

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.06.092>

УДК 57.085.2:577.21

**А.Ю. Кваско¹, С.В. Ісаєнков¹,
К.В. Дмитрук², А.І. Ємець¹**

¹ ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

² Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: kvasko.anna@ukr.net

Створення рослин пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2*

Представлено членом-кореспондентом НАН України А. І. Ємець

Введено в культуру *in vitro* рослини кількох сортів пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) і досліджено їх регенераційну здатність. Відібрано сорти Миронівська 67 і Мірхад з метою перенесення в геном дріжджових (*Saccharomyces cerevisiae*) генів біосинтезу трегалози (*TPS1* і *TPS2*) задля підвищення їх посухостійкості. Перенесення генів здійснювали за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, для цього було створено відповідні векторні конструкції *pBract214-TPS1* і *pBract214-TPS2* із застосуванням технології Gateway-клонування. Як експланти для трансформації використовували незрілі зародки пшениці. В експериментах було використано штами *A. tumefaciens* GV3101, які несли окремо конструкції *pBract214-TPS1* і *pBract214-TPS2* з цільовими генами *TPS1* та *TPS2* відповідно, що знаходились під контролем промотору убіхітину кукурудзи *PUBi*, і селективним маркерним геном гігроміцин-фосфотрансферази (*hpt*). Селекцію трансгенних ліній здійснювали на поживних середовищах у присутності гігроміцину. Трансгенну природу отриманих ліній підтверджували за допомогою ПЛР-методу з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* та *TPS2*.

Ключові слова: трегалоза, дріжджові гени *TPS1*, *TPS2*, генетична трансформація, *Triticum aestivum*.

На сьогодні внаслідок глобальних кліматичних змін надзвичайно актуальним питанням є створення посухостійких ліній рослин, зокрема зернових культур, серед яких один з найголовніших злаків — пшениця (*Triticum aestivum* L.). З метою набуття ознак толерантності та стійкості до різних стресових чинників у пшениці вже понад 20 років крім традиційних методів селекції використовують біотехнологічні підходи, серед яких метод перенесення цільових генів за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [1].

Відомо, що вплив екстремальних температур спричиняє складні фізіологічні та біохімічні реакції в рослинах, у тому числі активацію або репресію багатьох транскриптів, синтез

Цитування: Кваско А.Ю., Ісаєнков С.В., Дмитрук К.В., Ємець А.І. Створення рослин пшениці з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2*. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2020. № 6. С. 92—100. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.06.092>

білків, змінюючи вміст цукрів, ліпідів і вторинних метаболітів, а також модифікацію складу та структури мембран [2, 3]. Шляхом транскриптомного і метаболомного аналізу рослин, що піддавалися холодовому і тепловому стресам, виявлено зміни в експресії генів трегалозофосфатсинтази (*TPS*) і трегалозофосфатфосфатази (*TPP*) та визначено трегалозу як речовину, яка може взаємодіяти з іншими речовинами у разі індукції термотолерантності [4].

Трегалоза є дисахаридом глюкози і синтезується в клітинах усіх живих організмів, а в дріжджах (*Saccharomyces cerevisiae*) і в рослинах такий синтез включає два шляхи: синтез трегалозо-6-фосфату, що каталізується ферментом трегалозо-6-фосфатсинтазою під контролем гена *TPS1*, та його дефосфорильовання з утворенням трегалози (реакція каталізується ферментом трегалозо-6-фосфатфосфатазою під контролем гена *TPS2*) [5, 6]. За даними багатьох джерел, внаслідок декількох спеціальних механізмів захисту рослинної клітини в умовах осмотичних стресів, трегалозу розглядають як один з головних стресопротекторів у клітині [7, 8].

Саме тому метою даного дослідження було створення генетичних векторних конструкцій з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* і *TPS2* та отримання за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ліній рослин м'якої пшениці з надекспресією генів *TPS1* та *TPS2*, що підвищило б їх стійкість до екстремальних температур і посухи.

