway-клонування; методи культур тканин і органів *in vitro*; *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин в умовах *in vitro* та *in planta*; молекулярно-генетичні методи: виділення рослинної тотальної ДНК; полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР); електрофорез продуктів ампліфікації вагарозному гелі; спектрофотометричний метод кількісного визначення вмісту трегалози; методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше створено генетичні векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* термофільних дріжджів: pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* (з генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S), а також pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з генами *TPS1* та *TPS2* під контролем сильного конститутивного промотору убіхітину кукурудзи (PUbi) для трансформації рослин.

Вперше введено в культуру *in vitro* 6 (Вихованка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад) сортів пшениці м'якої української селекції та досліджено їх морфогенетичний потенціал. За допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методами *in vitro* та *in planta* вперше перенесено дріжджові гени *TPS1* та *TPS2* в геном рослин пшениці. Встановлено,

що трансгенні рослини пшениці з генами *TPS1* та *TPS2* характеризуються підвищеною стійкістю до посухи.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані трансгенні лінії рослин пшениці м'якої з підвищеною посухостійкістю мають практичну цінність і можуть бути використані у селекційній роботі та подальших наукових дослідженнях. Результати даної роботи вказують на перспективність генетичної трансформації цінних рослинних зернових культур генами трегалози для підвищення їх стійкості до посухи. Матеріали та методи дисертаційної роботи можуть представляти інтерес для науково-дослідних та навчальних робіт біотехнологічного та генно-інженерного напрямків.

Особистий внесок здобувача. Вибір теми роботи, постановку мети та наукових завдань досліджень, аналіз та наступну інтерпретацію отриманих результатів, розробку структури дисертаційної роботи та підготовку публікації за результатами проведених досліджень здійснено спільно з науковим керівником. Основні дослідження – отримання трансгенних ліній рослин, їх молекулярно-генетичний аналіз та аналіз на посухостійкість було проведено автором особисто. Автор висловлює подяку академіку НАН України А.А. Сибірному та д.б.н. К.В. Дмитруку (Інститут біології клітини НАН України) за надання послідовностей генів *TPS1* та *TPS2*, д.б.н. С.В. Ісаєнкову за допомогу у створенні векторних конструкцій. Наукові роботи опубліковано у співавторстві з Я.Б. Блюмом, К.В. Дмитруком, А.І. Ємець, С.В. Ісаєнковим, О.Є. Краснопоровою, А.А.Сибірним, В.Ю. Яцишин.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації було представлено на 5-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Одеса, Україна, 2–6 жовтня, 2016); Міжнародній науковій конференції «Досягнення та перспективи мікробіології» (Львів, Україна, 12–14 жовтня, 2016); XIII та XIV Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 16–18 травня, 2017; Львів, Україна, 10–12 квітня, 2018); III Конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, Україна, 16–18 травня, 2017); XVIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScienceAdvances» (Київ, Україна, 23–25 квітня, 2020), XIV Всеукраїнській конференції молодих вчених «Інституту молекулярної біології та генетики НАН України» (Київ, Україна, 27–28 травня, 2020).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць, з них 4 статті у фахових виданнях та 7 тез у матеріалах наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 290 посилань. Дисертаційна робота містить 29 рисунків, 7 таблиць, 4 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У першому розділі (огляді літератури) висвітлено загальні відомості про будову, функціональні особливості молекули трегалози та шляхи її біосинтезу в живих організмах. Розглянуто результати досліджень щодо біотехнологічних та генно-інженерних підходів, пов'язаних зі змінами шляхів біосинтезу трегалози за використанням чужорідних генів *TPS1* та *TPS2*, і їх впливу на стресостійкість у створених трансгенних рослинних ліній. Описано основні особливості *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації однодольних рослин. Також представлено сучасні досягнення та ключові проблеми у створенні трансгенних рослин пшениці за використання методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методами *in vitro* та *in planta*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Створення генетичних векторних конструкцій. Для проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації досліджуваних рослин було створено векторні конструкції з цільовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* (кодує фермент першої реакції біосинтезу трегалози трегалозо-6-фосфатсинтазу) та *TPS2* (кодує фермент другої реакції трегалозо-6-фосфатфосфатазу) термофільних дріжджів. Кодуючі послідовності генів *TPS1* та *TPS2* було люб'язно надано Інститутом біології клітини НАН України. Конструкції створювали за допомогою методу Gateway-клонування (Karimi et al., 2007) з використанням бінарних векторів для трансформації дводольних рослин - pGWB2 (Nakagawa and Kimura, 2007) та однодольних рослин - pBract214 (<http://www.bract.org>; Smedley et al., 2011) (Reese-Hoyes et al., 2018; Karimi et al., 2002, 2013). У результаті було створено векторні конструкції pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2*, які містили цільові гени *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S), і такі селективні маркерні гени, як *hpt* (гігromіцин-фосфотрансферази), що забезпечує стійкість до гігromіцину, та *nptII* (неоміцин-фосфотрансферази II), що забезпечує стійкість до канаміцину у рослин; а також конструкції pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотору убіхвітину кукурудзи (PUbi) та селективним маркерним геном *hpt*.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну (*N. tabacum*).** Вектори pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* з генами *TPS1* та *TPS2*, що знаходились під контролем промотору P35S, відповідно, перевіряли, використовуючи їх для перенесення зазначених генів, на модельному рослинному об'єкті – тютюні сорту Самсун (з колекції ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»). Трансформацію здійснювали згідно методу (Tuncer, 2006). Для цього листові експланти інокулювали нічною культурою агробактерії, яку вирощували у середовищі LB (Sambrook et al., 1989). Після кокультивування з агробактерією експланти переносили на середовище MC (Murashige & Skoog, 1962), що містило 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) (Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) (Sigma, США) для регенерації рослин, 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії, 25 мг/л гігromіцину (Duchefa, Німечина) для селекції трансгенних рослин. У відібраних ліній, на відміну від контрольних рослин, спостерігали

затримку пагоно- та коренеутворення. Для індукції цих процесів з метою покращення розвитку відібраних ліній рослин *in vitro* проводили додаткове дослідження по вивченню впливу окремо глюкози, сахарози та мальтози у концентраціях 0-45 г/л, які додавали до середовища вище зазначеного складу.

Введення в культуру *in vitro* сортів пшениці м'якої української селекції. Перед проведенням генетичної трансформації пшениці нами було спочатку введено в культуру *in vitro* та досліджено морфогенетичний потенціал 7 сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад. Як експланти використовували незрілі зародки. Для цього насіння пшениці (14-16 доба після запилення) стерилізували за використання 70%-го етанолу (30 с) та гіпохлориту натрію (NaOCl) (12 хв), далі тричі промивали стерильною дистильованою водою. Асептично ізольовані зародки розміром 1–1,5 мм розміщували щитком догори (Sabetta et al., 2016, Wan et al., 1994) на середовище МС, що містило вітаміни за Гамборгом (Gamborg, 1968) і 2 мг/л 2,4-дихлорфенолоцтової кислоти (2,4-Д) (Sigma, США), та культивували протягом 4-5 діб при 24°C в темряві для індукції калюсогенезу. Потім експланти переносили на середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, для регенерації рослин. Частоту утворення морфогенного калюсу та частоту регенерації рослин оцінювали за стандартною методикою.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація незрілих зародків пшениці.** Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці було використано вектори pBract 214-TPS1 та pBract 214-TPS2, що містили дріжджові гени біосинтезу трегалози TPS1 та TPS2, відповідно, під контролем промотора убіхвітину кукурудзи (PUbi), та експланти (незрілі зародки) сортів Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад. Перед трансформацією експланти спочатку ізолювали зі стерилізованого насіння та переносили на середовище МС, доповнене вітамінами за Гамборгом та 2 мг/л 2,4-Д, для індукції калюсогенезу. Через 5 діб експланти інокулювали нічною культурою агробактерії з додавання 200 мМ ацетосирінгону (Sigma, США) протягом 30 хв, потім переносили на середовище МС для кокультивування з агробактерією протягом 48 год. Далі експланти переносили на середовище МС для регенерації пагонів та селекції трансгенних ліній пшениці, яке містило в якості фітогормонів 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, 30 мг/л гігromіцину, а також 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії та 30 г/л сахарози. Регенеровані пагони укорінювали на безгормональному середовищі МС, що містило половинний набір макросолей, 10 г/л сахарози, а також 400 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л гігromіцину.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці методом *in planta*.** Дослідження по *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta* проводили за використання аналогічних конструкцій pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2 та наступних сортів пшениці: Вихованка, Зимоярка, Журавка Одеська, Кесарія Поліська, Щедрість. Для цього колоси пшениці, що не вийшли з прапорцевого листка попередньо кастрували та огортали індивідуальним ізолятором з пергаментного паперу (Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009; Горбатюк та ін., 2015). Нічну культуру *A. tumefaciens* вирощували на середовищі LB

(Sambrook et al., 1989) до досягнення оптичної щільності $OD_{600}=0,8-1,0$. Потім культуру центрифугували, осад ресуспендували у середовищі LB з додаванням 200 мМ ацетосирингону (Sigma, США) та 5 г/л сахарози. Колоси після кастрування (через 3-4 доби) занурювали в це середовище та огортали індивідуальним ізолятором. Через 7 діб колоси запилювали пилком інтактних колосів кожного окремого сорту. Після повного досягання насіння (через 21 добу) колоси збирали для проведення подальшого аналізу.

