

УДК 604.6:602.627:632.954

## ОТРИМАННЯ СТІЙКИХ ДО ГЕРБИЦИДУ ФОСФІНОТРИЦИНУ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ СОРТУ ЗИМОЯРКА ТРАНСФОРМАЦІЄЮ IN VITRO

І.Р. ГОРБАТЮК<sup>1</sup>, Н.Л. ЩЕРБАК<sup>1</sup>, М.О. БАННИКОВА<sup>1</sup>, Л.Г. ВЕЛИКОЖОН<sup>1,2</sup>,  
М.В. КУЧУК<sup>1</sup>, Б.В. МОРГУН<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук  
України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Двома методами генетичної трансформації отримано стійкі до фосфінотрицину рослини м'якої пшениці сорту вітчизняної селекції Зимоярка, які несуть ген *bar* бактерії *Streptomyces hygroscopicus*. Біолістичну трансформацію проводили вектором рАНС25, *Agrobacterium*-опосередковану — рСВ203 у штамі GV3101. Обидва вектори крім селективного гена фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*) містили репортерний ген β-глюкуронідази (*uidA*) *Escherichia coli*. Первинними експлантами слугували незрілі зародки. Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) доведено перенесення трансгена *bar* у геноми регенерантів і відсутність зараження агробактерією. Експресію гена *uidA* підтверджено гістохімічним аналізом. Ефективність трансформації біолістичним методом становила 0,5 %, *Agrobacterium*-опосередкованим — 1,25 %, що дало змогу відібрати відповідно 3 і 12 трансгенних ліній. Це перше повідомлення про успішне отримання в Україні трансгенної пшениці, стійкої до гербіциду фосфінотрицину, із застосуванням культури in vitro.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L., пшениця м'яка, генетична трансформація рослин, біотехнологія рослин, гербіциди.

Перенесення генів є потужною технологією, завдяки якій стає можливим відносно швидке вдосконалення властивостей культурних рослин відповідно до потреб сьогодення: врожайність, поживні й харчові якості, стійкість до гербіцидів, біотичних та абіотичних стресорів. Пшениця (*Triticum aestivum* L.) — одна з основних зернових культур у багатьох країнах світу, в тому числі й Україні. Інтенсивне сільськогосподарське виробництво потребує використання гербіцидів, які селективно знищують бур'яни, що зумовлює необхідність отримання сортів пшениці, стійких до гербіцидів. Попри значні досягнення генетичної інженерії пшениця залишається складним об'єктом для трансформації та культивування in vitro. Велику кількість досліджень присвячено розробці нових методик, які дають змогу підвищити ефективність трансформації пшениці [5, 11]. Згідно з опублікованими даними, більшість трансгенних рослин пшениці отримано за допомогою прямого перенесення генів — біолістичним методом [3, 15, 24—26]. Втім генетична трансформація прямим перенесенням генів має чимало обмежень і недоліків, основни-

ми з яких є множинні вставки й можливі перебудови перенесених ДНК-касєт, що зумовлюють «замовчування» відповідних генів.

*Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин *in vitro* має низку переваг над біолістичною, але це досить складний і тривалий процес, який передбачає участь бактеріальних генетичних детермінант і клітин рослини-хазяїна. Застосування такого методу уможливує використання генетичних конструкцій відносно великого розміру й супроводжується мінімальними порушеннями у структурних послідовностях генів, які переносяться [8, 9]. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин залежить від багатьох чинників [28], на її ефективність впливають генотип рослини, тип експлантата, генетичний вектор, бактеріальний штам, оптична густина бактеріальних клітин, тривалість сумісного культивування, склад поживного середовища тощо. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація однодольних рослин ускладнена тим, що вони не виділяють із пораних тканин ацетосирингон — специфічну фенольну сполуку, яка активує гени вірулентності Ті-плазмід в агробактерій. Цю проблему вирішують додаванням згаданої сполуки в суміш для сумісного культивування рослинних експлантатів та агробактерій [2]. На сьогодні розроблено ефективні протоколи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* багатьох злаків, у тому числі пшениці [12, 23]. Встановлено, що лише кілька сортів пшениці здатні сприймати агроінфекцію, більшість же сортів мають низький ступінь чутливості [14], тому підвищення ефективності трансформації пшениці залишається актуальним питанням, а умови трансформації та регенерації вдосконалюють для кожного сорту окремо.

