

УДК 602.64:633.11:577.218

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЯВУ ТРАНСГЕНІВ ПІСЛЯ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ IN PLANTA ПШЕНИЦІ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Н. А. ЖАЛІЙ^{1,2}, М. О. БАННИКОВА¹, М. О. ПЛУГАТАР³, Л. Г. ВЕЛИКОЖОН¹,
А. М. ТАРАНЕНКО¹, Б. В. МОРГУН^{1,3}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148
e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Національний університет харчових технологій
Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 68

³ ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64

Мета. Виявлення послідовностей цільових трансгенів *prtII* і *bar* у геномі ймовірних трансформантів пшениці м'якої озимої *Triticum aestivum* L. сортів Зимоярка та Подолянка, отриманих в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, і з'ясування рівня їх експресії. **Методи.** Використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) самостійно та у поєднанні із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), електрофорез ДНК у агарозному гелі. Толерантність до гербіциду оцінювали у фізіологічному тесті. **Результати.** За допомогою ПЛР-аналізу послідовність трансгена *prtII* виявлено у 30 зразках із 145 проаналізованих, частота трансформації склала 20,7 %. Послідовність гена *bar* спостерігалася у 85 дослідних рослинах, а частота трансформації склала 15,6 %. Виявлено мРНК обох трансгенів, що засвідчило їх транскрипційну активність та стабільну експресію. **Висновки.** Порівнюючи частоти трансформації обох трансгенів можна стверджувати про дещо вищу ефективність генетичної конструкції з *prtII* геном. Разом з тим, стабільна транскрипційна активність дає підстави констатувати успішне функціонування обох трансгенів в цілому, хоча і не у кожній конкретній взятій рослині (позиційний ефект). За результатами фізіологічного тесту 25 % рослин, що містять ген *bar*, виявили стійкість до гербіциду Баста®.

Ключові слова: генетично модифіковані організми, трансгенні рослини, біотехнологічні культури, пшениця м'яка озима, генетична інженерія.

Вступ. Пшениця є однією з найважливіших зернових культур для людства. Її значна екологічна пластичність у поєднанні з методами захисту, що постійно удосконалюються, дозволяють уникати негативного впливу абіотичних та біотичних факторів. Потужний розвиток та тривала кропітка робота в області молекулярної біології, генетики дали змогу віднайти ряд методів створення сортів пшениці з багатьма корисними для людини ознаками. Стійкість до гербіцидів, шкідників, патогенів, толерантність до екстремальних кліматичних умов (посухи, засолення, критичних температур, тощо), підвищення якості та врожайності, технологічних характеристик, які полегшують її механізоване культивування є найбільш бажаними (Zhang et al., 2012).

В доповнення до класичних методів добору, гібридизації та мутагенезу для виведення рослин з бажаними характеристиками, сучасний потужний розвиток отримують біотехнологічні методи із залученням культури рослинних клітин і тканин *in vitro*, клітинної селекції, генетичної трансформації, тощо.

В останні роки все більшого поширення набуває *Agrobacterium*-опосередкована трансформація злаків, хоча раніше вважали, що перенесення чужорідної ДНК у однодольних рослин за допомогою агробактерій неможливе взагалі (Ishida et al., 2015).

До недавнього часу ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці залишалася досить низькою, але нещодавно науковці Japan Tobacco Company запропонували новий протокол трансформації. Частота трансформації з використанням цього методу сягала 50 % (Ishida et al., 2014). Цей протокол був підтверджений австралійськими вченими, що отримали 45 % та 41 % ефективності трансформації для сортів пшениці *Westonia* та *Fielder* (Richardson et al., 2014).

Згідно з опублікованими даними, більшість трансгенних рослин пшениці отримані за допомогою прямого переносу генів — біолістичним методом (Altpeter et al., 1996; Lazzeri, Jones 2009; Vasil et al., 1992; Weeks et al., 1993; Zhou et al., 1995; Qin et al., 2014; Hamada et al., 2017). Тим не менш, така трансформація має ряд обмежень та недоліків, основним з яких є можливі перебудови перенесених ДНК касет та мультикопійність, що зумовлюють «замовчування» відповідних генів (Бончук и др., 2014: пат. РФ № 2507736), ускладнення культивування та регенерації рослин *in vitro*.