Молекулярно-генетичний аналіз відібраних ліній рослин. Підтвердження перенесення та інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2* в геноми досліджуваних рослин здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього ізолювали тотальну ДНК контрольних і відібраних ліній тютюну та пшениці за допомогою ЦТАВ-методу (Ausubel et al., 1987). ПЛР проводили за використання наступних пар праймерів до цільових генів: *TPS1* for_5' – AGATCATCGGTGTTCCAAGG–3' та *TPS1* rev_5' –TGTCTTCCGTGCAAAGAGTG–3'; *TPS2* for_5' –ATGGGGCATGATGGAATAA–3' та *TPS2* rev_5' –ACCACTGCCCAAGACAATTC–3'. З метою додаткової перевірки відсутності бактеріального зараження у досліджуваних зразках пшениці, трансформованих методом *in planta*, було проведено молекулярно-генетичний аналіз з використанням специфічних праймерів до агробактеріального гена вірулентності *virD* наступних послідовностей: *virD* for_5' –ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA–3'; *virD* rev_5' –GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAGCAA–3'.

Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 10 мкл суміші HotStart ПЛР (Neogene, Україна), 50 нг ДНК, по 1 мкл кожного з праймерів. Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США) за наступною схемою: початкова денатурація – 95°C 12 хв, наступні 40 циклів – денатурація 95°C 30 с, відпал праймерів – 57°C 40 с, елонгація – 72°C 90 с, та кінцева елонгація – 72°C 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі в 1хТБЕ-буфері (Peacock and Dingman, 1968). Для визначення довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер довжин фрагментів ДНК (GeneRuler™ 1 kb; 100 bp PlusDNA Ladder, ready-to-use; Fermentas, Литва). Розміри очікуваних ампліфікованих фрагментів: 640 п.н. – для гена *TPS1*, 758 п.н. – для гена *TPS2*.

Аналіз отриманих ліній пшениці на стійкість до посухи. Зібране насіння пшениці контрольних рослин та отриманих після трансформації методом *in planta* вирощували у вегетаційному посуді, який містив однорідну суміш пісок:торф:грунту (1:1:1). Для моделювання умов посухи рослини переводили на обмежений полив, перший тиждень він становив 50% від повної вологості ґрунту (ПВГ), другий тиждень – 40%, та останній тиждень і до кінця дозрівання насіння – 30%. Також рослини вирощували за умов 100% ПВГ. По закінченню дослідження та за досягання зерна проводили аналіз морфологічних показників рослин за такими параметрами: висота рослин, довжина головного колоса, кількість та маса зерен з головного колосу (Дубровна та ін., 2019).

Визначення вмісту трегалози в досліджуваних рослинах пшениці. Концентрацію трегалози в контрольних та трансгенних рослинах пшениці

визначали за допомогою KitK-TREN (Megazyme™, Ірландія) згідно протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Виміри проводили у рослин, які зростали в умовах закритого ґрунту за 100% та 30% ПВГ. Для цього підготовлений екстракт (листя рослин (1 г) розтирали у рідкому азоті, двічі екстрагували 500 мМ оцтовою кислотою за кімнатної температури та фільтрували (Ge et al., 2008)) використовували для реакції з відповідним реагентами, що входили до набору, та згідно протоколу визначали концентрацію трегалози у зразках.

Статистичний аналіз даних. Експерименти повторювали не менше трьох разів, достовірність результату підтверджували за *t*-критерієм Ст'юдента для 5% рівня значущості.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створення векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. З метою перенесення дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* в рослини нами було створено 4 векторні конструкції: дві з них - рGWB2-*TPS1* та рGWB2-*TPS2* (Рис. 1) – які несуть, відповідно, гени *TPS1* та *TPS2* під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S), селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігromіцину, та ген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину, у рослин; дві інші конструкції - рBract214-*TPS1* та рBract214-*TPS2* (Рис.2) – містять цільові гени *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотору убіхвітину кукурудзи (PUbi) і селективний маркерний ген *hpt*.

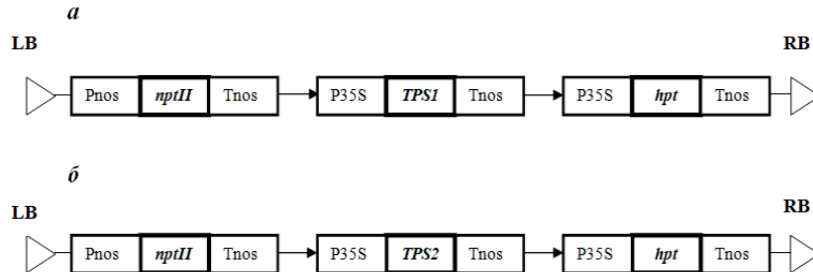


Рис. 1. Схема Т-ДНК векторів рGWB2-*TPS1* (а) та рGWB2-*TPS2* (б). LB, RB–ліва та права границі Т-ДНК, *TPS1* – цільовий ген біосинтезу трегалозо-6-фосфатсинтази;

TPS2 – цільовий ген біосинтезу трегалозо-6-фосфатфосфатази, *nptII* – ген неоміцин-фосфотрансферазиІІ, *hpt* – ген гігromіцин-фосфотрансферази, P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, Pnos, Tnos – нопалінові промотор і термінатор.

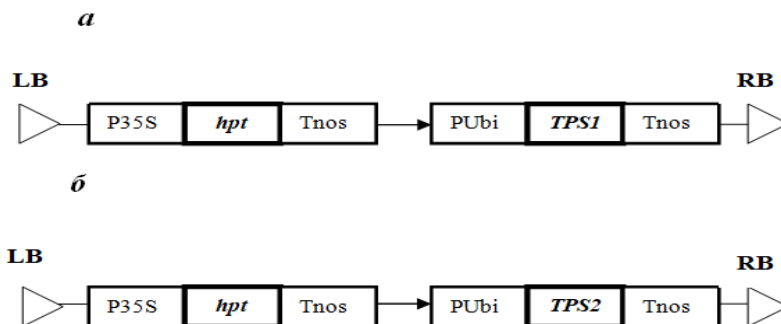


Рис. 2. Схема Т-ДНК векторів рBract214-*TPS1* (а) та рBract214-*TPS2* (б): LB, RB–ліва та права границі Т-ДНК, *TPS1*–цільовий ген біосинтезу трегалозо-6-фосфатсинтази; *TPS2* – цільовий ген біосинтезу

трегалоза-6-фосфат синтази, *hpt* – ген гігromіцин-фосфаттрансферази, PUbi–промотор убіхвітину кукурудзи, P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, Tnos – термінатор нопалінсинтази.

Ефективність конструкцій *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2* перевіряли, як зазначено вище, на модельній рослині *N. tabacum*. Дві останні конструкції було створено виключно для трансформації злаків, зокрема пшениці.

Створені вектори було перенесено у штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 за допомогою методів хімічної трансформації (Sambrook et al., 1989) для подальшого використання у трансформації досліджуваних рослин.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну.** У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну за використання конструкцій *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2* на 14 добу регенерації пагонів в умовах селективного тиску (Рис. 3) було встановлено, що показники частоти регенерації пагонів були на рівні $86,5 \pm 1,78\%^*$ та $53,3 \pm 1,09\%$ відповідно, а ефективність регенерації - 4 та 5 регенованих пагонів на експлант, тоді як у контролі цей показник (частота регенерації пагонів) сягав $95 \pm 2,35\%^*$ і у всіх пагонів спостерігали утворення коренів на відміну від трансгенних ліній, ефективність регенерації – 5 - 7.