Метою нашої роботи було отримання методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка, стійких до гербіциду фосфінотрицину.

## Методика

**Рослинний матеріал.** Первинними експлантатами для калюсогенезу слугували незрілі зародки м'якої пшениці *T. aestivum* сорту Зимоярка, виведеної в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Незріле насіння (12—14 діб після запилення) отримували з рослин, вирощених на дослідній ділянці. Насіння піддавали поверхневій стерилізації за такою схемою:  $\text{AgNO}_3$  — 3 хв, 96 %-й етанол — 1 хв, триразове промивання дистильованою стерильною водою — для ізоляції незрілих зародків.

Ізольовані незрілі зародки розміром 1,0—1,2 мм розташовували щитками вгору в чашки Петрі (близько 50 шт.) на модифіковане середовище МС [16] для калюсогенезу, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 10 мг/л  $\text{AgNO}_3$  та вітамінами за Гамборгом [10]. Культивування проводили за температури 26 °С в темряві протягом 4—6 діб до отримання первинного калюсу. Асептичні незрілі зародки та первинний калюс використовували в експериментах з генетичної трансформації.

**Генетичні вектори та агробактеріальні штами.** Трансформацію пшениці біолістичним методом виконували вектором рАНС25. Конструкція містить репортерний ген  $\beta$ -глюкуронідази (GUS, КФ 3.2.1.31) *uidA*, що походить з *Escherichia coli*, а також селективний ген фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*) зі *Streptomyces hygrosopicus*, що надає стійкості клітинам рослин до гербіциду баста (Basta, Buster, Liberty виробництва Bayer Crop Science) (активна речовина L-фосфінотрицин). Для досяг-

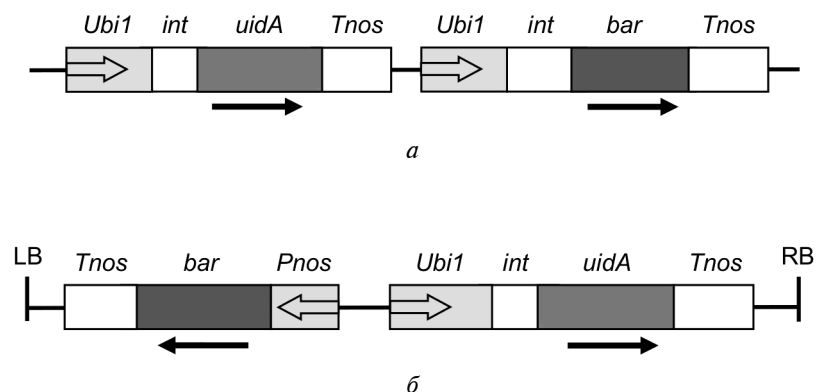


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК векторів рАНС25 (а) та рСВ203 (б)

нення високого рівня експресії цих генів у векторі використано промотори та інтрони *Ubi1* кукурудзи [7] (рис. 1).

Трансформацію, опосередковану *A. tumefaciens*, виконували вектором рСВ203, створеним на основі рАНС25, тому він містив також гени *bar* та *uidA* під контролем убіквітинового промотору. Генетичну трансформацію проводили за допомогою непалінового штаму *A. tumefaciens* GV3101. Плазмідну ДНК бінарного вектора переносили до агробактерій методом електропорації з використанням Micro Pulser Electroporator (BioRad).

Агробактерії, які містили вектор рСВ203, вирощували протягом ночі за температури 27 °С у середовищі [4], до якого добавляли 50 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину та 25 мг/л гентаміцину. В подальшому бактеріальні клітини переносили в індукційне середовище з відповідними антибіотиками й культивували протягом ночі на шейкері за температури 27 °С [22].