Хоча *Agrobacterium*-опосередкована трансформація і є досить складним і тривалим процесом, вона має ряд переваг над біолістичною трансформацією. Застосування такого методу дозволяє використовувати генетичні конструкції відносно великого розміру та призводить до мінімальних порушень у структурних послідовностях генів, що переносяться (Dai et al., 2001; Ding et al., 2009). Вбудовування як правило відбувається у транскрипційно активні ділянки геному у вигляді одиничних копій. Все це дає можливість підвищити ефективність експресії перенесених генів. На сьогодні основним завданням генетичної трансформації є не лише отримання трансгенних ліній пшениці, а й надійна, стабільна експресія цільових генів та їх успадкування у наступних поколіннях. Метою даного дослідження було виявлення послідовностей гетерологічних генів *npfII* і *bar* у геномі ймовірних трансформантів пшениці м'якої озимої *Triticum aestivum* L. сортів Зимоярка та Подолянка, отриманих у результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, і з'ясувати чи відбувається експресія даних трансгенів.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень були рослини м'якої пшениці сортів Зимоярка та Подолянка, які пройшли процедуру генетичної трансформації *in planta*, так звані ймовірні трансформанти. Сорт Зимоярка є дворучкою поєднуючи два типи розвитку: озимий та ярий, в той час, як сорт Подолянка належить до озимої пшениці м'якої. Оригіном обох районованих в Україні сортів є Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, якому автори висловлюють щирі вдячності за надане насіння.

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили генетичними конструкціями, до складу Т-ДНК яких входили гени *npfII* або *bar*. Усе отримане після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* насіння висівали у ґрунт у закритій системі. Рослини пшениці T₀ покоління аналізували на присутність нуклеотидних послідовностей генів *npfII*, *bar* і *virC* (ген вірулентності агробактерій) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Загальну рослинну ДНК виділяли з листя. Реакційні суміші для проведення ПЛР включали: специфічні праймери до гена *npfII* — Kan 1F і Kan 1R або до гена *bar* — SBE-barF і SBE-barR (Sestili et al., 2010), або для перевірки відсутності гена *virC* — праймери VCF і VCR (Sawada, et al., 1995), по 2 мкл буфера для ПЛР 10× DreamTaq™ Green Buffer (Thermo Fisher Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфата (Thermo Fisher Scientific), 0,5 одиниці полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 30 нг загальної ДНК. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q® (Merck Millipore).

ПЛР проводили з використанням наступних програм:

1. для визначення трансгена *npfII*: початкова денатурація 3 хв за температури 94° С, 34 цикли — денатурація 30 с за 94° С, ренатурація 30 с при 60° С, елонгація 40 с при 72° С, фінальна елонгація 5 хв за 72° С. Використовувалась пара праймерів Kan 1F

5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3'
та Kan 1R

5'-CAA GCT CTT CAG CAA TAT CAC G-3';

2. для визначення наявності *bar*-гена: початкова денатурація 3 хв за 94° С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94° С, ренатурація 30 с при 65° С, елонгація 1 хв при 72° С, фінальна

елонгація 5 хв за 72° С. Використовувалась пара праймерів SBE-barF

5'-CAT CGA GAC AAG CAC GGT CA-3'
та SBE-barR

5'-GAAACCCACGTCATGCCAGT-3';

3. для визначення бактеріального зараження (на ген *virC*): початкова денатурація 4 хв за 94° С, 34 цикли — денатурація 30 с при 94° С, ренатурація 30 с при 59° С, елонгація 30 с за 72° С, фінальна елонгація 5 хв при 72° С. Використовувалась пара праймерів VCF

5'-ATC ATT TGT AGC GAC T-3'
та VCR

5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3'.