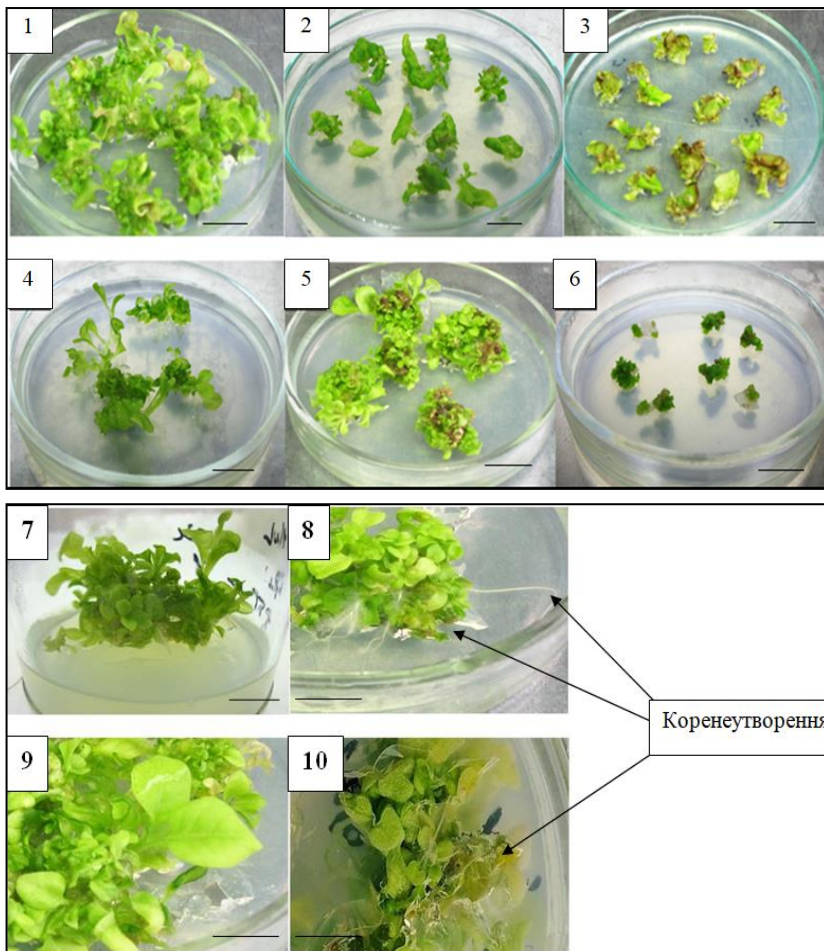


Рис. 3. Загальний вигляд експлантів тютюну через 30 діб культивування: **1** – контрольні експланти на середовищі МС для регенерації; **2** – контрольні експланти на середовищі для регенерації пагонів, що містило 5%-ну сахарозу; **3** – контрольні експланти на середовищі з гігromіцином (25

мг/л) та цефотаксимом (500 мг/л); **4** – експланти після трансформації конструкцією *pGWB2-TPS1* на середовищі з 5%-ною сахарозою; **5** – експланти, трансформовані конструкцією *pGWB2-TPS2*, на середовищі з 5%-ною сахарозою; **6** – експланти, трансформовані конструкцією *pGWB2-TPS1*, на середовищі

з 5%-ною мальтозою. Рослини тютюну після трансформації плазмідами *pGWB2-TPS1* (**7, 8**) та *pGWB2-TPS2* (**9, 10**): **7, 8** – на 30 добу після трансформації на середовищі для регенерації; **9, 10** – на 60 добу на середовищі для вкорінення. Масштабна мітка – 1 см.

При подальшому культивуванні (через 30 діб) відібраних пагонів спостерігали суттєву затримку їх росту та коренеутворення. Оскільки відомо, що

вміст трегалози в рослинах, а також рівень експресії генів її біосинтезу впливають на розподіл метаболітів під час енергетичного обміну, регулюють розподіл цукрів всередині та поза клітин рослин (Jung et al., 2003, Figueroa et al., 2016), нами було проведено додаткове дослідження по підборі та визначенню впливу джерел вуглецю в живильних середовищах на ріст і розвиток відселектованих ліній *in vitro*. Для цього вивчали окремо вплив глюкози, сахарози та мальтози у концентраціях від 0 до 45 г/л, які додавали до середовища вище зазначено складу.

Щодо експлантів рослин тютюну, які були трансформовані конструкцією *pGWB2-TPS1*, то найвищі показники частоти та ефективності регенерації рослин було зафіксовано на середовищах, що містили сахарозу, мальтозу або глюкозу у концентрації від 25 до 45%. Зокрема, за цих умов найвищий показник частоти регенерації рослин в умовах селективного тиску становив $88,5 \pm 3,23\%$ на середовищі з 45 г/л сахарози, а найбільший показник ефективності регенерації - 4 добре розвинених регенованих пагонів на одному експланті. Нижчі показники ефективності регенерації в умовах селективного тиску були отримані при додаванні у живильне середовище мальтози в концентраціях 30-45 г/л, як єдиного джерела вуглецю (1-2 регенеранти на експлант), ріст пагонів при цьому гальмувався, а найвищий показник ефективності регенерації становив $63,91 \pm 2,62\%$. За трансформації рослин конструкцією *pGWB2-TPS2* найвищі показники ефективності та частоти регенерації пагонів в умовах селективного тиску було зафіксовано на 40 добу вирощування на середовищі зі зниженим вмістом цукрів – 5-10 г/л.

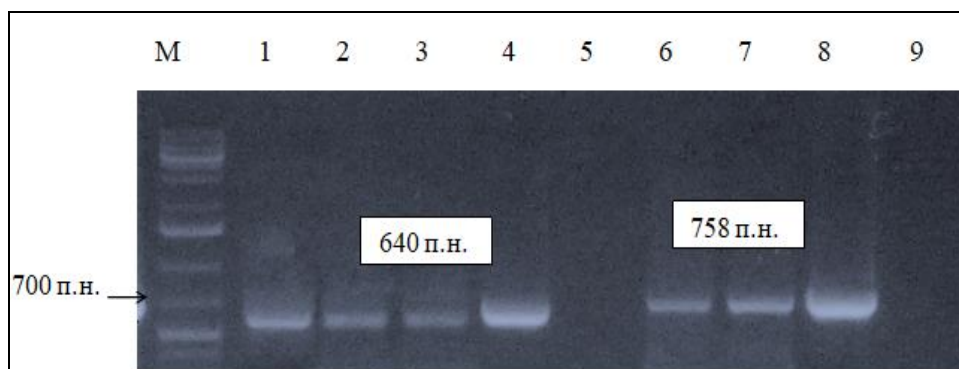


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин тютюну: М – маркер довжини фрагментів ДНК (1 kb); 1-3- ДНК ліній тютюну, трансформованих конструкцією *pGWB2-TPS1* (розмір амплікону 640 п.н.); 4 – позитивний контроль (конструкція *pGWB2-TPS1*); 5 – негативний контроль (ДНК контрольної нетрансформованої рослини); 6-7 – ДНК ліній тютюну, трансформованих конструкцією *pGWB2-TPS2* (розмір амплікону 758 п.н.); 8 – позитивний контроль (конструкція *pGWB2-TPS2*); 9 – негативний контроль (реакційна суміш для ПЛР без ДНК).

Найбільший показник частоти регенерації становив $73,5 \pm 2,34\%$ при вирощуванні на середовищі з глюкозою у концентрації 10 г/л, а найвищий показник ефективності регенерації – 4-5. На 60 добу вирощування на середовищі

для коренеутворення вдалося вкорінити $25 \pm 1,98\%$ пагонів при додаванні сахарози або глюкози після трансформації експлантів конструкцією *pGWB2-TPS1* та $20 \pm 2,78\%$ пагонів за використання *pGWB2-TPS2*.

Для підтвердження перенесення та інтеграції цільових генів в геном рослин тютюну було проведено їх ПЛР-аналіз. Нами було проаналізовано 50 ліній тютюну, стійких до гігromіцину. Інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2* було виявлено у 80% та 95% рослин, трансформованими, відповідно, конструкціями *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2* (Рис. 3). Розмір ампліфікованих фрагментів становив 640 п.н. (для гена *TPS1*) та 758 п.н. (для гена *TPS2*) (Рис. 4).

Таким чином, в результаті проведених досліджень продемонстровано можливість перенесення та успішну інтеграцію дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* в геном рослин тютюну за допомогою створених нами конструкцій *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2*. Виявлено чутливість відібраних трансгенних ліній тютюну до наявності певних цукрів у живильних середовищах для індукції пагоноутворення та укорінення рослин *N. tabacum*. Підібрано умови для підвищення частоти регенерації та для укорінення трансгенних рослин, що містять у своєму геномі цільові гени *TPS1* та *TPS2*.