**Генетична трансформація біолістичним методом.** Для біолістичної трансформації з нічної культури XL-1 Blue *E. coli* виділяли плазмідну ДНК з використанням Qiagen Plasmid Maxi Kit. Щоб абсорбувати плазмідну ДНК на мікрочасточках (Tungsten M-17 Microcarriers, 1,1 мкм, BioRad), 10 мкл ДНК (1 мкг/мкл) додавали до 50 мкл суспензії часточок вольфраму (0,06 мг/мл у 50 %-му розчині гліцерину), розфасованих в 1,5 мл пробірки Eppendorf. До отриманої суспензії доливали 10 мкл розчину PEG/MgCl<sub>2</sub> (50 % PEG 2000, 5 М MgCl<sub>2</sub>). Після інкубації, що тривала 20 хв за кімнатної температури, часточки осаджували центрифугуванням на мікроцентрифузі упродовж 30 с, після чого надосадову рідину відбирали, а осад ресуспендували у 60 мкл абсолютного етанолу. Незрілі зародки переносили на середовище МС, що додатково містило 2 мг/л 2,4-Д та 0,3 М манітол. На цьому середовищі їх інкубували протягом 4 год перед трансформацією. Після бомбардування калюси залишали ще на 24 год на середовищі з 0,3 М манітолом, потім переносили на середовище МС, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 10 мг/л AgNO<sub>3</sub> і залишали при 26 °С у темряві на 1–2 тижні. Сформовані так калюси переносили на середовище для регенерації МС, доповнене 0,5 мг/л БАП, 1 мг/л Кін, 0,1 мг/л НОК (MCR2) та 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК (MCR3), яке містило селективний агент — фосфінотрицин у концентрації 5 мг/л, та культивували вже на світлі й далі вирощували за температури 24 °С, освітлення 3–4 клк і 16-годинного фотоперіоду.

*Генетична трансформація Agrobacterium-опосередкованим методом.* Отримані бактеріальні клітини ресуспендували в інокуляційному середовищі, яке містило 200 мкМ розчин ацетосирингону. Незрілі зародки занурювали в суспензію *A. tumefaciens* й витримували протягом 15 хв. Потім експлантати переносили на середовище для сумісного культивування [22], яке проводили в темряві за температури 27 °С протягом 48 год. Після сумісного культивування з агробактеріями експлантати переносили на середовище для регенерації [1], доповнене фосфінотрицином концентрацією 5 мг/л, й культивували за температури 24 °С протягом 16-годинного фотоперіоду. Пасажування здійснювали через кожні 14 діб. Отримані регенеранти відокремлювали від калюсу й для ініціації ризогенезу висаджували на середовище МС з половинним вмістом макро- і мікросолей, доповнене 0,1 мг/л НОК.

*Гістохімічний аналіз активності β-глюкуронідази.* GUS-аналіз калюсних клонів і листків виконували в 100 мМ фосфатному буфері (рН 7,0), який містив 1 мМ X-Gluc, 10 мМ натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти, 0,1 % тритон X-100, 2,5 мМ K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2,5 мМ K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2 мМ дитіотрейтолу, 0,1 % диметилсульфоксиду та 20 % метанолу, за 37 °С протягом ночі. Після фарбування хлорофіл із тканин видаляли 70 %-м етанолом.

*Молекулярно-біологічний аналіз із використанням ПЛР.* Отримані регенеранти аналізували за допомогою ПЛР. Реакційна суміш містила: специфічні праймери на *bar* ген — SBE F, SBE R [21] (очікуваний амплікон 405 пн), ген *VirC* — VCF, VCR [20] (очікуваний амплікон 730 пн), по 2 мкл буфера для ПЛР 10 × DreamTaq™ GreenBuffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q (Merck Millipore).

Реакції проводили з використанням двох профілів:

1) ПЛР для визначення наявності *bar* гена — початкова денатурація 3 хв за 94 °С, 34 цикли денатурації 30 с за 94 °С, ренатурація 30 с за 65 °С, елонгація 1 хв за 72 °С, фінальна елонгація 5 хв за 72 °С;

2) ПЛР для визначення наявності бактеріального зараження (ген *VirC*) — початкова денатурація 4 хв за 94 °С, 34 цикли денатурації 30 с за 94 °С, ренатурація 30 с за 59 °С, елонгація 30 с за 72 °С, фінальна елонгація 5 хв за 72 °С.

