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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КВАСКО АННА ЮРІЇВНА

УДК:57.085.2:577.21

СТВОРЕННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ З ДРІЖДЖОВИМИ ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.
_____А.Ю.Кваско

Науковий керівник: Ємець Алла Іванівна, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Кваско А.Ю. Створення посухостійких ліній пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. – Кваліфікаційна наукова праця 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», Київ, 2020.

Дисертаційну роботу присвячено створенню генетичних векторних конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* термофільних дріжджів для отримання посухостійких ліній пшениці методами *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*. З метою перенесення дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* в рослини за допомогою методики Gateway-клонування було створено 4 векторні конструкції: дві з них - pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* – які несуть, відповідно, гени *TPS1* та *TPS2* під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S), селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину, та ген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину, у рослин; дві інші конструкції - pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* – містять цільові гени *TPS1* та *TPS2,* відповідно, під контролем промотору убіхвітину кукурудзи (PUbi) і селективний маркерний ген *hpt*. Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин конструкції переносили у штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 методами хімічної трансформації. Ефективність конструкцій pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* перевіряли на модельній рослині *Nicotiana tabacum*. Конструкції pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* з бінарним вектором pBract214 та цільовими генами *TPS1* та *TPS2* під контролем сильного конститутивного промотору убіхвітину кукурудзи PUbi було використано виключно для трансформації однодольних рослин, зокрема пшениці м’якої української селекції.

У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну за використання конструкцій pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* на 14 добу регенерації

пагонів в умовах селективного тиску було встановлено, що показники частоти регенерації пагонів були на рівні 86,5±1,78%* та 53,3±1,09% відповідно, а ефективність регенерації - 4 та 5 регенерованих пагонів на експлант, тоді як у контролі цей показник (частота регенерації пагонів) сягав 95±2,35%* і у всіх пагонів спостерігали утворення коренів на відміну від трансгенних ліній, ефективність регенерації – 5 - 7.

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, нами було проведено додаткове дослідження по підбору 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 для регенерації. 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±3,23% на середовищі з 45 г/л сахарози, а найбільший показник ефективності регенерації - 4 добре розвинених регенерованих 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±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. Найбільший показник частоти регенерації становив

73,5±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±1,98% пагонів при додаванні сахарози або глюкози після трансформації експлантів конструкцією pGWB2-*TPS1* та 20±2,78% пагонів за використання pGWB2-*TPS2*. Для підтвердження перенесення та інтеграції цільових генів в геном рослин тютюну було проведено їх ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2*. Нами було проаналізовано 50 лінії тютюну, стійких до гігроміцину. Інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2* було виявлено у 80% та 95% рослин, трансформованими, відповідно, конструкціями pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2*. Розмір ампліфікованих фрагментів становив 640 п.н. (для гена *TPS1*) та 758 п.н. (для гена *TPS2*).

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*.

На початковому етапі дослідження для підвищення ефективності отримання трансгенних рослин пшениці 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 відбору тих, які б характеризувалися найвищими показниками морфогенетичного потенціалу, а саме здатністю до ефективної регенерації рослин *in vitro*. Як експланти використовували незрілі зародки. Найвищі показники утворення морфогенного калюсу було зафіксовано для сортів Миронівська 67 та Мірхад (68 ± 2,34 та 67,8 ± 1,56 відповідно), хоча для сортів Зимоярка та Кесарія Поліська ці значення також

були досить високими. Також для цих сортів була характерна найвища частота регенерації пагонів (47 ± 2,15 та 43,9 ± 0,76 відповідно), тоді як найнижчий показник відмічено у сорту Щедрість (24 ± 1,75).

Перераховані сорти пшениці нами було використано у біотехнологійних роботах вперше, окрім сорту Зимоярка. Незважаючи на те, що досліджувані сорти мали різні морфогенетичні показники, всі вони були використані в дослідах по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Так, найвищі показники частоти регенерації пагонів в умовах селективного тиску після трансформації конструкцією pBract214-*TPS1* було виявлено для сортів Вихованка та Зимоярка (48,9±0,96 та 40±2,31 відповідно), тоді як після трансформації конструкцією pBract214-*TPS2* - для сортів Миронівська 67 та Вихованка - 48±2,69 та 46,7±1,35, відповідно. Для всіх інших сортів цей показник коливався в межах від 24±1,75% (сорт Щедрість) до 38±1,21% (сорт Кесарія Поліська) за використання конструкції pBract214-*TPS1* та від 33±0,58% (сорт Кесарія Поліська) до 45±1,23% (сорт Зимоярка) за використання pBract214-*TPS2*. Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин пшениці було проведено молекулярно-генетичний аналіз. У результаті ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* було отримано фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають за розміром (в п.н.) позитивним контролям.

За використання методу *in planta* можуть існувати певні сезонні обмеження, проте, цей метод має багато переваг, тому актуальним для нашої роботи був підбір умов трансформації, складу живильних середовищ, а також, способу селекції рослин після трансформації, що був би оптимальним при мінімальних зусиллях та витратах. Саме тому, нами вперше були проведені дослідження по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* в геном пшениці методом трансформації *in planta*. Після проведення трансформації *in planta* з використанням 5 сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Кесарія Поліська, Журавка Одеська, та Щедрість, було проведено морфологічну оцінку зібраних колосків. Найвищий

відсоток зав'язування насіння було зафіксовано для сорту Вихованка (58%±1,7), а найнижчий для сорту Кесарія Поліська (34%±1,23). Морфологічно колоси та насіння були без суттєвих відхилень в розвитку, насіння відрізнялось середньою наповнюваністю. Після оцінки морфологічних показників зібраних колосків та пшениці після агробактеріальної трансформації *in planta*, насіння було висаджено в у підготовлений однорідний грунт (суміш грунт:торф:пісок – 1:1:1) та проведено молекулярно-генетичний аналіз рослин. У результаті ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* було також отримано фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю (векторним конструкціям з генами *TPS1* та *TPS2,* відповідно). За отриманими даними частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих рослин) за допомогою методу *in vitro* з використанням конструкції pBract214-*TPS1* була в середньому на рівні 2,5% для кожного сорту, з pBract214-*TPS2* – на рівні 4%. Для трансформації методом *in planta* показники частоти трансформації були на рівні 2-6,5% для обох конструкцій.

Оскільки, метою нашого дослідження було створення посухостійких рослин для вирішення поставленої мети було проведено дослідження стійкості створених ліній рослин пшениці до посухи. Дослідження з посухостійкості рослин пшениці, контрольних та отриманих після трансформації *in planta*, проводили в умовах закритого грунту. Для імітації посухи було обрано період до виходу з прапорцевого листка і до дозрівання насіння, що тривав близько місяця, в залежності від сорту. Для створення умов посухи рослини переводили на обмежений полив, перший тиждень – 50% від повного стовідсоткового постачання води, другий тиждень – 40%, та останній тиждень - 30%. За цих умов оцінювали морфологічні показників рослин та параметри врожаю, зокрема, висоту рослин, довжину головного колоса, кількість зерен з головного колоса, масу зерен з головного колосу (МЗГК). Отримані дані свідчать про збільшену резистентність отриманих рослин пшениці до посухи порівняно з контрольними рослинами.

Було проведено кількісний вимір трегалози у листах контрольних та трансгенних рослин пшениці, що зростали за умов нормального поливу та за умов змодельованої посухи. У трансгенних рослин за стресових умов концентрація трегалози збільшувалась від 0,158 до 0,305 мг на 1 г сирої ваги, тоді як за умов достатнього поливу вона не відрізнялась від контролю. Таке підвищення може бути результатом експресії перенесених дріжджових генів біосинтезу трегалози.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Yatsyhyn 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., Краснопьорова 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 ІІІ 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 (*TriticumaestivumL*.) 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.

SUMMARY

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

The thesis for a candidate of biological science degree in speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The thesis is devoted to the creation of constract genetic vectors with *TPS1* and *TPS2* yeast genes of trehalose biosynthesis for obtaining of drought resistant, agronomically important soft wheat varieties of Ukrainian selection using *Agrobacterium*-mediated *in vitro* and *in planta* transformation methods.

Gateway-cloning method was applied to construct genetic vectors with *TPS1* and *TPS2* trehalose biosynthesis genes: pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* under the control of cauliflower mosaic virus promoter - P35 and selective marker gene *hptII* - hygromycin phosphate transferase; pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* under the control of the pUbi maize ubiquitin promoter and the selective marker gene *hptII* - hygromycin phosphate transferase. Thus, the created vectors with target genes of trehalose biosynthesis under control of cauliflower mosaic virus P35S promoter were used for genetic transformation of model plant – tobacco, and vectors for monocotyledonous plants pBract214 with target genes *TPS1* and *TPS2* under the control of a strong constitutive maize ubiquitin promoter PUbi were used for further genetic transformation of soft wheat. The created vectors were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 for further use in plant transformation.

Genes from the constructed pGWB2-*TPS1* and pGWB2-*TPS2* vectors were successfully incorporated into model plant - tobacco (*N. tabacum*) using the *Agrobacterium*-mediated plant transformation method and the leaf disk transformation technique. After transformation a delay in shoot development was observed in transformed plants in 30-40 days of cultivation on the regeneration medium compared to

the control plants, as well as after transfer to the rooting medium a delay of root formation in transformed plants was observed compared to the control.

In order to increase shoot regeneration and root induction rate after transformation of tobacco optimal content and type of carbon sources in nutrient medium were studied. After plant transformation, explants were cultured on MS medium supplemented with different concentrations (0 - 45 g/l) of various sugars: sucrose, glucose and maltose. The highest rates of regeneration frequency and transformation efficiency for pGWB2-*TPS1* vector were observed in plants regenerated on media with sucrose, maltose or glucose at concentrations range from 25 to 45%. Under these conditions, the highest rate of regeneration frequency under selective pressure was 88.5 ± 3.23% on a medium with 45 g/l of sucrose, and the highest rate of transformation efficiency – 4 well-developed regenerated shoots per explant. After plant transformation with the pGWB2-*TPS2* vector, the highest efficiency and regeneration rate under selective pressure were observed in 40 days of cultivation on medium with low sugar content - 5-10 g/l. The highest regeneration rate was 73.5 ± 2.34%, and the highest rate of regeneration efficiency appeared to be 4 and 5 well-developed regenerated shoots per explant. On medium containing maltose at concentration 25-30 g/l efficiency regeneration was also lower, on average 2-3 regenerated shoots per explant. Growth retardation was observed when explants were cultured on media with sucrose or glucose at concentrations 25-45 g/l.

After determination of optimal conditions for cultivation of transformed tobacco plants resulting in obtaining of plant material for further molecular- genetic analysis, specific primers to the *TPS1* and *TPS2* genes were used to confirm transfer of target trehalose biosynthesis yeast genes to the genomes of selected plants. As a result of PCR analysis, the expected fragments of 640 bp (*TPS1*) and 758 bp (*TPS2*) were obtained, which correspond to the positive control.

In order to increase the efficiency of obtaining transgenic wheat plants *in vitro* culture of seven varieties of soft Ukrainian wheat was established at the begining of the study, namely: Vykhovanka, Zymoyarka, Myronivska 67, Shchedrist, Zhuravka Odesa,

Kesaria Poliska and Mirhad. Varieties were studied and those of the highest morphogenetic potential and ability to effectively regenerate plants *in vitro* were determined. Immature embryos were used as explants. The highest rates of morphogenic callus formation were recorded for cultivars Myronivska 67 and Mirhad (68 ± 2,34 and 67,8 ± 1,56, respectively), although for cultivars Zymoyarka and Kesaria Poliska these parameters were significant as well. These varieties were also characterized by the highest shoot regeneration rate (47 ± 2,15 and 43,9 ± 0,76, respectively), while the lowest rate was observed in the variety Shchedrist (24 ± 1,75).

Except for the variety Zimoyarka these varieties of wheat were used for the first time in biotechnological studies. Despite the fact that studied varieties had different morphogenetic parameters, all of them were used in experiments on *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro* with *TPS1* and *TPS2* genes. Thus, the highest shoot regeneration rate under selective pressure after transformation by pBract214-*TPS1* vector was recorded for varieties Vykhovanka and Zymoyarka (48,9 ± 0,96 and 40 ± 2,31, respectively), while after transformation by vector pBract214-*TPS2* - the highest shoot regeneration rate under selective pressure after transformation for varieties Myronivska 67 and Vykhovanka (48 ± 2,69 and 46.7 ± 1,35 respectively). For other varieties rates of shoot regeneration ranged from 24 ± 1.75% (variety Shchedrist) to 38 ± 1,21% (variety Kesaria Poliska) using the vector pBract214-*TPS1* and from 33 ± 0,58% (variety Kesaria Poliska) up to 45 ± 1,23% (Zymoyarka variety) using vector pBract214-*TPS2*. Molecular genetic analysis confirmed the transgenic nature of the obtained wheat plants. PCR analysis with specific primers for the *TPS1* and *TPS2* genes resulted in fragments 640 bp and 758 bp, which correspond to the positive controls.

In spite of some seasonal restrictions of *in planta* method this method has many advantages. It was important for our work to select the conditions of plant transformation, media composition, as well as the method of transformed plant selection after transformation, which would be optimal with minimal efforts and costs. For the first time we conducted research on the transfer of the *TPS1* and *TPS2* genes into wheat genome by *in planta* transformation method. After transformation *in planta* of 5 soft

wheat varieties of Ukrainian selection: Vykhovanka, Zymoyarka, Kesariya Poliska, Zhuravka Odesa, and Shchedrist, a morphological study of the collected spikelets was performed. The highest percentage of seed development was recorded for the cultivar Vykhovanka (58% ± 1,7), and the lowest for the cultivar Kesariya Poliska (34% ± 1,23). Morphologically, spikelets and grains showed no significant deviations in development and weight.

After analysis of morphological parameters of harvested spikelets and grains after *Agrobacterium* – mediated transformation *in planta*, the seeds were planted in vegetation pots in homogeneous soil mixture (soil: peat: sand - 1: 1: 1) and molecular-genetic analysis of plants was performed. As a result of PCR analysis with specific primers for the *TPS1* and *TPS2* genes, fragments of 640 bp and 758 bp were obtained corresponding to the positive control (vectors with *TPS1* and *TPS2* genes, respectively). According to the obtained data, the frequency of transformation (the ratio of PCR-positive plants to the total number of analyzed plants) for vector pBract214-*TPS1* was on average 2,5% for each variety and 4% for vector pBract214-*TPS2*. For transformation by the *in planta* method the transformation frequency was 2-6,5% for both vectors.

Since the purpose of the study was obtaining of drought-resistant plants, transformed plants were studied on their tolerance to drought conditions. Studies on drought resistance of control plants and plants obtained after *in planta* transformation were performed in glass house. Drought stress was applied during the period of tube emergence and grains maturation, which lasted about a month, depending on the variety. To create drought conditions, the plants were transferred to limited watering, the first week - 50% of the full 100% water supply, the second week - 40%, and the last week - 30%. Under these conditions morphological parameters of the plants were analyzed and the yield parameters were evaluated, namely plant height, length of the main spikelet, number of grains from the main spikelet, weight of grains from the main spikelet. Obtained results revealed increased tolerance of the created wheat plants to drought conditions compared to the control plants grown under drought stress.

Quantitative measurement of trehalose content in leaves of control and transformed wheat plants grown under normal watering and drought conditions. For transgenic plants under stress conditions the trehalose content increased from 0,158 to 0,305 mg per 1 g of raw weight. Such increase may appear in result of trehalose biosynthesis genes expression.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……..….17
ВСТУП……..…….……18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ…….……..24
1.1. Трегалоза, як один з основних осмопротекторів у клітинах живих організмів……....24
1.1.1. Генетична регуляція метаболізму трегалози та продуктів її синтезу.....27
1.1.2. Роль трегалози та компонентів її біосинтезу в регуляції росту, розвитку та стресостійкості рослин……..29
1.1.3. Біотехнологічні підходи щодо модифікацій шляхів біосинтезу трегалози……..…37
1.2. Пшениця як об'єкт для генетичної трансформації……..…….....41
1.2.1. Прогрес у *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* пшениці.....51
1.3. Метод трансформації рослин *in planta,* як актуальний підхід до модифікації пшениці……..…….….54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ
2.1. Рослинний матеріал для досліджень…….61
2.2. Реактиви, використані в роботі…….…64
2.3. Векторні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози ……..……...64
2.4. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну (*N. tabacum*)……...66
2.4.1. Аналіз стійкості отриманих ліній рослин тютюну до осмотичного стресу……..……....67
2.5. Введення в культуру *in vitro* досліджуваних сортів пшениці.…….....67
2.6. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці *in vitro*……..…….....68
2.7. Трансформація пшениці методом *in planta*…….....70
2.8. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній тютюну та пшениці.....71

2.9. Аналіз стійкості отриманих рослин пшениці до посухи ……..71
3.0. Визначення вмісту трегалози у створених лініях пшениці…….....72
3.1. Статистичний аналіз даних…….…….…….....73
РОЗДІЛ 3. *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТЮТЮНУ (*N. tabacum*) ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ
3.1. Створення генетичних векторних конструкцій з генами *TPS1* та *TPS2*….....74
3.2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну…….75
3.3. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих рослин…….....….83
3.4. Аналіз ліній на стійкість до осмотичного стресу *in vitro*.....84
РОЗДІЛ 4. ОТРИМАННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ (*T.aestivum* L.) МЕТОДАМИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ
4.1. Створення генетичних векторних конструкцій з генами *TPS1*, *TPS2* для трансформації пшениці…….....88
4.2. Введення в культуру *in vitro* сортів пшениці української селекції.....89
4.3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці *in vitro*.....….94
4.4. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці методом *in planta*…….……...98
4.5. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній ……..…….…….....103
4.6. Аналіз стійкості отриманих ліній пшениці до посухи…….……....106
4.7. Визначення вмісту трегалози в створених лініях пшениці……...115
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ…….....122
ВИСНОВКИ……..127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….……...129
ДОДАТКИ……...……..159

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕННЬ

Т6Ф – трегалозо-6-фосфат

TPS – трегалозо-6-фосфатсинтаза

TPP – трегалозо-6-фосфатфосфатаза

ДТ – дикий тип

АДФ- аденозиндинфосфат

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ВСТУП

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 [213,126]. Відомо, що у захисті рослин від стресів важливу роль відіграє трегалоза [269]. Завдяки унікальному поєднанню молекулярної структури та фізико-хімічних властивостей трегалозу характеризують як стресопротектор [70]. Трегалоза (α-Д-глюкопіранозил-1,1-α-Д-глюкопіранозид) - нередукуючий дисахарид, що складається з двох молекул глюкози, поєднаних α-1,1-глікозидними зв'язками [216,70,186]. 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 [196,269].

Трегалоза 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 [54,35] та деяких покритонасінних, стійких до висушування [67]. 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 [51]. 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 [121]. Синтез трегалози здійснюється великим ферментним комплексом, що складається з трегалозо-6-фосфатсинтази, яка кодується геном *TPS1*, та трегалозо-6-фосфатфосфатази, яка кодується геном *TPS2*. Трегалозо-6-фосфатсинтаза каталізує взаємодію глюкозо-6-фосфату з УДФ-глюкозою з утворенням трегалозо-6-фосфату. У свою чергу, трегалозо-6-фосфат перетворюється до трегалози за участю фермента трегалозо-6-фосфатфосфатази. Посилення експресії принаймі одного з цих генів – *TPS1* – сприяє підвищенню внутрішньоклітинної концентрації трегалози та посиленню термотолерантності дріжджів *S. cerevisiae* [21].

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 транформації геном *TPS* [201,116,110]. 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 [269]. 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* [157]. 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) [97, 96, 98] 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 «Інтитут 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* з використанням 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. Краснопьоровою, А.А.Сибірним, В.Ю. Яцишин.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені 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 та 7 тез у профільних наукових виданнях та збірках матеріалів конференцій.

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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Трегалоза, як один з основних осмопротекторів у клітинах живих організмів

Трегалоза – нередукуючий дисахарид глюкози, що формується двома молекулами α –глюкози, поєднаних α-1,1-глюкозидними зв'язками [70,166,239], з молекулярною формулою та вагою $C_{12}H_{22}O_{11}$ та 342,31 відповідно [196]. Синтетичні ізомери трегалози – α,β та β,β (ізотрегалоза) – рідко зустрічаються у природі, а форма α,α – ізомер, який зазвичай і називають трегалозою (α-Д-глюкопіранозил-1,1- α-Д-глюкопіранозид, грибний цукор, мікоза) – поширений майже поміж усіх живих організмів [196]. Конформація молекули трегалози має вагоме значення в збереженні структури двошарових ліпідних мембран клітин організмів, розвиток яких зазнає різних форм стресу, особливо під час спеки та недостачі води, і навіть близькі аналоги трегалози, такі як α, β – трегалоза або сахароза позбавлені такої властивості [24,216,269]. Трегалоза синтезується в клітинах багатьох живих організмів від прокаріот до еукаріот, є складовою частиною продуктів харчування людини, оскільки міститься в їстівних грибах, ракоподібних, хлібопекарських та пивних дріжджах [269]. Відносно інших поширених метаболітів, більшість судинних рослин не здатні продукувати трегалозу у великих концентраціях, за винятком невеликої групи організмів, що є стійкими до зневоднення, такі як деякі папороті та покритонасінні (*Myrothamnus flabelifolia*) [277,269]. Проте, для багатьох видів рослин було описано високоспецифічну активність трегалази, ензиму, що розщеплює трегалозу та не розчеплює інші поширені альфа-глікозиди [199,277]. Основна роль трегалози в інших організмах, окрім рослин безперечно пов'язана з забезпеченням енергією, реакцією на стрес (у мікроорганізмів та безхребетних) та початковою стадією біосинтезу хітину [148,269]. Ця молекула служить осмолітом, компонентом

клітинної стінки та джерелом вуглецю у бактерій [269]. Гриби синтезують трегалозу в умовах водного дефіциту на початку пригнічення росту, завдяки чому дисахарид підтримує цілісність клітин під час стресу та забезпечує швидку мобілізацію організму під час відновлення та проростання спор [24,269]. Дисахарид може зв'язувати міколінову кислоту з утворенням гліколіпіду, який служить компонентом клітинної стінки мікобактерій, включаючи *M. tuberculosis* та близьких до нього родів [269]. Ці гліколіпіди відіграють важливу роль у взаємодії бактерій та господарів, імунній відповіді та біології туберкульозу [205,269].

Поєднання молекулярної структури та фізико-хімічних властивостей наділяє трегалозу властивостями надзвичайно стабільного дисахариду. Високий ступінь оптичного обертання ($[\alpha]^2_D$ +178°) та температура плавлення (до 203°C) обумовлюють унікальні фізичні властивості трегалози [196]. Ця сполука може витримувати нагрівання до 100° C протягом 24 год при pH 3,5-10,0 і захищає білки мембран від денатурації [180].

Виділяють три основні механізми, що лежать в основі захисту біологічних мембран трегалозою: заміщення молекул води, вітрифікація та хімічна стабілізація [196,269]. Теорія заміщення води ґрунтується на тому, що макромолекули зазвичай стабілізуються водою, що утворює водневі зв'язки навколо цих молекул, а трегалоза має більш гнучку молекулярну структуру, ніж інші дисахариди (такі, як сахароза) через наявність глікозидного зв'язку між двома фрагментами Д-глюкози, отже, може зв'язуватись з полярними групами макромолекул [196,269]. Теорія вітрифікації постулює, що цукри можуть перетворювати внутрішньоклітинний розчин у склоподібний стан та підтримувати цей стан з утворенням так званих кристалів [231,269]. Такий стан негігроскопічного скла наділяє живу клітину стійкістю до високих температур і висихання, і, таким чином, підтримує будову біологічних мембран, що дозволяє відновити їх початкову форму в умовах, наприклад, дегідратації [231,269]. Існують різні погляди щодо механізмів термозахисту трегалозою клітин дріжджів (*S. cerevisiae*), так, *Hottiger et al*. описав, що трегалоза стабілізує конформацію білкових молекул та інгібує агрецію білків за

умов теплового стресу, *Simola et al*. постулювали, що трегалоза разом з HSP104 (Heat Shock Protein 104 - білок теплового шоку) полегшують конформаційне відновлення білків, пошкоджених підвищеною температурою, а також, *Petitijean et al*. виявили, що TPS1 (трегалозо-6-фосфатсинтаза) є важливою молекулою для підтримки енергетичного гомеостазу та виживання дріжджів під час теплового шоку [104,228,186,77].

Сучасні дослідження виявили функціональну варіабельність трегалози та продуктів її синтезу, які виходять за межі лише енергетично запасаючої речовини [254]. Бактерії, гриби, безхребетні тварини та деякі нижчі рослини синтезують трегалозу як осмоліт в умовах стресу, а також, для запасання та транспортування вуглецю, а в судинних рослин ці функції були значною мірою замінені сахарозою, тому роль метаболізму трегалози для вищих рослин залишається до кінця не з'ясованим [148]. Проте, на даний час відомо, що при взаємодії рослин з патогенними або симбіотичними мікроорганізмами чи травоїдними комахами, трегалоза є потенційним сигнальним метаболітом, пов'язана з біохімічними реакціями рослин на умови холоду, посухи, засолення, а також, бере участь у регулюванні роботи продихів та пов'язані з цим рівні транспірації [148]. Таким чином, внутрішньоклітинна трегалоза не лише бере участь у метаболізмі вуглецю, але також здатна виконувати протекторну функцію щодо біологічно активних речовин та клітинних структур (білки, нуклеїнові кислоти, біологічні мембрани) за умов несприятливих факторів оточуючого середовища, таких як засолення, дегідратація, окислення, високі температури, замерзання та опромінення UV-B [253,269,164]. Проміжний продукт біосинтезу трегалози – трегалозо-6-фосфат (Т6Ф) – бере участь у регуляції обміну речовин у грибах, рослин, безхребетних, зокрема у нематод та комах [269,180 ,217].

Рослини - єдині організми, які синтезують два невідновлювальних дисахариди одночасно – трегалозу і сахарозу, і якщо у судинних рослин енергетичні функції трегалози перейняла на себе сахароза, залишається нез'ясованим функціоналізація наявної у них генетичної регуляції біосинтезу

трегалози і продуктів її синтезу, а також трегалази – фермента, що розщеплює трегалозу, а також взаємозв'язок між рівнями трегалози та сахарози [178]. На даний час немає чітко з'ясованої кореляції між трегалозою та проміжними продуктами її синтезу з реакціями живих організмів, зокрема рослин, на стрес [269].

1.1.1. Генетична регуляція метаболізму трегалози та продуктів її синтезу

На сьогоднішній день знання про гени *TPS1* та *TPS2*, які регулюють метаболізм трегалози, в основному базуються на дослідженнях нормальних та термофільних дріжджів, таких як *Saccharomyces cerevisiae* та *Hansenula polymorpha*, проте дослідження того, яким чином відбувається генетична регуляція в екстремальних умовах оточуючого середовища є неповними [132,194,269]. В клітинах дріжджів (*S. cerevisiae*) біосинтез трегалози каталізується трегалозо-6-фосфатсинтазним/фосфатазним (TPS/TPP) комплексом, який представляє собою дві ферменті субодиниці (Tps1, Tps2) та дві регуляторні (Tsl1, Tps3) [77,219]. За теплового шоку ген *TSL1*, що кодує субодиницю Tps1, експресується, активуючи комплекс (TPS/TPP) з подальшим синтезом трегалози, з припиненням дії стресових умов Tps3 фосфорилюється і пригнічує активність Tps2, що призводить до накопичення Т6Ф, а підвищення рівня Т6Ф, в свою чергу, пригнічує активність Tps1, що зупиняє синтез трегалози [77]. Завдяки подвійній функції трегалози та ферментів її біосинтезу у клітинах дріжджів, яка полягає у збереженні енергії та стресопротекції, каталізуючі комплекси трегалози та гени, що їх кодують, вже достатньо тривалий час є об'єктом дослідження [269,257,66].

Трегалоза синтезується у великих кількостях в клітинах грибів, і найбільш розповсюдженим шляхом є трегалозо-6-фосфат синтазний/трегалозо-6-фосфат фосфатазний (TPS/TPP) або більш відомий як OtsA-OtsB шлях, ретельно вивчений на модельному об'єкті – дріжджах (*S. cerevisiae*), для яких він є основним [253,27]. Проте, вчені виділяють ще щонайменше п'ять ферментативних шляхів біосинтезу трегалози, що властиві для інших живих організмів - TreP, TreS, TreT, TreY-TreZ, TreH [274,269].

Шлях OtsA-OtsB є найбільш розповсюдженим для більшості прокаріот та еукаріот і єдиним, за яким трегалоза синтезується в рослинах та включає в себе в якості проміжного продукту трегалозо-6-фосфат (Т6Ф) [31,269]. Про такий двоступінчатий шлях біосинтезу трегалози відомо ще з 1958 року (*Cabib and Leloir*) [39,194], а невдовзі після його відкриття було описано кінетичні властивості комплексу ферментів TPS/TPP в дріжджах [30,248,194,175]. За цією моделлю синтез трегалози проходить дві стадії: перенесення молекули глюкози з УДФ-глюкози до глюкозо-6-фосфату з утворенням трегалозо-6-фосфату та УДФ (реакція, що каталізується ензимом трегалозо-6-фосфат синтазою (TPS), що кодується геном *TPS1*), та подальше дефосфорилювання трегалозо-6-фосфату з утворенням трегалози та неорганічного фосфату (реакція каталізується ензимом трегалозо-6-фосфат фосфатазою (TPP) що кодується геном *TPS2*) [181,132].

Шлях біосинтезу трегалози – **TreP**, виявлений у еукаріот, полягає у зворотньому синтезі трегалози з глюкозо-6-фосфату та глюкози, що каталізується трегалозо-фосфорилазою і характерний для грибів (*Agaricus bisporus*) та найпростіших (*Euglena gracilis*) [181,269]. Трегалозо-синтази певних бактерій (*Pimelobacter*) ізомерують α-1,4-зв'язок мальтози в α-1,1-зв'язок трегалози - шлях трегалозо-синтази - **TreS** [243,269]. У таких термофільних архей як, *Arthrobacter* [153], *Rhizobium* [190] та *Sulfolobus* відбувається двоступінчате перетворення мальтозо-олігосахаридів або α-1,4-глюканів у мальтозо-оліготрегалозу з подальшим утворенням трегалози – шлях трегалогідролази - **TreY-TreZ** [153,269]. У екстремофільних архей *Thermococcus litoralis* [204] та *Pyrococcus* [59], бактерій *Thermotoga maritima* [262] утворення трегалози каталізується трегалозо-глікозилтрансферазною синтазою, яка використовує глюкозу та АДФ –глюкозу як субстрати – шлях трегалозної глікозилтрансферної синтази – **TreT** [269]. Трегалаза (**TreH**) безпосередньо бере участь у деградації трегалози, як і **TreP**; перший вказаний шлях проходить з утворенням двох молекул глюкози, другий – з утворенням глюкозо-фосфату та глюкози [27,208]. Розпад трегалози до глюкози – важливий процес в організмах, що акумулюють великі її кількості внаслідок дії

стресу, що необхідно для відновлення гомеостазу клітин або для продукування глюкози як енергетичної молекули та/або джерело вуглецю [208].

Представлені шляхи метаболізму трегалози можуть об'єднуватись у різних варіантах в живих організмах, і наявність декількох шляхів синтезу трегалози в одному і тому ж організмі може вказувати на важливу роль накопичення трегалози за умов, наприклад, стресу, які накладають вибіркові обмеження на доступність субстрату, наприклад, *Mycobacterium* мають три біосинтетичні шляхи (OtsA-OtsB, TreS, TreY-TreZ) [59,269]. Однак, згідно більшості літературних даних, для росту, розвитку та стресостійкості рослин, синтез Т6Ф є надзвичайно важливим, що пояснює наявність у рослин єдиного шляху біосинтезу трегалози саме з проміжним продуктом Т6Ф– **OtsA-OtsB** [269].

1.1.2. Роль трегалози та компонентів її біосинтезу в регуляції росту, розвитку та стресостійкості рослин

Наукові дослідження кінця 1990-початку 2000-х років демонстрували ключову роль трегалози у метаболізмі рослин, а до цього часу трегалоза асоціювалась здебільшого з адаптацією рослин до посухи та відновленням після стресових умов і не вважалась частиною фізіологічних процесів [182]. Початкові експерименти щодо впливу трегалози на вищі рослини мали на меті встановити її роль як первинного метаболіту або як стресопротектору, оскільки синтез у таких невеликих кількостях не співвідноситься з функцією основної енергетичної молекули судинних рослин та ставить питання, чому рослини мають функціональні гени для синтезу та розпаду трегалози [173]. На сьогоднішній час значна кількість досліджень присвячена участі трегалози у різних аспектах фізіологічних процесів росту та розвитку рослин [146]. Вагомим внеском у розвиток таких досліджень було створення трансгенних рослин з гетерологічною експресією генів біосинтезу трегалози з метою підвищення посухостійкості рослинних культур та можливість їхнього використання для виробництва трегалози [182].

Екзогенне застосування розчинів трегалози або додавання різних її концентрації до поживних середовищ для вирощування рослин показали, що накопичення трегалози є токсичним, або прийнамні, що трегалоза виступає як інгібітор росту і було визначено, що ймовірно, цей ефект був пов'язаний з порушенням метаболізму вуглеводів, про що свідчило зниження рівня сахарози в досліджуваних рослинах [182]. Концентрація трегалози та Т6Ф в клітинах рослин надзвичайно низькі, що довгий час ускладнювало вимірювання існуючими аналітичними методами аналізу, поки не були розроблені більш чутливі методи для картоплі (*Solanum tuberosum*) [200,182], а згодом кілька лабораторій встановили процедури для більш точного виміру цих цукрів [182,149,40,154]. Ранні дослідження фіксували наявність трегалози в організмах лише посухостійких рослин, таких, як *Selaginella* та *Myrothamnus flabellifolia*, що здатні відновлювати свої організми навіть після повного висихання здебільшого за рахунок підвищеної акумуляції трегалози, а відсутність повідомлень про її накопичення в більшості судинних рослин призвели до припущення про її низьку функціональність, яка була замінена сахарозою під час еволюції [269]. Повне розшифрування геному *Arabidopsis thaliana* надало дані про наявність рослинних родин генів біосинтезу трегалози: до I родини відносяться 11 генів – гомологів *TPS*, та до II родини – 10 генів, гомологів *TPP* [182,139], таким чином, гени, асоційовані з синтезом трегалози було ідентифіковано та стала очевидною здатність рослин до її біосинтезу [182,37,250].

Проведені дослідження *Rodrigues et al*. (1998) продемонстрували наявність трегалози у 9 сортів квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) та чітку кореляцію між концентрацією трегалози та стійкістю рослин до посухи [277,199]. Було встановлено, що рослини цих сортів аккумулють трегалозу у кореневих бульбах як у відповідь на нестачу води, так і за умов достатнього її вмісту у листі та були стійкими до посухи [277,199]. Оскільки, трегалоза є однією з речовин, що природно виробляється живими організмами, вона є нетоксичною для навколишнього середовища, з'явилось багато досліджень з використання екзогенної трегалози для

підвищення резистентності сільськогосподарських рослин до абіотичних та біотичних стресів, також, існують дані про внесення її в грунт, що впливає на осмотолерантність рослин [225]. Цікавим є дослідження того, що екзогенна трегалоза індукує експресію гена *ApL3*, який кодує велику субодиницю аденозиндинфосфату (АДФ) – глюкозо-пірофосфорилази у *Arabidopsis*, більше того, трегалозо-6-фосфат забезпечує активацію АДФ-глюкозопірофосфорилази, і, таким чином, сприяє ініціації біосинтезу крохмалю [269,261,231]. Таким чином, висока концентрація трегалози ззовні призводить до гіперакумуляції крохмалю в листі та зменшення його вмісту в коренях, що в свою чергу пригнічує ріст рослин [261]. Проте, у рослин пшениці (*Triticum aestivum L.*) екзогенна трегалоза підвищувала стійкість до біотичного стресу, спричиненого борошнистою росою [195,238,225], а у саджанців рису (*Ozysa sativa*), попередня обробка трегалозою захищає рослини від окислювального стресу, спричиненого закисленням грунтів, внаслідок підвищення антиоксидантної активності, а також, призводить до підвищення рівня ендогенної трегалози та значно знижує токсичний вплив надлишкової міді для процесів фотосинтезу та розвитку рослин [163,225]. Дослідження на рослинах редьки (*Raphanus sativus L.*) під час стресу, викликаного посухою, виявили значну кореляцію між екзогенним застосуванням трегалози та посухостійкістю, аерозольна обробка квітучих рослин трегалозою була найкращим способом покращення антиоксидантної активності, що призводило до активації захистної системи від посухи [17,220,225]. Обробка 6-тижневих саджанців томатів (*S. lycopersicum*) 15 мМ трегалозою значно підвищувала толерантність рослин до посухи, що було пов’язано з закриттям продихів. Оброблені трегалозою рослини мали менший вміст пероксиду водню та підвищенні рівні антиоксидантних ферментів, у них був зменшений рівень АВА, що супроводжувалось зниженням експресії генів її біосинтезу та підвищенням регуляції генів катаболізму [275]. Отже, існує механізм регулювання балансу метаболізму трегалози у рослин, проте він поки що недостатньо вивчений [285].