Введення в культуру *in vitro* сортів пшениці м'якої української селекції. Перед тим, як проводити *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію, нами було розроблено підходи щодо введення в культуру *in vitro* та оцінено морфогенетичний потенціал семи досліджуваних в роботі сортів пшениці (Табл. 1). Як експланти в дослідженнях використовували незрілі зародки пшениці.

Таблиця 1

Оцінка морфогенетичного потенціалу експлантів (незрілих зародків) сортів пшениці м'якої при культивуванні *in vitro*

Досліджувані сорти пшениці	Частота утворення первинного калюсу, %	Частота утворення морфогенного калюсу, %	Частота регенерації пагонів, %
Вихованка	$95,5 \pm 2,31^*$	$53,2 \pm 1,21$	$35,9 \pm 0,96$
Зимоярка	$95 \pm 1,25$	$65 \pm 2,42^*$	$38 \pm 2,31^*$
Миронівська 67	$96,5 \pm 2,31^*$	$68 \pm 2,34^*$	$47 \pm 2,15^*$
Щедрість	$75 \pm 0,97$	$42,3 \pm 1,95$	$24 \pm 1,75$
Журавка Одеська	$82 \pm 0,76$	$55 \pm 1,35$	$25 \pm 1,53$
Кесарія Поліська	$85 \pm 1,08$	$65,3 \pm 1,3$	$38 \pm 1,21$
Мірхад	$92 \pm 1,98^*$	$67,8 \pm 1,56$	$43,9 \pm 0,76$

Примітка. $P^* \leq 0,05$.

У результаті було встановлено, що найвищі показники частоти утворення морфогенного калюсу характерні для сортів Миронівська 67 та Мірхад ($68 \pm 2,34$ та $67,8 \pm 1,56$ відповідно) (Рис. 5.), хоча для сортів Зимоярка та Кесарія Поліська вони також були досить високими.

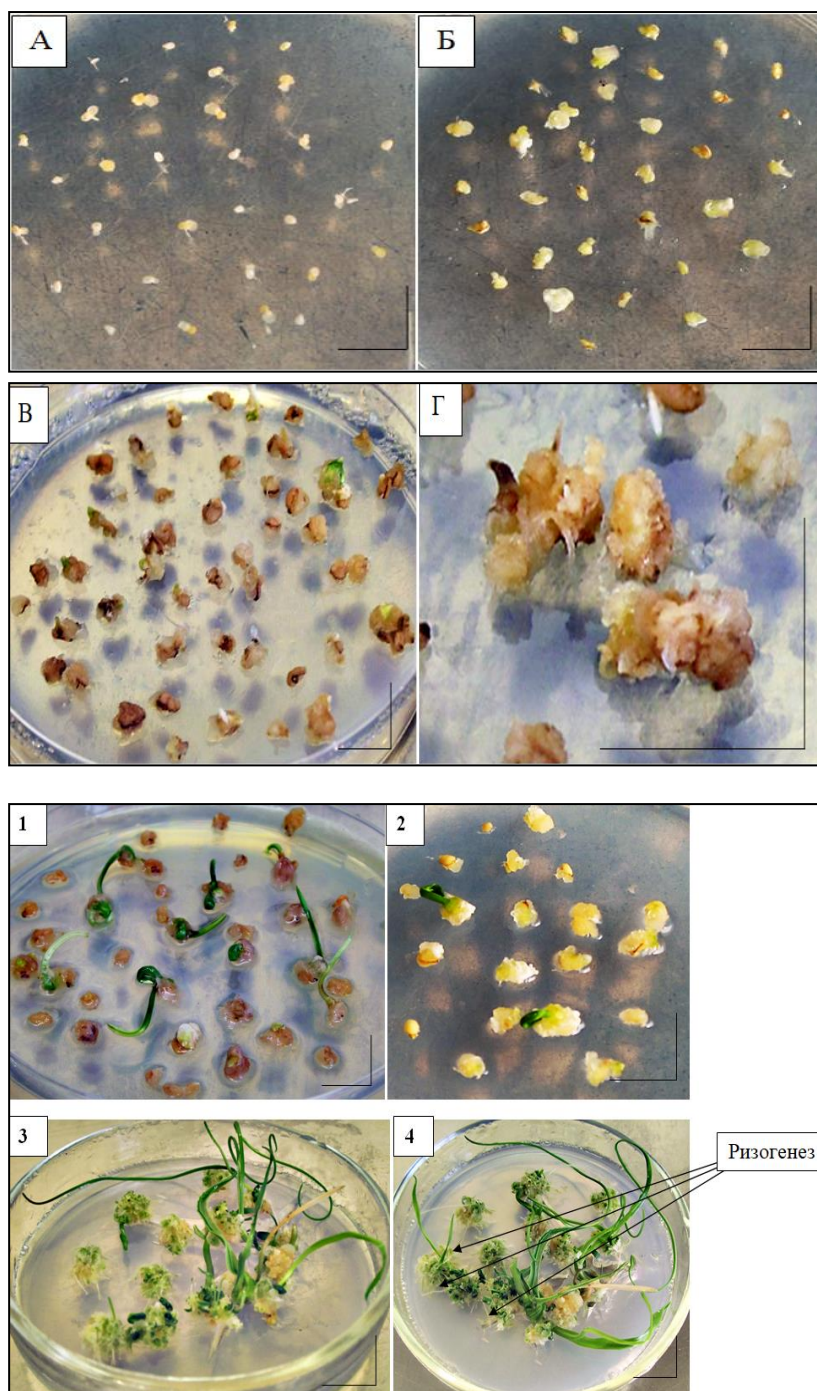


Рис. 5. Експланти пшениці на етапах введення в культуру *in vitro*:

А – ізолювані незрілі зародки сорту Мірхад розміром 0,8-1,5 мм; **Б** – експланти пшениці сорту Мірхад на 4-5 добу вирощування на середовищі МС, доповненому 2 мг/л 2,4-Д; **В** – формування морфогенного калюсу на експлантах пшениці сорту Мірхад, **Г** – морфогенний калюс пшениці сорту Мірхад через 14 діб культивування; **1, 2** – регенерація пагонів з калюсу пшениці сорту Миронівська 67; **3, 4** – регенерація та вкорінення пагонів пшениці сорту Миронівська 67 на через 30 діб культивування. Масштабні позначки - 1 см.

Також для цих сортів була характерна найвища частота регенерації пагонів ($47 \pm 2,15$ та $43,9 \pm 0,76$ відповідно), тоді як найнижчий показник відмічено у сорту Щедрість ($24 \pm 1,75$) (Табл. 1). У експлантів сортів

Миронівська 67 та Мірхад також спостерігали найвищі показники регенерації рослин у культурі *in vitro*.

Agrobacterium-опосередкована трансформація пшениці м'якої *in vitro*. У подальшому всі сім досліджуваних сортів пшениці, які попередньо було введено в культуру *in vitro*, було трансформовано генами *TPS1* та *TPS2* за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Найвищі показники частоти регенерації пагонів пшениці в умовах селективного тиску після трансформації конструкцією pBract214-*TPS1* було зафіксовано для сортів Вихованка та Зимоярка ($48,9 \pm 0,96\%$ та $40 \pm 2,31\%$, відповідно), тоді як після трансформації конструкцією pBract214-*TPS2* - для сортів Миронівська 67 та Вихованка ($48 \pm 2,69\%$ та $46,7 \pm 1,35\%$, відповідно). Для інших сортів цей показник був в межах від $24 \pm 1,75\%$

(сорт Щедрість) до $38 \pm 1,21\%$ (сорт Кесарія Поліська) за використання конструкції pBract214-TPS1 та від $33 \pm 0,58\%$ (сорт Кесарія Поліська) до $45 \pm 1,23\%$ (сорт Зимоярка) за використання pBract214-TPS2. Після 40 діб вирощування експлантів на середовищі МС відселектовані рослини, що зберегли життєздатність та мали нормальні (подібні до контролю) морфологічні ознаки, переносили на середовище для їх подальшого укорінення.