ПЛР-аналіз виконували в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Scientific) та Mastercycler gradient (Eppendorf). Продукти ампліфікації розділяли в 1,2 %-му агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

## Результати та обговорення

Для успішної передачі трансгенів у рослинний організм необхідною умовою є наявність клітин-мішеней, які активно діляться, піддаються трансформації і мають високу регенеративну активність [6, 18]. У зв'язку з цим ми для генетичної трансформації використали ізольовані незрілі зародки (рис. 2) та сформований 4–6-добовий калюс, оскільки такі експлантати мають високу регенераційну здатність. Після біолістичної трансформації селекцію отриманих ліній здійснювали на середовищі,

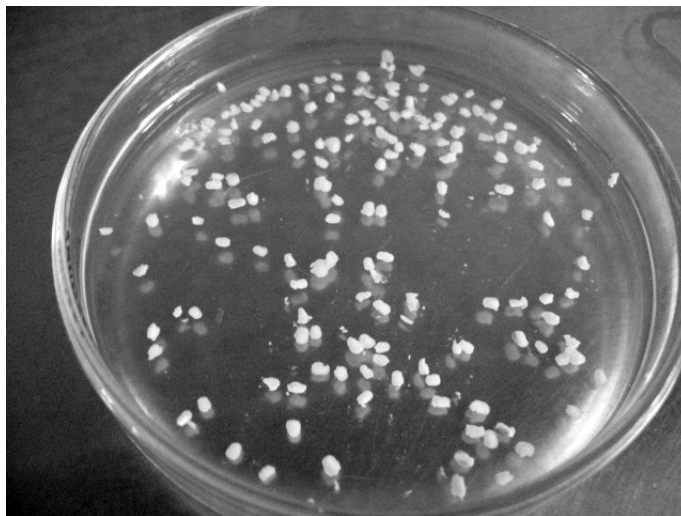


Рис. 2. Незрілі зародки пшениці *T. aestivum* відразу після виділення на поживному середовищі

яке містило 5 мг/л фосфінотрицину. Для регенерації рослин були використані середовища MCR2, MCR3. За наших умов оптимальним виявилось середовище MCR3 (1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК) (рис. 3).

Пагони, сформовані під час культивування калусів на селективному середовищі для регенерації, переносили на безгормональне середовище МС для вкорінення. В результаті проведених експериментів було відібрано 19 ліній, які росли на селективному середовищі (див. рис. 3, б). Аналізом за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до *bar* гена, виявлено відповідну генетичну послідовність у трьох ліній пшениці.

Із використанням гістохімічного аналізу оцінено наявність GUS активності в отриманих лініях. В експериментах ми спостерігали синє забарвлення трансформованих калусів, коренів та листків (рис. 4, а–в), а також листків щойно регенованих рослин пшениці. Через деякий час у рослинах, які були висаджені в ґрунт, гістохімічним аналізом GUS активність не виявлялась, однак активність β-глюкуронідази ми спостерігали в генеративних органах трансгенних рослин пшениці, в їх насінинах

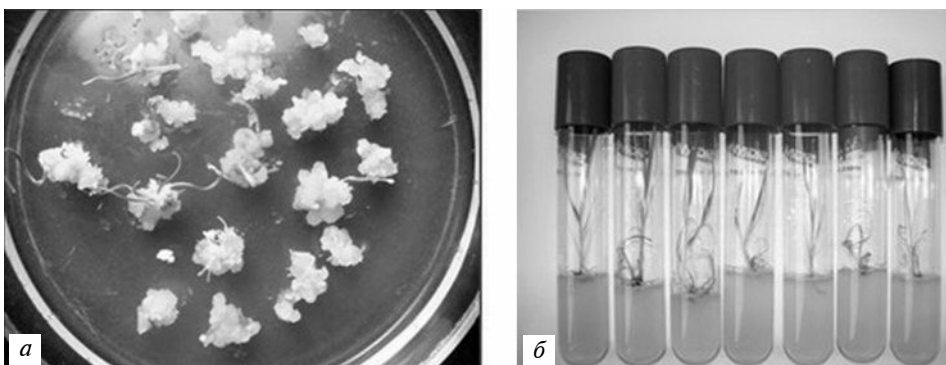


Рис. 3. Регенерація (а) та вкорінення (б) рослин пшениці сорту Зимоярка після трансформації біолістичним методом плазмідом рАНС25 на селективному середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину

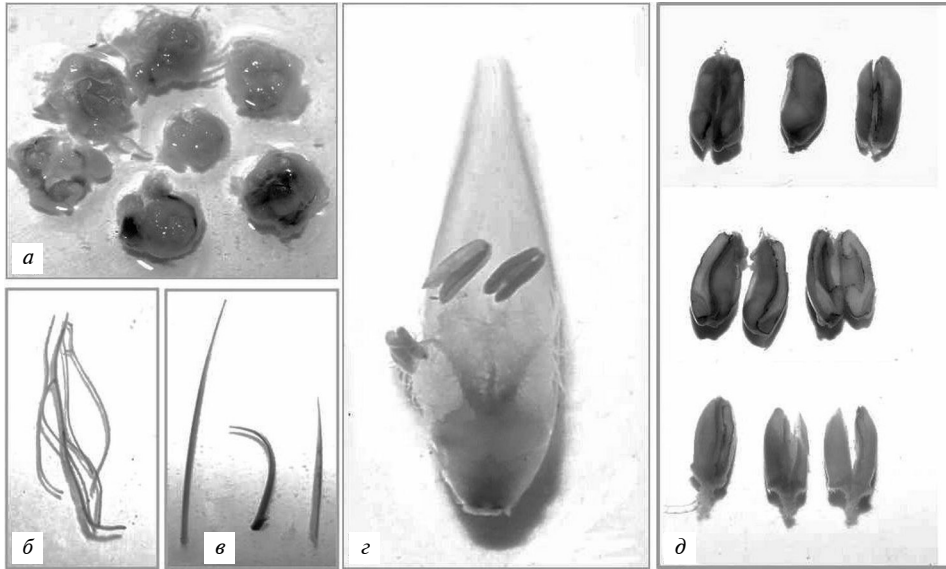


Рис. 4. Фарбування на GUS стійких до фосфіотрицину ліній пшениці, трансформованих вектором рАНС25:

*a* – калус; *б* – корені; *в* – листки; *г* – генеративні органи; *д* – насіння трансгенних ліній пшениці

(див. рис. 4, *г*, *д*), а також у проростках ( $T_1$ ) потомства. Слід зазначити, що в дорослих рослин ( $T_1$ ) GUS активності ми не виявили. Така нестабільність активності  $\beta$ -глюкуронідази ймовірно свідчить про «замовчування» перенесеного *uidA* трансгена в отриманих лініях пшениці.

Як відомо, «замовчування» генів унаслідок великої кількості вставок перенесеної ДНК згадується як один із недоліків прямого методу трансформації [17]. На противагу йому *Agrobacterium*-опосередкована трансформація характеризується простотою, порівняно низькою вартістю, забезпечує вставку меншої кількості копій трансгенів, що дає можливість звести до мінімуму їх «замовчування» [24].

Одним із чинників, які впливають на ефективність трансформації, є оптична густина бактеріальної суспензії ( $OD_{600}$ ). Оптимальна густина бактеріальних клітин для різних штамів, культур і генотипів знаходиться в діапазоні 0,2–2 [19, 27]. Найвища частота трансформації рослин пшениці спостерігалась за  $OD_{600} = 0,5$ – $4,4$  % [13] або 12,5 % [19]. У наших досліджах найефективнішою для трансформації пшениці сорту Зимоярка виявилась оптична густина *A. tumefaciens*  $OD_{600} = 0,4$ . За такого значення  $OD_{600}$  утворювалась найбільша кількість морфогенних осередків (~ 60 %) на селективному середовищі. Зростання густини агробактерій до 1 та 1,5 спричинювало сильне бактеріальне забруднення й загибель близько 75 % калусу.

Бактеріальною суспензією було оброблено 960 4–6-добових калусів, отриманих із незрілих зародків пшениці сорту Зимоярка. Після сумісного культивування із суспензією *A. tumefaciens* штаму GV3101 їх переносили на регенераційне середовище, яке містило 5 мг/л фосфіотрицину, й культивували за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду протягом 60 діб. Первинні меристематичні осередки починали формуватись на 5-ту добу. Відсоток морфогенезу в середньому