Матеріали та методи. За допомогою технології Gateway-клонування [9] було створено генетичні векторні конструкції pBract214-TPS1 і pBract214-TPS2, що несуть дріжджові (*S. cerevisiae*) гени біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2* відповідно, під контролем промотору гена *Ubi* — убіхітину кукурудзи (*PUBi*) та з селективним маркерним геном *hpt* (ген гігromіцин-фосфотрансферази) під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (*P35S*), що забезпечує стійкість до гігromіцину (рис. 1). Створені конструкції були перенесені в клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 для подальшого використання в генетичній трансформації пшениці.

З метою відбору сортів, що характеризуються найбільшим показником частоти утворення морфогенного калюсу і регенерації рослин, і їх подальшого ефективного використання для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було введено в культуру *in vitro* сім сортів пшениці м'якої української селекції: Вихованка, Зимоярка, Миронівська 67,

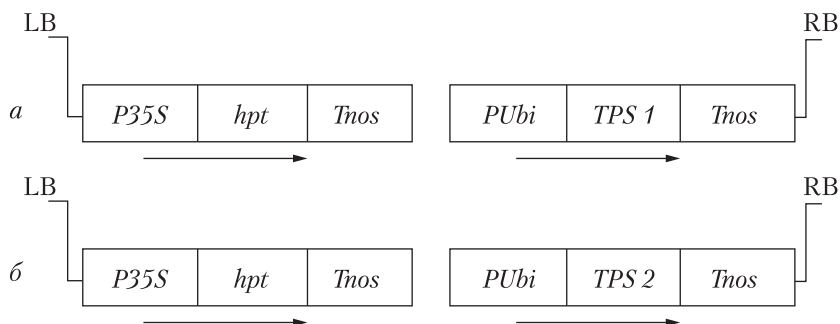


Рис. 1. Схема бінарних векторів, використаних для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці: *a* — конструкція pBract214-TPS1; *б* — конструкція pBract214-TPS2. LB та RB — ліва і права межі Т-ДНК; *TPS1* — цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат синтетази; *TPS2* — цільовий ген синтезу трегалозо-6-фосфат фосфатази; *P35S* — промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *PUBi* — промотор убіхітину кукурудзи; *Tnos* — термінатор нопалінсинтази; *hpt* — селективний ген гігromіцин-фосфотрансферази

Щедрість, Журавка Одеська, Кесарія Поліська та Мірхад. Як експланти для цих експериментів використовували незрілі зародки пшениці [10].

Зібрані на 12–16-ту добу після запилення незрілі зернівки пшениці стерилізували таким чином: обробка 70 %-м етанолом — 30 с, гіпохлоритом натрію (NaOCl) — 12 хв, триразове промивання стерильною дистильованою водою. Виділені стерильно зародки розміром 1–1,5 мм розміщували щитком догори у чашки Петрі на середовище МС [11], доповнене 2,4-Д (2 мг/л) та мальтозою (30 г/л), і культивували протягом 4–5 діб для індукції калусогенезу при 24 °С та 16-годинному добовому фотоперіоді. Частоту утворення первинного калусу оцінювали на 4–5-ту добу культивування експлантів на зазначеному середовищі як співвідношення кількості експлантів, на яких утворився первинний калус, до їх загальної кількості, взятих в експерименті, помножене на 100 %. Через 14 діб культивування експлантів визначали частоту утворення морфогенного калусу на їх поверхні як співвідношення експлантів, на яких утворювався калус із щільними, глобулярними, зеленими структурами, до загального числа експлантів, використаних у експерименті, помножене на 100 %. Після перенесення експлантів на середовище МС, доповнене 1 мг/л бензиламінопурина (БАП) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК), через два–три тижні спостерігалася регенерація пагонів і коренів з морфогенного калусу, що утворився на їх поверхні. Частоту регенерації пагонів оцінювали як співвідношення кількості живих, зелених експлантів з пагонами, які утворилися на їх поверхні, до загальної кількості експлантів, помножене на 100 %.