Багато відомо про взаємозв'язки проміжних продуктів біосинтезу трегалози з метаболізмом та розвитком рослин, більшість з яких, ймовірно, пов'язана із впливом змін внутрішніклітинної концентрації проміжного продукту її синтезу - Т6Ф [191]. Показано, що Т6Ф незамінний компонент початкової стадії дозрівання насіння та розвитку генеративних тканин [68], вегетативного розвитку [184], поділу клітин та відкладання клітин стінок [83,122], формування та розвитку квіток у суцвітті та переходу до цвітіння [215,247], фотосинтезі [184], метаболізмі цукрів та крохмалю [19], стійкості до абіотичних стресів, зокрема, посухи [19,78,157,187,269]. Цікавим є те, що такий більш розповсюджений в природі нередукуючий дисахарид, як сахарозо-6-фосфат (С6Ф), не впливає на вище перераховані процеси, що є приводом вважати функції Т6Ф та С6Ф протилежними, а дослідження впливів змін рівня продукту синтезу трегалози - Т6Ф актуальним для пояснення багатьох процесів росту та розвитку рослин [46,269]. Останні десять років увага вчених зосереджуються на вивченні ролі трегалози у реакціях на стрес, функції Т6Ф у реакціях росту та розвитку рослин, взаємодії Т6Ф з іншими молекулами, наприклад, сахарозою, протенкіназами SnRk1, та його сигнальні шляхи, що впливають на ріст, розвиток та урожайність, зокрема, зернових культур [173].

Blazques et al. та *Vogel et al.* у 1998 році клонували та охарактеризували гени *TPS1* (ген, що кодує TPS) та *TPPA, TPPB* (гени, що кодують TPP) в *Arabidopsis,* а пізніше було показано, що мутанти *tps1 Arabidopsis* були летальними, що демонструє життєво важливу роль метаболізму трегалози для рослинних організмів [215,261,269]. Дослідження на *Arabidopsis* показали, що Т6Ф необхідний для розвитку рослин, оскільки гени, що належать до I класу родини генів біосинтезу трегалози *Arabidopsis* та кодують домени трегалозо-6-фосфатсинтази (*AtTPS1-AtTPS*4), важливі для вегетативного росту та переходу до цвітіння, регулювання акумуляції крохмалю, стійкості до посухи, а гени II класу родини генів біосинтезу трегалози *Arabidopsis*, що кодують багатофункціональні ферменти, які мають синтазну та фосфатазну активність (*AtTPS5- AtTPS11*), контролюють клітинний

морфогенез та утворення суцвіть, розгалуження трихом та формування органів рослини [42,196,269]. *Satoh-Nagasawa et al.* продемонстрували, що гени кукурудзи RAMOSA (*RA1, 2* та *3*) впливають на розвиток суцвіть, а дослідження, проведені на делеційних мутантах *ra*, показали, що регулювання формування суцвіть геном *RA3*, що кодує ТРР кукурудзи, опосередковане або трегалозою або трегалозо-6-фосфатом [177,269]. Гомологи гена *RA3* у сорго та рису мають подібний ефект, що свідчить про збереження функцій *RA3* в інших зернових культурах [177,269].

Багато досліджень показали, що Т6Ф, а не власне трегалоза, може впливати і на перераховані вище фенотипові зміни, і, наприклад, на формування листя, терміни розвитку та морфологію у *Arabidopsis* [146,148,73,217]. Було встановлено, що рівень Т6Ф у тканинах рослин корелює з внутрішньотканним коливанням вмісту сахарози або внаслідок її екзогенного надходження (при додаванні до поживних середовищ) або внаслідок її підвищеного внутрішньоклітинного метаболізму [267]. Цей взаємозв'язок найкраще було описано на проростках *Arabidopsis* [267,172,149], у верхівках пагонів [251], у бальбах картоплі [60] та зернах пшениці [152,267]. Знижений внутрішньоклітинний рівень Т6Ф проростків *Arabidopsis*, що зростали в умовах вуглецевого голодування, підвищувався більше ніж у 25 разів після додавання до середовища сахарози, та кількісно корелював з сахарозою більше, ніж з глюкозою, фруктозою та іншими спорідненими цурками та їх похідними [73,267]. Описана модель взаємозв'язку сахарози-Т6Ф постулює, що Т6Ф виступає сигнальною молекулою шляху синтезу сахарози, що забезпечує фіксування її внутрішньоклітинної концентрації в оптимальних для функціонування клітини межах, тобто, таке співвідношення є критичним параметром для рослин та частиною гомеостазу, залежить від конкретних типів тканин та клітин на різних стадіях розвитку рослин і регулюється у відповідь на критичні зміни умов навколишнього середовища, наприклад, посухи чи низької температури [73,267]. Враховуючи центральну роль сахарози у вуглеводному обміні рослин та її здатність регулювати експресію генів на транскрипційному, трансляційному та посттрансляційному рівнях [134,73], описаний взаємоз'язок

може пояснити, чому рівень Т6Ф впливає на ріст та розвиток рослин [73,134,267]. Відомо, що сахароза контролює як синтез, так і деградацію Т6Ф, однак, роль Т6Ф не обмежується лише сигнальною функцією щодо рівня сахарози, а швидше, передбачає регулювання рівня сахарози в рослині [269]. Таким чином, Т6Ф можна вважати компонентом гомеостатичного механізму, який лежить в основі контролю за рівнем сахарози в рослинних клітинах і вибудовує цей механізм таким чином, що відповідний рівень не підіймається занадто високо і не опускається занадто низько, за аналогією контролю рівня глюкози в крові людини глюкагоном та інсуліном, проте, молекулярні механізми подібних реакцій ще потребують детального вивчення [269].

Регулювання Т6Ф розподілу та кількісного вмісту сахарози може бути пов'язано з декількома механізмами, один з яких пов'язаний з інгібуванням протеїнкіназ SnRK1 [61,146]. SnRK1 – рослинний гомолог AMP-залежних протеїнкіназ тварин та Snf1 дріжджів - центральна енергетична молекула, і багато ефектів Т6Ф на метаболізм і розвиток рослин виникають внаслідок синергічного зв'язку з SnRK1 [135]. Активність SnRK1 підвищується в умовах енергетичного стресу чи вуглецевого голодування, що подає сигнал до генеративних тканин і опосередкуванням ряду процесів робить вуглець доступним для клітинних мембран для продовження росту, поки вуглеводний обмін не відновиться [218]. *Baena-Gonzalez et al.* (2007) показали, що як мінімум 1000 генів регулюються SnRK1, при цьому різноманітні їх родини та підродини індукуються або репресуються в залежності від активності цих протеїнкіназ [28,179]. Модель зв'язку Т6Ф та SnRK1 можна описати наступним чином: коли сахароза доступна у поживному середовищі рослин Т6Ф кількісно зростає та інгібує SnRK1, що призводить до анаболічних процесів, необхідних для росту та розвитку; коли цукри недоступні, рівень Т6Ф знижується, а активність SnRK1 зростає, починають відбуватися катаболічні процеси [218,135].

Під час дозрівання зерен пшениці було показано зміни рівнів Т6Ф, які були найвищими під час першої стадії наповнення зерна (в 100 разів вище, ніж у *Arabidopsis*), що було тісно пов'язано з концентраціями сахарози [152,173].

В умовах недостатнього вуглецевого постачання SnRK1 може регулювати велику кількість транскриптів, з них фактори транскрипції bZIP групи S (bZIP 1/ 2/ 11/ 44/ 53) та C (bZIP 9/ 10/ 25/ 63) [282]. Більшість досліджень була зосереджена на впливі метаболізму трегалози на SnRK1, проте цікавим є зворотній зв'язок впливу SnRK1 на трегалозу та елементи її біосинтезу: транскрипційний фактор bZIP11 (транскрипційної групи S, що регулюється генами KIN10, KIN11) у синергізмі з SnRK1 бере участь у регулюванні експресії генів у відповідь на вуглецеве голодування, така взаємодія була відповіддю на екзогенне додавання трегалози під час проростання проростків *Arabidopsis* [282,61,173]. Мутантні рослини *Arabidopsis* з надекспресією KIN10, що пророщували на середовищі з додаванням 100 мМ трегалози, не проявляли змін у розвитку, як було зафіксовано для рослин дикого типу, що свідчило про інгібування bZIP11 рівня Т6Ф [61,173]. Порівнянням генетичних профілів внаслідок надекспресії KIN10 та bZIP11, було встановлено підродини генів, що індукуються bZIP11 та також регулюються KIN10, проте, ймовірно, саме pZIP11 є мішенню для SnRK1 [173]. В жодному дослідженні не повідомлялось про регуляцію метаболізму трегалози за допомогою SnRK1, а *Delatte et al*. (2011) показали, що функцію bZIP11 не можуть замінити інші bZIP цієї родини [61,282].

Т6Ф, як виявилось, є необхідним для відновлення рослин після заморозків: під дією низьких температур відбувається підвищене акумулювання цукрів, зокрема і сахарози, після підвищення температури концентрація Т6Ф зростає, що відновлює ріст та розвиток рослин внаслідок взаємодії Т6Ф/SnRK1 [182]. Можливим практичним застосування цих знань є відновлення посівних проростків після дії абіотичних стресів, таких як холод чи посуха, оскільки підвищення рівня Т6Ф сприяє росту та розвитку, біосинтезу кінцевих продуктів, таких як крохмаль для зерна, а можливість керування його рівнями представляє собою модель для

модифікацій біосинтетичних шляхів, що лежать в основі підвищення врожаю та стійкості рослин до стресових чинників [182].

Нещодавно, WRINKLED1 (WRI1) – транскрипційний фактор, що індукує експресію більше 20 генів, які беруть участь у синтезі жирних кислот, було ідентифіковано як мішень для KIN10 та показано, що інкубація суспензійних клітин *Brassica napus* у середовищі, що містить Т6Ф, або надекспресія *OtsA* (що кодує трегалозо-6-фосфатсинтазу) *E. coli* у *Nicotiana bentamiana* підвищує рівень Т6Ф, експресію WRI1 та синтез жирних кислот [279].

Figueroa et al. (2016) дослідили, що взаємозв'язок Т6Ф та SnRK1 у тканинах, що розвиваються, є досить складним і до кінця нез'ясованим, а у дослідженнях *Liu et al*. (2019) отримані рослини *Arabidopsis* з геном *TaTPS11* сприяли експресії SnRK1, а не інгібували її всупереч очікуванням, вказуючи на те, що ефект гетерологічної експресії *TaTPS11* відрізняється від ендогенної експресії *AtTPS* арабідопсису [180]. Дослідження зернових культур, а саме, пшениці, з детальним визначенням механізмів взаємозв'язку Т6Ф/SnRK1 можуть відкрити нові погляди на способи розподілу асимілянтів до органів рослин, що є особливо цікавим для підвищення показників наповненості/маси зерна з метою підвищення урожайності сільськогосподарської культури [180,146]. Такі взаємозв'язки показують великі перспективи щодо вдосконалення зернових культур, а саме, внаслідок націлювання на активність протеїнкіназ за допомогою регулювання Т6Ф або в бік зменшення його вмісту за посилення стресових реакцій, або в бік збільшення, тобто, така клітинна специфіка розвитку може бути ключем для покращення кількісних та якісних показників врожайності [179]. Таким чином, Т6Ф у відповідь на вміст сахарози регулює експресію генів росту та розвитку за допомогою протеїнкіназ SnRK1, що являє собою три компоненти унікального метаболічного механізму, контрольною точкою між реакціями на стрес та процесами розвитку рослин [171].

Ідентифікація генів, які беруть участь у синтезі трегалози та аналіз фенотипів трансгенних рослин, що експресують гетерологічні гени TPS та TPP, призвели до визнання надважливості функціонування метаболізму трегалози для рослинного

організму, що розширило можливості для транскриптомних досліджень, які показали зміни в експресії ендогенних рослинних генів, що кодують TPS, TPP та трегалазу у відповідь на різні абіотичні та біотичні стреси [269]. Такі дані встановлюють пріоритетність досліджень щодо впливу рівнів Т6Ф та трегалози, з'ясування умов контролю цих рівнів та шляхів регулювання, пошуку зв'язків між метаболізмом трегалози та підвищенням толерантності до стресів і розробки стратегій для спеціалізованої інженерії метаболізму трегалози з метою підвищення стійкості рослин до стресів [269].

1.1.3. Біотехнологічні підходи щодо модифікації шляхів біосинтезу трегалози

Транскриптомний і метаболомний аналіз рослин, що зазнавали холодовий і тепловий стрес, дозволив виявити зміни в експресії генів, що кодують TPS і TPP та визначити трегалозу як речовину, яка може взаємодіяти з іншими речовинами при індукції термотолерантності [246]. Підвищений синтез трегалози у відповідь на стресові умови в клітинах мікроорганізмів та деяких посухостійких рослин, а також, використання трегалози у фармацевтиці та харчовій промисловості, мотивували до перших спроб генетичної модифікації шляхів біосинтезу трегалози у тютюні (*Nicotiana tabacum*) та картоплі (*Solanum tuberosum*) [81,201,269], а генетичні конструкції з генами біосинтезу трегалози таких організмів, як *E. coli*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *O. sativa* є перспективними об'єктами для генетичної інженерії та біотехнології з метою створення осмотолерантних рослин [73,134,132,269] (Додаток А).

Перші роботи стосовно біотехнологічних модифікацій з використанням конструкцій з генами *otsA* та *otsB* біосинтезу трегалози з *E. coli* були проведені *Goddjin et al.* у 1997 році та *Pilon-Smits et al*. у 1998 році на тютюні [81,37,187], а також *Romero et al.* у 1997 році було трансформовано тютюн (*N. tabacum*) за використання конструкції з дріжджовим геном біосинтезу трегалози *TPS1* [201]. *Karim et al.* для трансформації тютюну використовували конструкції або з одним з дріжджових генів *TPS1* та *TPS2* під контролем сильного конститутивного

промотору *AtRBCS1A* з *Arabidopsis* або конструкцію з двома цільовими генами під контролем стрес-індуцибельного промотору *AtRAB18 Arabidopsis* [37,116]. На сьогодні методами генетичної інженерії створено мутантні лінії рослин *A. thaliana* з надекспресією генів біосинтезу трегалози з *E. coli – otsA,* що кодує трегалозо-6-фосфат синтетазу, та *otsB*, що кодує трегалозо-6-фосфат фосфатазу [217,37,73]. У цих та деяких інших публікаціях описано отримання трансгенних рослин, у яких виявляли конститутивну надекспресію генів, що кодують TPS та/або TPP, що у результаті демонструвало підвищення акумуляції трегалози та посухостійкість [37,239,81]. Т6Ф регулює активність протенкіназ SnRK1, і через такий сильний та тканиноспецифічний контроль, надмірна конститутивна експресія генів метаболізму трегалози призводить до плейотропних ефектів, які, звичайно, не є бажаними для сільськогосподарських культур [171]. Основною проблемою таких досліджень було те, що у трансгенних рослин спостерігався плейотропний фенотиповий ефект, що призводило до порушень розвитку рослин [269]. Створені рослини демонстрували підвищену посухостійкість, однак у них спостерігалось зниження росту, недорозвиненість листя, через що і зменшення площі листової поверхні, кількості продихів та, відповідно, зменшені втрати вологи [135]. *Holmstrom et al*. (1996) показали затримку відповіді на посуху рослин тютюну, трансформованих геном *TPS1*, що було спричинено недорозвиненням рослин, у яких була зменшена листова пластинка та, відповідно, транспірація. Наприклад, створені рослини тютюну з надекспресією генів *otsA, otsB* з *E. coli* проявляли морфологічні відхилення: у них були збільшені листя, коротші стебла, проте, рослини були стійкими до посухи [187]. Рослини картоплі, трансформовані геном *TPS1* дріжджів, проявляли карликовість і стійкість до засолення, холоду та посухи [273]. Створені посухостійкі рослини *Arabidopsis*, трансформовані дріжджовими генами *TPS1* та *TPS2,* були частково стерильними та формували невелике за розміром листя [157].

Для вирішення цієї проблеми, наприклад, *Wu* та *Garg* [264] досліджували стрес-індуцибельний промотор для контролю надекспресії генів біосинтезу

трегалози (*otsA* та *otsB*) з *E. coli* як гібридного гена TPP для підвищення толерантності рису до абіотичного стресу [250]. *Jang et al.* [110] за допомогою генетичної векторної конструкції, що містила ген, який кодує біфункціональний фермент TPSP (злиті TPS та TPP) (описаний [219]) синтезу трегалози з *E. coli* під контролем промотора убіквітину кукурудзи (*Ubi:TPSP*) успішно трансформували рослини рису [110,247]. Трансформовані таким вектором рослини демонстрували в 200 разів вищі рівні акумуляції трегалози, ніж за трансформації генами, що кодують TPS та TPP *E. coli*, також, рослини не змінювали ріст за нестресових умов, а експресія гібридного гена відбувалась лише за умов індукції стресом [110]. Індукований стресом промотор використовували також для створення конструкцій з генами *TPS1-TPS2* задля трансформації модельного рослинного об'єкту *Arabidopsis thaliana* [157]. Лінії з надекспресованим *TPS1-TPS2* конструктом демонстрували нормальний ріст, а також підвищену толерантність до засолення, посухи, переохолодження та високої температури [157]. Експресія дріжджового гена *ScTPS1* під контролем стрес-індуцибельного промотору у картоплі надала рослинам стійкість до посухи, проте небажаних фенотипових змін виявлено не було [232]. Для підвищення посухостійкості також було використано посилену експресію генів ендогенних ферментів метаболізму трегалози, наприклад, надекспресія гена *AtTPS1* у *Arabidopsis* сприяло підвищенню посухостійкості без видимих впливів на морфологію рослин, за винятком певної затримки цвітіння [27], а дослідження рослин рису з надекспресією *OsTPS1* показало толерантність їх до холоду, засолення та посухи без додаткових фенотипічних змін, а ген *OsTPP7* був охарактеризований як генетична детермінанта в головному кількісному локусі ознаки (QTL) толерантності до аеробного проростання [140]. Трансформовані рослини сорго геном *TPS1* демонстрували толерантність до сольового стресу, а також більш високий приріст біомаси та підвищений розвиток кореневої системи [272]. Показано, що накопичення трегалози у *Tripogonloliiformis* може регулювати процес аутофагії, що підвищує толерантність рослин до десикації [260].

Nuccio et al. [171] використовували для досліджень конструкцію з транскрипційним регуляторним геном *Mads6* та геном, що кодує TPP з рису (*O. sativa*), під контролем промотору рису (Os) для трансформації рослин кукурудзи, маючи на меті зміну рівнів накопичення Т6Ф, припускаючи, що його підвищена акумуляція може істотно покращити врожай кукурудзи та підвищити її стійкість до посухи [171]. Створені рослини кукурудзи було протестовано в польових умовах протягом декількох сезонів, і в результаті дослідженнь вдалось покращити врожайність за нормальних (не стресових) чи умов помірної посухи на 49%, а за стресових умов жорсткої посухи на 123% [171]. Експресія гена *TPP* та транскрипційного регуляторного гена *Mads* призвела до підвищення вмісту сахарози в колосках та насінні навіть за умов дефіциту води, також активність SnRK1 пригнічувалась у контрольних рослин у відповідь на посуху, але збільшувалась у трансгенних лініях, для яких було зафіксовано підвищене акумулювання Т6Ф, що також вказує на тісний зв’язок між Т6Ф, сахарозою та SnRK1, регуляція якого є важливою для дозрівання насіння та стресостійкості [171].

За результатами, описаними у цих роботах, можна зазначити, що підвищення посухостійкості рослин може бути досягнуто шляхом генно-інженерних маніпуляцій з генами, що задіяні у метаболізмі трегалози [269]. На жаль, відсутні дані про надекспресію генів *TPS1* та *TPS2*, що кодують ферменти біосинтезу трегалози, у більшості видів злаків, зокрема у пшениці (*Triticum aestivum L.*) – найважливішої сільськогосподарської культури [247,250,269]. Дослідження, що були проведені на рослинах рису та кукурудзи, дають змогу висунути припущення, що метаболічний шлях біосинтезу трегалози однодольних та дводольних рослин може функціонувати по-різному. Також, зв’язок Т6Ф – найважливішого метаболіту трегалози – з рівнями сахарози та його вплив на протенкінази SnRK1 є до кінця не вивченим, але, однозначно, такий зв’язок є одним з ключових в онтогенезі рослин, і, ймовірно, для дво- та однодольних рослин вони також можуть працювати по-різному. Зовсім не дослідженим є також використання різних типів промоторів для контролю генів *TPS1* та *TPS2*, зокрема, сильних конститутивних промоторів для

експресії цих генів в однодольних рослинах [247,250,269]. Таким чином, отримання трансгенних посухостійких ліній пшениці, що будуть характеризуватись нормальним ростом та розвитком, є надзвичайно актуальним, оскільки пшениця як одна з найбільш важливих зернових культур порівняно з іншими (ячмінь, кукурудза, рис) [247,250,269,97,98] займає одне з чільних місць у задоволенні харчових потреб людства. Саме тому детальне вивчення клітинно- і молекулярно-біологічних механізмів негативного впливу на пшеницю різних абіотичних чинників сприяє ефективному розвитку біотехнологічних шляхів покращення якості та продуктивності цієї культури [97,151], чому було присвячено дану дисертаційну роботу.

1.2.Пшениця як об'єкт для генетичної трансформації

Пшениця є однією з найбільш культивованих зернових культур у світі та основним джерелом поживних речовин, вона посідає перше місце в Азії, Китаї та друге в Індії за обсягами щорічного вирощування [86], в той час, як рис та кукурудза є все ж домінуючими у світовому виробництві зерна, пшениця задовільняє близько 20% основних людських енергетичних потреб і 25% потреб у незамінних білках [38]. Хоча на сьогодні світове виробництво пшениці задовольняє поточний попит на споживання, норма її щорічного вирощування за останні роки знизилась на 0,9%, що викликає занепокоєння, чи вдасться досягти збільшення принаймні до 15% від сьогоднішнього світового виробництва до 2050 року (що становить за оцінками Food and Agriculture Organization (FAO) близько 200 млн тонн), щоб прогодувати зростаюче населення планети (https://population.un.org/wpp/) [86,82]. Досягнення такої мети потребує збільшення площ орних земель, що поки недоступно, тому сучасна наука зосереджується на покращенні ключових якісних ознак, пов'язаних з продуктивністю рослин та їхньою адаптацією до чинників навколишнього середовища, які постійно змінюються [38]. Більше половини життєвого циклу пшениці проходить за температурного оптимуму 15°C, що забезпечує найкращу врожайність, а підйом

середньої температури на кожні 1°C знижує врожайність приблизно на 6% [119]. Очікується, що середня температура в світі зросте на 1,4-3,1°C до кінця XXI століття, весняно-літні періоди зростатимуть, а зимові періоди зведуться до мінімуму, що загострює проблему збереження врожаїв пшениці [119]. Генетично модифіковану пшеницю поки не культивують масштабно в польових умовах, впроваджуючи нові сорти з використанням традиційних селекційних методів, які є досить трудомісткими, займають багато часу та потребують значного людського ресурсу [142,255]. Селекційні заходи, які наразі застосовуються, повинні доповнюватись вдосконаленими методами функціональної геноміки сількогосподарських рослин, також необхідно запровадження ефективних молекулярних методів та розвиток генетичної інженерії для підвищення врожайності з урахування специфічних потреб різних генотипів та мінливого середовища, в якому вирощується пшениця [38].

Пшениця, як об’єкт генетичних досліджень є однією з найкраще вивчених культур завдяки гексаплоїдному геному (2n=6x=42) з трьома тісно пов’язаними підгеномами, що дає можливість моделювати серйозні структурні та кількісні зміни її геному [86]. На сьогоднішній день за допомогою біотехнологічних методів досягнуто значних успіхів в отриманні трансгенних рослин сої (*Glycine max*), кукурудзи (*Zea maize*), бавовни (*Gossypium*), ріпаку (*Brassica napus*), ячменю (*Hordeum vulgare*), рису (*Oryza sativa*) та багатьох інших важливих сільськогосподарських культур, проте, застосування генетично-інженерної модифікації пшениці ускладнюється таким складним та великим геномом (~17 Гб), що включає в себе високу частку повторів ДНК (>80%), та через низьку регенераційну здатність даної культури *in vitro* [255,283,151,34]. З цим пов’язані і довготривалі дослідження з секвенування геному пшениці, який було розшифровано останнім серед основних культур (Chinese Spring, IWGSC RefSeq v1.0 – 2018, ~120000 генів основного геному, ~140000 генів – пангеном; та оновлена версія IWGSC RefSeq v2.0 - 2020) [86].

Наразі продовжується дослідницька діяльність з використанням генетичних методів паралельно з розвитком методів геноміки пшениці, результатом є визначення майже всіх типових генетичних ознак, серед яких врожайність зерна та його властивості, толерантність до абіотичних та біотичних чинників, включаючи грибні та бактеріальні захворювання, посуху, засолення, дані щодо проростання в стресових умовах і багато інших властивостей [86]. З метою набуття нових ознак, наприклад, таких як стійкість до різних стресових чинників у пшениці окрім традиційних методів селекції використовують біотехнологічні підходи, серед яких методи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [151] (Додаток Б). В той час як дводольні можуть легко модифікувались з використанням ґрунтової бактерії та рослинного патогенна - *Agrobacterium tumefaciens,* однодольні, які не є природними господарями агробактерій, протягом тривалого часу залишались несприйнятливими до такого методу трансформації [41,111]. Як відомо, однодольні рослини не здатні продукувати моноциклічні фенольні сполуки [20], такі як ацетосирінгон та близькі йому ацетофенони, сирінгальдегіди, бензальдегіди, що в природі індукують гени вірулентності (*vir*) *A. tumefaciens* лише у дводольних рослин [20,74]. Дослідження відповідних реакцій рослин на агробактеріальну інфекцію може допомогти підвищенню ефективності трансформації пшениці, чого можна досягти поглибленим вивченням та оцінкою генів, відповідальних за компетенцію рослинних клітин до *Agrobacterium* за умов генетичної трансформації [226,151].

Для доставки Т-ДНК в геноми однодольних рослин постійно розвиваються генетично-інженерні методи, такі як ПЕГ (поліетилен-гліколь) – індукована трансформація протопластів, електропорація, використання карбідно-кремнієвих волокон, мікроін’єкція та два основні методи – біобалістика та *Agrobacterium*-опосередкована трансформація [284,290,92]. Хоча, увага дослідників більше зосереджена на методах прямої інтеграції Т-ДНК у геном пшениці [65], *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro* має ряд переваг в порівнянні з ними, – властивість інтегрувати великі за розміром фрагменти ДНК з

мінімальними порушеннями в їх послідовностях та без мультикопійних вставок, це надійна система регенерації експлантів та ефективної доставки Т-ДНК з простою процедурою селекції трансформованих ліній рослин [128,129,112]. Протокол трансформації однодольних зазвичай складається з етапів культури тканин, таких як спільне культивування тканин-мішеней та *A. tumefaciens*, етап «спокою», селекція для специфічної проліферації трансформованих клітин, регенерація пагонів та їх вкорінення [100]. Ефективність використання будь-якого методу трансформації залежить від підібраних умов проведення двох послідовних процедур: перенесення та інтеграція Т-ДНК в рослинний геном та селекція трансформованих клітин і регенерація цілої рослини [94]. З огляду на переваги, які властиві *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації рослин, залишається багато актуальних питань, пов’язаних з підвищенням частоти регенерації трансгенних рослин пшениці *in vitro* та механізмами ефективного інтегрування Т-ДНК [91]. Порівняно з більшістю дводольних та однодольних рослин пшениці властива низька регенераційна здатність в культурі *in vitro*, а оскільки метою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є створення трансгенних рослинних ліній з високою частотою та ефективністю, важливим фактором є умови роботи з культурами тканин *in vitro* та надійна система селекційного відбору [38,227]. За останні два десятиліття вченими світу багато зусиль покладено для встановлення ефективних протоколів регенерації пшениці з різних типів експлантів [125,126,128].

Ключовим чинником при роботі з культурами тканин пшениці *in vitro* є генотип рослин, а ефективність трансформації пшениці вдалось підвищити із застосуванням у дослідженнях рослин сорту Bobwhite [281] з високим регенераційним потенціалом, який був одним із основних для більш ніж 25% досліджень з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці [5]. Широко досліджують також і інші сорти, такі як Turbo, Millewa, Chinese Spring, Lona, Baldus, Fielder, Florida та Cadenza, Vesna; в Україні це сорти Зимоярка, Подолянка, Фаворитка, Смуглянка, Достаток, Володарка [5]. *Mitic et al*. (2014) досліджували

вплив генотипу на ефективність агробактеріальної трансформації з використанням незрілих зародків високопродуктивного сорту Vesna [159]. На початкових етапах частота трансформації становила 0,41-0,1 %, що може також вказувати на те, що генотип є важливим фактором для успішної трансформації, проте не вирішальним, оскільки додавання аскорбінової кислоти до живильного середовища для калюсогенезу та ацесирінгону до інокуляційного середовища дало змогу підвищити її до 10,8% [159]. *Habib et al*. (2014) досліджували 26 генотипів пшениці (включаючи TD-1, Uqub-2000, SH-2002, As-2002, Sehar-2006, Blue Silvet, Millat-2011, Galaxy-2013, Bobwhite) за регенераційним потенціалом в культурі *in vitro* незрілих зародків з використанням різних варіантів співвідношення регуляторів росту (ауксини/цитокініни) [87]. За результатами, 2 мг/л 2,4-Д були оптимальними для індукції калюсу більшості досліджуваних генотипів, а збільшення концентрації 2,4-Д призводило до пригнічення проліферації клітин, проте, варто зазначити, що зниження концентрації до 1 мг/л за використання незрілих зародків як експлантів може призводити до передчасного проростання та розвитку коренів, що є небажаним для ембріогенезу [87,88]. Однією з проблем, що виникає при роботі з незрілими зародками, є некроз тканин після контакту з агробактерією та під час спільного кокультивування, було встановлено, що незрілі зародки виробляють перекис водню (H_2O_2) що спричиняє побуріння та знижує ефективність трансформації [237]. Результати досліджень Tao et al. (2011) з використанням 29 сортів пшениці продемонстрували, що некроз тканин суттєво залежить від генотипу, а додавання до середовищ антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота, цистеїн, нітрат срібла або органічні добавки (тіамін, аспарагін) суттєво не впливали на регенерацію та калюсогенез, а навпаки, середовище з простим набором компонентів МС та дікамби без органічних речовин та вітамінів покращувало морфофізіологічні показники досліджуваних сортів [237]. Іншими дослідниками було встановлено, що додавання до живильних середовищ аскорбінової кислоти, глутатіону, ліполєвої кислоти та цистеїну зменшує некроз та потемніння тканин, підвищуючи регенерацію та частоту трансформації пшениці [38,53]. Використання

експлантів зрілих чи незрілих зародків передбачає проміжну стадію калюсогенезу, через що створені рослини часто схильні до сомаклональних варіацій та вважається, що ефективність трансформації таких експлантів частіше залежить від генотипу [23]. Так, наприклад, в дослідженнях Medvecka and Harwood (2015) перед проведенням агробактеріальної трансформації було протестовано 72 різних генотипи пшениці з використанням зрілих зародків, проте здатність до формування калюсу та регенерації мали лише 3 сорти, а вдалось трансформувати один – Bobwhite SH 9856 [156].

У більшості протоколів по підбору та оптимізації живильних середовищ для регенерації пшениці *in vitro* основаними є середовища МС (Murashige and Skoog, 1962), N6 (Chu, 1978) та B5 (Gamborg, 1958), а найбільшу увагу приділяють підбору комбінацій та концентрацій регуляторів росту, серед поширених ауксинів - 2,4-Д (дихлорфеноксиоцтова кислота) та інші речовини - 3,6-дихлор-2-метоксибензойна кислота (дікамба), 3,5,6-трихлор-2-піридинкарбонова кислота (піклорам), та менш застосовані у роботі за злаковими – індоліл-оцтова кислота (ІОК) та 1-нафтилоцтова кислота (НОК) [100]. *Sarker&Biswas* (2002) оцінювали індукцію калюсу паралельно з оцінкою ефективності трансформації після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, з використанням різних типів експлантів: зрілих та незрілих зародків, базальної частини пагона, апекса кореня, листових дисків та ендосперму, і згідно з отриманими результатами, найвищий відсоток трансформації було зафіксовано з використанням незрілих зародків [43,214]. *Kumar et al*. вдалось досягти майже 100% регенерації рослин з калюсу зрілих та незрілих зародків шляхом додавання до середовища для калюсогенезу 2 мг/л піклораму, а до середовища для регенерації - 0,1 мг/л 2,4-Д, 5 мг/л зеатину та 15 мг/л CuSO4 [126,127]. В інших досліджень додавання ліполєвої кислоти відвищувало частоту трансформації сорту Bobwhite в два рази, а арабіногалактан покращував регенерацію пшениці з 72-77% до 89-94% [38,53].

Для успішної *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці важливим також є вибір експланту-мішені, а для більшості злакових рослин незрілі

зародки в якості експлантів завжди представляли великий інтерес через властивий їм високий регенераційний потенціал в культурі *in vitro* та швидкі терміни утворення морфогенного калюсу [97,151,112]. Велика увага приділяється підготовці рослинного матеріалу для трансформації (якість та здоров'я донорного матеріалу, відсутність обробки гербіцидами), стадії розвитку зародка [94], умовам кокультивування з агробактерією, та середовищам для індукції калюсу та регенерації [128]. Наприклад, за використання незрілих зародків як експлантів встановленим оптимальним терміном спільного кокультивування рослинного матеріалу з агробактерією є 2-3 доби для успішного інтегрування чужорідних генів [130].

Узагальнюючи існуючі дані за використання незрілих зародків в якості експлантів, можна виділити три основні фактори для успішного проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: 1) частота та ефективність трансформації є генотип-залежними, важливими є не тільки сорт, що використовується, а і здоров'я та фізіологічні показники рослинного матеріалу; 2) для пшениці доведено ефективність проведення першої стадії культивування, або передкультивування, що потребує підбору складу середовища, визначення потрібної стадії клітинної диференціації; 3) в роботі з культурами *in vitro* на успіх трансформації та подальшої регенерації суттєвий вплив має співвідношення фітогормонів [94,98,206].

Робота з незрілими зародками передбачає контрольованих умов росту та розвитку рослин для постачання високоякісного рослинного матеріалу впродовж всього року, а також, процес відокремлення зародків є відповідальним та досить трудомістким [227]. З цих причин розповсюдженим є застосування альтернативних типів експлантів, такі як культури зрілих зародків, культури пильників, ізольовані яйцеклітини [97], а також незрілі колоси [32], сегменти колеоптиля, мезокотиля, молодих листків [222,223] та апікальні меристеми пагонів [4]. Листові сегменти та апекси пагонів є досить перспективними експлантами для біотехнології пшениці, оскільки дають можливість подолання генотипових бар'єрів та отримання великої

кількості вихідного рослинного матеріалу за короткий термін [223,222,4]. Ранні дослідження клітин меристем як експлантів для трансформації однодольних були багатообіцяючими, проте, частота трансформації була низькою та створені рослини демонстрували химерність розвитку [23].

Трансформація пшениці з використанням незріліх зародків досягла значного прогресу, розроблено проколи для певного числа генотипів та вдалось підвищити показників частоти та ефективності трансформації, проте застосування зрілих зародків в якості експлантів також є актуальним [255,43] (Додаток Б). Зрілі зародки пшениці легко доступні протягом року, таким чином їхнє використання оминає трудомісткий процес вирощування рослин в контрольованих умовах для збору великої кількості незрілих зародків необхідної стадії дозрівання [43,255]. *Bartok&Sagi* (1990) розробили швидкий метод індукції калюсу з використанням зрілих зародків, відсічених з частиною ендосперму, як додатковим джерелом поживних речовин [43]. Пізніше, *Delporte et al* (2001) розвинули вже ефективний метод трансформації зрілих зародків в якості експлантів сортів озимої (*Odeon*) та ярої (*Minaret*) пшениці, досягнувши частоти трансформації, подібної до раніше повідомленим даним з використанням незрілих зародків [43,63]. Проте, використання зрілих зародків для трансформації *in vitro* все ж поступається частотою та ефективністю іншим методам. Так, наприклад, *Wang et al*. вдалось досягти частоти трансформації незрілих зародків пшениці сортів Bobwhite, Yumai та Lunxuan208 - 0,06; 0,67 та 0,89% відповідно; *Aadel et al*. досягли показників частоти транформації до 1% , а *Medvecka ma Harwood* з використанням сорту Bobwhite SH98-56 – 2,2% [38,1,156,258]. Найбільш повний та спрощений протокол щодо трансформації зрілих зародків опубліковано *Chauhan et al*. (2017) [43,38].

Для покращення проникнення мембран клітинної рослин для клітин *Agrobacterium,* що пришвидшує доставку Т-ДНК та поліпшує ефективність трансформації пшениці, досить широко використовують поверхнево-активні речовини, такі як SilwetL-77 [130]. Останні дослідження Hayta et al. (2019) додають стадію попередньої обробки центрифугуванням незрілих зародків разом з

обробкою SilwetL-77, що підвищує ефективність трансформації, передбачаючи, що це збільшує проникність мембран клітинної стінки до агробактерії, проте точний механізм впливу невідомий [94].