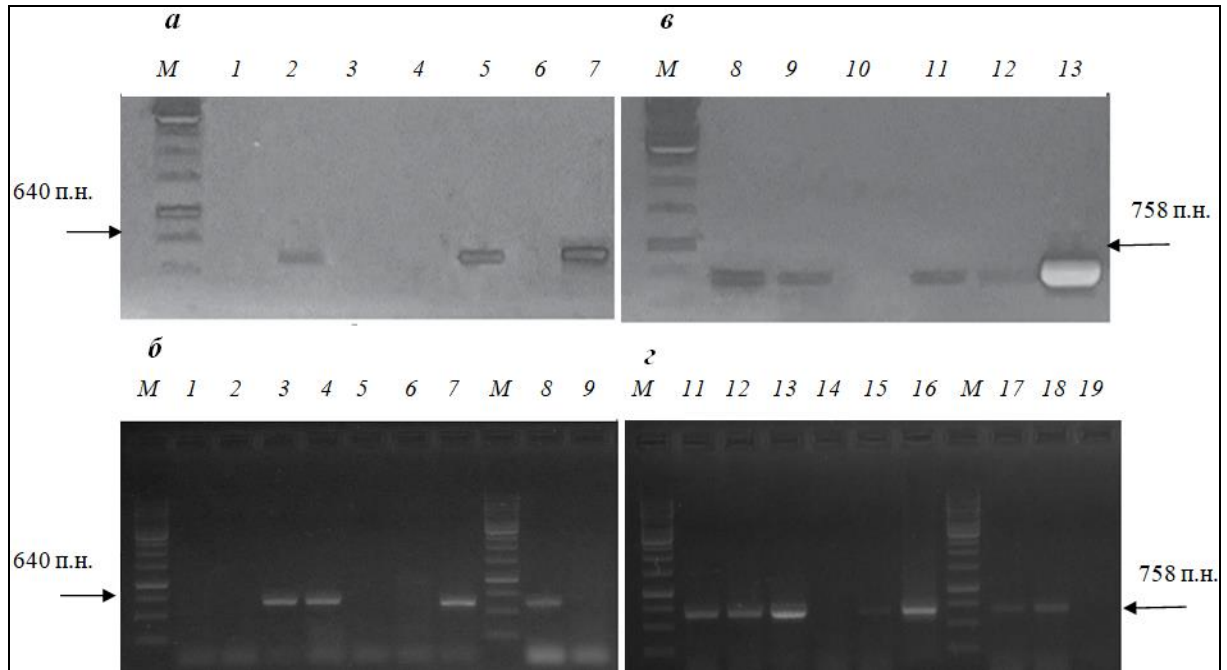


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній пшениці сортів Миронівська 67, Мірхад, Кесарія Поліська, Вихованка після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* конструкціями pBract214-TPS1 та pBract214-TPS2: **а, б** – з використанням праймерів до гена *TPS1* – М – маркер довжин фрагментів ДНК; **а** – 1, 3, 4, 6 – ДНК контрольних рослин сортів пшениці Мірхад та Миронівська 67, 2, 5 – ДНК ліній пшениці сортів Мірхад, Миронівська 67 відповідно, з геном *TPS1*, 7 – позитивний контроль (конструкція pBract214-TPS1, розмір амплікону - 640 п.н.); **б** – 1-2, 5-6 – ДНК контрольних рослин пшениці; 3-4 – ДНК ліній пшениці сортів Вихованка та Кесарія Поліська, що містили ген *TPS1*; 7 – позитивний контроль (pBract214-TPS1); 8 – ДНК пшениці після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-TPS1. **в** – з використанням праймерів до гена *TPS2*: **в** – М – маркер довжин фрагментів ДНК, 10 – ДНК контрольної лінії пшениці сорту Вихованка, 8,9,11,12 - ДНК ліній пшениці сортів Вихованка, Кесарія Поліська, що містили ген *TPS2*, 13 – позитивний контроль (pBract214-TPS2, розмір амплікону 758 п.н.), **г** - 11-13, 15 – ДНК ліній пшениці, що трансформовані *in vitro* конструкцією pBract214-TPS2; 16 – позитивний контроль (pBract214-TPS2, розмір амплікону - 758 п.н.); 17-18 – ДНК пшениці сорту Вихованка після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-TPS2.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих ліній пшениці було проведено їх молекулярно-генетичний аналіз. У результаті ПЛР-аналізу з

використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* було отримано фрагменти розміром 640 та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю. Таким чином, було досліджено морфогенетичний потенціал 7 сортів пшениці в культурі *in vitro* та проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію їх незрілих зародків конструкціями pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. Частота трансформації рослин пшениці за використання методу була в середньому на рівні 2,5% за використання конструкції pBract214-*TPS1* та приблизно 4% за використання конструкції pBract214-*TPS2* для всіх досліджуваних сортів.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці методом *in planta*.**

На наступному етапі досліджень було проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію п'яти сортів пшениці методом *in planta*. Після проведення трансформації та повного дозрівання насіння збирали колоси та досліджували їх морфологічні показники (Табл. 2; Рис. 7).

Таблиця 2

Морфологічні показники колосів пшениці після трансформації *in planta* конструкціями pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2*

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



Рис. 7. Етапи отримання трансгенного насіння пшениці після трансформації методом *in planta*: А – колоси після обробки суспензією агробактерії в індивідуальних ізоляторах, Б – колос контрольної рослини сорту Вихованка, В – кастрований колос після трансформації *in planta*, Г – зібране насіння пшениці після трансформації та достигання. Масштабна позначка – А – 10 см, Б, В, Г – 1 см.

Морфологічно колоси та насіння були без суттєвих відхилень в розвитку, насіння відрізнялось середньою наповнюваністю (Рис. 7). Варто зазначити, що

морфологічні показники (Табл. 2) порівнювали з контролем, яким слугували рослини кожного з сортів, кастровані та оброблені перед запиленням дистильованою водою замість *Agrobacterium*. Найвищий відсоток зав'язування насіння було виявлено для сорту Вихованка ($58\% \pm 1,7$), а найнижчий - для сорту Кесарія Поліська ($34\% \pm 1,23$). Після цього насіння висаджували у підготовлений ґрунт (суміш ґрунт:торф:пісок – 1:1:1) для їх подальшого молекулярно-генетичного аналізу та перевірку на стійкість до посухи.

З метою відбору трансгенних ліній пшениці та підтвердження перенесення цільових генів біосинтезу трегалозу до геномів рослин пшениці після трансформації *in planta* було проведено ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* (Рис. 6 та 8).

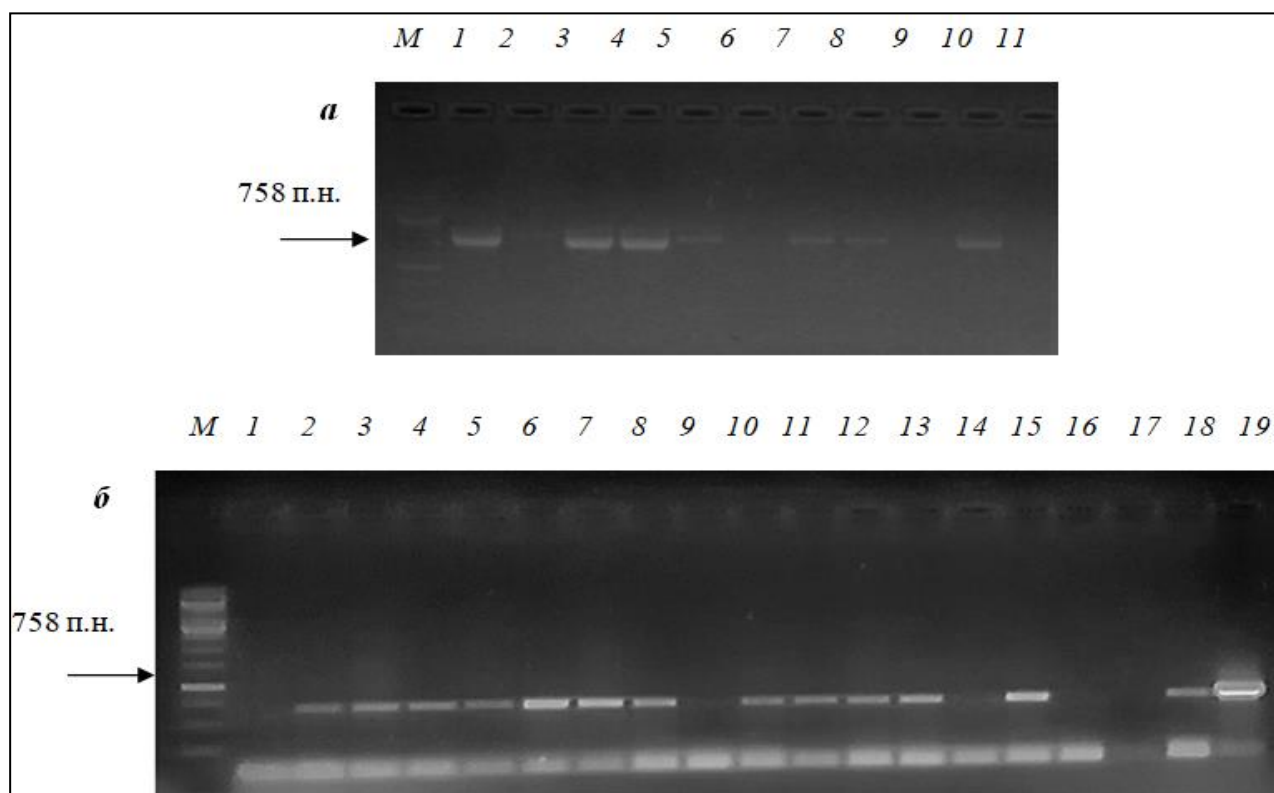


Рис. 8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин пшениці сортів Кесарія Поліська, Зимоярка, Вихованка, Журавка Одеська після трансформації конструкцією pBract214-TPS2: М – маркер довжин фрагментів ДНК; 2-8, 10-13, 15, 18– ДНК рослин пшениці, трансформованих методом *in planta* геном *TPS2* (розмір амплікону-758 п.н.); 10 - позитивний контроль (плазмідна ДНК).