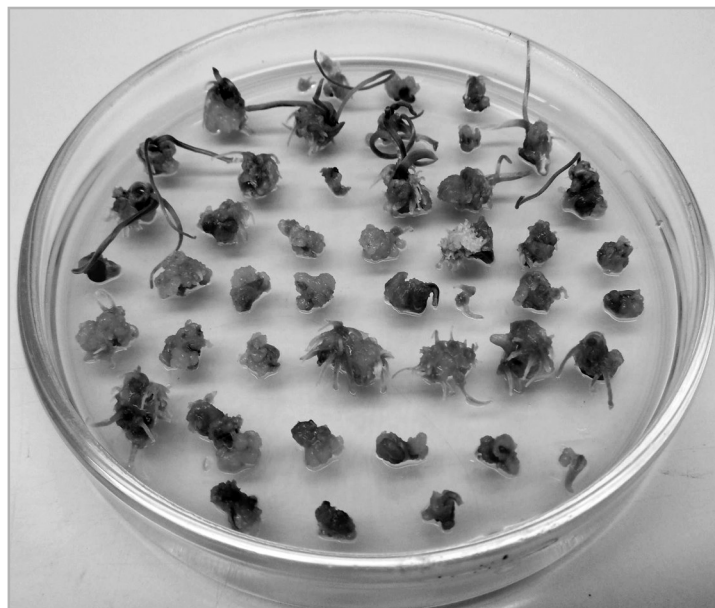


Рис. 5. Регенерация каллусов пшеницы после *Agrobacterium*-опосредкованой трансформации на селективном средовище з 5 мг/л фосфинотрицину

становив  $68,9 \pm 2,5$  %. На 10-ту добу культивування починали з'являтися пагони (рис. 5).

Після первинної селекції ми отримали 50 регенерантів, які перенесли на середовище для вкорінення. Частина регенерантів поступово втрачала зелене забарвлення й не утворювала коренів.

Для підтвердження наявності послідовності трансгена *bar* регеновані пагони аналізували методом ПЛР. За його результатами, позитивний сигнал наявності послідовності гена — амплікон завдовжки 405 пн (рис. 6) — виявлено у 12-рослин-регенерантів пшениці, що становило 1,25 % загальної кількості трансформованих експлантатів.

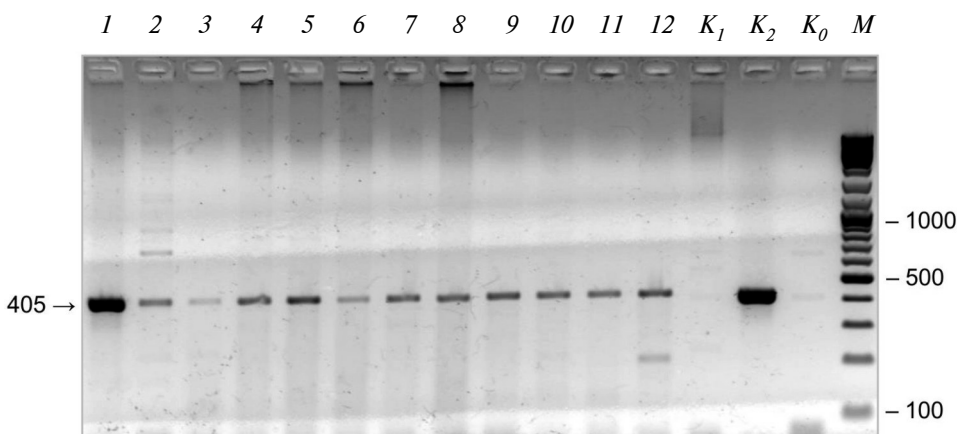


Рис. 6. Электрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *bar*.

1—12 — досліджувані зразки;  $K_1$  — ДНК нетрансформованої пшениці сорту Зимоярка (негативний контроль);  $K_2$  — ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203 (позитивний контроль);  $K_0$  — TE буфер (негативний контроль);  $M$  — маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)

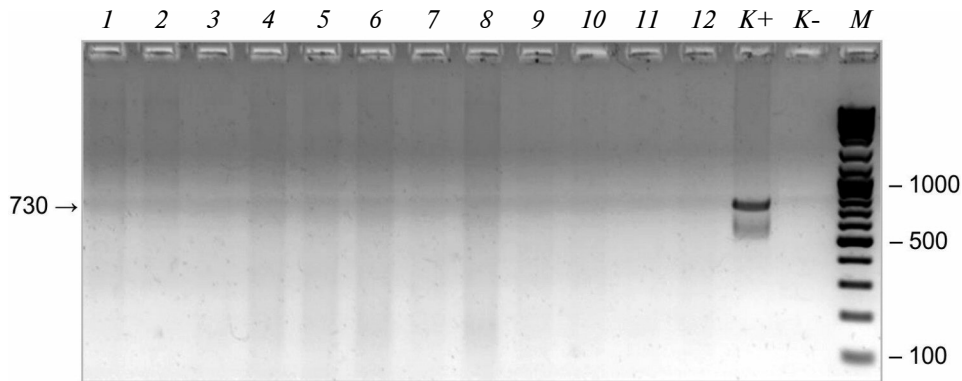


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації послідовності гена *VirC*: 1–12 — досліджувані зразки; K+ — агробактеріальна ДНК штаму GV3101 (позитивний контроль); K- — ТЕ буфер (негативний контроль); M — маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