Актуальним для трансформації однодольних рослин також є вибір вірулентих штамів *Agrobacterium tumefaciens* [20,112]. Більшість штамів *A. tumefaciens*, що використовуються для трансформації злакових, не було розроблено спеціально для однодольних, і власне, це обмежена їх кількість, ефективність яких раніше було опрацьовано у трансформації дводольних [100]. Група агробактеріальних штамів, похідних A281 (EHA101, EHA105, AGL0, AGL1) знайшла широке застосування в трансформації однодольних: EHA101 та EHA105 використовувались для успішної трансформації пшениці [108], штам AGL1 показав вищу частоту трансформації ячменю та сорго, ніж штам LBA4404 [98], штами LBA4404 та EHA101 були кращими для трансформації рису [100]. Для трансформації пшениці частіше застосовують три штами (близько 25% досліджень): LBA4404, C58C1, AGL1, та рідше (близько 10% описаних робіт) – A281, GV3101, ABI, EHA101, TYA105, AGL0, M-21 [5]. Певного прориву в *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації рослин було досягнуто впровадженням супер-бінарного плазмідного вектора pSB1 [123], що значно покращило трансформацію злакових і розширило діапазон рослин, сприйнятливих до трансформації *Agrobacterium* [23,136,263]. Супербінарний вектор додатково включав гени вірулентності virB, virC та virG супервірулентної плазміди pTiBo542, але потребував проміжного вектора клонування та коінтеграції в *Agrobacterium*, що ускладнювало клонування [22]. З метою усунення недоліків вектора pSB1 були створені серії плазмід pVIR з меншим репліконом, з корегованими послідовностями генів *vir* та сумісництвом з технологією Gateway-клонування [23]. *Przetakiewicz et al*. (2004) порівнювали ефективність трьох комбінацій бактеріальних штамів та векторів, що несли цільові гени для трансформації однодольних рослин, найвищий показник частоти регенерації на етапі селекційного відбору був за використання штаму EHA101 (вектор pGAH) на середовищі з канаміцином, значно нижчий за нього для штаму AGL1 (pDM805) на

фосфінотрицині та ще більше цей показник знизився на середовищі з гігроміцином [36,189]. З того часу з'явились нові та універсальні бінарні векторні вектори, одні з них – серія векторів pGreen – що можуть реплікуватись у *E. coli*, але не мають набору генів для реплікації у *Agrobacterium*, (http://www.pgreen.ac.uk) та другі – pCAMBIA (http://www.cambia.org/), основними ознаками цих векторів є висока здатність до клонування, багатокопійність у *E.coli*, покращена сумісність з будь-якими штамами та висока частота трансформації рослин [36]. Сворені бінарні вектори pCLEAN для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації як дводольних, так і однодольних рослин, базуються на широко застосованій системі pGreen/pSoup, плазміди pCLEAR-G/ pCLEAR-S повністю сумісні з векторами pGreen/pSoup, забезпечують доставку великої кількості трансгенів з різних Т-ДНК, мінімізують доставку зайвих послідовностей ДНК в ядерний геном рослин, а також, використовуються для створення безмаркерних рослин [240]. У дослідженнях Wang et al. (2016) було використано п'ять нових векторів на основі системи pCLEAN з репортерним геном *gusA* та селекційним маркерним геном *bar* у штамі *Agrobacterium* AGL1 для сортів пшениці сорту Stewart 63, в результаті оцінки ефективності трансформації та частоти створення трансгенних рослин два вектори (5G7B, 5TGTB154) були ефективними в отриманні безмаркерних трансгенних рослин пшениці [256].

Важливим аспектом генетичної трансформації є використання відповідного промотору для конститутивної, тканиноспецифічної або індуцибельної експресії цільового гена [128]. Більшість раніше застосованих промоторів походили з дводольних рослин, і нажаль не працювали так ефективно у однодольних [101]. На сьогодні достатньо невелику кількість промоторів успішно використовують в біотехнологічних дослідженнях рослин виду *Triticeae*, серед найбільш розповсюджених - UBIQUITIN 1 (кукурудза), ACTIN 1 (рис) та CAMV 35S (вірусу мозаїки цвітної капусти), які були успішно застосовані в трансформації однодольних [96]. Відомо про використання кількох тканиноспецифічних промоторів, такі як Glb (рисового глобуліну) та Glu (глютеніну пшениці) для

специфічної експресії в ендоспермі насіння однодольних, а також, стрес-індуцибельні, такі як rd29A (експресія у відповідь на посуху) та WARKYA71 (замороження) [128,124]. Важливим питанням є вибір селективного маркерного гена, продукти більшості яких надають стійкість до антибіотиків (таких як гігроміцин або канаміцин) або гербіцидів (гліфосат), і найбільш вживаними для злакових є гени, що кодують гігроміцинфосфотранферазу (*hpt*), неоміцинфосфотрансферазу (*nptII*), фосфінотрицин ацетилтрансферазу (*pat, bar*), ацетолактатсинтазу (*als*), фосфоманнозоізомеразу (*pmi*) та ізомеразу ксилози (*xyIA*). Ген *hpt* був найкращим маркером для відбору трансформованих рослин рису та ячменю, *pat/bar* – для кукурудзи та пшениці [108] та ген *pmi* показував найвищу ефективність у сорго[263].

1.2.1.Прогрес у *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації *in vitro* пшениці

Новостворені сорти сої, бавовнику, кукурудзи генетично-інженерними методами з покращеними сільськогосподарськими властивостями та стійкістю до абіотичних та біотичних стресів наразі широко впроваджуються у виробництво, на відміну від рослин пшениці, таким чином, запровадження нових методів на основі молекулярно-генетичних, біотехнологічних досліджень та розробка і розвиток вже існуючих методів є актуальним питанням, а технології генетичної інженерії пшениці стабільно прогресують останні 30 років [255]. Першими стабільно трансформованими рослинами роду *Triticeae* були рослини пшениці, отримані *Vasil et. al*. у 1992 році [249] з використанням методу біобалістичної трансформації, проте створені рослини були стерильні, тому за першим генетично-інженерним досягненням почались інтенсивні дослідження, спрямовані на удосконалення цього методу [255]. Отримані таким способом рослини часто демонстрували багатокопійність вставок, а Т-ДНК чи вектори інтегрувались в рослинний геном пошкодженими, що ускладнювало стабільне успадкування та потребувало більших зусиль для генерації гомозиготного покоління трансформованих рослин [94]. Серед

останніх розробок в напрямку біобалістичної трансформації стала заміна покриття, що наноситься на частинки від спермідину/хлориду кальцію до розчинів поліетиленгліколю/солей магнію, що дозволило інтегрувати векторну ДНК з інтеграцією однієї копії трансгена [96,108,111].

Cheng et al. у 1997 році вперше повідомили про вдалу трансформацію агробактерією культури калюсних тканин ізольованих та попередньо культивованих незрілих зародків пшениці з ефективністю трансформації 0,1-4,3% [48], проте застосування подібної методики надалі було обмежено генотиповою залежністю та низькою регенерацією в культурі *in vitro* [237]. Найбільш вражаючих результатів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці було досягнуто японською групою, якій вдалося досягти ефективності трансформації пшениці сорту *Fielder* з використанням культури незрілих зародків від 40 до 90%, технологія отримала назву PureWheat та ліцензію до впровадження для багатьох установ по всьому світі [108]. Використовуючи методику PureWheat *Richardson et al*. (2014) провели трансформацію з ефективністю 45% для австралійських сортів пшениці та 51% - для сорту твердої пшениці Kronos [197]. *Hensel et al*. розробили протоколи для трансформації пшениці сорту Bobwhite SH98-26 з частотою трансформації до 15% [97]. Wang et al. (2017) з використанням технології PureWheat отримали трансгенні рослини пшениці сорту Fielder з частотою трансформації 53% та досягли значень ефективності трансформації у діпазоні 2,7-37,7% для 15 комерційних китайських сортів пшениці [253]. Одні з останніх досягнень щодо підвищення частоти трансформації зроблені Hayta et al. (2019) з використанням того самого високопродуктивного сорту Fielder, які узагальнили розроблені раніше протоколи трансформації незрілих зародків пшениці [94]. Так, додаткові органічні речовини у живильних середовищах, включення стадії центрифугування перед обробкою агробактерією, вибір супервірулентних штамів (AGL1,0) та бінарного вектора pBract з включенням додаткових генів вірулентності дали змогу досягнути частоти трансформації у 25% [94]. Інші досягнення з використанням інших сортів окрім генотипів Fielder та Bobwhite були значно

нижчими, що вказує на необхідність пошуку вирішення проблеми генотип-залежності генетичної трансформації пшениці [255].

Серед якісних ознак, на які були направлені генно-інженерні та біотехнологічні методи у пшениці, стосувались, наприклад, збільшення кількості колосів на одну рослину, середньої маси тисячі зерен та інших показників врожайності зерна з підвищеною експресією факторів транскрипції TaGS2-B1 та TaNF-YB4, а також гена глутамінсинтази TaGS2 [106,267]. Процес фотосинтезу має вирішальне значення для приросту біомаси рослин, таким чином, асиміляцію фотосинтетичного вуглецю в С3 рослинах можна вдосконалити експресією ендогенних генів (PEPC, PPDK, PCK, NADP-ME, NADP-MDH) від С4 рослин, так, інтегрування PEPC, PPDK з кукурудзи окремо і разом в пшеницю підвищили фотосинтетичну активність, накопичення біомаси та врожайність створених рослин [280].

Оскільки абіотичні та біотичні стреси є основними факторами, що шкодять вирощуванню пшениці, багато досліджень було направлено на покращення толерантності та стійкості цієї надважливої сільськогосподарської культури. Інтегрування гена *Arabidopsis AtNHX1* покращило темпи росту створених ліній пшениці за умов підвищеного засолення (350 мМ NaCl) [160], трансгенні ліній пшениці з надекспресією *TaERF3* були толерантними до засолення та посухи [202], а надекспресія *TaSOD2* підвищувала активність СОД (супероксиддисмутази) та толерантність до засолення та інших стресових умов [256]. Важливими біотехнологічними досягненнями також є створені трансгенні лінії пшениці з підвищеною стійкістю до хвороб та шкідників. Так, надекспресія *TcLr19PR1* та *Sr50* підвищувала стійкість пшениці до стеблової іржі [76] та борошнистої роси [150], приглушення гена хітинсинтази *Chs3* призвела до стійкості до грибів роду *Fusarium* [47].

Нові можливості для генетично-інженерних модифікацій пшениці надало відкриття малих інтерферуючих РНК, вивчення їх фунцій як регуляторних молекул процесів адаптації/стійкості рослин привело до розробки нового напрямку – siРНК

[12]. В Україні співробітниками Інституту фізіології рослин і генетики НАН України розроблено біотехнологічні підходи для отримання стійких до посухи ліній пшениці з використанням дволанцюгового РНК-супресора гена проліндегідрогенази [12,11]. Було створено лінії пшениці, стійкі до нематоди (*H. avenae*), з використанням нових мікробіологічних біостимуляторів, що індукують синтез у рослинній клітині si/miРНК зі специфічними антисмисловими послідовностями експресія, яких впливає на рослинні гени, що регулюють відповідь на зараження та життєвий цикл розвитку нематод [242].

Вчені Китаю повідомили про мутагенез пшениці шляхом TALEN, та пізніше пшениця була одним із видів рослин, вперше редагованих системою CRISPR/Cas9 [255,221]. Серед якісних ознак на які були націлені мутації для поліпшення якостей створених рослин пшениці стійкість до борошнистої роси [259], розмір та маса зерна [144,283] та зниження вмісту глютену [212]. У всіх цих дослідженнях для доставки *Cas9* та *sgRNA* був обраний біобалістичний метод, проте, з розвитком та прогресом методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [197,108], наразі декілька вчених вважають такий метод доставки для редагування геному пшениці більш перспективним та актуальним [144,212,259,284]. Серед останніх розробок в цьому напрямку стало редагування геному в культурі мікроспор пшениці, внаслідок спрощеної методики їхньої ізоляції, генетичного та фізіологічної однорідності та зниженої складності геному (кількість алелів, що підлягають редагуванню зменшується вдвічі через гаплоїдний геном) [72]. Таким чином, оптимізація факторів, які прямо чи опосередковано впливають на інтеграцію чужорідних генів до геному пшениці та які, зокрема, впливають на взаємодію агробактерії з організмом хазяїна, повинні надати шлях до розвитку стабільного способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці [284,259,212].

1.2.2. Метод трансформації рослин *in planta* як актуальний підхід до генетичної модифікації пшениці

Методи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці з використанням культур тканин в умовах *in vitro* є широко розповсюдженими завдяки багатьом переліченим перевагам, проте, можливі небажані прояви, такі як сомаклональні варіації внаслідок епігенетичних ефектів або хромосомних перебудов, або, як це відбувається при застосуванні прямого біобалістичного методу, множинні вставки Т-ДНК та мовчання генів у наступних поколіннях трансгенних рослин [276]. Більшість протоколів для трансформації, особливо такої культури як гексаплоїдна пшениця (*Triticum aesivum L.*) передбачають використання праці кваліфікованого персоналу та коштовного спеціалізованого обладнання, що може бути недоступним для широкого загалу[276]. На сьогодні, велика кількість експериментів з агробактеріальної трансформації та подальшої регенерації *in vitro* дозволили отримати стабільні регенеранти рослин пшениці з ембріогенної культури, проте, це все ще малоефективні та трудомісткі процедури, що потребує подальшого розвитку методів трансформації без залучення культур тканин для отримання генетично модифікованих рослин пшениці більш легким, дешевим та ефективним способом, без обов'язкового дотримання стерильних умов [188,192].

Перенесення чужорідних генів методом in planta. Одним з альтернативних підходів, що мінімізує чи навіть повністю усуває використання культур тканин у генетичній трансформації є метод доставки цільових генів *in planta* [25] (Додаток В). Вперше такий метод було використано для трансформації *Arabidopsis* шляхом замочування та кокультивування пророслого насіння з *A. tumefaciens* з конструкцією pGV3850:pAK1003 [71], надалі метод *in planta* було застосовано для *Arabidopsis* з використанням вакуумної інфільтрації [29]. В подальшому було запроновано методи «clip-and-squirt», що передбачав підрізання суцвіть перед нанесенням суспензії агробактерії [118,3], а в подальшому «floral dip» або

занурення квіток [25,286], що дозволило уникнути використання вакуумної інфільтрації [3].

На сьогодні відомо про декілька шляхів використання методу трансформації *in planta,* такі як вакуумна інфільтрація, мікроін'єкції суспензією *Agrobacterium,* «pollen tube pathway», «floral dip», «floral spray», «spike dip», «pistil dip». [241,207,169]. Набільш широко застосованим є спосіб вакуумної інфільтрації, використання якого передбачає занурення тканини-мішені в суспензію *A. tumefaciens* та подальший вплив дії вакууму, що робить клітини рослин більш сприйнятливими до агробактерії, і таким способом було трансформовано, наприклад, рослини цукрової тростини (*Saccharum officinarum L.*) [155,169]. Ефективним методом перенесення генів є «pollen tube transformation», який може бути здійснений трьома способами: мікроін'єкціями, пряме нанесення Т-ДНК на маточку, та запилення квіток пилком, який попередньо обробляють агробактерією [169]. На сьогодні таким методом успішно трансформовано кілька видів сількогосподарських культур, зокрема кукурудзу (*Zea mays L.*) [164], цибулю (*Allium cepa L.*), диню (*Cucumis melo L.*) [93], пшеницю (*Triticum aestivum L.*) [105,18]. Іншим альтернативним підходом до трансформації методом *in planta* є мікроін'єкції суспензією агробактерії меристематичних чи інших тканини реципієнтних рослин [169]. Відомо про трансформацію рослин бавовника (*Gossypium hirsutum L.*) [113] шляхом ін'єкції апікальної меристеми, також, трансформація шляхом ін'єкції суспензією *Agrobacterium* епідермальних клітин цибулі (*Allium cepa L.*) [266] та 3-денних верхівкових апікальних меристем пагонів томатів (*Solanum lycopersicum L.*)[107].

Зважаючи на складний гексаплоїдний геном пшениці Saha and Blumwald (2016) обрали для своїх досліджень диплоїдну однодольну рослину – мишій (*Setaria viridis*) для трансформації *in planta* способом «spike dip», що передбачав занурення колосу рослини у суспензію агробактерії [207]. Tianzi et al. (2010) трансформували бавовник (*Gossypium hirsutum L.*) способом «pistil drip». Зокрема, після самозапилення рослин на маточку квіток наносили краплями розчин

агробактерії для інокуляції та огортали ізолятором з метою запобігання перехресного запилення, після чого отримане насіння оцінювали щодо інтегрування чужорідних генів [241].

Серед недоліків методу трансформації «floral dip» можна назвати відносно низьку ефективність трансформації, необхідність використання великої кількості квіток, відсутність конкретного цільового місця локалізації трасгена, необхідність у культивуванні значної кількості суспензії агробактерії, що передбачає використання великих центрифуг чи іншого обладнання [141,188]. Проте, такий метод є простим у відтворенні, економічним, застосування якого майже повністю виключає вирогідність бактеріальної контамінації (що часто зустрічається за використання культур тканин), що приваблює увагу науковців щодо його подальшого удосконалення з залученням нових видів рослин [141]. Трансформацію способом «floral dip» використовували не лише для *Arabidopsis*, але і для багатьох інших видів рослин, таких як картопля (*Solanum lycopersicum*) [268], ріпак (*Brassica napus*) [141], рижій (*Camelina sativa*) [147] та однодольних - пшениця [276], кукурудза [164] та рис [188] для яких, проте, використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та бомбардування мікрочастинками все ще є більш застосованими методами отримання трасгенних рослин [69].

Умови успішного інтегрування генів за використання методу трансформації in planta. Підбираючи умови трансформації «floral dip» для *Arabidopsis*, Clought та Bent (1998) встановили три основні вимоги для успішного інтегрування чужорідних генів: 1) склад інокуляційного середовища; 2) стадія розвитку квіток для обробки суспензією *Agrobacterium*; 3) додавання ПАР або використання вакууму [50,207].

Розповсюдження використання методу трансформації *in planta* з залученням інших видів рослин, окрім *Arabidopsis*, розширило список параметрів, підбір яких є необхідним для успішного інтегрування генів, а саме: стадія розвитку тканини-мішені або експланта для інокуляції; штам *Agrobacterium*, що використується для трансформації; оптична щільність клітин суспензії *Agrobacterium*; термін обробки

та спільного кокультивування з тканинами-мішенями; температура оточуючого середовища та pH середовищ [23,58,207].

Було встановлено, що молоді незрілі квітки *Arabidopsis* [50], які пікірували не пізніше, ніж за 4 дні до цвітіння, та колоски пшениці, які ще не вийшли з листової трубки за 4-7 днів до цвітіння з пилком на стадії одноядерної мікроспори [276], є найбільш сприйнятливими мішенями для трансформації клітин *Agrobacterium* [207]. У результаті досліджень не було зафіксовано суттєвого впливу pH середовища для інокуляції на ефективність трансформації рослин *Setaria viridis*, проте встановлено, що стадія розвитку квіток суцвіття має вирішальне значення для успішної трансформації, оскільки її ефективність знижувалась з розвитком колосу *S. viridis* [207].

Для використання методу *in planta* надважливими є умови обробки бактерією та особливо температурний режим. Вважають, що температура 25°C є оптимальною для активації генів вірулентності *Agrodacterium*, а її зменшення нижче 19°C та підвищення вище 28°C призводить до зниження вірулентності бактерії [58]. Було оцінено і деякі інші параметри, наприклад, додавання фенольних індукторів, таких як ацетосирингон, що у концентрації 200 мМ разом з відповідною температурою та pH середовища сприяє експресії генів вірулентності, продукти яких опосередковують доставку Т-ДНК [23]. Також, популярним у стабільній трансформації рослин методом занурення квіток знайшло додавання до інокуляційного середовища сурфактанту Silwet L-77, що у концентраціях 0,01-0,02% підвищує ефективність трансформації [23], та інших поверхнево-активних речовин, зокрема, Pluronic F-68 та Tween 20, ймовірна причина такого сприятливого впливу полягає у знатності цих речовин збільшити проникність мембран рослинних клітин і полегшити проникнення агробактерії в середину клітини [226].

Трансформація пшениці методом in planta. Про спроби трансформації «floral dip» гексаплоїдної пшениці (*Triticum aestivum L.*) було опубліковано раніше до розвитку такого методу для *Arabidopsis* [276] (Додаток В). Hess et al. (1990)

описували обробку суцвіть пшениці суспензією агробактерії під час цвітіння, припускаючи, що пилок пшениці містить флавонові глікозиди, які активують вірулентні гени *Agrobacterium,* що у близькому контакті в суцвіттях сприяє перенесенню чужорідних генів [99]. Ці дослідження посилались на результати Zerback et al. (1989) з рослинами петунії (*Petunia hybrida*), які вивчали *vir*-індукуючі властивості екстракту пилку та маточки цієї рослини, та визначили, що ті містять сполуки, ідентифіковані як флавонові глікозиди кемпферолу-3-глюцезилгалактозид та кверцетин-3-клейозилгелактозид, а також такі сполуки, як рутин, мірикотин-7-глюкозид, що разом з іншими *vir*–активуючими речовинами, такими як корична кислота та флавоноїди, впливають на природне зараження рослин *Agrobacterium* [278]. Проте, ранні спроби трансформації пшениці таким способом не були вдалими, ділянка Т-ДНК інтегрувалась не повністю, а наслідування трансгена було втрачене у наступних поколіннях рослин [99,276]. Supartana et al. трансформували пшеницю [234] та рис [235] методом *in planta* шляхом ін'єкції суспензією *Agrobacterium* зародкової апікальної меристеми насіння, з якої згодом розвивався проросток. Інший спосіб Zhao et al. (2006) передбачав ін'єкцію прикореневої частини зрізаних проростків [288]. Razzaq et al. (2011) також трансформували пшеницю шляхом ін'єкції суспензією агробактерії апікальної меристеми після проростання насіння [192]. Zale et al. (2009) успішно здійснили трансформацію пшениці *in planta* шляхом «floral dip» маючи на меті визначити, чи можна отримати стабільну інтеграцію Т-ДНК у геном пшениці за допомогою квіткового занурення, якщо інфікування агробактерією проводити на більш ранній стадії розвитку генеративних органів, ніж було використано іншими вченими раніше [276]. Таким чином, було розроблено найбільш вдалу методику «floral dip» для пшениці, яка заснована на зануренні кастрованих колосів пшениці, що не вийшли з прапорцевого листа та до їх цвітіння, в суспензію *Agrobacterium* на 1,5-2 хв та подальшому огортанні ізолятором для запобігання перехресному запиленню [276].

За результатами дослідження Bechtold et al. (2000) щодо ідентифікації клітин-мішеней для вставки Т-ДНК за трансформації «floral dip» *Arabidopsis* не спостерігалась експресія гена *gus* в пилкових зернах або зародкових мішках, та з використанням мутантних ліній *Arabidopsis* було встановлено, що мішенню для Т-ДНК є жіночий гаметофіт [29]. Ye et al. (1999) та Desfeux et al. (2000) спостерігали експресію *uiaA* (*gus*) в жіночих тканинах та пилкових зернах після трансформації вакуумною інфільтрацією та «floral dip» *Arabidopsis*, проте, за використання вектору з геном *gus,* що знаходився під контролем тканиноспецифічного промотору, експресії в пилку також не спостерігалось [270,64]. У результаті було отримано 15 трансформантів (при занурюванні кастрованих жіночих квіток в агробактерію) та нуль рослин за використанням обробленого *Agrobacterium* пилку-донора, що може підтверджувати те, що яйцеклітина є основною мішенню за трансформації «floral dip» [64]. Таким чином, ключовим фактором трансформації арабідопсису методом «floral dip» є близьке перебування клітин агробактерії до зав'язі, куди вони потрапляють на початку розвитку квітки [161]. У результаті використання цього методу на рослинах кукурудзи було висунуто припущення про наступні шляхи доставки Т-ДНК: в процесі проростання пилку *Agrobacterium* може взаємодіяти з проростаючою пилковою трубкою та формувати пилкове ядро, та Т-комплекс може бути доставлений разом з пилковою трубкою до ембріонального мішка, де відбувається трансформація яйцеклітини або зиготи [161].

Таким чином, метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* може бути потенційно корисним підходом для таких культур, як пшениця, у яких регенерація відбувається важко, також, дозволяє уникнути культури тканин, робота з якою потребує стерильних умов, займає багато часу, вимагає компетентних навичок для виробництва досить невеликого відсотку трансформованих рослин [192]. Розроблені і вдосконалені методи трансформації *in planta* мають потенціал для ефективної генетичної трансформації для подальшого генетичного вдосконалення зернових культур [192].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал для досліджень

В роботі було використано як модельний об’єкт для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* рослини тютюну (*N. tabacum*) сорту Самсун з колекції ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України». Також, використовували насіневий матеріал чистих ліній сортів пшениці м’якої української селекції, який було люб’язно надано Інститутом захисту рослин НААН України, зокрема використовували такі сорти озимої м’якої пшениці, як Зимоярка, Вихованка Одеська, Мірхад, Миронівська 67, Кесарія Поліська, Журавка Одеська, Щедрість Одеська.

Сорт **Зимоярка**, занесений в 2007 році до Державного реєстру сортів рослин придатних до поширення в Україні (далі Держреєстр СРППУ) для вирощування в Лісостеповій та Степовій зонах України. Є озимим сортом з осінньою сівбою та весняним підсівом (двуручка), середньостиглим, за прийнятою шкалою якості - сильний сорт (Держреєстр СРППУ, 2021). За роки конкурсного випробування (за даними оригінатора сорту Інституту фізіології рослин і генетики НАН України) урожай Зимоярки становив 68,3-84,4 ц/га за озимої форми та 42,2-55 ц/га як ярої. Сорт з високими зерновими властивостями, стійкий до посухи та борошнистої роси, відносна маса 1000 зерен - 42-45 г, приблизний вміст білка – 14 % (Наукова установа «Український інститут експертизи сортів рослин Міністерства розвитку економіки, торгівлі і сільського господарства України» (НУ УІЕСР); Інформаційно-довідкова система (ІДС) «Сорт», http://sort.sops.gov.ua). Пшениця сорту Зимоярка завдяки своїм агрономічним показникам, гарними борошномельними та хлібопекарськими властивостями, широко використовується для сівби, та є розповсюдженим об’єктом для селекційних та біотехнологічних досліджень [2,1].

Вихованка Одеська – за шкалою якості сильний сорт пшениці, є озимою та середньоранньою, внесено до Держреєстру СРППУ у 2013 році (заявник – Селекційно-генетичний інститут «Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України», м. Одеса), є універсальним для вирощування в різних природних зонах України. За період державного випробування у 2010-2012 рр. урожайність сорту коливалась в межах 50,4-98,4 ц/га, в середньому, в зоні Лісостепу врожайність складає близько 61,2 ц/га, для Степу – 50,4 ц/га, для Полісся – 54,4 ц/га. За даними лабораторії якості зерна НУ «УІЕСР Міністерства розвитку економіки, торгівлі і сільського господарства України» Вихованка відноситься за шкалою якості до сильних сортів, з продуктивним колосом, середньостиглим. Маса 1000 зерен – 37,7 – 39,4 г, вміст білка – 13,8-14,2 %, вміст клейковини – 30,3-31,6%, характеризується середньою холодостійкістю, посухостійкістю, та високою (8-9 балів) стійкістю до бурої іржі, фузаріозу, борошнистої роси (НУ УІЕСР; ІДС «Сорт»).

Сорт **Мірхад** (Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України) занесений до Держреєстру СРППУ у 2000 році, рекомендована зона для вирощування – Полісся. За шкалою якості даний сорт відноситься до філерів, середній вміст білка – 13-14%, маса 1000 зерен – 42-46 г, з потенціалом врожайності 104 ц/га. Даний сорт є середньостиглим, з високою стійкістю до хвороб, полягання та осипання (7-9 балів) та середньою стійкістю до посухи та холоду до 5 балів.

Сорт Щедрість Одеська внесений до Держреєстру СРППУ у 2014 році з пріоритетом поширення у Степовій та Лісостеповій зоні (заявник – Селекційно-генетичний інститут «Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України», м. Одеса). За шкалою якості це цінний сорт, середньоранній за стиглістю та середньою холодостійкістю. Потенціал врожайності 49,5-64,3 ц/га, маса 1000 зерен – 36,8-41,7 г, вміст білка – 14%, вміст клейковини- 28,4-30,4%. Для сорту характерна висока стійкість до бурої іржі, борошнистої роси, фузаріозу (7-9 балів), стійкість до посухи – 7,8-8 балів (НУ УІЕСР; ІДС «Сорт»).

Також, для сорту Щедрість характерний добре озернений колос та потужна кущистість, винятково висока стійкість до вилягання та осипання.

Миронівська 67 (оригінатор Миронівський інститут пшениці ім.. В.М. Ремесла НААН України), занесений до Держреєстру СРППУ у 2002 році, рекомендовано до поширення в зоні Лісостепу та Полісся. Створений гібридною комбінацією Миронівська 27 х Миронівська 61. Сорт відноситься до середньостиглих, за шкалою якості – цінний сорт, з високою стійкістю о холоду, полягання, осипання та середньою стійкістю до хвороб. Маса 1000 зерен – 48 г, вміст сирої клейковини – 29%, вміст білка – 15% та потенціалом урожайності до 96,0 ц/га (Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України; УІЕСР; ІДС «Сорт»).

Кесарія Поліська – внесений до Держреєстру СРППУ у 2017 році (Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН України») для поширення переважно у Степовій та Лісостеповій зоні. За шкалою якості це філер, середньостиглий сорт з високою стійкістю до посухи, полягання, осипання (8,7-9 балів) та до хвороб: борошнистої роси – 8-8,4 бали, бурої іржі – 8,6-9 балів, фузаріозу – 8,6-9 балів (За даними Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва; УІЕСР; ІДС «Сорт»). Показники врожайності для Степу – 53,2 ц/га, Лісостепу – 65,3 ц/га, Полісся – 56,2 ц/га, маса 1000 зерен – 41,9-45,6 г, вміст білка – 13,6-14%, клейковини – 28,9% (УІЕСР; ІДС «Сорт»).

Журавка Одеська внесений до Держреєстру СРППУ у 2011 році, рекомендована зона для вирощування Полісся, Лісостеп, Степ (заявник – Селекційно-генетичний інститут «Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України», м. Одеса). За якістю відноситься до сильних сортів пшениці м'якої, що вдало поєднує в собі високу продуктивність та стійкість до різноманітних польових умов, в тому числі екстремальних. За групою стиглості сорт є середньораннім з високою зимостійкістю. Потенціал врожайності 76,2 ц/га, маса 1000 зерен – 36,2-44,4 г, вміст білка – 13,4-13,8%, клейковини – 29,5-34,6%. Для сорту характерна висока холодостійкість,

посухостійкість (8-9 балів), стійкість до хвороб середня: до бурої іржі – 4-5 балів, до борошнистої роси – 5-6 балів (УІЕСР; ІДС «Сорт»).

2.2. Реактиви, використані в роботі

В роботі використовували реактиви наступних фірм-виробників.

1. Україна, «Макрохім»: амоній азотнокислий (NH4NO3), мідь сірчанокисла (CuSo4x5H2O), калій йодистий (KI), залізо сірчанокисле (FeSO4x7H2O), хлорид натрію (NaCl); «Хіммед»: калій азотнокислий (KNO3), кальцій хлористий (CaCl2). калй фосфорнокислий (KH2PO4), борна кислота (H3BO3), марганець сірчанокислий (MnSO4x5H2O), кобальт шести водневий (CoCl2x6H2O), сахароза; «Arterium»: цефотаксим, канаміцин;

2. «Dushefa» (Нідерланди): рифампіцин, карбеніцилін, суміш МС без вітамінів, суміш МС з вітамінами за Гамборгом, міо-інозітол, L-глутамін, глюкоза, мальтоза, Д-манітол;

3. «Sigma» (США): 2,4 – дихлорфенолоцтова кислота (2,4-Д), тіамін (вітамін В1), піридоксин (вітамін В6), 6-бензоамінопурин (БАП), нафтилотова кислота (НОК), нікотинова кислота (вітамін РР), бактопептон; дріжджовий екстракт, ацетосирінгон, 2-(N-орфоліно)етансульфонової кислоти (MES);

4. «Merck» (Німеччина): мікробіологічний агар;

5. «ThermoFisherScientific» (США): гігроміцин В;

6. «Fermentas» (Литва): GeneRuler 100bp, 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use маркер довжини фрагментів ДНК;

7. «Neogene» (Україна): суміш «HotStart – ПЛР», праймери до генів *TPS1*, *TPS2*.

2.3. Векторні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози

Кодуючі послідовності генів біосинтезу трегалози *TPS1* (трегалозо-6-фосфатсинтази) та *TPS2* (трегалозо-6-фосфатфосфатази) були люб’язно надані Інститутом біології клітини НАН України, м. Львів. Генетичні векторні конструкції, що використовували у дослідженнях з трансформації рослин

тютюну та пшениці, було сконструйовано за допомогою методу Gateway–клонування [193,117,176].

Кодуючі послідовності генів *TPS1* та *TPS2* без стоп кодону довжиною 1488 п.н. та 2691 п.н. відповідно було окремо ампліфіковано з використанням специфічних праймерів, що містили у собі attB сайти розпізнавання BP-клонази для Gateway: *TPS1*(Gate) _ for – GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCATGACTACGGATAACGCTAAGG, *TPS1*(Gate) _rev – GGGGACCACTTTGTA CAAGAAAGCTGGGTCGTTTTTGGTGGCAGAGGAGC – 3', та *TPS2*(Gate)_ for GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGCATGATGGAATAA, *TPS2*(Gate)_ rev GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCACTGCCCA AGACAATTC. Використовували наступні параметри для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): початкова денатурація – 95°С, 4 хв, наступні 36 циклів – денатурація – 95 °С, 30 с, відпал праймерів – 57°С, 40 с, елонгація – 72°С, 90 с, та цикл кінцевої елонгації – 72°С 7 хв. Ампліфікований ПЛР-фрагмент виділяли із агарозного гелю, очищали та використовували для подальшої реакції BP-рекомбінації із донорним вектором pDONOR207. Реакцію BP-рекомбінації проводили наступним чином: до 6 мкл ампліфікованих ПЛР – фрагментів (10 нг/мкл) додавали 1 мкл донорного вектору pDONOR207 (150 нг), 1 мкл ТЕ - буферу (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH=8,0) та 2 мкл BP-клонази (BP Clonase™ II, Thermo Fisher Scientific, США). Реакцію інкубували при 25°С протягом 18 год. Для зупинки реакції та подальшої трансформації компетентних клітин кишкової палички до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37°С протягом 10 хв. Далі проводили реакцію LR-рекомбінації для клонування послідовностей у вектори призначення pGWB2 (Gateway Binary Vectors) [170,168] та pBract214 (Biotechnology Resources for Arable Crop Transformation) (www.bract.org)[230]. До 6 мкл створеного за допомогою BP-рекомбінації Entry-клону (100 нг) додавали 1 мкл вектору призначення, а саме pGWB2 та pBract214 окремо, 1 мкл ТЕ-буферу (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH=8,0) та 2 мкл суміші ферментів LR Clonase ™ II (Thermo Fisher Scientific,

США) та перемішували. Реакцію інкубували при 25°С протягом 18 год. Для зупинки реакції до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37°С протягом 10 хв.

Отримані конструкції pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2* під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S) використовували для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну та pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* з цільовими генами під контролем промотору убіхвітину кукурудзи використовували для подальшої трансформації пшениці методами *in vitro* та *in planta*.

2.4. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну (*N.tabacum*)

Для перенесення цільових генів застосовували метод трансформації листових дисків [245]. Для цього листкові диски тютюну площею 0,5-1,5 $см^2$ механічно пошкоджували та інокулювали нічною культурою агробактерії [55], яку вирощували в середовищі LB (OD_{600}=0.4-0.8) [211] з додаванням канаміцину (100 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л). В кожному експерименті використовували по 30-50 експлантів. Інокуляцію проводили протягом 30 хв в присутності 40 мМ ацетосирингону (Posales-Campos, 2019; Curtis, 1995), після чого експланти просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МС (Murashige & Skoog, 1962) без додавання антибіотиків для кокультивування з агробактерією протягом 48 год при 28°С у темряві.

Після стадії кокультивування експланти переносили на середовище МС для регенерації пагонів з додаванням 30 мг/л гігроміцину для селекції трансформованих ліній рослин та 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії та регулятори росту: 1 мг/л 6-бензоамінопурину (БАП) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК). Попередньо для визначення селективної концентрації гігроміцину експланти контрольних рослин культивували на живильному середовищі, що містило гігроміцин в концентрації від 0 до 35 мг/л, для регенерації рослин. Регенеровані в умовах селективного тиску пагони

відокремлювали та переносили на середовище МС без додавання регуляторів росту, що містило половинний набір макросолей, 10 г/л сахарози та 0,1 мг/л НОК для їх укорінення. Показники частоти та ефективності трансформації визначали на 30-40 добу культивування протрансформованих експлантів. Як контроль проводили дослідження по регенерації рослин тютюну, які не зазнавали трансформації.

На наступних етапах досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації тютюну було проведено підбір складу живильних середовищ МС з метою підвищення частоти регенерації та вкорінення рослин. Після проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації конструкціями pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* та стадії кокультивування експланти тютюну було висаджено на середовища на етапах регенерації та вкорінення з додаванням до його складу глюкози, сахарози та мальтози у концентраціях від 0 до 45 г/л. Частоту та ефективність регенерації в умовах селективного тиску визначали на 30-40 добу після трансформації як співвідношення кількості життєздатних експлантів до загальної кількості експлантів, взятих у дослідження. Показником ефективності трансформації була середня кількість регенерованих пагонів, сформованих в умовах селективного тиску, на один експлант.

2.4.1. Аналіз стійкості отриманих ліній тютюну до осмотичного стресу

Для дослідження стійкості рослин тютюну до посухи в умовах *in vitro* імітацію дефіциту води проводили з додаванням маніту (Ducheffa, Німеччина), оскільки він підвищує внутрішньоклітинний осмотичний потенціал та знижує зовнішній водний потенціал. На початку досліджень було проведено аналіз морфологічних особливостей розвитку контрольних рослин тютюну при додаванні маніту до середовища МС в таких концентраціях: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 0,1 М. В подальшому рослини тютюну після трансформації генами *TPS1* та *TPS2* висаджувались на середовище для регенерації рослин.