Для з'ясування факту транскрипції гетерологічних генів *nptII* і *bar* у рослинній клітині, проводили зворотну транскрипцію цільових послідовностей з подальшою ПЛР ампліфікацією. Загальну РНК виділяли із пластинок молодих листків рослин *Triticum aestivum*. Перед використанням препаратів РНК проводили гідроліз залишкової ДНК ензимом ДНКаза I (1–5 мкг загальної РНК). Реакційну суміш витримували 30 хв за температури 37° С. Для зупинки реакції додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та витримували 10 хв при 65° С (денатурація фермента ДНКази I). Комплементарна ДНК (кДНК) була синтезована за допомогою зворотної транскриптази (РНК-залежної ДНК полімерази) з мРНК транс-

генних рослин пшениці за допомогою набору First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) згідно із інструкціями виробника. Одноланцюгова кДНК надалі аналізувалася на присутність нуклеотидної послідовності генів *nptII* і *bar* методом ПЛР залучаючи специфічні праймери. Для визначення зазначеної експресії трансгенів використовували 2 мкл продуктів реакції зворотної транскрипції (ЗТ), доданих у 20 мкл реакційної суміші ПЛР та специфічні праймери до кожного із генів. Реакції ампліфікації проводили у термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) і Mastercycler Gradient (Eppendorf). Продукти ампліфікації розділяли у 1,2 % агарозному гелі методом електрофорезу, з додаванням 5 мкг/мл бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

Результати

За допомогою ПЛР-аналізу наявність нуклеотидної послідовності трансгена *nptII* виявлено у 30 із 145 досліджуваних зразків (рис. 1). Частота трансформації по даному гену відповідно становила 20,7 %. Амплікон довжиною 647 пар нуклеотидів (п.н.) проявлявся у вигляді дискретної смуги.

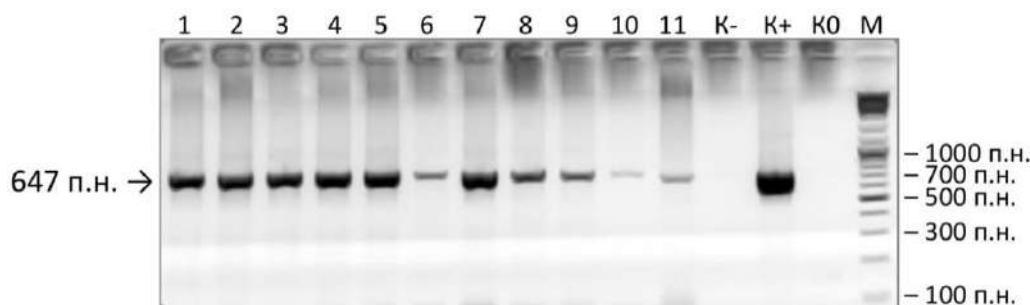


Рис. 1. Типова електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК дослідних рослин із використанням специфічних праймерів до гена *nptII*. Доріжки 1–11 — досліджувані рослини; K- — ДНК нетрансформованої пшениці сорту Подолянка у якості негативного контролю; K+ — позитивний контроль, ДНК *Nicotiana tabacum*, трансформованого конструкцією, Т-ДНК якої містить ген *nptII*; K0 — негативний контроль, ТЕ буфер без ДНК; М — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix із зазначенням довжин референтних фрагментів.

Дослідження експресії трансгена *nptII* проводили на рівні транскрипції у тих рослинах пшениці, у яких було показано його перенесення і включення до геному. З цією метою проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Якщо

інсерція трансгена відбулася успішно у транскрипційно активну ділянку геному, то шляхом виділення матричної РНК (мРНК), переведенням її у форму одноланцюгової комплементарної ДНК (кДНК) і наступною ампліфікацією фрагментів послідовності трансгена та детекцією їх

у агарозному гелі можна підтвердити експресію бажаного трансгена. В якості позитивного контролю доцільно було використовувати рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, заздалегідь трансформовані тими векторами, що й пшениця. Даний ПЛР-аналіз синтезованої кДНК показав наявність експресії гена *nrfl1* в усіх вивчених пробах (рис. 2). Приймаючи до уваги значно вищу собівартість подібних аналізів, розглядалися лише 4 рослини як цілком задовільна репрезентативна вибірка. Позитивні сигнали, отримані з даних рослин, представлені на доріжках 1, 3, 5,

7 рис. 2. Відповідно на доріжках з парною нумерацією (2, 4, 6 і 8) розміщені їх контролі для оцінки якості проходження реакції зворотної транскрипції. У випадку відсутності забруднення препарату кДНК геномною ДНК в процесі проведення експерименту сигнали мають бути відсутніми на парних доріжках, що і спостерігається. Це надає довіри до отриманих результатів. З 4-х дослідних рослин відмічено транскрипцію в усіх 4-х рослинах. Отже, експресія чужорідного гена *nrfl1* у клітинах пшениці відбувається досить стабільно.