Для агробактеріальної трансформації нічну культуру агробактерії, яка містила окремо конструкції pBract214-TPS1 і pBract214-TPS2, 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 $\text{OD}_{660} = 0,3 \div 0,4$ бактеріальну суспензію осаджували шляхом центрифугування (5 тис. об./хв), а осад ресуспендували в рідкому середовищі МС з додаванням 200 мМ ацетосирингону. Експланти пшениці сортів Миронівська 67 та Мірхад, які характеризувалися найвищими показниками регенерації, обробляли бактерією протягом 30 хв, просушували на фільтрувальному папері і переносили на середовище МС аналогічного складу, однак без антибіотиків для кокультивування з агробактерією протягом двох діб. Після цього експланти переносили на модифіковане середовище МС для подальшої регенерації пагонів, доповнене БАП (1 мг/л), НОК (0,1 мг/л), глюкозою (10 г/л), сахарозою (10 г/л), а також цефотаксимом (500 мг/л) для елімінації агробактерії та гігromіцином (30 мг/л) для селекції трансгенних рослин пшениці. Регеновані пагони укорінювали на безгормональному середовищі МС, що містило половинний набір макросолей, 10 г/л глюкози, а також 400 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л гігromіцину. Укорінені трансгенні рослини пшениці переносили в ґрунт для їх подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

Трансгенну природу відселектованих ліній пшениці підтверджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів до цільових генів *TPS1* та *TPS2*. Для цього з листя пшениці відібраних ліній виділяли тотальну ДНК за допомогою ЦТАБ-методу [12]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 50 нг ДНК, по 1 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ суміші dNTP, 2,5 мкл Taq-полімерази ("Fermentas", Литва). Ампліфікацію фрагментів проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems", США). Продукти ампліфікації розділяли за до-

помогою електрофорезу в 1 %-му агарозному гелі в 1хТБ буфері в присутності етидію броміду. Для визначення довжини ампліфікованих фрагментів використовували маркер молекулярної маси (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; “Fermentas”, Литва).

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

Результати та їх обговорення. Як вже зазначалося вище, для перенесення дріжджових генів трегалози в рослини пшениці за допомогою Gateway-технології нами створено відповідні векторні конструкції для *Agrobacterium*-опосередкової трансформації злаків, в яких гени *TPS1* та *TPS2* знаходились під контролем конститутивного промотору гена убіхітину кукурудзи *Ubi* (див. рис. 1).

Для підвищення ефективності отримання трансгенних рослин нами спочатку було введено в культуру *in vitro* сім сортів пшениці з метою відбору тих, які б характеризувалися найвищими показниками морфогенетичного потенціалу, а саме здатністю до ефективної регенерації рослин *in vitro*. Отже, нами було оцінено здатність до ефективного формування ембріогенного калюсу і регенерації рослин семи сортів пшениці м'якої (*T. aestivum*). Як експланти використовували незрілі зародки (таблиця, рис. 2).

Найвищі показники утворення морфогенного калюсу зафіксовано для сортів Миронівська 67 та Мірхад ($68 \pm 2,34$ та $67,8 \pm 1,56$ відповідно), хоча для сортів Зимоярка та Кесарія Поліська ці значення також були досить високими. Також для цих сортів була характерна найвища частота регенерації пагонів ($47 \pm 2,15$ та $43,9 \pm 0,76$ відповідно), тоді як найнижчий показник відмічено у сорту Щедрість ($24 \pm 1,75$). Оскільки сорти Миронівська 67 та Мірхад мали найвищі показники регенерації рослин у культурі *in vitro*, у подальшому саме їх використовували для генетичної трансформації генами *TPS1* та *TPS2*.

Селекцію трансгенних ліній проводили на середовищі, яке містило 30 мг/л гігromіцину. На 14-ту добу після генетичної трансформації для сортів Миронівська 67 та Мірхад визначали частоту регенерації пагонів в умовах селективного тиску за умов культивування на середовищі МС з додаванням БАП та НОК і антибіотиків (див. рис. 2). У разі трансформації конструкцією pBract214-TPS1 частота регенерації для сортів Миронівська 67 і Мірхад становила $37,6 \pm 1,15$ % та $35 \pm 1,76$ % відповідно, у варіанті трансформації конструкцією

Оцінка морфогенетичних показників сортів пшениці м'якої в умовах культивування *in vitro* експлантів незрілих зародків ($P \leq 0,05$)