2.5. Введення в культуру *in vitro* досліджуваних сортів пшениці

Для введення в культуру *in vitro* використовували як експланти незрілі зародки [98] пшениці сортів Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад. Зібрані на 12-16 добу після запилення незрілі зернівки пшениці стерилізували за такою схемою: 70%-й етанол – 30 с, гіпохлорит натрію – 12 хв, триразове промивання стерильною дистильованою водою. Асептично виділені зародки розміром 1–1,5 мм розміщувались щитком догори [206,252] у чашки Петрі на середовище МС і вітамінами за Гамборгом (Gamborg, 1968), доповнене 2 мг/л 2,4 – дихлорфенолоцтової кислоти (2,4-Д), 30 г/л мальтози, 0,5 мг/л L-глутаміну та культивували протягом 2-3 діб при 24°С у темряві для індукції калюсогенезу. Частоту утворення первинного калюсу оцінювали на 2-3 добу культивування експлантів на зазначеному середовищі, як співвідношення кількості експлантів, на яких утворився первинний калюс, до їх загальної кількості, взятих в експерименті, помножене на 100%. Після перенесення експлантів на світло (16-годинний світловий період та 24°С) через 14-16 діб культивування визначали частоту утворення морфогенного калюсу на їх поверхні, як співвідношення експлантів, на яких утворювався калюс з щільними, глобулярними, зеленими структурами до загального числа експлантів, використаних в дослідженні, помножене на 100%. Після перенесення експлантів на середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, через 30 діб визначали частоту регенерації пагонів, як співвідношення кількості живих експлантів з пагонами, які утворились на їх поверхні, до загальної кількості експлантів, помножене на 100%.

2.6. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці в умовах *in vitro*

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в умовах *in vitro* було використано вектори pBract 214-*TPS1* та pBract 214-*TPS2,* в яких гени *TPS1* та *TPS2* знаходились під контролем промотору убіхвітину кукурудзи. Попередньо,

було проведено дослідження з підбору селективної концентрації гігроміцину. Для цього контрольні рослини висаджували на середовище для регенерації, доповнене гігроміцином у концентраціях від 0 до 40 мг/л. Насіння пшениці, отримане не пізніше 16 доби після запилення стерилізували, як описано в підрозділі 2.5. Незрілі зародки асептично ізолювали та розміщували щитком догори на середовище МС з вітамінами за Гамборгом з додаванням 30 г/л мальтози, 500 мг/л L-глутаміну та 2 мг/л 2,4-Д для попереднього культивування протягом 4-5 діб при 24°С та 16–годинному добовому фотоперіоді. Для здійснення трансформації нічну культуру агробактерії нарощували в середовищі LB з додаванням антибіотиків рифампіцину (50 мг/л) та канаміцину (100 мг/л) при 28 °С на шейкері (150 об./хв). Після досягнення значень оптичної щільності OD_{600} = 0,3-0,4 бактеріальну суспензію осаджували шляхом центрифугування (5 тис. об./хв), осад ресуспендували в рідкому середовищі наступного складу: макро- та мікросолі МС (Murashige & Skoog,1962), 30 г/л мальтози, 800 мг/л L-цистеїну, 500 мг/л L-глутаміну, 2 г/л 2-(N-орфоліно)етансульфонової кислоти (MES) та 200 мМ ацетосирингону (pH=5,8) [98]. На 4-5 добу культивування екпланти пшениці обробляли суспензією агробактерії протягом 30 хв, просушували на фільтрувальному папері і переносили на середовище МС без антибіотиків для кокультивування з агробактерією протягом двох діб (25°С, темрява). Після кокультивування з агробактерією експланти розміщували на модифіковане середовище МС з вітамінами за Гамборгом для подальшої регенерації пагонів, доповнене 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 10 г/л глюкози, 10 г/л сахарози, 500 мг/л L-глутаміну, 500 мг/л MES, а також антибіотиками: цефотаксимом (500 мг/л) для елімінації агробактерії та гігроміцином (30 мг/л) для селекції трансгенних рослин. Регенеровані пагони укорінювали на середовищі МС з вітамінами за Гамборгом, що містило половинний набір макросолей, 10 г/л сахарози, 400 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л гігроміцину. Через 40 діб визначали частоту та ефективныість регенерації пагонів в умовах

селективного тиску. Після перенесення на середовище для вкорінення визначали показники частоти утворення коренів.

2.7. Трансформація пшениці методом *in planta*

Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації методом *in planta* використовували конструкції з генами біосинтезу трегалози pBract 214-*TPS1* та pBract 214-*TPS2*. Перенесення генів здійснювали в геном сортів пшениці Вихованка, Зимоярка, Журавка Одеська, Кесарія Поліська, Щедрість. Для цього колоси пшениці довжиною 4-6 см, які ще не вийшли з прапорцевого листка, кастрували: видаляли верхні, нижні та центральні недорозвинені квітки, залишаючи по 10-14 квіток на колос, з кожної видаляли пиляки. Колоси огортали індивідуальним ізолятором з пергаментного паперу і залишали на 3-5 доби.

Для проведення трансформації нічну культуру агробактерії нарощували в рідкому середовищі LB на орбітальному шейкері (150 об./хв) при 28°C в темряві. Після досягнення значень оптичної щільності OD_{600}=0,2-0,4, 1 мл нічної культури агробактерії використовували для підготовки індукційного середовища наступного складу: ½ LB, 250 мг/л $MgSO_4{}^x7H_2O$, 500 мг/л KH_2PO_4, 200 мМ ацетосирінгону та антибіотики: 50 мг/л рифампіцину та 100 мг/л канаміцину. За досягнення значень оптичної щільності OD_{600}=0,8-1 індукційне середовище центрифугували (4000 об./хв, 10 хв), осад ресуспендували у рідкому інокуляційному середовищі наступного складу: ½ МС, 5 мМ MES, 5 г/л сахарози та 200 мМ ацетосирінгону. Нанесення середовища на кастровані суцвіття проводили шляхом занурення кожного колосу в це середовище на 2 хв.

Після обробки агробактерією кожний колос підсушували та знову огортали індивідуальним ізолятором і залишали на 7 діб. Кастровані колоси примусово запилювали пилком інтактного колосу того ж сорту. Після повного достигання насіння (через 21 доби) колоси збирали та оцінювали морфологічні показники: середню довжину колоса, відсоток зав’язування насіння, його зовнішній вигляд та фізіологічний стан. Зібране насіння після стратифікації

висаджували для подальших досліджень в горщики з субстратом наступного складу: суміш пісок:грунт:торф (1:1:1).

2.8. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній тютюну та пшениці

З метою підтвердження перенесення та інтеграції генів *TPS1* та *TPS2* в геном рослин тютюну та пшениці здійснювали молекулярно-генетичний аналіз за допомою ПЛР з використанням специфічних праймерів до генів: *TPS1* (5` - AGATCATCGGTGTTCCAAGG – 3` та 5’ – TGTCTTCCGTGCAAAGAGTG – 3’); *TPS2* (5’- ATGGGGCATGATGGAATAA – 3’ та 5’- ACCACTGCCCAA GACAATTC – 3’). Тотальну ДНК виділяли з листя рослин за допомогою ЦТАБ-методу [26]. Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (“Applied Biosystems”, США). Для ПЛР використовували реакційну суміш наступного складу: 10 мкл суміші HotStart ПЛР (Neogene, Україна), 2,5 мкл розчину ДМСО (10%), 50 нг ДНК, по 1 мкл кожного з праймерів. ПЛР-ампліфікація мала наступні параметри: початкова денатурація - 95°С 12 хв, наступні 40 циклів – денатурація 95°С 30с, відпал праймерів - 57°С 40с, елонгація - 72°С 90с, та кінцева елонгація - 72°С 7хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1 %-му агарозному гелі в 1хТВЕ буфері (89 мМ Tris, 89 мМ H_3BO_4, 2 мМ EDTA) в присутності етидію броміду та візуалізували в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер довжини фрагментів ДНК (GeneRulerTM 100 bp, 1 kb, Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas, Литва). Розміри очікуваних фрагментів – 640 п.н. для гена *TPS1* та 758 п.н. для *TPS2*.

2.9. Аналіз стійкості отриманих рослин пшениці до посухи

Дослідження з посухостійкості рослин пшениці, контрольних та отриманих після трансформації *in planta*, проводили в умовах закритого грунту. Зібране насіння вирощували в вегетаційному посуді однакового об’єму, що містив однорідний ґрунт (пісок:торф: ґрунту 1:1:1), при 16-годинному освітленні та температурі 24-26°С. Для імітації посухи був обраний період до

початку колосіння, виходу в трубку і до дозрівання насіння, що тривав близько місяця, в залежності від сорту. Для створення умов посухи рослини переводили на обмежений полив, перший тиждень – 50% від повного стовідсоткового постачання води, другий тиждень – 40%, та останній тиждень 30%. Експерименти проводили з контрольними рослинами і за умов стресу, та за умов достатнього постачання води. Продуктивність пшениці визначається багатьма структурними показниками: маса тисячі зерен, довжина колосу, кількість колосків у колосі. Тому, по закінченню дослідів за повного достигання зерна проводили аналіз морфологічних показників рослин та оцінку параметрів врожаю: висота рослин, довжина головного колоса, кількість зерен з головного колоса, маса зерен з головного колосу [6].

3.0. Визначення вмісту трегалози у створених лініях пшениці

Трегалоза, як нередукуючий цукор, не гідролізується при низькому pH або високих температурах, не вступає в реакції з білками чи амінокислотами, відповідно не ініціює реакції Майяра, а її природно низький вміст в клітинах вищих рослин додатково ускладнює процедуру виміру кількісного вмісту. Концентрацію трегалози в рослинах пшениці визначали за використання набору реагентів (Megazyme™, Ірландія) згідно інструкції виробника. Зокрема, визначення вмісту трегалози проводили у контрольних і трансгенних рослин, що зростали за умов нормального поливу та посухи. Для цього листя рослин (1 г) розтирали в ступці з рідким азотом, далі дворазово екстрагували 500 мМ оцтовою кислотою за кімнатної температури та фільтрували (розмір пор-0,45мкм у фільтра) [80]. Отриманий екстракт використовували для реакції з реагентами (Megazyme™, Ірландія). Основні принципи виміру наступні: трегалоза гідролізується до Д-глюкози під дією трегалази, далі Д-глюкоза фосфорилюється завдяки гексокіназі до глюкозо-6-фосфату, який окислюється $НАДФ^+$ до глюконату-6-фосфат з утворенням НАДФН. Кількість НАДФН є стехіометричною по відношенню до кількості Д-глюкози, а отже вдічі більшою

за вміст трегалози, НАДФН вимірювали за довжині хвилі 340 нм (UV,VIS Спектрофотометр SPECORD® 210). Масову частку трегалози рахували через концентрацію, яка прямо пропорційна даним оптичних вимірів.

3.1. Статистична обробка даних

Експерименти повторювали не менше трьох разів, оцінку значимості між середніми проводили з рахуванням найменшої істотної різниці (HIP), достовірність результату підтверджували за t-критерієм Ст'юдента для 5% рівня значущості, розрахунки проводились в програмі Excel [13].

РОЗДІЛ 3

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТЮТЮНУ (*N. tabacum*) ГЕНАМИ БІОСИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

3.1. Створення векторних конструкцій з генами *TPS1* та *TPS2*

За використання технології Gateway-клонування було створено векторні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Цільові гени *TPS1* та *TPS2* кодують, відповідно, трегалозо-6-фосфат синтазу та трегалозо-6-фосфат фосфатазу. Технологія клонування Gateway – це набір універсальних та надійних Т-ДНК бінарних векторів, що дозволяє швидко та просто клонувати та переносити фрагменти ДНК між векторними основами [22]. Вона базується на високоспецифічних реакціях інтеграції бактеріофагів λ у геном кишкової палички (*E. coli*) з використанням двох ферментих сумішей для двох протилежних реакцій рекомбінації [193]. Суміш ферментів BP-клонази рекомбінує attB сайти з сайтами attP, що регенерують сайти attL та attR; тоді, як ферментна суміш LR-клонази каталізує зворотню реакцію, і в результаті створюється човниковий вектор pEntry, в якому вставка, що фланкується сайтами рекомбінації attL та attR, може бути перенесенена в вектор експресії будь-якого типу [193,117]. Бінарні вектори групи pGWB були конструйовані на основі модифікованого pBI (Mita et al., 1995), що містять селективні маркерні гени неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) та гігроміцинфосфотрансферази (*hpt*) для селекції рослин під промоторами нопалінсинтази (Pnos) та вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S), відповідно [168].

Векторні конструції pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* (Рис. 3.1.1) було створено для трансформації рослин. Ці вектори несли в собі цільові дріжджові гени біосинтезу трегалози під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (P35S) та селективні маркерні гени *ntpII* (неоміцин-фосфотрансферази II) та *hpt* (гігроміцинфосфотрансферази), що забезпечують стійкість до канаміцину та гігроміцину, відповідно, у рослин.

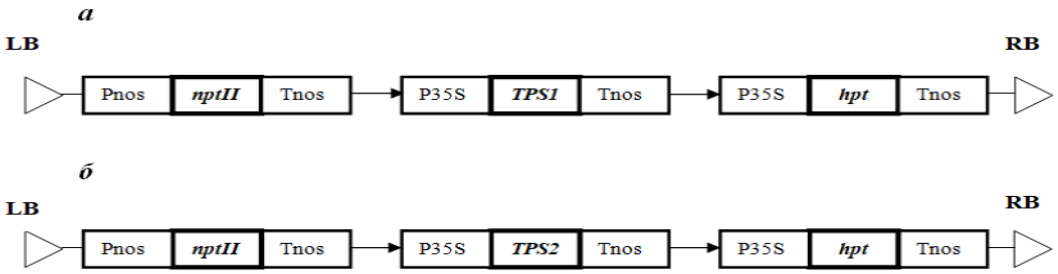

Рис. 3.1.1. Схема Т-ДНК векторів pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2*: LB, RB- ліва та права границі Т-ДНК, *TPS1* – цільовий ген біосинтезу трегалозо-6-фосфатсинтази, *TPS2* – цільовий ген біосинтезу трегалозо-6-фосфатфосфатази, *nptII* – селективний ген неоміцин-фосфотрансферази II, *hpt* – селективний ген гігроміцин-фосфотрансферази, P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, Pnos, Tnos – нопалінові промотор і термінатор.

Створені конструкції pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* переносили методами хімічної трансформації у клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 для подальшого використання у генетичній трансформації рослин [211]. Їх ефективність перевіряли на модельному рослинному об’єкті – тютюні [9].

3.2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація тютюну

Для тестування створених конструкцій здійснювали генетичну трансформацію модельного об’єкта *N. tabacum* сорту Самсун. На початкових етапах експериментів для підбору селективної концентрації гігроміцину досліджували вплив антибіотика на життєздатність експлантів тютюну. Було досліджено вплив різних його концентрацій (0-35 мг/л) на експланти тютюну після 30 діб їх вирощування в присутності селективного агента (Рис. 3.2.1.). Концентрація гігроміцину у 25 мг/л була визначена нами як селективна для подальшого відбору трансгенних ліній тютюну (ЛД=100) (Рис. 3.2.1.).

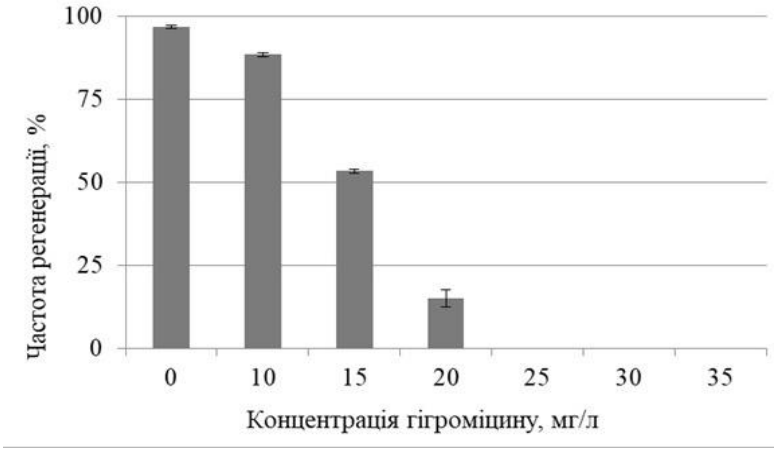

Рис. 3.2.1. Частота регенерації рослин тютюну (%) на живильному середовищі МС, доповнене гігроміцином у концентраціях від 0 до 35 мг/л.

Після проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням листових листків тютюну на 30 добу селекції та регенерації експлантів на середовищі МС з додаванням БАП (1 мг/л), НОК (0,1 мг/л), цефотаксиму (500 мг/л) та селективного агента – гігроміцину визначали показники частоти регенерації рослин в умовах селективного тиску (Рис. 3.2.2.).

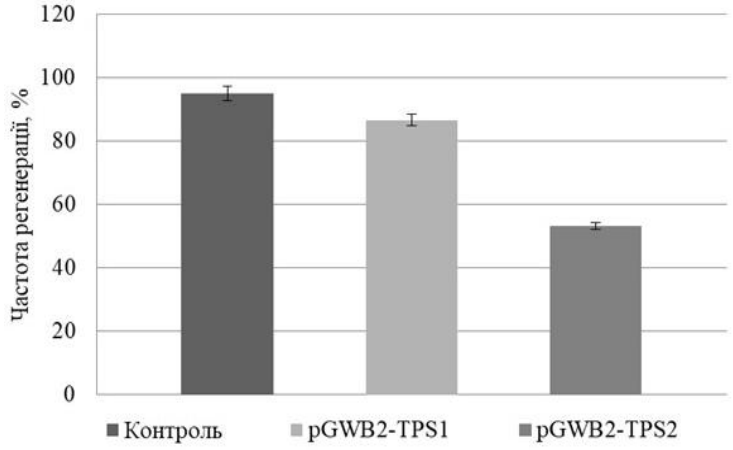

Рис. 3.2.2. Частота регенерації (%) дослідних рослин тютюну після агробактеріальної трансформації (Табл.3.3.1.) та контрольних експлантів.

Так, частота регенерації за трансформації конструкцією pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* становила 86,5±1,78%* та 53,3±1,09% відповідно, в той час, як

частота регенерації контрольних рослин була на рівні 95±1,52%*. Ефективність регенерація була на 4 та 5 пагонів на експлант, відповідно (Рис. 3.2.2.).

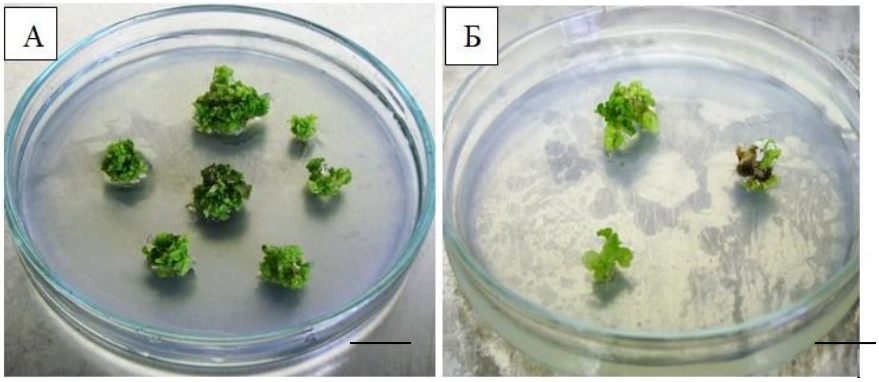

Рис. 3.2.3. Експланти тютюну на 30 добу культивування на середовищі МС для регенерації після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням конструкцій з генами біосинтезу трегаози: А – конструкція pGWB2-*TPS1*; Б – конструкція pGWB2-*TPS2*. Масштабна позначка – 1 см.

Оскільки, рослини тютюну часто використовують як модельні об’єкти для генетичної трансформації через здатність до регенерації у досить швидкі терміни та порівняно, наприклад, з однодольними, відносно прості у відтворюванні протоколи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, тютюн був першою рослиною для апробації конструкцій з генами біосинтезу трегалози [81,187]. Після появи цих даних щодо підвищення стійкості створених рослин до дії стресових чинників, число видів рослин для біотехнологічних експериментів з метаболізмом трегалози збільшувалось. Проте, незважаючи на те, що трансформовані рослини були стійкими до дії низьких температур, посухи, засолення, їх фенотипові ознаки внаслідок підвищеного акумулювання трегалози зазнавали різких змін – затримку росту та пагоноутворення, нетиповий розвиток коренів, зміни форми листя, фертильність, повна зупинку подальшого розвитку [81,110,187,201,269].

Слід зазначити, на 30-40 добу культивування протрансформованих рослин на регенераційному середовищі МС спостерігали затримку розвитку пагонів, порівняно з контрольними рослинами, а після їх перенесення на середовище МС

для вкорінення (з додавання половинного набору макросолей МС, 10 г/л сахарози та 0,1 мг/л НОК) спостерігали затримку коренеутворення порівняно з контролем. Дослідження з контрольними рослинами за аналогічних умов вирощування показало частоту регенерації пагонів - 95±2,35%*, а частоту коренеутворення на середовищі для вкорінення - 98±1,89%, загалом було протестовано не менше 200 контрольних експлантів.

Відповідно до літературних даних було висунуто припущення, що аномалії, які спостерігали у рослин тютюну, а саме затримку росту і коренеутворення, що не давало можливості проведення молекулярно-генетичного аналізу, можливо, пов'язані з перенесенням та експресією дріжджових генів *TPS1* та *TPS2* у відібраних в умовах селективного тиску ліній рослин *N. tabacum*, що обумовило подальші дослідження з оптимізації складу живильних середовищ для регенерації рослин. Оскільки, існують дані, що синтез трегалози в рослинному організмі, а також рівень експресії генів її біосинтезу здатні впливати на розподіл метаболітів під час енергетичного обміну, регулюють кількість та розподіл цукрів всередині та поза клітиною [110,73], важливим завданням було з'ясувати, як концентрація різних джерел вуглецю в регенераційному середовищі може впливати на ріст та розвиток трансформованих рослин.

Після проведення процедури трансформації експланти висаджували на середовище МС, доповнене, відповідно, окремо концентраціями цукрів від 0 до 45 г/л - сахарози, глюкози та мальтози. На 30 день вирощування було зафіксовано показники частоти та ефективності регенерації пагонів, що відрізнялись від попередніх даних. Найвищі показники частоти регенерації та її ефективності за трансформації конструкцією pGWB2-*TPS1* було встановлено для рослин, які регенерували на середовищах із концентраціями сахарози, мальтози або глюкози від 25 до 45 г/л. За цих умов найвищий показник частоти регенерації в умовах селективного тиску становив 88,5±3,23% на середовищі з 45 г/л сахарози, а найбільший показник ефективності трансформації був 4 (Табл. 3.2.1.). При вирощуванні рослин на середовищі, що містило глюкозу, ефективність

регенерації була вищою і складала в середньому 5 регенерантів на експлант, а показник частоти регенерації в умовах селективного тиску був на рівні 81,67±3,24%. Нижчі показники ефективності регенерації в умовах селективного тиску були отримані при додаванні у поживне середовище мальтози в концентраціях 30-45 г/л, як єдиного джерела вуглецю (1-2 регенеранти на експлант), ріст пагонів затримувався або зовсім не відбувався, а найвищий показник ефективності регенерації становив 63,91±2,62% [9].

Таблиця 3.2.1

Частота регенерації пагонів тютюну після трансформації (Дослід) конструкцією pGWB2-*TPS1* на середовищах з різними концентраціями цукрів в порівнянні з контролем (Контроль) в умовах селективного тиску

Частота регенерації, %	Концентрація цукрів, г/л					
	Мальтоза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	17,4±2,03*	30±1,75	55±0,97	73,7±2,5*	88±3,1	80±1,5
Дослід	10,3±1,6	16,6±2,34*	28,3±1,8	43,5±3,1	53,42±2,71*	63,91±2,62*
	Глюкоза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	15±2,34*	38±1,7	50,5±2*	88,5±2,1*	96±1,45	72±2,3*
Дослід	11,6±0,87	31,2±2,5*	35,4±2,2*	47±3,8	86±3,9	81,67±3,24
	Сахароза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	18±0,95	35±1,46	58±0,85	80±2,8	93±2,2*	76±1,6
Дослід	18,3±2,89	20±2,32*	56,7±2,67	68,9±3,9	85,3±3,93	88,5±3,23

Примітка. P*≤0,05.

На 60 добу вирощування на середовищі для коренеутворення з додаванням 300 мг/л цефотаксиму та 25 мг/л гігроміцину вдалося досягнути 25±1,98% вкорінення пагонів при додаванні сахарози або глюкози у всіх протестованих концентраціях (Рис. 3.2.2.). Відповідно до літературних даних можна

припустити, що з підвищенням експресії гена *TPS1* вичерпується вуглецевий субстрат у живильному середовищі рослин внаслідок підвищеної активності трегалозо-6-фосфат синтази з синтезом меншої кількості продукту Т6Ф, що активує протеїнкінази SnRK1 та призводить до активації катаболічних процесів [73,110,218]. Також, можна припустити, що внаслідок підвищення кількості вуглецю підвищувався рівень продукту реакції – Т6Ф, що призвело до зниження активності SnRK1 та анаболічних процесів. На кожному етапі дослідження експериментальні рослини тютюну порівнювали з контрольними рослинами (Рис. 3.2.4.).

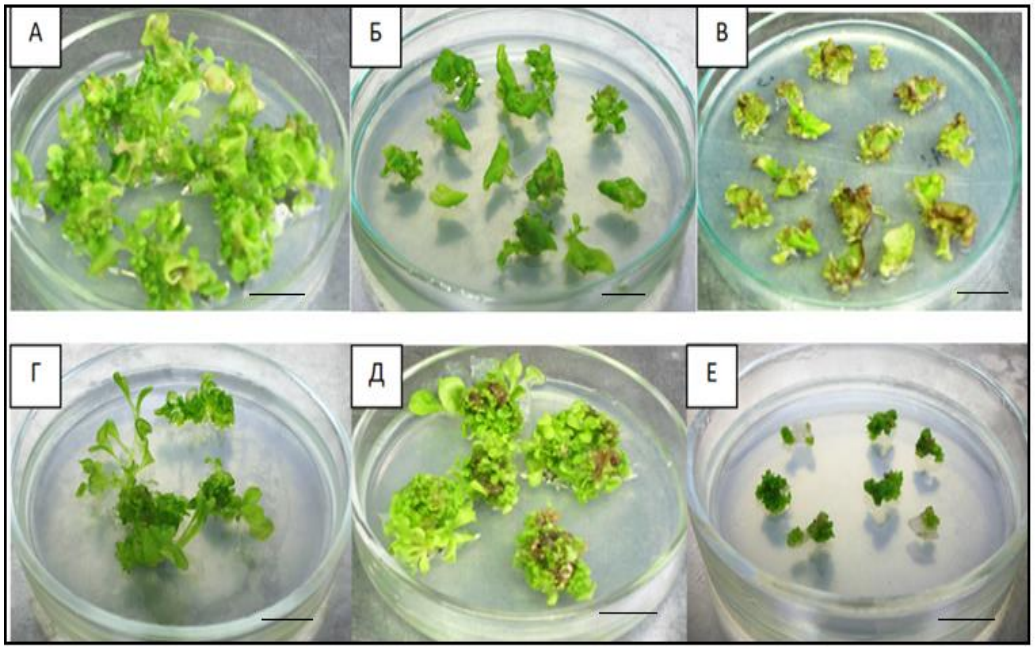

Рис.3.2.4. Загальний вигляд експлантів тютюну на 30 добу культивування: А – контрольні експланти на середовищі МС для регенерації; Б – контрольні рослини на середовищі для регенерації пагонів, що містило 5%-ну сахарозу; В – контрольні експланти на середовищі з додаванням 25 мг/л гігроміцину та 500 мг/л цефотаксиму; Г – експланти після трансформації конструкцією pGWB2-*TPS1* з 5%-ною сахарозою; Д – конструкцією pGWB2-*TPS2* на середовищі з 5%-ною сахарозою; Е – конструкцією pGWB2-*TPS1* на середовищі з 5%-ною мальтозою. Масштабна позначка - 1 см.

За трансформації рослин конструкцією pGWB2-*TPS2* найвищі показники ефективності та частоти регенерації в умовах селективного тиску було зафіксовано на 40 добу вирощування на середовищі зі зниженим вмістом цукрів – 5-10 г/л (Табл. 3.2.2.). Найбільший показник частоти регенерації після трансформації був на рівні 73,5±2,34%, а найвищий показник ефективності регенерації – 4 та 5 добре розвинених регенерованих пагони на одному експланті. На середовищі з мальтозою у концентрації 25-30 г/л ефективність утворення регенерантів також була нижча, у середньому 2-3 регенерованих пагони на кожному з експлантів. За культивування на середовищах з сахарозою або глюкозою у концентраціях 25-45 г/л у експлантів спостерігали затримку росту.

Таблиця 3.2.2

Частота регенерації рослин тютюну після трансформації конструкцією pGWB2-*TPS2* на середовищах з різними концентраціями цукрів в порівнянні з контролем в умовах селективного тиску

Частота регенерації, %	Концентрація цукрів, г/л					
	Мальтоза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	16,5±1,78	23,4±0,68	48±2,34	65±2,8	83±3,4	78±56
Дослід	10±1,1*	23,5±1,6	58,4±1,95*	45±1,9*	40±2,2*	25±2,63*
	Глюкоза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	14±2,1	40,15±1,76	56±0,98	78,12±1,23	93±4,3	76±1,25
Дослід	12±1,8*	58±2,11	73,5±2,34	56±2,6	26,57±1,98*	11,23±1,7
	Сахароза					
	0	**5**	**10**	**25**	**30**	**45**
Контроль	23,4±1,4	40±1,47	60±1,98	76±1,56	97±2,34	87±1,89
Дослід	11,6±1,7	52±2,5	71,3±1,25*	68±2,15	58±1,6*	31±2,46

Примітка. P*≤0,05.

Після перенесення експлантів на середовище для коренеутворення з додаванням 400 мг/л цефотаксиму та 25 мг/л гігроміцину вдалось вкорінити 20±2,78% регенерованих пагонів через 60 днів вирощування (Рис. 3.2.5.). Між цукрами, рівнями експресії генів, акумуляцією продуктів біосинтезу трегалози та протеїнкіназами безперечно існує тісний зв'язок [173,61], що безпосередньо впливає на метаболічні процеси рослин, які краще вивчені у дводольних рослин, ніж в однодольних [135].

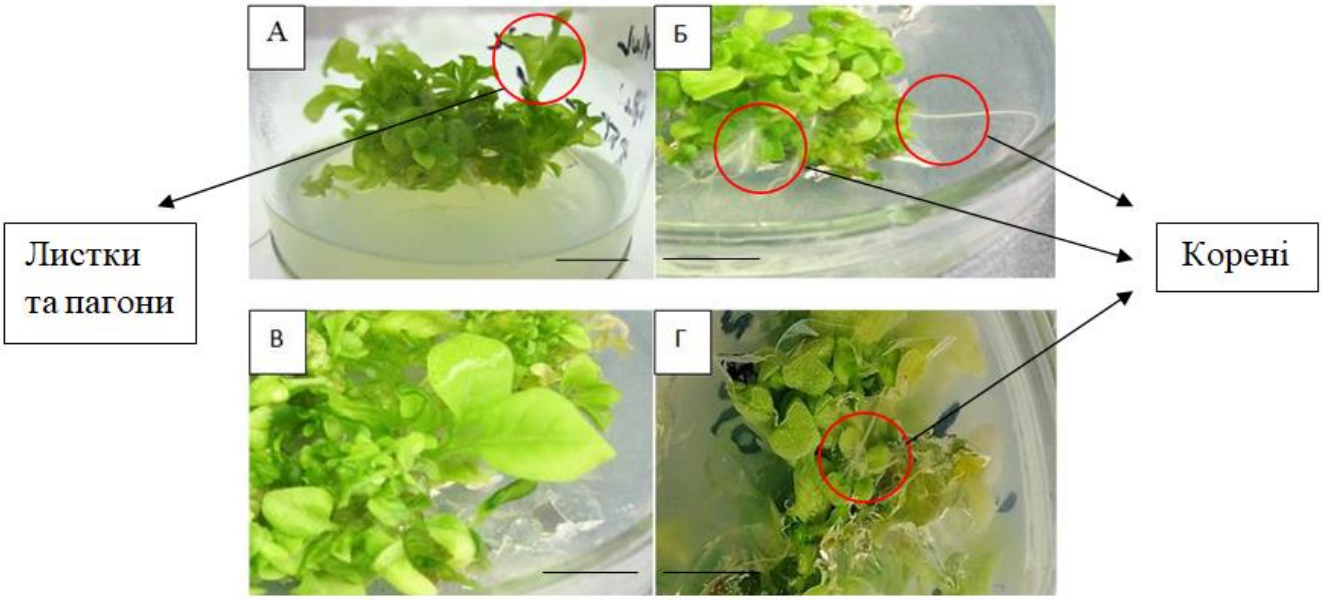

Рис. 3.2.5. Рослини тютюну після трансформації плазмідою pGWB2-*TPS1* (А, Б) та pGWB2-*TPS2* (В, Г): А, В – на 30 добу після трансформації на середовищі для регенерації; Б, Г – на 60 добу на середовищі для вкорінення. Масштабна позначка - 1 см.

Проте, молекулярні та біохімічні механізми, що лежать в основі взаємозв'язків генів біосинтезу трегалози та ростом і розвитком рослин до кінця не вивчені, як і зв'язок між фізіологічним та підвищеним рівнем експресії генів *TPS1* та *TPS2* та доступністю цукрів у живильних середовищах культивування рослин.

3.3. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих рослин

За використання специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2* було підтверджено перенесення та інтеграцію в геном відібраних рослин тютюну цільових дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. У результаті проведеного ПЛР-аналізу було отримано очікувані фрагменти розміром 640 п.н. (*TPS1*) та 758 п.н. (*TPS2*), що відповідають за розміром позитивному контролю (Рис. 3.3.1.). Загалом, нами було проаналізовано 50 лінії тютюну, стійких до гігроміцину. Інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2* було виявлено у 80% та 95% рослин, трансформованими, відповідно, конструкціями pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2*. Розмір ампліфікованих фрагментів становив 640 п.н. (для гена *TPS1*) та 758 п.н. (для гена *TPS2*) (Рис. 3.3.1.).

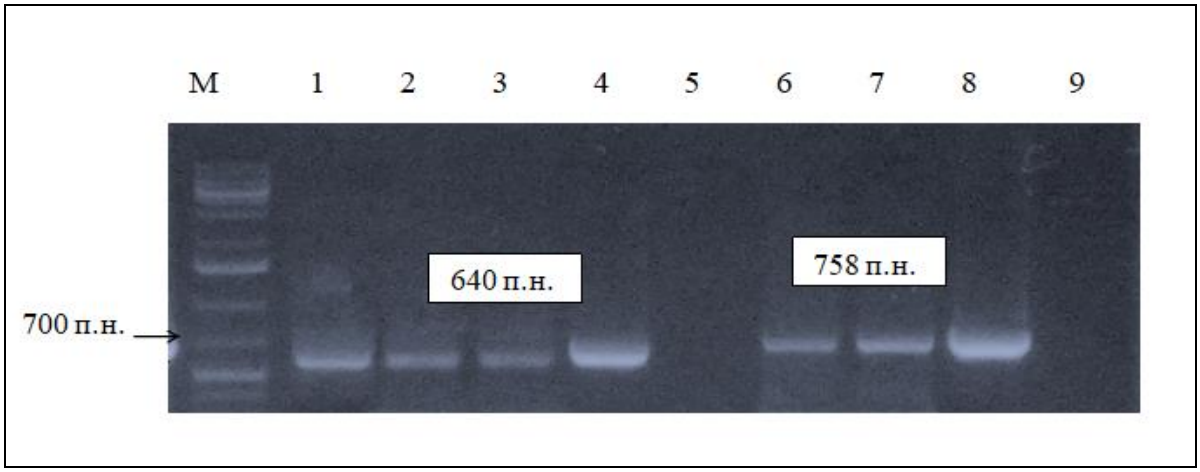

Рис. 3.3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній тютюну: М – маркер (GeneRuler^{TM} 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; Fermentas, Литва); 1-3- ДНК ліній тютюну, що трансформовані конструкцією pGWB2-*TPS1* (розмір амплікону 640 п.н.); 4 – позитивний контроль (плазмідна ДНК); 5 – негативний контроль (ДНК контрольної нетрансформованої рослини); 6-7- ДНК ліній тютюну, що трансформовані конструкцією pGWB2-*TPS2* (розмір амплікону 758 п.н.); 8 – позитивний контроль (плазмідна ДНК); 9 – негативний контроль (реакційна суміш для ПЛР без ДНК).

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*.

3.4. Аналіз ліній на стійкість до осмотичного стресу в умовах *in vitro*

Відомо, що рослини у природі часто підпадають під вплив різних абіотичних стресових факторів, таких як посуха або засолення, що призводить до зниження їх росту, розвитку та врожайності. Дослідження основних фізіологічних та біохімічних механізмів, пов'язаних з реакцією рослин на осмотичний стрес, виявили первинні і вторинні метаболіти, які беруть участь у реакціях рослин на стрес і толерантність, зокрема, це накопичення амінокислот та їх похідних (пролін, бетаїн), розчинних цукрів (фруктоза, глюкоза, сахароза, галактоза, і, власне трегалоза), цукрових спиртів або поліолів (маніт, сорбіт, інозитоли) та поліаміни (путресцин, спермідин, спермін) [57]. Як в культурі *in vitro*, так і в гідропонних системах застосовують осмотично активні сполуки, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ), маніт, сорбіт та NaCl [57,162,229].