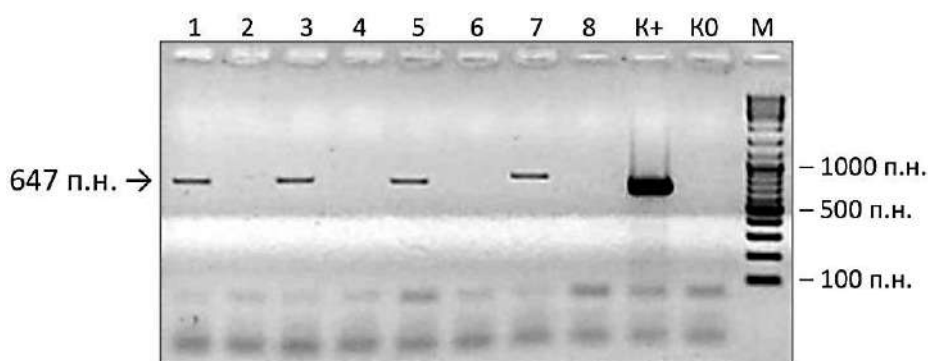


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *nrfl1* з кДНК трансгенних рослин пшениці. Доріжки 1, 3, 5, 7 — трансформовані рослини пшениці сорту Подолянка; 2, 4, 6, 8 — їх контролі (ті самі проби кДНК, але без використання зворотної транскриптази); K+ — позитивний контроль, трансгенна рослина *N. tabacum* за геном *nrfl1*; KO — негативний контроль, ТЕ буфер без ДНК; M — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

У рослинах пшениці, трансформованих вектором із селективним геном *bar*, також проводили детекцію послідовності трансгена. За результатами ПЛР-аналізу наявність нуклеотидної

послідовності виявлено у 85 зразках. Ефективність трансформації за трансгеном *bar* складала 15,6 % (рис. 3) від загальної кількості відібраних зразків.

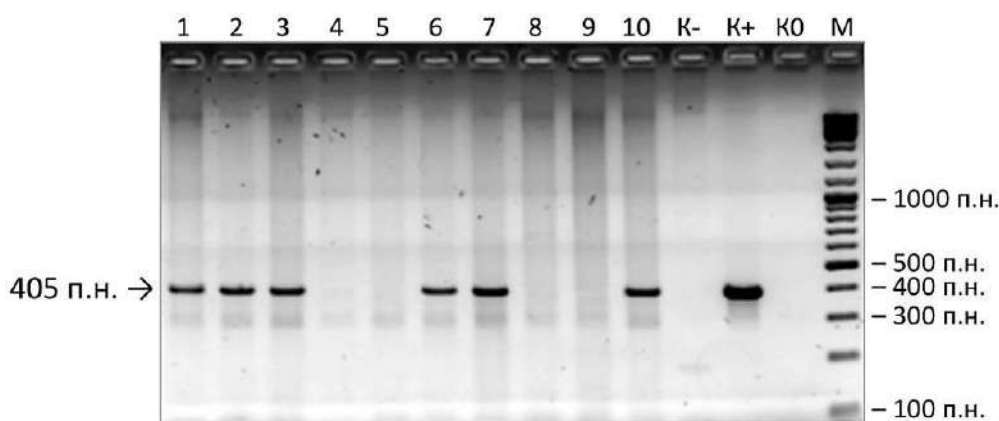


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК із використанням специфічних праймерів до гена *bar*. Доріжки 1–10 — досліджувані зразки; K- — ДНК нетрансформованої пшениці сорту Зимоярка у якості негативного контролю; K+ — позитивний контроль, ДНК рослини *N. tabacum*, трансформованої конструкцією з геном *bar*; KO — негативний контроль, ТЕ буфер без ДНК; M — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Дослідження прояву трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*...

Дослідження експресії трансгену *bar* у зразках пшениці, де цей ген було детектовано, здійснювали на рівні транскрипції. За результа-

тами ЗТ-ПЛР наявність експресії гена *bar* спостерігається у 50 % відібраних зразків (рис. 4).