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

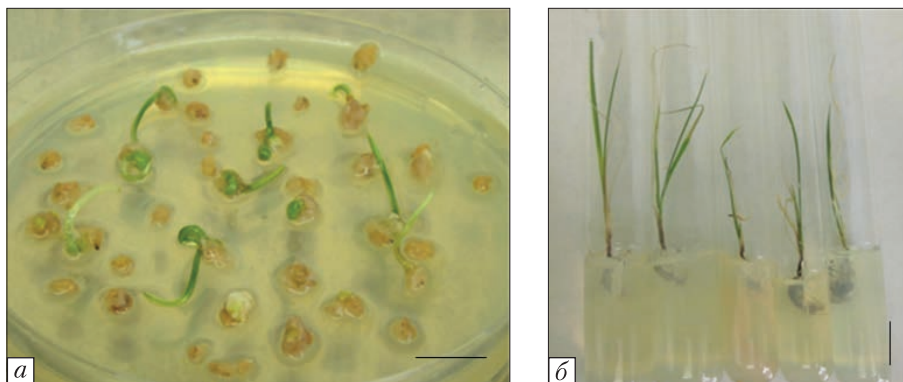


Рис. 2. Результати селекції трансгенних ліній сортів пшениці Миронівська 67 і Мірхад після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в присутності 30 мг/л гігromіцину: *a* — регенерація рослин пшениці сорту Миронівська 67 на 14-ту добу культивування після трансформації; *б* — вкорінення рослин сорту Мірхад на 30-ту—40-ву добу на середовищі для ризогенезу. Масштабна лінія — 1 см

pBract214-TPS2 — $48 \pm 2,69$ % та $40 \pm 1,25$ % відповідно. Після 30—40 діб культивування і двох пасажів на селективне середовище частота регенерації в умовах селективного тиску знижувалася для обох сортів. Загалом вдалося вкорінити шість рослин сорту Миронівська 67 і 12 рослин сорту Мірхад (див. рис. 2).

Оскільки нами раніше було створено відповідні конструкції з дріжджовими генами біосинтезу трегалози і за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації успішно перенесено цільові гени *TPS1* та *TPS2* в модельну рослину — тютюн [13], важливим завданням було здійснити ефективне перенесення даних генів у геном рослин пшениці. Для цього, як зазначено вище, було створено інші конструкції, в яких гени *TPS1* і *TPS2* розташовані під контролем конститутивного промотору гена убіхітину кукурудзи (*Ubi*), який найчастіше використовують для трансформації однодольних. Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин пшениці проведено молекулярно-генетичний аналіз. У результаті ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів до генів *TPS1* і *TPS2* отримано фрагменти розміром 640 та 758 п.н., що відповідають позитивному контролю (рис. 3).

Отже, у результаті досліджень нами отримано векторні конструкції pBract214-TPS1 і pBract214-TPS2 з дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* (ген трегалозо-6-фосфат-синтетази) та *TPS2* (ген трегалозо-6-фосфат фосфатази) для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації злакових культур. Проведено експерименти з введення в культуру *in vitro* семи сортів пшениці м'якої української селекції з використанням незрілих зародків як експлантів. Серед досліджених сортів вибрано сорти Миронівська 67 і Мірхад за показниками частоти утворення морфогенного калюсу та частоти регенерації рослин, які були найвищими, для подальшого їх використання в *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. Вперше здійснено успішне перенесення генів *TPS1* та *TPS2* в рослини пшениці. Інтеграцію цільових генів у геном відібраних рослин пшениці підтверджено за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів до цільових генів.

Слід зазначити, що на сьогодні відомо лише про успішну трансформацію такої однодольної рослини, як рис (*Oryza sativa*), генами біосинтезу трегалози з *E. coli otsA* та *otsB* [14], і створення рослин з надекспресією гена *OsTPS1* з *O. sativa* [15]. У наших попередніх дос-