З метою перевірки відсутності бактеріального зараження у досліджених зразках рослин пшениці було проведено їх молекулярно-генетичний аналіз з використанням специфічних праймерів до агробактеріального гена вірулентності *virD* (Рис. 9). У ліній пшениці з генами *TPS1*, *TPS2* фрагменту виявлено не було (Рис. 9).

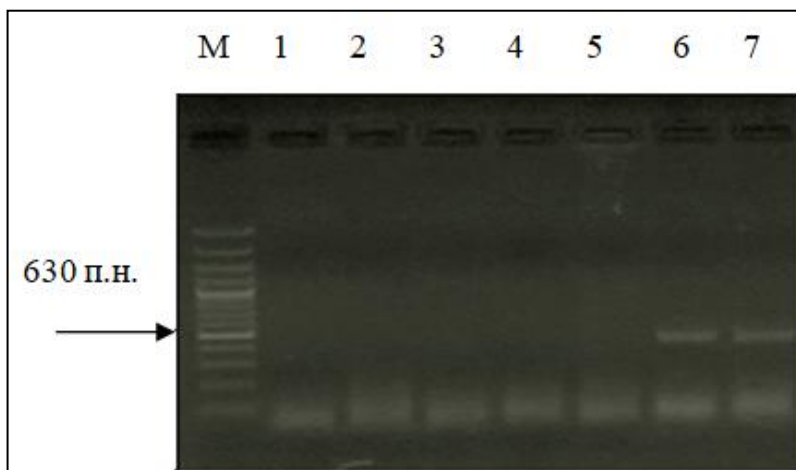


Рис. 9. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК трансгенних рослин пшениці: М – маркер довжин фрагментів ДНК, 1-5– ДНК трансгенних ліній пшениці з геном *TPS2*, 6-7– позитивний контроль - конструкція *pBract214-TPS2* (розмір амплікону-630 п.н.).

Таким чином, згідно отриманих даних частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих рослин) за допомогою методу *in vitro* з використанням конструкції *pBract214-TPS1* була в середньому на рівні 2,5% для кожного з досліджуваних сортів, з *pBract214-TPS2* – на рівні 4%. За результатами молекулярно-генетичного аналізу, найвищі показники частоти трансформації було зафіксовано для рослин сортів Вихованка, Зимоярка та Кесарія Поліська. Частота трансформації досліджуваних сортів пшениці за використання методу *in planta* була рівні 2-6,5% (для обох конструкцій).

Аналіз посухостійкості трансгенних рослин пшениці та визначення вмісту трегалози. Отримане насіння пшениці було висаджено в умови закритого ґрунту для оцінки показників росту контрольних та трансгенних рослин, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta*, за нормальних умов та змодельованої посухи (Дубровна та ін., 2019).

На початку дослідження з посухостійкості відібрані лінії пшениці, які було висаджено в однакові з контрольними рослинами умови, розвивались без помітної різниці та без затримки росту. До початку виходу в листову трубку рослини переводили на зменшений полив. Нами було зафіксовано якісні відмінності між трансформованими та контрольними рослинами, що зростали в умовах посухи та за умов повної вологоємності ґрунту (100% ПВГ) (Рис. 10).

Після досягання насіння рослин пшениці їх збирали та аналізували морфологічні показники (Рис. 11 та 12). Встановлено, що середня довжина головного колосу пшениці сорту Зимоярка становила $10,38 \pm 0,38$ см за умов посухи. Цей показник був на рівні середньої довжини колосів контрольних рослин пшениці того ж сорту як за умов 30% ПВГ, так і за умов 100% поливу. Проте кількість насіння в головному колосі була більшою на $37\% \pm 0,05$ ($31,2 \pm 1,44$ шт.), а маса зерна з головного колосу більшою на $23\% \pm 0,05$ ($1,007 \pm 0,52$ г) порівняно з контролем, який зростав за умов змодельованої посухи (30% ПВГ).

Для рослин пшениці сорту Вихованка, що вирощували за умов посухи, показники довжини головного колосу були меншими порівняно з відповідними показниками у контрольних рослин ($10,6 \pm 0,21$), однак кількість зерна з головного колосу була більшою на $40\% \pm 0,06$ ($19,3 \pm 0,81$ шт.), а маса зерна - $0,522 \pm 0,53$ г.

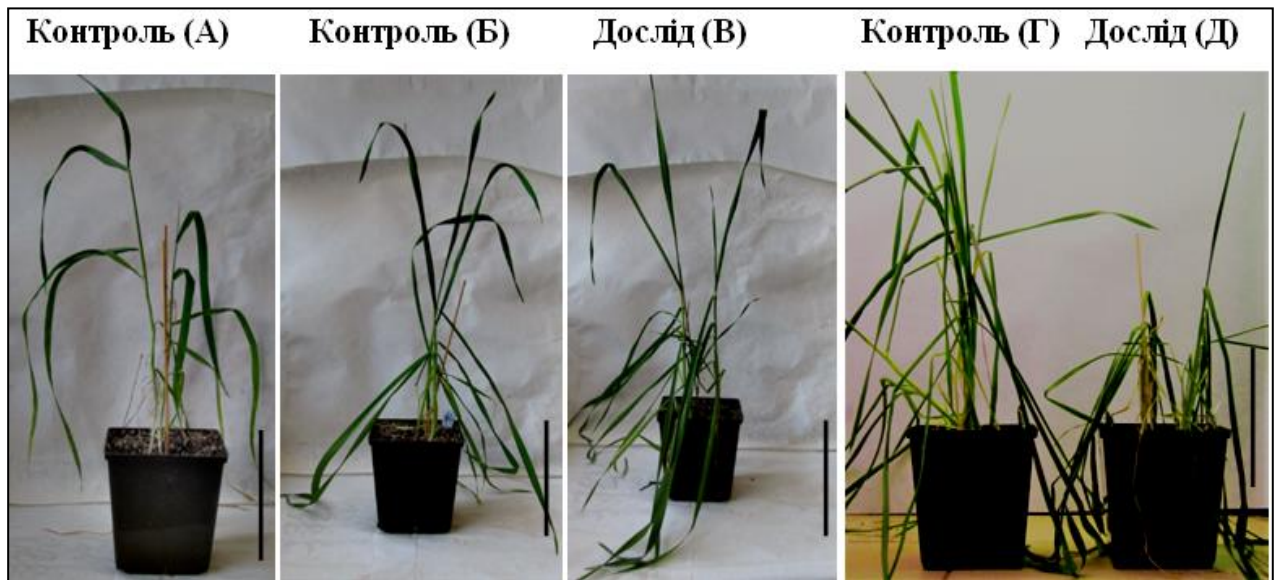


Рис. 10. Загальний вигляд рослин пшениці при дослідженні їх стійкості до експериментально змодельованої посухи (А, Б, В – 7-а доба вирощування; Г, Д – 14-а доба вирощування): А – контрольна рослина сорту Вихованка (50% ПВГ), Б – контрольна рослина сорту Вихованка за умов 100% ПВГ, В – трансгенна рослина сорту Вихованка, трансформована геном *TPS2* (50% ПВГ); Г – контрольна рослина сорту Вихованка (40% ПВГ), Д – трансгенна рослина сорту Вихованка – з геном *TPS2* (40 % ПВГ). Масштабна позначка – 20 см.



Рис. 11. Колоси та насіння контрольних та трансгенних рослин пшениці, зібрані після вирощування за умов посухи (30 % ПВГ): А, В – колоси та насіння контрольних рослин пшениці сорту Кесарія Поліська; Б, Г – колоси та насіння трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка, трансформованих геном *TPS2*. Масштабна позначка – 1 см (В, Г) та 5 см (А, Б).