Коли почали з'являтись перші повідомлення про позитивний вплив трегалози на посухостійкість (як екзогенної, так і внаслідок інтегрування цільових генів біосинтезу), багато досліджень було зосереджено на використанні дводольних рослин, як модельних об'єктів дослідження. Також, була запропонована та апробована досить велика кількість моделей імітування посухи, серед яких для наших досліджень було обрано використання осмотичної стресової сполуки – маніту – з метою перевірки отриманих рослин тютюну на стійкість до водного дефіциту.

Дослідження з контрольними рослинами показало, що летальною концентрацією маніту є 0,8 М, після культивування їх на середовищі МС, що було доповнене різними концентраціями маніту (від 0 до 1 М) (рис. 3.4.1.). За вирощування контрольних рослин на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М у експлантів тютюну спостерігали зміну кольору експлантів рослин, вони спочатку жовтіли, потім біліли, при цьому регенерації пагонів не відбувалось. Після етапу підбору цукрів у живильному середовищі, рослини тююну після трансформації висаджувались на середовище МС з відповідно підібраними концентраціями цукру та доповнене манітом у летальній конецнтрації – 0,8 М.

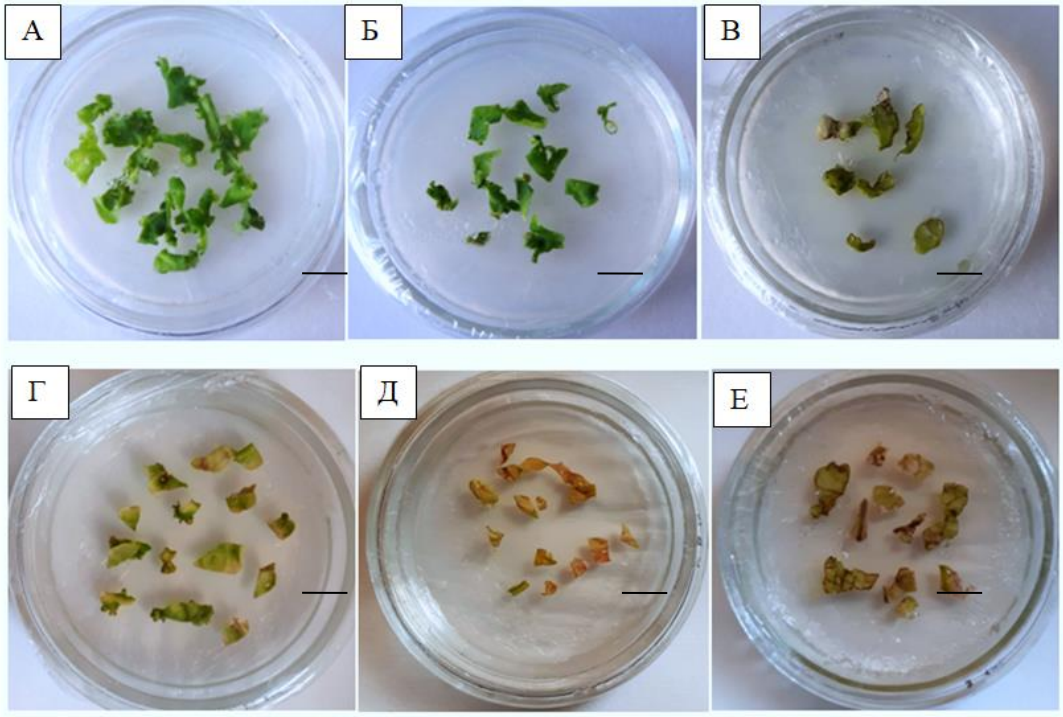

Рис. 3.4.1. Контрольні експланти тютюну на середовищі МС, доповнене манітом у концентраціях: А – 0 М; Б – 0,2 М; В – 0,4 М; Г – 0,6 М; Д – 0,8 М; Е – 1 М. Масштабна позначка – 1 см.

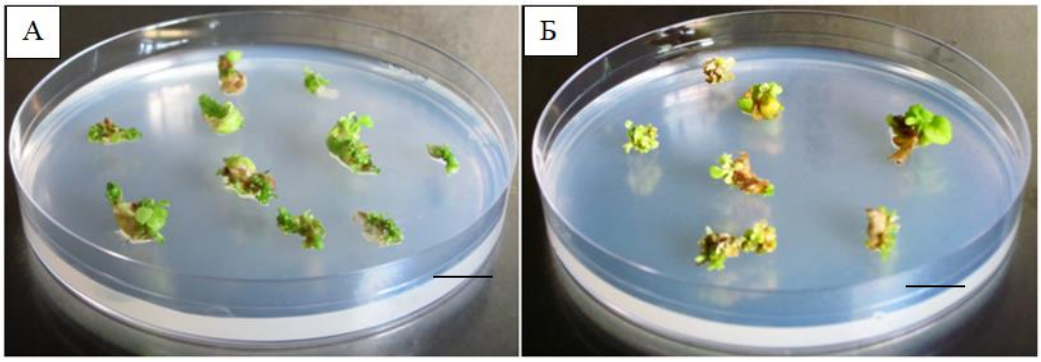

Рис. 3.4.2. Експланти тютюну після трансформації на середовищі МС1, доповнене манітом: А – за використання конструкції pGWB2-*TPS1;* Б - конструкції pGWB2-*TPS2*. Масштабна позначка – 1 см.

Вирощування рослин після трансформації конструкціями з генами біосинтезу трегалози на середовищах, доповнених манітом, дало змогу додати селективний фактор у відборі трансформованих рослин. Такі рослини зберігали свою життєздатність, в порівняні з контрольними.

Таким чином, за допомогою методу Gateway-клонування нами було створено генетичні векторні конструкції pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* з генами біосинтезу трегалози дріжджів *TPS1* та *TPS2*, відповідно, під контролем промотору вірусу мозаїки цвітної капусти 35S для трансформації рослин. Ефективність створених конструкцій перевірено за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на модельному рослинному об'єкті – *N. tabacum*. Пересення та інтеграцію дріжджових генів біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* до геномів рослин тютюну здійснено за допомогою аналізу ПЛР з використанням специфічних праймерів до цільових генів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. *Кваско А. Ю.* Генетична трансформація *Nicotiana tabacum* дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* / Ісаєнков С.В.,

Краснопьорова О.Є., Дмитрук К.В., Ємець А.І.// Вісн. Укр. Тов.-ва генетиків та селекціонерів. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 8–16. (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

2. *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.

РОЗДІЛ 4

ОТРИМАННЯ ПОСУХОСТІЙКИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ (*T.aestivum* L.) МЕТОДАМИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

4.1. Створення генетичних векторних конструкцій з генами *TPS1* та *TPS2* для трансформації пшениці

Важливим фактором для успішної агробактеріальної трансформації є вибір бінарних векторних конструкцій, оскільки більшість векторів були розроблені для дводольних та виявились неефективними до однодольних рослин, що в основному було пов'язано з невідповідністю обраних промоторів та селективних генів [20,98,91]. Бінарні вектори, що використовували для трансформації однодольних були зазвичай великого розміру з обмеженою кількістю сайтів рестрикції, для вирішення цих проблем почали широко використовувати та розроблювати відповідні Gateway (Invitrogen) системи [101]. Так, наприклад, було створено універсальні набори векторів призначення, сумісних з Gateway системою для однодольних рослин для полегшення отримання трансгенних рослин або через надекпресію трасгена, або iRNA-опосередковану супресію генів [22].

Вектори pBract основані на векторах pGreen, вектор pBract214, який використовували в роботі, було розроблено спеціально для трансформації однодольних рослин, несе в собі селективний ген гігроміцинфосфатрансферази (*hpt*) та касету для експресії трансгена під контролем промотора убіхвітину кукурудзи (www.bract.org) [7]. Генетичні векторні конструкції pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* (Рис. 4.1.1) було створено для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці методами *in vitro* та *in planta*. Вектори несли у собі селективний ген гігроміцин-фосфотрансферази (*hpt*) стійкості до гігроміцину рослинних ліній. Для досягнення високо рівня експресії цільових генів *TPS1* та

TPS2 в злакових рослин вони знаходились у векторах під контролем убіхвітинового промотору кукурудзи (PUbi).

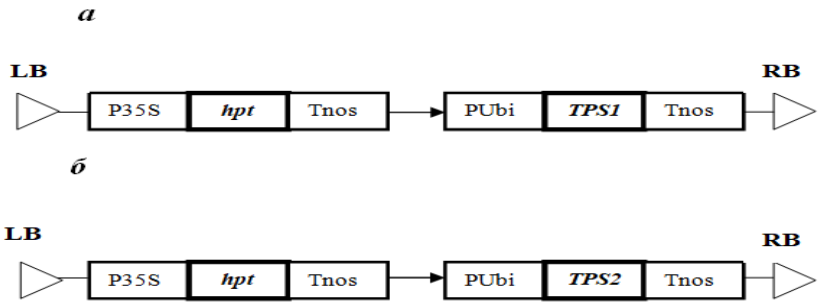

Рис. 4.1.1. Схема Т-ДНК вектору pBract214-*TPS1*: LB, RB – ліва та права границі Т-ДНК, *TPS1* – цільовий ген біосинтезу трегалоза-6-фосфат синтази, *TPS2* – цільовий ген біосинтезу трегалоза-6-фосфат фосфатази, *hpt* – селективний ген гігроміцин - фосфотрансферази, PUbi - промотор убіхвітину кукурудзи, Tnos – термінатор нопалінсинтази.

Таким чином, для подальшої генетичної трансформації досліджуваних сортів пшениці використовували вектори pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з цільовими генами під контролем сильного конститутивного промотору убіхвітину кукурудзи PUbi [131].

4.2. Введення в культуру *in vitro* сортів пшениці м'якої української селекції

Перед проведенням *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації нами спочатку було введено в культуру *in vitro* 7 сортів пшениці та оцінено їхній морфогенетичний та регенераційний потенціал. Умови регенерації пшениці в культурі *in vitro* є одним з ключових питань, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [128]. Ефективність трансформації в умовах *in vitro* пов'язана з умовами культивування ембріогенних культур та стадії проміжного калюсогенезу, що значною мірою залежить від генотипу обраного рослинного матеріалу (внаслідок можливості сомаклональних варіацій)

[23,4**Ошибка! Источник ссылки не найден.**], тому це питання було ключовим на початку нашого дослідження.

Відомо, що регенерація рослин із культивованих тканин контролюється генетично, і такі фактори, як вік, ступінь диференціації та інші фізіологічні умови суттєво впливають на регенерацію експлантів за умов культури *in vitro*, яка може відбуватись шляхом органо- чи ембріогенезу [206]. Якщо рослини тютюну (*N. tabacum*) представляють собою модельну систему регенерації шляхом прямого органогенезу чи навіть ембріогенезу, для пшениці цей шлях є проблемним, що наштовхує на постійні пошуки вченими альтернативних методів та оптимізації умов регенерації в культурі *in vitro*. Для цих рослин найбільш широко використовують культури ізольованих зародків, зрілих, які є повністю диференційованими, та незрілих на різних етапах диференціації. Клітини меристеми також досліджували як експланти для трансформації, хоча деякі ранні результати були багатообіцяючими, таку трансформацію рідко застосовують через низьку ефективність та ймовірність отримання химерних рослин [23]. Використання культур незрілих зародків має більшу перевагу через високий потенціал ефективного органогенезу порівняно з більш диференційованими зрілими [206]. Робота в умовах культури *in vitro* з таким типом експлантів підвищує вимоги щодо складу синтетичних середовищ, які набором макро- та мікроелементів, джерелом вуглецевого живлення та іншими добавками (фітогормони, вітаміни, амінокислоти, екстракти дріжджів, гідролізату казеїну, кокосове молоко) замюнють ендосперм для продовження розвитку зародка після ізолювання [206]. Таким чином, незрілі зародки як експланти є, зазвичай, основним типом для трансформації пшениці, рекомендовано використовувати свіжоізольовані або попередньо культивовані незрілі зародки, або калус, індуковний з них [4].

Для підвищення ефективності отримання трансгенних рослин нами спочатку було проведено роботу по введенню культуру *in vitro* семи сортів пшениці з метою відбору тих, які б характеризувалися найвищими показниками морфогенетичного потенціалу, а саме здатністю до ефективної регенерації

рослин *in vitro* для їх подальшого виростання в *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації (Табл. 4.2.1) [8]. Як експланти використовували незрілі зародки.

Таблиця 4.2.1

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±2,31*	53,2±1,21	35,9±0,96
Зимоярка	95±1,25	65±2,42*	38±2,31*
Миронівська 47	96,5±2,31*	68±2,34*	47±2,15*
Щедрість	75±0,97	42,3±1,95	24±1,75
Журавка Одеська	82±0,76	55±1,35	25±1,53
Кесарія Поліська	85±1,08	65,3±1,3	38±1,21
Мірхад	92±1,98 *	67,8±1,56	43,9±0,76

Примітка. P*≤0,05.

Після розміщення незрілих зародків (розміром 0,8-1,2 мм) на середовище МС для калюсогенезу (з додаванням 2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л мальтози та вітамінами за Гамборгом) вже на 2-3 добу спостерігали утворення прозорого світлого калюсу аморфної консистенції (первинного калюсу) (Рис. 4.2.1, Б). Після перенесення експлантів на світло через 14-16 діб утворений з експлантів калюс розрізняли за морфофізіологічними показниками: морфогенний калюс – щільний, глобулярний, жовтуватий, та неморфогенний – водянистий, прозорий [4]. Варто зазначити, що саме з морфогенного калюсу за подальшого перенесення та вирощування на середовищі для регенерації утворювались пагони та корені, а пухкий та прозорий калюс нами було визначено як неморфогенний.

Отже, нами було оцінено здатність до ефективного формування морфогенного калюсу і регенерації рослин семи сортів пшениці, дані наведено в Табл. 4.2.1. Найвищі показники утворення морфогенного калюсу (рис. 4.2.1., В, Г) зафіксовано для сортів Миронівська 67 та Мірхад (68 ± 2,34 та 67,8 ± 1,56 відповідно), хоча для сортів Зимоярка та Кесарія Поліська ці значення також були досить високими. Також для цих сортів була характерна найвища частота регенерації пагонів (47 ± 2,15 та 43,9 ± 0,76 відповідно), тоді як найнижчий показник відмічено у сорту Щедрість (24 ± 1,75). Етапи введення в культуру та морфогенез в культурі *in vitro* пшениці з використанням незрілих продемонтворано на Рис. 4.2.1., 4.2.2.

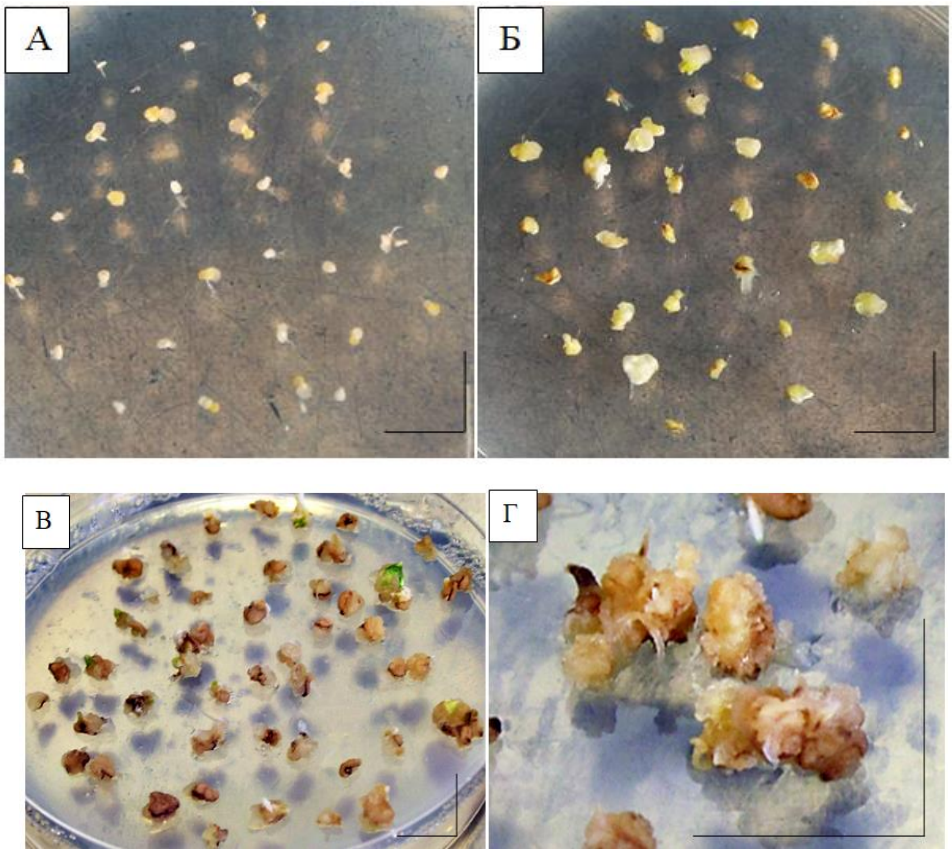

Рис. 4.2.1. Експланти пшениці на етапах введення в культуру *in vitro*: А – свіжі ізольовані незрілі зародкі сорту Мірхад розміром 0,8-1,5 мм; Б – експланти пшениці сорту Мірхад на стадії перед культивування на 4-5 добу вирощування на середовищі МС, доповнене 2,4-Д;.В – формування морфогенного калюсу на експлантах пшениці сорту Мірхад, Г – морфогенний калюс пшениці сорту Мірхад. Масштабна лінія - 10 мм.

Формування морфогенного калюсу спостерігали з 7-10 доби культивування, після чого визначали морфофізіологічні етапи розвитку: морфогенез за типом гемморизогенезу (утворення бруньки та коренів) та утворення соматичних ембріоїдів (Рис. 4.2.2. А, Б).

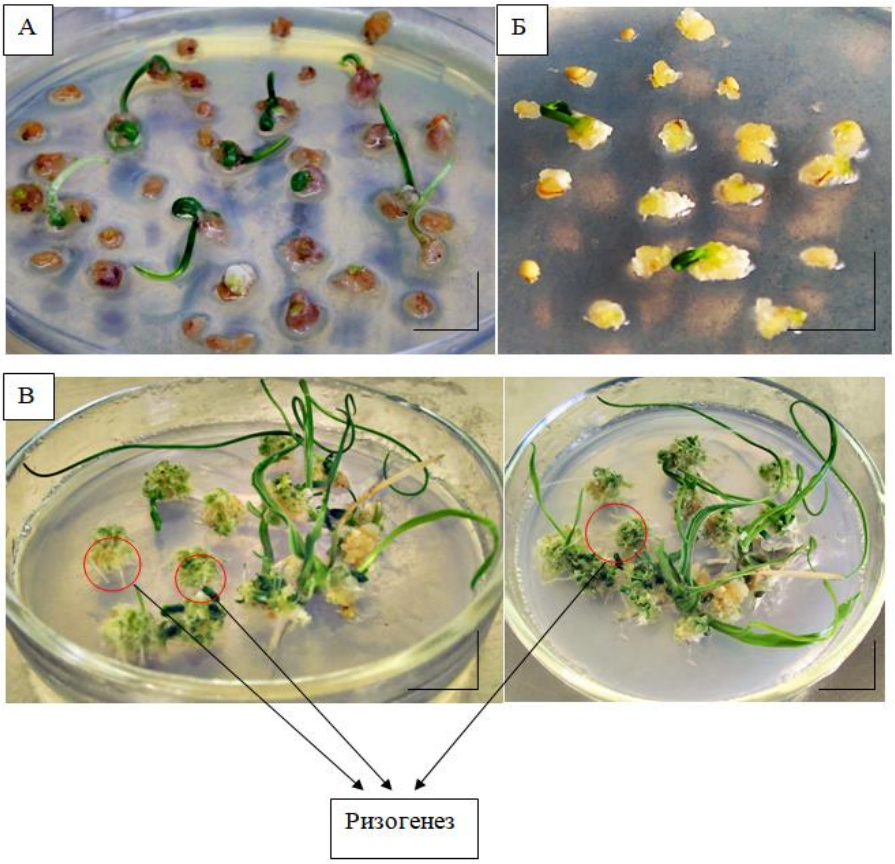

Рис. 4.2.2**.** Морфологічні етапи розвитку пшениці сорту Миронівська 67 з культури незрілих зародків: А, Б – регенерація пагонів з морфогенного калюсу, соматичний ембріогенез; В - регенерація та вкорінення пагонів на через 30 діб. культивування. Масштабна лінія - 1 см.

Соматичний ембріогенез біотехнологічно є більш сприйнятливим для подальших досліджень через проростання зародка в рослину з усіма сформованими органами [4]. Через 14 діб культивування на експлантах, на яких формувався морфогенний калюс, спостерігали утворення зелених щільних структур, з яких в подальшому регенерували органи рослин (Рис. 4.2.2.). Нами ло

вставовлено, що сорти Миронівська 67 та Мірхад мали найвищі показники регенерації рослин у культурі *in vitro.* У подальшому всі сім сортів пшениці використовували для генетичної трансформації генами *TPS1* та *TPS2*, враховуючи отримані контрольні дані.

4.3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці *in vitro*

Узагальнюючі літературні дані стосовно *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої, можна виділити такі ключові фактори успішного інтегрування чужорідної Т-ДНК у геном пшениці: генотип-залежність; стадія попереднього культивування; склад живильних середовищ. У публікаціях, що стосуються переважно м'якої пшениці, додавання першого етапу, або стадії попереднього культивування, є ключовим фактором для ефективної генетичної трансформації, умови якого мають бути збалансованими стосовно складу поживного середовища, стадії клітинної диференціації, клітинного циклу та внутрішньоклітинного осмотичного балансу [206]. Як у дводольних, так і у однодольних рослин регулятори росту (співвідношення ауксинів та цитокінів) які використовують у середовищі для культивування, є важливим фактором, який необхідно враховувати для ефективної трансформації. Існують дані, що додавання синтетичного ауксину 3,6-дихлор-2-метоксибезойної кислоти (дікамба) є ефективним для індукції та регенерації калюсу озимої та ярої пшениці, проте, серед найбільш розповсюджених для використання є піклорам та 2,4-Д [15,65,206,264], що ми використовували у наших дослідженнях. Доведено, що ацетосирінгон – потужний фенольний активатор *vir*-генів *Agrobacterium* може значно покращити ефективність трансформації для багатьох видів рослин [159]. Для пшениці додавання ацетосирінгону до середовища для інокулювання агробактерією вважається найголовнішим чинником успішної трансформації, проте в деяких дослідженнях, за інокулювання попередньо культивованих незрілих зародків ацтосирингон не мав такого суттєвого впливу на ефективність

трансформації, що вказує на переважний вплив вихідного рослинного матеріалу та генотипу на успішність трансформації [159].

Незважаючи на те, що досліджувані сорти мали різні морфогенетичні показники, всі вони були використані в дослідах по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* (Рис. 4.3.1.). Селекцію трансгенних ліній *in vitro* проводили на середовищі, яке містило 30 мг/л гігроміцину. Попередньо, селективну концентрацію гігроміцину було визначено з використанням контрольних рослин пшениці.

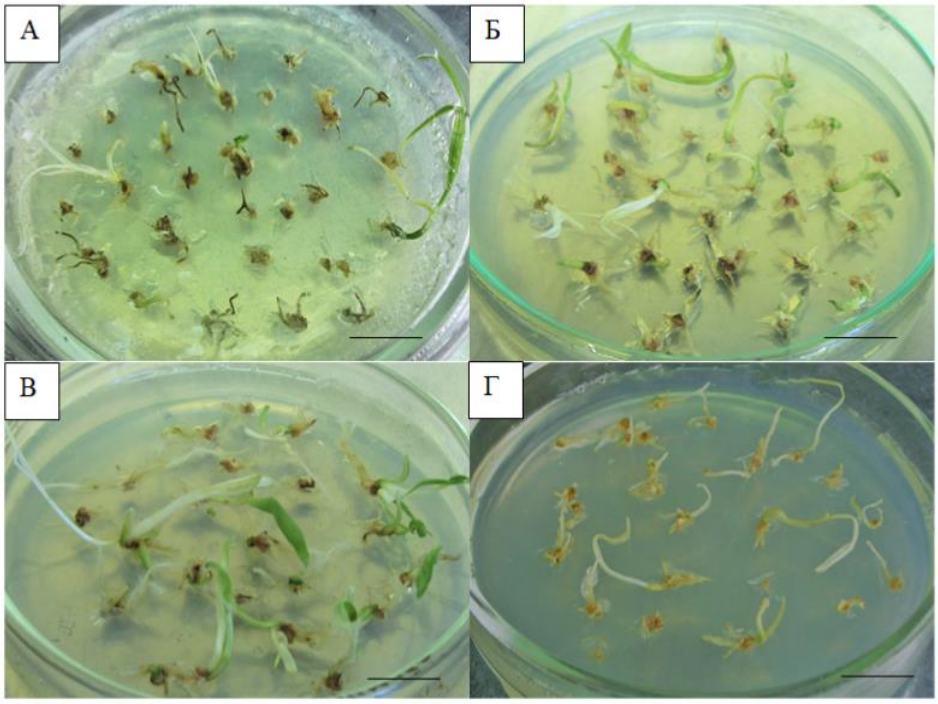

Рис. 4.3.1. Експланти пшениці на 14 добу після трансформації на середовищі МС із селективним агентом - гігроміцином (30 мг/л): А – Миронівська 67 (конструкція pBract214-*TPS1*); Б – Журавка Одеська (pBract214-*TPS2*); В – Щедрість (pBract214-*TPS2*); Г – Зимоярка (pBract214-*TPS2*). Масштабна лінія – 1 см.

За даними багатьох досліджень, при використанні незрілих зародків як експлантів було виявлено суттєві відмінності в ефективності трансформації між

застосованими в експериментах свіжоізольованими зародками та попередньо культивованими. Так, термін до 7-ми діб попереднього культивування вважається оптимальним для ефективної доставки Т-ДНК, а починаючи з 21 доби підвищується ймовірність некрозу тканин та мікробіологічної контамінації [206]. У наших експериментах виділені незрілі зародки попередньо культивували на середощі з 2,4-Д від 4 до 7 діб. Через 40 діб культивування експлантів після трансформації на середовищі МС для регенерації пагонів (з додаванням 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 500 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л гігроміцину) визначали частоту регенерації пагонів для кожного з досліджуваних сортів пшениці (Табл. 4.3.1.).

Таблиця 4.3.1

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

Сорт пшениці	Кількість експлантів	Частота регенерації пагонів (%), конструкція pBract214-TPS1	Частота регенерації пагонів (%),конструкція pBract214-TPS2
Вихованка	150	48,9±0,96	46,7±1,35
Зимоярка	150	40±2,31	45±1,23
Миронівська 67	150	37,6±1,15	48±2,69
Щедрість	150	24±1,75	39,5±2,87
Журавка Одеська	150	25±1,53	35,6±1,98
Кесарія Поліська	150	38±1,21	33±0,58
Мірхад	150	35±0,76	40±1,25

Примітка. $P^* \leq 0,05$.

Так, найвищі показники частоти регенерації пагонів в умовах селективного тиску після трансформації конструкцією pBract214-TPS1 було зафіксовано для сортів Вихованка та Зимоярка (48,9±0,96 та 40±2,31 відповідно), тоді як після трансформації конструкцією pBract214-TPS2 - для сортів Миронівська 67 та

Вихованка (48±2,69 та 46,7±1,35 відповідно) (Табл. 4.3.1). Для всіх інших сортів цей показник коливався в межах від 24±1,75% (сорт Щедрість) до 38±1,21% (сорт Кесарія Поліська) за використання конструкції pBract214-TPS1 та від 33±0,58% (сорт Кесарія Поліська) до 45±1,23% (сорт Зимоярка) за використання pBract214-*TPS2*.

Після 40 діб вирощування експлантів на середовищі МС для регенерації відселектовані рослини, що зберегли життєздатність та мали нормальні (подібні до контролю) морфологічні ознаки, було перенесено на середовище МС для їх подальшого укорінення (Рис. 4.3.2.).

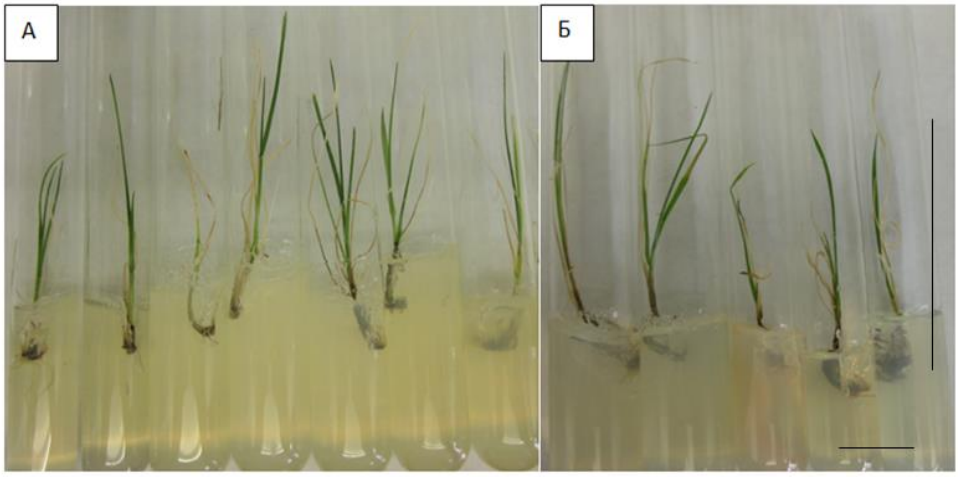

Рис. 4.3.2. Рослини пшениці на 7 добу вирощування після перенесення на середовище МСК для укорінення: А – рослини сорту Мірхад, трансформовані конструкцією pBract214-*TPS1*; Б – рослини сорту Миронівська 47 після трансформації конструкцією pBract214-*TPS2*. Масштабна позначка – 1 см, 5 см.

Цікавим фактором, що впливає на ефективність трансформації та регенерації є культивування експлантів зрілих та незрілих зародків з розміщенням на середовищі щитком догори, так *Cheng et al.* (1997) за культивування таким способом спостерігали сильніше забарвлення GUS після періоду спокою та селекції [94]. Такий спосіб використовують за аналогією з культивуванням зародків кукурудзи, в той час, як зародки ячменю культивують щитком вниз [97].

Таким чином, було досліджено морфогенетичний потенціал 7 сортів пшениці в культурі *in vitro* та проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію незрілих зародків пшениці конструкціями pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. На сьогодні відомо про трансформацію однодольних рослин рису [140,110] та кукурудзи [171] генами біосинтезу трегалози. За трансформації дводольної рослини – тютюну нами були зафіксовані морфологічні зміни росту та розвитку створених рослин, проте, після *Agrobacterium* – опосередкованої трансформації пшениці подібних проявів не було, що збігається з літературними даними щодо інших однодольних рослин. Тому, актуальним є дослідження особливостей морфогенезу та регенерації, а також, стійкості до абіотичних та біотичних стресів пшениці після трансформації генами біосинтезу трегалози.

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

Для отримання трансгенних однодольних рослин все більше розвивають та застосовують альтернативні методи трансформації, загальною назвою яких є методи *in planta* – процедури з використанням клітин *Agrobacterium* для зараження експлантів, але без культур тканин або клітин, тим самим зменшуючи витрати та час, і дозволяючи уникати сомаклональних варіацій [98,169]. Як було зазначено щодо способів трансформації *in planta*, мішенями для інфікування агробактерією можу бути цілі рослини, квітки або тканини, а основними способами є вакуумна інфільтрація, мікроін’єкції, «pollen tube transformation» квіткове занурення («floral dip», «floral spray», «spike dip») [169]. У наших дослідження ми інфікували попередньо кастровані колоси, які ще не вийшли з листової трубки, способом окунання його в суспензію агробактерії, подібний методу квіткового занурення, що широко розповсюджений для трансформації рослин *Arabidopsis*.

Надважливою умовою активації генів вірулентності *Agrobacterium* з метою успішного інфікування рослинних клітин та інтеграцією Т-ДНК є температурні

режими (визнано, що за температури більше 28°С та нижче 19°С, система *vir* генів деактивується, а оптимумом є 25°С для стадії кокультивування клітин рослини з бактерією), а також, наявність в індукційних середовищах для трансформації ацетосирінгону в концентрації 200мМ, що в додатку до температури та pH середовища є активаційним елементом вірулентності *Agrobacterium* [23,58,151]. Аналізуючи літературні відомості щодо застосованого методу, можна виділити такі особливості проведення та ключові фактори, що впливають на ефективність трансформації: 1) важливу роль відіграє стадія пікірування суцвіть пшениці та терміни обробки суспензією агробактерії; 2)ключовим фактором, також, є температура оточуючого середовища під час інфікування та після, що має бути в межах 25°С для активування комплексу *vir*-генів *Agrobacterium*; 3) важливим є елементи, що входять до складу середовищ на етапах інфікування: для вирощування нічної культури агробактерії, індукційне та інокуляційне середовища, що використовуються для обробки колосів пшениці [16,276].

Привабливість *in planta* трансформації рослин пояснюється відсутньою необхідністю використання культури тканин, необов'язкове дотримання стерильних умов роботи та спрощеною процедурою отримання можливих трансгенних ліній [276]. Хоча використання методів *in planta* мають сезонні обмеження та прямо залежать від умов оточуючого середовища, цей метод має багато переваг, тому актуальним є підбір умов трансформації, складу живильних середовищ, а також, способу селекції рослин після трансформації, що був би оптимальним при мінімальних зусиллях та витратах. Саме тому нами також були проведені дослідження по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* в геном пшениці методом трансформації *in planta*.

Рис. 4.4.1. Дослідна ділянка ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» для вирощування досліджуваних сортів пшениці.

Дослідження з вирощування рослин пшениці та проведення трансформації *in planta* було здійснено на дослідній ділянці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (Рис. 4.4.1). У результаті проведеної роботи було отримано колоси і насіння (трансгенне покоління T_1) пшениці досліджуваних сортів пшениці. На Рис. 4.4.2. показано колоси пшениці, загорнуті в індивідуальні ізолятори (А), а також колосся з насінням пшениці, отримане після трансформації (Б, В). Отже, після проведення трансформації та повного дозрівання насіння, було зібрано колоси та проведено оцінку зав'язування насіння, а також досліджено їх морфологічні показники (Табл. 4.4.1 та Рис. 4.4.3).

Нами було вставнолено, що найвищий відсоток зав'язування насіння був характерним для сорту Вихованка (58%±1,7), а найнижчий - для сорту Кесарія Поліська (34%±1,23). Морфологічно колоси (Рис. 4.4.3) та насіння були без суттєвих відхилень в розвитку, насіння відрізнялось середньою наповнюваністю.

Рис. 4.4.2**.** Етапи отримання трансгенного насіння пшениці після трансформації методом *in planta*: А – колоси пшениці після обробки суспензією агробактерії в індивідуальних ізоляторах, Б – колос контрольної рослини пшениці сорту Вихованка, В – кастрований колос пшениці після трансформації *in planta*, Г – зібране насіння пшениці після трансформації та достигання. Масштабна позначка – А – 10 см, Б, В, Г – 1 см.

Таблиця. 4.4.1

Морфологічні показники колосів пшениці після трансформації *in planta* конструкціями pBract214-*TPS1* тарBract214-*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*

Примітка. P*≤0,05.

Рис.4.4.3. Загальний вигляд колосків пшениці після трансформації *in planta*: А – колос сорту Вихованка після достигання насіння за трансформації конструкцією pBract214-*TPS1*; Б – сорту Зимоярка після достигання насіння за умов трансформації конструкцією pBract214-*TPS2*, В – сорту Кесарія Поліська.

Рис. 4.4.4. А - колос пшениці сорту Вихованка після трансформації *in planta*, Б – колос контрольної рослини сорту Вихованка (масштаб 5 см); В -

насіння пшениці сорту Кесарія Поліська, зібране після трансформації *in planta,* Г – насіння контрольних рослин сорту Кесарія Поліська. Масштабна лінія -1 см.

4.5. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих ліній

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин пшениці після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* було проведено їх молекулярно-генетичний аналіз. У результаті 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 (Рис. 4.5.1., Рис. 4.5.3).