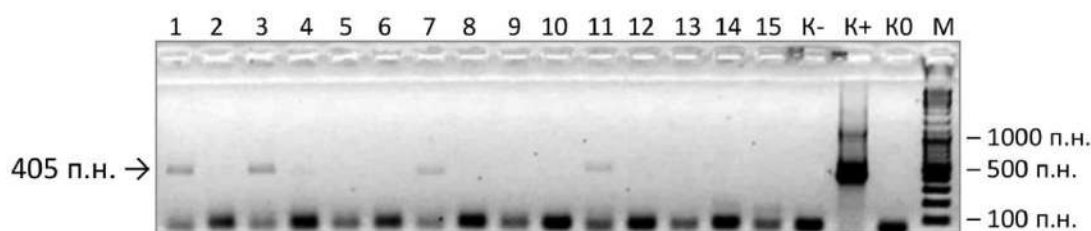


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації з транскриптів гена *bar* (кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази з мРНК трансгенних рослин пшениці). Доріжки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 — кДНК трансформованих рослин пшениці сорту Подолянка; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 — відповідні контролю на забруднення геномної ДНК (ті самі проби очищеної мРНК, але без використання зворотної транскриптази); K1 — позитивний контроль (кДНК, синтезована з мРНК трансгенної рослини *N. tabacum*, трансформованої конструкцією з геном *bar*); K- — негативний контроль, TE буфер без ДНК; M — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Ген *bar* у разі експресії надає толерантності рослинам до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Рослини пшениці, які за результатами ПЛР-аналізу містили послідовність гена *bar*, досліджували на здатність реагувати з гербіцидом Баста®. Для цього їх обробляли розчином гербіциду у концентрації 1,5 мг/мл. У якості контролю використовували нетрансформовані рослини пшениці. Толерант-

ність трансгенних рослин до гербіциду, яка відмічалася, свідчила про експресію гена *bar* і функціональну активність гетерологічного ферменту фосфінотрицин ацетилтрансферази. За результатами фізіологічного тесту серед проаналізованих рослин стійкість проявляли 25 % від загальної кількості досліджуваних рослин (рис. 5).

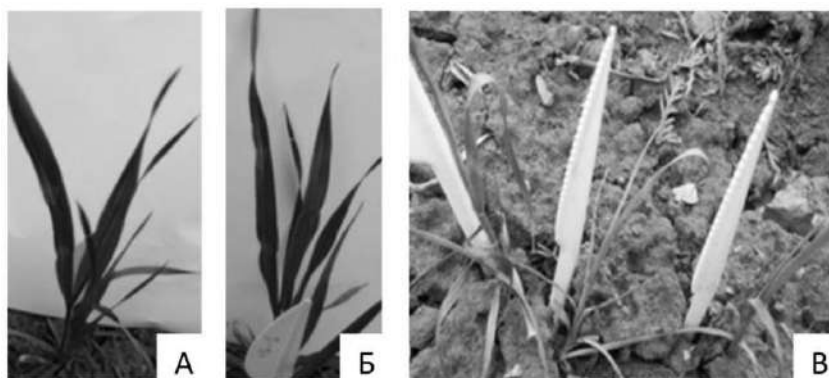


Рис. 5. Рослини пшениці сорту Подолянка оброблені гербіцидом Баста® у концентрації, рекомендованій виробником (1,5 мг/мл): А, Б — рослини, толерантні до гербіциду, живі, зеленого кольору; В — нетрансформовані рослини пшениці (контроль) жовті з пошохлим листям, нетолерантні.

Висновки

Таким чином, було вивчено генетичний статус рослин пшениці м'якої озимого сорту Подолянка та озимо-ярого сорту Зимоярка, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Аналіз за допомогою

ПЛР дозволив виявити присутність трансгена *nrp11* у 30 зразках із 145, що становило частоту у 20,7 %. Дослідження експресії трансгена *nrp11* проводилося методом полімеразної ланцюгової реакції у поєднанні із зворотною транскрипцією. Його експресія була виявлена у всіх 4-х досліджених зразках, що дає підстави вважати її

досить стабільною з конститутивним проявом. Разом із тим, факт перенесення і стабільного вбудовування у геном пшениці гена *bar* був виявлений у 15,6 % зразків від загальної кількості досліджуваних рослин. Транскрипція даного трансгена спостерігалася лише у 50 % досліджених рослин (4-х з 8-ми). За результатами фізіологічного тесту було показано, що лише 25 % рослин, які містили ген *bar*, виявили стійкість до гербіциду Баста®.