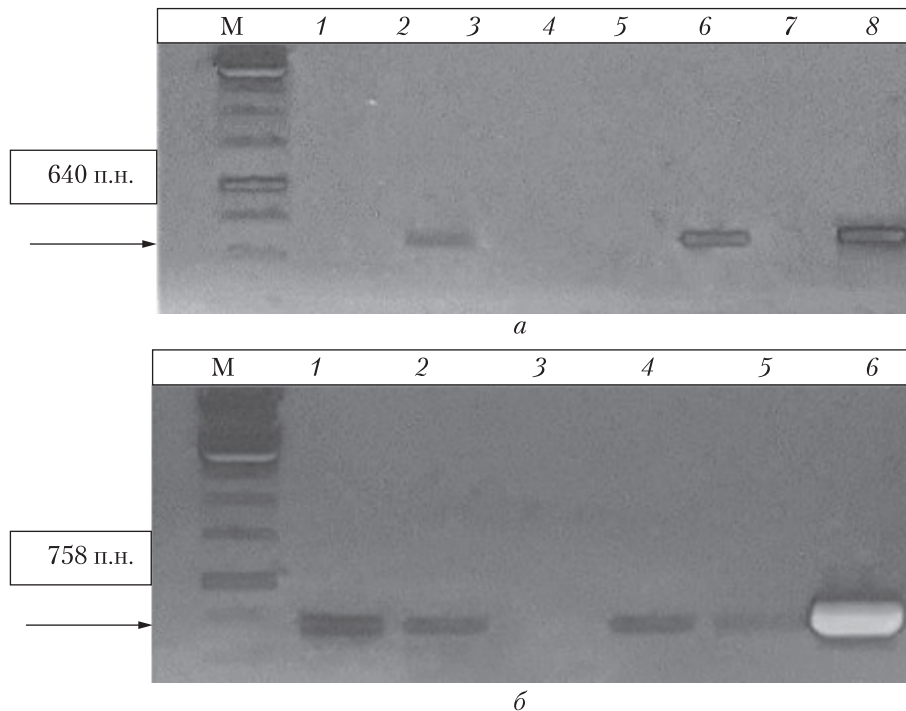


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації зразків ДНК пшениці після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації конструкціями рBract214-TPS1 і рBract214-TPS2: *a* – з використанням специфічних праймерів до гена *TPS1*: М – маркер молекулярної маси (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; “Fermentas”), 1, 3, 4, 5, 7 – ДНК нетрансгенних (контрольних) ліній пшениці, 2, 6 – ДНК ліній пшениці, що містили ген *TPS1* після трансформації конструкцією рBract214-TPS1, 8 – позитивний контроль (конструкція рBract214-TPS1, розмір амплікону 640 п.н.); *б* – з використанням специфічних праймерів до гена *TPS2*: М – маркер молекулярної маси (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use; “Fermentas”), 3 – ДНК зразка нетрансформованої (контрольної) лінії пшениці, 1, 2, 4, 5 – ДНК ліній пшениці, що містили ген *TPS2* після трансформації конструкцією рBract214-TPS2, 6 – позитивний контроль (конструкція рBract214-TPS2, розмір амплікону 758 п.н.)

лідженнях з використанням створених нами конструкцій з генами біосинтезу трегалози рGWB2-TPS1 і рGWB2-TPS2 було отримано трансгенні лінії тютюну [13], проте такі рослини відрізнялися за формою листя та затримкою коренеутворення порівняно з контролем. У даному дослідженні відібрані в результаті селекції лінії пшениці з генами *TPS1* і *TPS2* істотно не відрізнялися від контрольних рослин. Тому метою подальших досліджень буде перевірка створених ліній на посухостійкість, а також порівняння вмісту трегалози в трансгенних і контрольних рослин пшениці.