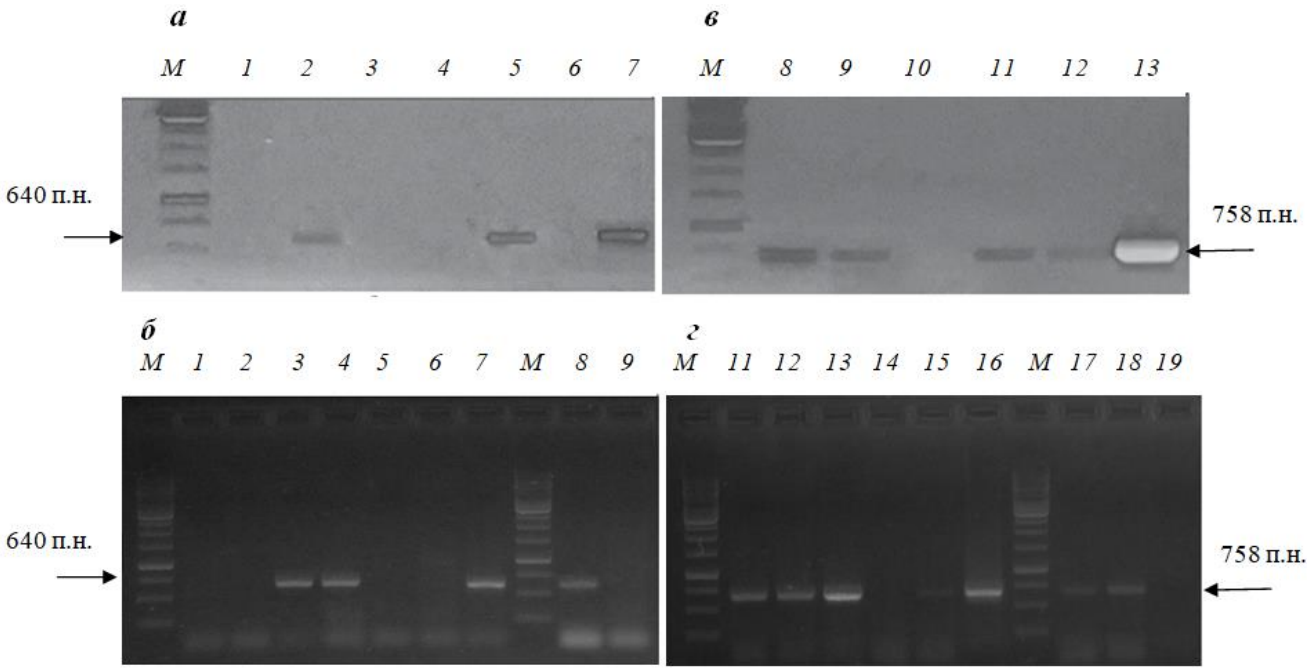

Рис.4.5.1. Електрофореграмма продуктів ампліфікації ліній ДНК пшениці сортів Миронівська 67, Мірхад, Кесарія Поліська, Вихованка після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* конструкціями pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2*: **а, б** – з використанням специфічних праймерів до гена *TPS1* - М – маркер довжин фрагментів ДНК; а - 1, 3, 4, 6 – ДНК контрольних 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 (конструкція pBract214-*TPS1*, розмір амплікону 640 п.н.); **в** – М – маркер довжин фрагментів ДНК, 10 – ДНК контрольної ліній 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*.

Після оцінки морфологічних показників зібраних колосків та пшениці після агробактеріальної трансформації *in planta* насіння було висаджено в вегетаційний посуд у підготовлений однорідний грунт (суміш грунт:торф:пісок – 1:1:1) (рис. 4.5.2.). Після появи четвертого листа було проведено молекулярно-генетичний аналіз рослин.

Рис. 4.5.2. Пророщені рослини пшениці з насіння, зібраного після агробактеріальної трансформації *in planta* та контрольні рослини у вегетаційному посуді.

За отриманими даними частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих рослин) за допомогою методу *in vitro* з використанням конструкції pBract214-*TPS1* була в

середньому на рівні 2,5% для кожного сорту, з pBract214-*TPS2* – на рівні 4% (Рис. 4.5.3.).

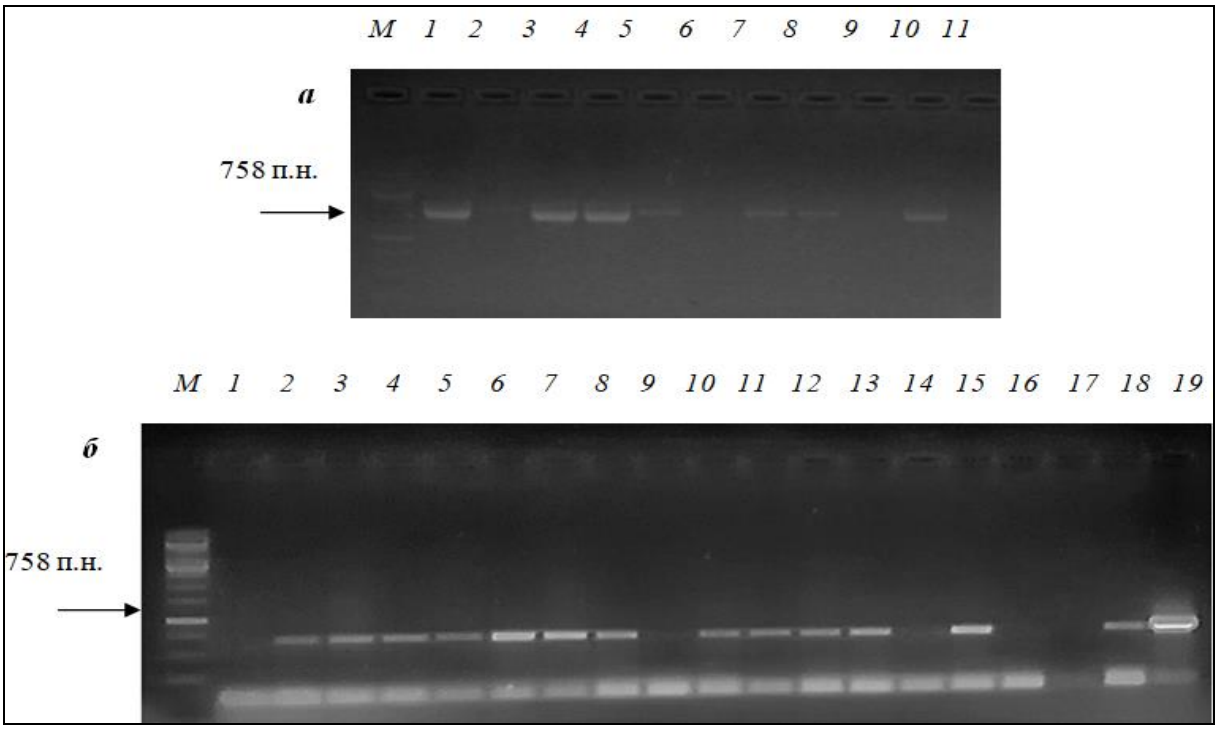

Рис. 4.5.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин пшениці сортів Кесарія Поліська, Зимоярка, Вихованка, Журавка Одеська після трансформації конструкцією pBract214-*TPS2*: **а** – М – маркер довжин фрагментів ДНК; 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10 - ДНК рослин пшениці, трансформованих методом *in planta* геном *TPS2* (розмір амплікону-758 п.н.); **б** – 2-8, 10-13, 15, 18 – ДНК рослин пшениці, трансформованих методом *in planta* геном *TPS2* (розмір амплікону-758 п.н.); 19 – позитивний контроль (плазмідна ДНК).

З метою перевірки відсутності агробактеріального зараження у досліджених зразках рослин пшениці, трансформованих методом *in planta*, було додатково проведено молекулярно-генетичний аналіз із використанням специфічних праймерів до агробактеріального гена вірулентності *virD* (Рис. 4.5.4.). У трансгенних ліній пшениці з генами *TPS1* та *TPS2*, відповідно, ампліфікованого фрагменту виявлено не було, що свідчить про відсутність такого зараження. Частота трансформації рослин пшениці за використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* була в середньому

на рівні 2,5% за використання конструкції pBract214-*TPS1* та приблизно 4% за використання конструкції pBract214-*TPS2* для всіх досліджуваних сортів.

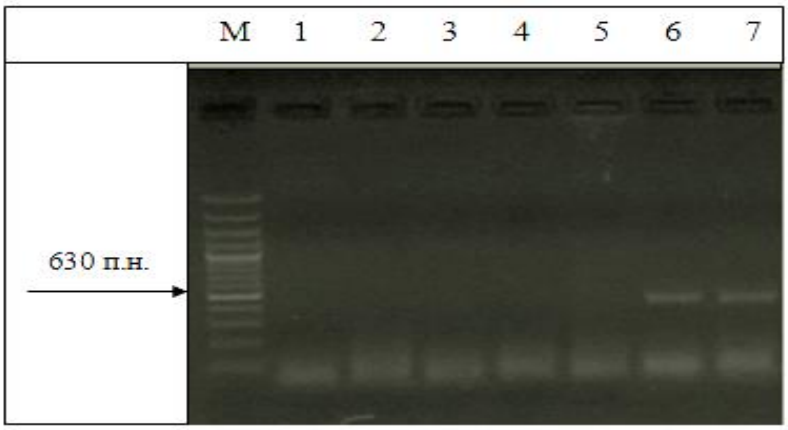

Рис. 4.5.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК трансгенних рослин пшениці: М – маркер довжин фрагментів ДНК, 1-5– ДНК трансгенних ліній пшениці з геном *TPS2*, 6-7– позитивний контроль - конструкція pBract214-*TPS2* (розмір амплікону-630 п.н.).

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

4.6. Оцінка стійкості отриманих ліній рослин до посухи

Толерантність до стресу визначається як здатність рослини акліматизуватись до несприятливих умов оточуючого середовища, у літературі термін «стресостійкість» найчастіше використовують взаємозаміно з терміном «стресотолерантність» [236]. Якщо толерантність рослини зростає в результаті впливу стресу, рослина вважається акліматизованою (загартованою), що часто

плутається з адаптацією, яка, як правило відноситься до генетично визначеного рівня стійкості, що набувається процесом селекції протягом багатьох поколінь [236]. Механізми стійкості до посухи поділяються на кілька типів: відстрочене висихання або запобігання посусі (здатність рослин підтримувати гідратацію тканин); витривалість до посухи (рослин завершують свій життєвий цикл під час умов нормальної вологості до настання посухи); толерантність до висихання (здатність функціонувати в зневодненому стані) [236].

Пшениця відноситься до мезофітів – рослин помірного клімату середніх широт, вона є менш витривалою до посухи, ніж рослини груп ксерофітів. Однією з властивостей мезофітів є здатність витримувати тимчасове глибоке зневоднення тканин без помітного зниження врожаю. Наслідки посухи на будь-якому етапі онтогенезу відображають на врожайності пшениці, проте найбільш критичні періоди що потребують оптимального забезпечення вологою для росту та подальшого розвитку насіння припадають на період від виходу у листову трубку до колосіння, і рослини у цей період, відповідно, повинні бути забезпечені вологою [10,119]. Прикріплений спосіб життя призвів до формування у рослин стійких адаптивних реакцій, направлених на пом’якшення наслідків посухового стресу, такі як контроль над роботою продихів та послаблення транспірації з метою зменшення втрат води, зменшення фотосинтетичної активності, здатність накопичувати розчинні цукри, амінокислоти, змінювати вміст хлорофілу та ферментативну та не ферментативну антиоксидантну активність, а також чисельні молекулярні шаперони та транскрипційні фактори [210]. Бесперечно стійкість рослини до посухи є комплексною полігенною ознакою, що потребує вивчення біологічних параметрів рослин з залученням методів з різних галузей досліджень: вимір фізіологічних та морфологічних параметрів, експресії генів, залучення селекційних методів [210].

Оскільки, за літературними даними, зміни шляхів біосинтезу трегалози внаслідок інтегрування бактеріальних, дріжджових та рослинних цільових генів до геномів рослин в більшості випадків призводили до створення рослинних ліній, стійких до абіотичних та біотичних стресів, важливим завданням було

проаналізувати створені рослини пшениці за використання саме дріжджових генів на посухостійкість та оцінити їхній вплив на морфологію та розвиток рослин. Стійкість пшениці до посухи в експериментальних умовах можна оцінювати на різних стадіях онтогенезу від проростання насіння до цвітіння. Якщо умови посухи виникають в період цвітіння, це суттєво впливає на важливі складові елементи врожайності пшениці: висоту рослин, довжину колосу, архітектурні ознаки колоси, кількість зерен на колос, масу тисячі зерен, наповненість зерна і толерантність до посухи можна оцінити за будь якою з цих ознак чи сукупності показників [210,6]. У наших дослідження посуху було змодельовано в період до виходу колосу з прапорцевого листа до формування насіння та було оцінено вплив посухи на врожай контрольних рослин пшениці та трансформованих генами *TPS1, TPS2*.

На початку свого розвитку рослини, що було висаджено в однакових умовах *in vivo*, проростали без помітної різниці та затримки росту, і з появою 4 листка було проведено ПЛР-аналіз досліджених рослин та відібрано трансгенні лінії. До початку періоду виходу в листову трубку, як зазначалось, рослини переводили на зменшений полив, поступово знижаючи відсоток вологи по відношенню до повного вологонасичення. Було встановлено якісну різницю між контрольними та трансгенними рослинами, що розвивались в умовах посухи (Рис. 4.6.1.; 4.6.2.).

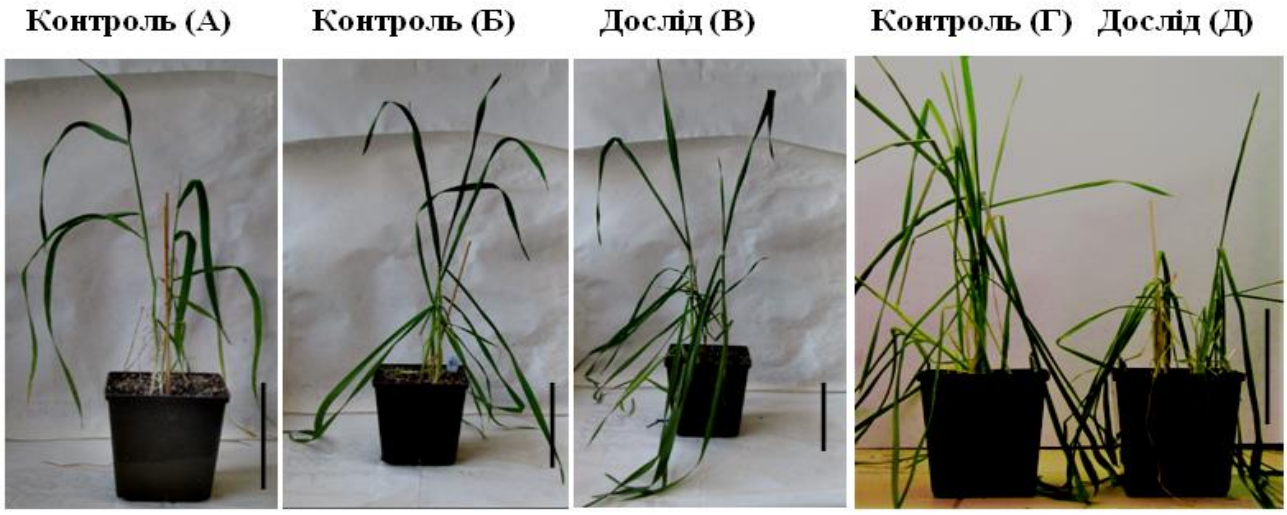

Рис. 4.6.1. Рослини пшениці на початку експерименту з посухостійкості (**А, Б, В** – 7-а доба експерименту; **Г, Д** – 14-а доба експерименту): **А** – контрольна рослина сорту Вихованка за умов 50% ПВГ, **Б** – контрольна рослина сорту Вихованка за умов 100% ПВГ, **В** – рослина сорту Вихованка, трансформована геном *TPS2* за умов 50% ПВГ; **Г** – контрольна рослина сорту Вихованка за умов 40% ПВГ, Д – дослідна рослина сорту Вихованка за умов 40 % ПВГ. Масштабна лінія – 20 см.

Одним з важливих показників, що характеризує відповідь рослин пшениці на умови посухи є ступінь кущіння. За впливу посухи на початкових етапах онтогенезу ці показники можуть різниться. Ступінь кущіння також може залежать від генотипу, оскільки в нашому експерименті вплив посухи почався пізніше, цей показник не оцінювали. Важливою характеристикою врожайності пшениці є загальна кількість колосів, що формуються на одній рослині, оскільки утворення додаткових колосків може впливати на показники врожайності головного колосу. За іншими даними, утворення додаткових пагонів може позитивно впливати на врожайність пшениці, оскільки збільшується площа для процесів фотосинтезу, а отже, підвищеної акумуляції поживних речовин.

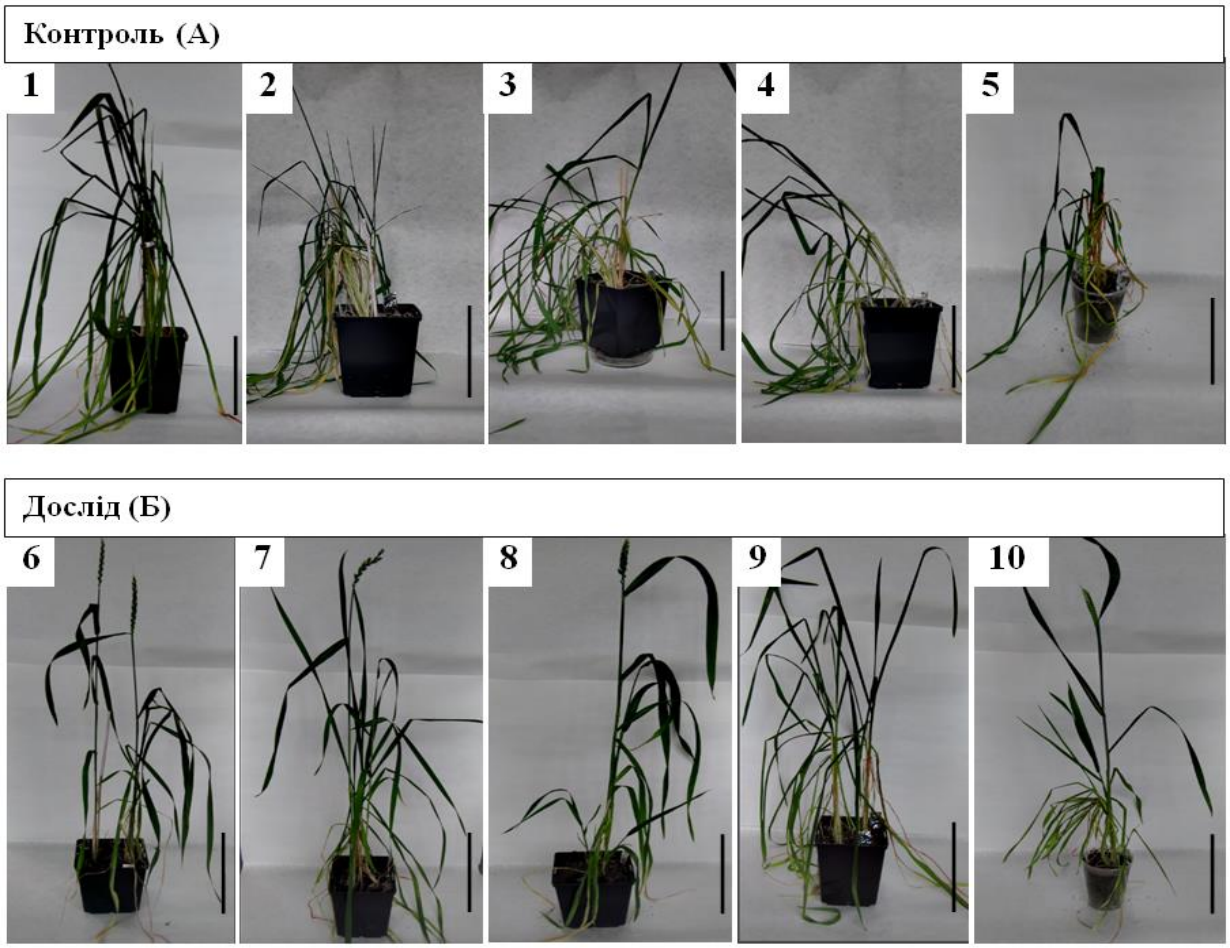

Рис. 4.6.2. Рослини пшениці через 30 діб вирощування в умовах посухи (30% ПВГ): **А** – контрольні рослини, що не зазнавали агробактеріальної трансформації: 1 – пшениця сорту Зимоярка, 2 - 3 – пшениця сорту Вихованка, 4 – 5 – пшениця сорту Кесарія Поліська; **Б** – дослідні рослини, для яких було підтверджено перенесення генів *TPS1* та *TPS2*: 6 – 8 – пшениця сорту Зимоярка, трансформована геном *TPS2*, 9 – пшениця сорту Вихованка, трансформована геном *TPS2*, 10 – пшениця сорту Кесарія Поліська, трансформована геном *TPS1*. Масштаб – 20 см.

Варто зазначити, що як контрольні рослини було використано насіння кожного сорту, зібране після кастрування та запилення проте оброблене дистильованою водою замість *Agrobacterium*. Після завершення колосіння та повного достигання насіння було оцінено показники середньої висоти рослин,

довжини головного колоса, кількості зерен з головного колоса, маси тисячі зерен головного колоса за умов посухи та 100% поливу (Табл. 4.6.1).

Таблиця. 4.6.1

Морфологічні показники контрольних та експериментальних рослин, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*

Варіант	Висота рослин, см	Довжина головного колоса, см	Кількість зерен головного колоса, шт	Маса зерен головного колоса, г
Зимоярка (контроль -)	88,23±2,43	11,2±0,89	35,3±1,32	1,102±1,21
Зимоярка (контроль +)	75,15±2,44*	9,02±0,46*	22,5±2,41*	0,591±0,99*
Зимоярка (Т)	78,24±2,52*	10,38±0,38*	31,2±1,44*	1,007±0,52*
Вихованка (контроль -)	74,33±2,31	10,0±0,45	25±1,56	0,975±1,23
Вихованка (контроль +)	70,45±2,89*	9,73±0,38	13,5±1,74*	0,392±0,67
Вихованка (Т)	72,32±1,98	10,6±0,51	19,3±0,81*	0,522±0,53
Кесарія Поліська (контроль -)	71,65±1,67	8,56±0,92	21,0±0,98	0,869±0,97
Кесарія Поліська (контроль +)	57±2,94*	7,73±0,56	14,6±0,66	0,345±0,16
Кесарія Поліська (Т)	63±1,48	8,0±1,26*	15,76±0,97*	0,543±0,68

Примітка. контроль (-) – нетрансформовані рослини (100% ПВГ), контроль (+) – нетрансформовані рослини (30% ПВГ), (Т) – трансформовані рослини (30% ПВГ). $P^* \leq 0,05$.

Контрольні рослини, що зростали за умов 40% ПВГ були меншої висоти, проте, у деяких було виявлено вищу ступінь кущіння та утворення додаткових пагонів, тоді, як трансгенні рослини частіше утворювали один головний колос. Встановлено, що середня довжина головного колосу пшениці сорту Зимоярка становила 10,38±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%±0,05 (31,2±1,44*шт.), а маса зерна з головного колосу більшою на 23% ± 0,05 (1,007±0,52*г) порівняно з контролем, який зростав за умов змодельованої посухи (30% ПВГ).

Рис. 4.6.3. 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).

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±0,21), однак кількість зерна з

головного колосу була більшою на 40%±0,06 (19,3±0,81*шт), а маса зерна - 0,522±0,53г.

Результати досліджень трансгенних рослин сорту Вихованка свідчать, що показники довжини головного колосу були нижчими порівняно з контролем, що не зазнавав посухи і був практично на одному рівні з рослинами в умовах стресу (10,6±0,21см). Проте, кількість зерна з головного колосу зросла на 40% ± 0,06 (19,3±0,81*шт), а маса зерна збільшилась до середнього значення 0,522±0,53г. Рослини пшениці сорту Кесарія Поліська, що несли ген *TPS2*, за умов 30% ПВГ формували насіння з масою на 20% більшу, ніж контрольні рослини за тих самих умов (0,543±0,68г). Також рослини цього сорту відрзнялись більш короткою довжиною колосів, яка була співставна з контрольними і експериментальними рослинами, вирощених за нормальних та стресових умов (Табл. 4.6.1.). Кількість зерен в колосі трансгенних рослин за умов 30% ПВГ була у середньому 15,76±0,97*шт., проте насіння відрізнялось наповнюваністю.

Очікуваною реакцією на дію такого стресового чинника, як посуха у злакових рослин є якісні та кількісні зміни врожайності, вагомими параметрами, які слід враховувати при оцінці фактору впливу стресу, як було зазначено, є морфологічні показники. До них можна віднести і якісні зміни морфології колосків, що може проявлятись в недорозвиненості або редукції верхніх квіток у суцвітті (рослина акумулює поживні речовини за дії стресу для розвитку певної кількості насіння та можливості розмноження, а інші квітки редукуються) [210,119]. У результаті наших спостережень за контрольними та трансгенним рослинами, що розвивали за умов посухи та повного вологонасичення, було виявлено різні морфологічні відмінності у розвитку колосів всередині сорту, і такі колоси були здебільшого стерильними (Рис. 5.4.3).

Було оцінено показники фертильності для контрольних та експериментальних рослин, по відношенню до загальної кількості рослин, задіяних в експерименті, для контрольних такий показник становив 40%, для

трансформованих рослин він був досить високим – 85%., тоді як 10% контрольних рослин в умовах посухи взагалі не викинули колос.

Рис.5.4.3**.** Морфологічні ознаки зібраних колосків контрольних та трансформованих рослин пшениці: А, Б – колоски трансгенної рослини сорту Вихованка; Д – колоски трансгенної рослини сорту Зимоярка; В, Г – колоски контрольних рослин пшениці, що зазнавали дії стресового фактору. Масштабна позначка – 5 см.

Також нами було проведено дослідження щодо успадкування цільових генів в наступному поколінні трансгенних рослин.

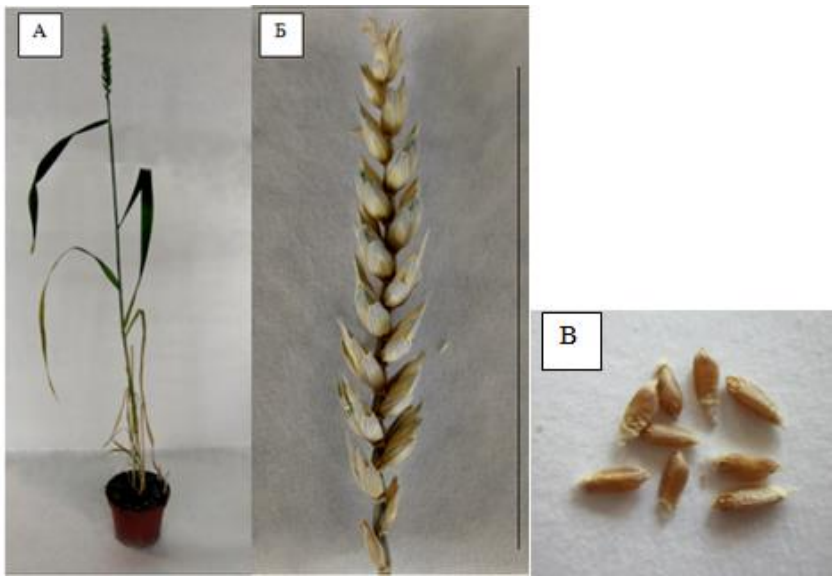

Рис.4.6.5. **А** – загальний вигляд трансгенної лінії пшениці сорту Вихованка, отриманої після трансформації *in planta* конструкцією pBract214-*TPS2*, **Б** – колос цієї лінії та **В** – насіння першого покоління . Масштабна позначка: А – 20 см, Б – 5 см, В – 1 см.

Для перевірки успадкування перенесених генів, зокрема гена *TPS2* у наступне покоління трансгенних рослин пшениці було проведено молекулярно-генетичний аналіз з використанням специфічних праймерів до цього гена. За результатами ПЛР-аналізу було підтверджено успадкування цільового гена в рослинах другого покоління.

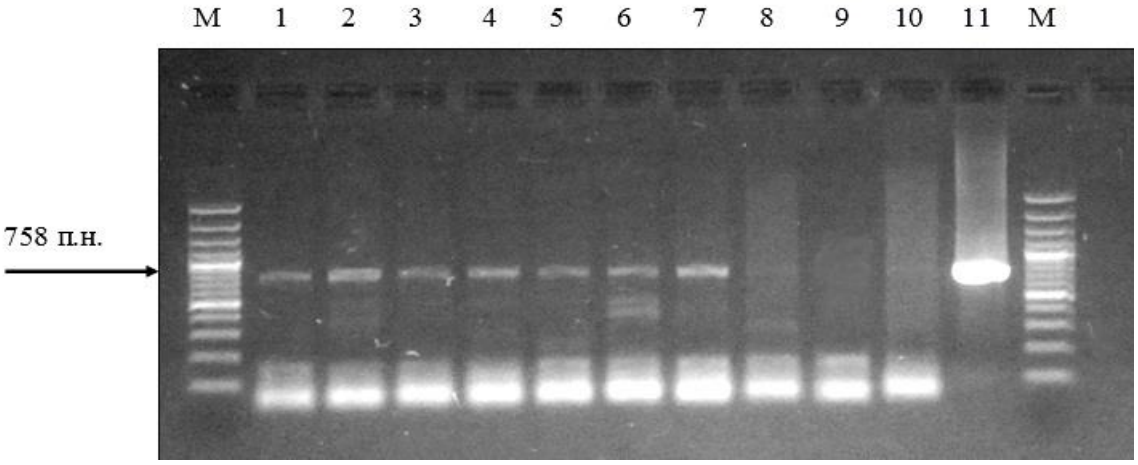

Рис. 4.6.6. Продукти ампліфікації: М – маркер молекулярної маси (100 bp); 1-7 - ДНК зразків пшениці покоління сорту Вихованка (розмір амплікону 758 п.н.); 8-10 – негативний контроль, 11- позитивний контроль (плазмідна ДНК з геном *TPS2*, розмір амплікону 758 п.н.).

Зокрема, у трансгенної рослини сорту Вихованка, для якої підтверджено інтеграцію в геном гена біосинтезу трегалози *TPS2,* було зібране насіння (Рис. 4.6.5), пророщено та проведено перевірку щодо успадкування цього гена у наступному поколінні трансгенних ліній (Рис. 4.6.6). При проведені ПЛР-аналізу було підтверджено успадкування гена *TPS2* в другому поколінні трансгенних рослин пшениці сорту Вихованка.

4.7. Визначення вмісту трегалози в трансгенних лініях пшениці

Синтез трегалози, як вже було зазначено, є двоступеневим процесом, який включає участь двох ферментів – трегалозо-6-фосфатсинтази та трегалозо-6-фосфатфосфатази, і за підрахунками, за такого шляху біосинтезу, концентрація її в організмах *Saccaromyces cerevisiae* складає близько 10-20% сирої маси, змінюючи свої рівні залежно від умов навколишнього середовища. Перші дослідження з модифікацій шляхів біосинтезу трегалози зроблені Goddijn et al. (1997)[81], Pilon-Smith et al. (1998)[187], на рослинах тютюну, картоплі демонстрували лище незначне накопичення продукту – трегалози проте, було зафіксовано плейотропічні зміни морфологічного розвитку рослин, що ймовірно, було пов’язане з підвищеним накопиченням продуктів двоступеневої реакції біосинтезу, але не з акумуляцією самої трегалозою. Створені рослини демонстрували також стійкість до стресів, зокрема до посухи, проте на той час визначити точні механізми стійкості та як це по’язано з біосинтезом трегалози не було можливим.

Серед перших досліджень також можна відзначити Holmstorm et al. (1996)[102], Romero et al. (1997)[201], що демонстрували підвищення вмісту трегалози в тканинах картоплі та тютюну, що також корелювало з різними фенотиповими змінами розвитку створених рослин. Ендогенна експресія *TPS1* змінювала метаболізм цукрів, оскільки трасгенні лінії мали низчий рівень сахарози та глюкози порівняно з ДТ, проте характеризувались толерантністю до посухи. Варто зазначити, що різниця у проведені згаданих досліджень полягає у різних організмах - донорах генів *TPS1, TPS2* (останні використовували дріжджові гени біосинтезу трегалози). Ці автори були першими, хто визначив, що трегалозо-6-фосфатсинтаза може бути ключовим ферментом у біосинтезі трегалози та толерантності рослин до стресів, таким чином, механізми, що лежать в основі синтезу трегалози рослинами за умов стресу набагато складніші, ніж осмотичні процеси захисту, які спостерігались у мікроорганізмів [19]. За трансформації тютюну Han et al. (2005) отримали зовсім інші результати

з використанням гена *TP* (трегалозо фосфорилази) з *Pleurotus sator-caju* та одностадійним синтезом трегалози, отримані рослинні лінії продукували в 2-2,5 більше трегалози, відрізнялись стійкістю до посухи та не виявляли фенотипових змін у рослин [91].

Пізніше, дослідження *Jang et al*. (2003) з використанням конструкції зі злитим генами *TPS1, TPS2* (TPSP) біосинтезу трегалози для трансформації рису показали підвищення каталітичної активності злитого ферменту TPSP в 3,5-4 рази, ніж у кожного ферменту окремо, а отримані трансгенні рослини продукували трегалозу у концентрації до 0,1% по відношенню до сирої маси, що було значно більшим, ніж попередні виміри у дводольних рослин, і не виявляли пригніченого росту, проте демонстрували підвищення толерантності до посухи, засолення та низьких температур [110]. В цих дослідженням також було висунуто припущення, що плейотропічні дефекти, фенотипові відхилення, зміни морфології під час росту та розвитку рослин, в геном яких було інтегровано гени біосинтезу трегалози з бактерії або дріжджів, незважаючи на підвищену толерантність до стресу, не залежали від рівня трегалози, а виникали навіть за відсутності її підвищеного накопичення [110]. Li et al. (2011) також вивчали вплив надекспресії гена *TPS1* у трансгенних рослин рису, і було зафіксовано значне підвищення вмісту трегалози разом зі збільшем вмісту вільного проліну, що призводило до стійкості створених рослин до засолення, посухи та холоду, при чому вміст осмолітів зростав при вирощуванні рослин за умов стресу [140].

Проте, дуже мало відомо про особливості метаболізму трегалози в однодольних рослинах. Так наприклад, у ранніх дослідженнях вивчали екзогенних вплив трегалози на проростки рису та не виявили загальмованості росту або інших видимих порушень, на відміну від подібного впливу на дводольні рослини, натомість зменшувався інгібіторний ефект від засолення, в той час як екзогенне додавання проліну інгібувало ріст на 15% [110,218]. Можна припустити, що синтез трегалози в однодольних рослинах може здійснюватись

за відмінним від дводольних типом. Саме тому, питання кількісного виміру трегалози у рослин пшениці є актуальним для подальших досліджень впливу змін метаболічного шляху трегалози на розвиток, ріст та стресотолерантність однодольних.

У наших дослідження кількісний вимір трегалози у рослин пшениці, що не зазнавали дії посухи та не були трансгенниим, показав досить невеликі значення – близько 0,058-0,075 мг на 1 г сирої ваги (Табл. 4.7.1.). У контрольних (нетрансгенних) рослин пшениці, що не зазнавали дії посухи, вміст трегалози становив 0,058-0,075 мг на 1 г сирої маси, тоді як при вирощуванні контрольних рослин в умовах посухи (30% ПВГ) - 0,130-0,150 мг на 1 г сирої 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 сирої маси. Проте під час вирощування за умов 30% ПВГ вміст трегалози збільшувався– від 0,19 до 0,305 мг на 1 г сирої маси.

Таблиця 4.7.1

Вміст (мг на 1г сирої маси) трегалози в тканинах контрольних та транс генних 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
Т(-)	0,158±0,05	0,170±0,05	0,165±0,05
Т(+)	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); Р(-) – трансформовані рослини пшениці відповідного сорту (100% ПВГ); Р(+) – трансформовані рослини пшениці, що зростали в умовах посухи (30% ПВГ).

Проте, за стресових умов концентрація трегалози збільшувалась – зафіксовані значення за умов посухи від 0,190 до 0,305 мг на 1 г сирої ваги. Такі підвищення можуть бути результатом надмірної експресії гена біосинтезу трегалози, внаслідок чого кількісно варіюють продукти реакцій, власне, і трегалозо-6-фосфат. Оскільки, обидві реакції прямо пропорційно впливають на кількість Т6Ф, і відповідно, на вміст трегалози, особливої кореляції між рослинами, трансформованими окремо генами *TPS1* та *TPS2* зафіксовано не було, отримані значення були в одному діапазоні.

Таким чином, нами було встанволено вміст трегалози в трансгенних та контрольних рослинах пшениці за умов 100% поливу та за умов посухи. Оскільки, було показано, що за умов посухи рослини акумулюють підвищену кількість осмолітів, за умов посухи у контрольних рослин підвищувався вміст трегалози. Проте, такі показники були вищими для трангенних рослин з генами *TPS1, TPS2,* як за умов 100% поливу, так і за умов посухи. Такі дослідження є актуальними для однодольних рослин та раніше не були зафіксовані для рослин пшениці.

Отже, у результаті проведенних досліджень нами було створено генетичні векторні конструкції pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1, TPS2* під контролем сильного конститутивного промотора убіхвітину кукурудзи (PUbi) та селективним маркерним геном *hpt* гігроміцин-фосфотрансферази.Створені вектори було використано для трансформації досліджуваних сортів пшениці м’якої української селекції з метою створення посухостійких ліній. Для цього на попередньому етапі досліджень 7 сортів пшениці було введено в культуру in vitro для встановлення їхнього морфогенетичного потенціалу. Проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію пшениці 7 сортів *in vitro* з використанням незрілих зародків як експлатів, також проведено трансформацію 5 сортів пшениці методом *in planta.* За допомогою молекулярно-генетичного аналізу з використанням специфічних

праймерів до генів *TPS1, TPS2* підтверджено їх перенесення до досліджуваних геномів рослин пшениці. Результати проведеного аналізу трансгенних ліній вказують на їх підвищену стійкість до посухи.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

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., 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*)

3. *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*)

4. 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.

5. 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.

6. *Кваско А.Ю.*, Ємець А.І. Калюсогенез та регенерація зрілих зародків пшениці (*Triticum aestivum* L.). Збірник тез доповідей ІІІ Конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія», 16–18 травня, м.Київ, 2017 р., с. 69.