Подяки

Виносимо щиру подяку колегам ІФРГ НАН України за надане насіння та Горбатюк І. Р. за допомогу з проведенням фізіологічного дослідження. Дослідження фінансово підтримане відомчою тематикою НАН України № держреєстрації 0116U000173.

Перелік літератури

1. Способ создания трансгенных растений с высоким уровнем экспрессии трансгенного белка: пат. 2507736 Российская Федерация. № 2507736; заявл. 11.01.2011; опубл. 27.02.2014, Бюл. № 6.
2. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stöger E., Vasil I. K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports*. 1996. Vol. 16. P. 12–17. doi: 10.1007/BF01275440.
3. Dai S. H., Zheng P., Marmey P., Zhang S. P., Tian W. Z., Chen S. Y., Beachy R. N., Fauquet C. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed*. 2001. Vol. 7. P. 25–33. doi: 10.1023/A:1009687511633.
4. Ding L., Li S., Gao J., Wang Y., Yang G., He G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol Biol Rep*. 2009. Vol. 36. P. 29–36. doi: 10.1007/s11033-007-9148-5.
5. Hamada H., Linghu Q., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(7) P. 11443. doi: 10.1038/s41598-017-17188-2.
6. Ishida Y., Tsunashima M., Hiei Y., Komari T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. In *Agrobacterium Protocols* Vol. 1, Methods in Molecular Biology; Wang, K., Ed. Springer Science + Business Media: New York, NY, USA. 2014. Vol. 1223. P. 189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_15.
7. Ishida Y., Yukoh H., Toshihiko K. High efficiency wheat transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. 2015. Vol. 5. P. 167–175. doi: 10.1007/978-4-431-55675-6_18.
8. Lazzeri P. A., Jones H. D. Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization. *Methods in*

Molecular Biology. 2009. Vol. 478. P. 3–22. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_1.

9. Qin J. B., Wang Y., Zhu C. Q. Biolistic transformation of wheat using the *HMW-GS 1Dx5* gene without selectable markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014. Vol. 13. P. 4361–4371. doi: 10.4238/2014.June.10.3.
10. Richardson T., Thistleton J., Higgins T., Howitt C., Ayliffe M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell Tiss. Org*. 2014. Vol. 119. P. 647–659. doi: 10.1007/s11240-014-0564-7.
11. Sestili F., Janni M., Doherty A., Botticella E., D'Ovidio R., Masci S., Jones H. D., Lafiandra D. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *BMC Plant Biology*. 2010. Vol. 10. P. 1–12. doi: 10.1186/1471-2229-10-144.
12. Vasil V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biotechnol*. 1992. Vol. 10. P. 667–674. doi: 10.1038/nbt0692-667.
13. Weeks J. T., Anderson O. D., Blechl A. E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*. 1993. Vol. 102. P. 1077–1084. doi: 10.1104/pp.102.4.1077.
14. Zhang Z., Liu X., Wang X., Zhou M., Zhou X., Ye X., Wei X. An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes. *New Phytol*. 2012. Vol. 196. P. 1155–1170. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04353.x.
15. Zhou H., Arrowsmith J., Fromm M., Hironaka C., Taylor M., Rodriguez D., Pajeau M., Brown S., Santino C., Fry J. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports*. 1995. Vol. 15. P. 159–163. doi: 10.1007/BF00193711.

References

1. Method of creation of transgenic plants with high level of expression of transgenic proteins: pat. 2507736 Russian Federation. № 2507736; app. 11.01.2011; pub. 27.02.2014, Bull. № 6.
2. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stöger E., Vasil I. K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports*. 1996. Vol. 16. P. 12–17. doi: 10.1007/BF01275440.
3. Dai S. H., Zheng P., Marmey P., Zhang S. P., Tian W. Z., Chen S. Y., Beachy R. N., Fauquet C. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed*. 2001. Vol. 7. P. 25–33. doi: 10.1023/A:1009687511633.
4. Ding L., Li S., Gao J., Wang Y., Yang G., He G. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol*