Щоб виключити можливість бактеріальної контамінації, проведено детекцію генів вірулентності Tі-плазміди, а саме *VirC* (рис. 7).

Результати аналізу за допомогою ПЛР (див. рис. 7) підтвердили відсутність бактерії в рослинних зразках і дали підставу стверджувати, що відбулася інтеграція трансгенів у рослинний геном.

Таким чином, удосконалено технологію отримання трансгенних рослин м'якої пшениці з незрілих зародків, що підвищує ймовірність регенерації в умовах *in vitro*. Трансгенні рослини пшениці отримано відразу двома методами: біолістичним та *Agrobacterium*-опосередкованим перенесенням чужорідної ДНК. Ефективність трансформації становила 0,5 і 1,25 %, що дало змогу відібрати відповідно 3 і 12 трансгенних ліній. Трансгенну природу отриманих рослин підтверджено методом ПЛР із праймерами, специфічними до гена *bar*. Експресію гетерологічного репортерного гена β-глюкуронідази у трансгенних лініях T<sub>0</sub> покоління, трансформованих біолістичним методом, підтверджено гістохімічним аналізом. Отже, вперше в Україні двома незалежними методами в асептичних умовах отримано трансгенну м'яку пшеницю, стійку до гербіциду фосфінотрицину.

1. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О. та ін. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоарка // Физиология растений и генетика. — 2015. — 47, № 6. — С. 514–525.
2. Дубровна О.В., Моргул Б.В., Бавол А.В. Біотехнологія пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. — К.: Логос, 2014. — 375 с.
3. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V. et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants // Plant Cell Rep. — 1996. — 16. — P. 12–17.
4. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1951. — 62. — P. 293–300.
5. Binka A., Oreczyk W., Nadolska-Oreczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*xTriticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes // J. Appl. Genet. — 2012. — 53. — P. 1–8.
6. Birch R.G. Plant transformation problems and strategies for practical application // Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1997. — 48. — P. 297–326/
7. Christensen A.H., Quail P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // Transgen. Res. — 1996. — 5. — P. 213–218.
8. Dai S.H. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment // Mol. Breed. — 2001. — 7. — P. 25–33.



9. Ding L. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat // Mol. Biol. Rep. — 2009. — **36**. — P. 29–36.
10. Gamborg O.L., Eveleigh D. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. — 1968. — **46**, N 5. — P. 417–421.
11. He Y., Jones H.D., Chen S. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Agrobacterium*-mediated transformation (*Triticum turgidum* L. var. durum cv. Stewart) with improved efficiency // J. Exp. Bot. — 2010. — **61**. — P. 1567–1581.
12. Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Front. Plant Sci. — 2014. — **5**. — P. 1–11.
13. Hu T., Metz S., Chay C. et al. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection // Plant Cell Rep. — 2003. — **21**. — P. 1010–1019.
14. Khanna H.K., Daggard G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium // Plant Cell Rep. — 2003. — **21**. — P. 429–436.
15. Lazzeri P.A., Jones H.D. Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization // Methods in Mol. Biol. — 2009. — **478**. — P. 3–22.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473–497.
17. Nadolska-Orczyk A., Orczyk W., Przetakiewicz A. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals — from technique development to its application // Acta Physiol. Plant. — 2000. — **22**. — P. 77–88.
18. Ombori O., Vincent J., Muoma O., Machuka J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines // Plant Cell, Tissue Organ Cult. — 2013. — **113**. — P. 11–23.
19. Rashid H., Afzal A., Khan M.H. et al. Effect of bacterial culture density and acetosyringone concentration on *Agrobacterium*-mediated transformation in wheat // Pakistan J. Bot. — 2010. — **42**. — P. 4183–4189.
20. Sawada H., Leki H., Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Applied and environmental microbiology. — 1995. — **61**, N 2. — P. 828–831.
21. Sestili F., Janni M., Doherty A. et al. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes // BMC Plant Biol. — 2010. — **10**. — P. 1–12. (DOI: 10.1186/1471-2229-10-144).
22. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus // Methods Mol. Biol. — 2009. — **526**. — P. 47–58.
23. Sparks C.A., Doherty A., Jones H.D. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery // Methods Mol. Biol. — 2014. — **1099**. — P. 235–250. (DOI: 10.1007/978-1-62703-715-0\_19).
24. Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E. et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus // Biotechnol. — 1992. — **10**. — P. 667–674.
25. Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Physiol. — 1993. — **102**. — P. 1077–1084.
26. Zhou H., Arrowsmith J.W., Fromm M.E. et al. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation // Plant Cell Rep. — 1995. — **15**. — P. 159–163.
27. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances // Biocatal. Agricult. Biotechnol. — 2013. — P. 1–8. (DOI: 10.1016/j.bcab.2013.10.004).
28. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances // Biocatal. Agricult. Biotechnol. — 2014. — **3**. — P. 95–102.