7. *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.

8. *Кваско А.Ю.*, Ємець А.І. Оптимізація складу живильного середовища для підвищення ефективності калюсогенезу з різних експлантів пшениці (*TriticumaestivumL.*) 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.

9. *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.

10. *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.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дисертаційна робота присвячена створенню генетичних векторних конструкцій з цільовими генами біосинтезу трегалози термофільних дріжджів *TPS1*, *TPS2* для отримання посухостійких ліній пшениці м'якої (*T.aestivum L.*) української селекції. Генетичні векторні конструкції, що були використані у дослідженнях з трансформації рослин тютюну та пшениці було конструйовано за використання методики Gateway-клонування [193,117,176]. Створено наступні вектори з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*: pGWB2-*TPS1*, pGWB2-*TPS2* під контролем промотора вірусу мозаїки цвітної капусти - P35 та селективним маркерним геном *hptII* – гігроміцинфосфатрансферази; pBract214-*TPS1*, pBract214-*TPS2* під контролем промотору убіхвітину кукурудзи pUbi та селективним маркерним геном *hptII* – гігроміцинфосфатрансферази.

З використанням методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації створені конструкції pGWB2-*TPS1* та pGWB2-*TPS2* було перевірено на модельному рослинному об'єкті – тютюні (*N. tabacum*). Після трансформації на 30-40 добу вирощування у дослідних рослин на регенераційному середовищі спостерігали затримку розвитку пагонів, порівняно з контрольними рослинами, а після їх перенесення на середовище для вкорінення спостерігали затримку утворення коренів, порівняно з контролем. Результати дослідження на контрольних рослинах показали, що частота утворення пагонів на середовищі для регенерації була 95±2,35%, а частота утворення коренів на середовищі для вкорінення - 98±1,89%, загалом було протестовано не менше 200 контрольних експлантів. З метою підвищення частоти регенерації та коренеутворення після трансформації тютюну було проведено дослідження з підбору концентрацій джерел вуглецю в живильних середовищах. Для цього після проведення трансформації експланти висаджували на середовище МС, доповнене окремо концентраціями від 0 до 45 г/л таких цукрів, як сахароза, глюкоза та мальтоза. Найвищі показники частоти регенерації та її ефективності за трансформації конструкцією pGWB2-*TPS1* було встановлено для рослин, які регенерували на

середовищах із концентраціями від 25 до 45%сахарози, мальтози або глюкози. За цих умов найвищий показник частоти регенерації в умовах селективного тиску становив 88,5±3,23% на середовищі з 45 г/л сахарози, а найбільший показник ефективності трансформації – 4. За трансформації рослин конструкцією pGWB2-*TPS2* найвищі показники ефективності та частоти регенерації в умовах селективного тиску було виявлено на 40 добу вирощування на середовищі зі зниженою концентрацією цукрів – 5-10 г/л. Найбільший показник частоти регенерації був на рівні 73,5±2,34%, а найвищий показник ефективності регенерації – 4 та 5 добре розвинених регенерованих пагони на одному експланті. На середовищі з 25-30 г/л мальтози ефективність регенерації також була нижчою, у середньому регенерувало 2-3 пагони на кожному з експлантів. За культивування на середовищах з сахарозою або глюкозою у концентраціях 25-45 г/л у експлантів спостерігали затримку росту. Проведене дослідження з підбору умов регенерації та вкорінення рослин тютюну після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дало можливість проведення подальшого молекулярно-генетичного аналізу, у результаті якого було підтверджено перенесення цільових дріжджових генів біосинтезу трегалози до геномів відібраних рослинних ліній.

Для виконання поставленої задачі з отримання посухостійких ліній пшениці м’якої сортів української селекції з метою підвищення ефективності трансформації рослин пшениці було спочатку введено в культуру *in vitro* сім сортів пшениці м’якої: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67, Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад та оцінено їх морфогенетичний потенціал, а саме здатність до ефективної регенерації рослин *in vitro*. Як експланти в дослідженні використовували незрілі зародки. Найвищі показники утворення морфогенного калюсу було виявлено для сортів Миронівська 67 та Мірхад (68 ± 2,34 та 67,8 ± 1,56 відповідно), хоча для сортів Зимоярка та Кесарія Поліська ці значення також були досить високими. Також для цих сортів була характерна найвища частота регенерації пагонів (47 ± 2,15 та 43,9 ± 0,76

відповідно), тоді як найнижчий показник відмічено у сорту Щедрість (24 ± 1,75). Новизна роботи полягає у використанні сортів, які ще не було охарактеризовано за відповідними показниками у культурі *in vitro* та не було використано у біотехнологічних роботах та генетичних модифікаціях.

Незважаючи на те, що досліджувані сорти мали різні морфогенетичні показники, всі вони були використані в дослідах по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Для трансформації, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens*, в культурі *in vitro*, було використано конструкції pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2* з генами біосинтезу трегалози дріжджів під контролем промотора убіхвітину кукурудзи (Ubi) та селективним маркерним геном стійкості до гігроміцину. Так, найвищі показники частоти регенерації пагонів в умовах селективного тиску після трансформації конструкцією pBract214-*TPS1* було виявлено для сортів Вихованка та Зимоярка (48,9±0,96 та 40±2,31 відповідно), тоді як після трансформації конструкцією pBract214-*TPS2* - для сортів Миронівська 67 та Вихованка (48±2,69 та 46,7±1,35 відповідно). Для всіх інших сортів цей показник коливався в межах від 24±1,75% (сорт Щедрість) до 38±1,21% (сорт Кесарія Поліська) за використання конструкції pBract214-*TPS1* та від 33±0,58% (сорт Кесарія Поліська) до 45±1,23% (сорт Зимоярка) за використання pBract214-*TPS2*. Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин 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 п.н. та 758 п.н., що відповідають позитивним контролям (плазмідним ДНК, що несли у собі конструкції з генами *TPS1* та *TPS2*).

На сьогодні, актуальним методом генетичної модифікації рослин є трансформація, опосередкована *Agrobacterium tumefaciens in planta*, умови проведення якої, включаючи склад живильних середовищ, способу селекції трансформованих ліній та механізми переносу цільових генів невивчених для однодольних рослин [16,276]. Саме тому, нами вперше були проведені

дослідження по перенесенню генів *TPS1* та *TPS2* в геном пшениці методом трансформації *in planta.* Для проведення трансформації *in planta* було використано 5 сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Кесарія Поліська, Журавка Одеська, та Щедрість та конструкції з генами біосинтезу трегалози дріжджів pBract214-*TPS1* та pBract214-*TPS2*. Після трансформації було проведено морфологічну оцінку зібраних колосків пшениці. Найвищий відсоток зав'язування насіння було виявлено у сорту Вихованка (58%±1,7), а найнижчий у сорту Кесарія Поліська (34%±1,23). Морфологічно колоси та насіння були без суттєвих відхилень в розвитку, насіння відрізнялось середньою наповнюваністю. Після проведення оцінки морфологічних показників зібраних колосків та пшениці, насіння було висаджено в вегетаційний посуд у підготовлений однорідний грунт (суміш грунт:торф:пісок – 1:1:1). Після появи четвертого листа було проведено молекулярно-генетичний аналіз досліджуваних рослин. У результаті ПЛР-аналізу було отримано фрагменти розміром 640 п.н. та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю (векторним конструкціям з генами *TPS1* та *TPS2,* відповідно). За отриманими даними частота трансформації (співвідношення кількості ПЛР-позитивних рослин до загального числа проаналізованих рослин) за допомогою методу *in vitro* з використанням конструкції pBract214-*TPS1* була в середньому на рівні 2,5% для кожного сорту, з pBract214-*TPS2* – на рівні 4%. Для трансформації методом *in planta* зафіксовано показники частоти трансформації на рівні 2-6% для обох конструкцій.

Оскільки, метою нашого дослідження було створення посухостійких рослин, для вирішення поставленої мети було проведено дослідження стійкості створених ліній рослин пшениці до посухи. В залежності від умов оточуючого середовища, розвиток рослин може зазнавати змін, які виражаються в багатьох факторах, для пшениці це: ступінь кущіння, кількість бокових пагонів, кількість додатково розвинених колосків, довжина колосів та їхня наповнюваність, кількісний та якісний склад врожаю [103]. Дослідження з посухостійкості рослин пшениці, контрольних та отриманих після трансформації *in planta*, проводили в

умовах *in vivo*. Для імітації посухи було обрано період до початку колосіння, виходу в трубку і до дозрівання насіння, що тривав близько місяця в залежності від сорту. Для моделювання умов посухи рослини переводили на обмежений полив, перший тиждень – 50% від повного стовідсоткового постачання води, другий тиждень – 40%, та останній тиждень 30%. Дослідження проводили з контрольними і трансгенними рослинами і за умов стресу, та за умов достатнього постачання води. Після повного достигання зерна проводили аналіз морфологічних показників досліджуваних рослин та оцінку параметрів врожаю: висота рослин, довжина головного колоса , кількість зерен з головного колоса, маса зерен з головного колосу. Отримані дані свідчать про підвищеню стійкість трансгенних рослин пшениці до посухи, що проявлялося у збільшенні кількості зерна в головному колосі на 37% та маси зерна на 40% порівняно з контрольними рослинами, що зростали в умовах стресу.

Нами також було проведено кількісне визначення трегалози у листях контрольних та трансгенних рослин пшениці, що зростали за умов нормального поливу та змодельованої посухи. З рослинами, в яких було підтверджено інтеграцію генів *TPS1* та *TPS2,* результати були наступними: за умов достатнього поливу вміст трегалози у них не відрізнявся від контрольних, проте, за стресових умов концентрація трегалози збільшувалась від 0,198 до 0,305 мг на 1 г сирої ваги. Таке підвищення може бути результатом експресії перенесених генів біосинтезу трегалози, внаслідок чого кількісно варіюють продукти реакцій, власне, і трегалозо-6-фосфат.

Таким чином, у результаті проведеної роботи нами створено векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Підтверджено їх перенесення та інтеграцію до геномів рослин тютюн (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.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи створено векторні конструкції з генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. Підтверджено їх перенесення та інтеграцію до геномів рослин тютюн (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* (гігроміцин-фосфотрансферази), а також конструкції pBract214-*TPS1*та pBract214-*TPS2* з генами біосинтезу трегалози під контролем промотору убіхвітину кукурудзи (PUbi) та селективним маркеним геном *hpt* (гігроміцин-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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Горбатюк І. Р, Гнатюк І. С., Банникова М.О., Тараненко А. М, Моргун Б. В Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. Физиология растений и генетика, 2015, 47: 514–525.

2. Горбатюк І. Р., Щербак Н. Л., Банникова М. О., Великожон Л. Г., Кучук М. В, Моргун Б. В. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro* .Физиология растений и генетика, 2016, 48 (1):65–74.

3. Горбатюк І.Р. Оптимізація *Agrobacterium*-опосередкованої біотехнології трансформації Triticum aestivum в культурі *in vitro* та методом *in planta*: дис.. кан-та біологічних наук 03.00.20/2015, с.193.

4. Дубровна О.В., Моргун Б.В, Бавол А.В. Біотехнологія пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія: Монографія НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетика. – Київ: Логос, 2014. – с. 374.

5. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень Agrobacterium-опосередкованої трансформації пшениці, Фізіологія рослин та генетика, 2018, 50(3).

6. Дубровна О.В., Сливка Л.В., Кулеш С.С. Фізіолого-біохімічний аналіз транс генних рослин пшениці насіннєвого покоління Т2 з гетеро логічним геном орнітин-Δ-амінотрасферази, Фактори експер. евол. організмів, 2019, Т. 24, С.70-74.

7. Ісаєнков С.В. Молекулярно-генетична та функціональна характеристика мембранних транспортерів, залучених до регуляції соле- і посухостійкості у рослин та детоксифікації арсену: дис.. д-ра біологічних наук 03.00.22/2016. 318 с.

8. 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.

9. Кваско А. Ю., Ісаєнков С. В., Краснопьорова 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.

10. Макрушин М.М., Макрушина Є.М., Петерсон Н.В., Мельников М.М.// Фізіологія рослин/Підручник. – Вінниця:Нова Книга, 2006. – 416 с.

11. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю. Повышение содержания свободного пролина в осмотолерантных растениях кукурузы с двухцепочечным РНК-супресором гена пролиндегидрогеназы. Физология растений и генетика., 2014, 46(6):482-489.

12. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. Физиология растений и генетика, 2016, 48(3):196-214.

13. Приседський Ю.Г., Статистична обробка результатів біологічних експериментів. – Донецьк:Юго-Восток, 1999. – 210 с.

14. Aadel H., Abdelwand R., Udupa S.M., Diria G., Mouhtadi A.E., Ahansal K., Gaboun F., Douira A., Ibaqi D. Agrobacterium-mediated transformation of mature embryo tissues of bread wheat (*Triticum aestivum L.*) genotypes. Cereal Res. Communications., 2018, 46(1).

15. Abid N.; Maqbool A.; Malik K.A. Screening commercial wheat (*Triticum aestivum L.*) varieties for *Agrobacterium*-mediated transformation ability. Pak. J. Agric. Sci., 2014, 51:83–89.

16. Agarwal S., Loar S., Stebel C., Zale J. Floral transformation of wheat. Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats, 2009, 478: 105-113.

17. Akram N.A., Irfan I., Ashraf M. Trehalose-induced modulation of antioxidative defence system in radish (*Raphanus sativus L.*) plants subjected to water-deficit conditions. Agrochimica, 2016; 60(3):186-98.

18. Ali A., Bang S.W., Chung S-M., Staub J.E. Plant transformation via pollen tube-mediated gene transfer. Plant Mol. Biol. Rep., 2015, 33:742-747.

19. Almeida A.M., Silva A.B., Araujo S.S., Cardoso L.A., Santos D.M., Torne J.M., Silva J.M., Paul M.J., and Ferereiro P.S. Responses to water withdrawal of tobacco plants genetically engineered with the *AtTPS1* gene: a special reference to photosynthetic parameters, Euphytica, 2007, 154(1–2): 113–126.

20. Amoah B.K., Wu H., Sparks C., Jones H.D. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(358):1135-1142.

21. An M.-Z., Tang Y.-Q., Mitsumasu K., Liu Z.-S., Shigeru M., and Kenji K., Enhanced thermo-tolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase, Biotechnol. Lett., 2011, 33:1367–1374.

22. Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S., Lijsebettens V Higher plant transformation: principles and molecular tools, Int. J. Dev. Biol., 2013, 57:483-494.

23. Anand A., Jones T.J. Advancing *Agrobacterium*-based crop transformation and genome modification technology for agricultural biotechnology, Springer Nature, 2018, 418:489-507.

24. Arguelles J.*C*. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis, Arch. Microbiol., 2000, 174:4, pp. 217-224.

25. Arthikala M-K., Nanjareddy K., Lara M., Sreevathsa R. Utikity of a tissue culture-independent *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation strategy in bell pepper to develop fungi disease resistant plants. Scientia Horticulturae, 2014, 170:61-69.

26. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D.D., Seidman J. G., Smith J.A., Struhl K. Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley, 1987, pp. 431-433.

27. Avonce N., Leyman B., Thevelein J., Iturriaga G. Trehalose metabolism and glucose sensing in plants, Biochem. Soc. Trans., 2005, 33(1):276-279.

28. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature, 2007, 448:938–942

29. Bechtold, N., Ellis,J., Pelletier, G., In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Acad. Sci. Paris Life Sci., 1993, 316:1194–1199.

30. Bell W., Klaassen P., Ohnacker M., Boller T., Herweijer M., Schoppink P., van der Zee, Wiemken A., Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation., Eur.J. Biochem, 1992, 209(3): 951-959.

31. Bell W., Sun W., Hohmann S., Wera S., Reinders A., De Virgilio C., Wiemken A., Thevelein J.M. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. J. Biol. Chem., 1998, 273(50): 33311-33319.

32. Benkirane H., Martin A., Lazzeri P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritodeum, Euphytica, 1999, 108(3):161-167.

33. Ben-Saad R., Ben-Ramdhan W., Zouari N., Azaza J., Mieulet D., Guiderdoni E., Ellouz R., Hassairi A. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the *AlSAP* gene exhibits a high level of tolerance to salinity and degudration, Mol. Breeding, 2012, 30:521-533.

34. Bhalla P.L. Genetic engineering of wheat-current challenges and opportunities. Trends Biotechnol, 2006, 24:305–311.

35. Bianchi G., Gamba A., Limiroli R., Pozzi N., Elster R., Salamini F., and Bartels D. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*, Physiol. Plant, 1993, 87: 2, pp. 223–226.

36. Binka A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk, The *Agrobacterium*-madiated transformation of common wheat (*Triticum aestivum L.*) and triticale (x *Triticosecale*

Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes, J. Appl. Genetics, 2012, 53:1-8.

37. Blázquez M.A., Santos E., Flores C.L., Martínez-Zapater J.M., Salinas J., Gancedo C. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Plant J, 1998, 13: 685–689.

38. Borisjuk N., Kishchenko O., Eliby S., Schramm C., Anderson P., Jatayev S., Kurishbayev A., Shavrukov Y. Genetic modification for wheat improvement: From transgenesis to genome editing, 2019, BioMed Res. Int., ID:6216304, 2019.

39. Cabib E., Leloir F.L. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. J. Biol. Chem, 1958, 231(1):259-275.

40. Carillo P., Feil R., Gibon Y., Satoh-Nagasawa N., Jackson D., Bläsing O.E., Stitt M., Lunn J.E. A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. Plant Methods, 2013 9(21).

41. Chan M-T., Chang H-H., Ho S-L., Tong W-F., Yu S-M. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric a-amylase promoter/b-glucuronidase gene. Plant Mol Biol , 1993, 22: 491-506.

42. Chary S.N., Hicks G.R, Choi Y.G., Carter D., Raikhel N.V. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in Arabidopsis, Plant Physiol., 2008, 146 (1): 97-107.

43. Chauhan H. and Khurana P. Wheat genetic transformation using mature embryos as explants. Wheat Biotechnology: Methods and Protocols, 2017, 1679:153–167.

44. Chauhan H., Khurana P. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum L*.) transgenics, Plant biotechnology Journal, 2011, 9:408-417.

45. Chauhan H., Khurana P. Wheat transformation using mature embryos as explants. Wheat Biotechnology:Methods and Protocols, 2017, 1679:153-167.

46. Chen S., Hajirezaei M., Peisker M., Tschiersch H., Sonnewald U., and Bornke F. Decreased sucrose6- phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning and reduces growth, Planta, 2005, 221(4): 479–492.

47. Chen W., Kastner C., Nowara D., Garcia E.O., Rutten T., Zhao Y., Deising H.B., Kumlehn J., Schweizer P. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection, Journal of Experimental Botany, 2016, 67(17):4979-4991.

48. Cheng M., Fry J.E., Pang Sh., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan. Yu. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology, 1997, 115:971-980.

49. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. In Vitro Cell Devel Biol Plant, 2004, 40:31–45.

50. Clough S.J. and Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J., 1998, 16: 735–743.

51. Colaco K., Kampinga J., and Roser B. Amorphous stability and trehalose, Science, 1995, vol. 268, pp. 788–789.

52. Cortina C., Cullianez-Macia F.A. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis, Plant Science, 2005, 169:75-82.

53. Coskun Y., Duran R. E, Savaskan C., Demirci T., and Hakan M. T., Eficient plant regeneration with arabinogalactanproteins on various ploidy levels of cereals. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(3): 420–425.

54. Crowe J. H., A. E. Oliver and F. TablinIs there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis? Integr. Comp. Biol., 2002, 42:497–503.

55. Curtis I. S., Davey M.R., Power J.B. Leaf Disk Transformation. *Agrobacterium* Protocols. 1995. Vol. 5. P. 59-70.

56. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus L*. longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in ptimizing transformation efficiency, Transgenic Research, 2001, vol. 10, pp. 363-371.

57. Darco E., Vegh B., Khalil R., Marcek T., Szalai G., Pal M., Janda T. Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various ocmolytes under iso-osmotic conditions, 2019, PlOS One, 14(12).

58. De Oliveira M.L.P, Febres V.J., Costa M.G.C., Moore G.A., Otoni W.C. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. Plant Cell Rep, 2009, 28(3):387–395.

59. De Smet, K.A., Weston, A., Brown, I.N., Young, D.B., and Robertson, B.D., Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria, Microbiology, 2000, 146: 199–208.

60. Debast S., Nunes-Nesi A., Hajirezaei M.R., Hofmann J., Sonnewald U., Fernie A.R., Börnke F. 2011. Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. Plant Physiology,156(4): 1754–1771.

61. Delatte T.L., Sedijani P., Kondou Y., Matsui M., de Jong G.J., Somsen G.W., Wiese-Klinkenberg A., Primavesi L.F., Paul M.J., Schluepmann H.,Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over grown by way of the SnRK1 signaling pathway, Plant Physiol., 2011, 157:160-174.

62. Delporte F., Mostade O., Jacquemin J.M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell Tissue Org Cult, 2011, 67:73–80.

63. Delporte F., Pretova A., du Jardin P., Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat, Protoplasma, 2014, 251: 1455-1470.

64. Desfeux C., Clught S.J., Bent A.F. Female reproductive tissue are primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* foral-dip. Methods Plant Physiol., 2000, 123:895-904.

65. Ding L., Li SH., Gao J., Wang Yu., Yang., He G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elie wheat. Mol Bio Rep, 2009, 36(1): 29-36.

66. Divate N.R., Chen G-H., Divate R.D., Ou B.R., Chung Y.C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improvement in stresses tolerance. Bioengin., 2017, 8(5): 524-535.

67. Drennan P.M., Smith M.T., Goldsworthy D., Staden van J. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerat angiosperm *Myrothamnus flabelifolius* welw., J. of Plant Physiology, 1998, 142:4, pp. 493-496.

68. Eastmond P.J., Van Dijken A., Spielman M., Kerr A., Tissier A.F., Dickinson H.G., Jones J.D.G., Smeekens S.C., Graham I.A. Trehalose-6-phosphate synthase, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation, The Plant J., 2002, 29(2):225-235.

69. Eck J.V. The status of *Setaria viridis* transformation: *Agrobacterium*-mediated to floral dip, Front. in Plant Sci., 2018, 9:652.

70. Elbein A.D., Pan Y.T., Partuszak I., Carroll D. New insight on trehalose:a multifunctional molecule, Glycobiology, 2003, 13(4):17-27.

71. Feldman K.A., Marks, M.D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. Mol. Gen. Genet., 1987, 208, 1–9.

72. Ferrie A.M.R., Bhowmik P., Rajagopalan N., Kagale S. GRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in wheat doubled halpoids, Cereal Genomics:Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2020, 2073:183-198.

73. Figueroa C.M., Feil R., Ishihara H., Watanabe M., Kolling K., Krause U., Hohne M., Encke B., Plaxton W.C. Zeeman S.C., Li Z., Schulze W.X., Hoefgen R., Stitt M., Lunn J.E. Trehalose-6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability., Plant J., 2016, 85: 410-423.

74. Fortin Ch., Nester E.W., Dion P. Grownth inhabition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. Journal of Bacteriology, 1992, 174(17):5676-5685.

75. Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley Can. J. Biochem, 1968, 46: 417–421.

76. Gao H., Wang Y., Xu P., Zhang Z. Overexpression of a WRKY transcription factor TaWRKY2 enhances drought stress tolerance in transgenic wheat, Frontiers in Plant Science, 2018, 9:997.

77. Gao L., Liu Y., Sun H., Li C., Zhao Z., Liu G. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 121(6) :599-606.

78. Garg A.K., Kim J.-K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., and Wu R.J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance to different abiotic stresses, Prot. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99(25):15898–15903.

79. Gasparis S., Orczyk W., Zalewski W., Nadolska-Orczyk A.. The RNA-mediated silencing of one of the *Pin* genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. J. Exp. Bot., 2011, 62:4025–4036.

80. Ge, L. F., Chao, D. Y., Shi, M., Zhu, M. Z., Gao, J. P., and Lin, H. X. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. Planta, 2008, 228:191–201.

81. Goddijn J.M., Verwoerd Th. C., Voogd E., Krutwagen R. W. H. H., de Graaf P. T. H., Poeis J., van Dun K., Ponstein A. S., Damm B., Pen J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. Plant Physiol. 1997,113:181-190.

82. Godfray H.C., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Science, 2010, 327:812–818.

83. Gomes D.L., Baud S.,Gilday A., Li Y., Graham A. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phoshate synthase 1 mutant is assosiated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. Plant *J*., 2006, 46:69-84.

84. Gomez-Escobedo I.A., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-Estrella L.R., Hernandez-Luna C., Montes de Oca-Luna R. Mejora del crecimiento de plantas de tabaco mediante la inhibicioen del gen de la trahalasa, Ciencia UANL,(4): 483-489, 2004.

85. Grennan A.K. The role of trehalose biosynthesis in plants, Plant Physiol., 2007, 144(1):3-5.

86. Gupta K.P., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R. Genetics of yield, abioic stress tolerance and biofortification in wheat (*Triticum aestivum L.*), Theor. Appl. Genet., 2020, 133(5):1569-1602.

87. Habib I., Rauf M., Qureshi J., Ahmed M., Mansoor Sh., Saeed N.A. Optimization of somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of elite wheat (*Triticum aestivum*) cultivars of Pakistan, International Journal of Agriculture and Biology, 2014, 16(6):1098-1104.

88. Haliloglu K., Wheat immature embryo culture for embryogenic callus induction. Online J. Biol. Sci.,2002, 2: 520−521.

89. Hamada H., Linghu Q., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation, Scientific Reports, 2017, 7:11443.

90. Han J., Lakshman D., Garvez L.C., Mitra S., Baenziger P.S., Mitra A. Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*, Plant Biology, 2012, 12:33.

91. Han J., Yu X., Chang J., Yang G., He G.Overview of the wheat genetic transformation and breeding status in China. Wheat Biotech.:Methods and Prot., 2017, 1679(3):37-60.

92. Hansen G., Wright M.S. Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci., 1999, 4:226–231.

93. Hao J., Niu Y., Yang B., Gao F., Zhang L., Wang J., Hasi A. Transformation of marker-free and vector-free antisense ACC oxidase gene cassette into melon via the pollen-tube Pathway. Biotechnol Lett, 2011, 33:55–61.

94. Hayta S., Smedley M.A., Demir S.U., Blundell R., Hichiffe A., Atkinson N., Harwood W.A. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-medated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum L.*), Plant Method, 2019, 15:121.

95. He Y., Jones H.D., Chen S., Chen X.M., Wang D.W., Li K.X., Wang D..S, Xia L.Q. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. *var. durum cv* Stewart) with improved efficiency. J Exp Bot, 2010, 61:1567–1581.

96. Hensel G., Genetic transformation of *Triticeae cereals* – Summary of almost tree-decades development. Biotechnology Advances, 2019, 40:107484.

97. Hensel G., Kastner C., Oleszczuk S., Riechen J., Kumlehn J., *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize, Int. J. Plant Genomics, 2009, 1:1-9.

98. Hensel G., Marthe C., Kumlehn J. Agrobacterium-mediated transformation of wheat using immature embryos. Methods Mol. Biol., 2017, 1679:129-139.

99. Hess D., Dressler K., Nimmrichter *R.* Transformation experiments by pipetting Agrobacterium into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum L.*), Plant Sci., 1990, 72 , 233–244.

100. Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Front. In Plant. Sci., 2014, 5(628).

101. Himmelbach A., Zierold U., Hensel G., Riechen J., Douchkov D., Schweizer P., Kumlehn J. A set of modular binary vectors for transformation of cereals, Plant Physiology, 2007, Vol. 145, pp. 1192-1200.

102. Holmström K. O., Mäntylä E., Welin B., Mandal A., Tapio Palva E., Tunnela O. E. Drought tolerance in tobacco, Nature, 1996, 379:683–684.

103. Hossain M.A., Wani S.H., Bhattacharjee S., Burritt D.J., Phan Tran L-S., Drought stress tolerance in plants, Molecular and Genetic Perspectives, 2016, 2: 615.

104. Hottiger T., Virgiliov C. D., Hall M. N., Boller T., Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast, Eur. J. Biochem., 1994, 219:187-193.

105. Hou W.S. Development of transgenic wheat with a synthetical insecticidal crystal protein gene via pollen-tube pathway. Acta Agron Sin, 2003, 29:806–80.

106. Hu Z., Wang R., Zheng M., Meng F., Liu X., Wu H., Yao Y., Xin M., Peng H., Ni Z., Sun Q. TaWRKY51 promotes lateral root formation through negative regulation of ethylene biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum L.*), The Plant Journal., 2018, 96:372-388.

107. Hussain Shah S., Ali S., Jan S.A., Din J.U., Ali G.M. Piercing and incubation method of in planta transforma_tion producing stable transgenic plants by overexpressing DREB1A gene in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 120: 1139–1157.

108. Ishida Y., Tsunashima M., Hiei Y., Komari T.Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Agrobacterium* prot.: Methods in molecular Biology, 2015, 1223:189-198..

109. Ismagul A., Yang N., Maltseva E., Iskakova G., Mazonka I., Skiba Y., Bi H., Eliby S., Jatayev S., Shavrukov Y., Borisjuk N., and Langridge P. A biolistic method for highthroughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. BMC Plant Biol., 2018, 18:135.

110. Jang I-C., Oh S-J., Seo J-S., Choi W-B., Song S.J., Kim Ch.H., Kim Y.Sh., Seo H-S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J-K. Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth, 2003, 131:516-524.

111. Ji Q., Xu X., Wang K., Genetic transformation of major cereal crops, Int.J.Dev.Biol., 2013, 57:495-508.

112. Jones H.D., Doherty A., Wu H.Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. Plant Methods, 2005, 5: 1-9.

113. Kalbande B., Patil A.S. Plant tissue culture independent *Agrobacterium tumefaciens* mediated in planta transformation for upland cottoc (*Gossypium hirsutum*).Genetic Engin. and Biotech. J., 2016, 14(1).

114. Kang G., Liu G., Peng X., Wei L., Wang C., Zhu Y., Ma Y., Jiang Y., Guo T. Increasing the starch content and grain weight of common wheat dy overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene, Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 73:93-98.

115. Kapildev G., Chinnathambi A., Sivanandhan G., Rajesh M., Vasudevan V., Mayavan S., Arun M., Jeyaraj M., Alharbi S.A., Selvaraj N., Gapnapathi A. Hight – efficient *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation in black gram (*Vigna mungo* L.) Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38:205.

116. Karim S., Aronsson H., Ericson H., Pirhonen M., Leyman B., Welin B., Mantyla E., Palva E.T., Dijck P.V., Holmstrom K.O. Improved drought tolerance without

undersired side effect in transgenic plants producing trehalose, Plant Mol. Biol. 2007, 64:371-386.

117. Karimi M., Inze D., Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends in Plant Science, 2002, 7(5):193-195.

118. Katavic V., Haughn G.W., Reed D., Martin M., Kunst L. In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet, 1994, 245:363–370.

119. Kaur R., Sinha K., Bhunia R.K. Can wheat survive in heat? Assembling tools towards successful development of heat stress tolerance in *Triticum aestivum L.* Molecular Biology Reports., 2019, 46(2):2577-2593.

120. Khanna H., Daggard G., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. Plant Cell Reports, 2003, 21:429-436.

121. Kim J., Alizadeh P., Harding T., Hefner-Gravink A., and Klionsky D.J., Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications, Appl. Environ. Microbiol., 1996, vol. 62, pp. 1563–1569.

122. Kolbe A., Tiessen A., Schluepmann H., Paul M., Ulrich S., Geigenberger P. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslation redox activation of ADF-glucose pyrophosphorylase, PNAS, 2005, 102(31):11118-11123.

123. Komari T, Takakura Y, Ueki J, Kato N, Ishida Y, Hiei Y Binary Vectors and super-binary vectors. *Agrobacterium* prot., 2006, 2:15–42

124. Kumar A.M., Reddy K. N., Sreevathsa R., Ganeshan G., Udayakumar M. Towards crop improvement in bell pepper (Capsicum annuum L.): Transgenics (uidA::hptII) by a tissue-cultire-independent Agrobacterium-mediated in planta approach, Scientia Horticulture, 2009, vol. 119, pp. 362-370.

125. Kumar N., Gulati A., Bhattacharya A. L-glutamine and L-glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170:1649–1664.

126. Kumar R., Mamrutha H. M., Kaur A. Development of an efcient and reproducible regeneration system in wheat (*Triticum aestivum L*.) Physiology and Molecular Biology of Plants, 2017a, 23: 4, pp. 945–954.

127. Kumar R., Mamrutha H.M., Kaur A., Grewal A. Synergistic effect of cefotaxime and timentin to suppress the *Agrobacterium* overgrowth in wheat (*Triticum aestivum L*.). Asian J. of Microbiol., 2017, 19(4):961-967.

128. Kumar R., Mamrutha H.M., Kaur A., Venkatesh K., Sharma D., Singh G.P. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. Mol. Biol. Report., 2019, 46(2):1845-1853.

129. Kumar R., Mamrutha H.M., Venkatesh K., Tiwari K.N., Kumar S. (2018) Application and achievements of Recombinant DNA in crop improvement. In: Bharadwaj DN (ed) Advanced molecular plant breeding. Apple Academic Press, Inc., New Jersey, USA, p 299–328.

130. Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., and Loerz H., Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare L*.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4(2):251–261.

131. **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.

132. Kwon H-B., Yeo E-T., Hang S-E., Bae Sh-Ch., Kim D-Y., Byun M-O. Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) and trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPS2*) from *Zygosaccharomyces rouxii*, Yeast Research, 2003, 3: 433-440.

133. Langridge P., Brettschneider R., Lazzeri P., Lorz H. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment , Plant J. 1992, 2:631–638.

134. Lastrdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development, J. Exp. Bot., 2014, 65: 799-807.

135. Lawlor D.W., Paul M.J. Sourse/sink interaction underpin crop yield:the case for trehalose-6-posphate/SnRK1 in improvement of wheat. Frontiers in Plant Science., 2014, 418:1-16.

136. Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Liu C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. Genome Biol, 2015, 16:258.

137. Lee S-B.,Kwon H-B., Kwon S-J., Park S-C., Jeong M-J., Han S-E., Byun M-O., Daniell H. Accumulation of trehalose withen transgenic chloroplasts confers drought tolerance, Molecular Breeding, 2003, 11:1-13.

138. Leyman B., Avonce N., Ramon M., Van Dijck P., Iturriaga G., Thevelein J.M. Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. J Biotechnol, 2006, 121: 309–317.

139. Leyman B., Van Dijck P., Thevelein J.M. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. Trends Plant Sci, 2001, 6: 510–513.

140. Li H-W., Zang B-S., Deng X-W., Wang X-P., Overexpression of the trehalose-6-phosphate syntase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. Planta., 2011, 234(5):1007-1018.

141. Li J., Tan X., Zhu F., Guo J. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets. International Journal of Biology, 2010, 2:127-131.

142. Li J.R., Ye X.G., An B.Y., Du L.P., Xu H.J. Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. Plant Biotechnol Pep, 2012, 6:183–193.

143. Liang Q., Wang K., Liu X., Riaz B., Jiang L., Wan X., Ye X., Zhang C. Improved folate accumulation in genetically modified maize and wheat, Journal of Experimental Botany, 2019, 70(5):1539-1551.

144. Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y. and Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Commun, 2017, **8**: 14261.

145. Lin J., Zhou B., Yang Y., Mei J., Zhao X., Huang X., Tang D., Liu X. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo:a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of Indica Rice. Plant Cell Reports, 2009, 28:1065-1074.

146. Liu K., Fu L., Qin P., Sun Y., Liu J., Wang X. Overexpression of the wheat trehalose-6-phosphate synthase 11 gene enhances cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*., Gene , 2019, 710: 210-217.

147. Liu, X., Brost, J., Hutcheon, C., Guilfoil, R., Wilson, A., Leung, S., Shewmaker, C., Rooke, S., Nguyen, T., Kiser, J. and Rocher, J. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2012, 48:462-468.

148. Lunn J. E., Delorge I., Figueroa C. M., Dijck P. V., Stitt M. Trehalose metabolism in plants. The Plant Journal., 2014, 79:544-567.

149. Lunn J.E., Feil R., Hendriks J.H., Gibon Y.,Morcuende R., Osuna D., Scheible W.R., Carillo P., Hajirezaei M.R., Stitt M. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Biochem J., 2006, 397: 139–148.

150. Mago R., Zhang P., Vautrin S., Simkova H., Bansal U., Luo M-C., Rouse M., Kagaoglu H., Periyanan S., Kolmer J., Jin Y., Ayliffe M., Bariana H., Park R.F., Mclntosh R., Dolezel J., Berges H., Spielmeyer W., Lagudah E.S., Ellis J.G., Dodds P.N. The wheat Sr50 gene reveals rich diversity at a cereal disease resictance locus, Nature Plants, 2015, No. 15186.

151. Manfroi E., Yamazaki-Lau E., Grando M.F., Roesler E.A. Acetosyringone, pH and temperature effects on trancient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*, Genet. Mol. Biol., 2015, 38(4):470-476.

152. Martínez-Barajas E., Delatte T., Schluepmann H., de Jong G.J., Somsen G.W., Nunes C., Primavesi L.F., Coello P., Mitchell R.A.C., Paul M.J. Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pre

grain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. Plant Physiology, 2011, 156(1):373–381.

153. Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T. Kubota, M., Sugimoto, T., and Kurumoto, M., Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from Rhizobium sp. M-11, Biosci. Biotech. Biochem., 1996, 60(4): 717–720.