Таким чином, отримані дані вказують про підвищену стійкість відібраних трансгенних рослин пшениці з генами *TPS1* та *TPS2* до посухи. Варто зазначити, що відсоток фертильності отриманих ліній рослин був вищим і становив 85%, в той час, як для контрольних рослин характерними були низький показник зав'язування насіння та вищий відсоток стерильності – 40%.

Нами також було визначено вміст трегалози в трансгенних та контрольних рослинах (Табл. 3).

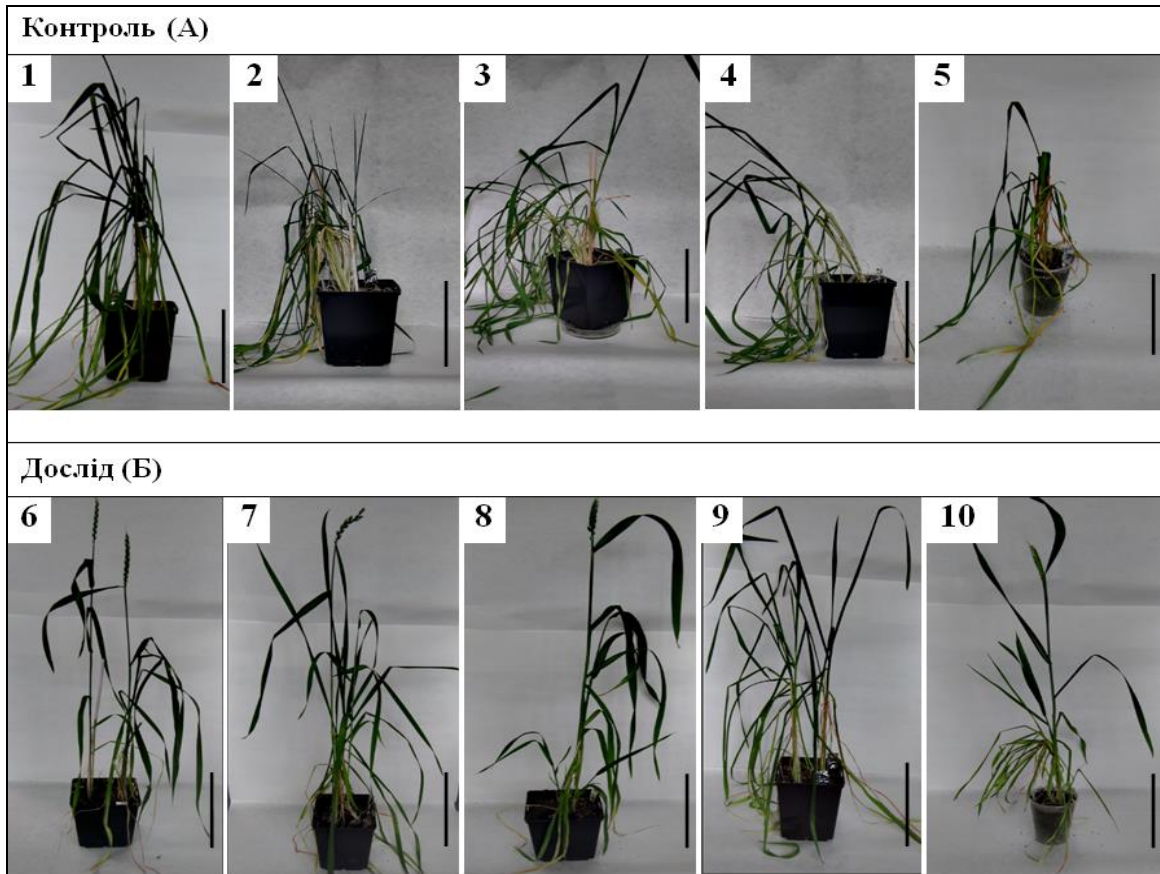


Рис. 12. Загальний вигляд рослин пшениці через 30 діб вирощування в умовах посухи (30% ПВГ): **А** – контрольні (нетрансгенні) рослини: 1 – пшениця сорту Зимоярка, 2 - 3 – пшениця сорту Вихованка, 4 – 5 – пшениця сорту Кесарія Поліська; **Б** – трансгенні рослини, у яких було підтверджено інтеграцію в геномі генів *TPS1* та *TPS2*: 6 – 8 – лінії пшениці сорту Зимоярка, трансформовані геном *TPS2*, 9 – пшениця сорту Вихованка, трансформована геном *TPS2*, 10 – пшениця сорту Кесарія Поліська, трансформована геном *TPS1*. Масштаб – 20 см.

Таблиця 3

Вміст (мг на 1г сирої маси) трегалози в тканинах контрольних та трансгенних ліній рослин пшениці з геном *TPS2*

Варіант	Зимоярка	Вихованка	Кесарія Поліська
Контроль (-)	0,058	0,060	0,071
Контроль (+)	0,131±0,07	0,139±0,05	0,150±0,07
P(-)	0,158±0,05	0,170±0,05	0,165±0,05
P(+)	0,290±0,08	0,303±0,06	0,198±0,08

Контроль (-) – контрольні рослини пшениці відповідного сорту (100% ПВГ); контроль (+) – контрольні рослини пшениці (30% ПВГ); P(-) – трансформовані рослини пшениці відповідного сорту (100% ПВГ); P(+) – трансформовані рослини пшениці, що зростали в умовах посухи (30% ПВГ).

Так, у контрольних (нетрансгенних) рослинах пшениці, що не зазнавали дії посухи, вміст трегалози становив 0,058-0,075 мг на 1 г сирової маси (Табл. 3), тоді як при вирощуванні контрольних рослин в умовах посухи (30% ПВГ) - 0,130-0,150 мг на 1 г сирової маси. У трансгенних рослин, для яких було підтверджено інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2*, за умов 100% ПВГ вміст трегалози був вищим порівняно з контролем і становив від 0,15-0,17 мг на 1 г сирової маси.

Також нами було проведено дослідження щодо успадкування цільових генів в наступному поколінні трансгенних рослин. Зокрема, у трансгенної рослини сорту Вихованка, для якої підтверджено інтеграцію в геном гена біосинтезу трегалози *TPS2*, було зібране насіння, пророщено (Рис. 13), та проведено перевірку щодо успадкування гена *TPS2* у наступному поколінні (Рис. 14). При проведенні ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів до гена *TPS2* було підтверджено успадкування гена *TPS2* в наступному поколінні пшениці сорту Вихованка.



Рис. 13. А – загальний вигляд трансгенної лінії пшениці сорту Вихованка, отриманої після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-TPS2, Б – колос цієї лінії та В – насіння першого покоління. Масштабна мітка: А – 20 см, Б – 5 см, В – 1 см.

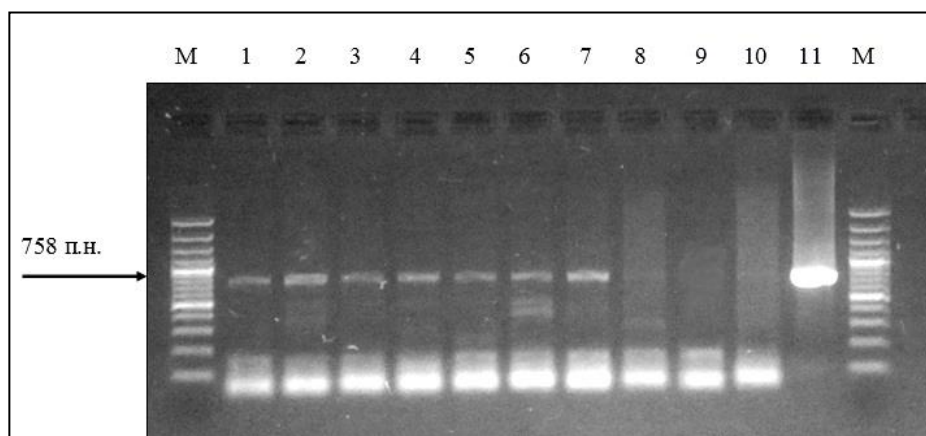


Рис. 14. Електрофореграма продуктів ампліфікації: М – маркер довжин фрагментів ДНК; 1-7 - ДНК зразків пшениці покоління сорту Вихованка (розмір амплікону 758 п.н.); 8-10 – негативний контроль, 11 – позитивний контроль

(конструкція pBract214-TPS2, розмір амплікону- 758 п.н.).

Таким чином, за результатами проведених досліджень з перенесення дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* методами *in vitro* та *in planta* було створено лінії пшениці, які характеризувались підвищеною посухостійкістю.

Також, було показано підвищення концентрації трегалози в тканинах трансформованих ліній рослин як за умов достатнього поливу, так і за модельованої посухи.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи створено векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Підтверджено їх перенесення та інтеграцію до геномів рослин тютюну (модельного об'єкту) та пшениці м'якої української селекції з використанням методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*. Проведений аналіз створених рослинних ліній вказує на підвищену стійкість до умов посухи.