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

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Manfroi E., Yamazaki-Lau E., Grando M.F., Roesler E.A. Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. *Gen. Mol. Biol.* 2015. **38**. P. 470–476. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150026>
2. Sanghera G.S., Wani S.H., Hussain W., Singh N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr. Genomics*. 2011. **12**. P. 30–43. <https://doi.org/10.2174/138920211794520178>
3. Yatsyshyn V.Yu., Kvasco A.Yu., Yemets A.I. Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol. Genet.* 2017. **51**, № 5. P. 371–383. <https://doi.org/10.3103/S0095452717050127>
4. Usadel B., Blasing O.E., Gibon Y., Retzlaff K., Höhne M., Günther 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**. P. 1834–1861. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115592>
5. Vicente R.L., Spina L., Gomes J.P.L., Dejean J., Parrou J.-L., Francois J.M. Trehalose-6-phosphate promotes fermentation and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell.* 2018. **5**, № 10. P. 444–459. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.651>
6. Tang B., Wang S., Wang S.-C., Wang H.-J., Zhang J.-Y., Cui S.-Y. Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. *Front. Physiol.* 2018. **9**. Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00030>
7. İlhan S., Özdemir F., Bor M. Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant Biol. (Stuttg.)*. 2015. **17**, № 2. P. 402–407. <https://doi.org/10.1111/plb.12227>
8. Lawlor D.W., Paul M.J. Source/sink interaction underpin crop yield: the case for trehalose-6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Front. Plant Sci.* 2014. **5**. Art. 418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00418>
9. Karimi M., Inze D., Depicher A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002. **7**. P. 193–195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
10. Hensel G., Marthe C., Kumlehn J. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos. *Wheat biotechnology: methods and protocols*. New York: Humana Press, 2017. P. 129–139. (Methods in Molecular Biology; Vol. 1679). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_8
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. **15**. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
12. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley, 1987. P. 431–433. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
13. Кваско А.Ю., Ісаєнков С.В., Краснопоорова О.Є., Дмитрук К.В., Ємець А.І. Генетична трансформація *Nicotiana tabacum* дріжджовими генами біосинтезу трегалози *TPS1* та *TPS2*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2019. **17**, № 2. С. 150–158. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.2.1215>
14. Jang I.C., Oh S.J., Seo J.S., Choi W.B., Song S.I., Kim C.H., Kim Y.S., Seo H.S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.K. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 2003. **131**, № 2. P. 516–524. <https://doi.org/10.1104/pp.007237>
15. Li H.-W., Zang B.-S., Deng X.-W., Wang X.-P. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*. 2011. **234**, № 5. P. 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1458-0>

Надійшло до редакції 18.02.2020

REFERENCES

1. Manfroi, E., Yamazaki-Lau, E., Grando, M. F. & Roesler, E. A. (2015). Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. *Gen. Mol. Biol.*, 38, pp. 470-476. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150026>
2. Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W. & Singh, N. B. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr. Genomics*, 12, pp. 30-43. <https://doi.org/10.2174/138920211794520178>
3. Yatsyshyn, V. Yu., Kvasco, A. Yu. & Yemets, A. I. (2017). Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol. Genet.*, 51, No. 5, pp. 371-383. <https://doi.org/10.3103/S0095452717050127>

4. Usadel, B., Blasing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M. & Stitt, M. (2008). Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during a progressive exhaustion of carbohydrates in arabidopsis rosettes. *Plant Physiol.*, 146, pp. 1834-1861. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115592>
5. Vicente, R. L., Spina, L., Gomes, J. P. L., Dejean, J., Parrou, J.-L. & Francois, J. M. (2018). Trehalose-6-phosphate promotes fermentation and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell.*, 5, No. 10, pp. 444-459, <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.651>
6. Tang, B., Wang, S., Wang, S.-C., Wang, H.-J., Zhang, J.-Y. & Cui, S.-Y. (2018). Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. *Front. Physiol.*, 9, Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00030>
7. Iilhan, S., Ozdemir, F. & Bor, M. (2015). Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. *Plant Biol. (Stuttg.)*, 17, No. 2, pp. 402-407. <https://doi.org/10.1111/plb.12227>
8. Lawlor, D. W. & Paul, M. J. (2014). Source/sink interaction underpin crop yield: the case for trehalose-6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Front. Plant Sci.*, 5, Art. 418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00418>
9. Karimi, M., Inze, D. & Depicher, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends. Plant. Sci.*, 7, pp. 193-195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
10. Hensel, G., Marthe, C. & Kumlehn, J. (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using immature embryos. In *Wheat Biotechnology: methods and protocols*, *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1679). (pp. 129-139). New York: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7337-8_8
11. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, pp. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
12. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley, pp. 431-433. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
13. Kvasko, A. Yu., Isayenkov, S. V., Krasnoperova, E. E., Dmytruk, K. V. & Yemets, A. I. (2019). Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* with yeast genes of trehalose biosynthesis *TPS1* and *TPS2*. *Visnyk Ukr. tov-va henetykiv i seleksioneriv*, 17, No. 2, pp. 150-158. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.2.1215>
14. Jang, I. C., Oh, S. J., Seo, J. S., Choi, W. B., Song, S. I., Kim, C. H., Kim, Y. S., Seo, H. S., Choi, Y. D., Nahm, B. H. & Kim, J. K. (2003). Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.*, 131, No. 2, pp. 516-524. <https://doi.org/10.1104/pp.007237>
15. Li, H.-W., Zang, B.-S., Deng, X.-W. & Wang, X.-P. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*, 234, No. 5, pp. 1007-1018. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1458-0>