- Biol Rep. 2009. Vol. 36. P. 29–36. doi: 10.1007/s11033-007-9148-5.
5. Hamada H., Linghu Q., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. 7:11443. doi: 10.1038/s41598-017-17188-2.
 6. Ishida Y., Tsunashima M., Hiei Y., Komari T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. In *Agrobacterium* Protocols Vol. 1, Methods in Molecular Biology; Wang, K., Ed. Springer Science + Business Media: New York, NY, USA. 2014. Vol. 1223. P. 189–198. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_15.
 7. Ishida Y., Yukoh H., Toshihiko K. High efficiency wheat transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. 2015. Vol. 5. P. 167–175. doi: 10.1007/978-4-431-55675-6_18.
 8. Lazzeri P. A., Jones H. D. Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization. *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 478. P. 3–22. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_1.
 9. Qin J. B., Wang Y., Zhu C. Q. Biolistic transformation of wheat using the *HMW-GS 1Dx5* gene without selectable markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014. Vol. 13. P. 4361–4371. doi: 10.4238/2014. June. 10.3.
 10. Richardson T., Thistleton J., Higgins T., Howitt C., Ayliffe M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell Tiss. Org.* 2014. Vol. 119. P. 647–659. doi: 10.1007/s11240-014-0564-7.
 11. Sestili F., Janni M., Doherty A., Botticella E., D'Ovidio R., Masci S., Jones H. D., Lafiandra D. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *BMC Plant Biology*. 2010. Vol. 10. P. 1–12. doi: 10.1186/1471-2229-10-144.
 12. Vasil V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biotechnol.* 1992. Vol. 10. P. 667–674. doi: 10.1038/nbt0692-667.
 13. Weeks J. T., Anderson O. D., Blechl A. E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*. 1993. Vol. 102. P. 1077–1084. doi: 10.1104/pp.102.4.1077.
 14. Zhang Z., Liu X., Wang X., Zhou M., Zhou X., Ye X. et al. An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to Bipolaris sorokiniana and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes. *New Phytol.* 2012. Vol. 196. P. 1155–1170. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04353.x.
 15. Zhou H., Arrowsmith J. W., Fromm M. E., Hironaka C. M., Taylor M. L., Rodriguez D., Pajeau M. E., Brown S. M., Santino C. G., Fry J. E. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in

wheat transformation. *Plant Cell Reports*. 1995. Vol. 15. P. 159–163. doi: 10.1007/BF00193711.

Представлено В. М. Мельником
Надійшла 09.12.2018

STUDY OF TRANSGENE EXPRESSION IN TRITICUM AESTIVUM AFTER AGROBACTERIUM-MEDIATED IN PLANTA TRANSFORMATION

N. A. Zhaliy^{1,2}, M. O. Bannikova¹, M. O. Plugatar³,
L. H. Velikozhon¹, A. M. Taranenko¹, B. V. Morgun^{1,3}

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
of the National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv,
Akademika Zabolotnoho Street, 148
e-mail: molgen@icbge.org.ua

² National University of Food Technologies
Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska Street, 68

³ STC «Institute of Biology and Medicine»
Kyiv National Taras Shevchenko University
Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska Street, 64

Goal. Detection of sequences of target transgenes *np1l* and *bar* in the genome of probable transformants of bread winter wheat *Triticum aestivum* L. cultivars Zymoarka and Podolianka obtained as a result of *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* and determination of their expression level. **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR) method was used independently and in combination with reverse transcription (RT-PCR), electrophoresis of DNA in agarose gel. Tolerance to the herbicide was evaluated in the physiological test. **Results** Through PCR analysis, the sequence of *np1l* transgene was detected in 30 samples of 145 analyzed, the frequency of transformation was 20.7 %. The sequence of the gene *bar* was observed in 85 experimental plants, and the frequency of transformation was 15.6 %. mRNAs of both transgenes were detected, indicating their transcriptional activity and stable expression. **Conclusions** PCR analysis allowed to detect *np1l* transgenic signal in 20.7 % of plants, while the presence of the *bar* gene was detected in 15.6 % of cases, indicating a higher efficiency of this genetic construct. The transcription is shown in all the specimens studied for both transgene. According to the results of the physiological test, 25 % of plants containing the gene *bar* showed resistance to the Basta[®] herbicide.

Keywords: genetically modified organisms, transgenic plants, biotechnological cultures, bread winter wheat, genetic engineering.