1. Створено векторні конструкції *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2*, що несуть в собі цільові дріжджові гени біосинтезу трегалози під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S) та селективні маркерні гени *ntpII* (неоміцин-фосфотрансферази II) і *hpt* (гігromіцин-фосфотрансферази), а також конструкції *pBract214-TPS1* та *pBract214-TPS2* з генами біосинтезу трегалози під контролем промотору убіхвітину кукурудзи (PUbi) та селективним маркерним геном *hpt* (гігromіцин-фосфотрансферази).

2. Ефективність конструкції *pGWB2-TPS1* та *pGWB2-TPS2* було перевірено на модельній рослині – тютюні (*N. tabacum*) за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Підібрано умови регенерації та вкорінення отриманих трансгенних ліній тютюну.

3. Введено в культуру *in vitro* 7 сортів пшениці м'якої української селекції, для 6 сортів (Вихованка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад) вперше досліджено їх морфогенетичний потенціал в культурі *in vitro*.

4. За допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методами *in vitro* та *in planta* вперше перенесено дріжджові гени *TPS1* та *TPS2* в геном рослин пшениці. Встановлено, що трансгенні рослини пшениці з генами *TPS1* та *TPS2* характеризуються підвищеною стійкістю до посухи.

5. Шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* отримано рослини пшениці м'якої української селекції з цільовими генами біосинтезу трегалози.

6. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було підтверджено перенесення цільових генів *TPS1* та *TPS2* до геномів рослин тютюну та пшениці м'якої.

7. Встановлено, що отримані трансгенні рослини пшениці з генами *TPS1* та *TPS2* характеризуються підвищеною стійкістю до посухи. За розвитку рослин в умовах змодельованої посухи показано збереження кількісних показників формування зерна та його нормального розвитку, збільшення довжини колосу, висоти експериментальних рослин в порівнянні з контролем.

8. Виявлено підвищення вмісту трегалози в трансгенних рослинах пшениці, вирощених як за умов посухи, так і за нормальних умов, у порівнянні з контрольними рослинами.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Yatshyn V.Yu., **Kvasko A.Yu.**, Yemets A.I. Genetic approaches on the role of trehalose in plants. *Cytol. Genet.* 2017; 51(5): 371-383. *(Здобувачем разом зі співавторами опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
2. **Кваско А.Ю.**, Ісаєнков С.В., Краснопорова О.Є., Дмитрук К.В., Ємець А.І Генетична трансформація *Nicotiana tabacum* дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Вісн. Укр. Тов.-ва генетиків та селекціонерів. 2019. 18(2):8–16. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*
3. **Кваско А. Ю.**, Ісаєнков С.В., Дмитрук К.В., Ємець А.І. Створення рослин пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2020. 6:92–100. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.06.09>. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю)*
4. **Kvasko A.Yu.**, Isayenkov S.V., Dmytruk K.V., Sibirny A.A., Blume Ya. B., Yemets A.I. Obtaining of wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with yeast genes of trehalose biosynthesis. *Cytol. Genet.* 2020. 54(4): 283–292. doi: 10.3103/S0095452720040088. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю)*
5. Yatsyshyn V., Krasnoperova O., **Kvasko A.**, Luzhetskyi T., Dmytruk K., Isayenkov S., Sibirny A., Yemets A. Genetic engineering of drought resistant cereals by introducing the trehalose biosynthesis genes from *Saccharomyces cerevisiae*. Abstract of the International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology. (Odesa, october 2–6, 2016) – p. 57.
6. Yatsyshyn V., Krasnoperova O., **Kvasko A.**, Luzhetskyi T., Dmytruk K., Isayenkov S., Sibirny A., Yemets A. Genetic engineering of drought resistant cereals via derepression of *Saccharomyces cerevisiae* genes of trehalose biosynthesis. Abstract of the International Scientific Conference «Achievements and Prospects of Microbiology», october 12–14, Lviv, 2016, p. 107.
7. **Кваско А.Ю.**, Ємець А.І. Калюсогенез та регенерація зрілих зародків пшениці (*Triticum aestivum* L.). Збірник тез доповідей III Конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 16–18 травня, м.Київ, 2017 р., с. 69.
8. **Кваско А.Ю.**, Ємець А.І. Оптимізація складу живильного середовища для індукції калюсогенезу зрілих зародків пшениці (*Triticum aestivum* L.). Збірник тез доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня, м.Львів, 2017р., с. 99.
9. **Кваско А.Ю.**, Ємець А.І. Оптимізація складу живильного середовища для підвищення ефективності калюсогенезу з різних експлантів пшениці (*Triticumaestivum*L.) Збірник тез доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, 10–12 квітня, м.Львів, 2018 р., с.136.
10. **Кваско А.Ю.**, Ісаєнков С.В., Дмитрук К.В., Ємець А.І Створення рослин тютюну (*N. tabacum*) та пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Збірник тез доповідей

XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки BioScienceAdvances»: 23–25 квітня, м. Київ, 2020р., с. 23.

11. **Kvasko A.Yu.**, Isayenkov S.V., Dmytruk K.V., Yemets A.I. *In planta* transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. Abstract of the XIV All-Ukrainian Conference of Young Scientists IMBG, 27-28 may, Kyiv, 27-28, 2020, p. 13.

АНОТАЦІЯ

Кваско А.Ю. Створення посухостійких ліній пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

Дисертаційна робота присвячена створенню посухостійких ліній пшениці м'якої української селекції методами *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* з використанням генетичних векторних конструкцій з генами біосинтезу трегалози дріжджів *TPS1* та *TPS2*.

За допомогою методики Gateway-клонування створено генетичні векторні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*: pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* та pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2*. Проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію тютюну – модельного рослинного об'єкту з конструкціями pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S). Для генетичної трансформації пшениці м'якої використовували вектори pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2* під контролем сильного конститутивного промотору убіхвітину кукурудзи (PUBi). Нами було введено в культуру *in vitro* сім сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад, з метою найвищими показниками морфогенетичного потенціалу. Було здійснено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію *in vitro* відібраних сортів пшениці. Вперше було проведено трансформацію пшениці методом *in planta* з використанням п'яти сортів пшениці української селекції. Трансгенну природу рослин тютюну та пшениці було підтверджено молекулярно-генетичним аналізом. У результаті проведеного ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* було отримано фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю (векторним конструкціям з генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно). Аналіз отриманих ліній пшениці показав підвищену стійкість до посухи створених рослин.

Ключові слова: трегалоза, трегалозо-6-фосфат, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, *in planta* трансформація, пшениця м'яка, *Triticum aestivum* L.

SUMMARY

Kvasko A. Yu. Creation of drought tolerant wheat lines with yeast trehalose biosynthesis genes. –Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the creation of drought tolerant bread wheat lines of Ukrainian varieties by *Agrobacterium*-mediated transformation methods *in vitro* and *in planta* using genetic vectors containing yeast trehalose biosynthesis genes *TPS1* and *TPS2*.

Genetic vectors containing yeast trehalose biosynthesis genes *TPS1* and *TPS2*: pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* and pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* were created using the Gateway-cloning method. *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco, as a model plant, with vectors pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* under control of the cauliflower mosaic virus promoter (P35S) was conducted. The vectors pBract214-*TPS1* and pBract214-*TPS2* with target genes *TPS1* and *TPS2* under control of a strong constitutive maize ubiquitin promoter (PUBi) were used for genetic transformation of bread wheat. In order to determine the highest morphogenetic potential *in vitro* culture of seven varieties of Ukrainian bread wheat: Vykhovanka, Zymoyarka, Myronivska 67, Shchedrist, Zhuravka Odesa, Kesaria Poliska and Mirhad were established. *Agrobacterium*-mediated transformation of these selected wheat varieties was conducted. For the first time, five varieties of Ukrainian bread wheat were transformed using *in planta* method. Using molecular genetic analysis presence of transgenes in tobacco and wheat plants was confirmed. PCR analysis with specific primers for *TPS1* and *TPS2* genes resulted in fragments of 640 bp and 758 bp corresponding to positive control (vector constructs with *TPS1* and *TPS2* genes, respectively). Analysis of the obtained wheat lines showed increased drought tolerance of the plants.

Key words: trehalose, trehalose-6-phosphate, *Agrobacterium*-mediated transformation, *in planta* transformation, bread wheat, *Triticum aestivum* L.

Підписано до друку 11.03.2021 р. Зам. № 94.
Формат 60х84 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
095-941-84-99, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net