Отримано 21.01.2016

ПОЛУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДУ ФОСФИНОТРИЦИНУ  
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ СОРТА ЗИМОЯРКА ТРАНСФОРМАЦИЕЙ  
IN VITRO

И.Р. Горбатюк<sup>1</sup>, Н.Л. Щербак<sup>1</sup>, М.А. Банникова<sup>1</sup>, Л.Г. Великожон<sup>1,2</sup>, Н.В. Кучук<sup>1</sup>,  
Б.В. Моргун<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Двумя методами генетической трансформации получены устойчивые к фосфинотрицину растения мягкой пшеницы отечественной селекции сорта Зимоярка, которые несут ген *bar* бактерии *Streptomyces hygroscopicus*. Библистическую трансформацию проводили вектором рАНС25, *Agrobacterium*-опосредованную — рСВ203 в штамме GV3101. Оба вектора кроме селективного гена фосфинотрицинацетилтрансферазы (*bar*) содержали репортерный ген β-глюкуронидазы (*uidA*) *Escherichia coli*. Первичными эксплантатами служили незрелые зародыши. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) доказан перенос трансгена *bar* в геномы регенерантов и отсутствие заражения агробактерией. Экспрессия гена *uidA* подтверждена гистохимическим анализом. Эффективность трансформации библистическим методом составляла 0,5 %, *Agrobacterium*-опосредованным — 1,25 %, что позволило отобрать соответственно 3 и 12 трансгенных линий. Это первое сообщение об успешном получении в Украине трансгенной пшеницы, устойчивой к гербициду фосфинотрицину, с применением культуры in vitro.

ESTABLISHING TRANSGENIC WHEAT PLANTS OF CV. ZYMOYARKA RESISTANT  
TO THE HERBICIDE PHOSPHINOTHRICIN IN VITRO

I.R. Gorbatyuk<sup>1</sup>, N.L. Shcherbak<sup>1</sup>, M.O. Bannikova<sup>1</sup>, L.H. Velykozhon<sup>1,2</sup>, M.V. Kuchuk<sup>1</sup>,  
B.V. Morgun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine  
148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Phosphinothricin resistant wheat plants of native breeding cv. Zymoyarka carrying *bar* gene of bacterium *Streptomyces hygroscopicus* have been obtained by two methods of genetic transformation. The biolistic transformation was performed with vector рАНС25 while the *Agrobacterium*-mediated one with рСВ203 in strain GV3101. Both vectors in addition to the selective gene (*bar*) of phosphinothricin acetyl transferase contained the reporter gene (*uidA*) of β-glucuronidase from *Escherichia coli*. The immature embryos were used as primary explants. The integration of transgene *bar* into regenerants' genome and the lack of agrobacterium infection were proved by means of PCR. The expression of gene *uidA* was confirmed by histochemical analysis. The transformation efficiency amounting to 0.5 % for biolistic and to 1.25 % for *Agrobacterium*-mediated allowed us to select 3 and 12 transgenic lines, respectively. This is the first report on the successful establishment of transgenic wheat resistant to the herbicide phosphinothricin in in vitro culture in Ukraine.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., bread wheat, genetic transformation of plants, plant biotechnology, herbicides.