Received 18.02.2020

А.Ю. Кваско¹, С.В. Исаенков¹,
К.В. Дмитрук², А.И. Емец¹

¹ ГУ "Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины", Киев

² Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

E-mail: kvasko.anna@ukr.net

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ С ДРОЖЖЕВЫМИ ГЕНАМИ БИОСИНТЕЗА ТРЕГАЛОЗЫ *TPS1* И *TPS2*

Введены в культуру *in vitro* растения нескольких сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и исследован их регенерационный потенциал. Отобраны сорта Мироновская 67 и Мирхад с целью интеграции в их геном дрожжевых (*Saccharomyces cerevisiae*) генов биосинтеза трегалозы (*TPS1* и *TPS2*) для повышения их устойчивости к засухе. Перенос генов осуществляли с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, для этого были созданы соответствующие векторные конструкции pBract214-TPS1 и pBract214-TPS2 с помощью технологии Gateway-клонирования. В качестве эксплантов для трансформации исполь-

зовали незрелые зародыши пшеницы. В экспериментах использовали штаммы *A. tumefaciens* GV3101, которые несли отдельно конструкции pBract214-TPS1 и pBract214-TPS2 с целевыми генами *TPS1* и *TPS2* соответственно, находящимися под контролем промотора убихитина кукурузы *PUBi*, и селективным маркерным геном гигромицин-фосфотрансферазы (*hpt*). Селекцию трансгенных растений осуществляли на питательных средах в присутствии гигромицина. Трансгенную природу полученных линий подтверждали с помощью ПЦР-метода с использованием специфических праймеров к генам *TPS1* и *TPS2*.

Ключевые слова: трегалоза, дрожжевые гены *TPS1*, *TPS2*, генетическая трансформация, *Triticum aestivum*.

A.Yu. Kvasko¹, S.V. Isayenkov¹,
K.V. Dmytruk², A.I. Yemets¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv

² Institute of Cell Biology of the NAS of Ukraine, Lviv

E-mail: kvasko.anna@ukr.net

THE OBTAINING OF WHEAT PLANTS WITH YEAST GENES OF TREHALOSE BIOSYNTHESIS *TPS1* AND *TPS2*

Plants of several common wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) were established in *in vitro* culture, and their ability of plant regeneration was studied. In order to obtain plants with enhanced drought tolerance, varieties Myronivska 67 and Myrkhad were picked up for a further transfer of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) trehalose biosynthesis genes (*TPS1* and *TPS2*) into their genomes. For this purpose, constructs *pBract214-TPS1* and *pBract214-TPS2* were created using the Gateway-cloning technique. Both constructs contained *TPS1* and *TPS2* genes under the control of the constitutive maize ubiquitin promoter (*PUBi*) and hygromycin-phosphotransferase (*hpt*) selectable marker gene. Transformation was carried out with the use of two *A. tumefaciens* strains GV3101 carrying the constructions pBract214-TPS1 and pBract214-TPS2. Wheat immature embryos were used as explants for the transformation. Selection of transgenic lines was carried out on nutrient medium supplemented with 30 mg/L hygromycin (as selective agent). The presence of yeast *TPS1* and *TPS2* sequences in genomic DNA isolated from transgenic wheat plants was confirmed by the PCR analysis using primers specific to these genes.

Keywords: trehalose, yeast genes of trehalose *TPS1*, *TPS2*, genetic transformation, *Triticum aestivum*.