154. Mata A.T., Jorge T.F., Ferreira J., do Rosário Bronze M., Branco D., Fevereiro P., Araújo S., António C. Analysis of low abundant trehalose-6-phosphate and related metabolites in *Medicago truncatula* by hydrophilic interaction liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. J Chromatogr., 2016, 1477: 30–38.

155. Mayavan S., Subramanyam K., Arun M., Rajesh M., Kapil Dev G., Sivanandhan G., Jaganath B., Manickavasagam M., Selvaraj N., Ganapathi A.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *in planta* seed transformation strategy in sugarcane. Plant Cell Reports, 2013, 32: 1557–1574.

156. Medveck´a E. and Harwood W. A. Wheat (*Triticum aestivum L.*) transformation using mature embryos. Meth. in Mol. Biol., 2015, 1223:199–209.

157. Miranda J.A., Avonce N., Suárez R., Thevelein J.M., Dijck P.V., Iturriaga G., A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. Planta, 2007, 226:6, pp. 1411–1421.

158. Mitic N., Nikolic R., Ninkovic S. Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration of *Triticum aestivum* L., Biologia Plantarum, 1998, 48:179-184.

159. Mitic N., Vinterhalter B., Ninkovic S., Dodig D. The procedure providing enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat, Biologia, Cection Botany, 2014, 69/12:1668-1677.

160. Moghaieb R.E., Sharaf A.N., Soliman M.H., El-Arabi N.I., Momtaz O.A. An efcient and reproducible protocol for the production of salt tolerant transgenic wheat plants expressing the *Arabidopsis AtNHX1* gene. GM Crops Food, 2014, 5:132–138.

161. Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated transformation of maize with antisense

suppression of the proline dehydrogenase gene by an In planta method, British Biothechnology Journal, 2014, 4(2): 116-125.

162. Molnar I, Gaspar L, Sarvari E, Dulai S, Hoffmann B, Molnar-Lang M, et al. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes. Funct Plant Biol., 2004; 31: 1149–1159.

163. Mostofa M.G., Hossain M.A., Fujita M. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. Protoplasma. 2015; 252(2):461–75.

164. Mu G, Chang N, Xiang K, Sheng Y, Zhang Z, Pan G Genetic transformation of maize female inflorescence flowering floral dip method mediated by *Agrobacterium*. Biotechnology, 2012, 11:178–183.

165. Mu M., Lu X.K., Wang J.J., Wang D.L., Wang S., Fan W.L., Ye W.W. Genome-wide identification and analysis of the stress-resistance function of the TPS (trehalose-6-phosphate synthase) gene family in cotton, BMC Genet., 2016, 17:1-11.

166. Muller J., Boller T. and Wiemken A. Trehalase and trehalose in plants: recent development, Plant Sci., 1995, 112:1-9.

167. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol.Plant., 1962, 15: 473-497.

168. Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jimbo T., Kimura T. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing ifficiens construction of fusion genes for plant transformation, Biosci. Bioeng, 2007, 104(1):34-41.

169. Niazian M., Sadat Noori S.A., Galuszka P., Mortazavian S.M.M. Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated and *in planta* transformation methods, Czech J. Genet. Plant Breed., 2017, 53:4, pp. 133-143.

170. Nora L.Cz., Westmann C.A., Martins-Santana L., Alves L. de F., Monteiro L.M.O., Guazzaroni M-E., Rocha R.S. The art of vector engineering:towards the construction of next-generation genetic tools. Microbian Biotechnology, 2018, 12(1):125-147.

171. Nuccio M.L., Wu J., Mowers R. Expression of trehalose-6- phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. Nature Biotechnology, 2015, 33:862–869.

172. Nunes C., O'Hara L., Primavesi L.F., Delatte T.L., Schluepmann H., Somsen G.W., Silva A.B., Fevereiro P.S., Wingler A., Paul M.J. The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. Plant Physiology, 2013, 162(3):1720–1732.

173. O`Hara L.E., Paul M.J., Wingler A., How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate, Mol.Plant, 2013, 6(2): 261-274.

174. Oszvald M., Primavesi L.F., Griffiths C., Cohn J., Basu S.S., Nuccio M.L., Paul M.J. Trehalose-6-phosphate regulates photosynthesis and assimilate partitioning in reproductive tissue, Plant Physiol., 2018, 176:2623-2638.

175. Panek A.C., Araujo P.S., Neto M., Panek A.D., Regulation of the trehalose-6-phasphate syntase complax in *Saccharomyces*, Curr. Genet., 1987, 11:459-465.

176. Park J., Throop A.L., LaBaer J. Site-specific recombination cloning using Gateway and in-fusin cloning schemes, Curr. Protoc. Mol. Biol., 2015, 110(1):3.20.1-3.20.23.

177. Patist A. and Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 40: 107–113.

178. Paul M., Gonzalez-Uriarte A., Griffiths C.A., Hassani-Pak K. The role of trehalose-6-phosphate in crop yield and resilience, Plant Physiology, 2018, 177(1):12-23.

179. Paul M.J., Osvald M., Jesus C., Rajulu C., Griffiths C.A. Increasing crop yield and resilience with trehalose6-phosphate:targeting a feast-famine mechanism in cereals for better source-sink optimization, Journal of Experimental Botany, 2017.

180. Paul M.J., Pellny T.K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis development, J. of Experimental Botany, 2003, 54(382):539-547.

181. Paul M.J., Primavesi L.F., Jhureea D., Zhang Y. Trehalose metabolism and signaling, Annu. Rev. Plant. Biol., 2008, 59:417-441.

182. Paul M.J., Watson A., Griffiths C.A. Trehalose-6-phosphate signaling and impact on crop yield, Biochemical Society Transaction, 2020, 48:2127-2137.

183. Pellegrineschi A., Noguera L.M., Skovmand B., Brito R.M., Velazquez L., Salgado M.M., Hernandez R., Warburton M., Hoisington D. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. Genome, 2002, 45(2):421–430.

184. Pellny T.K., Ghannoum O., Conroy J.P., Schluepmann H., Smeeken, S., Andralojc J., Kraus, K.P., Goddijn O., and Paul M.J., Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis, Plant Biotechnol. J., 2004, 2(1):71–82.

185. Pena P.A., Quach T., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Changa T., Dweikat I., Soundararajan M., Clemente T.E. Expression of the maize Dof1 transcription factor in wheat and sorghum, Frontiers in Plant Science, 2017, 8:434.

186. Petitijean M., Teste M.A., Leger-Silvestre I., Francois J.M., Parrou J-L. A new function for the yeast Trehalose-6P-Synthase (*Tps1*) protein, as key pro-survival factor during growth, chronological ageing and apoptotic stress. Mechanisms Ageing Dev. 2017, 161:234-246.

187. Pilon-Smits E.A., Terry N., Sears T. Trehalose - producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress, Plant Physiol., 1998, 152(4/5): 525–532.

188. Pod-in W., Sujipuli K., Ratanasut K. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation, Int. J. of Agricultural Tech., 2014, vol. 10(2):467-474.

189. Przetakiewicz A, Karas A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. *Agrobacterium*-mediated transformation of polyploid cereals. The efficiency of selection and transgene expression in wheat. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9:903–917.

190. Qu Q., Lee S.J., and Boss W. TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis,* J. Biol. Chem., 2004, 279(46): 47890–47897.

191. Ramon M., and Rolland F., Plant development: introducing trehalose metabolism, Trends Plant Sci., 2007, 12(5): 185–188.

192. Razzaq A., Hafiz I.A., Mahmood I., Hussain A. Development of *in planta* transformation protocol for wheat, African Journal of Biotechnology, 2011, 10(5):740-750.

193. Reece-Hoyes J.S., Walhout A.J.M. Gateway recombination cloning, Cold Spring Harb Protoc., 2018, 2(1).

194. Reinders A., Burckert N., Hohmann S., Thevelein J.M., Boller Th., Wiemken A., Virgilio C., Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock, Molecular Microbiol., 1997, 24(4):687-695.

195. Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R, Reignault P. Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry., 2007, 68(8):1156–64. doi: 2007.02.011.

196. Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., and Kurimoto, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies, Food Chem. Toxicol., 2002, 40: 7, pp. 871–898.

197. Richardson T., Thistleton J., Higgins T.J., Howitt C., Ayliffe M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. Plant Cell Tiss Org, 2014, 119:647–659.

198. Risacher T., Craze M., Bowden S., Paul W., Barsby T. Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of wheat via in planta inoculation. Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats, 2009, 478:115-124, doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_7.

199. Rodriguez F.R., Mellor R.B., Arias C., Cabriales P.J.J. The acculation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress, Physiol Plant., 1998, 102: 353-359.

200. Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J, 2000, 23: 131–142.

201. Romero C., Belles J.B., Vaya J.L., Serrano R., Culianez-Macia A. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants:pleiotropic phenotypes include drought tolerance. Planta, 1997, 201:293-297.

202. Rong W., Qi L., Wang A.Y., Ye X.G., Du L.P., Liang H.X., Xin Z.Y., Zhang Z.Y. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tol_erance to salt and drought stresses in wheat. Plant Biotechnol J., 2014, 12:468–479.

203. Rosales-Campos A.L., Gutierrez-Ortega A. *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaf Explants. Bio, 2019, 101: E3150.

204. Ryu S.I., Park C.S., Cha J., Woo E.J., and Lee S.B. A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: molecular cloning and characterization, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 329(2): 429–436.

205. Saavedra R., Segura E., Tenorio E.P., Lopez Marin L.M. Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4(+) and CD8(+) T-cells. Microbes Infect., 2006, 8:2, pp.533-540.

206. Sabetta W., Crosatti C., Soltesz A., Di Rienzo V., Montemurro C. Screening auxin response, in vitro culture aptitude and susceptibility to *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian commercial durum wheat varieties. Molecules, 2016, 21(1440).

207. Saha P., Blumwald E. Spike-dip transformation of *Setaria viridis*, The Plant Journal, 2016, 86(1): 89-101.

208. Sakaguchi M. Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism, Appl. Microbiol. and Bitechnol., 2020, 104:1837-1947.

209. Salas M.G., Park S.H., Stivatanakul M., Smith Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells, Plant Cell Rep., 2001, 20: 701-705.

210. Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F.A., Baenxiger P.S., Borner A. Drought stress tolerance in wheat and barley:advances in physiology, breeding and genetics research, Intr. Journ. of Molecular Sciences, 2019, 20:3137.

211. Sambrook J. Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989, 1-3:1659.

212. Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F. and Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant Biotechnol J., 2018, 16:902-910.

213. Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W. and Singh, N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants, Curr. Genomics, 2011, 12:30–43.

214. Sarker R.H., Biswas A. In vitro plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum L*.). Plant Tissue Cult. Biotechnol., 2002, 12(2):155–165.

215. Satoh-Nagasawa N., Nagasawa N., Malcomber S., Sakai H., and Jackson D. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. Nature, 2006, 441:227–230.

216. Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M. Trehalose production: exploiting novel approaches, Trends Biotechnol., 2002, 20:10, pp. 420-425.

217. Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., and Paul, M., Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilisation and growth in *Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. *A.*, 2003, 100(11):6849–6854.

218. Schuluepman H., Berke L., Sanchez-Perez G.F. Metabolism control over growth:a case for trehalose-6-phosghate in plants, Journal of Experimental Botany, 2012, 63(9):3379-33-90.

219. Seo H.S., Koo Y.J., Lim J.Y., Song J.T., Kim C.H., Kim J-K., Lee J.S., Choi Y.D. Characterization of a bifunctional fusion enzyme between trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 2000, 66:2484-2490.

220. Shafiq S, Akram NA, Ashraf M. Does exogenously-appliedtrehalose alter oxidatve defense system in the edible part of radish (*Raphanus sativus L*.) under water-deficit conditions? Sci Hortic-Amsterdam., 2015, 185:68–75.

221. Shan Q., Wang Y., Chen K., Liang Z., Li J., Zhang Y., Zhang K., Liu J., Voytas D.F., Zheng X., Zhang Y. and Gao C. Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs. Mol Plant, 2013, 6(4):1365-1368.

222. Sharma V., Hansch R., Mendel J. Influence of picliram and tidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with longterm retention of morphogenecity meristematic shoot segments. Plant Breeding, 2005, 124(3):242-246.

223. Sharma V., Hansch R., Mendel J. Node – derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 88(1):242-246.

224. Shaw D.J., Gray J.C. Visualisation of stromules in transgenic wheat expressing a plastid-targeted yellow fluorescent protein, Planta, 2011, 233: 961-970.

225. Shi Y., Sun H., Wang X., Jin W., Chen Q., Yuan Z., Yu H. Physiological and transcriptomic analyses reveal the molecular networks of responses induced by exogenous trehalose in plant, Plos One, 2019, 14(5).

226. Shrawat A. K and Lorz H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4(6):575–603.

227. Shrawat A.K., Armstrong C.L. Development and application of genetic engineering for wheat improvement, Critical Rev. in Plant Sci., 2018, 37: 335-421,

228. Simola, M., Hänninen, A. L., Stranius, S. M., and Makarow, M. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress, Mol. Microbiol., 2000, 37:42-53.

229. Slama I, Ghnaya T, Hessini K, Messedi D, Savoure´ A, Abdelly C. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. Environ Exp Bot., 2007; 61: 10–17.

230. Smedley M., Sparrow P., Harwood W. pBRACT-crop transformation vectors, Aspect of Applied Biology, 2011,110(5):80.

231. Sola-Penna M., and Meyer-Fernandes J.R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars?, Arch. Biochem. Biophys., 1998, 360:1, pp. 10–14.

232. Stiller I., Dulai S., Kondrak M., Tarnai R., Szabo L., Toldi O., Banfalvi Z., Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trahalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Planta, 2008, 227(2):299-308.

233. Suarez R., Calweron C., Iturriaga G. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic Alfalfa zccumulating trehalose, Crop Science, 2009, 49:1791-1799.

234. Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakijima, T., Haramoto, N., Nozue, M., Kojima, M. Development of simple and efficient in Planta transforma_tion method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Biosci. Bioeng., 2006, 102:162–170.

235. Supartana, P., Shimizu, T., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M., Kojima, M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa L.*) using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Biosci. Bioeng., 2005, 100, 391– 397.

236. Taiz L., Zeiger E. Plant physiology, 2003, 3:690.

237. Tao L., Du L., Shi Z., She M., Xu H., Ye X. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by Agrobacterium tumefaciens, Africultural Sciences in China, 2011, 10(3):317-326.

238. Tayeh C, Randoux B, Vincent D, Bourdon N, Reignault P. Exogenous Trehalose Induces Defenses in Wheat Before and During a Biotic Stress Caused by Powdery Mildew., Phytopathology., 2014; 104 (3):293–305.

239. Thevelein J. M., Hohmann S., Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?, Trends Biochem. Sci., 1995, 20:1, pp. 3-10.

240. Thole V., Worland B., Snape J.W., Vain P. The pCLEAN Dual Binary Vector System for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, 2007, 145(4):1211-9.

241. Tianzi C., Shenjie W., Jun Z., Wangzhen G., Tianzhen Z. Pistil drip following pollination: a simple *in planta Agrobacterium*-mediated transformation in cotton. Biotechnol Lett, 2010, 32(4):547–555.

242. Tsugankova V., Shysha E., Andrusevich Y., Galkin A., Lutynska G., Yemets A., Blume Y. Using of new microdibial biostimulants for obtaining in vitro new lines of Triticum aestivum L. cells resistant to nematode *H. avenae*. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 2016, 4(4):39-53.

243. Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., and Kurimoto, M. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1290(1):1–3.

244. Tucker E.J., Baumann U., Kouidri A., Suchecki R., Baes M., Garcia M., Okada T., Dong C., Wu Y., Sandhu A., Singh M., Langridge P., Wolters P., Albertsen M.C., Cigan A.M., Whitford R. Molecular identification of the wheat male fertility gene Ms1 and its prospects for hybrid breeding. Nature Communications, 2017, 8:869.

245. Tuncer T., Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) with antimicrobial pflp gene and analysis of transgenic plants. In: Partial Fulfillment of the Requirements the Degree of Masters of Science in Biotechnology. 2006.P. 110.

246. Usadel B., Blasing O.E., Gibon Y., Restzlaff K., Hohne M., Glunther M., Stitt M. Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during a progressive exhaustion of carbohydrates in arabidopsis rosettes. Plant Physiol., 2008, 146 (4):1834–1861.

247. Van Dijken, A.J.H., Schluepmann, H., and Smeekens, S.C.M. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering, Plant Physiol., 2004, 135(2): 969–977.

248. Vandercammen A., Francois J., Hers H.G., Characterisation of trehalose-6-phasphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem, 1989, 182:613-620.

249. Vasil V.C., Fromm M.E., Vasil I.K. Herbicide resistant fertiletransgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Nat Biotechnol, 1992, 10:667–674.

250. Vogel G., Aeschbacher R.A., Muller J., Boller T., and Wiemken A., Trehalose 6-phosphate phosphatases from Arabidopsis thaliana: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. Plant J., 1998, 13(5), pp. 673–683.

251. Wahl V., Ponnu J., Schlereth A., Arrivault S., Langenecker T., Franke A., Feil R., Lunn J.E., Stitt M., Schmid M. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. Science, 2013, 339:704–707.

252. Wan, Y.; Lemaux, P.G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 1994, 104:37–48.

253. Wang G-P., Yu X-D., Sun Y-W., Jones H.D., Xia L-Q. Generation of marker- and/or Backbone-Free Transgenic wheat plants via *Agrobacterium*-mediated transformation, Frontiers in Plant Science, 2016a, 7:1324.

254. Wang J.J., Cai Q., Qiu L., Ying S-H., Feng M-G. Additive roles of two TPS genes in trehalose synthesis, conidiation, multiple stress responses and host infection of fungal insect pathogen. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2017, 101(9):3637-3651.

255. Wang K., Gong Q., Ye X. Recent development and applications of genetic transformation and genome editing technologies in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 133:1603-1622.

256. Wang M., Zhao X., Xiao Z., Yin X., Xing T., Xia G. A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity, Plant Mol Biol, 2016b, 91:115-130.

257. Wang Y. J., Hao Y. J., Zhang Z. G., Chen T., Zhang J.S., Chen S.Y. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells, J. Plant Physiol, 2004, 162:215-223.

258. Wang Y., Xu M., Yin G., Tao L., Wang D., and Ye X. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues, Cereal Research Communications, 2009, 37:1–12.

259. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nature Biotechnology, 2014, 32, 947-951.

260. Williams B., Njaci I., Moghaddam L., Long H., Dickman M.B., Zhang X., Mundree S. Trehalose accumulation triggers autophagy during Plant Desiccation. PLOS Genetics, 2015, 11(12).

261. Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T., and Aeschbacher R.A., Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol., 2000, 124(1): 105–114.

262. Worning, P., Jensen, L.J., Nelson, K.E., Brunak, S., and Ussery, D.W., Structural analysis of DNA sequence: evidence for lateral gene transfer in *Thermotoga maritime*. Nucleic Acids Res., 2000, 28(3): 706–709.

263. Wu E., Lenderts B., Glassman K., Berezowska-Kaniewska M., Christensen H., Asmus T., Zhen S., Chu U., Cho M-J., Zhao Z-Y. Optimized *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. In Vitro Cell Dev Biol—Plant, 2014, 50:9–18.

264. Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat.. 2003, Plant Cell Rep., 21:659-668.

265. Xia C., Zhang L., Zou C., Gu Y., Duan J., Zhao G., Wu J., Liu Y., Fang X., Gao L., Jiao Y., Sun J., Pan Y., Liu X., Jia J., Kong X. A TRIM insertion in the promoter of Ms2 causes male sterility in wheat. Nature Communications, 2017, 8:15407.

266. Xu K., Huang X., Wu M., Wang Y., Chang Y., Liu K., Zhang J., Zhang Y., Zhang F., Yi L., Li T., Wang R., Tan G., Li C. A rapid, highly efficient and economical method of Agrobacterium-mediated in planta transient transfor_mation in living onion epidermis. PLOS ONE, 2014, 9: e83556.

267. Yadal U.P., Ivakov A., Feil R. The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus:specificity and mechanisms of sucrose signaling be Tre6P, J. Exp. Boi., 2014, 65 (4): 1051-1068.

268. Yasmeen, A., Mirza, B., Inayatullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S. and Choudhry, M. F. In Planta Transformation of Tomato. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27:20-28.

269. Yatsyshyn V.Y., Kvasko A. Yu., Yemets A.I. Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. Cytol. Genet., 2017, 51: 371-383.

270. Ye G.N., Stone D., Pang W., Creely W., Gonzalez K., Hinchee M. Arabidopsis ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. The Plant J., 1999, 19:249-257.

271. Ye X.G., Shirley S., Xu H.J., Du L.P., Clement T. Regular production of transgenic wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Agri Sci China, 2002, 1:239–244.

272. Yellisetty V., Reddy L.A., Mandapaka M. In planta transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) using *TPS1* gene for enhancing tolerance to abiotic stresses. J Genet., 2015, 94(3):425–34.

273. Yeo E.T., Kwon H.B., Han S.E., Lee J.T., Ryu J.C., Byu M.O., Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from Sacharomyces cerevisae, Mol. Cell., 2000, 10(3):263-268.

274. Yin H., Wang Y., He Y., Xing L., Zhang X., Wang Sh., Qi X., Zheng Z., Lu J., Miao J. Cloning and expression analysis of *tps*, and cryopreservation research of trehalose from Antarctic strain *Pseudozyma* sp., Biotech, 2017, 7(5):343.

275. Yu W., Zhao R., Wang L., Li R., Sheng J., Shen L. ABA signaling rather than ABA metabolism is involved in trehalose-induced drought tolerance in tomato plants, 2019, 250:643-655.

276. Zale J.M., Agarwal S., Loar S., Steber C.M. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium* tumefaciens, Plant Cell Rep., 2009, 28(6):903-913.

277. Zeid I.M., Trehalose as osmoprotectant for maize under salinity-induced stress. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2009, 5:5, pp.613-622.

278. Zerback R., Dressler K., Hess D. Flavonoid compounds from pollen and stigma of Petunia hybride: inducerd of the vir region of the *Agrobacterium* tumefaciens Ti plasmid, Plant Science, 1989, 62:83-91.

279. Zhai Z., Keereetaweep J., Liu H., Feil R., Lunn J.E., Shankln J. Trehalose-6-phosphate positively regulates fatty acid synthesis by stabilizing WRINKLED1, The Plant Cell, 2018, 30:2616-2627.

280. Zhang H.F., Xu W.G., Wang H.W., Hu L., Li Y., Qi X.L., Zhang L., Li C.X., Hua X. Pyramiding expression of maize genes encod_ing phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) synergistically improve the photosynthetic characteristics of transgenic wheat. Protoplasma, 2014, 251:1163–1173.

281. Zhang L., Rybczynski J., Langerberg W., Mitra A. & French R. An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration. Plant Cell Rep., 2000, 19: 241–250.

282. Zhang S., Wang H., Luo J., Yu W, Xiao Y., Peng F. Peach PpSnRK1α interacts with bZIP and maintains trehalose balance in plants, Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 160: 377-385.

283. Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. BMC Plant Biol, 2018, 18: 302.

284. Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J-L., Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/ Cas9 DNA or RNA., Nat Commun, 2016, 7:12617.

285. Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K., Yang B., Li W. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genom editing, 2020, 17(8):1623-1635.

286. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., Chua, N.H., 2006. Agrobacterium mediated transformation of *Arabidopis thaliana* using the floral dip method. Nat. Prot. 1, 641–646.

287. Zhao B., Wu T.T., Ma S.S., Jiang D.J., Bie X.M., Sui N., Zhang X.S., Wang F. TaD27-B gene controls the tiller number in hexaploid wheat, Plant Biotechnology Journal, 2020, 18:513-525.

288. Zhao T-J., Zhao S-Y., Chen H-M., Zhao Q-Z., Hu Z-M., Hou B-K., Xia G-M. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculums to the basal portion of wheat seedling, Plant Cell Rep, 2006, 25:1199-1204,

289. Zhao X.Y.. Hong P., Wu J.Y., Chen X.B., Ye X. G., Pan Y.Y., Wang J., Zhang X.S. The tae-miR408-Mediated control of TaTOC1 genes transcription is required for the regulation of heading time in wheat, Plant Physiol., 2016., 170:1578-1594.

290. Zhong H., Elumalai S., Nalapalli S., Richbourg L., Prairie A., Bradley D., Dong S., Su X.J., Gu W., Strebe T., Que Q. Advanced in *Agrobacterium*-mediated maize transformation. Methods in Molecular Biology, 2018, 1676:41-59.

Додаток А

Модифікації шляхів біосинтезу трегалози рослин біотехнологічними методами.

Організм-донор гена	Ген/промотор	Штами Agrobacterium/Вектори	Рослина-реціпієнт	Фенотип/Якісні ознаки	Літературні джерела
E.coli	*otsA, otsB* / CaMV35S	EHA105/pRK2013	*N. tabacum*	Низький вміст трегалози	Goddijn et al. (1997)
E.coli	*otsA, otsB* / CaMV35S	EHA105/pRK2013	*S. tuberosum*	Без фенотипових змін	Goddijn et al.(1997)
E.coli	*otsA, otsB* / CaMV35S		*N. tabacum*	Збільшені листя, коротші пагони, покращений ріст під час посухи.	Pilon-Smith et al. (1998)
E.coli	*otsA, otsB* / ABRC1 actin, rbcS	LBA4404/pSB11	*O. sativa*	Підвищення вмісту трегалози, нижча фотоокислювальна чутливість, стійкість до осмотичних стресів.	Garg et al. (2002)
E.coli	*otsA, otsB* /Ubi1	pSB	*O. sativa*	Підвищений вміст трегалози, відсутність дефектів росту, посухостійкість, стійкість до засолення, низьких температур.	Jang et al. (2003)

E.coli	*otsA, otsB* / CaMV35S	- / pVDH321	*N. tabacum*	Вплив на фотосинтетичні процеси	Pelny et al.(2004)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS*/Robisco, small subunit		*N. tabacum*	Підвищення вмісту трегалози, менша втрата води внаслідок зменшеної листової поверхні.	Holmstorm et al. (1996)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1*/CaMV35S		*N. tabacum*	Підвищений вміст трегалози, аномалії розвитку: затримка росту, ланцетоподібні листя. Посухостійкість.	Lastdrager et al.(2014)
Saccharomyces cerevisiae	*ScTPS1*/CaMV35S	LBA4404/pBI121	*S. tuberosum*	Карликовість. Посухостійкість.	Yeo et al. (1999)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1*/16SrRNA	LBA / pHGTPS1	*N. tabacum*	Без фенотипових змін. Посухостійкість.	Lee et al.(2003)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1*/CaMV35S	LBA4404/pMB14, pBin19,pC2	*S. lycopersicum*	Підвищений вміст трегалози. Фенотипові аномалії: карликовість, ланцентовидне темно-зелене листя. Посухостійкість, солестійкість.	Romero et al.(1997)

Saccharomyces cerevisiae	*TPS1,TPS2*/Rubisco, AtRAB18	C58C1RifR / pKOH200	*N. tabacum*	Без фенотипових змін.Посухостійкість.	Karim et al. (2007)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1,TPS2*/Rubisco AtRAB18	C58C1RifR / pSCTP003, pSC952, pKOH200	*A.thaliana*	Без фенотипових змін.Посухостійкість.	Karim et al. (2007)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1,TPS2*/rd39A, CaMV35S	C58C1/pGV2260	*A.thaliana*	Посухо-,соле-,морозостійкість. Фенотипові зміни: зменшена площа листової поверхні, часткова стерильність.	Miranda et al. (2007)
A.thaliana	*TPS1*/CaMV35S	Bombardment/pGreen0229	*N. tabacum*	Стійкість до осмотичних стресів. Зменшена висота рослин.	Almeida et al. (2007)
Medicago sativa	*TRE(AS*)/ rd39A, CaMV35S	LBA4404 / pTPSMGW	*N. tabacum*	Глюкозо-нечутливий фенотип, проростки зростали на глюкозі	Leyman et al. (2006)
Medicago sativa	*TRE(AS)/* rd39A, CaMV35S	C58C1 / pTPSMGW	*A.thaliana*	-	Leyman et al. (2006)
Pleuratus sajor-caju	*TP*(phosphorylase)/CaM 35S	-	*N. tabacum*	Зменшена трегалазна активність	Sah et al.(2005)

Orysa sativa	*OsTPS1*/CaMV35S	AGL0/pH2GW7	*O. sativa*	Без фенотипових змін. Посухо-, соле-,холостій кість.	Li et al.(2011)
Mediago sativa	*TRE (AS)*/CaMV35S, rd29A	pBI121	*N. tabacum*	Зниження трегалазної активності у трансгенних ліній	Gomez-Escobedo et al. (2004)
Pleurotus sator-caju	*TP*/CaMV35S	LBA4404/pBI121	*N. tabacum*	Високий вміст трегалози; без морфологічних відхилень; стійкість до дефіциту води	Han et al. (2005)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS1*/CaMV35S	LBA4404/ pC2	*Lycopersicon esculentum*	Високий вміст трегалози; лантетоподібне листя; стійкість до осмотичних стресів (посуха, засолення, холод)	Cortina and Cullianez-Macia (2005)
O.sativa	*TPP*/pOsMads6	pNOV6901	*Zea maize*	Підвищення врожайності. Посухостійкість.	Nuccio et al. (2015)
Saccharomyces cerevisiae	*TPS-P*/CaMV35S, rd29A	LBA4404/pBin19	*Medicago sativa L.*	Посухостійкість, холодостійкість, солестійкість. Збільшення біомаси.	Suares e al. (2009)

Додаток Б

Створені лінії пшениці *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією в культурі *in vitro*

Генотип	**Експлант**	**Цільовий ген/Промотор**	**Селективні маркерні гени/Промотор**	**Штам *Agrobacterium*/ Вектори**	**Фенотип/якісні ознаки/Ефективність трансформації**	**Літературні джерела**
Kenong 199	Незрілі зародки	35S:TaD27-B	-	GV3101 / pROKII	Біосинтез стриголактонів/регуляція кущіння	Zhao et al. (2020)
Fielder	Незрілі зародки	RUbipro:GUS2	hpt	AGL/pAL155	Розробка ефективного проколу трансформації (25%)	Hayta et al. (2019)
Fielder	Незрілі зародки	Ubi: TaWRKY2	35S:bar	GV3101 / pCAMBIA1391	Посухостійкість/підвищений вміст вільного проліну, розчинних цукрів, хлорофілу/збільшення довжини колосу, кількості зерен в колосі, біомаси	Gao et al. (2018)
Kenong199, CB037	Незрілі зародки	Ubi: TaWRKY51	35S:bar	GV3101 / pCAMBIA1300	Біосинтез етилену/формування бічних (латеральних) коренів	Hu et al. (2018)
Fielder	Незрілі зародки	1Dx5: Gm8gGCHI; 1Dx5: LeADCS	35S: bar	EHA105 / pWMB122, pCAMBIA3301	Підвищення синтезу фолієвої кислоти	Liang et al. (2019)
CB037	Незрілі зародки	Ubi: ZmDof1; rbcS1:ZmDof1	35S:nptII	C58C1 / pMP90; NTL4 / pKPSF2	Підвищення ефективності акумуляції азоту	Pena et al. (2017)

Fielder, 15 Chinese varieties	Незрілі зародки	Ubi: gus	35S: bar	C58C1 / pWBM123	Створення ліній рослин вільних від маркерних генів (2,7-37,7%)	Wang et al. (2017)
Fielder	Незрілі зародки	Ma-TRIM:Ms2	35S: bar	pLC-Z2 / EHA105	Отримання стерильних жіночих квіток для покращення гібридизації	Xia et al. (2017)
Fielder	Незрілі зародки	Ubi: TaMs1	Ubi:bar	TILLING / LBA4404 / pMBC32	Отримання стерильних жіночих квіток для покращення гібридизації	Tucker et al. (2017)
Lunxuan987	Незрілі зародки	Ubi: TaTOC, ubi: tae-MIR408	35S: nptII	GV3101 / tae-miR408	Регуляція цвітіння, висота рослин	Zhao et al. (2016)
Yangmai16	Зрілі зародки	Ubi: TaSOD2	-	pMD18-T	Підвищення активності СОД (супероксид дисмутази)/ підвищення стійкості до осмотичних стресів	Wang et al. (2016)
Bobwhite	Незрілі зародки	Ubi: FcGls1, FcFmk1, FcChsV	-	AGL-1 / pIKTA26	Стійкість до патогенів роду *Fusarium*	Chen et al. (2016)
Fielder	Незрілі зародки	-	35S: bar; 35S: hyg	GV3101 / pMP90	Стійкість до стеблової іржі	Mago et al. (2015)
Gemmeiza9	Зрілі зародки	35S: AtNHX1	Nos: nptII	LBA4404/pBI-121	Солестійкість (6,9-8,7%)	Moghaieb et

, Gemmeiza10						al. (2014)
Yumai34	Базальна частина пагона	Glu: TaLSU 1	CaMV35S: hpt	pWM101	Підвищення вмісту крохмалю та маси зерна	Kang et al. (2013)
Bobwhite	Незрілі зародки	AMTP: BLF	CaMV35S: hpt	C58C1 / pAM4424	Стійкість до *Fusarium graminearum*	Han et al. (2012)
Kontesa, Torka	Незрілі зародки		Ubi:bar		0,2-1,4%	Gasparis et al. (2011)
NB 1	Зрілі зародки	Actin1/GBSSI-EYFP	Sc4: NPTII	EHA105 / pJOD14-SCV, pGBSSTP-EYFP	Дослідження функціонування стромів у однодольних	Shaw and Gray (2011)
Vesna	Незрілі зародки	uidA	Hpt, nptII	LBA / pTOK233	Дослідження впливу генотипу на ефективність трансформації (3,6-10,8%)	Mitic et al. (2014)
Sehar - 2006	Незрілі зародки	gusA	nptII	AGL1 / pCAMBIA2301	Дослідження співвідношень ауксинів/цитокінів на регенерацію різних генотипів пшениці, підбір протоколу трансформації (2,5%)	Habib et al. (2014)
Bobwhite,	Незрілі зародки	uidA	Bar, hpt	EHA101, EHA105 /	Підвищення частоти та	Ishida et al.

Fielder				pLC41bar, pLC41Hm	ефективності трансформації, оптимізація протоколу трансформації (50-60%)	(2015)
Bobwhite SH9826	Незрілі зародки	Ubi:sGfp (S65T)	35S:hpt	AGL1 / pGH215	Підвищення частоти та ефективності трансформації (5-15%)	Hensel et al. (2017)
16 genotypes	Незрілі зародки	Ubi: GUS	35S:nptII	C58C1 / pPTN290	Дослідження регенераційного потенціалу генотипів пшениці, підбір протоколу трансформації	Tao et al. (2011)
Bobwhite S 56	Зрілі зародки	Ubi:GUS-eGFP fusion	hpt	AGL1/pBract600, pBract204	Дослідження різних генотипів для трансформації агробактерією (2,2%)	Medvecka and Harwood (2015)

Додаток В

Створені лінії пшениці з використанням методів *in planta* трансформації

Генотип	Спосіб трансформації	Цільовий ген/Промотор	Селективні маркерні гени/Промотор	Штам *Agrobacterium*/ Вектори	Фенотип/якісні ознаки/Ефективність трансформації	Літературні джерела
Shirane komugi	Апікальні меристеми пагона / мікроін'єкції	GUS	nptII, hpt	M-21, LBA4404 / pIG121-Hm, pBI121	Дослідження нового методу трансформації inplanta (33,0-75%)	Supartana et al. (2006)
Yan361, Yan2801, H11	Апікальні меристеми пагона / мікроін'єкції	CaMV35S: Glu β-1,3 glucanase gene	NosPro: nptII	EHA105 / pBLG	Підвищена стійкість до борошнистої роси (9,8%)	Zhao et al. (2006)
Crocus, Chinese Spring	Floral dip	Anthocyanin reporter	Nos:nptII	AGL1, C58C1/ pBECKSred, pCAMBIA2200	Дослідження нового методу трансформації пшениці зануренням колосу в суспензію агробактерії (0,3-0,6%)	Agarwal et al. (2009)
Crocus	Floral dip	Anthocyanin reporter - CaMV35S:Lc, CaMV35S:Cl	Nos:nptII	AGL1, C58C1/ pDs(Hyg)35S, pBERKSred	Дослідження нового методу трансформації пшениці зануренням колосу в суспензію агробактерії	Zale et al. (2009)
NB1	Незрілі зародки/мікроін'єкції	Act: GUS	Sc4:nptII	EHA105 / pSCV	Впровадження нового методу трансформації inplanta (патент WO00/63398 (1-30%)	Risacher et al. (2009)
Karim-durum	Апількані меристеми пагона/мікроін'єкції	Act1: AlSAP	Marker free	EHA105 / pC0390-PrAct1	Посухо-/солестійкість	Ben-Saad et al. (2011)
GA-2002	Апікальні меристеми пагонів / зараження агробактерією через поранення	CaMV35S:uidA, GUS	CaMV35S:nptII	LBA4404/ pBI121	Дослідження нового методу трансформації inplanta (27%)	Razzad et al. (2011)
Fielder, Haruyokoi	Апікальні меристеми пагона/бомбардування мікрочастинками	Ubi: gfp	-	-	Оптимізація методу трансформації без культури тканин, стадії регенерації та селекції на антибіотику (0,8-4,2%)	Hamada et al. (2017)

Додаток Г
Список публікацій за темою дисертації

1. Yatsyhyn V. Yu., **KvaskoA. 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., Краснопьорова 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. **KvaskoA. Yu**., IsayenkovS. V., DmytrukK. V., SibirnyA. 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 ІІІ 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 доповідейXIII 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 (*Triticum aestivumL*.) 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 доповідейXVIII 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., YemetsA.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.